

Kinetik des Lipidmetabolismus im Mausmodell der überexprimierten Lysosomalen Sauren Lipasen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Humanmedizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Till Illies
aus Hamburg

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: ein

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	5
1. Lipidmetabolismus.....	6
2. Triacylglycerole und Cholesterol	7
2.1. Extrazellulärer Stoffwechsel	7
2.2. Intrazellulärer Stoffwechsel	12
3. Lipasen.....	15
3.1. Die Lysosomale Saure Lipase.....	15
3.2. Stoffwechsel	16
4. Lysosomale Speicherkrankheiten: Wolman'sche Erkrankung und Cholesterol Ester Speichererkrankung.....	17
4.1. Pathophysiologie	17
4.2. Klinik	18
4.3. Diagnose und Differentialdiagnose.....	19
4.4. Therapie.....	20
5. Arteriosklerose	21
5.1. Tiermodelle	23
6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	25
B Material und Methoden	26
1. Material.....	26
1.1. Geräte.....	26
1.2. Verbrauchsmaterial.....	26
1.3. Chemikalien, Puffer, Enzyme, Primer.....	26
1.4. Versuchstiere.....	28
2. Methoden	28
2.1. Sterilisation und Filtration	28
2.2. Genotypisierung der transgenen Mäuse	29
2.3. Turnover	31
2.4. Detektion der Lipoproteine	34
3. Statistik.....	35
C Ergebnisse	36
1. Turnover mit ¹²⁵ Iod markierten Chylomikronen	36
2. Turnover mit ¹⁴ C markiertem Cholesteryloleat und ³ H markierten Cholesteryloleylether	38
D Diskussion	42
E Zusammenfassung	47
F Verzeichnisse	48

1. Abkürzungsverzeichnis	48
2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	50
3. Literaturverzeichnis	51
G Erklärung	61
H Danksagung	61

A Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Lysosomale Saure Lipase spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel der Lipide. Sie katalysiert die intrazelluläre Hydrolyse von Triacylglycerolen und Cholesterolestern in den Lysosomen, wobei Cholesterol und freie Fettsäuren entstehen. Ein Mangel dieses Enzyms führt zur Akkumulation von Cholesterolestern und Triacylglycerolen in den Zellen. Die Wolman Krankheit und Cholesterolester Speichererkrankung (CESD) sind zwei seltene Erkrankungen mit einem angeborenen Mangel dieses Enzymes. Die pathophysiologischen Vorgänge des dabei vorliegenden Stoffwechsels konnten in Tiermodellen bereits nachvollzogen werden.

Zur weiteren Untersuchung wurde von einer Forschergruppe ein Tiermodell entwickelt, das die Lysosomale Saure Lipase über exprimiert. Bei dessen Charakterisierung wurde eine erhöhte Lipideinspeicherung in der Leber, sowie einer erhöhte VLDL Konzentration im Serum der Versuchstiere gefunden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage untersucht werden, ob die Überexpression der Lysosomalen Sauren Lipase in diesen Versuchstieren zu einer Veränderung der Aufnahmekinetik von Cholesterolestern in die Zellen führt. Hierdurch sollte ein Erklärungsansatz für die bei der Charakterisierung der Mauslinie gefundenen Veränderungen im Lipidstoffwechsel erbracht werden. Die intrazellulär erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase führt zu einer vermehrten Hydrolase von Cholesterolestern zu freiem Cholesterol und freien Fettsäuren. Hierbei könnte durch den höheren Substratumsatz in *futile cycle* eine gesteigerte Aufnahme aus dem Blut in die Zellen ermöglicht werden, so dass es über die höhere Aufnahme von Lipiden zu der vermehrten Einspeicherung kommt. Um diese Frage zu beantworten, sollten Turnoverexperimente durchgeführt werden, in denen die Kinetik der Aufnahme von markierten Cholesterolestern gemessen werden kann.

B Einleitung

Um die funktionsgerechte Arbeitsweise der Zellen aufrecht zu erhalten, verfügt der menschliche Körper über ein komplexes System aus Stoffwechselwegen für die hierfür benötigten Biomoleküle. Diese sind die Kohlenhydrate, Proteine, Nukleinsäuren und Lipide. Hierzu kommen noch Wasser, Vitamine und Spurenelemente. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Stoffwechsel der Lipide. Er wird von Transportmolekülen, Rezeptoren und Enzymen vollbracht. An Lipoproteine gebunden, werden die Lipide zu den Zellen transportiert. Dort erfolgt die rezeptorvermittelte Aufnahme. In den Zellen werden das meist veresterte Cholesterol und die Triacylglycerole hydrolysiert. Es folgt eine organspezifische Verstoffwechslung. So werden im Fettgewebe Fettsäuren als Energielieferant eingespeichert. In Steroidhormon produzierenden Geweben, Nebennierenrinde, Ovarien, Testes und Plazenta, wird Cholesterol zur Synthese von Hormonen umgebaut. Die Leber ist das zentrale Organ im Lipidstoffwechsel, der durch Aufnahme und Sekretion von Lipoproteinen reguliert wird. Sie kann einen Großteil der im Blut befindlichen Lipoproteine aufnehmen und verfügt über Mechanismen zur Sekretion von Cholesterol über die Galle in den Dünndarm.

Nach der rezeptorvermittelten Endozytose werden die Lipide in die Lysosomen eingeschleust, deren Aufgabe in der Zerlegung von komplexen extra- und intrazellulären Molekülen in ihre Bausteine besteht. Hierfür enthalten die Lysosomen verschiedene hydrolytisch wirksame Enzyme. Diese sind die Nukleasen, Proteasen, Lipasen und Glukosidasen. Die Esterbindungen der Cholesterolester und Triacylglycerole werden durch die Lysosomale Saure Lipase gespalten, während der Proteinanteil der sie im Blut transportierenden Lipoproteine durch die Cathepsine in Aminosäuren zerlegt wird. Die erhaltenen Moleküle werden über spezielle Transporter aus den Lysosomen in das Zytoplasma gebracht, von wo aus sie in weitere Stoffwechselwege eingeschleust werden können. Den Lysosomen kommt somit eine große Bedeutung als Schnittstelle zwischen dem extra- und intrazellulären Lipidstoffwechsel zu. Triacylglycerole werden nicht nur intrazellulär in den Lysosomen gespalten, sondern auch von Lipasen, die am Endothel haften. Dies sind unter anderem die Lipoproteinlipase (LPL), die sich in den Kapillaren des Muskel- und Fettgewebes befindet und die hepatische Lipase (HL), die in den Kapillaren des Lebergewebes sitzt.

Erste Hinweise auf die Lysosomale Saure Lipase ergaben sich 1956. Es wurde ein Kind mit aufgetriebenem Abdomen, Hepatosplenomegalie und Kalzifikation der Nebennierenrinden beschrieben, die zugrunde liegende Erkrankung war unbekannt (Abramov *et al.* 1956). Insgesamt sind bis heute mehr als 60 Fälle dieser Erkrankung bekannt. Später wurde sie nach einem ihrer Entdecker Wolman'sche Erkrankung genannt. In der Leber und Niere wurde eine massive Einspeicherung von Lipiden gefunden, auf welche die Hepatosplenomegalie zurückzuführen war. Ein weiteres Kind mit ähnlichen Symptomen, massiver Hyperlipidämie und Hepatomegalie, jedoch ohne Verkalkungen der Nebennierenrinden wurde 1963 beschrieben. In der Leber fanden sich ebenfalls massiv Cholesterolester (Frederickson *et al.* 1963). Die Krankheit wurde Cholesterol Ester Speicher Krankheit genannt (CESD, engl. Cholesterol Ester Storage Disease). In den Patienten beider Erkrankungen wurden verminderte Aktivitäten der Lysosomalen Sauren Lipase festgestellt. Ihre Rolle in der Pathogenese dieser Krankheiten

ist zu großen Teilen geklärt. In Bezug auf andere Störungen des Fettstoffwechsels aber, wie z.B. der Arteriosklerose ist ihre Rolle noch weitgehend ungeklärt (siehe unten).

Diese Arbeit beschreibt den kinetischen Metabolismus von intravenös applizierten Cholesterolestern in transgenen Mäusen, die das Gen der Lysosomale Saure Lipase überexprimieren. Sie schließt sich an eine weitgehende Charakterisierung dieser Mauslinie an (Dissertation S. Mayet 2003). Ziel ist es, die Rolle der Lysosomalen Sauren Lipase in der Zusammenarbeit mit anderen Lipasen und Stoffwechselwegen zu untersuchen. Im Folgenden wird der Lipidstoffwechsel und seine pathologischen Veränderungen, wie die Wolman Erkrankung und CESD, aber auch die Arteriosklerose beschrieben.

1. Lipidmetabolismus

Lipide sind eine heterogene Gruppe von Stoffen, die sich durch ihre Löslichkeit in unpolaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol auszeichnen. Diese Löslichkeit steht im Gegensatz zu der Wasserlöslichkeit von Molekülen, die durch ihre Polarität (Ungleichverteilung von Ladung) vermittelt ist. Da Blut hauptsächlich aus Wasser besteht, müssen Lipide in Mizellenform oder an Lipoproteine gebunden transportiert werden (siehe unten). In Wasser lösliche Stoffe werden hydrophil genannt, darin unlösliche hydrophob. Es werden hydrolysierbare und nicht hydrolysierbare Lipide unterschieden. Die hydrolysierbaren Lipide enthalten eine Esterbindung, die durch eine chemische Reaktion in einen Alkohol und eine Carbonsäure gespalten werden kann. Diese Reaktion heißt Hydrolyse, da sie unter Anlagerung eines Wassermoleküls stattfindet. Selbstständig läuft sie nur sehr langsam ab und wird deshalb im Körper durch biologische Katalysatoren, Enzyme, beschleunigt. Diese Enzyme heißen Hydrolasen oder Lipasen. Beispiele sind die in dieser Arbeit untersuchte Lysosomale Saure Lipase, aber auch die neutrale Cholesterolester Hydrolase (NCEH), die LPL, die HL und andere. Da die Lysosomale Saure Lipase hauptsächlich Triacylglycerole und Cholesterolester zu Freiem Cholesterol und Freien Fettsäuren spaltet, sind sie in dieser Arbeit die wichtigsten Lipide. Die Triacylglycerole (TAG) und Cholesterolester (Sterolester) gehören zu den hydrolysierbaren Lipiden. Weitere Lipide dieser Gruppe sind die Phospholipide (u.a. Sphingolipide) und Glykolipide (u.a. Cerebroside und Ganglioside). In den Triacylglycerolen ist ein Glycerolmolekül mit einer, zwei oder drei Fettsäuren (*engl.* Free Fatty Acid, FFA) verestert. Ein Cholesterolmolekül bildet mit einer Fettsäure ein Cholesterolestermolekül. Bei den ebenfalls wichtigen Phospholipiden ist im Vergleich zu den Triacylglycerolen eine Fettsäure durch ein lipophiles Phosphatmolekül ausgetauscht. Sie haben daher sowohl einen hydrophilen als auch einen hydrophoben Bereich und spielen eine wichtige Rolle in der Zusammensetzung von Lipidmembranen (siehe unten).

Die freien Fettsäuren und freies Cholesterol sind nicht hydrolysierbaren Lipide. Andere nicht Lipide dieser Gruppe sind die Steroide (wie Estradiol und Testosteron), Alkane und Eikosanoide.

Im Körper erfüllen die Lipide unterschiedliche Aufgaben, die sie für den Bestand des Organismus unabdingbar machen. Triacylglycerole sind der Hauptenergielieferant des Körpers. Im Fettgewebe werden sie in Lipidtröpfchen gespeichert und bei Bedarf wieder freigesetzt, um in der β -Oxidation der Fettsäuren Energie in Form von ATP freizusetzen. Diese Energiegewinnung findet in den Mitochondrien statt. Freie Fettsäuren sind außerdem wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von Cholesterole-

lestern, Phospholipiden, Leukotrienen, Thromboxanen und vielen anderen mehr. Das subkutane Fettpolster dient zudem der Kälteisolation des Körpers.

Cholesterol ist ubiquitär in allen Zellmembranen vorhanden und beeinflusst dessen Fluidität entscheidend. Die Membran ermöglicht den Zellen eine sowohl chemische als auch elektrische Trennung des Intra- und Extrazellulärtraumes und so unter anderem die Zellkommunikation. Außer dem Cholesterol finden sich in der Zellmembran Phospholipide, die mengenmäßig deren größten Anteil ausmachen. Phospholipide wirken in der Signaltransduktion mit, bei der von außen ankommende Signale durch die Zellmembran in das Zellinnere geleitet werden. Diese können zum Beispiel durch Hormone vermittelte Wachstumssignale oder durch Zytokine weitergeleitete Entzündungsreaktionen sein. Auch Medikamente wirken zum größten Teil über Rezeptoren und stellen so extrazelluläre Signale dar.

In die Membran eingelassene Glykolipide verwirklichen durch ihre in den Extrazellulärtraum ragenden Kohlenhydratstrukturen eine Rezeptor- und Oberflächenerkennungsfunktion, wie sie zum Beispiel bei den Blutgruppensystemen eine Rolle spielt. Wichtige Steroide sind die Gallensäuren, die die Lipide vor ihrer Aufnahme im Dünndarm emulgieren, sowie die Steroidhormone des Menschen: Cortisol, Aldosteron, Calcitriol, Estradiol, Progesteron und Testosteron. Des Weiteren wirken Lipide als Retinal im Sehprozess mit, unterstützen als Cofaktoren chemische Reaktionen und bilden lipophile Membrananker, um Proteine an Zellmembranen zu heften.

2. Triacylglycerole und Cholesterol

Wie oben beschrieben nehmen Triacylglycerole und Cholesterol unter den Lipiden eine wichtige Rolle ein. In ihrem Stoffwechsel im Körper wird ein extrazellulärer von einem intrazellulären Weg unterschieden. Der extrazelluläre Stoffwechselweg beschreibt hierbei die Verteilung der Triacylglycerole und des Cholesterols über das Blut in die einzelnen Organe. Der intrazelluläre Stoffwechsel beschreibt die Verarbeitung von da an in der Zelle.

2.1. Extrazellulärer Stoffwechsel

Da Triacylglycerole und Cholesterolester im Blut nicht löslich sind, müssen sie an Trägermoleküle gebunden transportiert werden. Diese werden Lipoproteine genannt. In ihnen lagern sich die Apolipoproteine mit Cholesterolestern, Triacylglycerolen, Phospholipiden und anderen Lipiden zusammen (Abbildung 1). Dabei bilden sie einen kugelförmigen Komplex mit hydrophiler Außenschicht und lipophilem Kern. Die Hülle besteht aus dem nach außen gerichteten polaren und damit hydrophilen Teil der Phospholipide, den Apolipoproteinen und unverestertem Cholesterol, während sich die Triacylglycerole und Cholesterolester im Kern ansammeln. Die meisten Apolipoproteine sind, ähnlich wie Phospholipide, amphiphatisch und können so an der Oberfläche der Lipoproteine sowohl mit Wasser als auch mit Lipoproteinen interagieren. Wasserunlöslich sind dagegen die Apolipoproteine B-48 und B-100, die dadurch nicht zwischen den Lipoproteinen ausgetauscht werden können und eine Funktion als Strukturproteine haben (Tabelle 1) (Segrest *et al.* 1992). Ihre Aufgabe besteht in der Stabilisierung der Lipoproteinstruktur und Mitwirken als Cofaktor bei Enzymreaktionen. Hier vermittelt zum Beispiel das Apo-E die Rezeptorgesteuerte Endozytose der Lipoproteine in die Leberzellen oder das Apo-CII die

Hydrolyse von Triacylglycerolen aus den Lipoproteinen an der endothelständigen Lipoproteinlipase (siehe unten). Die Apolipoproteine werden in der Leber und im Dünndarm synthetisiert.

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	Ca. 0,095	<1,006	1,019 –	1,063 –
Serumelektrophorese		prä- β	1,063	1,21
Apolipoproteine	B-48, C-I, II, C-III, E	B-100, C-I, II, C-III, E	β B-100	α A-I, II
Proteingehalt (%)	2	8	21	50
Phospholipide (%)	7	19	22	23
Cholesterolester (%)	5	13	37	18
Triacylglycerole (%)	84	51	11	4

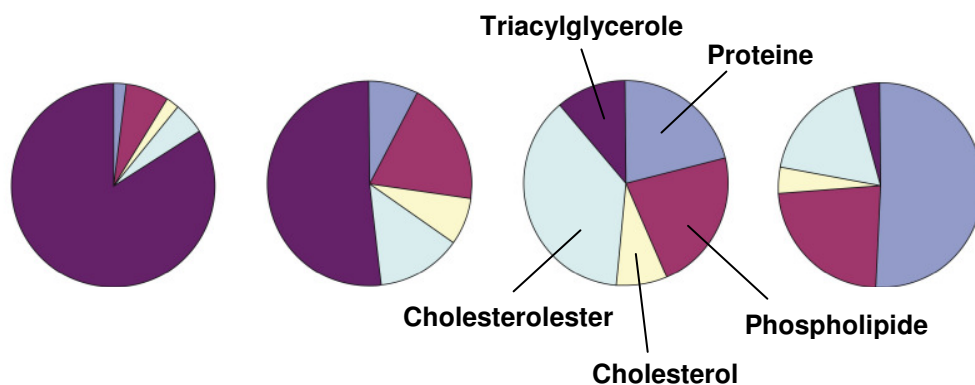


Abbildung 1: Zusammensetzung der Lipoproteine. Die Lipoproteine werden nach ihrer Dichte und Lauflänge in der Serumelektrophorese unterschieden. Die Chylomikronen haben die geringste Dichte und den höchsten Anteil an Triacylglycerolen. In den Lipoproteinen von VLDL über LDL bis HDL nimmt der Anteil an Triacylglycerolen ab und an Cholesterol zu. Gleichzeitig steigen die Dichte und der Proteinanteil an. In der Abbildung unten ist die Lipidzusammensetzung der Chylomikronen, VLDL, LDL und HDL von links nach rechts in Kreisdiagrammen dargestellt. Proteine: Blau, Phospholipide: Rot, Cholesterolester: Türkis und Triacylglycerole: Violett.

Die Lipoproteine werden durch ihr unterschiedliches Verhalten in der Ultrazentrifuge, nach abnehmender Größe und zunehmender Dichte, eingeteilt. Mit der geringsten Dichte und dem größten Durchmesser sind die Chylomikronen triacylglycerolreich und transportieren die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide zu den Körperzellen. Sie fungieren in dem so genannten Exogenen Weg des Lipidstoffwechsels. Durch ihn werden über den Darm aufgenommene Lipide im Körper verteilt und in die Leber gebracht (Goldstein *et al.* 1983). In der Dichte und dem Cholesterolgehalt zunehmend, übernehmen die VLDL (very low density lipoproteins), IDL (intermediate density lipoproteins) und LDL (low density lipoproteins) den endogenen Weg. Hier werden die endogen gebildeten Lipide von der Leber in die Körperperipherie transportiert. Das HDL (high density lipoprotein), das kleinste und cholesterolreichste Lipoprotein, sorgt schließlich für den Reverse Cholesterol Transport, den Transport von Cho-

lesterol aus Zellen der Körperperipherie zur Leber hin. Der extrazelluläre Lipidstoffwechsel kann also in einen endogenen, einen exogenen und einen reversen Mechanismus unterteilt werden.

2.1.1. Exogener Weg

Als exogenen Weg werden die Stoffwechselschritte von der Aufnahme der Lipide über die Darmmukosa, deren Verteilung an die Körperzellen und die Aufnahme in die Leber bezeichnet (Abbildung 2). Diese Aufgabe wird von den Chylomikronen wahrgenommen. Die Lipide können entweder exogen, das heißt mit der Nahrung aufgenommen oder durch den enterohepatischen Kreislauf dem Körper wieder zur Verfügung gestellt werden. Dabei wird über die Galle im Duodenum ausgeschiedenes Cholesterol weiter unten im Dünndarm wieder aufgenommen. Die über die Nahrung aufgenommenen Lipide werden durch Gallensalze und in der Galle enthaltene Phospholipide im Duodenum emulgiert. Nach der Hydrolyse durch die pankreatischen Lipasen diffundieren sie in die Dünndarmmukosazellen (Riley *et al.* 1979). Dort wird das Cholesterol im rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) re-verestert. Dies geschieht durch das Enzym ACAT (Acyl-CoA Cholesterol-Acyl-Transferase). Die freien Fettsäuren werden durch die Fettsäure-CoA-Ligase zu Triacylglycerolen verestert. Die Lipide werden dann mit den Apolipoproteinen B-48, A-I, A-II und A-IV als triacylglycerolreiche Chylomikronen in die Lymphe sezerniert. Über den ductus thoracicus gelangen sie in den linken Venenwinkel und schließlich in das venöse Blutssystem. Dort treten die Chylomikronen in Wechselwirkung mit den HDL, von denen sie die Apolipoproteine C-II, C-III und E übernehmen (Hussain *et al.* 1996). Apo-C-II wirkt als Cofaktor der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL), die in den Kapillaren des Fett und Muskelgewebes lokalisiert ist. Sie hydrolysiert einen Großteil der Triacylglycerole. Die freien Fettsäuren werden von den Zellen des Gewebes aufgenommen (Patsch 1987, Mahley und Ji 1999, Merkel *et al.* 2002). Dort werden sie entweder als Speicherfett re-verestert und in zytoplasmatischen Lipidtröpfchen gespeichert oder als freie Fettsäuren zur Energiegewinnung der mitochondrialen β -Oxidation zugeführt. Im Weiteren nehmen die Chylomikronen über das plasmatische Cholesterolester Transferprotein (CETP) Cholesterolester der HDL auf und geben Triacylglycerole und Apolipoproteine an sie ab. Es entstehen die Chylomikronen Remnants, die Cholesterolester und Apo-E, jedoch kaum noch Triacylglycerole enthalten. Sie werden von der Leber Apo-E vermittelt über den LDL-Rezeptor, den VLDL-Rezeptor oder das LRP (LDL receptor related protein) endozytiert (Beisiegel *et al.* 1989, Beisiegel *et al.* 1994, Beisiegel 1995, Kowal *et al.* 1989, Kowal *et al.* 1990). Die enthaltenen Lipide werden dem intrazellulären Lipidstoffwechsel der Leber zugeführt, während die Rezeptoren und Apolipoproteine zur Wiederverwendung an die Zellmembran geschleust werden (siehe unten) (Herren *et al.* 2001, Heeren *et al.* 2003).

2.1.2. Endogener Weg

Der so genannte endogene Weg, der von den VLDL, IDL und LDL vermittelt wird, dient der Versorgung der peripheren Gewebe mit den in der Leber produzierten, beziehungsweise gespeicherten Lipiden. In den Hepatozyten werden Triacylglycerole zusammen mit Apo-B100 und Phospholipiden als VLDL in die Blutbahn sezerniert (Olofsson *et al.* 1987). Sie übernehmen wie die Chylomikronen von den HDL Apo-C und Apo-E. Die am Endothel der Kapillaren in Muskel und Fettgewebe lokalisierte Lipoproteinlipase hydrolysiert ihre Triacylglycerole, die dann von den Zellen der Gewebe aufgenom-

men werden. Die VLDL schrumpfen durch die Hydrolyse der Triacylglycerole aus dem Kern zusammen, es entstehen VLDL-Remnants. Die überschüssige Oberfläche wird in Form von freiem Cholesterol, Phospholipiden und Lipoproteinen - außer dem Apo-B100 und Apo-E - an die HDL abgegeben. In diesen verestert die LCAT das Cholesterol und gibt es über die CETP als Cholesterolester an die VLDL Remnants zurück (Glomset *et al.* 1966, Glomset 1968). Etwa die Hälfte dieser Remnants wird von der Leber aufgenommen, die andere Hälfte über IDL zu LDL weiter verstoffwechselt. Dies geschieht durch weitere Hydrolyse durch die LPL, HL und wiederum Transfer von Triacylglycerolen an und Cholesterolester von den HDL, welcher vom CETP vermittelt wird. So entstehen die praktisch nur noch Cholesterol und Apo-B100 enthaltenden LDL (Havel *et al.* 1980).

Protein	Vorkommen	Funktion
A-I	HDL	Aktiviert LCAT
A-II	HDL	Aktiviert HL
A-IV	CM	Unbekannt
B-48	CM	SP der Chylomikronen
B-100	VLDL, LDL, Lp(a)	SP der VLDL, LDL
C-I	CM, VLDL	Aktiviert LCAT
C-II	CM, VLDL	Aktiviert LPL
C-III	CM, VLDL	Hemmt LPL
D	CM, VLDL	Unbekannt
E	CM, VLDL	LDL Rezeptor Erkennung
CETP	Plasma	CE von HDL zu VLDL, CM und TG zurück
LCAT	Plasma	Verestert Cholesterol in HDL
HL	Hepatozyten	Hydrolysiert TG aus VLDL, CM
LPL	Endothel	Hydrolysiert TG aus VLDL, CM

Tabelle 1: Apolipoproteine und mit ihnen verbundene Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels. Die Apolipoproteine haben verschiedene Funktionen in den Lipoproteinen. Sie sind Strukturproteine oder wirken als Erkennungssignale für Rezeptoren und Enzyme. LCAT: Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase, ACAT: Acyl-CoenzymA-Cholesterol-Acyl-Transferase, NCEH: Neutrale Cholesterolesterase, LRP: LDL-rezeptorr-related protein, HL: Hepatische Lipase, LPL: Lipoproteinlipase, SP: Strukturprotein, TG: Triacylglycerol, CM: Chylomikronen.

2.1.3. Reverser Cholesteroltransport

Dem Reversen Cholesteroltransport (RCT, reverse cholesterol transport) wird eine große Bedeutung in der Entstehung und Therapie der Arteriosklerose beigemessen. Über ihn wird Cholesterol aus den peripheren Körperzellen zur Leber, dem zentralen Organ des Lipidstoffwechsels, transportiert. Dieser Transport wird durch die HDL vermittelt. Das in ihnen enthaltene Cholesterol macht etwa ein Viertel des insgesamt im Blut vorliegenden Pools aus. Das Hauptapolipoprotein der HDL, das Apo-AI

wird in der Leber synthetisiert (von Eckardstein *et al.* 2001). Mit Phospholipiden angereichert wird es als pre- β -HDL bezeichnet. Da es scheibchenförmig ist, wird es auch diskoidales HDL genannt. An den

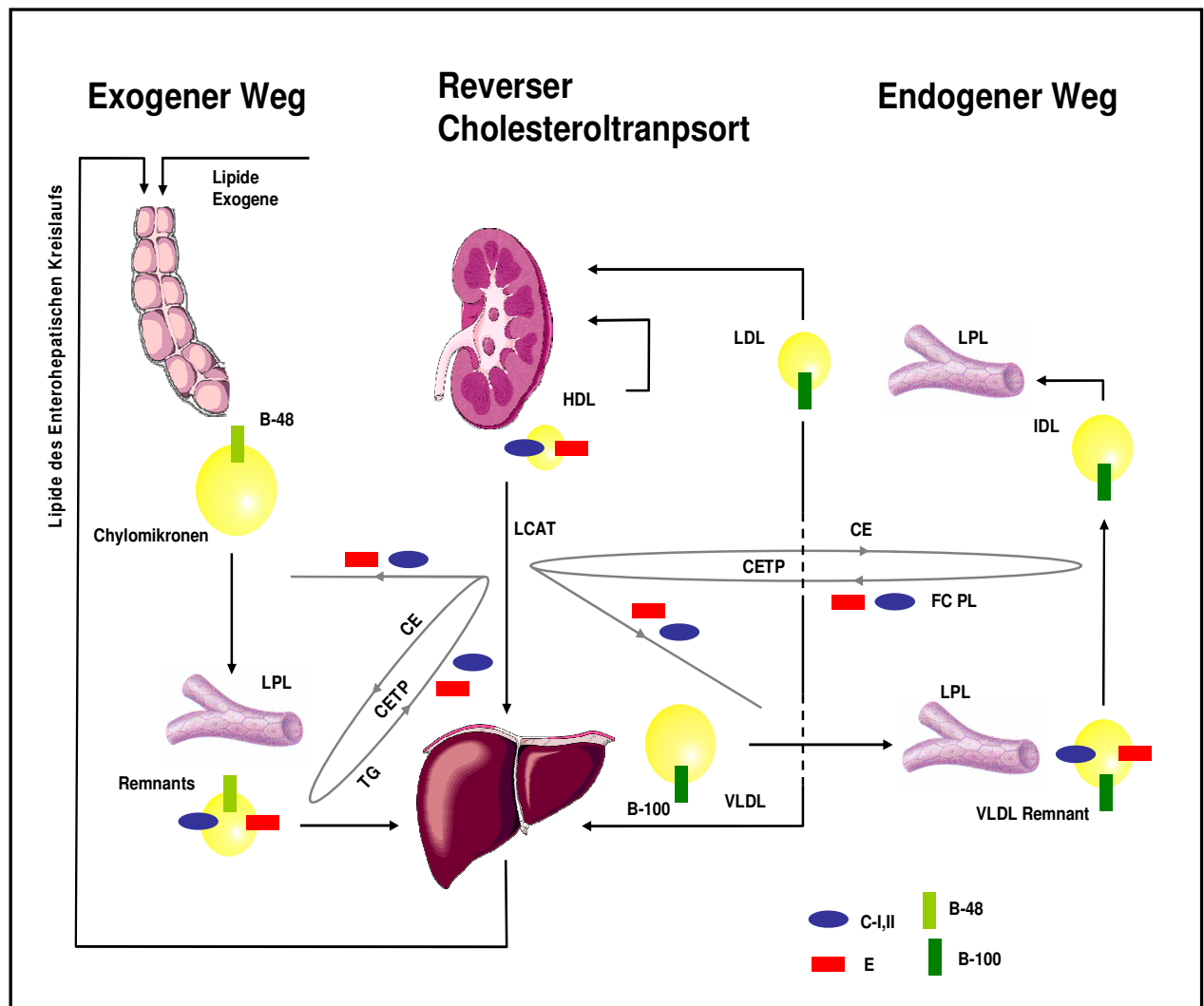


Abbildung 2: Extrazellulärer Lipidmetabolismus. Im Stoffwechsel der Lipide wird zwischen einem exogenen und endogenen sowie dem Reversen Cholesteroltransport unterschieden. Im exogenen Weg (linke Seite) werden Lipide über den Darm aufgenommen. Diese können entweder als exogene Lipide mit der Nahrung aufgenommen werden oder über den Enterohepatischen Kreislauf in den Dünndarm gelangen. Sie werden zusammen mit Apo B-48 als triacylglycerolreiche Chylomikronen in die Lymphe sezerniert, von wo aus sie über den linken Venenwinkel in die Blutbahn gelangen. Dort nehmen sie von den HDL Apo-C und -E auf. Durch Lipolyse der Triacylglycerole an der LPL der Kapillaren des Fett- und Muskelgewebes entstehen triacylglycerolärmere Remnants. Bevor sie Apo-E vermittelt von der Leber aufgenommen werden, geben sie die erhaltenen Apo-C und weitere Triacylglycerole an die HDL ab. Der endogene Weg (rechte Seite) beginnt mit der Sekretion von triacylglycerolreichen und Apo B-100 enthaltenden VLDL aus der Leber. Diese erhalten ebenfalls Apo-C und -E von den HDL und werden wiederum durch die LPL zu Remnants verkleinert. Durch Abgabe von freiem Cholesterol sowie der von ihnen erhaltenen Apolipoproteine an die HDL entstehen die IDL. Weitere Interaktion mit der LPL wandelt sie zu cholesterolreichen LDL um. Die LDL geben das Cholesterol entweder über LDL Rezeptoren an die Leber oder an steroidhormonproduzierende Gewebe, wie die Nebennieren, ab. Der Transport von cholesterolreichen HDL aus der Körperperipherie zur Leber wird über den Reversen Cholesteroltransport bewerkstelligt (Bild Mitte). Die HDL treten in verschiedenen Stufen mit den anderen Lipoproteinen in Interaktion und tauschen mit diesen Apolipoproteine und Cholesterol aus. Apo: Apolipoprotein, C: Cholesterol, CE: Cholesterolester, TG: Triacylglycerole, PL: Phospholipide, LPL: Lipoproteinlipase, CETP: Cholesterolester Transferprotein, LCAT: Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase.

Zellen der Körperperipherie überträgt der ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1), ein transmembranöses Protein, freies Cholesterol und Phospholipide auf diese lipidarmen HDL (Lawn *et al.* 1999, Rust *et al.* 1999). Patienten der Tangier Krankheit, einer autosomal rezessiv vererbaren Erkrankung, die ein defektes ABCA1 Protein aufweisen, haben extrem niedrige HDL Spiegel. Dies ist

Ausdruck eines stark beeinträchtigten Cholesterolausstromes aus den Zellen im RCT (Attie *et al.* 2001). Die Folge ist eine Einlagerung vor allem von Cholesterolestern in Makrophagen, Schwannzellen und glatten Muskelzellen. Die Patienten fallen im Kindesalter durch große orangefarbene Mandeln, rezidivierende sensomotorische Polyneuropathien und eine Hornhauttrübung auf. Weiterhin findet sich eine Hepatosplenomegalie und Hypercholesterinämie sowie Hypertriglyceridämie. Eine erhöhte Anfälligkeit für Arteriosklerose besteht nicht.

Das in die HDL aufgenommene freie Cholesterol wird durch die LCAT, die der Oberfläche der HDL anhaftet, mit Lecithin zu Cholesterolestern umgewandelt (Glomset *et al.* 1966). Die Cholesterolester wandern in den hydrophoben Kern der HDL, während das freie Cholesterol mit den Phospholipiden an der Oberfläche verbleibt. Durch diese Umschichtung nehmen die HDL eine kugelförmige Gestalt an. Sie werden nun als sphärische α_3 -HDL bezeichnet. Sie wachsen durch weitere Aufnahme von Cholesterol und dessen Veresterung durch die LCAT zu großen α_2 -HDL heran (Neary *et al.* 1991, Rye und Barter 2003). Auf diese Moleküle wird das freie Cholesterol nun durch den SR-B1 auf die Lipoproteine übertragen (Ji *et al.* 1997).

Die großen α_2 -HDL tauschen über das plasmatische CETP Cholesterolester und Triacylglycerole mit den VLDL und LDL aus (siehe oben). Phospholipide werden über das PLTP (phospholipide transfer protein) transferiert. Wichtig dabei ist der Übertrag von Cholesterolestern von den HDL auf die VLDL und LDL. Hierdurch wird das Cholesterol aus der Körperperipherie indirekt den Körperzellen über LDL Rezeptoren zugänglich gemacht. Die HDL selber geben ihre Cholesterolester hauptsächlich SR-B1 rezeptorvermittelt an die Zellen ab (Ji *et al.* 1997). Die Scavenger Rezeptoren binden neben modifizierten LDL wie oxidierten oder acetylierten LDL auch HDL mit hoher Affinität (Calvo *et al.* 1997). Sie werden vor allem in Nebennieren, Leber, Testis und Monozyten exprimiert (Murao *et al.* 1997). Im Gegensatz zur Aufnahme der HDL durch den LDL Rezeptor, vermittelt der SRB1 Rezeptor eine selektive Aufnahme der Cholesterolester (Glomset *et al.* 1966, Rigotti *et al.* 1997). Ein dritter Weg der Aufnahme der Cholesterolester aus dem RCT besteht in der Niere über den Cubulinrezeptor, über den das gesamte HDL Molekül aufgenommen wird (Hammad *et al.* 2000). Die freien Fettsäuren der HDL werden durch Hydrolyse der Triacylglycerole über die Lipoproteinlipase, bzw. Hepatische Lipase in die Zellen aufgenommen (Lambert *et al.* 1999, Clee *et al.* 1997). Hierbei werden die großen α_2 -HDL gleichzeitig wieder zu kleinen α_3 -HDL oder pre- β -HDL degradiert, die wieder zur Aufnahme von Cholesterolestern zur Verfügung stehen. Es besteht also ein Kreislauf im Stoffwechsel der HDL, in dem Apo-AI zur Aufnahme von Cholesterolestern zur Verfügung gestellt wird (Wang und Briggs 2004).

2.2. Intrazellulärer Stoffwechsel

Die Aufnahme von Cholesterol in die Zellen geschieht in erster Linie als Cholesterolester über eine Lipoprotein-Rezeptor Interaktion. Der intrazelluläre Stoffwechsel unterscheidet sich in den Zellen verschiedener Gewebe. In der Leber geschieht die Cholesterolaufnahme durch den LDL-Rezeptor (Yamamoto *et al.* 1984, Brown *et al.* 1986), das LDL-receptor-related-protein (Beisiegel *et al.* 1989, Beisiegel 1994), den VLDL-Rezeptor (Takahashi *et al.* 2003) und den Scavenger-Rezeptoren (Goldstein *et al.* 1979, Brown *et al.* 1983). Ein kleiner Teil kann auch direkt als unverestertes Cholesterol per Diffusion durch die Plasmamembran aufgenommen werden (Fielding *et al.* 1995). Die Gruppe der

LDL-Rezeptoren nimmt dabei den Hauptanteil der Cholesterolester auf. Der Rezeptor sitzt an der Zelloberfläche in spezialisierten Bereichen, den so genannten clathrin-coated-pits (Abbildung 3). Ein Gerüst aus Clathrinverstrebnungen liegt hier an der Innenseite der Zellmembran an wo sich später ein Vesikel abschnürt (Higgins und McMahon 2002). Binden Apo-B und Apo-E an den Rezeptor, wird der Membranteil mit dem Clathringerüst als coated-vesicle abgeschnürt und in das Zellinnere verlagert. Durch Verlust der Clathrinhülle und Abfall des pH entsteht hieraus ein Endosom. Bevor das Endosom mit einem Lysosom zum Verdau des Inhaltes fusioniert, schnürt sich ein recycling-vesicle ab, das LDL-Rezeptoren und Apolipoproteine zur Zelloberfläche zurückbringt. So können diese erneut in den

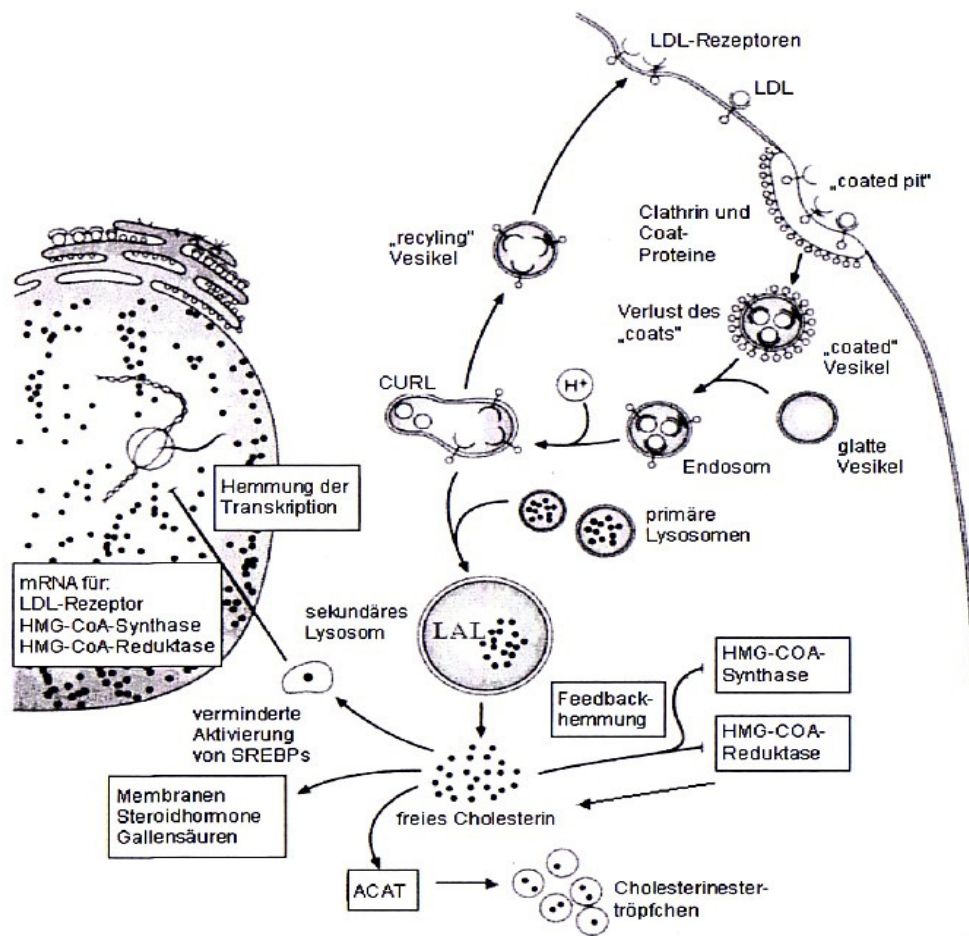


Abbildung 3: LDL Rezeptor und intrazellulärer Stoffwechsel der Lipide. Die LDL Rezeptoren sitzen an der Zelloberfläche in speziellen Bereichen, den „coated pits“. Sie haben an der Innenseite der Plasmamembran ein Clathringerüst, mit dem nach andocken von Lipoproteinen ein „coated“ Vesikel ins Innere der Zelle abgeschnürt wird. Vor Vereinigung mit einem glatten Vesikel zu einem Endosom wird das Clathringerüst abgeworfen. Durch Protonenpumpen, die an der Membran des Endosoms liegen, wird der pH im Inneren abgesenkt. Im Stadium des CURL („compartment of uncoupling of receptor and ligand“) werden die Lipoproteine von den LDL Rezeptoren getrennt, welche in einem „recycling“ Vesikel wieder an die Zelloberfläche gebracht werden. Das Endosom mit den Lipoproteinen vereinigt sich mit einem primären Lysosom zu einem sekundären Lysosom, in dem die unter anderem die Lipide durch die Lysosomale Saure Lipase und die Proteine durch Cathepsin degradiert werden. Freies Cholesterin wird in das Zytoplasma ausgeschleust, wo es entweder durch die ACAT reverestert und in Lipidtröpfchen gespeichert wird, oder zur Synthese von Gallensäuren, Steroidhormonen und Lipoproteinen verwendet wird. Freies Cholesterin bewirkt im Zytoplasma über das SREBP (Steroid Response Binding Protein) eine Feedback Hemmung der intrazellulären Cholesterolsynthese und Runterregulation der LDL Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Abbildung nach (Kostner und März 2002).

Lipoproteinstoffwechsel eingeschleust werden. Das Endosom wird in diesem Stadium als CURL (Compartment of Uncoupling of Receptor and Ligand) bezeichnet (Havel *et al.* 1988, Parton und Richards 2003). Die lysosomalen Enzyme, die ihr Wirkoptimum im sauren pH Bereich haben, zersetzen in den Lysosomen die verbleibenden Lipoproteine. Die Cholesterolester und Triacylglycerole werden dabei von der Lysosomalen Sauren Lipase zu Cholesterol, Monoacylglycerolen und freien Fettsäuren abgebaut, die ins Zytoplasma freigesetzt werden (Goldstein *et al.* 1975, Brown *et al.* 1976).

Die Freisetzung des Cholesterol erfolgt über das Niemann Pick C1 Protein (NPC1) (Strauss *et al.* 2002). Ein Defekt dieses Proteins führt zu der autosomal rezessiv vererbaren Niemann-Pick Erkrankung Typ C. Freies Cholesterol und Glykosphingolipide können nicht mehr aus den Lysosomen ausgeschleust werden und sammeln sich dort an. Die Folge ist eine neurologisch-viszerale Degeneration. Die Patienten zeigen bereits im frühen Kindesalter einen kognitiven Verfall, der mit motorischen Störungen (Chorea, Ataxie, Dystonien und Myoklonien) sowie Krampfanfällen und einer vertikalen supranukleären Blickparese einhergehen kann (Pentchev *et al.* 1995). Weiterhin tritt eine Hepatosplenomegalie auf. Das Cholesterol wird zum einen in die Plasmamembran, zum anderen in das raue Endoplasmatische Retikulum transportiert. Der Transport wird im Zytoplasma über verschiedene Proteine vermittelt (Arakan *et al.* 1998, Seedorf *et al.* 2002).

Der größte Anteil des in der Zelle vorhandenen Cholesterol befindet sich in der Plasmamembran. Zudem liegt im Zytoplasma ein geringer Teil als freies Cholesterol und in Fett- und Steroidproduzierenden Geweben als Cholesterolester in Lipidvakuolen vor. Da freies Cholesterol stark zytotoxisch ist, wird es in Form von Cholesterolester gespeichert. Die Veresterung erfolgt im rauhen Endoplasmatischen Retikulum durch die Acyl-CoA Acyl Transferase (ACAT) (Chang *et al.* 1997). Ihre Aktivität wird über die im Zytoplasma vorhandene Menge an freiem Cholesterol reguliert. Eine Erhöhung des Cholesterol bewirkt eine Aktivierung der ACAT. Um die Zelle vor einer Überladung an Cholesterol zu schützen, wird zusätzlich die Synthese der LDL-Rezeptoren vermindert und weniger externes Cholesterol aufgenommen. Auch die interne Cholesterolproduktion wird durch Herunterregulation des in der Cholesterol synthese geschwindigkeitsbestimmenden Enzymes, der HMG-CoA-Reduktase, gebremst (Assman und Seedorf 1995). Diese Schritte werden über das SREBP (Steroid Response Binding Protein) gesteuert. Das SREBP ist in der Membran des rauhen Endoplasmatischen Retikulum verankert und wird bei sinkendem Cholesterolgehalt zum Golgi Apparat gebracht, wo es von gespalten wird. So aktiviert, wandert es in den Zellkern und bindet an das SRE (Steroid Response Element), einen Transkriptionsfaktor, der die Synthese der oben genannten Stoffwechselwege in Gang setzt (Sakai *et al.* 1998, Wang *et al.* 1994).

Die Utilisation der Cholesterolester aus den Lipidvakuolen erfolgt über Hydrolyse durch die NCEH (Brown *et al.* 1980). Dieser intrazelluläre Kreislauf zwischen verestertem und freiem Cholesterol wird *futile cycle* genannt. Da sowohl die ACAT als auch die NCEH ständig aktiv sind, besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen verestertem und freiem Cholesterol. Der Cholesterolspiegel in der Zelle kann auf diese Weise fein reguliert werden. Überschüssiges Cholesterol kann in der Leber je nach Stoffwechsellage mit der Galle ausgeschieden oder als VLDL/LDL sezerniert werden.

3. Lipasen

Durch ihr Aktivitätsmaximum im sauren pH der Lysosomen bildet die Lysosomale Saure Lipase zusammen mit der Gastrischen Lipase (GL) und der experimentell bedeutsamen RLL (rat lingual lipase) die Familie der sauren Lipasen. Ihnen stehen die neutralen Lipasen gegenüber, zu denen die Hepatische Lipase (HL), die Lipoproteinlipase (LPL), Endotheliale Lipase (EL), die Pankreatische Lipase und die Hormonsensitive Lipase (HSL) gehören. Es sind insgesamt über 50 Lipasen bekannt, für den Lipoproteinstoffwechsel des Menschen sind aber nur einige wenige von Bedeutung. Hierbei spielt die LPL eine wichtige Rolle in der Degradierung von triacylglycerolhaltigen Lipoproteinen, vor allem Chylomikronen und VLDL, und damit der Aufnahme von freien Fettsäuren in periphere Körperzellen. Sie ist an die glykosaminhaltige endotheliale Matrix der Kapillaren gebunden um eine längere Interaktionsdauer mit den daran anhaftenden Lipoproteinen zu ermöglichen. Nach der Lipolyse bindet sie sich an die Lipoproteine und wirkt als Cofaktor an der Rezeptor-vermittelten Aufnahme mit. Die HL ist an die Endothelien der Lebersinusoiden gebunden. Sie besitzt darüber hinaus die Fähigkeit Phospholipide zu spalten. Da die EL im Gegensatz hierzu eine noch höhere lipolytische Aktivität gegenüber Phospholipiden hat, ist sie hauptsächlich im Stoffwechsel der HDL involviert. Die HSL ist intrazellulär in Zellen des Fettgewebes und des steroidhormonproduzierenden Gewebes sowie in Herz- und Muskelzellen lokalisiert. Sie zeigt hydrolytische Aktivität gegenüber Cholesterolestern und Triacylglycerolen und nimmt damit eine Hauptrolle in der Bereitstellung von freien Fettsäuren für die Energiegewinnung des Fettgewebes ein. Darüber hinaus spielt sie durch die Hydrolyse von zytoplasmatischen Cholesterolestern in Rahmen des *futile cycle* eine wichtige Rolle in des intrazellulären Lipidhaushaltes (siehe oben). Ihr Name entstammt ihrer durch Hormone regulierbaren Aktivität. Dabei wirken Adrenalin, Glukagon und ACTH aktivierend, während Insulin und Adenosin ihre Aktivität vermindern (Kraemer *et al.* 2002, Escary *et al.* 1998).

Die verschiedenen Lipasen besitzen zum Teil sehr unterschiedliche Primärstrukturen, haben jedoch außer ihrer lipolytischen Aktivität einige strukturelle und reaktionsspezifische Gemeinsamkeiten. Das aktive Zentrum wird im Kern von einer Aminosäuresequenz gebildet, die katalytische Tetrade genannt. Sie wird von der Sequenz Glycerin-X-Serin-X-Glycerin gebildet, wobei X entweder Aspartat oder Glutamat ist. In einer geschlossenen, inaktiven Form, wird das aktive Zentrum von einer α -helikalen Struktur, dem so genannten „Lid“ bedeckt. Verdeckt durch den „Deckel“ kann in dieser Konformation kein Substrat zur katalytischen Tetrade gelangen. Der „Deckel“ wird bei Kontakt der Lipase mit einer wässrigen Phase geöffnet und das Enzym so in die offene, aktive Form überführt. Dieser als Grenzflächenaktivierung bezeichnete Mechanismus bewirkt, dass die aus den wasserunlöslichen, veresterten Lipiden freigesetzten Fettsäuren zum Beispiel über Kationen gelöst in der wässrigen Phase abtransportiert werden können. Dabei wirkt unter anderem Ca^{2+} als Aktivator, während freie Fettsäuren die Lipasen inhibieren.

3.1. Die Lysosomale Saure Lipase

Die Lysosomale Saure Lipase ist das zentrale Enzym in der intrazellulären Verstoffwechslung der Lipoproteine. Nach der Interaktion mit dem LDL-Rezeptor werden die Lipoproteine in Endosomen aufgenommen. Diese schnüren im CURL-Stadium ein recycling-vesicle ab, in dem Proteinbestandteile

und der LDL-Rezeptor zur Zellmembran zurückkehren. Die verbliebenen Anteile des Endosoms fusionieren mit Lysosomen. In diesen stehen saure Hydrolasen bereit um die Apolipoproteine, Lipide und andere Lipoproteinpartikel zu degradieren. Die Cholesterolester und Triacylglyceride werden dabei von der Lysosomalen Sauren Lipase hydrolysiert. Dabei werden Triacylglycerole etwa zehnmalschneller von der humanen Sauren Lysosomalen Lipase hydrolysiert als Cholesterolester. Auf diese Weise wird der größte Teil der in LDL, aber auch in HDL und Chylomikronen enthaltenen Cholesterolester und Triacylglycerole in der Zelle abgebaut. Die Lysosomale Saure Lipase spaltet bei der Hydrolyse die C_{14} -Fettsäure von den Cholesterolestern ab. Freie Fettsäuren sowie freies Cholesterol werden dann ins Zytoplasma geschleust. Phospholipide aus den Lipoproteinen werden von der Phospholipase A hydrolysiert.

3.2. Stoffwechsel

Die Lysosomale Saure Lipase ist aus verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies extrahiert und untersucht worden. Hierzu zählen die Lunge der Ratte (Brooks und Weinhold 1986), kultivierte Fibroblasten (Sando und Henke 1982, Warner *et al.* 1982), humane Leber (Warner *et al.* 1981), die Leber der Ratte (Fowler und Brown 2004) und Kaninchenleber (Imanaka *et al.* 1984). Erst 1991 gelang es, genug Enzym zur Bestimmung der Peptidsequenz zu extrahieren (Anderson und Sando 1991).

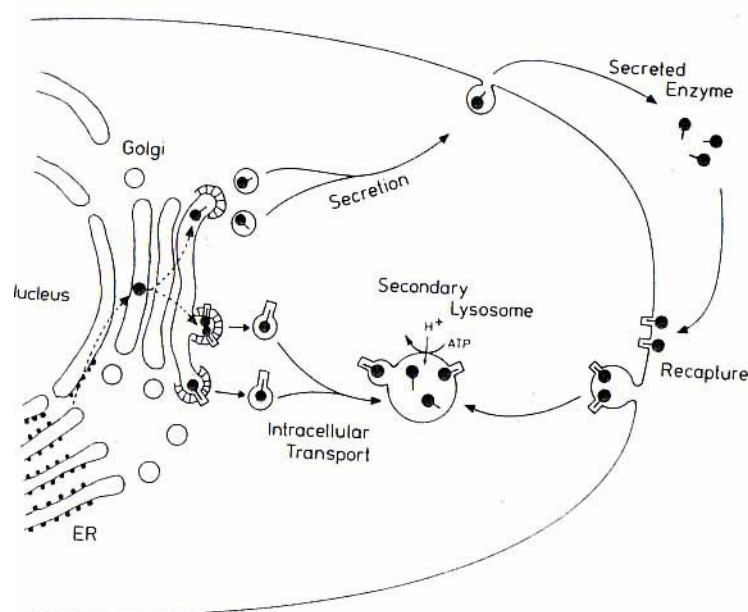


Abbildung 4: Stoffwechsel der Lysosomalen Sauren Lipase. Die Translation der Lysosomalen Sauren Lipase erfolgt an den Ribosomen des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER). Durch eine Signalsequenz an ihrem N-terminalen Ende wird das Protein in das Lumen des RER eingeschleust, von wo es vom trans Ende des Golgi Apparates zum cis Ende gebracht wird. Auf dem Weg dorthin werden an Kohlenhydrat Seitenketten Mannose-6-Phosphat Reste angebracht. Dies ist eine Signalsequenz, die eine Einschleusung in die Lysosomen bewirkt. Die Lysosomale Saure Lipase kann von der Zelle sezerniert und durch Endozytose wieder aufgenommen werden. Diese Aufnahmefähigkeit wird bei der Enzymsubstitution ausgenutzt, indem das Enzym aufgenommen und durch die Mannose-6-Phosphat Sequenz zu den Lysosomen geleitet wird. Abbildung aus (Assmann und Seedorf 1995).

Inzwischen ist die Lysosomale Saure Lipase in ihrer Struktur und Funktion weitergehend erforscht. Das Gen der Lysosomalen Sauren Lipase befindet sich auf dem Chromosom 10q23.2 bis 10q23.3. Es umfasst 10 Exons und 9 Introns (Anderson *et al.* 1993).

Die Translation des Peptides erfolgt an den Ribosomen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (Abbildung 4). Das translatierte Protein enthält eine 27 Aminosäuren (AS) lange Signalsequenz und ein Propeptid von 47 AS. Die hydrophobe Signalsequenz befindet sich am N-terminalen Ende und bewirkt eine co-translationale Einschleusung des Peptides in das Lumen des rauen Endoplasmatischen Retikulums, wo es abgespalten wird. Das Propeptid wird erst später bei der Einschleusung in ein Lysosom entfernt. Im nächsten Syntheseschritt werden dem Peptid Kohlenhydrate angeheftet. Diese Kohlenhydratseitenketten dienen als Signalstoffe für den Zellkontakt, zur Stabilisierung und Sortierung des wachsenden Peptides. Alle Funktionen sind im Einzelnen noch nicht bekannt. Auf dem Weg vom trans Ende des Golgi Apparates zu seinem cis Ende erfolgt die Anheftung von Mannose Molekülen. Es folgt ihre Phosphorylierung zu Mannose-6-Phosphat (Man-6-P) Resten. Die Man-6-P Sequenz ist eine spezifische Erkennungssequenz für lysosomale Enzyme. Nach Bindung der Signalsequenz an Rezeptoren im Golgi Apparat schnürt sich ein Kompartiment ab, welches das Enzym zu den Lysosomen transportiert. Nach Dissoziation von Rezeptor und Ligand schnürt sich wiederum ein *recycling* Vesikel ab und kehrt mit dem Rezeptor zurück zum Golgi Apparat. In dem verbleibenden Prälysosom wird die Lysosomale Saure Lipase durch limitierte Proteolyse modifiziert und durch Abspaltung des Propeptides aktiviert. Durch Fusion mit einem späten Endosom, welches die von LDL aufgenommene Cholesterolester und Triacylglycerole enthält, wird deren Hydrolyse in Gang gesetzt (Anderson *et al.* 1993, Hoflack und Kornfeld 1985, Kornfeld 1986).

4. Lysosomale Speicherkrankheiten: Wolman'sche Erkrankung und Cholesterolester Speicherkrankung

4.1. Pathophysiologie

Sowohl der Wolman'schen Erkrankung also auch der CESD liegt eine verminderte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase zugrunde. Entsprechend der Restaktivität der Lysosomalen Sauren Lipase sammeln sich durch verminderte oder fehlende Hydrolyse Cholesterolester und Triacylglycerole in den Lysosomen an und werden nicht in das Zytoplasma freigesetzt. Durch diese Ansammlung in den Lysosomen entstehen so genannte Lipolysosomen. Der normale Feedback Mechanismus für die Regulation des intrazellulären Cholesterolgehaltes ist durch die ausbleibende Einschleusung von Lipiden aus den Lysosomen in das Zytoplasma unterbrochen. Durch den niedrigen intrazellulären Cholesterolgehalt kommt es zu einer Hochregulation der endogenen Cholesterolsynthese und der LDL Rezeptoraktivität (siehe oben) (Sando *et al.* 1990). Das endozytierte Cholesterolester wird wiederum in die Lysosomen aufgenommen und verstärkt die Entstehung der Lipolysosomen. Die Zellen werden zudem durch die endogene Cholesterolsynthese überschwemmt, es bilden sich zytoplasmatische Lipidvakuolen. Die massive Lipidüberladung der Zellen bewirkt einen Funktionsverlust, Fibrosierung und den Zelltod. Bei der CESD sammeln sich im Gegensatz zur Wolman Erkrankung keine Triacylglycerole im Zytoplasma an, da sie etwa zehnmals schneller von der Lysosomalen Sauren Lipase abgebaut werden und die erhaltene Aktivität ausreicht um sie vollständig zu Hydrolysieren. Von der Lipideinlagerung sind hauptsächlich Organe betroffen, die ihren Cholesterolesterbedarf zum Großteil durch die Auf-

nahme von LDL decken. Dabei werden die Lipide nicht allein in den Parenchymzellen, sondern auch in Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES), wie Makrophagen und Kupfferzellen, gespeichert. Die Leber, die etwas mehr als zwei Drittel der gesamten LDL aus dem Blut aufnimmt, ist besonders betroffen. Die Vergrößerung der Milz ist im Wesentlichen auf ihren hohen Gehalt von sinusoidalen Schaumzellen zurückzuführen. Dies sind Makrophagen, die über ihren Scavenger Rezeptor modifizierte LDL aufnehmen und durch die Abwesenheit der Lysosomale Saure Lipase nicht im Stande sind, die enthaltenen Cholesterolester abzubauen. Die so in großen zytoplasmatischen Lipidvakuolen akkumulierten Cholesterolester verleihen den Zellen das schaumige Aussehen. Bei der Wolman'schen Erkrankung kann eine für diese Erkrankung pathognomonische Kalzifizierung der Nebennierenrinde beobachtet werden. Die erhöhte Aufnahme von oxidierten LDL in die Zellen führt dabei zu einem Anstieg des Ca^{2+} Spiegels, der eine Kalzifizierung und Apoptose bedingt (Marshall *et al.* 1968).

Die zugrunde liegenden Unterschiede in der Entstehung der Wolman'schen Erkrankung und CESD sind nicht vollständig geklärt. Es wurde eine Vielzahl verschiedener genetischer Defekte aufgedeckt, aus denen sich aber keine eindeutige Zuweisung einer Mutation zu einer Erkrankung durchführen ließ. Die Variabilität der Veränderungen der DNS scheint bei der Wolman'schen Erkrankung jedoch größer zu sein. Bei Patienten der CESD wird vermutet, dass eine erhaltene Restaktivität der Lysosomale Saure Lipase die Akkumulation der Triacylglycerole verhindert und die völlige Entgleisung der Stoffwechselregulation in der Zelle begrenzt, wie dies bei der Wolman Erkrankung der Fall ist (Lohse *et al.* 1999, Assman und Seedorf 1995).

4.2. Klinik

Trotz der gemeinsamen zugrunde liegenden Pathophysiologie, der verminderten oder nicht vorhandenen Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase, unterscheiden sich die Verläufe der beiden Erkrankungen erheblich voneinander.

4.2.1. Wolman'sche Erkrankung

Die Wolman'schen Erkrankung, bei der keine oder eine nur sehr geringe Restaktivität der Lysosomalen Sauren Lipase vorhanden ist, hat einen früheren Beginn und verläuft gravierender als die CESD. Die Patienten, die bereits vor der Geburt symptomatisch werden, versterben meist innerhalb der ersten drei bis sechs Lebensmonate. Selten erreichen sie das erste Lebensjahr. Ein Fall eines fünfjährigen Patienten ist beschrieben, der erfolgreich mit einer Knochenmarkstransplantation behandelt wurde (Krivit *et al.* 2000). Die Symptome treten oft in den ersten Lebenswochen auf und beginnen unspezifisch mit Erbrechen und wässrigen Durchfällen. Die Durchfälle werden auf eine Darmschädigung durch Ablagerung der Cholesterolester in den Darmepithelien und daraus folgende intestinale Malabsorption zurückgeführt. Selten besteht ein Ikterus oder Fieber. Im weiteren Verlauf fallen das verminderte Größenwachstum und das hervorstehende Abdomen auf, welches durch die massive Vergrößerung von Leber und Milz entsteht. Pathognomonisch für die Wolman'sche Erkrankung sind die bilateralen Verkalkungen und Vergrößerungen der Nebennierenrinden bei erhaltener Form, die auf der Abdomen Übersichtsaufnahme röntgenologisch sichtbar werden (Marshall *et al.* 1968). Eine Hepatosplenomegalie mit Nebennierenrindenverkalkungen sollte immer den Verdacht auf die Wolman'sche Erkrankung lenken, obgleich dieser Befund auch bei der CESD gesehen wurde. Obwohl keine fokalen neurologischen Symptome zu beobachten sind, ist die neurologische Entwicklung der

Patienten verzögert und nimmt einen dementiellen Verlauf an. Das Elektroenzephalogramm ist normal. Es gibt keine für die Erkrankung spezifischen Laborparameter. Die Plasmalipide bewegen sich im Gegensatz zur CESD im niedrig normalen Bereich. Die Leberenzyme sind teilweise leicht erhöht, können aber auch vollständig normal sein. Manche Patienten haben zudem eine Anämie (Assmann und Seedorf 1995).

4.2.2. CESD

Die Cholesterolesterspeicherkrankheit zeichnet sich durch eine sehr variable Ausprägung und einen ebensolchen Verlauf aus. Zurückzuführen ist dies auf die unterschiedliche Restaktivität der Lysosomale Saure Lipase in den Körperzellen. Das Kardinalsymptom, die Hepatomegalie, kann schon bei Geburt, häufiger in der frühen Kindheit oder bei sehr milder Ausprägung erst im späteren Lebensalter in Erscheinung treten. Nach längerem Verlauf wird die Leber meist bindegewebig durchsetzt und es entwickelt sich eine Leberfibrose. Auch das Endstadium dieser Umwandlung, die Leberzirrhose ist möglich. In einzelnen Fällen wurde ein akutes oder chronisches Leberversagen beobachtet. Eine Splenomegalie, wie in der Wolman'schen Erkrankung, tritt nur in zirka einem Drittel der Fälle ein. Weitere, nicht durchgängig vorhandene Symptome umfassen einen Ikterus, abdominale Schmerzen, gehäufte gastrointestinale Blutungen sowie Nasenbluten. Neurologische Symptome wurden nur in einem Patienten mit unerklärten Kopfschmerzen, vermehrtem Schlafbedürfnis, Schwindel und Bewusstseinsverlust gefunden (Lageron *et al.* 1967). Intestinale Malabsorption und Gallensteine, wie bei der Wolman'sche Erkrankung wurden nicht beobachtet. Die für die Wolman'sche Erkrankung typischen bilateralen Verkalkungen der Nebennierenrinden wurden auch in einem Fall der CESD gefunden, allerdings in geringer Ausprägung als fleckige Verkalkungen. Sie gelten daher als pathognomonisch für die Wolman'sche Erkrankung. In den Laborwerten fällt bei allen Patienten mit CESD eine Hypercholesterinämie zwischen 250 und 400 mg/dl auf. Teilweise ist diese mit einer Hypertriglyceridämie verbunden.

4.3. Diagnose und Differentialdiagnose

Geht aus der klinischen Beobachtung der Verdacht auf die Wolman'sche Erkrankung hervor, sollte nach weiteren Symptomen wie Hepatosplenomegalie, gastrointestinalen Beschwerden, verzögertem Wachstum und neurologischen Symptomen gesucht werden. Möglichst früh sollte eine Röntgenaufnahme des Abdomens angefordert werden, da der zusätzliche Nachweis von Verkalkungen der Nebennierenrinden den Verdacht der Wolman'schen Erkrankung erhärtet (Abbildung 5). Differentialdiagnostisch müssen als Ursache der Verkalkungen der Morbus Addison, adrenale Teratome, Neuroblastome, Phäochromocytome und Karzinome in Betracht gezogen werden. Die Niemann-Pick Krankheit, bei der keine solchen Verkalkungen zu sehen sind, ist somit ausgeschlossen. Des Weiteren müssen andere Erkrankungen, wie die Adrenoleukodystrophie und solche, bei denen Triacylglycerole und nicht Cholesterolester eingespeichert werden, wie z.B. die Neutral Lipid Storage Disease (NLSD) ausgeschlossen werden. Die CESD mit ihrem variablen Krankheitsbild ist anderen Lysosomalen Speicherkrankheiten ähnlich und muß differentialdiagnostisch gegen sie abgegrenzt werden. Der Beweis einer Defizienz der Lysosomalen Sauren Lipase kann nur durch den Nachweis ihrer verminderten biochemischen Aktivität geführt werden. Hierfür werden vornehmlich Leukozyten und kultivierte Hautfibroblasten benutzt.

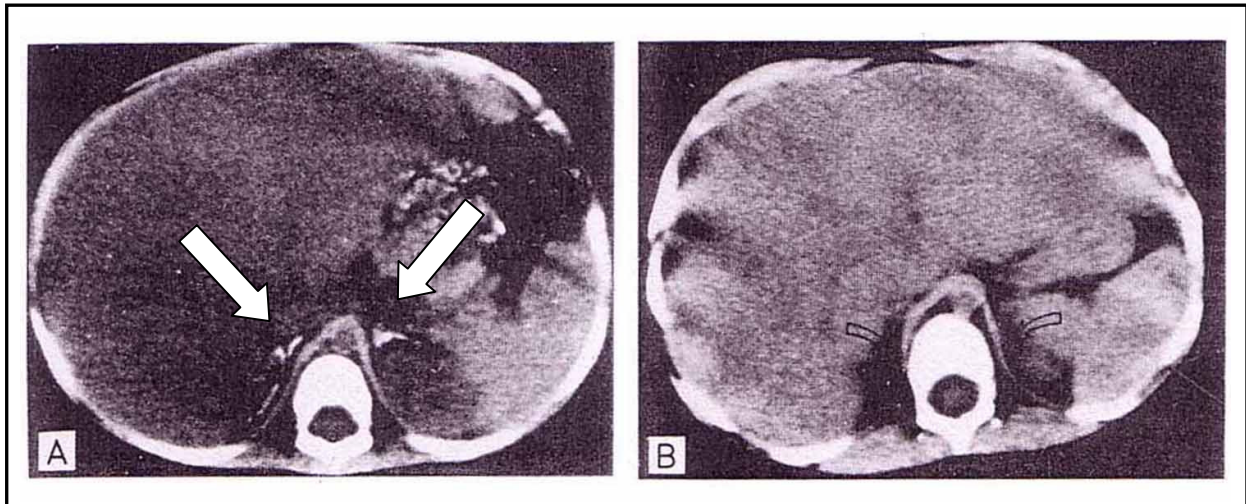


Abbildung 5: Computertomographie von Patienten mit Wolman Erkrankung und CESD. Bei dem Patienten mit Wolman Erkrankung (A) ist die Vergrößerung der Leber und die typische Verkalkung der Nebennieren zu erkennen (weiße Pfeile). Der Patient mit CESD (B) weist eine Lebervergrößerung auf, die Nebennieren sind nicht verkalkt.

Ein standardisiertes Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität ist bis heute nicht eingeführt. Verschiedene Methoden sind in der Literatur beschrieben. Diese unterscheiden sich durch die angebotenen Substrate wie Cholesterolester, Triacylglycerole oder synthetische Ester sowie deren Darreichung in Form von Konzentration oder Mizellenbildung. Die Substrate werden üblicherweise radioaktiv markiert um über eine scintillatorische Messung ihre Konzentration bestimmen zu können. Benutzt werden unter anderem am Fettsäurerest mit 14 -Kohlenstoff markierte Cholesterolester. Die durch Fluoreszenz sichtbar gemachten synthetischen Substrate wie Pyren-Methyl-Laurat haben den Nachteil der geringeren Spezifität. Verschiedene andere Faktoren scheinen darüber hinaus die Aktivitätsbestimmung zu beeinflussen. Die Substratlösung kann mit Detergenzien versetzt oder als Mizellen dargeboten werden, um ihre Wasserlöslichkeit zu verbessern. Darüber hinaus erhöht die Anwesenheit von Phospholipiden und Gallensalzen die Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase.

4.4. Therapie

Neben cholesterol- und triacylglycerolarmer Diät steht bei Patienten der CESD die Behandlung mit Statinen und Anionenaustauschern im Vordergrund. Statine sind Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterolsynthese. Hierdurch wird die massive endogene Biosynthese gebremst, die durch die fehlende Ausschleusung von Cholesterol in das Zytoplasma hochreguliert ist. Durch Anionenaustauscher werden im Darm Gallensalze gebunden und so dem Enterohepatischen Kreislauf entzogen, durch den ein Großteil des über die Galle ausgeschiedenen Cholesterols wieder vom Körper aufgenommen wird. Auf diese Weise konnte in an CESD erkrankten Patienten gezeigt werden, dass sowohl die erhöhten Serumcholesterolspiegel (hauptsächlich in Form von HDL), als auch die Vakuolisierung in Leberbiopsien in einem Zeitraum von einem bis neun Jahren deutlich erniedrigt wurde (Leone *et al.* 1991, Glueck *et al.* 1992). Ein Patient der Wolman'schen Erkrankung wurde erfolgreich mit einer Knochenmarkstransplantation behandelt. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung war er bereits fünf Jahre alt, was deutlich die Lebenserwartung anderer Wolman Patienten übersteigt. Die Aktivität der Lysosomale Saure Lipase in peripheren Leu-

kozyten und die Cholesterol- sowie Triacylglycerolwerte in Serum hatten sich normalisiert. Die beeinträchtigte Leberfunktion erholte sich auf Normalwerte. Die Verbesserungen wirkten sich ebenfalls positiv auf die weitere Entwicklung des Kindes aus (Krivit *et al.* 2000).

5. Arteriosklerose

Arteriosklerose ist eine Erkrankung der innersten Schicht der Arterienwand, der Intima. Sie engt das Gefäßlumen ein und kann zum vollständigen Verschluss führen. Da sie in den entwickelten Industrieländern die häufigste zugrunde liegende Ursache für tödlich verlaufende Erkrankungen darstellt, ist sie eine der so genannten großen Volkskrankheiten. Klinisch manifestiert sich der durch die Verengung zustande kommende verminderte Blutzufuss zum Gewebe in der Koronaren Herzkrankheit (KHK), der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK), der Angina Abdominalis und Stenosen der hirnversorgenden Gefäße, die Schlaganfälle verursachen können. Die Ursachen der Arteriosklerose sind multifaktoriell bedingt. Durch klinische Studien wurden Risikofaktoren herausgearbeitet, die im Zusammenhang mit einer erhöhten Arterioskleroseinzidenz stehen (Tabelle 2) (Libby 1999). Es existieren unbeeinflussbare Risikofaktoren wie z.B. hohes Alter oder männliches Geschlecht neben beeinflussbaren Risikofaktoren. Häufige Grunderkrankungen, die zur Ausbildung einer Arteriosklerose führen sind ein Diabetes Mellitus, Bluthochdruck und hohe LDL Cholesterolspiegel. LDL ist neben anderen Apo-B enthaltenen Lipoproteinen die Hauptquelle für atherogene Lipide. Ein hohes HDL Cholesterol hingegen scheint einen protektiven Wert durch seine Funktion im reversen Cholesteroltransport, sowie durch eine antiinflammatorische Wirkung zu haben (Mackness *et al.* 1993, Spady 1999, Stein und Stein 1999). Als unabhängiger Risikofaktor 2. Ordnung gilt unter anderem ein hoher Wert für das Lipoprotein(a). Lipoprotein(a) ist ein LDL ähnliches Molekül, in dem über Disulfidbrücken ein Apolipoprotein(a) an das Apo-B gebunden ist. Buechler *et al.* konnten zeigen, dass hohe Lipoprotein(a) Werte sowohl die Aktivität der Lysosomalen Säuren Lipase über ihre mRNA herunterregulieren, als auch das inflammatorische IL-6 hochregulieren. Beides steht mit der Entwicklung der Arteriosklerose in Verbindung (Buechler *et al.* 2003). Das im Blut transportierte LDL diffundiert durch einen passiven Prozess durch das Endothel der Gefäße (Gimbrone 1999). Dort werden die Lipoproteine durch Wechselwirkung ihres Apo-B mit Proteoglykanen der extrazellulären Matrix festgehalten. Es kommt zur Aggregation der Moleküle. Durch die lange Verweildauer im subendothelialen Spalt unterliegen die LDL verstärkt Modifikationen durch die dort vorhandenen Enzyme und Radikale. Für die Entstehung der Arteriosklerose ist hierbei die Oxidierung der wichtigste Prozess. Sie wird durch oxidativen Abfall der Endothelzellen katalysiert. In knock-out Experimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Enzym Lipooxygenase hierbei eine besondere Rolle spielt (Cyrus 1999). Aber auch eine Acetylierung wirkt atherogen. Da das Apo-B die Retention im subendothelialen Raum vermittelt, wirken auch Lipoprotein(a) und Remnants atherogen. Die oxidierten LDL (oxLDL) stimulieren das Endothel zur Zytokinfreisetzung und Synthese von Adhäsionsmolekülen für Entzündungszellen. So werden Monozyten angezogen, die durch das Endothel migrieren und sich zu Makrophagen differenzieren. Auch T-Lymphozyten und Granulozyten sammeln sich in der Intima an und fördern die Entzündungsreaktion. Stark oxidierte LDL werden von den Makrophagen über die Scavenger Rezeptoren SRA, CD 36 und SRB aufgenommen. Dies sind Rezeptoren, die spezialisiert auf die Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen sind. Im Gegensatz zu anderen Lipoproteinrezeptoren, wie dem LDL Rezeptor, wird ihre

Oberflächendichte nicht durch die intrazelluläre Cholesterolkonzentration reguliert. Da die Konzentration der oxLDL sehr hoch ist, nehmen die Makrophagen die Lipoproteine ungesteuert auf. Die oxLDL vermindern zudem die Geschwindigkeit der weiteren Abbauege, so dass sie in den Lysosomen der Makrophagen akkumulieren (Lipolysosomen und Lipidvakuolen in Zytoplasma). Durch das schaumige Aussehen, das die Makrophagen dadurch unter dem Mikroskop erhalten, werden sie Schaumzellen (foam cells) genannt. Dieses Stadium der arteriosklerotischen Läsion wird als *fatty streak* bezeichnet. Um die Lipide wieder abzugeben, produzieren die Makrophagen Apo-E, über welches in Verbindung mit HDL das Cholesterol in den Reversen Cholesteroltransport eingespeist wird. Auf diese Weise wirkt HDL antiatherogen. Es wirkt jedoch wahrscheinlich auch über seine Enzymausstattung, unter anderem mit der Paraoxonase, die der Oxidierung der Phospholipide entgegenwirkt, der Entzündungsreaktion entgegen. Durch Cytokinproduktion der Makrophagen und Lymphozyten werden glatte Muskelzellen aus der Media angelockt. Sie beginnen in der Läsion zu proliferieren und synthetisieren extrazelluläre Matrix. Aus den *fatty streaks* entwickelt sich so eine fibröse Läsion mit einem fibrösen Plaque (*fibrous cap*) und einem lipidreichen Inneren (*lipid core*). Die fibröse Plaque wird von den glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix gebildet und kann im Laufe der Zeit Kalzifizieren und Vaskularisieren. Im *lipid core* entsteht durch Untergang von Schaumzellen eine nekrotisierende Zone. Es besteht die Gefahr der akuten Ruptur der fibrösen Plaque. Auf die rupturierte Stelle lagert sich ein Thrombus auf, der das Gefäßlumen akut verschließen kann. Auf diese Weise entsteht die Klinik des Akuten Koronarsyndromes (ACS). Die Plaque rupturiert bevorzugt an den Rändern. Es wird angenommen, dass ein hoher Gehalt an Schaumzellen in diesem Bereich sie destabilisiert (Lusis 2000).

Unbeeinflussbare Risikofaktoren	Beeinflussbare Risikofaktoren	Beeinflussbare Risikofaktoren
	1. Ordnung	2. Ordnung
Familiäre Disposition	Hohes LDL	Lipoprotein (a)
Lebensalter	Niedriges HDL	Hyperfibrinogenämie
Männliches Geschlecht	Hohe Triglyceride	Hyperhomocysteinämie
	Hypertonus	Antiphospholipid AK
	Diabetes Mellitus	Bewegungsmangel
	Metabolisches Syndrom	Genetisch t-PA-Defekte
	Zigarettenrauchen	Psychosoziale Faktoren: Stress

Tabelle 2: Risikofaktoren der Arteriosklerose: Es existieren beeinflussbare und unbeeinflussbare Risikofaktoren der Arteriosklerose. Die beeinflussbaren Risikofaktoren werden noch einmal in Faktoren 1. und 2. Ordnung unterteilt.

Welchen Stellenwert die Lysosomale Saure Lipase in der Arterioskleroseentstehung einnimmt, ist noch nicht vollständig verstanden. In Tierversuchen wurde in Homogenaten von arteriosklerotisch veränderten Aortenpräparaten eine bis zu dreieinhalbfach erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase gefunden. Dies wurde als Antwort auf die erhöhte Lipidbelastung der Zellen gesehen (Morisaki *et al.* 1982). Auf der anderen Seite wurde vermutet, dass die erhöhte Konzentration der Lysosomalen Sauren Lipase in den arteriosklerotischen Plaques Ursache für die Lipidakkumulation ist. Da das En-

zym ein Marker für Makrophagen ist, scheinen diese eine gesonderte Rolle zu spielen (Davis *et al.* 1985). 1999 wurde beobachtet, dass die Cholesterolester der subendothelial festgehaltenen LDL durch sezernierte Lysosomale Saure Lipase hydrolysiert werden. Ein anderes lysosomales Enzym, das Cathepsin B verändert dabei das Apo B-100 (Buton *et al.* 1999). Lysosomale Enzyme werden von Makrophagen als Antwort auf den Entzündungsreiz sezerniert (Hakala *et al.* 2003). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise auf eine schützende Funktion der Lysosomalen Sauren Lipase in Bezug auf die Arteriosklerose. So wurde in arterioskleroseanfälligen Tieren, wie Hunden, Ratten und Meerschweinchen eine erniedrigte Aktivität nachgewiesen (Bonner *et al.* 1972). Von einer Forschergruppe wurde 1998 in LDL Rezeptor *knock out* Mäusen mit arteriosklerotischen Veränderung verschiedener Stadien humane Lysosomale Saure Lipase injiziert. Das Enzym wurde in den Tieren in Kupffer- und Schaumzellen wieder gefunden. Ein Rückgang der Gefäßveränderungen wurde beobachtet. Die Lysosomale Saure Lipase scheint also eine doppelte Bedeutung in der Entstehung der Arteriosklerose zu haben. Eine erhöhte intrazelluläre Aktivität wirkt der Lipidakkumulation der Zellen entgegen, während sie extrazellulär in der enzymatischen Veränderung der proatherogenen LDL mitwirkt (Du *et al.* 2003).

5.1. Tiermodelle

Es sind verschiedene Tiermodelle zur Erforschung der Lysosomalen Lipase beschrieben worden. In Knock-out Mäusen wird das Gen der Lysosomalen Sauren Lipase gezielt durch eine Nullmutation ausgewechselt, so dass die Tiere nur ein oder gar kein Allel für den jeweiligen Genort besitzen. Das Protein, wofür das Gen kodierte, wird nicht mehr oder mit verminderter Aktivität synthetisiert. Transgenen Tieren wird mit gentechnischen Methoden ein zusätzliches Gen in die DNS eingefügt. Das Gen wird an zufälliger Stelle in die DNS einbaut. Daher muß die Mauslinie daraufhin untersucht werden, ob sich der Genort auf einem Intron befindet und so nicht an der Proteinbiosynthese teil nimmt oder in ein anderes Gen eingesetzt wurde und dieses zerstört hat.

Ein Knockout Modell in Mäusen der Wolman'schen Erkrankung wurde 1998 beschrieben. Durch gezielte Mutation wurde das Gen der Lysosomalen Sauren Lipase der Mäuse durch eine Nullmutation ausgewechselt. So wurden homozygote *lal* (-/-) und heterozygote *lal* (+/-) Mäuse erhalten. Die homozygoten Tiere waren fruchtbar und wurden in Verhältnissen nach den Mendelschen Vererbungsregeln geboren. Zu Geburt waren sie phänotypisch normal. Es konnte weder das Enzym, noch eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Im Verlauf entwickelten sich eine massive Lipideinspeicherung in Leber, Nebennieren, Dünndarm und einem einzelnen mesenterialen Lymphknoten. Die Leber vergrößerte sich auf das Zweifache ihrer normalen Größe. Zunächst wurden die Lipide in Hepatozyten, später, im Alter von etwa 6 Monaten, in Kupfferzellen eingespeichert. Braunes und weißes Fettgewebe verschwanden in zunehmendem Maße. Plasma Cholesterol und Triacylglycerolspiegel stiegen im Vergleich zu wildtyp Mäusen signifikant an. Die Mäuse starben im Alter von sechs bis acht Monaten. Die heterozygoten Mäuse zeigten eine Verminderung der Lysosomale Saure Lipase Aktivität um etwa die Hälfte und keine Lipidakkumulation (Du *et al.* 1998, Du *et al.* 2001a).

Den homozygoten *lal* (-/-) Mäusen wurde zunächst eine in *pichia pastoris* synthetisierte Lysosomale Sauren Lipase in die Schwanzvene injiziert. Durch die angeheftete Mannose-6-Phosphat Erkennungssequenz wurde sie in die Lysosomen der Zellen geschleust (Sando und Henke 1982). Im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Tieren PBS injiziert wurden, fand sich eine deutliche Aufnahme in

Kupferzellen sowie Lungen- und Darmmakrophagen. Nach 30 Tagen Therapie zeigten sich eine deutliche Entspeicherung der Lipide in Leber, Milz und Dünndarm (Du *et al.* 2001b). In einer neueren Arbeit wurde den homozygoten Tieren ein adenoviraler Vektor mit der cDNS (komplementären DNS) der humanen Lysosomale Saure Lipase intravenös injiziert. Wieder im Vergleich mit Kontrolltieren, denen PBS gespritzt wurde, wurde das Protein der humanen Lysosomalen Sauren Lipase in hepatischen Parenchym- und Kupferzellen, sinusoidalen Milzzellen, Lungenmakrophagen und in der Nebennierenrinde gefunden. Die Speicherreduktion von Cholesterol und Triacylglycerolen in den Geweben betrug bis zu 68%. Diese Ergebnisse geben Hoffnung auf zukünftige Entwicklungen in der Therapie der Wolman'schen Erkrankung und der CESD, obgleich eine Anwendbarkeit auf den Menschen erst sorgfältig vorbereitet werden muß (Du *et al.* 2002).

Ein anderes, transgenes Mausmodell, welches für diese Arbeit benutzt wurde, zeigt eine Überexpression des Gens der Lysosomalen Sauren Lipase. Eizellen von Wildtyp C57/Black Mäusen wurden ein linearisiertes, aufgereinigtes ApoAI-hLAL Fragment mikroinjiziert und diese dann in ein scheinchwangeres Empfängertier eingepflanzt. Aus den Nachkommen wurden die transgenen Tiere der ersten Generation, Founder genannt, ausgewählt. Die Linie mit der höchsten Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase, Linie24 genannt, wurde zur weiteren Charakterisierung gezüchtet. Die Tiere wurden unter normaler und unter einer mit Cholesterol angereicherten, der so genannten westlichen Diät, untersucht. Die Expression des humanen Lysosomalen Sauren Lipase Gens wurde durch Vergleich mit anderen Organen als leberspezifisch nachgewiesen. Ihre Aktivität betrug bei den Männchen das Siebenfache, bei den Weibchen das Achtfache des Normalen. Dieser Unterschied deutet auf eine geschlechtsspezifische Regulation des Apo-AI Promotors hin. In den Untersuchungen unter normaler Diät konnte lediglich in den Lebern transgener Weibchen eine Verschiebung im Fettsäuremuster festgestellt werden. Diese Tiere hatten außerdem tendenziell höhere VLDL Werte im Plasma, die jedoch nicht signifikant erhöht waren.

Die mit der westlichen Diät gefütterten Tiere wiesen im Serum eine VLDL und HDL Erhöhung auf. Sie war in den transgenen Tieren signifikant höher als in den Tieren der Vergleichsgruppe (um 42%, $p=0,018$). Diese Erhöhung wurde in Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit als Folge einer gesteigerten Synthese der VLDL erklärt. In den Lebern der transgenen Tiere fand sich eine signifikante Erhöhung eingespeicherter Lipide. Es waren sowohl Cholesterolester und Triacylglycerole (kumuliert +37%, $p=0,005$) als auch freies Cholesterol (+31%, $p=0,005$) und freie Fettsäuren (+39%, $p=0,0001$) erhöht. Durch den vermehrten Einstrom von Lipiden ins Zytoplasma, der durch die erhöhte hydrolytische Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase verursacht wird, sind die Ausschleusungsmechanismen der Leber überfordert. Dadurch kommt es zu einer Nettoeinspeicherung von Lipiden (siehe Diskussion) (Dissertation S. Mayet 2003).

In der Charakterisierung solcher Tiermodelle spielen auch kinetische Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, eine Rolle. In der Lipidforschung werden damit Veränderungen in der Aufnahme von Lipoproteinen oder selektiv einzelner Lipide dargestellt. So können etwa die Auswirkungen einer höheren oder niedrigeren Aktivität eines im Lipidstoffwechsel beteiligten Enzymes auf die Aufnahmekinetik von Lipoproteinpartikeln untersucht werden. Dazu werden radioaktive Substanzen, wie zum Beispiel ^{125}I , ^{14}C oder ^3H , an die Moleküle gebunden, deren Kinetik verfolgt werden soll. In festgelegten Zeitabständen werden den Tieren Blutproben entnommen, mit denen die Kinetik der

Substanz dargestellt wird. Am Ende eines Experimentes wird die in die Organe aufgenommene Menge an Radioaktivität bestimmt werden.

Unter Umständen ist es zweckmäßig, nicht das zu beobachtende Molekül selbst, sondern ein anderes mit sehr ähnlichen Eigenschaften zu verwenden. Ein Beispiel ist das in dieser Arbeit verwendete Cholesteryloleylether. Es wird in der Lipidforschung eingesetzt, wenn die Gesamtaufnahme von Cholesteroleat in den Organen bestimmt werden soll. Die Etherbindung des Cholesteroleat wird wie beschrieben hydrolytisch gespalten und die Produkte weiteren Stoffwechselwegen zugeführt. Damit entspricht aber die am Ende des Versuches in den Organen gemessene Menge nicht der insgesamt aufgenommenen. Das Cholesteryloleylether hat dafür eine Etherbindung, die nicht gespalten werden kann. Das Molekül akkumuliert so in den Lysosomen und wird nicht weiter verändert. Mit ihm kann zum Beispiel der Hydrolysegrad des Cholesteryloleylethers bestimmt werden.

6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Zur *in vivo* Erforschung der Funktion der Lysosomalen Sauren Lipase wurden, wie oben beschrieben, sowohl *knock out* Tiere als auch eine Mauslinie der Überexpression des Enzymes etabliert. Die Charakterisierung der Versuchstiere brachte neue Erkenntnisse über die Auswirkungen der erniedrigten oder erhöhten Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase auf den Lipidstoffwechsel. Es wurden dabei jedoch keine kinetischen Experimente durchgeführt. Sie ermöglichen es, das Aufnahmeverhalten von Lipiden in die Organe direkt zu beobachten. In der Charakterisierung von transgenen Mäusen, zum Beispiel für die LPL, werden häufig kinetische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei können Aussagen über die Ursache erhöhter Plasmalipidspiegel und Organaufnahmen gemacht werden.

Diese Arbeit ergänzt die von Mayet durchgeführte Charakterisierung der transgenen Mauslinie durch kinetische Experimente. Dabei soll die Frage geklärt werden, ob die erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase eine veränderte Aufnahmekinetik von Lipiden in die Organe bewirkt und ob dadurch eine Mehreinspeicherung zu erklären ist. Die Klärung dieser Fragen soll dazu beitragen, die bei der Charakterisierung gefundenen Beobachtungen zu erklären. So soll herausgefunden werden, ob die beobachtete VLDL Erhöhung im Plasma durch eine verminderte Aufnahme oder gesteigerte Synthese der Lipoproteine bedingt ist. Weiterhin soll geklärt werden, ob die in der Leber gefundene erhöhte Einspeicherung von Lipiden auf eine erhöhte Aufnahme zurückzuführen ist, oder einem anderen Mechanismus unterliegt. Mit Klärung dieser Fragen soll das erstellte pathophysiologische Modell des Lipidstoffwechsels dieser transgenen Mauslinie vervollständigt werden.

C Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte

Autoklav	Typ 24 (Melag)
Gelelektrophoresekammern	wide mini™ sub cell (BioRad)
PCR Maschine	GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
pH Meter	537 WTW (Micropreusser)
Photometer	Lambda 20 (Perkin Elmer)
Scintillationszähler	Betacounter (Packard)
Schüttler	KS 501 D (Jahnke & Kunkel)
Tischzentrifuge	Biofuge A (Kendro Laboratory Products)
Ultra-Turrax	T25 (Jahnke & Kunkel)
Untertischzentrifuge	Minifuge RF (Heraeus Sepatech)
Vortexer	VF 2 (Jahnke & Kunkel)
Waagen	KERN 440-RS (Jahnke & Kunkel)
Zentrifuge	5810 R (Eppendorf)

1.2. Verbrauchsmaterial

Pipettenspitzen	Finntip (Thermolabsystems)
Eppendorftubes	(Eppendorf)
Spritzen	(Braun)
Insulinspritzen	U-100 Micro Finn (Becton-Dickinson)
Kanülen	Sterican (Braun)

1.3. Chemikalien, Puffer, Enzyme, Primer

Äther zur Narkose	(Merck)
Aquasol	(Packard)
Benzen	(Merck)
Borsäure	(Merck)
Bromphenolblau	(Sigma)
10xBuffer ohne MgCl ₂	(Roche)
CETP	(Roche)
Chloroform	(Merck)
Cholesteryl-[1- ¹⁴ C]oleat	(Amersham)
[1a,2a(n)- ³ H]Cholesteryloleylether	(Amersham)

Chylomikronen	(Jörg Heeren, Labor Beisiegel, UKE Hamburg)
dNTP	(Roche)
EDTA	(Merck)
Ethanol 70% + 100%	(Merck)
Ethidiumbromid 5%	(Sigma)
Glycerol	(Merck)
Hexan	(Merck)
[¹²⁵ Iod]	(Merck)
Ketamin	(Merck)
LDL	(Jörg Heeren, Labor Beisiegel, UKE Hamburg)
Methanol	(Roche)
MgCl ₂	(Roche)
NaOH	(Merck)
NaCl	(Merck)
Oleat	(Sigma)
PBS	(Roche)
Phenol	(Merck)
Pittman Extraktionspuffer	(Merck)
Primer ApoAIMF	(Roche)
Primer LALRS4	(Roche)
Proteinase K 15,5 mg/ml	(Roche)
SDS	(Merck)
SeaKem Agarose 1%	(FMC)
taqPolymerase	(Roche)
TE Puffer	(Merck)
Toluol	(Roche)
TRIS	(Roche)

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien sowie die ohne Bezeichnung wurden von der Firma Merck in der Qualität *pro analysis* (*p.a.*) benutzt. Das verwendete Wasser wurde bidestilliert (dd). Das Wasser für Arbeiten mit DNS wurde zusätzlich steril filtriert (22 µm).

1.3.1. TBE

Für die Stammlösung 10xTBE wurden 108 g TRIS Puffer, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 m EDTA (pH 8,0) auf 1000 ml H₂O dd aufgefüllt.

1.3.2. PBP

Die Stammlösung Bromphenolblau wurde aus 500 µl 10% PBP Lösung, 6 µl wasserfreiem Glycerol und 13,5 ml H₂O dd hergestellt.

1.3.3. PCR Mix (Master Mix)

Für jede PCR wurde zunächst eine Reaktionslösung bereitgestellt, die nach der Anzahl der PCR Proben dimensioniert wird, so dass zu 2 µl Probe 23 µl der Lösung gegeben wurden. Während des Ansatzes wurden die Proben und der PCR Mix beide auf Eis gekühlt gehalten. Die Taq-Polymerase wurde zuletzt hinzu gegeben, da sie die Reaktion zum Anlaufen bringt.

- 2,5 µl 10xbuffer ohne MgCl₂
- 2,5 µl 2 mM dNTP's
- 2,5 µl 25 mM MgCl₂
- 2,5 µl Primer ApoAIMF
- 2,5 µl Primer LALRS4
- 10,3 µl H₂O dd steril filtriert
- 0,2 µl Taq-Polymerase

1.3.4. STE

Für 50 ml der STE Stammlösung wurden 1 ml 0,1 mM NaCl, 1 ml 0,02 mM TRIS, 1 ml 0,01 mM EDTA und 5 ml 10% SDS mit 42 ml H₂O dd, steril filtriert, gemischt.

1.3.5. Pittmann Extraktionspuffer

Der Pittmann Extraktionspuffer wurde vor jeder Extraktion aus Benzen, Chlorophorm und Methanol im Volumenverhältnis von 10/5/12 angesetzt. Oleat und NaOH wurden hinzugefügt, so dass der Puffer eine Endkonzentration von 0,1 m Oleat und 0,3 m NaOH enthielt. Der Ansatz erfolgte unter dem Abzug, der Puffer wurde in Glasflaschen mit Alufolie umwickelt aufbewahrt.

1.4. Versuchstiere

Die für die Versuche verwendeten Mäuse wurden von Frau Dr. Mayet, Arbeitsgruppe Beisiegel, etabliert. Sie wurden im Versuchstierstall unter normaler Diät gezüchtet. Für die Zucht wurden Käfige mit transgenen Männchen und wildtyp C57/Black Weibchen eingerichtet. Da die männlichen Tiere eine höhere Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase aufwiesen wurden nur sie für die Versuche genommen. Im Alter von drei bis vier Wochen wurden ihnen Schwanzspitzenbiopsien entnommen, um herauszufinden, ob die Tiere transgen sind. Für die Versuche wurden 12 bis 16 Wochen alte Tiere aus demselben Wurf ausgewählt, um einen möglichst identischen genetischen Hintergrund zu erhalten. Dies ist notwendig, um den Einfluss anderer vererbbarer Faktoren auf den Lipidstoffwechsel auszuschließen.

2. Methoden

2.1. Sterilisation und Filtration

Zur Sterilisation wurde der Autoklav Typ 24 der Firma Melag benutzt. Es wurde 45 min mit 1 bar und 121 °C sterilisiert. Destilliertes Wasser wurde mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 22 µm steril filtriert.

2.2. Genotypisierung der transgenen Mäuse

Die Mäuse wurden im Alter von drei bis vier Wochen genotypisiert. Da die männlichen Tiere eine höhere Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase aufwiesen, wurden nur sie für die Versuche verwendet und genotypisiert. Jedes Ergebnis musste verifiziert werden, d.h. die Schritte der PCR und Gelelektrophorese wurden für alle Proben zweimal durchgeführt um ein reproduzierbares Ergebnis zu belegen.

2.2.1. Schwanzspitzenbiopsie

Zur Narkotisierung wurden die Mäuse in ein Becherglas, welches mit Diethylether getränktem Zellstoff ausgelegt und einem Deckel abgeschlossen war, gesetzt. An ruhigen, tiefen Atemexkursionen der sich ansonsten nicht mehr bewegenden Tiere wurde die Narkosetiefe eingeschätzt. Sie wurde mit einem Schmerzreiz durch Kneifen mit einer Pinzette in den Hinterlauf kontrolliert. Etwa 2 bis 5 mm der Schwanzspitze wurden abgeschnitten und der Stumpf mit Histoacryl-Gewebekleber verklebt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Biopsien in einem Eppendorftube bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.2. DNS Extraktion

Um die DNS aus den Biopsien zu extrahieren, mussten die Zellen mit einem Lysispuffer (STE-Puffer) zerstört werden. Die freigewordenen Proteine wurden zunächst mit Proteinase K Lösung denaturiert und das Protein/DNS Gemisch dann mit einer Phenol/Chloroform Lösung aufgetrennt. Die übrig gebliebene DNS wurde in zwei Stufen durch Waschen mit Alkohollösungen verschiedener Konzentrationen ausgefällt.

Die Biopsien wurden mit 400 µl der STE-Stammlösung und 20 µl der Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55 °C bei 180 rpm inkubiert. Für die Weiterverarbeitung wurde unter dem Abzug der Werkbank eine Lösung aus Phenol und Chloroform im Volumenverhältnis 1/1 in einem Glasgefäß angesetzt und auf dem Vortex vermischt, bis sie milchig war. Das Gefäß wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um die schnelle Zersetzung des Chloroforms zu verhindern. In jeweils 400 µl der Lösung wurde ein Biopsat gegeben, auf dem Vortex vermischt und zur Phasentrennung 5 min bei 13000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die wässrige Oberphase in der sich die DNS löst, wurde ohne Kontamination der phenol- und proteinhaltigen Unterphase abpipettiert und in ein neues Eppendorftube gegeben. Zum Auswaschen und Fällern der DNA wurden in zwei Schritten zunächst 100% und dann 70% Ethanol hinzugefügt, wieder 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Flüssigkeit unter Belassen des DNS Präzipitates entfernt. Dazu wurde das Eppendorftube schnell ausgekippt und der Rest des Ethanols heraus pipettiert. Das am Boden des Eppendorftubes sichtbare DNS Präzipitat wurde kurz bei RT trocknen gelassen und dann 30 min bei RT in 200 µl TE Puffer gelöst.

2.2.3. Photometrische Bestimmung der DNS Konzentration

Die Konzentration von DNS und deren Reinheitsgrad in den Extraktionslösungen wurden photometrisch bestimmt. Für die Untersuchung wurden 50 µl der Probe und 450 µl H₂O steril, dd, in eine Kristallküvette gefüllt und mit einer Pipette vermischt. Plastikgefäße wurden hierfür nicht benutzt, da die DNS an der Gefäßwand haftet. Die Konzentration ließ sich aus der Messung der optischen Dichte

(OD) der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm nach folgender Formel bestimmen: $\text{Konzentration}_{\text{DNS}} \text{ in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = \text{OD}_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$. Der Reinheitsgrad der Proben wurde durch das Verhältnis der Extinktionen bei 280 nm und 260 nm bestimmt, deren Verhältnis $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ optimalerweise bei 0,55 liegt. Um ein Maß für die Verunreinigung mit Protein zu erhalten, wurde die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 320 nm gemessen. Dieser Parameter sollte für eine hohe Reinheit möglichst klein sein.

2.2.4. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Einteilung der Mäuse in transgen oder wildtyp geschah durch Nachweis des bei der Vererbung in die DNS eingebauten humanen Lysosomalen Saure Lipase Gens. Hierfür wurde die PCR eingesetzt: Durch den Zusatz von zwei Primern, ApoAIMF und LALRS4, die an zwei spezifischen Sequenzen im Gen der humanen Lysosomalen Saure Lipase hybridisieren, kann ein etwa 630 kD großes DNS Stück vervielfältigt werden, welches die Gegenwart des humanen Lysosomalen Saure Lipase Genes in der Maus beweist.

Für die PCR wurde eine Reaktionslösung erstellt, die zwei Primer, die benötigten Oligonukleotide, die hitzestabile Taq-Polymerase (aus dem Bakterium *thermophilus aquaticus* gewonnen) und die zu vervielfältigende DNS enthielt. Im ersten Schritt wurden die Proben stark erhitzt, um die DNS in Einzelstränge aufzuspalten (Denaturierung). Im Vervielfältigungszyklus wurden die Proben abgekühlt damit sich die Primer an den DNS Strang binden kann (*primer annealing*). Im nächsten Schritt wurden die Proben wieder erhitzt um die Reaktion durch die Taq-Polymerase in Gang zu setzen (*primer extension*). Dieser Vorgang aus Spalten der Stränge, Anlagern der Primer und Synthesereaktion der Polymerase wurde 35 Mal wiederholt, wobei sich bei jedem Zyklus die DNS Menge verdoppelt:

- 5 min bei 94 °C - Denaturierung
 - 1 min bei 94 °C - Denaturierung
 - 1 min bei 53 °C - *primers annealing*
 - 45 sec bei 72 °C - *primer extension*
 - 10 min bei 72 °C - *primer*
 - halten bei 4 °C
- } 35 Zyklen

2.2.5. Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese wird über ein Agarose Gel mit definierter Körnung ein elektrisches Feld angelegt, um geladene Teilchen eines Stoffgemisches, die entlang des Feldes unterschiedlich schnell laufen, aufzutrennen. Da DNS negativ geladen ist, bewegen sich die Teilchen von der Kathode zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit der Teilchen stellt eine logarithmische Funktion ihrer Größe dar und ist abhängig von der Körnung des Gels. Um die Teilchen anhand ihrer Laufstrecke zu identifizieren, läuft ein Probenstandard mit, der mit den unbekanntenen Proben verglichen wird. Zur Darstellung wird dem Gel Ethidiumbromid beigemischt, das die durchlaufende DNS interkaliert und sie so unter ultraviolettem Licht durch Fluoreszenz zum Leuchten bringt. Bei Arbeiten mit Ethidiumbromid ist besondere Vorsicht zu geboten, da es sich in die DNS setzt und so stark mutagen ist.

Zum Erstellen des Gels wurden 100 ml der 10 % TBE Pufferstammlösung mit 900 ml H₂O verdünnt. Davon wurden 100 ml mit 1 g Seakem Agarose auf dem Rührer aufgeköcht. Nach Erkalten der Agarose auf etwa 50 °C, wurde 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und vermischt. Die Lösung wurde in einen auf beiden Seiten mit Klebefolie verschlossenen Gelschlitten gegossen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Bläschen bildeten, da sie den Lauf der Proben stören. Entstandene Bläschen wurden mit einer Pipettenspitze abgesogen oder an den Rand des Gels gedrückt. Ein Stempel zum Erstellen der Geltaschen wurde eingesetzt. Das erkaltete und feste Gel wurde nach Entfernen der Klebestreifen in die Gelkammer eingesetzt und in die 900 ml der verdünnten TBE Pufferlösung eingelegt. Die Geltaschen wurden jeweils mit 8 µl DNS Probe beladen, die zuvor mit 2 µl des Ladepuffers Bromphenolblau (BPB) vermischt wurden. Die Gele wurden bei 80 V laufen gelassen, bis die BPB Marke etwa zwei Drittel des Gels durchlaufen hatte. Die Ergebnisse wurden mit einer Ultraviolettkamera dokumentiert (Abbildung 6).



Abbildung 6: Gelelektrophorese von Schwanzspitzenbiopsien. An den Seiten rechts und links ist der mitgelaufene Probenstandard zu sehen, anhand dessen die Größe des amplifizierten Genstückes identifiziert werden kann. Die transgenen Mäuse zeigen eine weiße Bande, die wildtyp Mäuse nichts.

2.3. Turnover

Um eine statistische Aussage machen zu können, wurden zwei Vergleichsgruppen mit jeweils mindestens sechs Tieren für die Experimente bestimmt. Das Substrat zur Injektion wurde kurz vor den Versuchen markiert. Den Tieren wurde 12 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen. Wasser erhielten sie nach Belieben weiter. Vor Beginn wurden die Tiere gewogen und am Schwanz markiert, so dass sie leicht zu erkennen waren. Zu festgelegten Zeitpunkten wurde ihnen Blut abgenommen und am Ende die Organe entnommen.

2.3.1. Synthese der Lipoproteine

Die Markierung der Lipoproteine erfolgte teilweise in unserem Labor oder sie wurden uns von Dr. J. Heeren aus dem Labor Beisiegel zur Verfügung gestellt.

2.3.2. Markierung der Chylomikronen mit ^{125}I od

Humane Chylomikronen (1,019 – 1,063 g/dl) wurden durch Ultrazentrifugation von menschlichem Plasma gewonnen. Die Markierung erfolgte nach der Methode von McFarlane (McFarlane 1958). Zur Vorbereitung wurden 10 μl ICI mit 10 ml 0,1 molarer HCL und 2 molarer NaCl über 90 ml Chloroform vermischt. Von den Chylomikronen, die zuvor mit PBS auf 5 mg Protein pro ml verdünnt wurden, wurden pro ml 800 μl Glycerinlösung hinzugegeben. Zu 200 μl Glycerinlösung wurden in einem neuen Reagenzglas 3 μl ^{125}I od Natrium hinzugefügt und mit der anderen Lösung vermischt. Dazu wurden 40 μl der ICI Lösung langsam hinzupipettiert und 2 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Freies ^{125}I od wurde durch zweimalige Säulenchromatographie an PD-10 Säulen entfernt. Die mit ^{125}I od markierten Chylomikronen wurden von Dr. J.Heeren aus dem Labor Beisiegel zur Verfügung gestellt.

2.3.2.1 Markierung der LDL mit Cholesterol-[1- ^{14}C]oleat und [1a,2a(n)- ^3H]Cholesteryloleylether

Humane LDL (1,019 – 1,063 g/dl) wurden durch Ultrazentrifugation von menschlichem Plasma gewonnen. Diese wurden von J. Heeren aus dem Labor Beisiegel zur Verfügung gestellt. Es erfolgte eine Aufreinigung an PD-10 Säulen. Dazu wurde die Säulen mit 2 mal 4 ml PBS äquilibriert. Das LDL wurde geladen und 1 ml PBS hinzu gegeben, das gereinigte LDL unten aufgefangen. Von den Stammlösungen wurden 2 ml Cholesterol-[1- ^{14}C]oleat und 200 μl [1a,2a(n)- ^3H]Cholesteryloleylether vermischt, was jeweils einer Aktivität von 200 μCi entspricht. Die Flüssigkeit wurde mit CO_2 abgedampft. Das aufgereinigt LDL wurde mit 100 μl CETP über Nacht bei RT langsam geschüttelt. Die Lösung wurde am nächsten Tag erneut über eine PD-10 Säule eluiert. Die gewonnenen 1,4 ml markierter LDL wurden mit 2,1 ml PBS zu einer Injektionslösung von 3,5 ml gebracht.

2.3.3. Auswahl der Tiere

Als Versuchstiere wurden männliche Tiere der Linie C57Bl/6J-TgN(ApoAI-hLAL)24SH genommen. Sie zeigten einmal gegenüber den Tieren der Linie 21, als auch gegenüber den weiblichen Tieren derselben Linie die höchste Aktivität der humane Lysosomale Saure Lipase. Für den Versuch wurden mindestens sechs transgene und ebenso viele wildtyp Mäuse benötigt, um ein signifikantes Ergebnis zu erlangen. Damit der Stoffwechsel der Tiere ausgereift, aber noch nicht altersbedingten Veränderungen unterworfen war, wurden Tiere im Alter zwischen 12 und 16 Wochen für die Versuche genommen. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die verglichenen Tiere der Kontrollgruppe Geschwistertiere der transgenen waren, um eine Vergleichbarkeit aufgrund desselben genetischen Hintergrundes zu gewährleisten.

2.3.4. Injektion in Schwanzvene

Die Mäuse wurden in einem mit Diethylether getränktem Zellstoff ausgelegten Becherglas für kurze Zeit narkotisiert. Zur Injektion wurden die Mäuse in einer Haltevorrichtung in Bauchlage fixiert und 200 μl der Lipidlösung in eine Schwanzvene injiziert. Die größte Vene befindet sich in einer Position von 12 Uhr, zwei kleinere bei 10 und 2 Uhr. Um die Venen deutlicher hervortreten zu lassen, wurde der Schwanz zuvor mit in warmem Wasser getränkter Watte gewärmt.

2.3.5. Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten aus dem retroorbitalen Venenplexus. Die Versuchstiere wurden mit Diethylether für kurze Zeit narkotisiert. In einer Hand wurden sie festgehalten, während mit der anderen über Kapillarröhrchen das Blut entnommen wurde. Das Blut wurde in Eppendorftubes geleitet, die mit 5 µl EDTA zur Hemmung der Blutgerinnung vorbereitet wurden. Nach 2 min Zentrifugation bei 2500 rpm wurden 15 µl des Überstandes in 100 µl PBS gelöst und bei -20 °C eingefroren. Nach der Punktion wurde mit einem Zellstofftupfer das Auge für einige Sekunden tamponiert, um Nachblutungen zu verhindern und so eine erneute Punktion zu ermöglichen. Insgesamt sind auf diese Weise fünf bis sechs solcher Punktionen an einem Auge möglich. Im ersten Turnover wurde zu den Zeitpunkten 2 min und 10 min Blut entnommen, nach 30 min erfolgte die Abnahme aus dem Herzen. In dem zweiten Turnover mit LDL wurde nach 2 min, 10 min, 1 Stunde und 6 Stunden Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen, nach 20 Stunden mit der Organentnahme aus dem Herzen.

2.3.6. Organentnahme

Am Ende des Turnovers erfolgte die Organentnahme. Die Narkose erfolgte 10 min zuvor durch Spritzen von 200 µl Ketanest in die Bauchhöhle. Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurden die Mäuse mit einer Pinzette auf Schmerzreize getestet und gegebenenfalls Ketanest nachgespritzt. Die Bauch- und Brusthöhle wurden mit einer Schere weiträumig eröffnet und ein freier Zugang zum noch schlagenden Herzen geschaffen. Mit einer mit 5 µl EDTA gefüllten Insulinspritze und dünner Kanüle wurden aus der rechten Herzkammer etwa 200 µl Blut entnommen. Daraufhin wurde der rechte Vorhof inzidiert, um das Blut aus dem Kreislauf zu entfernen. Durch den linken Ventrikel wurden die Mäuse mit 5 ml PBS perfundiert, bis die Leber aufgrund der Blutleere eine helle Farbe annahm. Hierauf erfolgte die Entnahme der Organe: Herz, Milz, Leber in vier Teilen ohne die Gallenblase, präperitoneales Fett, ein Stück Muskel aus der Oberschenkelmuskulatur und Schwanzspitzenbiopsie zur Nachkontrolle der Genotypisierung. Sie spielen eine Rolle im Lipidstoffwechsel, bzw. dem Stoffwechsel der Lysosomalen Sauren Lipase, so dass Veränderungen des Lipidmusters der transgenen Tiere erwartet werden könnten. Die Organe wurden gewogen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.6.1 Lipidextraktion

Da im Cholesteroleat das Oleat mit ^{14}C markiert ist, strahlen sowohl die nicht hydrolysierten Cholesterolester, als auch das Hydrolyseprodukt, das Oleat, mit demselben Energiespektrum des Kohlenstoffes. Das wurde ausgenutzt, indem aus dem Plasma der Mäuse das lipophile Cholesteryloleat und die Cholesteryloleylether von dem hydrophilen Oleat getrennt wurden. Hierfür wurde die Extraktion nach Pittmann benutzt. Die Proben wurden in einem Extraktionspuffer gelöst, wo nach Zentrifugation eine obere, hydrophile und eine untere, lipophile Phase sichtbar wurden. Die Ölsäure sammelte sich in der wässrigen, die anderen Moleküle in der lipophilen Phase (Pittman *et al.* 1974).

Für die Extraktion wurden von der Leber 200 mg, von der Milz 20 mg und vom Plasma 15 µl mit PBS auf 600 µl gebracht. Die Gemische wurden in Reagenzgläsern aus Glas vermengt, da das in der Pittmann Lösung enthaltene Chloroform Plastik zersetzt. Bis auf die Plasma Lösungen wurden alle anderen 30 sec mit dem Ultraturrax zerkleinert, bis sich eine Emulsion bildete. Der Ultraturrax wurde

nach jeder Anwendung gereinigt, um Reste der Radioaktivität zu entfernen. Zu jeder Probe wurden 3 ml des Pittmann Extraktionspuffers und 0,6 ml 0,3 m NaOH Lösung hinzugefügt. So enthielt jede Probe 1,11 ml Benzen, 0,55 ml Chloroform und 1,33 ml Methanol aus der Pittmanlösung. Danach wurde 45 sec mit dem Vortex vermischt. Nach 15 min Zentrifugation bei 2500 rpm bildete sich eine hydrophile Ober- und lipophile Unterphase, die durch eine harte Proteinschicht getrennt waren. Für die Auswertung wurden 1 ml der Oberphase und 0,5 ml der Unterphase entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.4. Detektion der Lipoproteine

Da ^{125}I ein γ -Strahler ist, wurde es in einem Zählgerät für diese Strahlung gemessen. Die ausgesandte β -Strahlung der ^3H und ^{14}C Markierungen wurde mit einem Scintillationszähler gemessen. Die gemessene Radioaktivität ist dabei der Menge der markierten Lipide, bzw. Lipoproteine proportional. Da viele radioaktive Substanzen ihre Strahlung in einem niedrigen energetischen Bereich aussenden, geht bei einer direkten Messung durch ein Zählrohr ein Großteil der Strahlungsenergie in der Wand des Messgefäßes durch Absorption verloren. Daher wird die Methode der Flüssigkeitsscintillationsmessung benutzt. Hierbei wurde die zu messende Substanz in einer Scintillationsflüssigkeit gelöst. Sie ermöglicht die Messung durch einen Verstärkereffekt. Die Flüssigkeit besteht aus einem Lösungsmittel und einem Scintillator. Das Lösungsmittel nimmt die Energie der β -Strahlung auf und gibt sie an den Scintillator ab, dessen Atome angeregt werden und bei Rückkehr in den Grundzustand Lichtquanten aussenden. Dieses Licht wird von dem Scintillationsmeßgerät durch zwei Photomultiplier, die Lichtbrille in elektrische Energie umsetzen, erkannt. Die Strahlung radioaktiver Isotope breitet sich über Spektren verschiedener Energien aus. Der Messbereich eines Scintillators wird so eingestellt, dass der Energiebereich des Isotops abgedeckt wird, das gemessen werden soll. Er wird dabei so eingestellt, dass er das Spektrum möglichst vollständig erfasst, die Hintergrundstrahlung aber eliminiert. In Plastikgefäße wurden jeweils 10 ml der Scintillationsflüssigkeit Aquasol und 0,5 ml der Probe gegeben. Die Lösung wurde geschüttelt und im Scintillationsmeßgerät Betacounter der Firma Packard gemessen.

2.4.1. Messung der ^{125}I markierten Proben

Die ^{125}I markierten Proben wurden 2 min in einem Messfenster von 15 bis 75 keV gemessen.

2.4.2. Messung der ^{14}C und ^3H doppelt markierten Proben

Die Messung von zwei markierten Substanzen zugleich erfordert die Berücksichtigung der radioaktiven Eigenschaften beider Isotope. Die abgestrahlten Energiespektren überschneiden sich im niederenergetischen Bereich, so dass die Isotope durch einfache Messung nicht zu unterscheiden sind. Zur Messung wird für jede Substanz ein eigener Bereich eingestellt. Der Messbereich für ^3H , der sich im niedrigeren energetischen Bereich befindet, wird so gewählt, dass er das gesamte Spektrum an ^3H abdeckt. Der in dieses Fenster hineinragende Anteil an ^{14}C -Strahlung wird als „Spill“ bezeichnet und stört die korrekte Erfassung der ^3H Aktivität. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, sollte die Aktivität von ^3H ein Mehrfaches der ^{14}C Aktivität betragen. Das zweite Messfenster, in dem ^{14}C gemessen wird, wird so gelegt, dass keine Strahlung von ^3H die Messung stört. Das untere Fenster wurde bei diesem Programm zwischen 5 keV und 150 keV, das obere zwischen 320 keV und 650 keV

festgelegt. Aus den Messergebnissen können die korrekten Aktivitäten errechnet werden, ihre Einheit ist *desintegrates per minute* (dpm). Es wurde ein von der Firma Packard in dem Betacounter voreingestelltes Programm benutzt, das für die Zählung von doppelt markierten Substanzen vorgesehen ist und die Verunreinigungen durch Fremdstrahlung berücksichtigt.

3. Statistik

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel. Berechnet wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen. Mit Hilfe des Student's t-Test wurden Stichproben auf ihre Unabhängigkeit voneinander überprüft. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ angesehen.

D Ergebnisse

1. Turnover mit 125 Iod markierten Chylomikronen

Zur Klärung der Frage, ob durch die erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase eine erhöhte Aufnahme von Lipoproteinen aus dem Blut in die Organe erfolgt, wurde ein Turnover Experiment mit 125 Iod markierten Chylomikronen durchgeführt. Dabei wurden die Aktivitäten im Plasma im Zeitverlauf dargestellt und nach Beendigung des Versuches die Aufnahmen in die Organe gemessen. Die Versuchsgruppen enthielten sechs wildtyp und 12 transgene Mäuse. Die Gewichte der Tiere unterschieden sich nicht signifikant. Die transgenen Tiere wogen $28,2 \pm 1,6$ g und die wildtyp Tiere $29,8 \pm 1,9$ g. Die Organgewichte von Leber, Milz und Herz wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf (Tabelle 3).

Nach Injektion des Substrates wurde den Mäusen zu den Zeitpunkten 2 min und 10 min aus dem retroorbitalen Venenplexus Blut entnommen. Nach 30 min wurde das Blut aus dem Herzen abpunktiert und Leber, Milz, Herz, Muskel- und Fettgewebe nach Spülung des Kreislaufes entnommen. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurden die Proben mit 5 μ l EDTA vermischt und nach Zentrifugation Plasma für die Messungen gewonnen. Die Werte aller Messzeitpunkte wurden auf die nach 2 min gemessenen Aktivitäten bezogen und als Fraktionen von diesen dargestellt. Auf diese Weise ergeben sich die beiden in Abbildung 7(A) dargestellten Verläufe der Aktivitäten im Plasma beider Versuchstiergruppen. Die Chylomikronen wurden in den wildtyp Tieren tendenziell schneller aus dem Plasma entfernt als in den Transgenen. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Es verblieben noch $39 \pm 10\%$ der Aktivität am Ende des Versuches im Plasma, im Vergleich zu $38 \pm 9\%$ in den transgenen Tieren.

	Organgewichte (mg)		Spezifische Aufnahmen (dpm/mg)	
	wildtyp	transgen	wildtyp	transgen
Leber	1143 \pm 180 *	1066 \pm 156 *	293 \pm 52	293 \pm 40
Milz	88 \pm 22	88 \pm 12	477 \pm 168 **	396 \pm 122 **
Herz	160 \pm 20	159 \pm 14	6 \pm 2	7 \pm 2
Muskel	-	-	2 \pm 1	2 \pm 1
Fett	-	-	2 \pm 1	3 \pm 1

Tabelle 3: Gewichte und spezifische Aufnahmen in die Organe (erster Turnover). Entnommen wurden Leber, Milz, Herz, Muskel und Fettgewebe. Die Gewichte der Organe sind in mg, die spezifischen Aufnahmen in dpm/mg angegeben. Beide zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Die Milz hat eine höhere spezifische Aufnahme als die Leber, sie ist durch den hohen Gehalt an Makrophagen bedingt. Herz, Muskel- und Fettgewebe haben jeweils Aufnahmen, die weniger als einen Prozent der Gesamtaufnahme ausmachen. Dpm (*desintegrates per minute*) entsprechen den durch Berechnung bereinigten cpm (*counts per minute*); * p=0,36; ** p=0,26.

Nach Homogenisierung der Organe wurden die in ihnen gespeicherten Aktivitäten gemessen. Sie sind auf die nach 2 min im gesamten Blut gemessenen Radioaktivitäten bezogen. Für diese Berechnung wurde ein Blutvolumen von 0,035 ml pro kg Körpergewicht und ein Hämatokrit von 0,45 zugrunde gelegt. Die angegebenen Fraktionen entsprechen so dem Anteil, den die Organe von der zum Zeitpunkt 2 min im Blut vorhandenen Aktivität aufgenommen haben (Abbildung 7(B)). Nur in Leber und Milz wurden mehr als 1% der Aktivität gefunden. Herz, Muskel und Fettgewebe nahmen dahingegen kaum Radioaktivität auf, was sich auch in ihrer spezifischen Aktivität wieder spiegelte (siehe unten). Die Leber war der Hauptaufnahmeort der Chylomikronen. Sie nahm $55 \pm 13\%$ in den transgenen Tieren und $57 \pm 8\%$ in den wildtyp Tieren auf. In der Milz wurden $6 \pm 3\%$, bzw. $7 \pm 2\%$ der Aktivität nachgewiesen. Signifikante Unterschiede zwischen transgenen und wildtyp Tieren ergaben sich nicht. Insgesamt wurden nach 30 Minuten Versuchsdauer 99%, bzw. 96% der injizierten Aktivität wieder

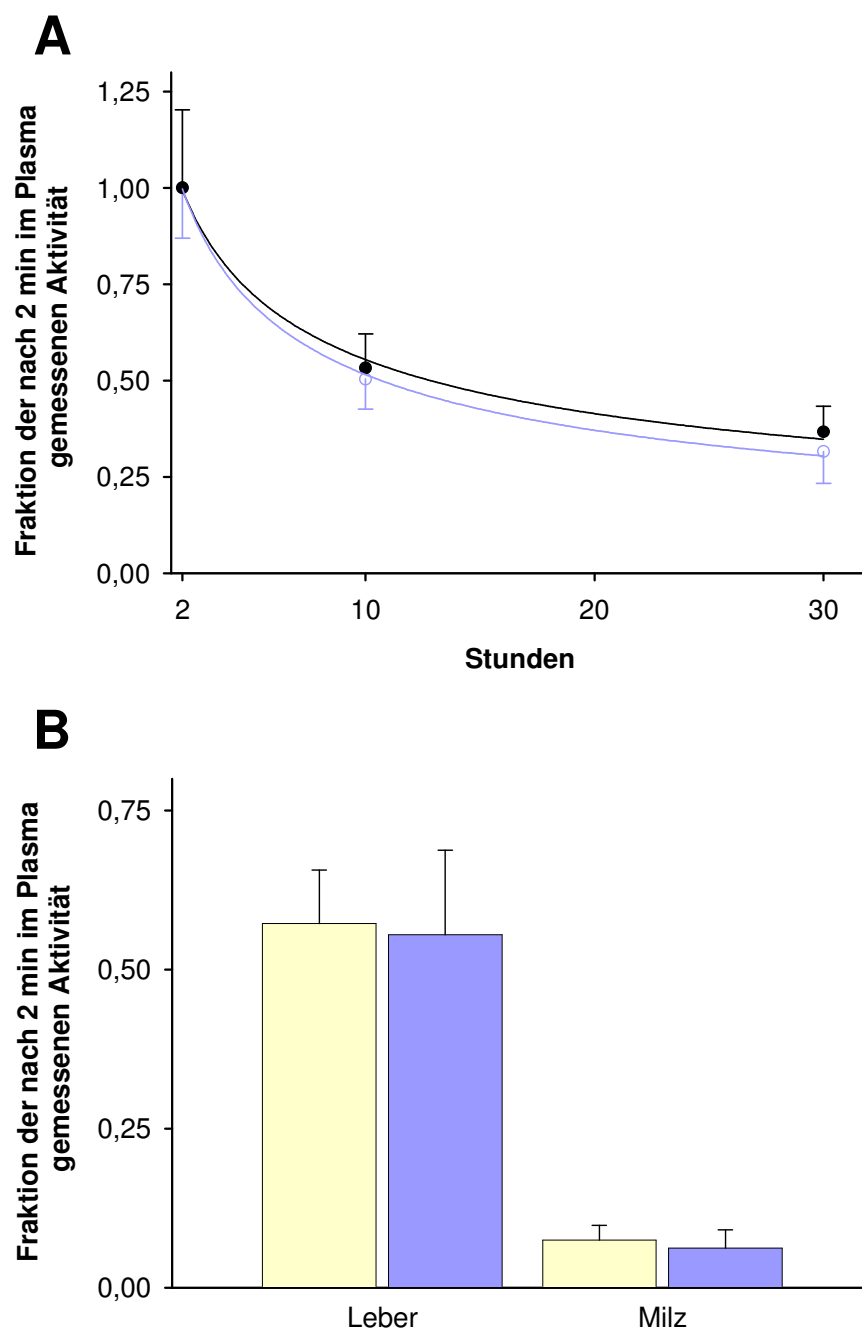


Abbildung 7: (A) Plasmaaktivitäten und (B) Organaufnahmen von wildtyp und transgenen Mäusen. (A) 2 min, 10 min und 30 min nach Injektion wurden den Tieren Blutproben entnommen und nach Zentrifugation die Aktivitäten des Plasmas bestimmt. Gezeigt sind die Verläufe der Aktivitäten von transgenen (schwarze Kreise) und wildtyp (blaue Kreise) Mäusen. Die Werte sind als Fraktionen der zum Zeitpunkt 2 min gemessenen Aktivitäten dargestellt. (B) Nach 30 min wurde der Kreislauf der Tiere mit PBS gespült und Leber, Milz, Herz, Fettgewebe und Muskelgewebe entnommen und gemessen. Dargestellt sind die Aktivitäten für Leber und Milz als Fraktionen der nach 2 min gemessenen Aktivität im Plasma. Die anderen Organe zeigten Aktivitäten von weniger als einem Prozent. Die Werte der wildtyp Tiere sind mit blauen Balken, die der transgenen Tiere mit weißen Balken dargestellt.

erhalten. Die spezifischen Aufnahmen pro Milligramm Organgewicht sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Milz hat mit durchschnittlich 436 ± 145 dpm/mg eine erheblich größere Kapazität als die Leber (293 ± 46 dpm/mg), kann aber wegen ihres geringeren Gewichtes insgesamt weniger Chylomikronen aufnehmen. Ihre spezifische Aufnahmekapazität ist auf den großen Gehalt an Makrophagen, bezogen auf das eigene Gewicht, zurückzuführen.

2. Turnover mit ^{14}C markiertem Cholesteryloleat und ^3H markierten Cholesteryloleylether

Da der erste Turnover keine signifikanten Unterschiede hervorbrachte, wurde ein zweiter Versuch unter veränderten Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurden LDL als Lipoproteine verwendet, um die Aufnahmekinetik unter anderen Versuchsbedingungen zu beobachten. Zum anderen sollte direkt gemessen werden, ob die erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase eine erhöhte intrazelluläre

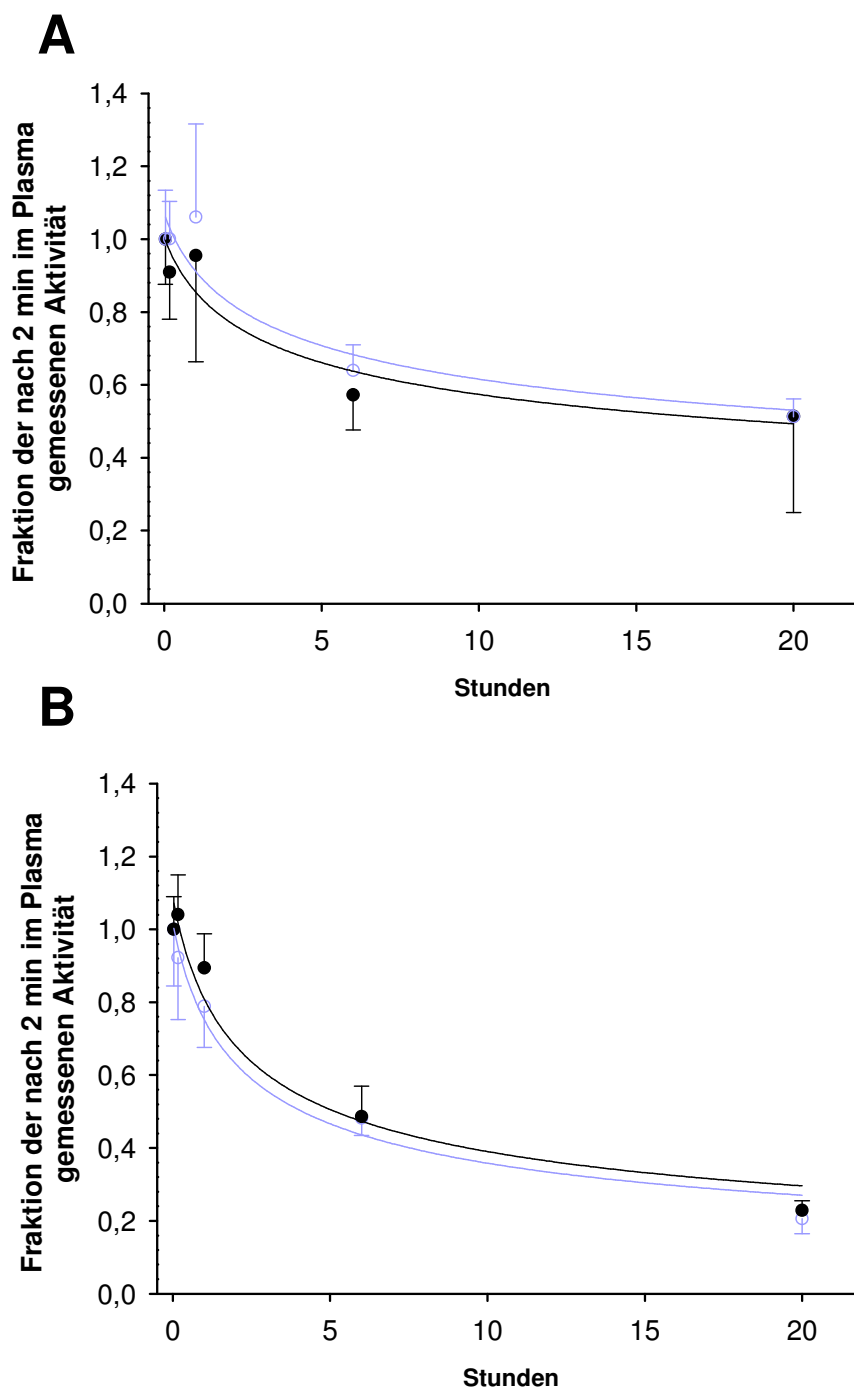


Abbildung 8: Plasmaaktivitäten von wildtyp und transgenen Mäusen (zweiter Turnover): (A) Cholesteryloleat, (B) Cholesteryloleylether. 2 min, 10 min, 1 h, 6 h und 20 h nach Injektion wurden den Tieren Blutproben entnommen und nach Zentrifugation die Aktivitäten des Plasmas bestimmt. (A) Zeigt die Verläufe des Cholesteryloleates in transgenen (schwarze Kreise) und wildtyp (blaue Kreise) Mäusen. (B) Zeigt die Verläufe des Cholesteryloleylether (schwarze Kreise entsprechen den transgenen Tieren, blaue Kreise den wildtyp Tieren). Die Werte sind als Fraktionen der zum Zeitpunkt 2 min gemessenen Aktivitäten dargestellt.

Hydrolyse bewirkt. Die Markierung der LDL mit Cholesteryloleat und Cholesteryloleylether ermöglicht es, hierüber eine Aussage zu machen, da der Cholesteryloleylether nicht abgebaut wird und so in der Zelle akkumuliert (siehe oben). Durch Vergleich des hydrolysierten Oleates mit dem akkumulierten Ether ist die Bestimmung des Hydrolysegrades möglich. Da in den transgenen Tieren die Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase höher ist als in den wildtyp Tieren, wurde angenommen dass sich auch der Hydrolysegrad vergrößerte. Darüber hinaus können durch die größere plasmatische Halbwertszeit der LDL im Vergleich zu der der Chylomikronen Unterschiede in der Verstoffwechslung dargestellt werden, die erst nach längerer Zeit auftreten. In die Vergleichsgruppen wurden jeweils acht Tiere eingeschlossen. Die Gewichte der Mäuse, sowie der entnommenen Leber und Milz, waren nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 8).

Den Tieren wurden 2 min, 10 min, 1h und 6 h nach Injektion des Substrates Blutproben aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Nach 20 h erfolgten die Organentnahme, sowie die Blutentnahme aus dem Herzen. Die Blutproben wurden wie im ersten Turnover mit 5 μ l EDTA vermischt. Nach Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert. Vor der Messung erfolgte die im Material und Methoden Teil beschriebene Trennung des Cholesteryloleates und des Cholesteryloleylether von dem Oleat. Die Verläufe der Aktivitäten von Cholesteryloleat und Cholesteryloleylether im Plasma sind in Abbildung 8 gezeigt. Wie im ersten Turnover sind die Aktivitäten auf die nach 2 min gemessenen Werte bezogen dargestellt. Zwischen den Vergleichsgruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Das Cholesteryloleat (in der Abbildung 8(A)) wurde schneller aus dem Plasma entfernt als das Cholesteryloleylether (in der Abbildung 8(B)), so dass nach 24 Stunden Versuchsdauer noch $23 \pm 3\%$

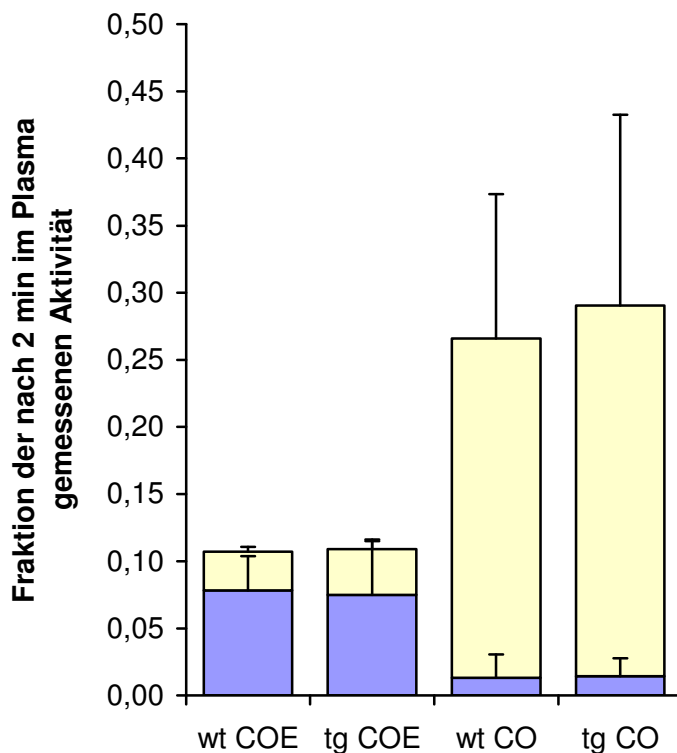


Abbildung 9: Organaufnahmen von wildtyp und transgenen Mäusen. Dargestellt sind die in Leber (blau) und Milz (weiß) gefundenen Aktivitäten von Cholesteryloleat und Cholesteryloleylether als Fraktionen der nach 2 min im gesamten Plasma gemessenen Aktivitäten. Die beiden Balken auf der linken Seite stellen die Gesamtaufnahme des Cholesteryloleylether in Leber und Milz dar. Links jeweils die wildtyp Tiere, rechts die transgenen. Die beiden Balken auf der rechten Seite zeigen die Gesamtaufnahme von Cholesteryloleat an. Wt: wildtyp, tg: transgen, COE: Cholesteryloleylether, CO: Cholesteryloleat.

der Aktivität in den transgenen Mäusen und $21 \pm 5\%$ in der Vergleichsgruppe verblieben. Vom Cholesteryloleylether waren es $53 \pm 11\%$, bzw. $52 \pm 28\%$. Oleat, das aus der Hydrolyse von Cholesteryloleat entsteht und aus den Zellen ins Plasma hätte sezerniert werden können, wurde nicht gefunden. Die gemessene Aktivität entsprach über den gesamten Versuchszeitraum konstant der Hintergrundaktivität. Da sich im ersten Turnover gezeigt hatte, dass nur Leber und Milz relevante Mengen des injizierten Substrates ansammelten, wurde im zweiten Experiment auf die Entnahme anderer Organe verzichtet. In Abbildung 9 sind die Aufnahmen von Cholesteryloleat und Cholesteryloleylether in Leber und Milz gezeigt. Sie sind als Fraktionen der nach 2 min im gesamten Plasma gemessenen Aktivitäten dargestellt. Entgegen den Erwartungen zeigte sich, dass die Milz den Hauptanteil der Radioaktivität

	Organgewichte (mg)		Spezifische Aufnahmen (dpm/100mg)		
	wildtyp	transgen	wildtyp	transgen	
Leber	1224±46	1285±118	COE	54±18	44±24
			CO	33±10	39±22
Milz	79±16	86±12	COE	310±145	294±85
			CO	9257±4913	7187±5374

Tabelle 4: Gewichte und spezifische Aufnahmen in die Organe (zweiter Turnover). Entnommen wurden Leber und Milz. Auf der linken Seite sind die Organgewichte, auf der rechten die spezifischen Aktivitäten pro 100mg Organgewicht dargestellt. Bei den Organgewichten und den spezifischen Aktivitäten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Milz nahm pro 100 mg Organgewicht deutlich mehr Cholesteryloleat und Cholesteryloleylether auf, als die Leber.

aufnahm. Sie enthielt $28 \pm 14\%$ ($25 \pm 11\%$ in der Vergleichsgruppe) des injizierten Cholesteryloleates, im Gegensatz zur Leber, die in beiden Versuchsgruppen knapp über einen Prozent aufnahm. Cholesteryloleylether wurde zu $3 \pm 1\%$ ($3 \pm 2\%$ in der Vergleichsgruppe) durch die Milz aufgenommen. Hier war die Leber der Hauptaufnahmeort, deren Aufnahme mit $7 \pm 4\%$ ($8 \pm 3\%$ in der Vergleichsgruppe) etwa das Doppelte betrug. Damit ergab sich eine deutlich geringere Aufnahme des Cholesteryloleylethers in die Organe als des Cholesteryloleats, was sich in der langsameren Aufnahmekinetik aus dem Plasma wieder spiegelt. Zwischen den transgenen und wildtyp Tieren ergab sich dabei kein signifikanter Unterschied. Vom Cholesteryloleat wurden in den transgenen Tieren insgesamt 52% der zu Beginn im Plasma gemessenen Radioaktivität wieder gefunden, 47% in den wildtyp Tieren. Vom Cholesteryloleylether waren es in beiden Gruppen jeweils 63%. Wie im ersten Versuch war die Milz für beide Markierungen das Organ mit der größten spezifischen Aufnahme. Im zweiten Experiment war sie jedoch größer im Vergleich zu der Leber (Tabelle 4). Durch die Bestimmung des in den Organen gefundenen Oleates konnte der Hydrolysegrad des Cholesteryloleates berechnet werden, der im Zusammenhang mit der Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase steht. Unterschiedliche Mengen an Oleat wurden in den Vergleichsgruppen dabei nicht gemessen. Die Milz enthielt jedoch parallel zu ihrem hohen Gehalt an Cholesteryloleat wesentlich größere Mengen als die Leber. In ihr wurden

3681±1554 dpm (3643±1433 dpm in der Vergleichsgruppe) und in der Leber 10,9±3,4dpm (11,7±3,3dpm in der Vergleichsgruppe) nachgewiesen. Da durch die Hydrolyse und weitere Stoffwechselaktivität der Gehalt an Cholesteryloleat in den Organen vermindert wird, ist die Berechnung des Hydrolyseverhältnisses mit seiner Hilfe verfälscht (siehe oben). Es wird dazu die an das Oleat gebundene Aktivität durch die Aktivität des Cholesteryloleythers geteilt. In den Lebern der transgenen Tiere fand sich eine signifikant höhere Hydrolyse als in der Vergleichsgruppe (Abbildung 10). Wird der Hydrolysegrad der wildtyp Tiere auf 100% gesetzt, weisen die transgenen Tiere eine Hydrolyse von 145±49% auf (94±50% in der Milz).

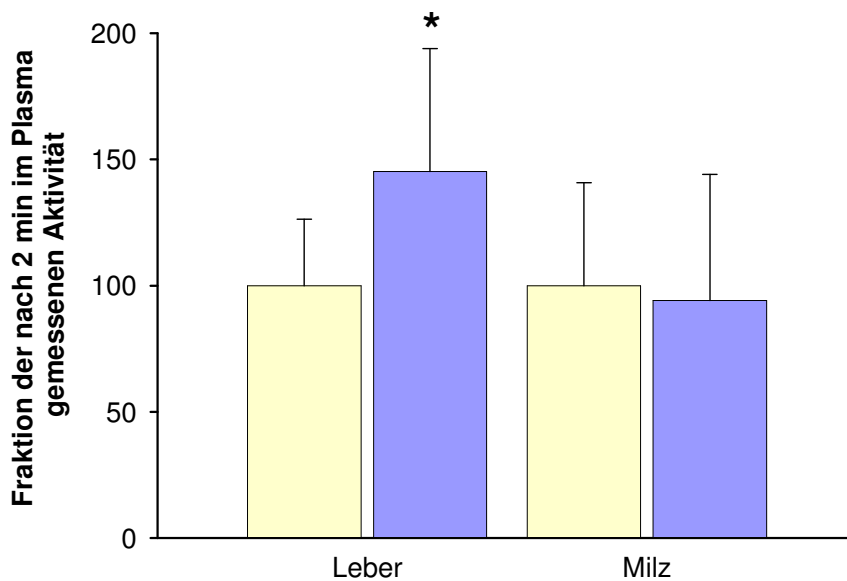


Abbildung 10: Hydrolysegrad von Cholesteryloleat in wildtyp und transgenen Mäusen. Dargestellt ist der Hydrolysegrad von Cholesteryloleat in der Leber und Milz. Er wurde berechnet, indem die Aktivität von Oleat durch die von Cholesteryloleyther geteilt wurde. Der Hydrolysegrad der wildtyp Tiere ist auf 100 % gesetzt. Das Cholesteryloleyther entspricht dabei der Menge des Cholesteryloleates, das insgesamt in den Zellen akkumuliert wäre, da es nicht gespalten wird und somit in keine weitere Stoffwechselwege gelangt. In den Lebern der transgenen Tiere liegt mit 145% eine signifikant größere Hydrolyse als in denen der wildtyp Tiere vor ($p=0,04$). Die blauen Balken zeigen die Werte der wildtyp Tiere, die weißen der transgenen Tiere an. * $p=0,04$.

E Diskussion

In einem transgenen Mausmodell für die leberspezifische Expression der humanen Lysosomalen Sauren Lipase wurde mit Turnover Experimenten der kinetische Stoffwechsel von humanen Chylomikronen und an LDL gebundenem Cholesteryloleat untersucht. Es wurde gezeigt, dass durch die Überexpression keine unterschiedliche Abgabe von Lipoproteinen aus dem Blut verursacht wird, wie es hätte erwartet werden können. Des Weiteren wurde kein Unterschied in der Einspeicherung in die Organe der transgenen Tiere beobachtet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die höhere Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase eine verstärkte Hydrolyse von Cholesteryloleat in der Leber der transgenen Tiere hervorruft, die für die nachgewiesene vermehrte Einspeicherung von Lipiden ursächlich ist. Die Versuche schlossen sich einer weitgehenden Charakterisierung der Tiere unter normaler und cholesterolreicher Diät an. Hierbei wurde beobachtet, dass aufgrund einer geschlechtsspezifischen Regulation des Promotors, hinter dem das Gen der humane Lysosomale Saure Lipase in das Genom der Tiere eingebracht wurde, die männlichen Tiere eine doppelt so hohe Aktivität wie die weiblichen Tiere aufwiesen. Deswegen wurden die Versuche dieser Arbeit nur mit den männlichen Tieren durchgeführt. Unter der normalen Diät wurde lediglich eine Verschiebung des Fettsäuremusters in den Lebern beobachtet. In den unter der cholesterolangereicherten Diät gehaltenen Tieren wurde jedoch eine signifikante Mehreinspeicherung von Lipiden in den Lebern nachgewiesen, während sie im Plasma im Vergleich zu den wildtyp Tieren eine erhöhte VLDL Konzentration aufwiesen (Dissertation Mayet 2003).

Der kinetische Metabolismus von Chylomikronen wurde von einer Arbeitsgruppe in Ratten, Kaninchen, Meerschweinchen und Hunden untersucht. Den Tieren wurden radioaktiv markierte humane Chylomikronen injiziert und die Aktivität in Plasma und Organen beobachtet. Nach 30 Minuten Versuchszeit wurden 65% bis 95% der injizierten Chylomikronen aus dem Plasma entfernt. Diese Werte stimmen mit den von uns gefundenen 65%, bzw. 68% in transgenen Tieren, überein (Hussain et al. 1989a, Hussain et al. 1989b). Der kinetische LDL Metabolismus in Ratten und Kaninchen wurde 1982 von zwei anderen Gruppen untersucht. Sie injizierten mit ^{14}C -Sucrose markierte LDL. Dabei wurden nach 24 Stunden Versuchszeit zwischen 75% und 95% der Aktivität aus dem Plasma eliminiert (Pittman *et al.* 1982, Carew *et al.* 1982). Die für das Cholesteryloleat in unserem Experiment gefundenen Aktivitäten, die im Plasma verbleiben (77%, bzw. 75% in transgenen Tieren), stimmen mit ebenfalls diesen Werten überein. Eine veränderte Aufnahmekinetik zwischen den Vergleichsgruppen, wie sie bei anderen kinetischen Experimenten an Tiermodellen gefunden wurde, die für Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels transgen waren, wurde weder bei den Chylomikronen noch bei den LDL gefunden. So führt eine erhöhte LPL Aktivität zum Beispiel zur verstärkten Aufnahme von HDL oder VLDL Partikeln (Rinninger *et al.* 1998, Merkel *et al.* 1998, Merkel *et al.* 2000).

Die Überexpression der Lysosomalen Sauren Lipase in der Leber bewirkt also keine Veränderung der Aufnahme von Lipoproteinen. Dieses Ergebnis bestätigt die bei der vorhergehenden Charakterisierung gemachten Beobachtungen, in denen keine Unterschiede in der Expression von Apolipoproteinen und Lipoproteinrezeptoren in den transgenen Mäusen nachgewiesen werden konnten. Die Ak-

tivität des Apo A-I, des Hauptapolipoproteins der HDL, war nicht erhöht. Auch die Aktivität des SR-B1 blieb unverändert, über den selektiv Cholesterolester von den HDL in die Leber aufgenommen werden. Es findet also keine gesteigerte Aufnahme von Lipiden durch den Reversen Cholesteroltransport in die Leber statt. Die ebenfalls gleiche Expression der LRP und LDL-R in den Versuchstiergruppen lässt auf eine ebenfalls gleiche Aufnahme von Apo-E reichen Partikeln, wie zum Beispiel VLDL, schließen.

Da die Aufnahme von VLDL Partikeln in transgenen Tieren nicht vermindert ist, muß deren erhöhte Konzentration im Plasma auf einer gesteigerten Produktionsrate beruhen. Auf der anderen Seite ist die Aufnahme von HDL und anderen Lipoproteinen in die Leber nicht erhöht, so dass sich die Frage stellt, wie es zu der beobachteten Mehreinspeicherung der Lipide in der Leber kommt. Da nicht mehr Lipide in die Zellen aufgenommen werden, müssen entweder weniger abgegeben, oder mehr in der Zelle synthetisiert werden. Das pathophysiologische Modell, nach dem durch die erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase vermehrt Triacylglycerole und Cholesterolester in den Lysosomen gespalten werden und ihre Produkte in das Zytoplasma geschleust werden, wird im Folgenden beschrieben. Durch den erhöhten Anfall von Lipiden werden die Exkretionsmechanismen über die Gallen- und VLDL-Synthese hoch reguliert, was die erhöhte plasmatische VLDL Konzentration erklärt. Die Transportkapazität dieser Mechanismen könnte durch die Überladung der Zellen mit Lipiden überschritten werden. Zudem bewirkt der vermehrte Einstrom von Lipiden ins Zytoplasma eine Reaktion im *futile cycle*, so dass es zu einer Nettoeinspeicherung von Lipiden kommt.

Die männlichen transgenen Tiere, die in dieser Arbeit für die Experimente verwendet wurden, wiesen eine etwa zweifach erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase in der Leber auf. Es wurde daher von einer verstärkten Hydrolyse von Cholesterolestern und Triacylglycerolen in den Lysosomen ausgegangen. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass durch die erhöhte Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase in den transgenen Tieren tatsächlich die Hydrolyse von Cholesterolestern erhöht wurde. Die Bestimmung des Verhältnisses von Oleat zu Cholesteryloleylether in der Leber der transgenen Tiere ergab einen um etwa die Hälfte größeren Hydrolysegrad des Cholesteryloleates als in den Tieren der Vergleichsgruppe. Damit wurde ein wichtiger Stoffwechselschritt in der Entstehung der Leberverfettung bei erhöhter Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase aufgezeigt. In den Lysosomen der transgenen Tiere liegen durch die gesteigerte Hydrolyse mehr freies Cholesterol und freie Fettsäuren vor. Diese werden in Folge eines Feedback Mechanismus vermehrt in das Zytoplasma ausgeschleust. Die bei der Charakterisierung gefundenen erhöhten Werte für freies Cholesterol und freie Fettsäuren sind hierdurch bedingt. Das freie Cholesterol ist zytotoxisch und wird im Zytoplasma von der ACAT verestert (Warner et al. 1995). Als Cholesteryloleat ist es nicht mehr toxisch und kann in der Zelle gespeichert werden. Die Aktivität der ACAT wird allosterisch durch das Substratangebot geregelt (Chang et al. 1997; Chang et al. 1998), wobei freies Cholesterol sie verstärkt. Die ACAT verestert es mit freien Fettsäuren, die durch die Hydrolyse der Triacylglycerole ebenfalls vermehrt vorliegen. So kommt es zu der gleichermaßen beobachteten Erhöhung von Cholesterolestern und Triacylglycerolen in der Leber.

Die beschriebene Veresterung der Lipide durch die ACAT führt sie in den *futile cycle* des Cholesterols im Zytoplasma ein. Die Mobilisierung der Cholesterolester aus den Lipidvakuolen des Zytoplasmas erfolgt über Hydrolyse durch die NCEH, die sie in freies Cholesterol und eine freie Fettsäure spal-

tet. Das freie Cholesterol kann entweder über die Gallensäuresynthese oder die Synthese von Lipoproteinen aus der Zelle geschleust werden, oder es wird zur Biosynthese von Steroidhormonen oder der Plasmamembran benutzt. Da sowohl die ACAT als auch die NCEH ständig aktiv sind, besteht ein Fließgleichgewicht zwischen freiem Cholesterol und Cholesterolestern. So kann der Gehalt an freiem Cholesterol genau reguliert werden und das Substratangebot dem Stoffwechselbedarf der Zelle angepasst werden.

Da die Leber die großen Mengen an freiem Cholesterol nicht in gleichem Maße abgibt, wie sie sie aufnimmt, wird durch einen kinetischen Effekt sowie die Überlastung der Abgabemechanismen für Cholesterol hervorgerufen. Eine Arbeitsgruppe experimentierte 1999 mit Mäusen, die die Hormonsensitive Lipase (HSL) überexprimierten. Sie ist eine NCEH und hydrolysiert Cholesterolester und Triacylglycerole im Zytoplasma. Die Lebern der Mäuse wiesen paradoxerweise eine vermehrte Lipideinspeicherung auf, anstatt ihren Cholesterolgehalt zu vermindern, wie es durch die verstärkte Hydrolyse der Ester hätte erwartet werden können. Die vorgefundene Nettoeinspeicherung wurde dadurch erklärt, dass die ACAT stärker als die HSL von dem erhöhten Substratangebot aktiviert wird (Escary *et al.* 1999). Der gleiche Mechanismus tritt in den transgenen Mäusen auf. Das freie Cholesterol und die freien Fettsäuren aktivieren die ACAT stärker als die Cholesterolester und Triacylglycerole die NCEH aktivieren. Als Folge werden mehr Lipide im Zytoplasma eingespeichert. Ein zweiter Grund für die Einspeicherung kann in der Überlastung der Abgabemechanismen der Lipide liegen. Überschüssiges Cholesterol kann von den Leberzellen über die Galle ausgeschieden oder in VLDL verpackt an die Peripherie abgegeben werden. Bei der Charakterisierung wiesen die transgenen Tiere eine erhöhte Aktivität der Cyp7A1 auf. Dies spricht für eine verstärkte Gallensäureproduktion, mit der das Cholesterol über den Magen Darm Trakt ausgeschieden wird. Die vermehrt vorliegenden freien Fettsäuren verstärken zudem die VLDL Syntheserate der Zellen. In den transgenen Mäusen wurde eine verstärkte Apo-E Synthese gefunden. Da keine vermehrte Apo-B Synthese nachgewiesen wurde, wurde von einer verstärkten Beladung der VLDL und nicht einer erhöhten Anzahl freigesetzter Partikel ausgegangen. Die Erhöhung der VLDL Konzentration im Plasma ist also indirekt auf die Lipidüberladung der Leberzellen zurückzuführen.

In den Tieren mit erhöhter Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase wäre durch die größere hydrolytische Aktivität ein erhöhter Umsatz von Lipiden in den Zellen vorstellbar gewesen, der letztendlich zu einer verminderten Lipidkonzentration im Blut führen würde. Da jedoch eine Nettoeinspeicherung in den Leberzellen stattfindet, werden gegenregulatorisch nicht vermehrt Lipide aus dem Blut aufgenommen, so dass kein lipidsenkender Effekt im Blut sichtbar wird. Im Gegenteil, die Konzentration der VLDL ist erhöht. Die hohe Konzentration von Cholesterol und freien Fettsäuren im Zytoplasma bewirkt eine Downregulation der LDL Rezeptoren um eine Überschwemmung der Zelle mit Lipiden zu verhindern. Weiterhin wird die endogene Cholesterolsynthese über die Verminderung der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase gebremst. Um eine Rolle der Lysosomalen Sauren Lipase in Hinsicht auf ihren Einfluss auf den systemischen Lipidspiegel zu untersuchen, sind weitere Experimente notwendig. Diese könnten sich den Versuchen einer Forschergruppe anschließen, die mit erhöhter ACAT Aktivität in Schaumzellen experimentierten (siehe oben), da sich die Mechanismen der vermehrten Einspeicherung gleichen. Experimente mit Zellen, die die Lysosomale Sauren Lipase überexprimieren und gleichzeitig eine erhöhte Abgabekapazität von Cholesterol und Triacylglycerolen aufweisen, sind e-

benfalls interessant. So wurden 2003 von einer weiteren Gruppe Versuche zur Entspeicherung von Schaumzellen durchgeführt, die eine erhöhte ACAT Aktivität aufwiesen. Die Zellen wurden in Nährmedien mit unterschiedlicher Aufnahmekapazität für freies Cholesterol beobachtet. Die Gruppe fand, dass die Entspeicherung der Schaumzellen in Medien mit besserer Aufnahmekapazität effektiver war (Ghosh *et al.* 2003). Ebenso könnten Experimente mit transgenen Mäusen, die neben der hohen Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase eine verminderte Aktivität der ACAT aufweisen das Zusammenspiel der intrazellulär gelegenen Enzyme des Fettstoffwechsels weiter aufklären. Die Verminderung der ACAT Aktivität ist Ziel der pharmakologischen Forschung für die Arteriosklerosetherapie. Mehrere Inhibitoren der ACAT sind inzwischen erhältlich, jedoch nur für den experimentellen Gebrauch. Durch sie werden die Veresterung und so die Einspeicherung der Cholesterolester in den Zellen unterbunden. Experimente haben gezeigt, dass die ACAT-Inhibitoren den Cholesterolefflux aus den Zellen erhöhen (Chang *et al.* 1997).

Die in unserem Experiment beobachtete unterschiedliche Plasmakinetik und Organaufnahme von Cholesteroleat und Cholesteryloylether war unerwartet. Die Aufnahmekinetiken und Verteilung in den Organen entsprechen in vorausgegangenen Experimenten einander (Stein *et al.* 1980, Stein *et al.* 1982). In der vorgelegten Arbeit ist jedoch ein deutlicher Unterschied im Aufnahmeverhalten zu erkennen. Cholesteryloylether wird langsamer aus dem Plasma entfernt, so dass dort am Versuchsende noch etwa die Hälfte der Aktivität verbleibt, im Vergleich zu 23% beim Cholesteroleat.

Diese unterschiedliche Plasmakinetik ist hauptsächlich auf eine ungleiche Aufnahme in die Organe, vor allem die Milz, zurückzuführen. Wie in anderen Experimenten gezeigt, nimmt die Leber, trotz höherer spezifischer Aufnahmekapazität der Milz, den größten Teil des Cholesteryloylethers auf. Insgesamt liegt sie jedoch auf einem niedrigen Niveau mit 8% der injizierten Menge (Stein *et al.* 1981). Bei der Aufnahme des Cholesteroleates ist es genau umgekehrt. Die Milz nimmt ein Vielfaches der Leber auf. Mit etwa 28% der injizierten Menge sind das drei bis viermal mehr als Cholesteroleat. Die gesamte wieder gefundene Aktivität beider Lipide ist mit Werten aus der Literatur vergleichbar. Von einer Arbeitsgruppe wurden in Plasma, Leber und Milz nach 25 Stunden Versuchszeit etwa 48% der injizierten LDL wieder gefunden, in unseren Experimenten waren es zwischen 47% und 64%. Die restliche Aktivität verteilt sich auf das nicht gemessene Fett- und Muskelgewebe, Haut, Darm, Urin und Stuhl (Carew *et al.* 1982).

Die unterschiedliche Aufnahme in die Organe könnte durch die verschiedenen Aufnahmemechanismen von Lipiden in Leber und Milz erklärt werden. Im Gegensatz zur Leber nimmt die Milz Lipide hauptsächlich unspezifisch über Makrophagen auf. Sie enthält etwa 5% der gesamten im Körper vorhandenen retikuloendothelialen Zellen (Desai und Thakur 1985). In der Leber werden Lipide zum größten Teil über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Diese Aufnahme in die Leber wird vom intrazellulären Lipidgehalt reguliert (siehe Einleitung). Durch erhöhte Lipidmengen wird die Aktivität der LDL Rezeptoren vermindert. Es werden weniger Lipide aufgenommen. Das Angebot an Lipiden an andere Organe, wie zum Beispiel der Milz, erhöht sich konsekutiv. Da die Aufnahme der Milz nicht durch den intrazellulären Gehalt geregelt wird, nimmt sie reaktiv eine größere Lipidmenge auf. Ein solcher Mechanismus wird *spillover* genannt und wurde 1974 erstmals beschrieben (Bradfield 1974, Jitten und Patel 1986). Ein ähnlicher Mechanismus könnte in unserem Experiment selektiv die Auf-

nahme des Cholesteryloleats in der Leber hemmen und zu einer erhöhten Aufnahme in die Milz geführt haben.

Es sind ebenfalls Unterschiede in der plasmatischen Verstoffwechslung von Cholesteryloleat und Cholesteryloleythern bekannt. Cholesterolester und Cholesterolether werden von der CETP mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten umgesetzt. Als Folge verteilen sich die Ester schneller auf andere Lipoproteine, hauptsächlich von HDL auf LDL, aber auch umgekehrt und können so schneller aufgenommen werden (Green *et al.* 1989). Dieser Effekt wurde für Spezies mit hoher CETP Aktivität, wie Schweine, Ratten und Menschen beschrieben. Da Mäuse eine niedrige CETP Aktivität haben, tritt dieser Effekt in ihnen kaum zutage (Guyard-Dangremont *et al.* 1998).

Der Einfluss der Lysosomalen Sauren Lipase auf den Lipidhaushalt ist somit nicht so unmittelbar, wie er bei einer Reihe anderer hydrolytisch wirksamer Enzyme, wie zum Beispiel der LPL oder EL, ist. Durch die intrazelluläre Lage des Enzymes ist der Angriffspunkt auf die plasmatischen Lipide indirekt. Eine Veränderung der Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase wirkt sich deshalb nicht direkt auf den Lipidspiegel im Blut aus. Da der intrazelluläre Lipidhaushalt über das Zusammenspiel weiterer Enzyme, wie der ACAT und der NCEH, sowie verschiedener Exkretionsmechanismen reguliert wird, kann die Veränderung der Aktivität eines einzelnen Enzymes durch die anderen Enzymaktivitäten aufgefangen werden und zu kaum merklichen oder sogar paradoxen Resultaten führen. Daher ist die Funktion der Lysosomalen Sauren Lipase im Zusammenhang mit der Aktivität anderer intrazellulär gelegener Enzyme und Stoffwechselwege zu sehen. Trotz dieser schwierigen experimentellen Bedingungen sind in Laborexperimenten bereits Erfolge mit der gentherapeutischen Behandlung von Mausmodellen der Wolman Erkrankung und CESD erfolgreich verlaufen. Ihre Anwendung auf den Menschen muß jedoch sorgfältig vorbereitet werden und wird wahrscheinlich noch längere Zeit brauchen (Du *et al.* 1998, Du *et al.* 2001a, Du *et al.* 2001b, Du *et al.* 2002).

F Zusammenfassung

Mithilfe von Turnoverversuchen wurde der Einfluss auf den kinetischen Stoffwechsel von Lipiden und Lipoproteinen in einem transgenen Mausmodell der Lysosomale Saure Lipase untersucht. Durch Einbringen des Gens der humanen Lysosomalen Sauren Lipase wurden Mäuse mit einer leberspezifischen Überexpression generiert. Bei ihrer Charakterisierung wurde eine Fettsäureerhöhung in der Leber festgestellt, die sich unter einer cholesterolreichen Diät verstärkte. Es speicherten sich vermehrt freies Cholesterol, Cholesterolester und Triacylglycerole ein. Darüber hinaus wurde eine erhöhte VLDL Konzentration im Blut nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die männlichen Tiere untersucht, da sie eine zweifach höhere Aktivität der Lysosomalen Sauren Lipase aufwiesen als die weiblichen.

In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurden zwei Turnover Versuche mit Chylomikronen sowie Cholesteryloleat und Cholesteryloleylether durchgeführt. Im Zusammenhang mit den Resultaten der vorhergehenden Charakterisierung wurde hier das pathophysiologische Modell der Tiere vervollständigt. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression der Lysosomalen Sauren Lipase zu einer um die Hälfte verstärkten Hydrolyse von Cholesteryloleat in der Leber führt. Als Folge werden die vermehrt anfallenden Hydrolyseprodukte aus den Lysosomen in das Zytoplasma geschleust und erhöhen die Aktivität der cholesterolausschleusenden Mechanismen der Leberzellen. In der Charakterisierung wurde eine erhöhte Gallensäureproduktion und Apo-E Synthese beobachtet, die eine gesteigerte VLDL Produktion bedeuten und deren hohe plasmatische Konzentration erklären kann. Durch Übersteigen der Exkretionskapazität dieser Mechanismen und der verstärkten Aktivierung der ACAT kommt es zu der nachgewiesenen Nettoeinspeicherung von Lipiden. Es wurde in dieser Arbeit ebenfalls belegt, dass die Überexpression nicht zu einer erhöhten Aufnahme von Lipiden führt. Dabei werden weder verstärkt Lipoproteine noch selektiv Cholesterolester in die Zellen aufgenommen. Eine erhöhte Aufnahme trägt damit nicht zu der Leberverfettung der transgenen Tiere bei.

Neben Cholesteryloleat wurde in den Versuchen auch Cholesteryloleylether verwendet, das ähnliche Stoffwechseleigenschaften hat, aber in den Lysosomen akkumuliert. Auf diese Weise lässt sich die Gesamtaufnahme des Cholesterolesters bestimmen. In dieser Arbeit wurden Unterschiede in der Verstoffwechselung beider Lipide beobachtet, die vorher nicht beschrieben wurden. Die Milz nahm im Gegensatz zur Leber große Mengen Cholesteryloleat und wenig Cholesteryloleylether und dabei insgesamt die größte Lipidmenge auf. Als Folge wurde das Cholesteryloleylether langsamer aus dem Plasma eliminiert. Die Beobachtungen könnten auf spezifische Unterschiede in der Organaufnahme sowie eine reaktive Mehraufnahme in die Milz zurückzuführen sein.

Nach den bisherigen Ergebnissen hat die Lysosomale Saure Lipase als intrazellulär gelegenes Enzym keinen direkten Einfluss auf den Lipidspiegel im Blut. Die Erhöhung ihrer Aktivität führt jedoch im Zusammenspiel mit anderen intrazellulär gelegenen Enzymen zu erhöhter Einspeicherung in die Organe. Ob die Lysosomale Saure Lipase eine Rolle in der Entstehung und Therapie der Arteriosklerose spielt und wenn ja, welche, ist noch nicht vollständig verstanden und wird Ergebnis weiterer Forschungsbemühungen sein.

G Verzeichnisse

1. Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ACAT	Acyl Coenzym-A Acyl Transferase
acLDL	acetylierte LDL
ACS	Akutes Koronarsyndrom
Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BPB	Bromphenolblau
Ca ²⁺	Calcium
cDNS	komplementäre DNS
CESD	Cholesterol Ester Storage Disease
CETP	Cholesterol Ester Transfer Protein
CM	Chylomikronen
CoA	Coenzym-A
CURL	compartment of uncoupling of ligament and receptor
dd	doppelt destilliert
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	desintegrates per minute
FC	freies Cholesterol
FFA	freie Fettsäuren (free fatty acids)
GL	Gastrische Lipase
HL	Hepatische Lipase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzym-A Reduktase
HSL	hormonsensitive Lipase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin Cholesterol Acyl Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	Low Density Lipoprotein Rezeptor
Lp(a)	Lipoprotein a
LRP	LDL receptor related protein
Man-6-P	Mannose-6-Phosphat

NCEH	neutrale Cholesterol Ester Hydrolase
NLSD	neutral lipid storage disease
NPC1	Niemann Pick C1
OD	Optische Dichte
oxLDL	oxidierte LDL
PAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCR	polymerase chain reaction
PL	Phospholipide
RCT	reverse cholesterol transport
RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
RES	Retikuloendotheliales System
RLL	rat lingual lipase
RPM	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SP	Strukturprotein
SR-B1	scavenger receptor B1
SRE	steroid response element
SREBP	steroid response element binding protein
TAG	Triacylglycerol
tPA	tissue plasminogen activator
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung der Lipoproteine.....	6
Abbildung 2: Extrazellulärer Lipidmetabolismus.....	9
Abbildung 3: LDL Rezeptor und intrazellulärer Stoffwechsel der Lipide.....	11
Abbildung 4: Stoffwechsel der Lysosomalen Sauren Lipase.....	14
Abbildung 5: Computertomographie von Patienten mit Wolman Erkrankung und CESD.....	16
Abbildung 6: Gelelektrophorese von Schwanzspitzenbiopsien.....	29
Abbildung 7: Plasmaaktivitäten und Organaufnahmen von wildtyp und transgenen Mäusen.....	35
Abbildung 8: Plasmaaktivitäten von wildtyp und transgenen Mäusen (zweiter Turnover).....	36
Abbildung 9: Organaufnahmen von wildtyp und transgenen Mäusen.....	37
Abbildung 10: Hydrolysegrad von Cholesteryloleat in wildtyp und transgenen Mäusen.....	38
Tabelle 1: Apolipoproteine und mit ihnen verbundene Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels.....	8
Tabelle 2: Risikofaktoren der Arteriosklerose.....	20
Tabelle 3: Gewichte und spezifische Aufnahmen in die Organe (erster Turnover).....	34
Tabelle 4: Gewichte und spezifische Aufnahmen in die Organe (zweiter Turnover).....	38

3. Literaturverzeichnis

- Abramov A, Schorr S, Wolman M (1956). Generalized xanthomatosis with calcified adrenals. *Am J Dis Child* 91: 282 - 286.
- Anderson RA, Rao N, Byrum RS, Rothschild CB, Bowden DW, Hayworth R, Pettenati M (1993). In situ localization of the genetic locus encoding the lysosomal acid lipase/cholesterol esterase (LIPA) deficient in Wolman disease to chromosome 10q23.2-q23.3. *Genomics* 15: 245 - 247.
- Anderson RA, Sando GN (1991). Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase. Similarities to gastric and lingual lipases. *J Biol Chem* 266: 22479 - 22484.
- Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NB, Pain D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss JF (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.
- Assmann G, Seedorf U (1995). Acid Lipase Deficiency: Wolman Disease and Cholesterol Ester Storage Disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*. McGraw and Hill, New York: 2563 -2587.
- Attie A, Pittmann R, Steinberg D (1980). Metabolism of native and of lactosylated human low density lipoprotein: Evidence for two pathways for catabolism of exogenous proteins in rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 77: 5923 – 5927.
- Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR (2001). Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res* 42: 1717 - 1726.
- Beisiegel U (1995). Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 6: 117 - 122.
- Beisiegel U, Krapp A, Weber W, Olivecrona G (1994). The role of alpha 2M receptor/LRP in chylomicron remnant metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 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.
- Bonner MJ, Miller BF, Kothari HV (1972). Lysosomal enzymes in aortas of species susceptible and resistant to atherosclerosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 139: 1359 – 1367.

- Bradfield JW (1974). Control of spillover. The importance of Kupffer-cell function in clinical medicine. *The Lancet* 2: 883 – 886.
- Brooks B, Weinhold PA (1986). The activity and properties of an acidic triacylglycerol lipase from adult and fetal rat lung. *Biochemical and physiological acta* 875: 39 - 47.
- Brown MS, Sabhani MK, Braunschede GY, Goldstein JS (1976). Restoration of a regulatory response to low density lipoprotein in acid lipase-deficient human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 251: 711 - 720.
- Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1980). The cholesterol ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *Recent Progress in Hormon Research* 35: 215 - 257.
- Brown MS, Goldstein JL (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry* 52: 223 – 261.
- Brown MS, Goldstein JL (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 43 - 37
- Buechler C, Ullrich H, Aslanidis C, Bared SM, Lingenhel A, Ritter M, Schmitz G (2003). Lipoprotein(a) downregulates lysosomal acid lipase and induces interleukin-6 in human blood monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1642: 25 – 31.
- Buton X, Mamdouh Z, Ghosh R, Du H, Kuriakose G, Beatini N, Grabowski G, Maxfield F, Tabas I (1999). Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained of methylated aggregated low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 274: 32112 – 32121.
- Calvo D, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA, Vega MA (1997). CLA-1 is an 85-kDa plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL and VLDL) and modified (OxLDL and ACLDL) lipoproteins. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 17: 2341 – 2349.
- Carew T, Pittman R, Steinberg D (1982). Tissue sites of degradation of native and reductively methylated [¹⁴C] Sucrose-labeled low density lipoprotein in rats. *Journal of Biological Chemistry* 257: 8001 – 8008.
- Chang TY, Chang C, Cheng D (1997). Acyl-Coenzyme A:Cholesterol acyltransferase. *Annual Review of biochemistry* 66: 613 - 638.

- Chang CC, Lee CY, Chang ET, Cruz JC, Levesque MC, Chang TY (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. *Journal of Biological Chemistry* 273: 35132 – 35141.
- Chiang JY (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: III bile acids and nuclear receptors. *American Journal of Physiology. Gastroenterological and Hepatic Physiology* 284: G349 – G356.
- Clee SM, Zhang H, Bissada N, Miao L, Ehrenborg E, Benlian P, Shen GX, Angel A, LeBoeuf RC, Hayden MR (1997). Relationship between lipoprotein lipase and high density lipoprotein cholesterol in mice: modulation by cholesteryl ester transfer protein and dietary status. *Journal of Lipid Research* 38: 2079 – 2089.
- Cyrus T (1999). Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 103: 1597 - 1604.
- Davis HR, Glagov S, Zarins CK (1985). Role of acid lipase in cholesteryl ester accumulation during atherogenesis. Correction of enzyme activity with acid lipase-containing macrophage in rabbit and human lesions. *Atherosclerosis* 55: 205 – 215.
- Desai AG, Thakur ML (1985). Radiopharmaceuticals for spleen and bone marrow studies. *Seminars in nuclear medicine* 15: 229 – 238.
- Du H, Duanmu M, Grabowski GA, Hui DY, Witte DP, Mishra J (1998). 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, Witte DP, Ameis D, Grabowski GA (2001). Lysosomal acid lipase deficiency: correction of lipid storage by adenovirus-mediated gene transfer in mice. *Human Gene Therapy* 13: 1361 – 1372.
- Du H, Heur M, Duanmu M, Grabowski GA, Hui DY, Witte DP, Mishra J (2001a). Lysosomal acid deficient-mice: Depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegalie, and shortened life span. *Journal of lipid research* 42: 489 - 500.
- Du H, Heur M, Witte DP, Ameis D, Grabowski GA (2002). Lysosomal acid lipase deficiency: correction of lipid storage by adenovirus-mediated transfer in mice. *Human Gene Therapie* 13: 1361 - 1372.
- Du H, Schiavi S, Levine M, Mishra J, Heur M, Grabowski GA (2001b). Enzyme therapie for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Human Molecular Genetics* 10: 1639 - 1648.

- Escary JL, Choy HA, Reue K, Wang XP, Castellani LW, Glass CK, Lusic AJ, Scholz MC (1999). Paradoxical effect on atherosclerosis of hormone-sensitive lipase overexpression in macrophages. *Journal of Lipid Research* 40: 397 – 404.
- Fielding CJ, Fielding PE (1995). Role of an N-ethylmaleimide-sensitive factor in the selective cellular uptake of low-density lipoprotein free cholesterol. *Biochemistry* 34: 14237 – 14244.
- Fowler SD, Brown J (2004). Lysosomal acid lipase. In: Borgström, B& Brockmann, HL (eds). *Lipases* 329 - 364.
- Frederickson D S, ONO K, DAVIS L L (1963). Lipolytic activity of post-heparin plasma in hyperclyceridemia. *J. Lipid Res.* 35: 24 - 33.
- Gimbrone MA (1999). Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *American Journal of Pathology* 155: 1 - 5.
- Glomset JA, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J (1966). Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *journal of lipide research* 7: 638 - 648.
- Glomset JA (1968). The plasma lecithin:cholesterol acyltransferase reaction. *Journal of Lipid Research* 9: 155-167.
- Glueck CJ, Lichtenstein P, Tracy T, Speirs J (1992). Safety and efficacy of treatment of pediatric cholesteryl ester storage disease with lovastatin. *Pediatric Research* 32: 559 – 565.
- Goldstein JL, Dana SE, Faust JR, Beudet AL, Brown MS (1975). Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein: Observation in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *Journal of Biological Chemistry* 250: 8487 - 8497.
- Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 76: 333 – 337.
- Goldstein JL, Kita T, Brown MS (1983). Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine* 309: 288 - 296.
- Ghosh S, Clair R, Rudel LL (2003). Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase. *Journal of lipid research* 44: 1833 – 1840.

- Green S, Beltz W, Goldberg D, Pittman R (1989). Cholesteryl oleyl and linoleyl ethers do not trace their ester counterparts in animals with plasma cholesteryl ester transfer activity. *Journal of Lipid Research* 30: 1405 - 1410.
- Guyard-Dangremont V, Desrumaux C, Gambert P, Lallemand C, Lagrost L (1998). Phospholipid and cholesteryl ester transfer activities in plasma from 14 vertebrate species. Relation to atherogenesis susceptibility. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 120: 517 - 525.
- Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS (2000). Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 275:12003 – 12008.
- Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS (1980). Lipoprotein and lipid transport. *In* *Metabolic Control and Disease*. 8th edition. PK Bondy and LE Rosenberg, editors: 393 - 494.
- Havel RJ, Hamilton RL (1988). Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. *Hepatology* 8: 1689 – 1704.
- 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.
- Higgins MK, McMahon HT (2002). Snap-shot of clathrin-mediated endocytosis. *Trends in Biochemical Science* 27: 257 – 263.
- Hoflack B, Kornfeld S (1985). Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *Journal of Biological Chemistry* 260: 12008 - 12014.
- Hussain M, Mahley R, Boyles J, Lindquist P, Brecht W, Innerarity T (1989). Chylomicron Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 264: 17931 – 17938.
- Hussain M, Mahley R, Boyles J, Menahem F, Brecht W, Lindquist P (1989). Chylomicron-remnant Clearance by Liver and Bone Marrow in Rabbits. *Journal of Biological Chemistry* 264: 9671 – 9582.
- Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochemical and physiological acta* 1300: 151 - 170.

- 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.
- Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips GH, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR (1997). Scavenger Receptor B1 promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry* 272: 20982 - 20985.
- Jitten D, Patel H (1984). Differentiation in hepatic and splenic phagocytic activity during reticuloendothelial blockade with cholesterol-free and cholesterol-rich liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 888: 184 - 190.
- Hakala KH, Oksjoki R, Laine P, Du H, Grabowski G, Kovanen P, Pentikäinen M (2003). Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 23: 1430 - 1439.
- Kostner GM, März W (2001). Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: Schwandt P, Richter PO, Parhofer KG (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, pp. 3 – 57. Schattauer, New York, Stuttgart.
- Kornfeld S (1986). Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *Journal of Clinical Investigation* 77: 1 - 6.
- 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, Shen WJ (2002). Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipid Research* 43: 1585 – 1594.
- Krivit W, Peters C, Dusenbery K, Ben-Yoseph Y, Ramsay NK, Wagner JE, Anderson R (2000). Wolman disease successfully treated by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 26 : 567 – 570.
- Lageron A, Caroli I, Stralin H, Barbier P (1967). Polycorie cholestérique de l'adulte. I. Étude clinique, électronique, histochimique. *Presse médicale* 75: 2785 - 2799.

- Lambert G, Chase MB, Dugi K, Bensadoun A, Brewer HB, Santamarina-Fojo S (1999). Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *Journal of Lipid Research* 40: 1294 – 1303.
- Lawn R, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter J, Seilhammer JJ, Vaughan AM, Oram JF (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular Apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *Journal of Clinical Investigation* 104: R25 – R31
- Leone L, Ippoliti PF, Antonicelli R (1991). Use of simvastatin plus cholestyramine in the treatment of lysosomal acid lipase deficiency. *Journal of pediatrics* 119: 1008 – 1009.
- Libby P (1999). Changing concepts of atherogenesis. *Journal of Internal Medicine* 247: 349 - 358.
- Lohse P, Maas S, Lohse P, Sewell A, van Diggelen O, Seidel D (1999). Molecular defects underlying Wolman disease appear to be more heterogeneous than they appear. *Journal of Lipid Research* 40: 221 – 228.
- Lusis AJ (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407: 233 - 241.
- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN (1993). Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. 104 – 135.
- 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.
- Marshall WC, Ockenden BC, Fosbrooke AS, Cumings JN (1968). Wolman's disease: A rare lipidosis with adrenal calcification . *Archives of disease childhood* 44: 331 - 340 .
- Mayet S (2003). Biochemische und physiologische Untersuchungen der lysosomalen sauren Lipase im transgenen Tiermodell. Dissertation
- McFarlane AS (1958). Efficient trace labelling of proteins with iodine. *Nature* 182: 53 – 57.
- Merkel M, Weinstock P, Chajek-Shaul T, Radner H, Yin B, Breslow J, Goldberg I (1998). Lipoprotein lipase Expression Exclusively in Liver. Am Mouse Model for Metabolism in the Neonatal Period and During Cachexia. *Journal of Clinical Investigation* 102: 893 – 901.
- 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.
- Morisaki N, Murano S, Shinomiya M, Sasaki N, Shirai K, Matsuoka N, Mizobuchi M, Akikusa B, Saito Y, Kumagai A (1982). *Atherosclerosis* 43: 51 – 57.
- Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O (1997). Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *Journal of Biological Chemistry* 272: 17551 – 17557.
- Neary R, Bhatnagar D, Durrington P, Ishola M, Arrol S, Mackness M (1991). An investigation of the role of lecithin:cholesterolacyltransferase and triglyceride-rich lipoproteins in the metabolism of pre-beta high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 89: 35 - 48.
- Nishina PM, Lowe S, Verstuyft J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B (1993). Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *Journal of Lipid Research* 34: 1413 – 1422.
- Olofsson S-O, Bjursell G, Boström G, Carlsson P, Elovson J, Protter A, Reuben M, Bondjers G (1987). Apolipoprotein B: Structure, biosynthesis and role in the lipoprotein assembly process. *Atherosclerosis* 68: 1 – 17.
- Parton RG, Richards AA (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 4: 724 - 738.
- Patsch JR (1987). Postprandial lipaemia. Shepard J, ed. *Lipoprotein Metabolism. Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism: International Practice and Research*: 551 – 580.
- Petchev PG, Vanier MT, Beaudet AL, Suzuki K (1995). Niemann-Pick disease type c: a cellular cholesterol lipidosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS eds. *The metabolic and molecular basis of inherited diseases*. McGraw and Hill, New York: 2563 -2587.
- Pittman R, Khoo J, Steinberg D (1974). 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.
- Pittman E, Carew T, Attie A, Witztum J, Watanabe Y, Steinberg D (1982). Receptor-dependent and receptor-independent degradation of low density lipoprotein in normal rabbits and in receptor-deficient mutant rabbits. *Journal of Biological Chemistry* 257: 7994 – 8000.

- Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in the HDL metabolism. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 94: 12610 - 12615.
- Riley JW, Glickman RM (1979). Fat malabsorption – advances in our understanding. *American Journal of Medicine* 67: 980 – 988.
- Rinninger F, Kaiser T, Mann W, Meyer N, Greten H, Beisiegel U (1998). Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. *Journal of Lipid Research* 39: 1335 - 1348.
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *National Genetics* 22: 352 – 355.
- Rye KA, Barter PJ (2003). Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein AI. *arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24: 1 - 8.
- Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS (1998). Molecular identification of the sterol-regulated luminal proteases that cleaves SREBP's and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell* 2: 505 - 514.
- Sando GN, Henke VL (1982). Recognition and receptor-mediated endocytosis of the lysosomal acid lipase secreted by cultured human fibroblasts. *Journal of lipid research* 23: 114 - 123.
- Sando GN, Ma GP, Lindsley KA, Wei YP (1990). Intercellular transport of lysosomal acid lipase mediates lipoprotein cholesteryl ester metabolism in human vascular endothelial cell fibroblast coculture system. *Cell Regulation* 1: 661 - 672.
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM (1992). The amphiphathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33:141-166.
- Seedorf U, Ellinghaus P, Roch N (2000). Sterol carrier protein-2. *Biochemical and physiological acta* 1486: 45 - 54.
- Spady DK (1999). Reverse cholesterol transport and atherosclerosis regression. *Circulation* 100: 576 - 578.

- Stein Y, Halperin G, Stein O (1981). The fate of cholesteryl linoleyl ether and cholesteryl linoleate in the intact rat after infection of biologically labeled human low density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta* 663: 569 – 574.
- Stein Y, Stein O, Halperin G (1982). Use of ³H-cholesteryl linoleyl ether for the quantitation of plasma cholesteryl ester influx into the aortic wall in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis* 2: 281 – 289.
- Stein O, Stein Y (1999). Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis* 144: 285 - 301.
- Strauss JF, Liu P, Christenson LK, Watari H (2002). Sterols and intracellular vesicular trafficking: lessons learned from the study of NPC1. *Steroids* 67: 947 - 951.
- Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Miyamori I, Yamamoto TT (2003). The very low density lipoprotein (VLDL) receptor. A peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. *Molecular Cell Biochemistry* 248: 121 - 127
- von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G (2001). High density lipoproteins and arteriosclerosis. arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 21: 13 - 27.
- Wang M, Briggs R (2004). HDL: The metabolism, function, and therapeutic importance. *Chemical reviews* 104: 119 - 137.
- Wang SL, Stato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77: 53 - 62.
- Warner TG, Dambach LM, Shin JH, O'Brien JS (1981). Purification of the lysosomal acid lipase from human liver and its role in lysosomal lipid hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 256: 2952 - 2957.
- Warner GJ, Stoudt G, Bamberger M, Johnson WJ, Rothblat GH (1995). Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 270: 5772 – 5778.
- Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russel DW (1984). The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39: 27 – 38.

H Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Ameis für die Bereitstellung des Themas und seines Labors zur Durchführung der Experimente. Seine angenehme Art und stets offenes Ohr haben ein Übriges dazu gegeben, dass ich mich dort sehr wohl gefühlt habe.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Zschenker für die stete Begleitung durch die gesamte Arbeit. Ohne seine Hilfe und Einführung in der Laborarbeit hätte die Arbeit niemals vollbracht werden können. Seine offene Art erleichterte die manchmal frustrierende Arbeit.

Sehr herzlich danke ich Herrn PD Dr. Merkel. Ohne seine Hilfe bei der Planung und Durchführung der Turnoverversuche wäre die Arbeit ebenfalls nie möglich gewesen. Er war immer ansprechbar und fand Zeit, um Ergebnisse und andere Probleme zu besprechen.

Ich danke auch unserer MTA Frau Schmid sehr herzlich für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Auch Frau Dr. Mayet, die die Mauslinie charakterisierte, sei für ihre Unterstützung in Fragen zu Versuchen und Tieren gedankt.

Herrn Dr. Heeren möchte ich für die Bereitstellung der markierten Chylomikronen und der LDL danken.

Dank gilt auch Frau Prof. Beisiegel und Herrn Prof. Rinninger für die Bereitstellung ihrer Counter, um unsere Proben messen zu können.

Dank gilt auch den Mitarbeitern aus dem nephrologischen Labor für die Ratschläge zur Beseitigung von Giftstoffen und die Bereitstellung von Gasmasken.

Natürlich möchte ich meiner Mutter (und meinem Vater) danken, die immer ein offenes Ohr für mich hat, zu jeder Zeit und für alles. Ohne geht's nicht. Und meinem Bruder für alles andere.

I Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Till Illies

Geburtsdatum: 7.10.1976

Geburtsort: Hamburg

Nationalität: Deutsch

Familienstand: Ledig

Ausbildung:

Schulische Ausbildung:	1983 – 1987	Grundschule Windmühlenweg, Hamburg
	1987 – 1996	Gymnasium Christianeum, Hamburg
	1993 – 1994	Alvord High School, Texas, USA
Zivildienst:	1996 – 1997	ASB Rettungsdienst Hamburg
Studium:	1997 – 1998	Allgemeine Ingenieurwissenschaften, Technische Universität Hamburg-Harburg
	1998 – 2004	Medizinstudium, Universität Hamburg
	2002 - 2003	Studium an der Université de Bordeaux II, Bordeaux
	10/2000	Physikum
	10/2001	1. Staatsexamen
	10/2003	2. Staatsexamen
	10/2004	3. Staatsexamen,
Promotion:	10/2001	Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Ameis an der II. Medizinischen Klinik der Universität Hamburg Eppendorf
Beruf:	4/2005	Assistenzarzt in der Abteilung für Neurologie, AK St. Georg, Hamburg, bei Prof. Dr. Vogel

J Erklärung

Hiermit versichere ich, alle in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse selbstständig erworben und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen zum Verfassen dieser Arbeit genutzt zu haben.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden

Hamburg, den 24. August 2005