

Aus der III. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. R. Stahl

**Untersuchung der Funktion des VLDL-Rezeptors bei der durch
Lipoproteinlipase (LPL) vermittelten Lipoproteinaufnahme *in vivo***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin vorgelegt von

Nils Stefan Jahn

aus Bönningstedt

Hamburg 2006

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| INHALTSVERZEICHNIS | II |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | V |
| 1. Arbeitshypothese und Fragestellung..... | 1 |
| 2. Einleitung | 2 |
| 2.1. Bedeutung der Lipide und des Lipidstoffwechsels..... | 2 |
| 2.2. Übersicht über den Lipidstoffwechsel | 3 |
| 2.2.1. Exogener Lipidstoffwechsel | 3 |
| 2.2.2. Endogener Lipidstoffwechsel und reverser Cholesteroltransport..... | 4 |
| 2.3. Plasmalipoproteine und Lipoproteinrezeptoren | 5 |
| 2.3.1. Plasmalipoproteine..... | 5 |
| 2.3.2. Lipoproteinrezeptoren | 6 |
| 2.3.2.1. LDL-Rezeptor | 6 |
| 2.3.2.2. VLDL-Rezeptor | 7 |
| 2.3.2.3. LDL-Rezeptor-Related Protein (LRP) | 8 |
| 2.3.2.4. Glykoprotein 330 (gp 330)/ Megalin | 8 |
| 2.3.2.5. Rezeptor-assoziiertes-Protein (RAP) | 8 |
| 2.4. Lipoproteinlipase (LPL)..... | 9 |
| 2.4.1. Synthese, Aufbau Struktur und Eigenschaften der LPL | 9 |
| 2.4.2. Katalytische Funktionen der LPL | 10 |
| 2.4.3. Nichtenzymatische Funktionen der LPL..... | 11 |
| 2.5. Lipidstoffwechselstörungen | 11 |
| 2.5.1. Allgemeines und Einteilung | 11 |
| 2.5.2. LPL-Defizienzen..... | 12 |
| 2.5.2.1. Homozygote LPL-Defizienz (familiäre Hyperchylomikronämie) | 13 |
| 2.5.2.2. Heterozygote LPL-Defizienz..... | 13 |
| 3. Material und Methoden..... | 14 |
| 3.1. Tiere | 14 |
| 3.1.1. Genehmigungen..... | 14 |
| 3.1.2. Allgemeines und Haltung..... | 14 |
| 3.1.3. Mauslinien | 14 |
| 3.1.3.1. VLDL-R-defiziente Mauslinie..... | 14 |
| 3.1.3.2. Mauslinie mit transgener Überexpression inaktiver LPL | 15 |
| 3.1.4. Zucht | 15 |
| 3.2. Material | 16 |
| 3.2.1. Geräte und Arbeitsmittel | 16 |
| 3.2.2. Chemikalien..... | 18 |
| 3.2.3. Medikamente | 19 |
| 3.2.4. Pufferlösungen..... | 19 |
| 3.2.5. Enzyme, Proteine und Oligonukleotide | 20 |
| 3.3. Methoden..... | 21 |
| 3.3.1. Tiere | 21 |
| 3.3.1.1. Blutentnahme..... | 21 |
| 3.3.1.2. Narkosen..... | 21 |
| 3.3.1.3. Schwanzbiopsien..... | 21 |
| 3.3.1.4. Injektionen | 22 |
| 3.3.2. Genotypisierung..... | 22 |
| 3.3.2.1. Schwanzbiopsieverdau | 22 |
| 3.3.2.2. DNA-Extraktion..... | 22 |
| 3.3.2.3. PCR | 22 |

| | | |
|------------|---|----|
| 3.3.2.3.1. | VLDL-R-PCR | 22 |
| 3.3.2.3.2. | MCK-N-LPL-PCR | 23 |
| 3.3.2.4. | Gelelektrophorese | 23 |
| 3.3.3. | Lipoproteine | 24 |
| 3.3.3.1. | Allgemeines | 24 |
| 3.3.3.2. | Auftrennung der Lipoproteine | 24 |
| 3.3.3.3. | FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) | 24 |
| 3.3.3.4. | Quantitative Bestimmung von Triglyceriden | 25 |
| 3.3.3.5. | Quantitative Bestimmung von Cholesterol | 25 |
| 3.3.4. | Metabolische Studien | 26 |
| 3.3.4.1. | Prinzip | 26 |
| 3.3.4.2. | Markierung der Lipoproteine | 26 |
| 3.3.4.3. | Durchführung | 26 |
| 3.3.4.4. | Radioaktivitätsmessung | 27 |
| 3.3.5. | Sterilisation | 27 |
| 4. | Ergebnisse | 28 |
| 4.1. | PCR | 28 |
| 4.1.1. | VLDL-R-KO-PCR | 28 |
| 4.1.2. | MCK-N-LPL-PCR | 28 |
| 4.2. | Zuchtergebnisse | 29 |
| 4.3. | Lipoproteinprofil | 29 |
| 4.3.1. | Plasmalipide im Nüchternzustand | 29 |
| 4.3.1.1. | Sequenzielle Lipoproteinultrazentrifugation | 29 |
| 4.3.1.2. | Fast Liquid Protein Chromatographie (FPLC) | 30 |
| 4.3.2. | Plasmalipide nach High-fat-Diät | 31 |
| 4.3.2.1. | Sequenzielle Lipoproteinultrazentrifugation | 31 |
| 4.4. | Metabolische Studien | 32 |
| 4.4.1. | VLDL-Turnover | 32 |
| 4.4.1.1. | Turnover mit weiblichen Tieren | 32 |
| 4.4.1.2. | Turnover mit männlichen Tieren | 34 |
| 5. | Diskussion | 37 |
| 6. | Zusammenfassung | 39 |
| 7. | Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen | 40 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 41 |
| | Danksagung | 51 |
| | Lebenslauf | 52 |
| | Eidesstattliche Versicherung | 54 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------------|--|
| ABCA1 | ATP-binding cassette transporter |
| apo | Apolipoprotein |
| AS | Aminosäure |
| Asn | Asparagin |
| ASP | Aspartat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | zirka |
| cDNA | complementary DNA |
| CDTA | Trans-1,2-Diaminocyclohexan-Tetraessigsäure |
| CE | Cholesterolester |
| CETP | Cholesterylester-Transferprotein |
| Chol | Cholesterol |
| Cl | Chlor |
| d'ATP | desoxy Adenin |
| d'CTP | desoxy Cytosin |
| d'GTP | desoxy Guanin |
| d'TTP | desoxy Thymin |
| DNA | Desoxyribonucleinacid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | desoxy Nukleotidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzymed linked Immuno Sorbent Assay |
| FCHL | Familiäre Kombinierte Hyperlipoproteinämie |
| FPLC | fast protein liquid chromatographie |
| Gp 330 | Glykoprotein 330 |
| HCl | Salzsäure |
| HDL | High density lipoprotein |
| His | Histidin |
| HMG-CoA-Reduktase | β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA-Reduktase |
| hLPL | humane LPL |
| IDL | Immediate density lipoprotein |
| KH_2PO_4 | Kaliumdihydrogenphosphat |
| kb | Kilobasen |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | kilo Dalton |
| KHK | Koronare Herzkrankheit |
| LCAT | Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LDL-R | LDL-Rezeptor |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LRP | LDL-receptor related protein |
| MCK-N-LPL | transgen exprimierte humane mutierte, katalytisch inaktive LPL mit organspezifischer Expression im Muskel |
| MgCl_2 | Magnesiumdichlorid |
| MHV | Mäuse Hepatitis Virus |
| mRNA | messenger RNA |

| | |
|---------------------------------|---|
| NaCl | Natriumchlorid |
| Na ₂ PO ₄ | Natriumdihydrogenphosphat |
| NHSO ₄ | Natriumhydrogensulfat |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| RAP | Rezeptor-assoziiertes-Protein |
| RNA | Ribonuclein acid |
| rpm | rounds per minute |
| Ser | Serin |
| SR-B1-Rezeptor | Scavanger Rezeptor Klasse B1 |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TG | Triglyzeride |
| Tris | Tris-Hydroxylmethyl-Aminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| v.a. | vor allem |
| VLDL | Very low density lipoprotein |
| VLDL-R | Very low density lipoprotein-Rezeptor |
| VLDL-R ⁺ /. | heterozygot Very low density lipoprotein-Rezeptor-defizient |
| VLDL-R ⁻ /. | homozygot Very low density lipoprotein-Rezeptor-defizient |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass katalytisch inaktive LPL (MCK-N-LPL) sowohl die Aufnahme von ganzen Lipoproteinpartikeln als auch selektiv die Aufnahme von Cholesterolestern (CE) aus Chylomikronen und VLDL in den Muskel von Mäusen verstärkt. Die Aufnahme von Lipoproteinpartikeln, aber nicht die selektive CE-Aufnahme ist von der gleichzeitigen Anwesenheit aktiver LPL im Muskel abhängig. Die Lipoproteinaufnahme von nur apo B-haltigen Lipoproteine (low density lipoproteine (LDL) scheint über den LDL-Rezeptor zu verlaufen; bei Vorhandensein von apo E (Chylomikronen) ist dieser Rezeptor vermutlich von untergeordneter Bedeutung.

Es wird postuliert, dass die LPL-vermittelte Aufnahme von Chylomikronen und VLDL (bzw. deren Remnant-Partikel) im Muskel über den VLDL-Rezeptor verläuft. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden MCK-N-LPL-transgene Mäuse so mit VLDL-Rezeptor defizienten Tieren gekreuzt, dass heterozygote und homozygote VLDL-Rezeptor defiziente Tiere mit und ohne Expression inaktiver LPL im Muskel (also insgesamt vier Gruppen) entstehen. Bei diesen Tieren wurden zunächst mittels sequenzieller Ultrazentrifugation die Lipoproteinspiegel bei normaler Ernährung und nach einer High-fat-Diät im Blut bestimmt. Danach wurden die Ergebnisse mittels einer Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) ergänzt und zur präziseren Einschätzung des Fettstoffwechsels wurden Plasmaturnovers und Organaufnahmestudien mit radioaktiv markierten VLDL durchgeführt.

2. Einleitung

2.1. Bedeutung der Lipide und des Lipidstoffwechsels

Die Lipide haben viele wichtige Funktionen. Sie bilden die Struktur sämtlicher Membranen, sind intrazelluläre Energiespeicher und bilden den Ausgangspunkt für die Biosynthese zahlreicher biologisch aktiver Moleküle wie zum Beispiel (z.B.) der Steroidhormone und Eikosanoide.

Für diese lebensnotwendigen und bedeutenden Aufgaben ist ein gut funktionierender Stoffwechsel notwendig um z.B. die benötigten Substrate an die richtigen Gewebe zu liefern bzw. sie für den Transport im Blut in eine hydrophile Form umzuwandeln.

Daher ist es leicht zu verstehen, dass es bei Störungen im Lipidstoffwechsel zu einer Anzahl an, zum Teil auch, bedrohlichen Krankheitsbildern kommen kann.

Die Fettstoffwechselstörungen, insbesondere erhöhte LDL- und verminderte HDL-Spiegel führen zur Atherosklerose und gehören neben dem Rauchen, erhöhten Blutdruck und Diabetes mellitus zu den Risikofaktoren 1. Ordnung für die Entstehung beziehungsweise (bzw.) Begünstigung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) (Assmann et al., 2002; Grundy et al., 1998). Alle diese Faktoren sind beeinflussbar und jeder für sich alleine kann eine Entstehung einer KHK bewirken (Smith et al. 2000). Weitere Risikofaktoren sind das metabolische Syndrom (eine Kombination aus Fettsucht, erhöhtem Blutdruck, Neigung zu Diabetes mellitus und Blutfetterhöhung), Bewegungsmangel, psychosoziale Faktoren, sowie Veränderungen verschiedener Laborparameter wie kleine LDL-Partikel, erhöhte Triglyceride (TG), Fibrinogen, Homozystein, Lipoprotein[a], C-reaktives Protein, Plasminogen activating factor inhibitor. Als unbeeinflussbare Faktoren kommen noch die genetische Disposition, männliches Geschlecht und das Lebensalter hinzu (Assmann et al., 2002; Grundy et al., 1998; Smith et al., 2000). Die Entwicklung der Erkrankung hängt wesentlich von individuellen Prädispositionsfaktoren ab, wozu auch genetische Faktoren zählen. Derzeit wird von etwa 50 meist noch unbekannt Genen ausgegangen. Für einige Gene, zum Beispiel für das der LPL, konnte eine Assoziation mit der KHK in klinischen Studien nachgewiesen werden (Übersicht in Merkel, Eckel et al., 2002).

Die Atherosklerose ist auch für weitere Erkrankungen mitverantwortlich wie z.B. die zerebrovaskulären Erkrankungen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Sie ist in der westlichen Welt die Haupttodesursache (ca. 50% aller Menschen) und hat eine hohe Morbidität mit entsprechenden sozioökonomischen Auswirkungen (Bruckenberg 2000, Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.2000).

2.2. Übersicht über den Lipidstoffwechsel

2.2.1. Exogener Lipidstoffwechsel

Mit der Nahrung werden neben Kohlenhydraten und Proteinen auch Lipide aufgenommen, die sich aus ca. 90% TG und 10% Phospholipiden, Cholesterin (Chol) und fettlöslichen Vitaminen zusammensetzen. Zur Verdauung müssen die Nahrungslipide zunächst emulgiert und dann zum Teil enzymatisch gespalten werden. Die enzymatische Spaltung beginnt im Magen durch eine säurestabile Lipase aus den Speicheldrüsen sowie aus den Hauptzellen des Magens. Die weitere Verdauung findet durch die Pankreasenzyme statt. Insbesondere die Pankreaslipase, die die TG hydrolysiert, so dass 2-Monoacylglycerole und freie Fettsäuren entstehen ist neben weiteren Enzymen wie z.B. der Phospholipase A oder der Cholesterolesterase für die Fettverdauung verantwortlich. Die Pankreaslipase besteht aus zwei Komponenten: einer Kolipase, die aus einer Pro-Kolipase durch Trypsinogen aktiviert und an der Lipid-Wasser-Grenze fixiert wird, sowie der Lipase, die sich mit der Kolipase zu einem Komplex verbindet. Da die Produkte der Lipolyse schlecht wasserlöslich sind werden sie in Micellen eingebaut, deren Grundgerüst aus Gallensäuremolekülen besteht. Durch diese Micellenbildung können die Lipide von der Darmmukosa aufgenommen werden. Im Enterozyten werden die Fettsäuren wieder zu TG zusammengebaut, die in Form von Chylomikronen über die Lymphe in die Blutbahn gelangen. Die Chylomikronen bestehen aus den TG, CE, anderen Lipiden sowie aus einer Hülle von apo B-48, apo A-I, A-II und Phospholipiden. In den peripheren Geweben, besonders in den Kapillaren von Muskel- und Fettgewebe, werden die TG der Chylomikronen durch die Lipoproteinlipase (LPL), die durch apo C-II aktiviert wird, hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden den Geweben als Substrate zur Energiegewinnung und Speicherung zur Verfügung gestellt. Weiterhin verlieren die Chylomikronen ihre C-Apoproteine und nach Interaktionen vor allem mit High-density-lipoprotein (HDL) bleibt ein CE- und apo E-reicher Chylomikronenremnant über. Dieser gelangt nach genügender TG-Hydrolyse zusammen mit der sich vom Endothel ablösenden LPL zur Leber. In der Leber kommt es zu einer apo B-, apo E- und/ oder LPL-getriggerten Aufnahme, wobei apo E und die LPL zunächst die Bindung an hepatische Proteoglykane vermitteln und die Aufnahme schließlich über den Low-density-lipoprotein (LDL)-Rezeptor (LDL-R) und das LDL-Rezeptor related protein (LRP) erfolgt. Die Chylomikronen werden lysosomal abgebaut und die LPL sowie das apo E kann wieder verwendet werden (Heeren et al., 2003).

2.2.2. Endogener Lipidstoffwechsel und reverser Cholesteroltransport

Der endogene Weg dient dazu, die Gewebe im Nüchternzustand mit Fetten zu versorgen. In den Hepatozyten werden die Very-low-density-lipoproteine (VLDL) aus TG, Chol, Phospholipiden sowie den Apoproteinen C-I, C-II, C-III, apo B-100 und apo E synthetisiert und in die Blutbahn abgegeben. Wie auch die Chylomikronen werden diese Partikel in den peripheren Geweben mit Hilfe der LPL hydrolysiert und geben apo C-I, C-III, apo E, Phospholipide und freies Chol an HDL ab. Ein Teil der übrig gebliebenen VLDL-Remnants werden über den LDL-Rezeptor und das LRP in die Hepatozyten wieder aufgenommen. Dieser Vorgang wird durch LPL, apo B und apo E vermittelt. Der andere Teil konvertiert u.a. mit Hilfe der LPL und der hepatische Lipase zu IDL (intermediate density-lipoprotein) bzw. weiter zu LDL. Dabei verlieren die VLDL-Remnants ihren apo E Anteil und nehmen CE mit Hilfe des Cholesterin-Transferproteins (CETP) aus HDL auf. Die LDL werden über die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen, wobei vor allem apo B-100 als Ligand eine Rolle spielt. Die Hauptaufgabe der LDL-Partikel ist die Bereitstellung von Chol für die Gewebe. Den größten Anteil am LDL-Metabolismus hat die Leber. Weiterhin ist eine hohe LDL-Rezeptordichte auf Geweben mit hohem Chol-Bedarf zu finden wie z.B. der Nebennierenrinde und den Gonaden, da über die Rezeptordichte die Aufnahme von Chol in die Zelle reguliert wird. Die Expression des Rezeptors richtet sich nach der Konzentration des freien Chol im Zytoplasma der Zelle.

Es besteht noch die Möglichkeit über den Scavenger pathway LDL in extrahepatische Gewebe aufzunehmen. Hierbei erfolgt die Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren, die u.a. auf dem retikulohistiozytären System zu finden sind. Durch die Aufnahme der acetylierten und oxidierten LDL können Schaumzellen entstehen, die eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose spielen.

Das HDL ist für den Rücktransport von freiem Chol aus den peripheren Geweben und aus anderen Lipoproteinen zur Leber zuständig. Dieser Weg wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet. Durch diese Eigenschaft wirkt HDL atheroprotektiv (Glomset, 1968). Die HDL werden u.a. aus Phospholipiden und Apoproteinen mit Hilfe der Lezithin-Cholesterol-Azyl-Transferase (LCAT) und CETP gebildet. Ein bedeutender Teil entsteht allerdings mit Hilfe des ABCA1 (ATP-binding cassette transporter). Der Mechanismus ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt (Yokoyama, 2006). Die in der Leber synthetisierten HDL bestehen u.a. aus den Apoproteinen A-I; A-II; und apo E. Das Chol wird entweder mit dem ganzen HDL-Partikel rezeptorvermittelt in die Leber aufgenommen oder es werden nur selektiv die CE ohne die Apoproteine mit Hilfe des SR-B1 Rezeptors aus dem

Kern der HDL aufgenommen. Eine weitere Möglichkeit ist die Übertragung von Chol durch CETP an andere Lipoproteinklassen, mit denen dann der Rücktransport in die Leber stattfindet.

2.3. Plasmalipoproteine und Lipoproteinrezeptoren

2.3.1. Plasmalipoproteine

Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften müssen die Lipide für ihren Transport im Blut in eine hydrophile Form überführt werden. Dieses geschieht im Darm und in der Leber durch die Bildung von Komplexen mit Apoproteinen, die auch noch andere Funktionen besitzen.

| Apolipoprotein | Vorkommen in Lipoprotein | Molekulargewicht [kDa] | Funktion |
|----------------|--------------------------|------------------------|---|
| A-I | HDL, Chylomikronen | 28 | Aktivator der LCAT, Strukturelement von HDL |
| A-II | HDL | 17 | Strukturelemente |
| A-IV | HDL, Chylomikronen | 46 | TG-Stoffwechsel, LCAT-Aktivator |
| A-V | HDL, VLDL, Chylomikronen | 39 | TG-Senkung |
| B-100 | VLDL, IDL | 549 | Ligand des B-Rezeptors |
| B-48 | Chylomikronen | 265 | Strukturelement, Ligand von LRP |
| C-I | VLDL, HDL | 7 | Aktivator LCAT |
| C-II | VLDL, HDL | 8,5 | Aktivator LPL |
| C-III | VLDL, HDL | 8,9 | Inhibitor LPL |
| D | HDL | 21 | Aktivator LCAT, Strukturelement |
| E | VLDL, HDL, (LDL) | 39 | Ligand des E-Rezeptors |
| M | HDL | 47 | Reverser Chol-Transport |

Tab. 1: Wichtige der Apoproteine des menschlichen Serums: Apoproteine mit Vorkommen, Molekulargewicht und Funktion

Die Einteilung der Plasmalipoproteine erfolgt nach ihrer Dichte in die Gruppen Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL (Havel et al., 1955). Eine weitere Einteilung kann man nach den elektrophoretischen Eigenschaften der Lipoproteine machen. Je nach Lipid/ Proteinverhältnis wandern die Lipoproteine unterschiedlich weit im elektrischen Feld. Während Chylomikronen keine elektrophoretische Beweglichkeit haben, wandern LDL mit der β -Globulinfraktion und HDL mit der α -Globulinfraktion. Dementsprechend werden sie als α - bzw. β -Lipoproteine bezeichnet. Die VLDL wandern der β -Globulinfraktion voraus und werden prä- β -Lipoproteine genannt.

| Lipoprotein | Apoproteine | Funktion | Zusammensetzung |
|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--|
| Chylomikronen | B-48, A-I, IV, V, E, C | Transport exogener Lipide | TG 86%, Chol 3%, L/P-Verhältnis 99/1 |
| VLDL | A-V, B-100, E, C-I, II, III | Transport endogener Lipide | TG 55%, Chol 12%, L/P-Verhältnis 90/10 |
| IDL | B-100, E | Transport endogener Lipide | TG 23%, Chol 29%, L/P-Verhältnis 73/17 |
| LDL | B-100 | Chol-Transport zu allen Zellen | TG 6%, Chol 42%, L/P-Verhältnis 78/22 |
| HDL | A-I, II, IV, V, C-I, II, III, D, E, M | Reverser Chol-Transport | TG 3%, Chol 13%, L/P-Verhältnis 50/50 |

Tab. 2: Lipoproteinklassen: Lipoproteinklassen mit Apoproteinen, Funktionen, TG -und Chol-Konzentration sowie Lipid-/ Proteinverhältnis (L/P-Verhältnis)

2.3.2. Lipoproteinrezeptoren

Die Lipoproteinrezeptoren sind die Bindungsstellen für die Apoproteine der Lipoproteine und vermitteln zusammen mit anderen Kofaktoren die endozytotische Internalisierung in die Zelle wie z.B. der LPL. Alle Lipoproteinrezeptoren der LDL-R-Familie sind nach einem einheitlichen Grundschema aufgebaut, das aus fünf Domänen bestehen. Zu dieser LDL-R-Familie genannten Gruppe zählt man u.a. den LDL-R (Brown und Goldstein, 1986), den VLDL-Rezeptor (VLDL-R) (Takahashi et al., 1992), das LRP (Herz et al., 1988) und das Glykoprotein 330 (gp 330/ Megalin) (Saito et al., 1994).

An der ersten der fünf Domänen findet die Ligandenbindung statt und sie befindet sich am aminoterminalen Ende. Sie wird auch als „complement type repeat“ bezeichnet aufgrund ihrer Homologie zu einigen Komplementfaktoren (Stanley et al., 1985). Die zweite Domäne vermittelt die säureabhängige Dissoziation der Liganden vom LDL-R nach endozytotischer Internalisierung (Davis et al., 1987). Sie ähnelt sehr einem Vorläufermodell des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF-Präkursor) (Gray et al., 1983). Die dritte Domäne liegt noch extrazellulär, während die vierte Domäne mit ihren hydrophoben Aminosäuren (AS) die Membran passiert (Yamamoto et al., 1984). Die letzte carboxyterminale Domäne ist für das Rezeptorrecycling und die Verankerung in bestimmten Membrangebieten, den Stachelsaumgrübchen verantwortlich.

2.3.2.1. LDL-Rezeptor

Der LDL-R ist der am besten bekannte Rezeptor aus der LDL-R-Familie und wurde 1986 zum ersten Mal beschrieben (Brown und Goldstein, 1986). Der Großteil dieser Rezeptoren ist auf der Leber zu finden, er ist aber auch in den meisten anderen Geweben nachweisbar. Er ist

beteiligt an dem Gleichgewicht der Cholesterinkonzentration im Plasma. Über einen Feedback-Mechanismus im Zytoplasma der Zelle wird die Expression des Rezeptors reguliert, sowie der Transport an die Zelloberfläche, wo er sich in den mit Clathrin umsäumten Gebieten der Plasmamembran, den so genannte Stachelsaumgrübchen konzentriert (Anderson et al., 1976). Die Liganden für den LDL-R sind apo B-100 und apo E, nicht aber apo B-48. Auch das Rezeptor-assoziierte-Protein (RAP) wird mit niedriger Affinität gebunden. Die Liganden apo E (Innerarity und Mahley, 1978) und apo B-100 binden an unterschiedlichen Regionen von positiven AS-Clustern der Bindungsdomäne (Weisgraber et al., 1983).

Es liegen kontroverse *in vitro* Daten für die Interaktion von LPL mit dem LDL-R vor. Beisiegel et al. fanden keine LPL Bindung an den LDL-R (Beisiegel, 1995), während bei Medh et al. in Fibroblasten, nach Hochregulierung des LDL-R durch einen HMG-CoA-Reduktase Hemmer, die LPL-vermittelte VLDL-Aufnahme deutlich zunahm (Medh et al., 1996).

2.3.2.2. VLDL-Rezeptor

Der VLDL-R kommt vor allem in Herzmuskel-, Skelettmuskel-, und Fettgewebe vor. In der Leber ist er nur sehr vereinzelt zu finden, was eine Beteiligung am Remnantstoffwechsel ausschließt. Das Gen dieses Rezeptors mit 118 kDa ist auf Chromosom 9 lokalisiert und gleicht dem LDL-R-Gen bis auf ein Triplet in der 5' untranslatierten Region. Das Protein verfügt über eine Extradomäne, so dass es acht statt der sieben Wiederholungen einer cystinreichen Aminosäuresequenz beim LDL-R besitzt (Takahashi et al., 1992).

Es gibt eine große Anzahl von Liganden für den VLDL-R. Es wurde die Bindung von LPL und Urokinase-Typ 1-Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ-1 Komplex (Argraves et al., 1995) für den VLDL-R beschrieben, sowie für Thrombospondin 1 (Mikhailenko et al., 1997) und auch für β -VLDL, VLDL und IDL (Takahashi et al., 1995, 1992). Die Aufgabe des Rezeptors scheint die Versorgung der peripheren Gewebe mit Fettsäuren zu sein. Bei VLDL-R defizienten Mäusen konnte man eine reduzierte Fettgewebssmasse und einen verringerten BMI (Body-Maß-Index) feststellen (Frykman et al., 1995). Es gibt verschiedene Erkrankungen die mit Mutationen im VLDL-R beschrieben wurden. Im Huhn führt eine Form zu Sterilität und prämaturer Atherosklerose (Bujo et al., 1995), eine Ausdehnung der Sequenz, die den VLDL-R vom LDL-R unterscheidet wird als Ursache für das Fragile X-Syndrom angenommen (Sakai et al., 1993) und das Vorhandensein dieser Sequenz könnte auch für sporadischen Alzheimer verantwortlich sein (Okuizumi et al., 1995).

2.3.2.3. LDL-Rezeptor-Related Protein (LRP)

Auch das LRP gehört zu der LDL-R-Familie. Es ist identisch mit dem α_2 -Makroglobulin-Rezeptor (Kristensen et al., 1990; Strickland et al., 1990) und kommt hauptsächlich in Hepatozyten (Herz et al., 1988), aber auch in Neuronalzellen des Gehirns und in den Syncytiotrophoblasten der Plazenta vor (Jensen et al., 1988). Das LRP benötigt das RAP als Chaperon und Eskortprotein für die normale Funktion in Leber und Gehirn (Willnow et al., 1995). An der Zelloberfläche ist RAP mit LRP assoziiert (Strickland et al., 1991) und hemmt die Ligandenbindung (Herz et al., 1991; Willnow et al., 1995). LRP war der erste Rezeptor für den eine Interaktion mit der LPL nachgewiesen wurde (Beisiegel et al., 1991; Krapp et al., 1995; Nykjaer et al., 1994), und es spielt eine bedeutende Rolle im Lipoproteinstoffwechsel, insbesondere im Chylomikronenremnant-Stoffwechsel. Es bindet an apo E (Beisiegel et al., 1989), an LPL (Beisiegel et al., 1991; Chappell et al., 1994; Krapp et al., 1995; Nykjaer et al., 1993), an die hepatische Lipase (Shafi et al., 1994; Krapp et al., 1996), an mit apo E angereichertes β -VLDL (Kowal et al., 1989), an mit VLDL assoziierte LPL (Chappell et al., 1994) und an reine β -VLDL (Nykjaer et al., 1993; Krapp et al., 1995).

2.3.2.4. Glykoprotein 330 (gp 330)/ Megalin

Das gp 330 ist mit ca. 600 kDa das bisher größte bekannte Protein aus der LDL-R-Familie und wird deswegen auch Megalin genannt (Saito et al., 1994). Es besitzt ein ähnliches Ligandenspektrum wie das LRP, allerdings ist die Organverteilung deutlich anders. Es kommt im proximalen Tubulus der Niere, an den Ependymzellen (Lundgren et al., 1997) und in zahlreichen anderen Organen vor.

2.3.2.5. Rezeptor-assoziiertes-Protein (RAP)

RAP ist ein heparinbindendes Protein und wird auch 39 kDa Protein genannt. Es ist das humane Homolog des Maus-Heparin-Bindungsprotein 44 (Furukawa et al., 1990) und des Ratten-Heymann-Nephritis-Protein (Pietromonaco et al., 1990). Es wurde erstmals als Komponente die mit LRP interagiert aus menschlicher Plazenta isoliert (Jensen et al., 1989; Kristensen et al., 1990; Ashcom et al., 1990). Es wird vermutet, das RAP auf unterschiedlichen Wegen die LRP-Expression reguliert. Zum einen als Chaperon des LRP bei der Synthese und als Eskortprotein während der Sekretion sowie als kurzfristiger Modulator der LRP-Aktivität (Willnow et al., 1995). RAP wirkt auf Rezeptoren der LDL-R-Familie inhibierend. Dieses wurde für den LDL-R (Medh et al., 1995), den VLDL-R (Battay et al., 1994; Simonsen et al., 1994) und das gp 330 (Moestrup et al., 1993; Orlando et al., 1994)

nachgewiesen. RAP inhibiert auch die Bindung aller bekannten Liganden *in vitro* und *in vivo* an LRP, wie z.B. α_2 -Makroglobulin (Moestrup et al., 1991). RAP bindet mit unterschiedlichen Fragmenten an die Rezeptoren. Der carboxyterminale Teil z.B. konkurriert mit der LPL um eine Domäne des LRP (Nykjaer et al., 1994).

2.4. Lipoproteinlipase (LPL)

2.4.1. Synthese, Aufbau, Struktur und Eigenschaften der LPL

Die LPL gehört in die Genfamilie der neutralen Lipasen und es besteht eine starke Ähnlichkeit zu den Genen der hepatischen Lipase und der Pankreaslipase (Persson et al., 1989; Hide et al., 1992).

Das LPL-Gen ist ca. 30 kb groß und liegt auf dem Chromosom 8p22 und ist in 10 Exons unterteilt (Kirchgessner et al., 1989/ Sparkes et al., 1987). Es gibt zwei RNA mit 3350 und 3750 Nukleotiden. Die cDNA codiert für ein Hauptprotein mit 448 Aminosäuren und je nach Glykosylierungsgrad mit einem Molekulargewicht zwischen 41.700 und 60.000 Dalton (Wion et al., 1987). Die mRNA wurde im Fettgewebe, Muskelgewebe, Niere, Nebenniere, Gastrointestinaltrakt und in der Leber Neugeborener, aber nicht bei Erwachsenen nachgewiesen. Die LPL des Menschen ähnelt der der Maus, Ratte und Kuh stark (Wion et al., 1987; Senda et al., 1987).

Das Enzym besteht aus zwei Domänen. Der carboxyterminale Teil ist die Bindungsstelle für die verschiedenen Lipoproteinrezeptoren und der n-terminale Teil enthält das katalytische Zentrum, das aus drei Aminosäuren: Ser132, Asp156 und His241 (Rutledge et al., 1997), sowie der Bindungsstelle für den Kofaktor apo C-II (Davis et al., 1992) besteht. Das katalytische Zentrum wird durch eine Proteindomäne („Lid“) verdeckt, so dass der freie Substratzugang blockiert wird (Dugi et al., 1992).

Die Synthese und Sekretion der LPL wurde an Zellkulturen von Adipocyten und Herzmuskelzellen untersucht (Garfinkel et al., 1987). Im endoplasmatischen Retikulum wird ein inaktives Proenzym synthetisiert, welches im Golgi-Apparat in mehreren Schritten zum aktiven Enzym glykosyliert und gespalten wird. Die aktive LPL wird in sekretorischen Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert. Zusätzlich zu dem aktivem Enzym kann auch inaktive LPL, die nicht alle Glykosylierungsschritte durchlaufen hat, frei gesetzt werden. Während die inaktive Form als Monomer vorliegt, besteht die aktive LPL aus zwei Glykoprotein-Untereinheiten gleicher Größe und liegt als Homodimer vor.

2.4.2. Katalytische Funktionen der LPL

Die LPL ist das zentrale Enzym der plasmatischen TG-Hydrolyse. Sie hydrolysiert TG aus Chylomikronen und VLDL. Die katalytisch aktive Form der LPL liegt als Homodimer vor und ist an den luminalen heparansulfatreichen Proteoglykanen der Kapillarendothelien gebunden. Durch Heparin-gabe kann die LPL aus ihrer Bindung gelöst und ins Plasma freigesetzt werden. Um ihre enzymatische Funktion zu erfüllen, bedarf es der Anwesenheit des Kofaktors apo C-II. Aus den Chylomikronen und VLDL werden den Geweben, hauptsächlich Herz-, Skelettmuskel- und Fettgewebe, freie Fettsäuren als Energiequelle zur Verfügung gestellt (Übersichten in Goldberg, 1996; Zechner, 1997).

Durch ihre lipolytische Funktion senkt die LPL die TG-Spiegel im Plasma und ist das entscheidende Enzym zum Abbau der Chylomikronen zu Chylomikronenremnants sowie der Initiierung der Konversion der VLDL zu LDL und VLDL-Remnants. Zudem erhöht die LPL die HDL-Konzentration im Plasma durch einen noch unbekanntem Mechanismus. Diskutiert wird eine Beeinflussung der CETP-Funktion durch die VLDL-Konzentration, die Übertragung von strukturellen Komponenten, die bei der Hydrolyse freiwerden, und zuletzt könnten Änderungen im TG-Gehalt der HDL den Abbau der Partikel beeinflussen (Goldberg, 1996).

Bei einer nicht organspezifischen Überexpression der LPL wurde die TG-senkende und HDL-steigernde Funktion der LPL nachgewiesen (Shimada et al., 1993; Zsigmond et al. 1994). Bei Mäusen mit einer Defizienz der LPL (LPL0) kommt es 24h postnatal zu einem Versterben mit einer massiven Hypertriglyzeridämie und einer verminderten Lipidaufnahme ins Gewebe (Coleman et al., 1995, Weinstock et al., 1995). Durch eine gewebsspezifische Expression der LPL konnte ein Überleben gesichert werden und gezeigt werden, dass die Verteilung von Fettsäuren von der Anwesenheit der LPL in dem jeweiligen Gewebe abhängig ist. Mäuse, bei denen nur im Muskel LPL exprimiert wird, haben einen stark verringerten Einstrom von Fettsäuren in das Fettgewebe, gemessen als deutliche Reduktion der Konzentration dieser Fettsäuren. Auch das Fettgewebe war deutlich vermindert unter extremen Bedingungen bei Kreuzung auf eine ob/ob defiziente Mauslinie (Levak-Frank et al., 1997; Weinstock et al., 1997). Bei isolierter Expression von LPL im Herzmuskel wurden ähnliche Ergebnisse erreicht (Levak-Frank et al., 1999). Bei einer ausschließlichen Expression von LPL in der Leber werden die TG von der Peripherie in die Leber umgeleitet und dort zu VLDL und Ketonen metabolisiert. Die Ketone können in der Peripherie als Energiequelle genutzt werden, welches in Zeiten mit begrenzter Glukose-Verfügbarkeit, z. B. perinatal und bei Kachexie, von Bedeutung sein könnte (Merkel et al., 1998).

In der Gatekeeper-Hypothese wird postuliert, dass die Gewebsverteilung der LPL für die Entstehung der Adipositas mitverantwortlich sein kann, da die LPL für die Verteilung der Fettsäuren limitierend ist (Greenwood, 1984, 1985).

2.4.3. Nichtenzymatische Funktionen der LPL

Neben ihren lipolytischen Funktionen ist die LPL an nichtenzymatischen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. Für verschiedene Lipoproteinrezeptoren wurde *in vitro* gezeigt, dass eine direkte Interaktion der LPL mit diesen die Bindung und zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen verstärkt (Beisiegel et al., 1995). Dieses wurde in Studien mit der LPL an LRP (Beisiegel et al., 1991; Chapell et al., 1992; Nykjaer et al., 1993; Williams et al., 1994), an dem LDL-R (Salinelli et al., 1996; Medh et al., 1996) bzw. dem VLDL-R (Agraves et al., 1995) gezeigt. Darüber hinaus fand sich, dass LPL eine Bindung zwischen Proteoglykanen und Lipoproteinen vermittelt (Olivecrona u. Olivecrona, 1995). Dies könnte Lipoproteine in Rezeptornähe konzentrieren und so eine apo E- oder apo B-vermittelte Aufnahme initiieren (Mulder, 1993). Alternativ könnten die so gebundenen Lipoproteine während des Proteoglykan-Turnovers in die Zellen gelangen (Obunike, 1994). Nicht zuletzt gibt es Hinweise *in vitro*, dass die LPL auch eine selektive Cholesterolaufnahme aus HDL verstärkt (Rinninger, 1998), womöglich ähnlich der durch Hepatische Lipase vermittelten Lipidaufnahme (Santamarina-Fojo, 1998).

Zudem wurde ein Tiermodell, mit transgener Expression mutierter, inaktiver LPL im Muskel (MCK-N-LPL) entwickelt, bei dem zum ersten Mal *in vivo* gezeigt wurde, dass LPL sowohl eine selektive Cholesterolaufnahme als auch eine Organaufnahme ganzer Lipoproteinpartikel vermitteln kann. Auch verstärkt inaktive LPL die plasmatische TG-Hydrolyse und die Lipoproteinaufnahme, dieses ist allerdings an die Anwesenheit aktiver LPL in demselben Organ gebunden, während die selektive Cholesterolesteraufnahme hingegen von inaktiver LPL allein vermittelt werden kann (Merkel et al., 1998).

2.5. Lipidstoffwechselstörungen

2.5.1. Allgemeines und Einteilung

Fettstoffwechselstörungen haben klinisch eine große Bedeutung, weil sie u.a. die Entwicklung einer Atherosklerose und die Entstehung einer Pankreatitis begünstigen.

Die Einteilung nach Fredrickson berücksichtigt nur die TG und das Chol. Man unterscheidet die Hypertriglyzeridämien (>200 mg/dl), die Hypercholesterinämien (>200 mg/dl) und die kombinierte Hyperlipidämie (Erhöhung von TG und Chol). Die ursprünglich von Fredrickson

für die Phänotypisierung der familiären Hyperlipoproteinämien verwendete Typeneinteilung ist heute noch nützlich zur Kurzbeschreibung des Lipoproteinmusters, unabhängig von der Form der Hyperlipoproteinämie. Da bei der Typisierung das HDL-Cholesterin und das Lipoprotein[a] nicht mit einbezogen ist, reicht diese Klassifikation zur Beurteilung einer Atherogenität nicht aus. Zudem kann es im Verlauf einer Lipidstoffwechselstörung auch zu einem Wechsel der Gruppe kommen.

| Typ | Serumaussehen | Chol | TG | Lipidelektrophorese | Manifestationsalter | Klinische Befunde |
|-----|---------------|------|-----|-------------------------------|---------------------|---|
| I | milchig | | ↑ | Chylomikronen | < 10 J. | abd. Beschwerden, eruptive Xanthome |
| IIa | klar | ↑ | | β-Lip. | < 30 J. | tendinöse Xanthome |
| IIb | klar-trüb | ↑ | (↑) | β-Lip., prae β-Lip. | < 30 J. | Xanthome |
| III | trüb | ↑ | | abnorme breite β-Bande | Erwachsene | tubero-eruptive Xanthome, Palmar-xanthome |
| IV | trüb-milchig | | ↑ | prae β-Lip. | > 50 J. | eruptive Xanthome |
| V | milchig | ↑ | ↑ | Chylomikronen+ prae β-Lip: | Erwachsene | eruptive Xanthome |

Tab. 3: Phänotypen der Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson (aus Dörner, *Klinische Chemie und Hämatologie*, 4.Auflage)

Somit sind Hyperlipoproteinämien nur Symptome und man teilt die Lipidstoffwechselstörungen nach ihrer Ätiologie in drei große Gruppen ein. Zum einen in die reaktiv-physiologischen Formen durch Überlastung des Stoffwechsels durch z.B. fettreiche Ernährung oder Alkoholgenuss, die sekundär symptomatischen Formen, bei denen es zu einer Stoffwechselstörung durch Erkrankungen oder Medikamente kommt und in primäre (hereditäre bzw. familiäre) Lipidstoffwechselstörungen.

2.5.2. LPL-Defizienzen

Es sind über 100 Mutationen im LPL-Gen bekannt und der Großteil liegt in den Exons fünf und sechs. Die meisten sind sehr selten und führen zur heterozygoten oder homozygoten LPL-Defizienz, die sich durch ansteigende TG-Spiegel, niedrige HDL-Spiegel, als familiäre kombinierte Hyperlipidämie oder früher koronarer Herzkrankheit manifestieren kann (Merkel et al., 2002).

2.5.2.1. Homozygote LPL-Defizienz (familiäre Hyperchylomikronämie)

Die homozygote Defizienz der LPL führt zum völligen Verlust der Aktivität dieses Enzyms, welches bedeutet, dass TG aus Chylomikronen und VLDL nicht mehr abgebaut werden können. Die Folge ist ein dramatischer Anstieg der Plasma-TG weit über 1000 mg/dl und ein sehr niedriger HDL-Wert (Brunzell et al., 1995). Sie tritt sehr selten mit einer Häufigkeit von 1:1000000 auf (Fredrickson et al., 1978). Sie betrifft alle Bevölkerungsgruppen und gleichermaßen beide Geschlechter. Die Patienten leiden unter Bauchschmerzen, rezidivierenden Pankreatitiden, Bewusstseinsstörungen, Xanthomen und/ oder Dyspnoe (Brunzell et al., 1995). Hinzu kann noch eine Vielzahl anderer Symptome kommen. Der Verdacht kann durch die Symptome und einen rahmigen Chylomikronenüberstand auf dem Blutplasma nach mehrstündiger Inkubation bei 4°C gestellt werden. Die Diagnose wird durch den Nachweis der LPL Aktivität im Postheparinplasma mit Hilfe eines ELISA erbracht (Peterson et al., 1992). Die Defekte können die katalytische Aktivität, den Proteintransport, die Translokation, die Heparinbindung oder die Dimerbildung betreffen. Von diesen Defekten ist die Defizienz von apo C-II abzugrenzen, die die gleichen Symptome hervorruft, da sie für die vollständige Aktivität der LPL benötigt wird (Brunzell et al., 1995).

2.5.2.2. Heterozygote LPL-Defizienz

Für einige der vielen beschriebenen Mutationen im LPL-Gen, die eine Veränderung der LPL-Aktivität bewirken, wurde eine Heterozygotenfrequenz von 3-7% gefunden (Benlian, 1996). Im französischen Teil Kanadas wurde sogar eine Frequenz von 17% in der Population festgestellt (Minnich et al., 1995; Normand et al., 1992). In epidemiologischen Studien über eine Assoziation mit der FCHL oder prämaturnen Atherosklerose waren die Aussagen widersprüchlich (Goldberg, 2001; Brunzell, 1995). Im Allgemeinen wird die LPL aufgrund ihrer TG-senkenden Wirkung als antiatherogen betrachtet, allerdings könnte sie auf lokaler Ebene durch eine LPL-vermittelte Bindung und Retention von Lipoproteinen in der Arterienwand proatherogen wirken (Olivecrona et al., 1995; Goldberg et al., 1996, Saxena et al., 1994). In einem Tiermodell wurde gezeigt, dass die Verminderung endothelialer LPL atheroprotektiv sein könnte (Semenkovich et al., 1998). Auch die Überexpression von LPL verminderte die Atherogenese in verschiedenen Tiermodellen (LDL-R- und apo E-defiziente Mäuse sowie Kaninchen) (Fan et al., 2001; Shimada et al., 1996; Yagyu et al., 1999).

3. Material und Methoden

3.1. Tiere

3.1.1. Genehmigungen

Der Laborleitung liegt die Genehmigung (Tierversuchsantrag 20/99) für Tierversuche vor, die nach §7 des Tierschutzgesetzes, genehmigungspflichtige Tierversuche, zu beantragen ist. Auch für die Blutentnahme, anzuzeigen nach §6 (1) Nr. 4 des Tierschutzgesetzes vom 30.04.1999 und die Schwanzspitzenbiopsien, anzuzeigen nach §6 (1) Nr. 2 des Tierschutzgesetzes liegt eine Genehmigung vor.

3.1.2. Allgemeines und Haltung

Die Haltung der Mäuse erfolgt in einer Tierhaltungsanlage des Universitätskrankenhauses Eppendorf in pathogenarmen Räumen und Käfigen. Die Serologien aller neuen Mäuse werden kontrolliert besonders auf das Mäusehepatitisvirus (MHV) um eine Infizierung der restlichen Tiere auszuschließen.

Die Pflege der Mäuse liegt bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Tierhaltung.

Die Nahrung der Tiere besteht aus einer handelsüblichen Nagerdiät. Die Mäuse haben jeder Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Für die High-fat-Diät wurde eine besonders fett- und cholesterinreiche Nahrung gefüttert.

Bei früheren Versuchen stellte man fest, dass die Unterschiede bei Untersuchungen im Lipidstoffwechsel bei den männlichen Tieren deutlicher ausfielen als bei den Weibchen gleichen Alters und gleichen Genotyps, so dass man in der Regel für die jetzigen Experimente die Männchen bevorzugt. Die Tiere sollten mindestens 12 Wochen alt sein, damit sie ausgewachsen und die Stoffwechselwege ausgereift sind.

3.1.3. Mauslinien

3.1.3.1. VLDL-R-defiziente Mauslinie

Um heterozygot VLDL-R-defizienten Tiere zu erhalten wurde durch Gen-Targeting das Exon 5 des VLDL-R-Gens einer Stammzelllinie durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt. (Frykman et al., 1995). Durch Kreuzung der heterozygoten Tiere entstanden homozygote und heterozygote VLDL-R-defizienten Tiere sowie Wildtypiere. Die homozygoten VLDL-R-

defizienten Tiere wurden vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA in die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf eingeführt.

3.1.3.2. Mauslinie mit transgener Überexpression inaktiver LPL

Diese Mauslinie wurde an der Rockefeller University, New York etabliert (Merkel et al., 1998) und in die Versuchstierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf importiert. Es sind transgene Tiere, die enzymatisch inaktive LPL im Muskel exprimieren. Das zur Mikroinjektion hergestellte DNS-Konstrukt aus einem humanen LPL (hLPL) Minigen, das die c-DNA, Intron3 und etwa 500 Basenpaare (bp) 3' genomische DNA enthält, wurde zielgerichtet mutiert (G⁷²¹->A). Hierdurch wurde die zweite Aminosäure Aspartat (Asp156) der katalytischen Triade der LPL durch Asparagin (Asn) ersetzt. Dieses ist die einzige Mutation des katalytischen Zentrums welche bei Patienten mit Chylomikronämie gefunden worden ist (Ma, et al. 1992). Um eine möglichst organspezifische Expression des Transgens in Skelett- und Herzmuskel zu erhalten wurde der Muskel-Kreatinkinase (MCK)-Promotor verwendet (Johnson et al. 1989). Durch quantitative Messung des LPL-Proteins in Prä- und Postheparinplasma wurde gezeigt, dass die Mutation keinen Einfluss auf die Bindung an endotheliale Proteoglykane hat. 98% der plasmatischen LPL wurde durch Heparinabgabe freigesetzt. Die als Dimer vorliegende inaktive LPL wird in 2-2,5facher Menge im Vergleich zur normalen LPL synthetisiert (Merkel, Kako et al. 1998).

3.1.4. Zucht

Die Zucht verläuft in mehreren Schritten. Zuerst werden homozygot VLDL R-defiziente Tiere mit WT-Mäusen, die zusätzlich die inaktive LPL (MCK-N-LPL) zur aktiven LPL des Muskels exprimieren gekreuzt. Hieraus entstehen zu 50% Mäuse die heterozygot VLDL-R-defizient sind und enzymatisch inaktive LPL exprimieren (VLDL-R⁺/MCK-N-LPL), sowie 50% heterozygot VLDL-R-defiziente Mäuse ohne zusätzliche Expression enzymatisch inaktiver LPL (VLDL-R⁺/).

Beim nächsten Schritt werden homozygot VLDL-R-defiziente Tiere mit heterozygot VLDL-R-defizienten Mäusen, die zusätzlich die enzymatisch inaktive LPL exprimieren, gekreuzt. Das Ergebnis sind je 25% homozygot VLDL-R-defiziente Tiere mit (VLDL-R⁺/MCK-N-LPL) und ohne enzymatisch inaktive LPL (VLDL-R⁺/) sowie je 25% heterozygot VLDL-R-defiziente Tiere mit und ohne enzymatisch inaktive LPL.

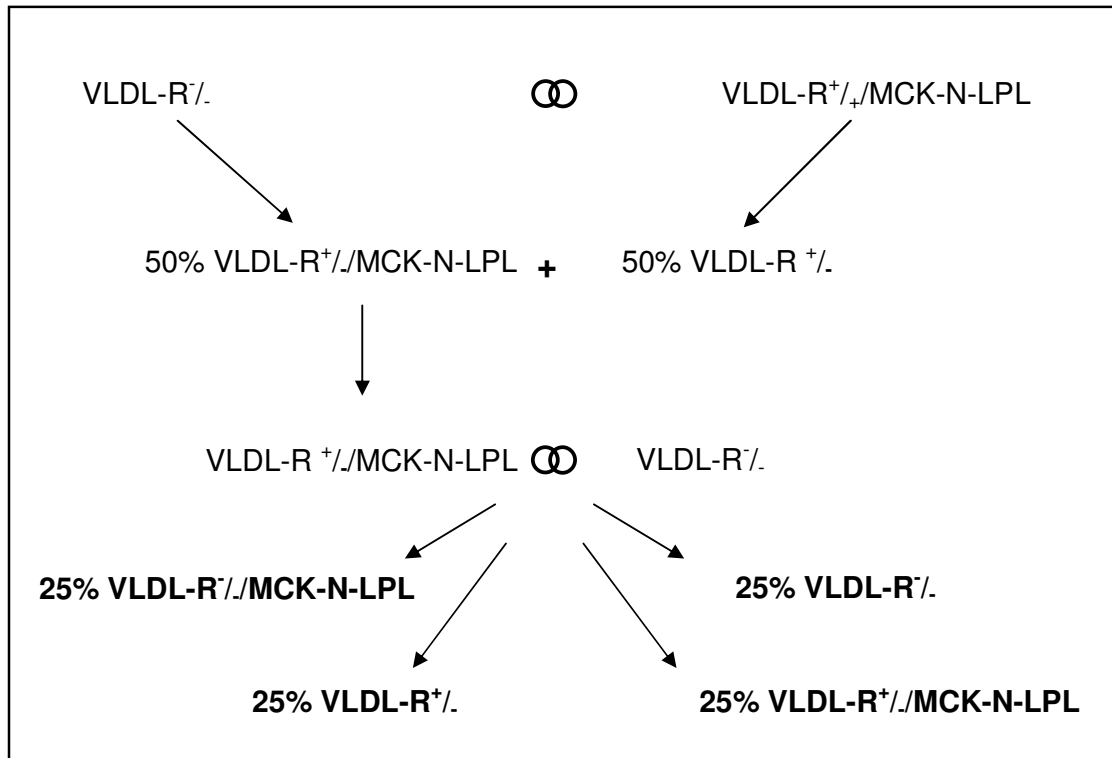


Abb. 1: Kreuzungsschema zum Erhalt der gewünschten Genotypen: Homozygot VLDL-R-defiziente Mäuse VLDL-R^{-/-} wurden in zwei Kreuzungsschritten mit Tieren mit transgener Expression inaktiver LPL (VLDL-R^{+/-}/MCK-N-LPL) gekreuzt. Daraus entstanden Mäuse mit homozygoter VLDL-R-Defizienz ohne und mit inaktiver LPL (VLDL-R^{-/-} und VLDL-R^{-/-}/MCK-N-LPL; erwartete Häufigkeit von jeweils 25%) sowie Mäuse mit heterozygoter VLDL-R-Defizienz ohne und mit inaktiver Lipoproteinlipase (VLDL-R^{+/-} und VLDL-R^{+/-}/MCK-N-LPL; erwartete Häufigkeit von jeweils 25%).

3.2. Material

3.2.1. Geräte und Arbeitsmittel

AMERSHAM-BIOSCIENCE, London, (England):

- FPLC-Anlage

BECKMANN, Fullerton, (USA):

- pH-Meter

- Ultrazentrifuge

- Zentrifugationsröhrchen

BIOMETRA, Göttingen, (Deutschland)

- PCR-Thermoblock T-1

- Personal Cycler

BIORAD, München, (Deutschland):

- Sub-Cell G r Agarose-Gel-Elektrophoresekammer und Zubehör

CARL ROTH, Karlsruhe, (Deutschland):

- Hamiltonspritze

DYNEX TECHNOLOGIES, Frankfurt, (Deutschland):

- Mikrotiterplatten-Lesegerät MRX 2

EDMUND BÜHLER, Hechingen, (Deutschland):

- Schüttler KS15A/B
- Inkubationshaube TH15

EPPENDORF, Hamburg, (Deutschland):

- Diverse Pipetten und Multipetten
- Reaktionsgefäße

GFL (GESELLSCHAFT FÜR LABORTECHNIK MBH), Burgwedel, (Deutschland):

- Wasserdestilliergerät, Dest. 2204
- Wärmebad

HERAEUS INSTRUMENTS GmbH, Hanau, (Deutschland):

- Biofuge fresco

HIRSCHMANN, Eberstadt, (Deutschland):

- Pipetus r akku
- heparinisierte Hämatokritkapillaren

H&P LABORTECHNIK GmbH, Oberschleißheim, (Deutschland):

- Varioklav r Dampfsterilisator

IKA LABORTECHNIK, Staufen, (Deutschland):

- Vortexer VF2
- Wärmeplatte mit Magnetrührer, Ikamag r RH

INVITROGEN, Groningen, (Niederlande):

- Novex Power Ease 500

MERCK, Darmstadt, (Deutschland):

- PCR-Röhrchen

NUNC, Wiesbaden, (Deutschland):

- Mikrotiterplatten
- phenolfeste Glasröhrchen

PACKARD, Frankfurt a. M. , (Deutschland):

- Gammacounter Cobra II

SARTORIUS, Göttingen, (Deutschland):

- Feinwaage U 4100 S

HAS, Stuttgart, (Deutschland):

- Videodokumentationsgerät für Agarosegele

3.2.2. Chemikalien

alle Chemikalien wurden in der höchsten Qualität verwendet.

BRAUN-AESULAP, Tuttlingen, (Deutschland):

- Histoacryl-Gewebekleber

GIBCO BRL, LIFE TECHNOLOGIES, Karlsruhe, (Deutschland):

- Agarose

INVITROGEN, Groningen, (Niederlande):

- Phenol

MALLINCKRODT BAKER B.V., Deventer, (Holland):

- Natriumchlorid

MERCK, Darmstadt, (Deutschland):

- Borsäure
- Bromphenolblau
- Chloroform
- Diethylether
- Ethanol
- Mercaptoethanol
- Methanol
- Natronlauge
- Salzsäure

ROCHE, Mannheim, (Deutschland):

- Chol (Standardlösung für Assays)
- TG (Standardlösung für Assays)
- Testkits zur enzymatischen Bestimmung von TG und Chol

SIGMA, Deisenhofen, (Deutschland):

- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dithioreitol (DTT)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Ethidiumbromid
- Glycerin
- Harnstoff

- Kaliumbromid
- Kaliumhydrogenphosphat
- Magnesiumchlorid
- Natriumhydrogenphosphat
- Sarkosyl
- Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)

EIGENE HERSTELLUNG:

- Aqua dest.

3.2.3. Medikamente

BAYER VITAL, Leverkusen, (Deutschland):

- Ketamin, 50 mg/ml

ATAROST, Twistringen, (Deutschland):

- Rompun 2%

3.2.4. Pufferlösungen

Lysispuffer (2-fache Konzentration):

480 g Harnstoff

33 ml 30% Sarkosyl

200 ml 1M Tris-Cl pH 8,0

80 ml 5 M NaCl

40 ml 0,5M CDTA pH 8,0

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Tris-EDTA-(TE) Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,6

1 mM EDTA pH 8,0

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen

Phosphate Buffered Saline (PBS):

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂PO₄

0,24 g KH₂PO₄

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

TBE-Puffer (10x):

108 g Tris Base

55 g Borsäure

40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

FPLC-Puffer:

1 mM Tris-HCl

10 mM NaCl

1 mM EDTA, pH 8,0

PCR-Puffer für MCK-N-LPL-PCR:

11% DMSO.....5,68 ml DMSO

19 mM NH₄SO₄ 0,945 ml NH₄SO₄

76 mM Tris pH 8,8 3,8 ml Tris

7,6 mM MgCl₂ 380 µl MgCl₂

11 mM DTT570 µl 1 M DTT

193 mg/ml BSA..... 9,65 ml 1 mg/ml BSA

23 mM dNTP 115 µl dNTP

mit sterilem, filtrierten Aqua dest. auf 50 ml auffüllen

Bromphenolblaupuffer:

eine Spatelspitze Bromphenolblau in Aqua dest. auflösen

hiermit verdünnt man 87%-Glycerin auf 80%

3.2.5. Enzyme, Proteine und Oligonukleotide

ROCHE, Mannheim, (Deutschland):

d'ATP, d'CTP, d'GTP, d'TTP

Proteinase K

Taq 1 mit Puffer

GIBCO BRL, Eggenstein, (Deutschland):

Taq DNA Polymerase

Marker für 100 bp

MWG BIOTECH, Ebersberg, (Deutschland):

Primer:

I) IMR 504: 5'-TGG TGA TGA GAG GCT TGT ATG TTG TC-3'

II) IMR 505: 5'-TTG ACC TCA TCG CTG CCG TCC TTG-3'

III) IMR 506: 5'-CGG CGA GGA TCT CGT CGT GAC CCA-3'

IV) IMR 507: 5'-GCG ATA CCG TAA AGC ACG AGG AAG-3'

V) MCK-1: 5'-CAC AGG GGC TGC CCC CGG GTG ACA TCA AG-3'

VI) 1977/2: 5'-CCT GTT ACC GTC CAG CCA TGG ATC ACC-3'

3.3. Methoden

3.3.1. Tiere

3.3.1.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme wird in einer Kurznarkose durchgeführt. Mittels einer heparinisierten Hämatokritkapillare wird der retrobulbäre Venenplexus punktiert und das Blut in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Das Reaktionsgefäß wurde zuvor mit 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) zur Antikoagulation gefüllt. Anschließend wird das Blut für 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert und der Überstand von den korpuskulären Blutbestandteilen getrennt.

Die letzte Blutentnahme während der metabolischen Studien erfolgt intrakardial aus dem rechten Vorhof mittels einer Spritze und Kanüle und anschließender Überführung in ein mit 2 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5) gefülltes Reaktionsgefäß.

3.3.1.2. Narkosen

Für die metabolischen Studien, die Schwanzbiopsien und die Blutentnahmen bekommen die Tiere eine Narkose. Es gibt eine Kurznarkose und eine etwas länger andauernde Narkose. Die Kurznarkose wird in einem verschließbaren Gefäß mit Diethylether-getränkten Zellstoff durchgeführt und erfolgt inhalativ. Die längere Narkose wird mit Ketaxyl durchgeführt, welches eine Mischung aus Ketamin und Rohphynol ist. Dies wird den Tieren intraperitoneal injiziert. Die Narkosetiefe wird anhand der Atemfrequenz- und tiefe sowie den Blinkreflexen gesteuert.

3.3.1.3. Schwanzbiopsien

Die Schwanzbiopsien werden in Narkose durchgeführt. Zuerst werden die Tiere mit Hilfe einer Ohrlochzange zur späteren Identifikation markiert, dann wird ein ca. 5 mm langes

Schwanzstück mit einem Skalpell abgeschnitten. Der Stumpf wurde mit Histoacryl-Kleber gegen weiteres Bluten und Infektionen versorgt. Die Schwanzspitze kommt in ein mit der Identifikationsnummer der Maus beschriftetes Reaktionsgefäß.

3.3.1.4. Injektionen

Die Injektionen der Narkose erfolgt in einer Kurznarkose intraperitoneal mit 160 µl Ketaxyl. Die Injektion für die metabolischen Studien erfolgen in die Schwanzvene des Tieres. Dafür kommen die Tiere in eine spezielle Kammer und der Schwanz wird mit warmen nassen Tüchern bestrichen, damit sich die Venen zur einfacheren Punktion erweitern.

3.3.2. Genotypisierung

3.3.2.1. Schwanzbiopsieverdau

Die Schwanzbiopsien werden in den Reaktionsgefäßen in einer Lösung aus 400 µl Lysispuffer und 50 µl Proteinase K (10 µg/ml) über Nacht verdaut. Dieses geschieht im Brutschrank bei 50°C und unter ständigem Schütteln.

3.3.2.2. DNA-Extraktion

Aus einem Gemisch von Phenol und Chloroform (Verhältnis: 1:1) werden je 400 µl zu den gelösten Schwanzbiopsien pipettiert. Dann werden sie gevortext und für fünf Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die obere Phase wird nun in ein mit zuvor 1 ml Ethanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Beim Schütteln der Reaktionsgefäße fällt die DNA aus und sie kann mittels einer Hämatokritkapillare in ein mit 200 µl TE-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß übertragen werden. Dieses wird zehn Minuten bei 37°C inkubiert bis sich die DNA wieder aufgelöst hat. Die DNA ist bei 4°C im Kühlschrank mehrere Monate haltbar bis sie mittels PCR bestimmt wird.

3.3.2.3. PCR

Es gibt zwei verschiedene PCR. Zum einen die VLDL-Rezeptor-Knock-Out-PCR und zum anderen die MCK-PCR.

3.3.2.3.1. VLDL-R-PCR

Für die Bestimmung des Transgens wurde eine PCR mit vier Primern benutzt:

I) IMR 504: 5'-TGG TGA TGA GAG GCT TGT ATG TTG TC-3'

II) IMR 505: 5'-TTG ACC TCA TCG CTG CCG TCC TTG-3'

III) IMR 506: 5'-CGG CGA GGA TCT CGT CGT GAC CCA-3'

IV) IMR 507: 5'-GCG ATA CCG TAA AGC ACG AGG AAG-3'

Für WT-Mäuse wird eine Bande bei ca. 400 bp, bei heterozygot VLDL-R-defizienten Tieren bei ca. 200 bp und ca. 400 bp und bei homozygot VLDL-R-defizienten Tieren bei ca. 200 bp erwartet. Das Probenvolumen von 23,5 µl setzte sich aus 13,85 µl H₂O, 1,95 µl MgCl₂, 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 2,5 µl dNTP, je 0,6 µl der Primer VLDL I-IV und 0,3 µl Taq Polymerase sowie 4 µl der genomischen DNA aus der Schwanzbiopsie zusammen. Die Proben wurde dann im PCR-Thermoblock für drei Minuten bei 94°C denaturiert und anschließend folgten 37 Zyklen à 85 Sekunden bei 94°C und drei Minuten bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2.3.2. MCK-N-LPL-PCR

Für die Transgenbestimmung wurde eine etablierte 2-Primer-PCR benutzt. Dafür wurde ein Upstream Primer MCK-1 (5'-CAC AGG GGC TGC CCC CGG GTG ACA TCA AG-3') zusammen mit einem Downstream Primer 1977/2 (5'-CCT GTT ACC GTC CAG CCA TGG ATC ACC-3') verwendet, wobei das Transgen mit 477 bp erwartet wurde. Das Reaktionsvolumen von 20 µl setzte sich aus 18,75 µl PCR-Puffer, je 0,5 µl der Primer MCK-1 und 1977/2 (10 pmol/µl), 0,25 µl Taq Polymerase sowie 4 µl der genomischen DNA aus der Schwanzbiopsie zusammen. Die Proben wurde dann im PCR-Thermoblock für 30 Sekunden bei 95°C denaturiert und anschließend folgten 35 Zyklen à 40 Sekunden bei 94°C, eine Minute bei 60°C und drei Minuten bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden bis zur Durchführung der Gelelektrophorese bei 4°C aufbewahrt.

3.3.2.4. Gelelektrophorese

Zur Auswertung der PCR-Ergebnisse wird ein 1,5% Agarosegel benutzt. Zur Herstellung des Agarosegel werden 100 ml 1xTBE-Puffer mit 1,5 g Agarose unter ständigem Rühren aufgekocht. Nach dem Aufkochen werden der Flüssigkeit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und man gießt die Flüssigkeit nach nochmaligem Umrühren in die mit einem oder zwei Kämmen vorbereitete Form. Dann lässt man das Gel erstarren, zieht die Kämmen heraus und kann es in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer einlegen. Dort werden dann die zuvor vermischten 10 µl Probe und 3 µl Bromphenolblaupuffer in die Taschen gefüllt. Vor die Proben kommt ein Marker mit 100 bp sowie nach den Proben eine Positiv- und eine Negativprobe. Der Powersupply wird auf 110 mA, mindestens 160 V und mindestens 15 W

eingestellt. Man lässt die Proben 45 Minuten laufen und fotografiert anschließend das Gel unter einer UV-Lampe.

3.3.3. Lipoproteine

3.3.3.1. Allgemeines

Die Blutentnahmen für die Auftrennung der Lipoproteine und zur Feststellung der Blutfettwerte erfolgen nach einer 8-stündigen Nahrungskarenz von 08:00-16:00 Uhr. Da Mäuse in der Regel nachts aktiv sind und auch während der Dunkelheit fressen hat sich dieses bewährt, weil bei einem Fasten über Nacht die Mäuse am nächsten Morgen fast 24 Stunden nichts gefressen hätten. Die Lipoproteinauftrennung erfolgt durch eine Ultrazentrifugation, bei der das Plasma sequentiell bei einer Dichte von 1,006 g/ml und 1,066 g/ml aufgetrennt wird (Havel, 1955). Von den verschiedenen Lipoproteinfraktionen werden dann die TG- und Chol-Werte bestimmt.

3.3.3.2. Auftrennung der Lipoproteine

Die Auftrennung der Lipoproteine geschieht mittels einer Ultrazentrifugation der Mausseren. Hierfür wird das Blut mit EDTA versetzt und bei 10000 rpm für zehn Minuten abzentrifugiert. Das Serum wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun legt man in die Zentrifugenröhrchen 60 µl PBS vor, welches anschließend mit 60 µl Serum mit Hilfe einer Hamiltonspritze unterschichtet wird. Die Ultrazentrifugation wird für 2,5 Stunden bei 42000 rpm und 4°C durchgeführt. Am Ende der Zentrifugation befinden sich in der oberen Schicht die VLDL und in der unteren die LDL, IDL und HDL. Die unteren 60 µl werden mittels der Hamiltonspritze abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, die obere Phase kommt in ein Reaktionsgefäß zur späteren Verwendung. Zu der unteren Phase wird nun Kaliumbromid mit einer Dichte von 1,12 g/ml hinzu gegeben und anschließend vermischt. Nun wird die Ultrazentrifugation für sechs Stunden bei 42000 rpm und 4°C durchgeführt. Am Ende liegen in der oberen Phase die LDL und IDL vor und in der unteren die HDL, die jeweils getrennt in ein Reaktionsgefäß überführt werden.

Von den erhalten Proben werden anschließend die TG- und Chol-Werte bestimmt.

3.3.3.3. FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Zuerst wurde Mausplasma gepoolt, wovon anschließend 200 µl in die FPLC-Anlage gefüllt wurde. Es wurde eine Superose 6 Säule benutzt sowie der FPLC-Puffer. Die Flussrate wurde

auf 0,5 ml/min eingestellt und Fraktionen zu je 0,5 ml. Anschließend wurden TG- und Chol-Assays von den einzelnen Proben gemacht.

3.3.3.4. Quantitative Bestimmung von Triglyceriden

Die Messung der TG erfolgt mit einem konventionell erhältlichen Testkit (Roche, MPR 2 Triglyceride GPO-PAP 701912) und beruht auf einer enzymatischen Spaltung der TG mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Glycerins mit einer Färbereaktion.

Die TG werden zuerst mit Wasser zusammen durch die Lipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten. Anschließend wird das Glycerin durch die Glycerinkinase in Glycerin-3-phosphat umgewandelt, welches durch die Glycerinphosphatoxidase in Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid weiter reagiert. Das Wasserstoffperoxid wird zusammen mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol durch die Peroxidase zu 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon umgewandelt, welches sich photometrisch bei 500 nm messen lässt.

Die Bestimmung der Proben erfolgt in Mikrotiterplatten, in die zuerst eine Standardreihe von 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg/ml hinein pipettiert wird, die zuvor aus dem Standard (250 mg/ml) verdünnt wurde. Anschließend kamen je 10 µl der Proben sowie 200 µl des TG-Reagenz hinzu und sie wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden sie mit Hilfe des Mikrotiterplattenlesegerätes gemessen und ausgewertet. Die Extinktion wurde anhand der Eichkurve der Standards über einen Proportionalitätsfaktor in die TG-Werte umgerechnet.

Zur genaueren Messung wurde immer ein Doppelansatz durchgeführt und der Mittelwert errechnet.

3.3.3.5. Quantitative Bestimmung von Cholesterol

Auch die Chol-Werte werden mit Hilfe eines konventionellen Testkits der Firma Roche bestimmt. Das Testprinzip ist ein enzymatischer Farbtest, der durch folgende Reaktionen möglich wird. Zuerst werden die CE und Wasser mit Hilfe der Cholesterinesterase zu freiem Chol und Fettsäuren gespalten. Dann wird das Chol von Sauerstoff unter Mitwirkung der Cholesterinoxidase zu Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt, welches durch eine Peroxidase zusammen mit 4-Aminophenazon und Phenol zu 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon reagiert. Dieses ist ein roter Farbstoff der photometrisch gemessen wird.

Zur Durchführung werden 10 µl des Ultrazentrifugats oder 5 µl des Originalserums verwendet und jeweils 200 µl des fertigen Cholesterolreagenz in die Mikrotiterplatten gegeben. Dieses wird dann für fünf Minuten bei 37°C inkubiert und dann gemessen. Zuerst

wird eine Standardreihe von 0, 50, 100, 200 mg/dl bestimmt und dann werden die Werte anhand der entstandenen Eichkurve bestimmt.

Zur genaueren Messung wurde immer ein Doppelansatz durchgeführt und der Mittelwert errechnet.

3.3.4. Metabolische Studien

3.3.4.1. Prinzip

Es wird in dem Tiermodell eine Veränderung des Lipoproteinabbaus im Plasma und eine veränderte organspezifische Aufnahme der Lipoproteine erwartet. Es wurde eine Abbaustudie verwendet mit der man sowohl den Abbau als auch die Organaufnahme beurteilen kann. Die markierten Lipoproteine wurden so gewählt, dass sie nach Aufnahme in die Organe nicht weiter metabolisiert werden können. Die Studie wurde bei homozygot (VLDL^{-/-}) und heterozygot (VLDL^{+/-}) VLDL-R-defizienten Tieren sowie bei homozygoten Tieren (VLDL^{-/-}/MCK-N-LPL) und heterozygoten Tieren (VLDL^{+/-}/MCK-N-LPL) mit zusätzlicher Expression von inaktiver LPL durchgeführt.

3.3.4.2. Markierung der Lipoproteine

Die VLDL wurden in *vitro* mit [¹²⁵I]-Tyramin-Zellobiose markiert. [¹²⁵I]-Tyramin-Zellobiose wird in dem Versuchszeitraum nicht wesentlich metabolisiert und kann die Zelle nach der Aufnahme nicht wieder verlassen. Dieses erlaubt den Vergleich der aufgenommenen Radioaktivität in den Organen miteinander.

Die radioaktiv markierten Lipoproteine wurden uns freundlicherweise von PD Dr. rer. nat. J. Heeren, Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie II des UKE zur Verfügung gestellt.

3.3.4.3. Durchführung

Acht Stunden vor Beginn der metabolischen Studie wurden die Mäuse gefastet. Zu Beginn wurden sechs Mäusen je Genotyp narkotisiert und die Schwänze rasiert. Anschließend werden ihnen 200 µl von der Lösung mit den Lipoproteinen in die Schwanzvene injiziert. Die Blutentnahmen bei den narkotisierten Mäusen erfolgten nach 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten. Das Blut wurde zentrifugiert und je 15 µl in ein Counterröhrchen mit 15 µl PBS-Lösung überführt. Die letzte Blutentnahme erfolgte intrakardial. Nach 60 Minuten wurden die Tiere durch die Gabe von Ketaxyl intraperitoneal in eine tiefe Narkose versetzt. Danach erfolgte aus dem rechten Herzvorhof die letzte Blutentnahme und über den linken Ventrikel wurden das

Gefäßsystem mit 10 ml vorgewärmter Perfusionslösung (PBS mit 1 U Heparin/ml) perfundiert. Herz, 4x Muskelgewebe, 2x Fettgewebe, 4x Leber, Milz, Lungen und die Nieren wurden entnommen, gewogen und in Counterröhrchen überführt.

3.3.4.4. Radioaktivitätsmessung

Die Organe in Counterröhrchen und die Plasmaröhrchen wurden in einen Gammacounter gestellt und dort wurde zweimal für je eine Minute die Gammastrahlung gemessen. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert bestimmt.

3.3.5. Sterilisation

Alle hitzeunempfindlichen Geräte werden in einem Autoklaven in feuchter Hitze bei 121°C und zwei bar für 30 Minuten sterilisiert.

Wasser wurde doppelt destilliert und autoklaviert oder steril filtriert. Andere hitzeempfindlichen Flüssigkeiten wurden mit einem 0,2 µm-Filter sterilisiert.

4. Ergebnisse

4.1. PCR

4.1.1. VLDL-R-KO-PCR

Zur Bestimmung des Genotyps wurde die schon beschriebene vier Primer PCR verwendet. Der Genotyp VLDL-R^{+/+} erbrachte ein Fragment von ungefähr 400 bp, die VLDL-R^{-/-} Mäuse hatten ein PCR-Produkt von etwa 200 bp und die VLDL-R^{+/-} Tiere hatten Fragmente bei etwa 200 bp und 400 bp. In der unten zu sehenden Abbildung sieht man die Fragmente der verschiedenen Genotypen nach der Gelelektrophorese.

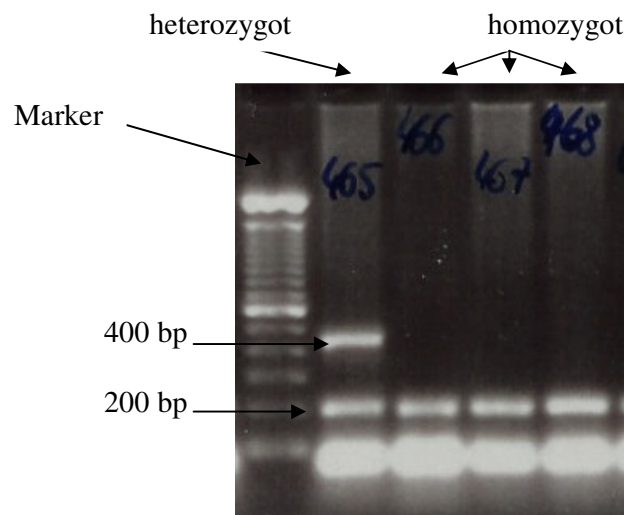


Abb. 2: Gelelektrophorese der PCR zur Bestimmung des VLDL-Genotyps: Bei heterozygoten Tieren erscheinen Banden bei 200 bp und 400 bp und bei homozygoten Tieren erscheint nur eine Bande bei 200 bp.

4.1.2. MCK-N-LPL-PCR

Für die Identifikation des MCK-Transgens wurde wie schon beschrieben eine zwei Primer PCR verwendet. Das PCR Produkt des Transgens wird bei 477 bp erwartet. Die unten stehende Abbildung zeigt die Genotypen nach der Gelelektrophorese.

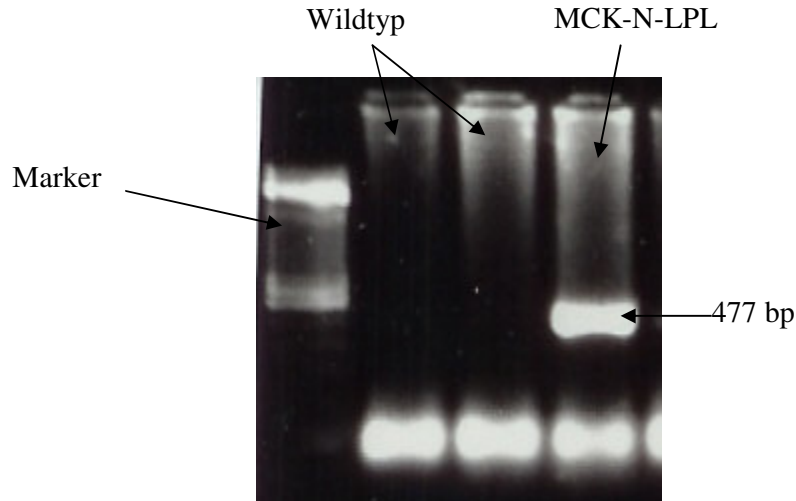


Abb. 3: Gelelektrophorese der PCR zur Bestimmung des MCK-N-LPL-Gen: Als Marker wurden 100 bp DNA-Fragmente verwendet, wobei die 600 bp-Bande dicker als die übrigen ist. Bei Anwesenheit des MCK-N-LPL-Gens erscheint eine Bande bei 477 bp.

4.2. Zuchtergebnisse

Die prozentuale Aufteilung der Genotypen stimmte mit den Erwartungen überein. Es wurden insgesamt mehr weibliche Jungtiere geboren als männliche.

4.3. Lipoproteinprofil

Die Plasmalipoproteinprofile der Tiere wurden bei einer normalen und einer High-fat-Diät untersucht. Das Plasma jeder Maus wurde zunächst individuell auf Chol und TG im Gesamtplasma, VLDL, LDL und HDL untersucht. Verglichen wurde hier die Auswirkung der inaktiven LPL (MCK-N-LPL) auf Chol und TG innerhalb eines genetischen Hintergrundes, nämlich heterozygote VLDL-Defizienz mit und ohne inaktive LPL und homozygote VLDL-Defizienz mit und ohne inaktive LPL.

4.3.1. Plasmalipide im Nüchternzustand

4.3.1.1. Sequenzielle Lipoproteinultrazentrifugation

Die Ergebnisse der sequenziellen Lipoprotein-Zentrifugation sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Es wurden die TG- und Chol-Werte der einzelnen Lipoproteinklassen untersucht.

| | TG | Chol | VLDL-TG | VLDL-Chol | LDL-Chol | HDL-Chol |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Männchen | | | | | | |
| VLDLR^{+/}. (n=8) | 80,3±11,9 | 109±21,9 | 46,1±7,8 | 11±2,1 | 19,9±7,1 | 76,9±14,3 |
| VLDLR^{+/}/MCK-N-LPL (n=11) | 67,9±9,9 | 110±13,2 | 41,2±6,4 | 10,8±2 | 17,8±3,5 | 81±10,3 |
| P | 0,016 | NS | NS | NS | NS | NS |
| VLDLR^{-/-}. (n=17) | 95,7±19,7 | 111,4±15 | 55,5±13,1 | 10,9±2 | 17,2±7,8 | 79,1±13,4 |
| VLDLR^{-/-}/MCK-N-LPL (n=13) | 88,9±19,6 | 99,1±13,1 | 54,4±12,2 | 12,1±2,6 | 14,4±4,6 | 70,3±9,6 |
| P | NS | 0,016 | NS | NS | NS | 0,031 |

Tab. 4: Lipoproteinprofil: Lipoproteinprofil von männlichen heterozygoten und homozygoten Mäusen mit und ohne inaktive LPL. Die Daten wurden als Mittelwerte (in mg/dl)±SD angegeben; P: Student's t-Test; NS: nicht signifikant

Es zeigte sich, dass bei den heterozygoten Tieren mit Expression inaktiver LPL die TG (VLDLR^{+/}.: 80± 11,9 mg/dl, VLDLR^{+/}/MCK-N-LPL: 67,9± 9,9 mg/dl; P= 0.016) um 18% niedriger waren als bei den Tieren ohne Expression inaktiver LPL im Muskel.

Bei den homozygot defizienten Tieren zeigte sich das das Gesamt-Chol um 12% (VLDLR^{-/-}.: 111± 15 mg/dl, VLDLR^{-/-}/MCK-N-LPL: 99± 13,1 mg/dl; P= 0.016) sank, sowie das HDL-Chol um 13% (VLDLR^{-/-}.: 79,1± 13,4 mg/dl, VLDLR^{-/-}/MCK-N-LPL: 70,3± 9,6 mg/dl; P= 0.031).

Bei den restlichen Werten gab es keine signifikanten Unterschiede.

4.3.1.2. Fast Liquid Protein Chromatographie (FPLC)

Um die verschiedenen Lipoproteinprofile der VLDL-R defizienten Mäuse zu bestimmen wurde jeweils gepooltes Plasma mittels FPLC getrennt. Wie bereits durch sequenzielle Ultrazentrifugation festgestellt, fand sich auch mit dieser Methode kein wesentlicher Einfluss des Transgens auf den verschiedenen VLDL-R Hintergründen. Bei allen Genotypen zeigte sich das typische murine Lipoproteinprofil mit kaum detektierbaren LDL und hohen HDL.

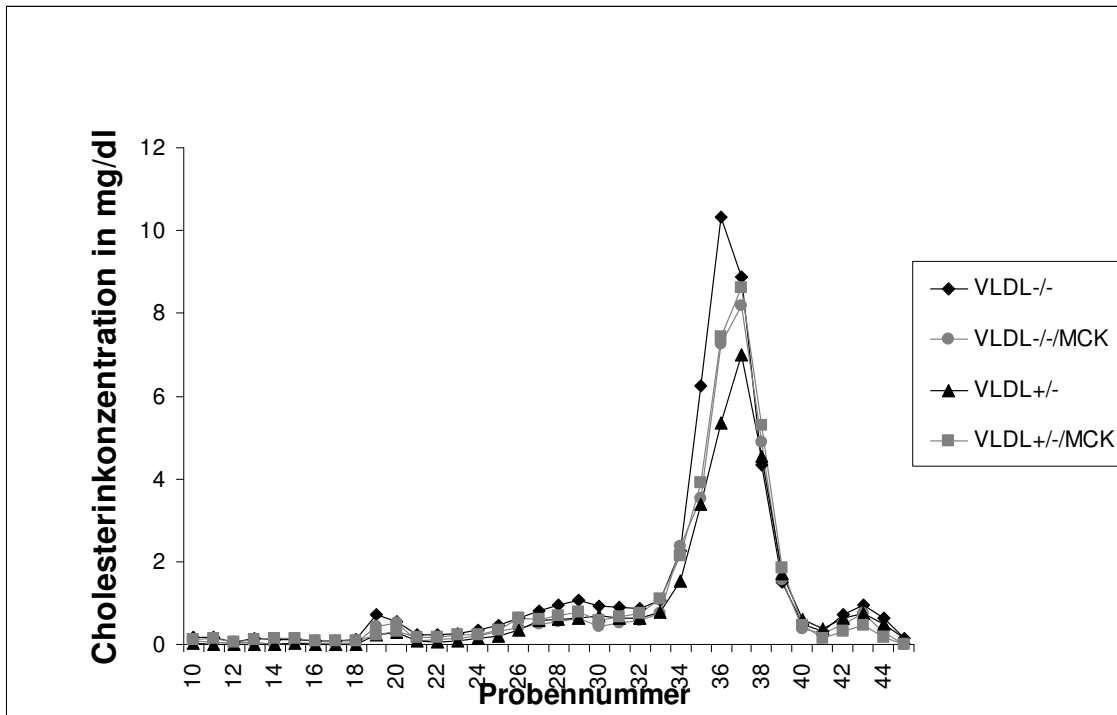


Abb. 4: FPLC-Profil: Profil von homozygoten und heterozygoten VLDL-R-defizienten Tieren mit und ohne Expression inaktiver LPL

4.3.2. Plasmalipide nach High-fat-Diät

4.3.2.1. Sequenzielle Lipoproteinultrazentrifugation

Die Ergebnisse der sequenziellen Lipoprotein-Zentrifugation sind der folgenden Tabelle zu entnehmen. Es wurden die TG- und Chol-Werte der einzelnen Lipoproteinklassen untersucht.

| Genotyp | TG | Chol | VLDL-TG | VLDL-Chol | LDL-Chol | HDL-Chol |
|--|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Männchen | | | | | | |
| VLDLR ^{+/+} (n=8) | 89,9±12,3 | 203±26,4 | 41,6±9,8 | 22,8±4 | 53,1±14,5 | 123±18,2 |
| VLDLR ^{+/+} /MCK-N-LPL (n=10) | 75,5±9,7 | 184±42,7 | 25,4±13,6 | 21,9±5,2 | 49,4±21,7 | 107±27,5 |
| P | 0,018 | NS | 0,017 | NS | NS | NS |
| VLDLR ^{-/-} (n=17) | 100±14 | 213±36,2 | 45,4±9,5 | 27,9±6,7 | 53,8±15,9 | 113±15,6 |
| VLDLR ^{-/-} /MCK-N-LPL (n=13) | 87±13,8 | 191±30,9 | 39,2±14,8 | 26,3±8,5 | 45,7±15,5 | 111±22,8 |
| P | 0,011 | NS | NS | NS | NS | NS |

Tab. 5: Lipoproteinprofil: Profil von männlichen heterozygoten und homozygoten Mäusen mit und ohne inaktive LPL nach High-fat-Diät. Die Daten wurden als Mittelwerte (in mg/dl) ±SD angegeben; P: Student's t-Test; NS: nicht signifikant

Bei den TG zeigte sich sowohl bei den homozygoten als auch bei den heterozygoten Tieren mit Expression inaktiver LPL eine Senkung der Werte. Bei den homozygoten Tieren lag sie bei 15% (VLDLR^{-/-}: 100± 14 mg/dl, VLDLR^{-/-}/MCK-N-LPL: 87± 13,8 mg/dl; P= 0.011) und bei den heterozygoten waren es 19% (VLDLR^{+/-}: 89,9± 12,3 mg/dl, VLDLR^{+/-}/MCK-N-LPL: 75,5± 9,7 mg/dl ; P= 0.018).

Ferner zeigte sich bei den heterozygoten Tieren eine signifikante Senkung der VLDL-TG bei den Mäusen mit Expression inaktiver LPL um 36% (VLDLR^{+/-}: 41,6± 9,8 mg/dl, VLDLR^{+/-}/MCK-N-LPL: 25,4± 13,6 mg/dl; P= 0.017).

Bei den restlichen Ergebnissen gab es keine signifikanten Unterschiede.

4.4. Metabolische Studien

4.4.1. VLDL-Turnover

4.4.1.1. Turnover mit weiblichen Tieren

In den Muskeln zeigte sich bei den heterozygot VLDL-R-defizienten Tieren mit inaktiver LPL (VLDL^{+/-}/MCK-N-LPL) im Vergleich zu den heterozygot VLDL-R-defizienten Mäusen ohne inaktive LPL (VLDL^{+/-}) eine signifikant erhöhte Chylomikronenaufnahme von 103% (VLDL^{+/-}/MCK-N-LPL: 6728 cpm/g, VLDL^{+/-}: 3318 cpm/g; P=0,036).

Herz, Fettgewebe, Milz, Niere und Lunge wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Chylomikronenaufnahme auf.

Bei den Ergebnissen des Plasmaabbaus der Chylomikronen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Bei den homozygot VLDL-R- defizienten Tieren mit Expression inaktiver LPL (VLDL^{-/-}/MCK-N-LPL) gab es im Vergleich mit den VLDL-R-defizienten Tieren ohne Expression zusätzlicher inaktiver LPL (VLDL^{-/-}) keine signifikanten Unterschiede in der Chylomikronenaufnahme. Insbesondere die Aufnahme in den Muskel war identisch (VLDL^{-/-}/MCK-N-LPL: 5419 cpm/g, VLDL^{-/-}: 4420 cpm/g; P=0,255).

Bei den Ergebnissen des Plasmaabbaus der Chylomikronen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

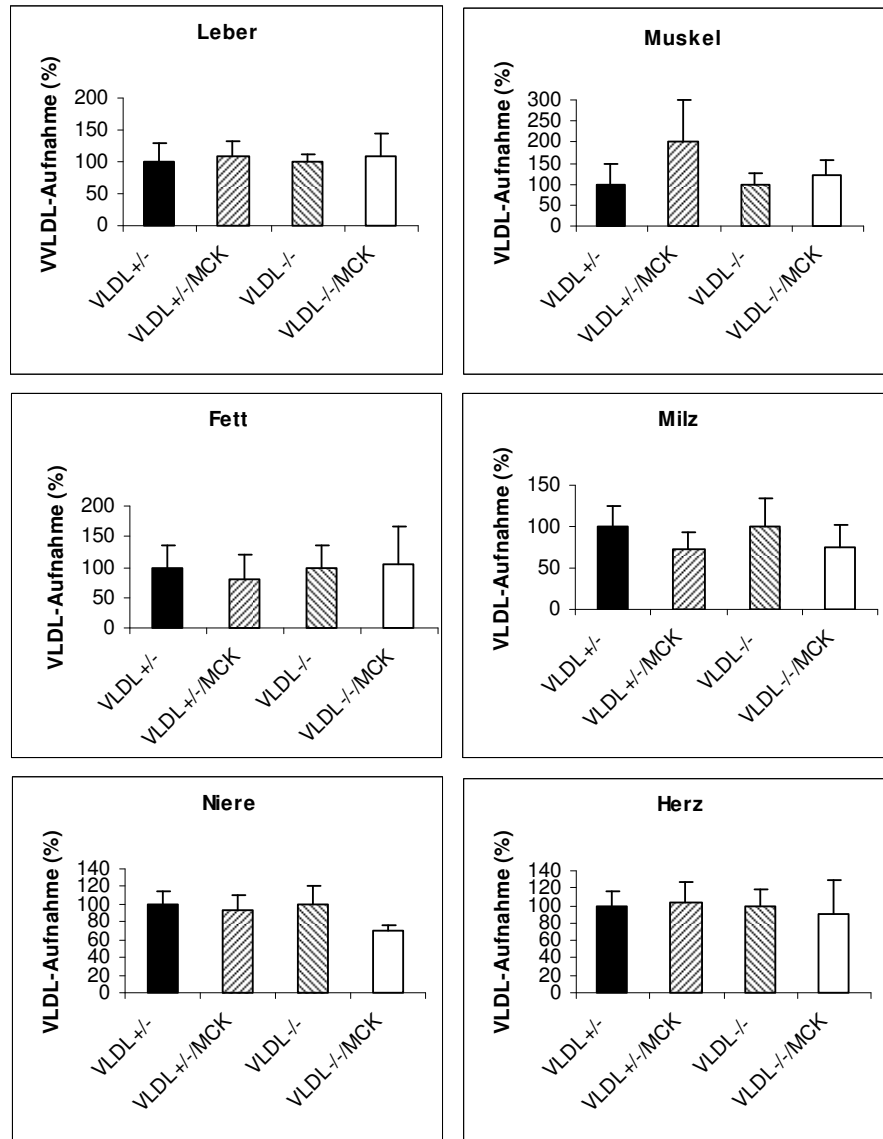


Abb. 5: Metabolische Studien, Organaufnahme von VLDL: Es wurde je 5-6 weiblichen Tieren je Genotyp die radioaktiv markierten VLDL injiziert und nach einer Stunde die Organaufnahme bestimmt. Die Werte der VLDL^{+/+} und VLDL^{-/-} wurde auf 100 % festgesetzt (Mittelwert^{+/}/. SD).

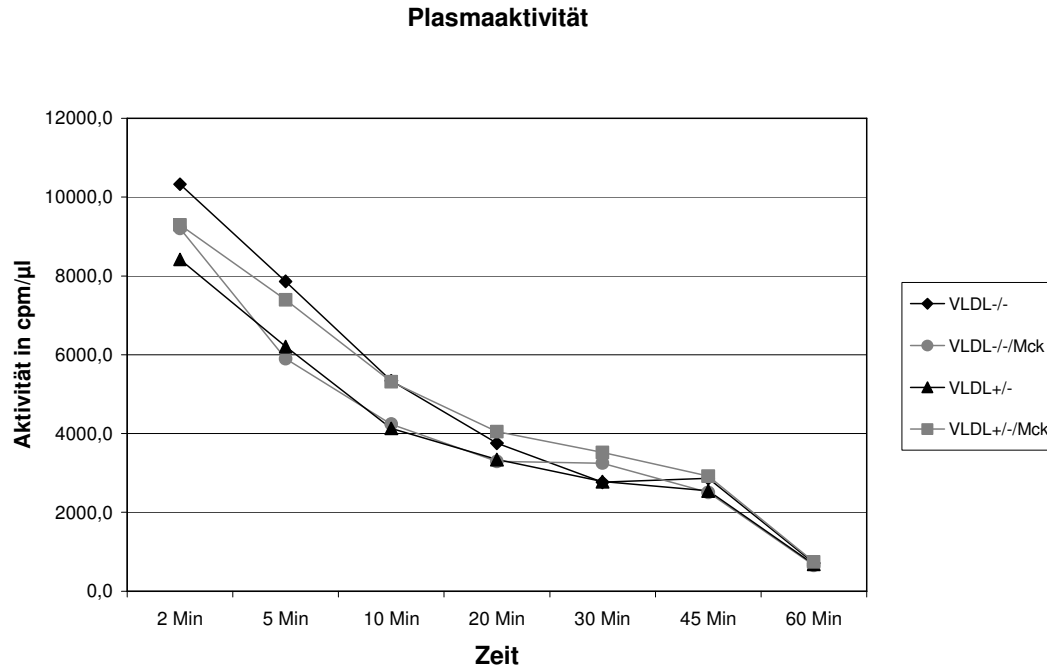


Abb. 6: Plasmaaktivität von ^{125}J in $\text{cpm}/\mu\text{l}$ in Abhängigkeit zur Zeit mit Tieren aller vier Genotypen weiblichen Geschlechts

4.4.1.2. Turnover mit männlichen Tieren

Bei den männlichen heterozygot VLDL-R-defizienten Mäusen mit Expression inaktiver LPL (VLDL-R⁺/MCK-N-LPL) zeigten sich im Vergleich zu den heterozygot VLDL-R-defizienten Tieren ohne Expression inaktiver LPL (VLDL^{+/}) bei der Niere eine Steigerung der Chylomikronenaufnahme von 133% (VLDL^{+/}/MCK-N-LPL: 39100 cpm/g , VLDL^{+/}: 29300 cpm/g ; $P=0,126$) und beim Muskel von 131% (VLDL^{+/}/MCK-N-LPL: 2100 cpm/g , VLDL^{+/}: 1600 cpm/g ; $P=0,381$). Allerdings waren diese wie auch die anderen Ergebnisse nicht signifikant.

Bei den Ergebnissen des Plasmaabbaus der Chylomikronen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Bei den männlichen homozygot VLDL-R-defizienten Mäusen mit Expression inaktiver LPL (VLDL-R⁻/MCK-N-LPL) gab es im Vergleich zu den homozygot VLDL-R-defizienten Tieren ohne Expression inaktiver LPL (VLDL⁻) keine signifikanten Unterschiede.

Auch bei den Ergebnissen des Plasmaabbaus der Chylomikronen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

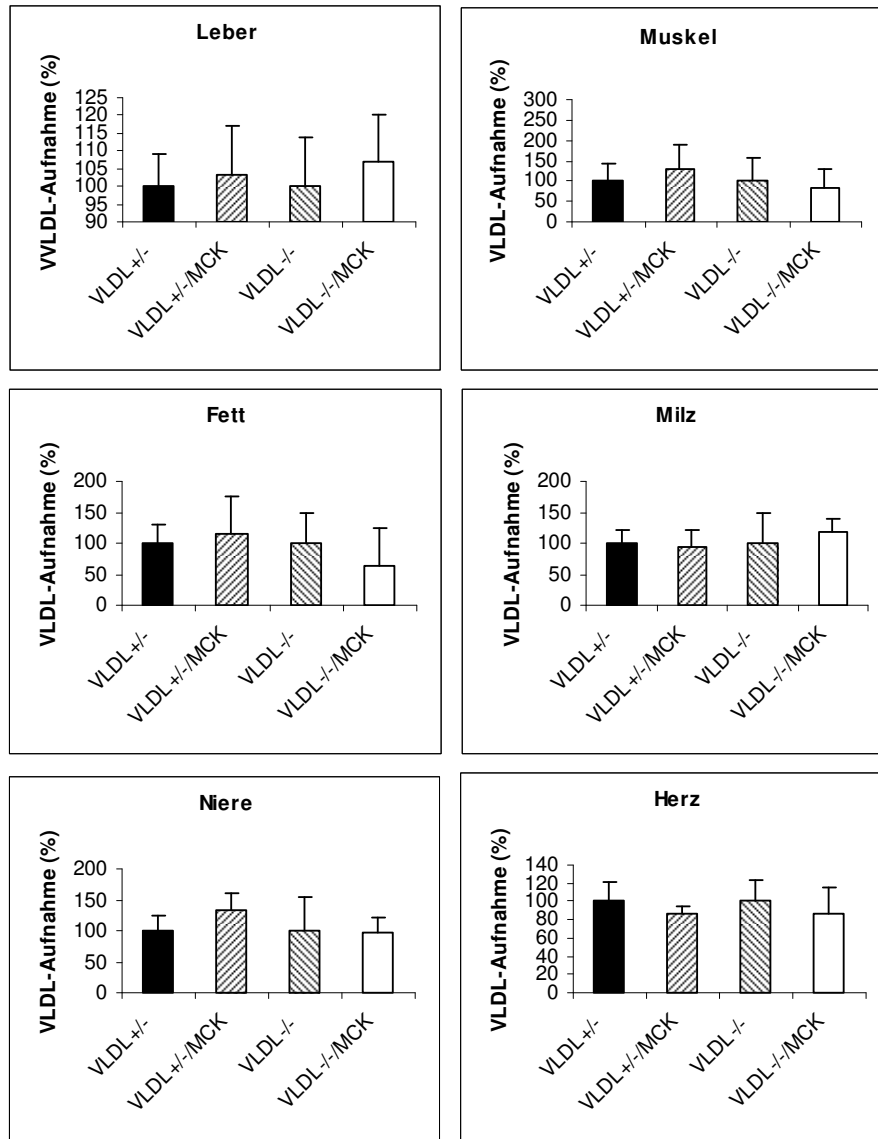


Abb. 7: Metabolische Studien, Organaufnahme von VLDL: Es wurde je 5-6 männlichen Tieren je Genotyp die radioaktiv markierten VLDL injiziert und nach einer Stunde die Organaufnahme bestimmt. Die Werte der VLDL^{+/+} und VLDL^{-/-} wurde auf 100 % festgesetzt (Mittelwert \pm SD).

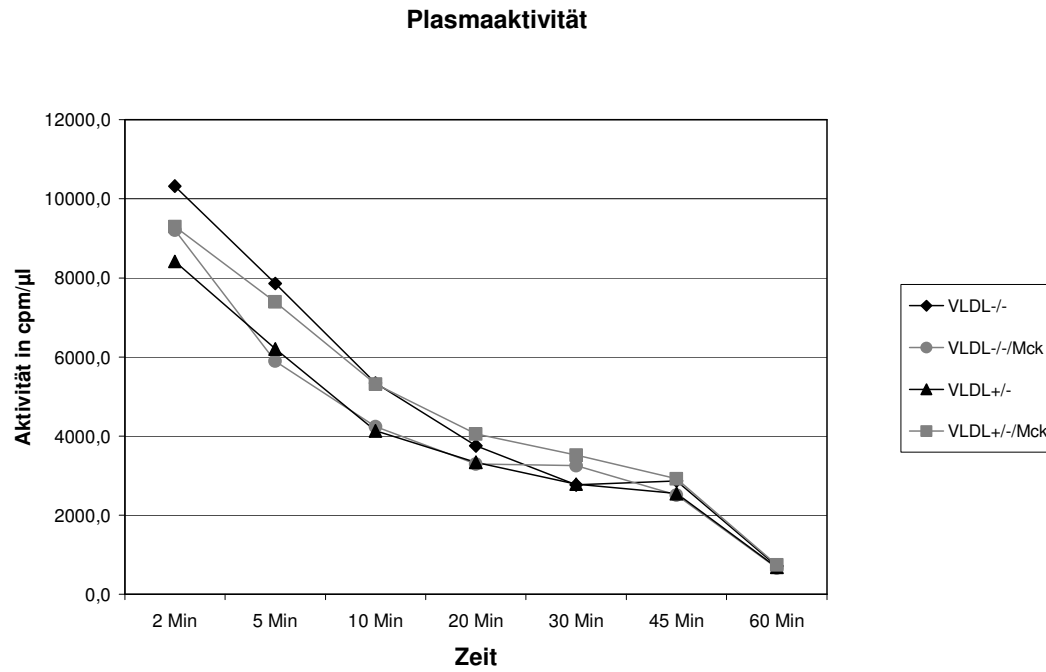


Abb. 8: Plasmaaktivität von ^{125}J in cpm/ μl) in Abhängigkeit zur Zeit mit Tieren aller vier Genotypen männlichen Geschlechts

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des VLDL-R bei der LPL-vermittelten Lipoproteinaufnahme in den Muskel zu untersuchen. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass katalytisch inaktive LPL (MCK-N-LPL) sowohl die Aufnahme von ganzen Lipoproteinpartikeln als auch selektiv die Aufnahme von CE aus Chylomikronen und VLDL in den Muskel von Mäusen verstärkt (Merkel et al., 1998) und damit VLDL-Triglyceride im Plasma senkt. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Aufnahme abhängig ist von der Anwesenheit aktiver LPL (Merkel et al., 2002). Außerdem wurde durch Merkel et al. gezeigt, dass die LPL-vermittelte Aufnahme von LDL abhängig ist von der Präsenz des LDL-R, die Aufnahme von Chylomikronen und VLDL aber unabhängig von diesem Weg ist (Merkel et al., 2003). Ob hierbei der VLDL-R beteiligt ist galt es zu untersuchen.

Der VLDL-R ist aufgrund seiner Organverteilung ein wahrscheinlicher Kandidat, über den die LPL-vermittelte Lipoproteinaufnahme v.a. apo E-haltiger Lipoproteine verlaufen könnte. Es wurde eine hohe Affinität dieses Rezeptors zu LPL nachgewiesen (Argraves et al., 1995) und eine Bindung kann, wie auch bei anderen Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie (LRP, gp 330), durch RAP antagonisiert werden (Krieger et al., 1994; Niemeier et al., 1996). Verschiedene *in vitro* (Obunike et al., 2001) und *in vivo* (Yagy et al., 2002; van Vlijmen et al., 1999) Daten weisen daraufhin, dass der VLDL-R am Transport der LPL an das Endothel beteiligt ist. VLDL-defiziente Mäuse haben etwa 60 % der Postheparin-LPL-Aktivität und – Masse (Yagy et al. 2002).

Für diese Untersuchungen wurde eine früher etablierte transgene Mauslinie mit Expression inaktiver LPL im Muskel (MCK-N-LPL) mit einer VLDL-R-defizienten Mauslinie (Herz et al., 1988) gekreuzt. Durch die Zucht wurden alle vier erwarteten Genotypen (VLDL-R heterozygot mit und ohne Expression inaktiver LPL sowie VLDL-R homozygot mit und ohne Expression inaktiver LPL) erhalten. Dieses zeigt, dass die Kombination dieser genetischen Defekte möglich ist und nicht zu einem intrauterinen oder postnatale Tod führt.

Das Lipoproteinprofil wurde durch Ultrazentrifugation und einer FPLC untersucht. Bei der Ultrazentrifugation wurden zwischen den homozygot und heterozygot VLDL-R-defizienten Tieren mit und ohne Expression zusätzlicher MCK-N-LPL im Muskel keine durchgehenden signifikanten Unterschiede festgestellt. Die vorkommenden Signifikanzen bei einzelnen Ergebnissen dürften zufälliger Natur sein. Diese Annahme wurde auch durch eine andere Methode, nämlich der Untersuchung der Lipide mittels FPLC, bestätigt, die ebenfalls kein signifikantes Ergebnis zwischen den Genotypen zeigte.

Weiter gefestigt wurde diese Erkenntnis in metabolischen Studien, bei denen den Tieren radioaktiv markierte VLDL injiziert wurden und die Organaufnahme sowie der Abbau der Plasmaaktivitäten untersucht wurden. Sowohl bei der Organaufnahme, noch bei dem Abbau der Plasmaaktivitäten konnten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen festgestellt werden.

Diese vorliegenden *in vivo* Daten zeigen, dass die LPL-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen, die apo B-48 enthalten, nicht durch den VLDL-Rezeptor vermittelt wird. Andere Möglichkeiten der Organaufnahme wären der LDL-R und das LRP; diese Kandidaten werden derzeit getestet. Alternativ könnten die VLDL im Rahmen des normalen Proteoglycan-Turnovers zellulär aufgenommen werden (Obunike, 1994).

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der LPL-vermittelten Lipoproteinaufnahme *in vivo* untersucht. Hierbei wurde bei Mauslinien mit transgener Expression von inaktiver LPL im Muskel bei gleichzeitiger homo- oder heterozygoter Defizienz des VLDL-R gezeigt, dass dieser Rezeptor nicht an der LPL-vermittelten Aufnahme von Lipoproteinen beteiligt ist. Neben dem grundwissenschaftlichen Aspekt des besseren Verständnisses des Lipoproteinstoffwechsels könnten diese Daten helfen, die Rolle von Dyslipoproteinämien beim Menschen mit heterozygoter LPL-Defizienz sowie anderen genetischen Mutationen weiter aufzuklären. Durch dieses Wissen kann man neue Erkenntnisse für die Früherkennung, Prophylaxe und Therapie von Dyslipoproteinämien und Atherosklerose gewinnen.

6. Zusammenfassung

Die Lipoproteinlipase kann neben ihrer katalytischen Funktion auch die Aufnahme von Chylomikronen, VLDL und Lipoproteinpartikeln sowie die selektive Aufnahme von CE bewirken. Dieses wurde in einem Mausmodell mit transgener Muskel-Expression von mutierter, inaktiver LPL (MCK-N-LPL) *in vivo* gezeigt.

In dieser Arbeit wollte man die Rolle des VLDL-R bei der LPL-vermittelten Lipoproteinaufnahme *in vivo* untersuchen. Hierfür kreuzte man transgene Mäuse mit der Expression von mutierter inaktiver LPL im Muskel (MCK-N-LPL) und VLDL-R-defizienten Tieren und untersuchte die Funktion der inaktiven LPL auf dem homozygoten (VLDL^{-/-}) und heterozygoten (VLDL^{+/-}) VLDL-R-defizienten Hintergrund.

Bei der Untersuchung des Lipidstoffwechsels mittels Auftrennung der Lipoproteine durch Ultrazentrifugation, quantitativer Bestimmung von TG und Chol sowie einer FPLC zeigten sich sowohl auf dem homozygoten als auch auf dem heterozygoten VLDL-R-defizienten Hintergrund keine durchgehenden signifikanten Unterschiede.

Auch die metabolischen Studien mit radioaktiv markierten Chylomikronen zeigten sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen Tieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die vorliegenden *in vivo* Daten zeigen, dass die LPL-vermittelte Aufnahme von Lipoproteinen, die apo B-48 enthalten nicht durch den VLDL-Rezeptor vermittelt wird.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

| | |
|--|-------|
| Abbildung 1: Kreuzungsschema zum Erhalt der gewünschten Genotypen | S. 16 |
| Abbildung 2: Gelelektrophorese der PCR zur Bestimmung des VLDL-Genotyps | S. 28 |
| Abbildung 3: Gelelektrophorese der PCR zur Bestimmung des MCK-N-LPL-Gen | S. 29 |
| Abbildung 4: FPLC-Profil | S. 31 |
| Abbildung 5: metabolische Studie, Organaufnahme mit VLDL (weibliche Tiere) | S.32 |
| Abbildung 6: Plasmaaktivität (weibliche Tiere) | S. 33 |
| Abbildung 7: metabolische Studie, Organaufnahme mit VLDL (männliche Tiere) | S. 34 |
| Abbildung 8: Plasmaaktivität (männliche Tiere) | S. 35 |
| | |
| Tabelle 1: Klassifizierung der Apoproteine des menschlichen Serums mit Vorkommen, Molekulargewicht und Funktion | S. 5 |
| Tabelle 2: Lipoproteinklassen | S. 6 |
| Tabelle 3: Phänotypen der Hyperlipoproteinämien nach Fredrickson | S. 12 |
| Tabelle 4: Lipoproteinprofil bei normaler Nagerdiät | S. 30 |
| Tabelle 5: Lipoproteinprofil nach High fat Diät | S. 31 |

8. Literaturverzeichnis

- Anderson, RG, JL Goldstein und MS Brown (1976) Lokalisation of low density lipoprotein receptor on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from familial hypercholesterinemia homozygote. Proc Natl Acad Sci U S A 73:2434-2438.
- Argaves, KM, FD Battey, CD MacCalman, KR McCrae, M Gafvels, KF Kozarsky, DA Chappell, JFr Strauss und DK Strickland (1995) The very low density lipoprotein receptor mediates the cellular catabolism of lipoprotein lipase and urokinase-plasminogen activator inhibitor type i complexes. J Biol Chem. 270:26550-26557.
- Ashcom, JD, SE Tiller, K Dickerson, JL Cravens, WS Argaves und DK Strickland (1990). The human α_2 -macroglobulinreceptor: identification of a 420 kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of α_2 -macroglobulin. J. Cell Biol. 110:1041-1048.
- Assmann, G, P Cullen und H Schulte (2002) Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular munster (procam) study. Circulation. 105:310-315.
- Battey, FD, ME Gafvels, DJ FitzGerald, WS Argaves, DA Chappell, JF Strauss et al. (1994) The 39 kDa receptor-associated protein regulates ligand binding by the very low density lipoprotein receptor. J Biol Chem. 269:23268-23273.
- Beisiegel, U, W Weber, G Ihrke, J Herz und KK Stanley (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. Nature. 341:162-4.
- Beisiegel, U, W Weber und G Bengtsson-Olivecrona (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrones to low density lipoprotein receptor-related protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 88:8342-8346.
- Beisiegel, U (1995) Receptors for triglycerid-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol. 6:117-122.
- Benlian, P, JL De Gennes, L Foubert, H Zhang, SE Gagne und M Hayden (1996) Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. N Engl J Med. 335:848-854.
- Brown, MS und JL Goldstein (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232:34-47.
- Bruckenberger, E (2000) Herzbericht 1999. Krankenhausausschuss der Arbeitsgemeinschaft der obersten Landesgesundheitsbehörde der Länder, Hannover.

- Brunzell, JD (1995) Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In the metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol. II. CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly und D Valle, editors. McGraw-Hill, New York. 1913-1932.
- Bujo, H, T Yamamoto, K Hayashi, M Hermann, J Nimpf und WJ Schneider (1995) Mutant oocytic low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:9905-9.
- Chappell, DA, GL Fry, MA Waknitz, PH Iverius, SE Williams and DK Strickland (1992) The low density lipoprotein receptor-related protein/ alpha₂-macroglobulin receptor binds and mediates catabolism of bovine milk lipoprotein lipase. J Biol Chem. 267:25764-7.
- Chappell, DA, I Inoue, GL Fry, MW Pladet, PH Iverius, JM Lalouel and DK Strickland (1994) The carboxy-terminal domain of lipoprotein lipase induces cellular catabolism of normal very low density lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/ alpha₂-macroglobulin receptor. Ann N Y Acad Sci. 737:434-8.
- Coleman, T, RL Seip, JM Gimble, D Lee, N Maeda und CF Semenkovich (1995) COOH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. J Biol Chem. 270:12518-12525.
- Davis, CG, JL Goldstein, TC Südhoff, AGW Anderson, DW Russel und MS Brown (1987) Acid dependent ligand association by growth factor homology region. Nature 326:760-765.
- Davis RC, H Wong, J Nikazy, K Wang, Q Han, MC Schotz (1992) Chimeras of Hepatic Lipase and Lipoprotein Lipase. Domain localization of enzyme-specific properties. J Biol Chem. 267: 21499-21504.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE) (2000) Ernährungsbericht 2000. Henrich GmbH, Frankfurt a. M.
- Dörner, Klinische Chemie und Hämatologie, 4.Auflage, 2001.
- Dugi, KA, HL Dichek, GD Talley, HB Brewer, Jr. und S Santamarina-Fojo (1992) Human lipoprotein lipase: The loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. J Biol Chem. 267:25086-25091.
- Fan, J, H Unoki, N Kojima, H Sun, H Shimoyamada, H Deng, M Okazaki, H Shikama, N Yamada und T Watanabe (2001) Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. J Biol Chem. 26:26.

- Fredrickson, DS, JL Goldstein und MS Brown (1978) The familial hyperlipoproteinemias. In the metabolic basis of inherited disease. Vol. 4. JB Stanbury, JB Wyngaarden und DS Fredrickson, editors. McGraw-Hill, New York. 604-655.
- Frykman, PK, MS Brown, T Yamamoto, JL Goldstein, J Herz (1995) Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:8453-8457.
- Furukawa, T, M Ozawa, RP Huang und T Muramatsu (1990): A heparin binding protein whose expression increases during differentiation of embryonal carcinoma cells to parietal endoderm cells: cDNA cloning and sequence analysis. J Biochem. (Tokyo) 108:297-302.
- Garfinkel, AS und MC Schotz (1987) Lipoprotein lipase. Elsevier, New York:335-357.
- Glomset, JL (1968) The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction. J Lipid Res. 9: 155-167.
- Goldberg, IJ (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J Lipid Res. 37:693-707.
- Goldberg, IJ und M Merkel (2001) Lipoprotein lipase: Physiology, biochemistry, and molecular biology. Front Biosci. 6:D388-D405.
- Gray, A, TJ Dull und A Ullrich (1983) Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. Nature 303:722-725.
- Greenwood, MRC (1984) Enzymatic alterations in the obese: Long and short term regulatory errors ? Int J Obes. 8:561-569.
- Greenwood, MRC (1985) The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: Lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. Int J Obes. 9:67-70.
- Grundy, SM, GJ Balady, MH Criqui, G Fletcher, P Greenland, LF Hiratzka, N Houston-Miller, P Kris-Etherton, HM Krumholz, J LaRosa, IS Ockene, TA Pearson, J Reed, R Washington und SC Smith, Jr. (1998) Primary prevention of coronary heart disease: Guidance from framingham: A statement for healthcare professionals from the AHA task force on risk reduction. American heart association. Circulation. 97:1876-1887.
- Havel, RH, HA Eder und JH Bragdon (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest. 34:1345-1353.
- Heeren, J, T Grewal, S Jackle und U Beisiegel (2001) Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in *vivo*. J Biol Chem. 276:42333-42338.

- Heeren, J, T Grewal, A Laatsch, D Rotke, F Rinniger, C Enrich, U Beisiegel (2003) Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem.* 278:14370-14378.
- Herz, J, U Hamann, S Rogne, O Myklebost, H Gausepohl und KK Stanley (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J.* 7:4119-4127.
- Herz, J, JL Goldstein, DK Strickland, YK HO und MS Brown (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/ alpha₂-macroglobulin receptor. *J Biol Chem.* 266:21232-21238.
- Hide, WA, L Chan und WH Li (1992) Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res.* 33:167-78. Review.
- Innerarity, TL, RW Mahley (1978) Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry.* 17:1440-7.
- Jensen, PH, SK Moestrup L Sottrup-Jensen, CM Petersen und J Gliemann (1988) Receptors for alpha₂-macroglobulin- and pregnancy zone protein-proteinase complexes in the human placental syncytiotrophoblast. *Placenta.* 9:463-477.
- Jensen, PH, SK Moestrup und J Gliemann (1989) Purification of the human placental alpha₂-macroglobulin receptor. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 255:275-280.
- Johnson, JE, BJ Wold und SD Hauschka (1989) Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 9:3393-3399.
- Kircheggner, TG, JC Chuat, C Heinzmann, J Etienne, S Guilhot, K Svenson, D Ameis, C Pilon, L d'Auriol, A Andalibi, MC Schotz, F Galibert und AJ Lusic (1989) Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:9647-9651.
- Kowal, RC, J Herz, V Esser und MS Brown (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.
- Krapp, A, H Zhang, D Ginzinger, MS Liu, A Lindberg G Olivecrona, MR Hayden und U Beisiegel (1995) Structural features in lipoprotein lipase necessary for the mediation of lipoprotein uptake into cells. *J Lipid Res.* 36:2362-2373.

- Krapp, A, S Ahle, S Kerstings, Y Hua, K Kneser, M Nielsen, J Gliemann und U Beisiegel (1996) Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J Lipid Res.* 37:926-36.
- Kristensen, T, SK Moestrup, J Gliemann, L Bendtsen, O Sand und LSottrup-Jensen (1990) Evidence that the newly cloned low density lipoprotein receptor related protein (LRP) is the α_2 -macroglobulin receptor. *Febs Lett.* 276:151-155.
- Levak-Frank, S, PH Weinstock, T Hayek, W Hofmann, R Verdery, JL Breslow und R Zechner (1997) Induced mutant mice expressing lipoprotein lipase exclusively in muscle have subnormal triglycerides yet reduced HDL-cholesterol levels in plasma. *J Biol Chem.* 272:17182-17190.
- Levak-Frank, S, W Hofmann, PH Weinstock, H Radner, W Sattler, JL Breslow und R Zechner (1999) Induced mutant mouse lines that express lipoprotein lipase in cardiac muscle, but not in skeletal muscle and adipose tissue, have normal plasma triglyceride and high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3165-3170.
- Lundgren, S, T Carling, G Hjaelm, C Juhlin, J Rastad, U Philgren, L Rask, , G Akerstroem und P Hellmann (1997) Tissue distribution of human gp330/megalin, a putative (Ca²⁺)-sensing protein. *J Histochem Cytochem.* 45:383-392.
- Ma, YH, T Bruin, S Tuzgol, BI Wilson, G Roederer, MS Liu, J Davignon, JJ Kastelein, JD Brunzell und MR Hayden (1992) Two naturally occurring mutations at the first and second bases of codon aspartic acid 156 in the proposed catalytic triad of human lipoprotein lipase. *In vivo* evidence that aspartic acid 156 is essential for catalysis. *J Biol Chem.* 267:1918- 1923.
- Medh, JD, GL Fry, SL Bowsen, MW Pladet, DK Strickland und DA Chappell. (1995) The 39 kDa receptor-associated protein modulates lipoprotein catabolism by binding to LDL-receptors. *J Biol Chem.* 270:536-540.
- Medh, JD, SL Bowsen, GL Fry, S Ruben, M Andracki, I Inoue, JM Lalouel, DK Strickland und DA Chappell (1996) Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins *in vitro*. *J Biol Chem.* 271:17073-17080.
- Merkel, M, Y Kako, H Radner, IS Cho, R Ramasamy, JD Brunzell, IJ Goldberg und JL Breslow (1998) Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases VLDL uptake. Direct evidence that LPL bridging occurs *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:13841-13846.

- Merkel, M, PH Weinstock, T Chajek-Shaul, H Radner, B Yin, JL Breslow und IJ Goldberg (1998) Lipoprotein lipase expression exclusively in liver: A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J Clin Invest.* 102:893-901.
- Merkel, M, RH Eckel und IJ Goldberg (2002) Lipoprotein lipase: Genetics, lipid uptake and regulation. *J Lipid Res.* 43:1997-2006.
- Merkel, M, J Heeren, W Dudeck, F Rinniger, H Radner, JL Breslow, GI.J., R Zechner, H Greten (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.
- Mikhailenko, I, D Krylov, KM Argraves, DD Roberts, G Liao und DK Strickland (1997) Cellular internalization and degradation of thrombospondin-1 is mediated by the amino-terminal heparin binding domain (HBD). High affinity interaction of dimeric HBD with the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 272:6784-91.
- Minnich, A, A Kessling, M Roy, C Giry, G DeLangavant, J Lavigne, S Lussier-Cacan und J Davignon (1995): Prevalence of alleles encoding defective lipoprotein lipase in hypertriglyceridemic patients of French Canadian descent. *J Lipid Res.* 36:117-124.
- Moestrup, S.K und J Gliemann (1991) Analysis of ligand recognition by the purified α_2 -macroglobulin receptor (low density lipoprotein receptor related protein). Evidence that high affinity of α_2 -macroglobulin-proteinase complex is achieved by binding to adjacent receptors. *J Biol Chem.* 266:14011-14017.
- Moestrup, S.K, TL Holtet, M Etzerodt, HC Thorgersen, A Nykjaer, PA Andreasen, L Sottrup-Jensen und J Gliemann (1993) α_2 -macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activator complexes, and receptor associated protein bind to a region of the α_2 -macroglobulin receptor containing a cluster of eight complement type repeats. *J Biol Chem.* 268:13691-13696.
- Mulder, M, P Lombardi, H Jansen, TJ van Berkel, RR Frants und LM Havekes (1993) Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 268:9369-9375.
- Normand, T, J Bergeron, T Fernandez-Margallo, A Bhaucha, MR Ven Murthy, P Julien, C Gagne, C Dionne, M De Braekeleer, R Ma, et al. (1992): Geographic distribution and genealogy of mutations 207 of the lipoprotein lipase gene in the french Canadian population of Quebec. *Hum Genet* 89:671-675.

- Nykjaer, A., Bengtsson-Olivecrona, G., Lookene, A, Moestrup, SK, Petersen, CM, Weber, W, Beisiegel, U, Gliemann, J. (1993) The α_2 -Macroglobulin Receptor/ Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Binds Lipoprotein Lipase and -Migrating Very Low Density Lipoprotein associated with Lipase. *J Biol Chem.* 268:15048-15055.
- Nykjaer, A, M Nielsen, A Lookene, N Meyer, H Roigaard, M Etzerodt, U Beisiegel, G Olivecrona und J Gliemann (1994) A carboxyl-terminal fragment of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein and inhibits lipase-mediated uptake of lipoprotein in cells. *J Biol Chem.* 269:31747-31755.
- Obunike, JC, IJ Edwards, SC Rumsey, LK Curtiss, WD Wagner, RJ Deckelbaum und IJ Goldberg (1994) Cellular differences in lipoprotein lipase-mediated uptake of low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 269:13129-13135.
- Okuizumi, K, O Onodera, Y Namba, K Ikeda, T Yamamoto, K Seki, A Ueki, S Nanko, H Tanaka, H Takahashi, K Oyanagi, H Mizusawa, I Kanazawa und S Tsuji (1995) Genetic association of the very low density lipoprotein (VLDL) receptor gene with sporadic Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2:207-9.
- Olivecrona, G, M Hultin, R Savonen, N Skottova, A Lookene, Y Tugrul und T Olivecrona (1995) Transport of lipoprotein lipase in plasma and lipoprotein metabolism. In *Atherosclerosis x.* W F.P., J Davignon und A Sniderman, editors. Elsevier, New York. 250-253.
- Olivecrona, G und T Olivecrona (1995) Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 6:291-305.
- Orlando, RA und MG Farquhar (1994) Functional domains of the receptor-associated protein (RAP). *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3161-3165.
- Peterson, J, WY Fujimoto und JD Brunzell (1992) Human lipoprotein lipase: Relationship of activity, heparin affinity and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res.* 33:1165-1171.
- Persson, B, G Bengtson-Olivecrona, S Enerback, T Olivecrona und H Jornvall (1989) Structural features of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur J Biochem.* 179:39-45.
- Pietromonaco, S, D Kerjaschki, S Binder, R Ullrich, MG Farquhar (1990) Molecular cloning of a cDNA encoding a major pathogenic domain of the Heymann nephritis antigen gp330. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1811-5.

- Rinninger, F, T Kaiser, WA Mann, N Meyer, H Greten und U Beisiegel (1998) Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. *J Lipid Res.* 39:1335-1348.
- Rutledge, JC, MM Woo, AA Rezai, LK Curtiss und IJ Goldberg (1997) Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ Res.* 80:819-828.
- Saito, A, S Pietromonaco, AKC Loo, MG Farquhar (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin", a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9725-9729.
- Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T. (1993): Structure, Chromosome Location, and Expression of the Human Very Low Density Lipoprotein Receptor Gene. *J Biol Chem.* 269: 2173-2182.
- Salinelli, S, JY Lo, MP Mims, E Zsigmond, LC Smith und L Chan (1996) Structure-function relationship of lipoprotein lipase-mediated enhancement of very low density lipoprotein binding and catabolism by the low density lipoprotein receptor. Functional importance of a properly folded surface loop covering the catalytic center. *J Biol Chem.* 271:21906-13.
- Santamarina-Fojo, S, C Haudenschild und M Amar (1998) The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 9:211-219.
- Saxena, U und IJ Goldberg (1994) Endothelial cells and atherosclerosis: Lipoprotein metabolism, matrix interactions, and monocyte recruitment. *Curr Opin Lipidol.* 5:316-322.
- Semenkovich, CF, T Coleman und A Daugherty (1998) Effects for heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice *J Lipid Res.* 39:1141-1151.
- Senda, M, K Oka, WV Brown, PK Quasba und Y Furuichi (1987) Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4369-73.
- Shafi, S, SE Brady, A Bensadoun und RJ Havel (1994) Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *J Lipid Res.* 35:709-20.
- Shimada, M, H Shimano, T Gotoda, K Yamamoto, M Kawamura, T Inaba, Y Yazaki und N Yamada (1993) Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. *J Biol Chem.* 269:17924-17929.
- Simonsen, AC, CW Heegaard, LK Rasmussen, L Ellgaard, L Kjoller, A Christensen, M Etzerodt und PA Andreasen (1994) Very low density lipoprotein receptor from

- mammary gland and mammary epithelial cell lines binds and mediates endocytosis of M(r) 40,000 receptor associated protein. FEBS Lett.354:279-83.
- Smith, SC, Jr., E Amsterdam, GJ Balady, RO Bonow, GF Fletcher, V Froelicher, G Heath, MC Limacher, J Maddahi, D Pryor, RF Redberg, E Roccella, T Ryan, L Smaha und NK Wenger (2000) Prevention conference v: Beyond secondary prevention: Identifying the high-riskpatient for primary prevention: Tests for silent and inducible ischemia: Writing group ii. Circulation. 101: E12-16.
- Sparkes, RS, S Zollman, I Klisak, TG Kirchgessner, MC Komaromy, T Mohandas, MC Schotz und AJ Lusis (1987) Human genes involved in lipolysis of plasma proteins: Mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. genomics. 94:3239-3245.
- Stanley, KK, HP Kocher, JP Lusizio, P Jackson, J Tschopp und J Dickson (1985) The sequence and topology of human complete component C9. EMBO 4:375-382.
- Strickland, DK, JD Ashcom, S Williams, WH Burgess, M Migliorini und WS Agraves (1990) Sequence identify between the alpha₂-macroglobulin receptor-associated protein and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J Biol Chem. 266:13364-13369.
- Strickland, DK, JD Ashcom, S Williams, F Battey, E Behre, K McTigue, JF Battey und WS Argraves (1991) Primary structure of a₂-macroglobulin receptor-associated protein. J Biol Chem. 266:13364-13369.
- Takahashi, S, Y Kawarabayasi, T Nakai, J Sakai und T Yamamoto (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 89:9252-9256.
- Takahashi, S, J Suzuki, M Kohno, K Oida, T Tamai, S Miyabo, T Yamamoto, T Nakai (1995) Enhancement of the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the very low density lipoprotein receptor by apolipoprotein E and lipoprotein lipase. J Biol Chem. 270:15747-15754.
- Weinstock, PH, CL Bisgaier, K Aalto-Setala, H Radner, R Ramakrishnan, S Levak-Frank, AD Essenburg, R Zechner und JL Breslow (1995) Severe hypertiglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. J Clin Invest. 96:2555-2568.
- Weinstock, PH, S Levak-Frank, LC Hudgins, H Radner, JM Friedmann, R Zechner und JL Breslow (1997) Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat

- mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:10261-10266.
- Weisgraber, KH und SCL Hall (1987) Human apolipoprotein B-100 heparin binding sites. *J Biol Chem*. 626:11097-11103.
- Williams, SE, I Inoue, H Tran, GL Fry, MW Pladet, PH Iverius, JM Lalouel, DA Chappell und DK Strickland (1994) The carboxyl-terminal domain of lipoprotein lipase binds to the low density lipoprotein receptor-related protein/ alpha₂-macroglobulin receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. *J Biol Chem*. 269:8653-8.
- Willnow, TE, Z Sheng, S Ishibashi und J Herz (1995) Functional expression of low density lipoprotein receptor related protein is controlled by receptor-associated protein *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4537-4541.
- Wion, KL, TG Kirchgessner, AJ Lusic, MC Schotz und RM Lawn (1987) Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. *Science* 235:1638-1641.
- Yagyu, H, S Ishibashi, Z Chen, J Osuga, M Okazaki, S Perrey, T Kitamine, M Shimada, K Ohashi, K Harada, F Shionoiri, N Yahagi, T Gotoda, Y Yazaki und N Yamada (1999) Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res*. 40:1677-1685.
- Yamamoto, T, GC Davis, MS Brown, WJ Schneider, ML Casey, JL Goldstein, DW Russel (1984) The human LDL-receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* 39:27-38.
- Yokoyama, S (2006) Assembly of High-Density Lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 26: 20-27.
- Zechner, R (1997) The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: Implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 8:77-88.
- Zsigmond, E, E Scheffler, TM Forte, R Potenz, W Wu und L Chan (1994) Transgenic mice expressing human lipoprotein lipase driven by the mouse metallothionein promoter. A phenotype associated with increased perinatal mortality and reduced plasma very low density lipoprotein of normal size. *J Biol Chem*. 269:18757-18766.

Danksagung

Für die Erstellung und auch Fertigstellung einer Dissertation braucht es der Unterstützung vieler Personen, denen ich hier danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. M. Merkel für die Aufgabenstellung und die Möglichkeit die vorliegende Arbeit anfertigen zu können, sowie für die ausgezeichnete Betreuung während gesamten Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Professor Dr. rer. physiol. Dr. h.c. U. Beisiegel für die Möglichkeit verschiedene Geräte im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des UKE, zu nutzen.

Herrn PD Dr. rer. nat. J. Heeren danke ich für die Herstellung der radioaktiven Substrate für die Turnover-Studien.

Für die Einarbeitung und technische Unterstützung möchte ich Frau Kathrin Frahm und Frau Iris Gerke danken.

Danken möchte ich auch Herrn Felix Ewert für die Unterstützung in informatischen Fragen und beim Layout.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie die mich jederzeit unterstützte.

Nils Stefan Jahn

Persönliches

Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder
Geburtsdatum: 07.03.1977 in Hamburg

Schulbildung

1983-1987 Grundschole Mühlenberg, Quickborn
1987-1991 Heinrich-Hertz-Realschole, Quickborn
1991-1996 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Quickborn

Ausbildung/berufliche Tätigkeiten

1996-1997 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Rettungsdienst des
Kreises Pinneberg
1997-1998 Ausbildung zum Rettungsassistent
03/1998-10/1999 angestellt beim Rettungsdienst Kreis Pinneberg

Studium

ab 10/1999 Medizinstudium Universitätsklinik Hamburg
08/2001 Physikum (Note 2,3)
03/2003 1. Staatsexamen (Note: 2)
03/2005 2. Staatsexamen (Note: 1,7)
25.04.05-19.06.05 PJ in der Kinderchirurgie Kinderkrankenhaus Altona
(Prof. Dr. Lambrecht)
20.06.05-14.08.05 PJ in der Allgemein Chirurgie im Klinikum Nord
(Prof. Dr. Rückert)
15.08.05-04.12.05 PJ in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin
des Klinikum Nord (PD Dr. Detsch)
05.12.05.-26.03.06 PJ in der Abteilung für Innere Medizin des Albertinen
Krankenhauses (Prof. Dr. Lock)
04/2006 3. Staatsexamen (Note 2; Gesamtnote 1,83)
21.04.06 Approbation

Wissenschaftliche Ausbildung

03-12/2002

experimenteller Teil im Lipaselabor, III. Medizinische
Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. R. Stahl),
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf; Laborleiter:
PD Dr. med. M. Merkel zum Thema
„Untersuchung zum Mechanismus der durch LPL-
vermittelten Lipoproteinaufnahme in VLDL-Rezeptor
defizienten“ Mäusen *in vivo*

Bönningstedt, den 05.05.2006

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.