

ANGEWANDTE CHEMIE

98. Jahrgang 1986

Heft 7

Seite 579-658

Ein Rezeptor-vermittelter Stoffwechselweg für die Cholesterin-Homöostase (Nobel-Vortrag)**

Von Michael S. Brown* und Joseph L. Goldstein*

Im Jahre 1901 untersuchte der Arzt *Archibald Garrod* einen Patienten mit schwarzem Urin. *Garrod* demonstrierte anhand dieser einfachen Beobachtung, daß ein einziges mutiertes Gen einen biochemischen Stoffwechselweg blockieren kann, und nannte dies einen „angeborenen Fehler im Metabolismus“. *Garrods* brillianter Ansatz nahm das „ein-Gen-ein-Enzym“-Konzept von *Beadle* und *Tatum* um etwa 40 Jahre vorweg. Durch Untersuchungen von Patienten mit Sichelzellanämie zeigten der Chemiker *Linus Pauling* und der Arzt *Vernon Ingram* auf ähnliche Weise, daß mutierte Gene die Aminosäuresequenz von Proteinen verändern. Es liegt auf der Hand, daß viele entscheidende Fortschritte in der Biologie durch perzeptive Studien genetisch bedingter Krankheiten des Menschen erreicht wurden^[1].

Wir begannen unsere Arbeit 1972 in der Absicht, eine genetisch bedingte Krankheit des Menschen, die familiäre Hypercholesterinämie (FH), zu verstehen. Im Blut dieser Patienten beträgt die Cholesterin-Konzentration ein Vielfaches des normalen Werts; diese Menschen erleiden schon in jungen Jahren Herzinfarkte. Wir postulierten, daß diese dominant vererbte Krankheit durch einen Fehler bei der Endprodukt-Repression der Cholesterin-Synthese verursacht wird. Diese Möglichkeit faszinierte uns, weil genetische Defekte bei der Rückkopplungsregulation vorher weder bei Mensch noch Tier beobachtet worden waren; wir hofften, daß das Studium dieser Krankheit auch fundamentale Regulationsmechanismen erhellen könnte.

Wir wendeten die Techniken der Zellkultur an, um den postulierten regulatorischen Defekt bei FH nachzuweisen. Die Untersuchungen führten zur Entdeckung eines an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptors für ein Cholesterin-Transportprotein aus dem Plasma. Dieses Protein wird „low density lipoprotein“ (LDL) genannt. Außerdem führten die Studien zur Aufklärung des Mechanismus, durch den dieser Rezeptor die Rückkopplung bei der Cholesterin-Synthese kontrolliert^[2,3]. Es konnte gezeigt werden, daß FH durch erbliche Defekte in dem Gen verursacht wird, das den LDL-Rezeptor codiert, und daß dadurch die normale Kontrolle des Cholesterin-Metabolismus aufgehoben ist. Die Arbeit am LDL-Rezeptor wiederum ermöglichte ein Verständnis der Rezeptor-vermittelten Endocytose. Durch diesen allgemeinen Mechanismus kommunizieren Zellen miteinander, indem sie regulatorische Moleküle und Substrat internalisieren^[4]. Die Rezeptor-vermittelte Endocytose unterscheidet sich von anderen biochemischen Vorgängen, da sie von der kontinuierlichen, vielfältig gesteuerten Wanderung von Membranproteinen von einer Zellorganelle zur anderen abhängt, einem Vorgang, der Rezeptor-Recycling genannt wird^[4].

Viele der Mutationen des LDL-Rezeptors, die bei FH-Patienten vorkommen, unterbrechen die Wanderung des Rezeptors zwischen den Organellen. Diese Mutationen definieren eine neue Art von zellulären Defekten, die große Bedeutung für die normale und abweichende Physiologie des Menschen haben.

In diesem Vortrag werden wir zuerst den Transport des Plasma-Cholesterins diskutieren. Danach werden einige historische Aspekte von FH und der Ursprung des LDL-Rezeptor-Konzeptes präsentiert. Als nächstes werden wir unser gegenwärtiges Wissen über diesen Rezeptor zusammenfassen und seine Funktion in Zellen beschreiben. Abschließend wird eine Beziehung zur Pathogenese von FH und zum alltäglichen klinischen Problem von hohem Cho-

[*] Prof. Dr. M. S. Brown, Prof. Dr. J. L. Goldstein
Department of Molecular Genetics
University of Texas Health Science Center
Southwestern Medical School
5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75235 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1986. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck dieser Übersetzung.

lesterin-Gehalt im Blut und Arteriosklerose beim Menschen hergestellt.

Das Problem des Cholesterin-Transports

Cholesterin ist das mit den meisten Preisen ausgezeichnete kleine biologische Molekül. Dreizehn Nobel-Preise wurden bereits an Wissenschaftler verliehen, die ihm einen Hauptteil ihrer Arbeitskraft widmeten^[5]. Seit es 1784, also vor etwa 200 Jahren, zum erstenmal aus Gallensteinen isoliert wurde, übte es eine hypnotische Faszination auf Wissenschaftler der verschiedensten medizinischen und naturwissenschaftlichen Richtungen aus. Die Organiker waren von Cholesterin wegen seiner komplexen tetracyclischen Struktur fasziniert, die Biochemiker, weil Cholesterin aus einem einfachen C_2 -Substrat, Acetat, unter Mitwirkung von mindestens 30 Enzymen synthetisiert wird, von denen viele koordiniert reguliert werden. Die Physiologen und Zellbiologen waren von Cholesterin wegen seiner lebenswichtigen Funktionen in Membranen tierischer Zellen fasziniert, wo es die Fluidität moduliert, die Barriere zwischen Zelle und Umgebung aufrecht erhält und außerdem als Rohstoff für die Bildung von Steroidhormonen und Gallensäuren dient. Schließlich waren auch die Ärzte fasziniert, denn ein erhöhter Cholesterin-Gehalt im Blut beschleunigt die Bildung arteriosklerotischer Plaques, die zu Herzinfarkten und Schlaganfällen führen. Die Arbeiten über Cholesterin umfassen somit fast alle Disziplinen der modernen Biologie. Wenn die Rolle von Cholesterin in der Biomedizin aufgeklärt werden soll, müssen alle diese Disziplinen dazu beitragen.

Cholesterin ist ein Molekül mit Januskopf. Die gleiche Eigenschaft, die für Zellmembranen nützlich ist – seine Unlöslichkeit in Wasser – hat auch letale Wirkung: Wenn Cholesterin sich an den falschen Stellen akkumuliert, z. B. an Arterienwänden, so kann es sehr schwer wieder mobilisiert werden, und es entstehen arteriosklerotische Plaques. Die Gefahr einer irregulären Ablagerung von Cholesterin wird durch seine gefährliche Tendenz, passiv zwischen Lipoproteinen des Blutes und Zellmembranen zu pendeln, verstärkt. Soll Cholesterin sicher im Blut transportiert werden, so muß man seine Konzentration niedrig halten und seiner Tendenz entgegenwirken, aus der Blutbahn zu entweichen.

Vielzellige Organismen lösen das Problem des Cholesterin-Transports durch Veresterung mit langkettigen Fettsäuren; diese Ester werden dann in den hydrophoben Kern von Plasma-Lipoproteinen verpackt (Abb. 1). Durch die Veresterung seiner polaren Hydroxygruppe verbleibt Cholesterin in dieser Kernregion, die so etwas wie ein Öltröpfchen aus Cholesterylestern und Triglyceriden ist, das durch eine Oberflächen-Monoschicht aus Phospholipiden und nicht-verestertem Cholesterin solubilisiert und durch Protein stabilisiert wird. Die kleinen Mengen an nicht-verestertem Cholesterin auf der Partikeloberfläche stehen in einem Austauschgleichgewicht mit dem Cholesterin der Zellmembranen, doch bleiben die weit größeren Mengen an Cholesterylestern fest im Innern der Partikel eingeschlossen und verlassen sie nur im Verlauf eines stark kontrollierten Prozesses.

Die Hauptklassen der Lipoproteine des Plasmas wurden in den fünfziger und sechziger Jahren dieses Jahrhunderts von vielen Arbeitsgruppen beschrieben, besonders von *Onclays*^[6], *Gofmans*^[7] und *Fredricksons Gruppe*^[8]. Man teilt die Plasma-Lipoproteine in vier Hauptklassen ein: Lipoproteine mit sehr niedriger Dichte (very low density lipoprotein, VLDL), Lipoproteine mit mittlerer Dichte (intermediate density lipoprotein, IDL), Lipoproteine mit niedriger Dichte (low density lipoprotein, LDL) und Lipoproteine mit hoher Dichte (high density lipoprotein, HDL). Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau von LDL, dem häufigsten Cholesterin-transportierenden Lipoprotein des menschlichen Plasmas.

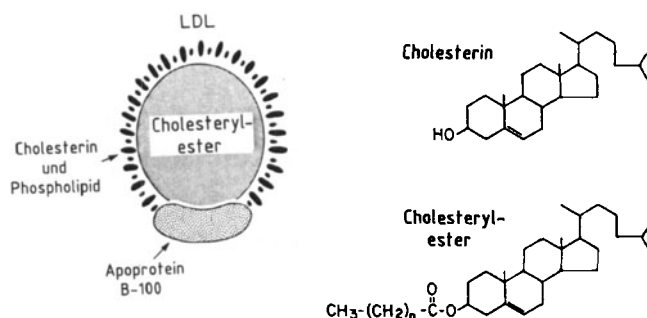


Abb. 1. Struktur von Plasma-LDL (links) sowie von Cholesterin und Cholesterylestern (rechts). LDL ist eine sphärische Partikel mit einer Masse von 3×10^6 Dalton und einem Durchmesser von 22 Nanometern. Jede LDL-Partikel enthält etwa 1500 Moleküle Cholesterylester in einem öligen Kern, der durch einen hydrophilen Mantel aus 800 Molekülen Phospholipid, 500 Molekülen nicht-verestertem Cholesterin und einem Molekül des 387 000 Dalton-Proteins Apoprotein B-100 [129] vom wässrigen Plasma abgeschirmt ist. Eine erhöhte Cholesterin-Konzentration im Blut ist gewöhnlich einer größeren Anzahl von LDL-Partikeln zuzuschreiben.

Das Verpacken von Cholesterylestern in Lipoproteine löst das Problem der nicht-spezifischen Einlagerung von Cholesterin in Zellmembranen, schafft aber ein neues Problem, das der Zulieferung. Cholesterylester sind zu hydrophob, um Membranen passieren zu können. Wie gelangt dann das veresterte Cholesterin in die Zellen? Dieses Problem wird durch Lipoprotein-Rezeptoren gelöst, deren Prototyp der LDL-Rezeptor ist^[9]. Diese strategisch an der Zelloberfläche angeordneten Rezeptoren binden LDL und befördern es durch Rezeptor-vermittelte Endocytose in die Zellen. Das internalisierte Lipoprotein gelangt zu den Lysosomen, wo seine Cholesterylester hydrolysiert werden. Das freigesetzte Cholesterin wird von der Zelle für die Synthese von Plasmamembranen, Gallensäuren und Steroidhormonen genutzt oder im Cytoplasma in Form von Cholesterylestertröpfchen gespeichert. Zwei Eigenschaften des Rezeptors – seine hohe Affinität für LDL und seine Fähigkeit, mehrfach zwischen Innerem und Äußerem der Zelle zu wechseln – ermöglichen die Zulieferung großer Mengen Cholesterin an das Körpergewebe, während die LDL-Konzentration im Blut niedrig genug bleibt, um das Entstehen von arteriosklerotischen Plaques zu verhindern. Ist die Funktion des LDL-Rezeptors durch genetische Defekte oder als Antwort auf regulatorische Signale beeinträchtigt, so fällt der Schutzmechanismus aus; Cholesterin sammelt sich im Plasma an und führt zu Arteriosklerose^[10].

Familiäre Hypercholesterinämie: Der Ursprung des LDL-Rezeptor-Konzeptes

Als Krankheit hat FH eine lange klinische Geschichte. Sie wurde zuerst 1938 von *Carl Müller*, einem Arzt am Städtischen Krankenhaus in Oslo in Norwegen, als „angeborener Fehler im Metabolismus“ beschrieben, der hohe Cholesterin-Werte im Blut und Herzinfarkte bei jungen Menschen verursacht^[11]. *Müller* schloß, daß FH dominant vererbt wird, und zwar über ein einziges autosomales Gen. Mitte der sechziger und Anfang der siebziger Jahre zeigten *Khachadurian*^[12] an der Amerikanischen Universität in Beirut sowie *Fredrickson* und *Levy*^[13] an den National Institutes of Health, daß FH klinisch in zwei Gruppen unterteilt werden kann: die weniger schwere heterozygote Form und die schwere homozygote Form.

FH-Heterozygote, die nur eine Kopie des mutierten LDL-Rezeptor-Gens tragen, sind recht häufig; bei den meisten ethnischen Gruppen der Welt ist etwa jeder Fünfhundertste davon betroffen^[14]. Diese Menschen haben von Geburt an die doppelte Menge an LDL-Partikeln im Plasma und erleiden im Alter von 30 bis 40 Jahren die ersten Herzinfarkte. Bei Herzinfarkt-Patienten unter 60 Jahren haben etwa 5% die heterozygote Form von FH, ein Prozentsatz, der 25fach über dem Bevölkerungsdurchschnitt liegt^[15–17].

Die Existenz von Homozygoten macht FH als experimentelles Modell interessant. Etwa einer von einer Million Menschen erbt zwei mutierte Gene für den LDL-Rezeptor, von jedem Elternteil eines. Bei diesen Patienten ist die Krankheit wesentlich schwerer als bei den Heterozygoten. Von Geburt an liegt die Plasma-LDL-Konzentration sechs- bis zehnfach höher als die Norm, so daß häufig schon im Kindesalter Herzinfarkte auftreten^[12–14]. Die schwere Arteriosklerose, die diese Menschen auch bei Abwesenheit sonstiger Risikofaktoren entwickeln, ist der formale Beweis dafür, daß Plasma-Cholesterin in hohen Konzentrationen die Arteriosklerose beim Menschen verursachen kann. An FH-Homozygoten lassen sich die Manifestationen des mutierten Gens ohne störende Einflüsse des normalen Gens untersuchen.

Zu Beginn unserer Arbeiten im Jahre 1972 nahm man an, daß alle wichtigen Schritte des Cholesterin-Stoffwechsels in der Leber oder im Darm stattfinden^[18]. Aus offensichtlichen Gründen war es nicht möglich, aussagekräftige Untersuchungen an der Leber von FH-Patienten durchzuführen. Die einzige Chance, dem Geheimnis auf die Spur zu kommen, lag in der Möglichkeit, daß der mutierte Phänotyp auch in längerfristig kultivierten Zellen, z.B. Hautfibroblasten, manifest würde. Die Methoden zum Züchten solcher Zellen waren während der vergangenen zwanzig Jahre etabliert worden. Man wußte zudem, daß vererbte Enzymdefekte in Kulturfibroblasten von Patienten mit seltenen rezessiven Krankheiten wie Galactosämie, dem Lesch-Nyhan-Syndrom und dem Refsum-Syndrom exprimiert werden. Um 1970 zeigten die klassischen Untersuchungen von *Neufeld* über Mucopolysaccharidosen – eine Art lysosomaler Speicherkrankheit – den Wert von Hautfibroblasten-Kulturen für die Aufklärung komplexer zellulärer Stoffwechselwege^[19].

Es gab Grund zur Annahme, daß auch FH in Hautfibroblasten-Kulturen manifest wird. Untersuchungen von

Bailey^[20] und *Rothblat*^[21] in den sechziger Jahren hatten gezeigt, daß mehrere Typen von kultivierten Tierzellen Cholesterin synthetisieren und daß diese Synthese einer negativen Rückkopplungsregulation unterliegt. War Serum im Medium anwesend, so produzierten die Kulturzellen nur wenig Cholesterin aus radioaktiv markiertem Acetat. Wurden die Serum-Lipoproteine aus dem Kulturmedium entfernt, so nahm die Cholesterin-Synthese zu.

Regulation der HMG-CoA-Reduktase durch LDL in Fibroblasten

Wir begannen unsere Untersuchungen mit der Entwicklung eines Mikroassays für 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterin-Biosynthese. Mit diesem Assay konnte die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in Extrakten von Fibroblastenkulturen bestimmt werden^[2,22]. *Bucher* und *Lynen*^[23] sowie *Siperstein*^[24] hatten bereits durch Untersuchungen an Rattenleber gezeigt, daß sich die Aktivität dieses Enzyms verringerte, wenn die Ratten Cholesterin bekamen, und daß diese Verringerung die Geschwindigkeit der Cholesterin-Synthese limitiert. Wir fanden bald, daß die Aktivität von HMG-CoA-Reduktase in Fibroblasten negativ reguliert wird^[2,22]. Wie Abbildung 2A zeigt, war die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase niedrig, wenn normale menschliche Fibroblasten in Gegenwart von Serum wuchsen. Die Aktivität stieg jedoch innerhalb von 24 Stunden, nachdem die Lipoproteine aus dem Medium entfernt worden waren, um mindestens das Fünzigfache an. Nach Zugabe von LDL wurde das induzierte Enzym sofort supprimiert (Abb. 2B).

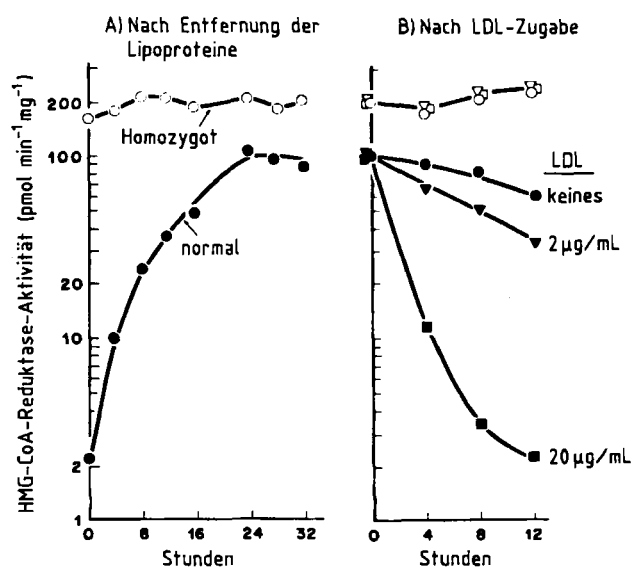


Abb. 2. Regulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (●) und eines FH-Homozygoten (○). A) Monoschichten von Zellen, die in Schalen mit 10% fötalem Kälberserum gehalten wurden. Am 6. Tag des Zellwachstums (Null-Zeit) wurde das Medium gegen frisches Medium mit 5% menschlichem Serum ohne Lipoproteine ausgetauscht. Zu den angegebenen Zeiten wurden Extrakte hergestellt, in denen die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität gemessen wurde. B) 24 Stunden nach Zugabe von 5% Lipoprotein-freiem menschlichem Serum wurde menschliches LDL zugesetzt. Die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität wurde zu den angegebenen Zeiten in zellfreien Extrakten gemessen (nach [2]).

Nicht alle Lipoproteine konnten die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase supprimieren. Von den beiden wichtigsten Cholesterin-bindenden Lipoproteinen des menschlichen Plasmas – LDL und HDL – war nur LDL wirksam^[22, 25]. Diese Spezifität gab uns den ersten Hinweis auf die Mitwirkung eines Rezeptors. Den zweiten Hinweis lieferte uns die erforderliche LDL-Konzentration. Schon 5 µg/mL waren aktiv, was einer Lipoprotein-Konzentration von weniger als 10^{-8} M entspricht^[22, 25]. Ein Mechanismus unter Beteiligung eines Rezeptors mit hoher Affinität mußte für die Enzymsuppression maßgeblich sein.

Den Schlüssel zu diesem Mechanismus lieferten Untersuchungen an Zellen von FH-Patienten^[2, 25]. Wurden diese Zellen in Serum mit Lipoproteinen gehalten, so lag die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase fünfzig- bis hundertfach über dem normalen Wert (Abb. 2A). Die Aktivität stieg nicht signifikant, wenn die Lipoproteine aus dem Serum entfernt wurden, und es trat auch keine Suppression bei LDL-Zugabe ein. Der genetische Defekt wurde demnach in Zellen exprimiert, die in Kultur gehalten wurden (Abb. 2A und 2B).

Die einfachste Interpretation dieser Befunde bestand darin, daß bei FH-Homozygoten das Gen für die HMG-CoA-Reduktase defekt ist und ein Enzym produziert, das nicht der Rückkopplungsregulation durch LDL-Cholesterin unterliegt. Diese Arbeitshypothese erwies sich schon beim nächsten Experiment als falsch. In Ethanol gelöstes Cholesterin wurde zu normalen und FH-homozygoten Zellen gegeben. Wird Cholesterin mit Albumin-haltigen Lösungen gemischt, so bildet sich eine quasi-lösliche Emulsion, die passiv in Zellen eindringen kann, anscheinend durch Diffusion durch die Plasmamembran. In dieser Form verabreichtes Cholesterin supprimierte die HMG-CoA-Reduktase-Aktivität von normalen und FH-homozygoten Fibroblasten in gleichem Maße^[25].

Der Defekt von FH-homozygoten Zellen betrifft demnach ihre Unfähigkeit, Cholesterin aus dem Lipoprotein zu extrahieren, und nicht die Wirksamkeit des einmal extrahierten Cholesterins. Wie aber extrahieren normale Zellen das Cholesterin aus LDL? Da die Affinität dieses Prozesses sehr hoch war, schien ein Rezeptor an der Zelloberfläche beteiligt zu sein. Solche Rezeptoren waren für Protein hormone und andere chemische „messenger“ seit vielen Jahren bekannt. Man nahm an, daß diese Rezeptoren den Liganden an der Oberfläche binden und sich daraufhin einen „second messenger“ an der intrazellulären Seite der Plasmamembran bildet. Der klassische „second messenger“ ist cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)^[26]. Es bestand also die Möglichkeit, daß LDL an einen Rezeptor bindet und dadurch die Entstehung eines „second messengers“ auslöst, der die HMG-CoA-Reduktase supprimiert.

Beschreibung des LDL-Rezeptor-Mechanismus

Die Existenz eines LDL-Rezeptors wurde bestätigt, als ¹²⁵Iod-markiertes LDL mit normalen und FH-homozygoten Fibroblasten inkubiert wurde. Diese Untersuchungen zeigten, daß normale Zellen über Bindungsstellen mit hoher Affinität für ¹²⁵I-LDL verfügen, FH-homozygote Zellen aber nicht^[3, 27]. Dieses Ergebnis schien den genetischen Defekt bei FH zu erklären, sagte aber nichts darüber aus,

wie LDL das Signal auslöst, das die HMG-CoA-Reduktase supprimiert. Die Antwort lieferten Untersuchungen über das Schicksal von Oberflächen-gebundenem ¹²⁵I-LDL. Es wurden Methoden zur Unterscheidung von Oberflächen-gebundenem und intrazellulärem ¹²⁵I-LDL entwickelt^[28], mit denen gezeigt werden konnte, daß das Rezeptor-gebundene LDL durchschnittlich weniger als zehn Minuten an der Oberfläche blieb (Abb. 3A). Während dieser Zeit drangen die meisten an der Oberfläche gebundenen LDL-Partikel in die Zelle ein; im Laufe der nächsten 60 Minuten wurde der Proteinanteil an der Oberfläche von ¹²⁵I-LDL vollständig zu Aminosäuren abgebaut, und ¹²⁵I, das an die Tyrosinreste von LDL gebunden war, wurde als ¹²⁵I-Monoiodtyrosin ins Kulturmedium abgegeben^[27, 28]. Währenddessen wurden die Cholesterylester aus dem Inneren von LDL hydrolysiert, so daß nicht-verestertes Cholesterin entstand, das in der Zelle blieb^[29].

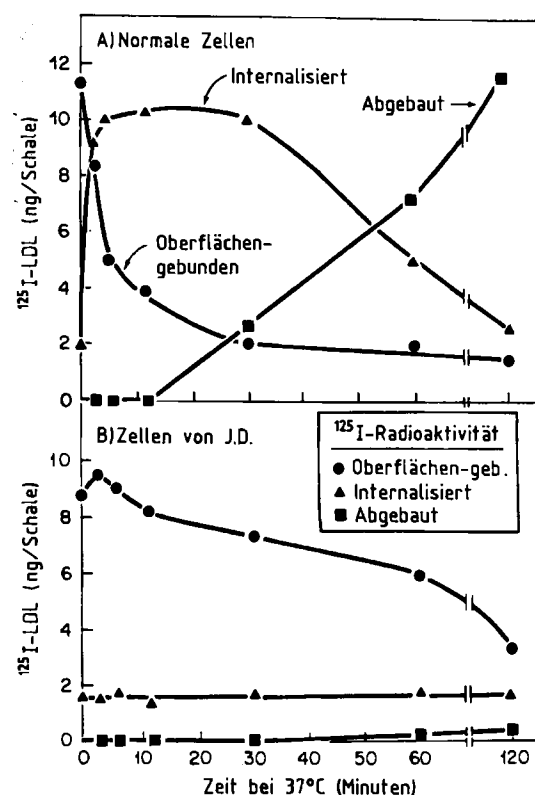


Abb. 3. Internalisierung und Abbau von ¹²⁵I-LDL bei 37°C, das vorher bei 4°C an den LDL-Rezeptor von Fibroblasten A) einer gesunden Kontrollperson und B) des Patienten J. D. gebunden war. J. D. litt an der Internalisierungsdefekten Form von FH. Jede Zellen-Monoschicht hatte zwei Stunden lang bei 4°C Gelegenheit, ¹²⁵I-LDL (10 µg Protein/mL) zu binden; die Zellen wurden danach gründlich gewaschen. In einigen Schalen wurde die Menge an ¹²⁵I-LDL bestimmt, das durch Heparin von der Oberfläche abgelöst werden konnte. Den anderen Schalen wurde warmes Medium zugesetzt, danach wurde bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Schalen schnell auf 4°C abgekühlt; die Mengen an Oberflächen-gebundenem (Heparin-ablösbar) ¹²⁵I-LDL (●), an internalisiertem (Heparin-resistentem) ¹²⁵I-LDL (▲) und an abgebautem (Trichloressigsäure-löslichem) ¹²⁵I-LDL (■) wurden bestimmt (nach [41]).

Die einzige Zellorganelle, in der LDL so vollständig und schnell abgebaut worden sein konnte, war das Lysosom. Lysosomen, zum ersten Mal von *de Duve*^[30] beschrieben, enthalten viele saure Hydrolasen, die ohne Schwierigkeiten alle Komponenten von LDL verdauen könnten. Die

Hypothese vom lysosomalen LDL-Abbau wurde erstens durch den Einsatz von Inhibitoren wie Chloroquin^[31], das den pH-Wert von Lysosomen erhöht und lysosomale Enzyme inhibiert^[32], und zweitens durch Untersuchungen an gezüchteten Fibroblasten von Patienten mit genetisch bedingtem Mangel an lysosomaler saurer Lipase^[29] bestätigt. Die Zellen dieser Patienten banden und internalisierten LDL, konnten seine Cholesterylester aber nicht hydrolysieren, obwohl der Proteinanteil abgebaut wurde.

Das im Lysosom aus LDL freigesetzte Cholesterin erwies sich als „second messenger“, der die Suppression der HMG-CoA-Reduktase hervorruft. Wir wissen heute, daß Cholesterin (oder ein oxygeniertes Derivat, das in der Zelle entsteht) auf mehreren Ebenen wirkt und auch die Transkription der HMG-CoA-Reduktase-Gene supprimiert^[33] und den Abbau des Enzyms beschleunigt^[34]. Das LDL-Cholesterin reguliert zusätzlich zwei weitere zelluläre Vorgänge in einer koordinierten Aktion und stabilisiert dadurch die Cholesterin-Konzentration in der Zelle. Es aktiviert ein Enzym, das Cholesterin verestert, die Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT), so daß überschüssiges Cholesterin als Cholesterylester in Tröpfchenform im Cytoplasma gespeichert werden kann^[35]. Zudem unterdrückt es die Synthese von LDL-Rezeptoren, indem es die Konzentration der Rezeptor-mRNA senkt^[36,37]. Dadurch kann die Zelle die Zahl der LDL-Rezeptoren regulieren und genügend Cholesterin für metabolische Zwecke bereitstellen, ohne zuviel Cholesterin zu akkumulieren^[9]. Durch diese regulatorischen Mechanismen halten die Zellen trotz starker Schwankungen des Bedarfs und des exogenen Angebots an Cholesterin die Konzentration an nicht-verestertem Cholesterin bemerkenswert konstant.

Die Rezeptor-vermittelte Endocytose von LDL: Bindung und Internalisierung in „Coated Pits“ sind gekoppelt

Die schnelle Internalisierung von Rezeptor-gebundenem LDL und die Vollständigkeit, mit der das LDL-Protein hydrolysiert wurde, deuteten an, daß Fibroblasten über einen speziellen Mechanismus für den Transport von Lipoproteinen von der Zelloberfläche in das Liposom verfügen. Am wahrscheinlichsten war die Endocytose, ein Prozeß, bei dem Oberflächenmembranen sich einstülpen und als Vesikel abgespalten werden, die danach mit den Lysosomen verschmelzen. Die Endocytose wurde erstmals in den dreißiger Jahren durch Kinematographie von phagocytierenden Zellen gezeigt, und in den fünfziger Jahren wurde das universelle Auftreten dieses Vorgangs in allen Zellen durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *Palade*^[38] nachgewiesen. Man hielt die Endocytose für einen unspezifischen Vorgang, durch den Flüssigkeiten und Inhaltsstoffe in die Zelle transportiert werden. Es gab bis dahin kein Beispiel, daß spezifische Rezeptoren auf diesem Weg in die Zelle gelangen.

Um festzustellen, ob die Endocytose an der Aufnahme von LDL beteiligt ist, arbeiteten wir ab 1975 mit *Richard G. W. Anderson* zusammen, einem Zellbiologen unserer Medical School in Dallas. Wir setzten an Ferritin (hohe Elektronendichte) gekoppeltes LDL ein und fanden, daß Rezeptor-gebundenes LDL durch Endocytose internalisiert wurde. Diese morphologischen Untersuchungen erklärten

zudem die Effizienz der Internalisierung; die Effizienz hängt von einer Anhäufung („Clustern“) der LDL-Rezeptoren in kleinen Taschen („Coated Pits“) der Oberfläche ab^[39]. Coated Pits wurden 1964 von *Roth* und *Porter*^[40] bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen über die Aufnahme von Dotter-Proteinen durch Moskito-Oocyten detailliert beschrieben. Diese Forscher zeigten, daß sich Coated Pits von der Oberfläche abschnüren und endocytotische Vesikel bilden, die extrazelluläre Flüssigkeiten und Inhaltsstoffe in die Zelle transportieren.

Der Befund, daß die LDL-Rezeptoren sich in Coated Pits anhäufen, legte die Möglichkeit nahe, daß diese Strukturen allgemein als „Sammelplätze“ für Rezeptoren an der Zelloberfläche dienen, die endocytotiert werden sollen^[41]. Andere Proteine von der Zelloberfläche, die sich nicht in Coated Pits befinden, können nicht so schnell in die Zelle eindringen.

Diese Interpretation der Funktion von Coated Pits wurde durch Befunde an Fibroblasten eines einzigartigen FH-Homozygoten gestützt. Die Zellen der meisten FH-Homozygoten binden einfach kein LDL. Die Zellen eines Patienten mit den Initialen J. D. banden jedoch LDL, internalisierten es aber nicht (Abb. 3B)^[41,42]. Wir zeigten in Zusammenarbeit mit *Anderson*, daß diese mutierten Zellen keine Coated Pits bildeten^[43]. Das war ein wichtiger Befund, durch den die essentielle Bedeutung von Coated Pits für die hocheffiziente Aufnahme von Rezeptor-gebundenen Molekülen bewiesen war^[4].

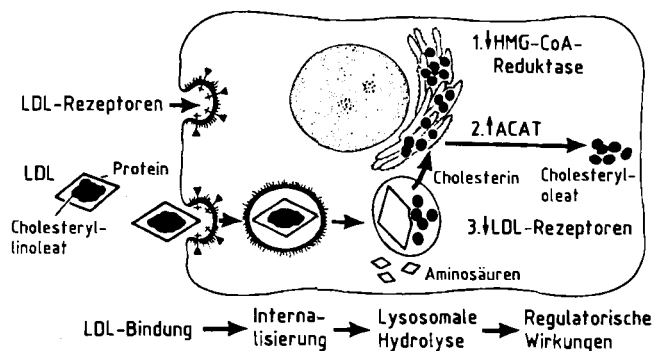


Abb. 4. Aufeinanderfolgende Schritte beim Stoffwechsel des LDL-Rezeptors in Säugerzellen. HMG-CoA-Reduktase bedeutet 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase; ACAT bedeutet Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase. Vertikale Pfeile zeigen die Richtung der regulatorischen Effekte (nach [130]).

Abbildung 4 faßt die aufeinanderfolgenden Schritte bei der Aufnahme des LDL-Rezeptors zusammen. Diese Ergebnisse stammen aus biochemischen, genetischen und ultrastrukturellen Untersuchungen zwischen 1972 und 1976. Abbildung 5 zeigt die eindrucksvollen biochemischen „Alles oder Nichts“-Unterschiede im LDL-Metabolismus und die regulatorischen Auswirkungen in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson und eines FH-Homozygoten ohne jegliche LDL-Rezeptoren.

Kurz nach den ersten Arbeiten über die LDL-Rezeptoren reinigte *Pearse*^[44] Coated Vesicles und fand, daß die cytoplasmatische Hülle hauptsächlich aus einem Protein besteht, das sie Clathrin nannte. Zur gleichen Zeit führten *Cohen* und Mitarbeiter ihre eleganten Untersuchungen

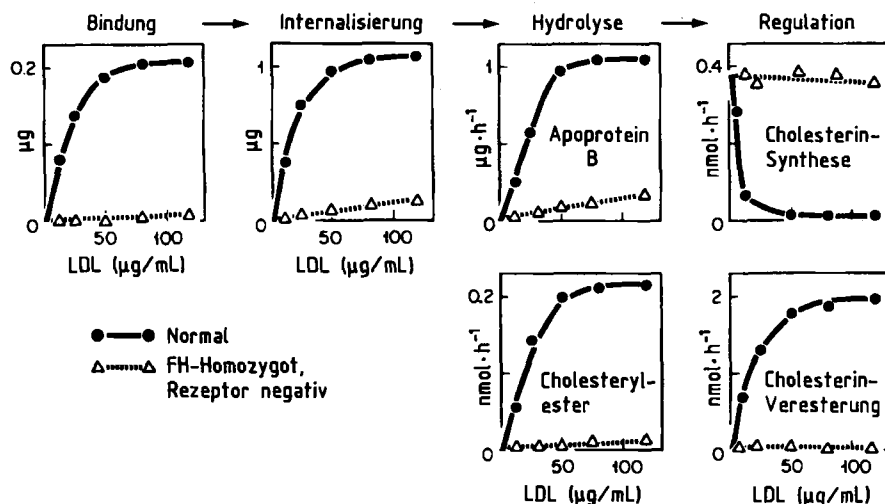


Abb. 5. Wirkungsweise des LDL-Rezeptors in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson (●) und eines FH-homozygoten Menschen mit der Rezeptor-negativen Form von FH (▲) nach 5 Stunden Inkubation mit ^{125}I -LDL in unterschiedlichen Konzentrationen oder mit nicht-markiertem LDL bei 37°C. Die Methode ist in [128] beschrieben. Alle Daten wurden auf 1 mg Zellprotein umgerechnet. Die Einheiten für jedes Assay sind wie folgt: **Bindung:** µg ^{125}I -LDL an die Zelloberfläche gebunden; **Internalisierung:** µg ^{125}I -LDL innerhalb der Zelle; **Hydrolyse von Apoprotein B-100:** µg ^{125}I -LDL pro Stunde abgebaut zu ^{125}I -Monoiodtyrosin; **Hydrolyse der Cholesteryl-ester:** nmol [^3H]Cholesterin pro Stunde durch Hydrolyse von [^3H]Cholesteryllinoleat-markiertem LDL gebildet; **Cholesterin-Synthese:** nmol [^{14}C]Acetat pro Stunde in [^{14}C]Cholesterin durch intakte Zellen eingebaut; **Veresterung von Cholesterin:** nmol [^{14}C]Oleat pro Stunde in Cholesteryl[^{14}C]oleat durch intakte Zellen eingebaut (nach [130]).

über die Wirkung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) auf Fibroblastenkulturen durch^[45]. Sie fanden, daß dieses Peptidhormon auf völlig gleiche Weise wie LDL von den Zellen internalisiert wird. Ähnliche Beobachtungen gelangen Terris und Steiner^[46] mit Insulin in Hepatocyten, Neufeld und Mitarbeitern^[47] sowie Sly und Mitarbeitern^[48] mit lysosomalen Enzymen in Fibroblasten und Ashwell, Morell und Mitarbeitern^[49] mit Asialoglycoproteinen in Hepatocyten. Zudem zeigten Helenius, Simons und Mitarbeiter^[50], daß einige Viren mit Lipidhülle auf diesem Weg in die Zelle eindringen. Es war klar, daß die Rezeptor-vermittelte Endocytose nicht nur der Cholesterin-Zufuhr diene; diese Art Endocytose ist ein allgemeiner Vorgang, durch den die Zelle viele externe Moleküle internalisiert und abbaut^[4,51]. In allen Fällen, in denen adäquate morphologische Untersuchungen vorgenommen wurden, konnte die Internalisierung der Anhäufung von Rezeptoren in den Coated Pits zugeschrieben werden. Pastan und Willingham^[51] sowie Carpentier et al.^[52] zeigten, daß Rezeptoren für diverse Liganden in der Tat im selben Coated Pit lokalisiert sind.

Die frühen Untersuchungen über den LDL-Rezeptor zeigten ein weiteres Charakteristikum der Rezeptor-vermittelten Endocytose: die Möglichkeit des Rezeptor-„Recycling“^[4,28]. Nach der Internalisierung dissoziiert der Rezeptor-Ligand-Komplex. Wir wissen durch die Arbeiten von Maxfield^[53] sowie Helenius und Mitarbeitern^[54], daß diese Dissoziation durch eine Abnahme des pH-Werts in den Endosomen, einer speziellen Klasse endocytotischer Vesikel, getriggert werden kann (wird weiter unten diskutiert). Nach der Dissoziation gelangen die Rezeptoren wieder an die Zelloberfläche. Die LDL-Rezeptoren brauchen zehn Minuten für den Weg in die Zelle hinein und wieder heraus; diesen Zyklus durchlaufen sie während ihrer zwanzigstündigen Lebensdauer mehrere hundert Mal^[4,28].

Der LDL-Rezeptor:

Eine Struktur, die der Funktion angepaßt ist

Der LDL-Rezeptor ist ein Zelloberflächen-Glycoprotein, das etwa zwei Asparagin-verknüpfte (*N*-verknüpfte) komplizierte Oligosaccharidketten und etwa 18 Serin/Threonin-verknüpfte (*O*-verknüpfte) Oligosaccharidketten enthält^[55,56]. Ungefähr zwei Drittel der *O*-verknüpften Zucker befinden sich in der gleichen Region des Moleküls^[57]. Der LDL-Rezeptor bindet zwei Proteine: 1) Apo B-100, das 387 000-Dalton-Glycoprotein und einzige Protein von LDL^[27], und 2) Apo E, ein 34 000-Dalton-Protein, das in mehreren Kopien in IDL und einer Subklasse von HDL befunden wird^[58,59]. Innerarity und Mahley^[59] wiesen nach, daß Lipoproteine, die mehrere Apo-E-Kopien enthalten, mit bis zu zwanzigfach höherer Affinität an LDL-Rezeptoren binden als LDL, das nur eine Apo-B-Kopie enthält.

Abbildung 6 zeigt das LDL-Rezeptor-Recycling. Der Rezeptor wandert vom Syntheseort zur Stelle der Internalisierung im Coated Pit und dann im Kreisprozeß zwischen Coated Pit und Endosomen. Der Rezeptor wird im Endoplasmatischen Reticulum (ER) als Vorläufermolekül^[60] synthetisiert, welches *N*-verknüpfte Mannose-haltige Kohlenhydratketten und den Kern-Zucker (*N*-Acetylgalactosamin) der *O*-verknüpften Ketten^[56] enthält. Die *O*-verknüpften Kern-Zucker werden eingefügt, bevor die Mannosereste der *N*-verknüpften Ketten abgespalten werden, d.h. während der Rezeptor noch immer Endoglycosidase-Hsensitiv ist. Daher müssen die *O*-verknüpften Zucker entweder im ER oder in der Übergangszone zwischen ER und Golgi-Apparat angebaut werden. Dieser Vorläufer des Rezeptors wandert bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als eine Bande, die einem Molekulargewicht von 120 000 entspricht^[60].

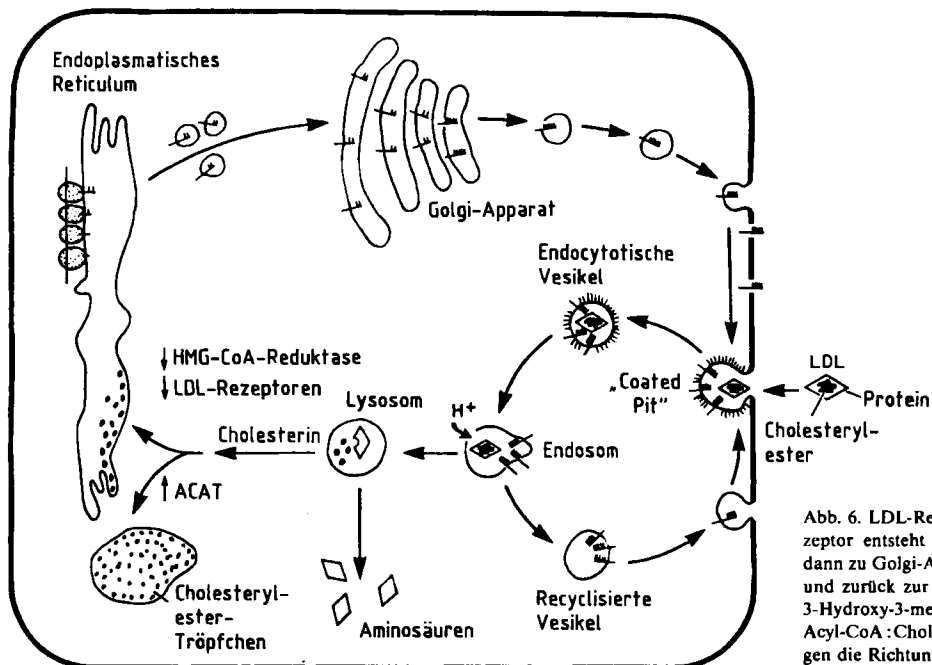


Abb. 6. LDL-Rezeptor-„Recycling“ in Säugerzellen. Der Rezeptor entsteht im Endoplasmatischen Reticulum, wandert dann zu Golgi-Apparat, Zelloberfläche, Coated Pit, Endosom und zurück zur Oberfläche. HMG-CoA-Reduktase bedeutet 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase; ACAT bedeutet Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase. Vertikale Pfeile zeigen die Richtung der regulatorischen Effekte (nach [131]).

Dreißig Minuten nach seiner Synthese läuft der LDL-Rezeptor auf SDS-Gelen langsamer: Das Molekulargewicht steigt von 120 000 auf 160 000^[60]. Diese Änderung fällt mit der Umwandlung der stark Mannose-haltigen *N*-verknüpften Oligosaccharidketten zur komplizierten Endoglycosidase-H-resistenten Form zusammen^[56]. Gleichzeitig wird jede *O*-verknüpfte Kette durch Addition eines Galactoserestes und einer oder zweier Sialinsäurereste verlängert^[56]. Das erklärt aber noch nicht die Zunahme des Molekulargewichtes um 40 000 Dalton. Die Abnahme der elektrophoretischen Beweglichkeit wird hauptsächlich durch eine Konformationsänderung des Proteins verursacht, die aus der Verlängerung der geclusterten *O*-verknüpften Zuckerkette resultiert^[56, 57].

Etwa 45 Minuten nach der Synthese erscheinen LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche, wo sie sich in Coated Pits sammeln. Drei bis fünf Minuten danach stülpen sich die Coated Pits ein und bilden endocytotische Vesikel. Der Clathrin-Mantel dissoziiert sehr schnell ab. Mehrere endocytotische Vesikel verschmelzen zu größeren Gebilden mit irregulärer Form, die Endosomen oder Rezeptosomen genannt werden^[4, 61]. Der pH-Wert der Endosomen fällt durch ATP-getriebene Protonenpumpen in der Membran unter 6,5^[53, 54, 61]. Bei diesem pH-Wert wird LDL vom Rezeptor abgespalten. Der Rezeptor kehrt zur Oberfläche zurück, indem er sich mit anderen Rezeptoren in einem Segment der endosomalen Membran sammelt; dieses wird abgeschnürt und bildet eine recycelte Vesikel. Hat der Rezeptor die Oberfläche erreicht, so bindet er ein neues Lipoprotein und beginnt wieder den Endocytose-Cyclus^[4]. Jeder LDL-Rezeptor durchläuft alle zehn Minuten einen Cyclus, gleichgültig, ob er mit LDL besetzt ist oder nicht^[4, 62]. Das vom Rezeptor abgespaltene LDL gelangt in das Lysosom, wenn die Membranen des Endosoms und des Lysosoms verschmelzen. Dort wird die Proteinkomponente von LDL zu Aminosäuren abgebaut, und die Cholesteryl-ester werden von einer sauren Lipase hydrolysiert, so daß Cholesterin frei wird (oben diskutiert).

Das herausragende Merkmal dieses Stoffwechselweges ist die zielgerichtete Wanderung eines Membran-gebundenen Proteins von einer Organelle zur anderen. Jedesmal muß der Rezeptor von benachbarten Proteinen, die nicht dem gleichen Weg folgen, separiert werden. Das wirft eine entscheidende Frage auf: Welche Signale bewirken die hochselektive Wanderung von Rezeptoren von einer Organelle zur anderen? Das Signal muß in der Struktur der Rezeptoren liegen. Was wissen wir über die Struktur des LDL-Rezeptors?

Der LDL-Rezeptor: Ein Multi-Domänen-Protein

Der LDL-Rezeptor wurde von Wolfgang Schneider in unserem Laboratorium aus Nebennierenrinde gereinigt^[55]. Wir bestimmten eine partielle Aminosäuresequenz, und diese Sequenz nutzten David Russell und Tokuo Yamamoto, um eine vollständige cDNA für den menschlichen LDL-Rezeptor zu isolieren^[37, 63]. Durch biochemische Untersuchungen des Rezeptorproteins zusammen mit der Aminosäuresequenz, die aus der Nucleotidsequenz der cDNA abgeleitet wurde, ließ sich Einblick in die Domänenstruktur des LDL-Rezeptors gewinnen (Abb. 7)^[63–65].

Am äußersten NH₂-Terminus des LDL-Rezeptors befindet sich eine hydrophobe Sequenz von 21 Aminosäuren, die direkt nach der Translation abgespalten wird. Dieses Segment fungiert als klassische Signalsequenz und dirigiert die Rezeptor-synthetisierenden Ribosomen zur ER-Membran. Im reifen Rezeptor ist es aber nicht mehr enthalten; es wird aus der weiter unten beschriebenen strukturellen Domäne entfernt. Der reife Rezeptor (ohne Signalsequenz) besteht aus 839 Aminosäuren^[63].

Die erste Domäne des LDL-Rezeptors umfaßt die 292 NH₂-terminalen Aminosäuren; dabei wird eine Sequenz aus 40 Aminosäuren siebenmal mit Variationen wiederholt^[65, 66]. Untersuchungen der Bindung von anti-Peptid-Antikörpern an intakte Zellen zeigten, daß diese Domäne auf der äußeren Oberfläche der Membran liegt^[67]. Jede der

sieben Sequenzen aus 40 Aminosäuren enthält sechs Cysteinreste, die in jeder Sequenz an der gleichen Stelle vorkommen. Da der Rezeptor ohne vorherige Reduktion nicht mit [^3H]Iodacetamid markiert werden kann, ist zu vermuten, daß alle diese Cysteinreste Disulfidbrücken bilden^[65]. Diese Region des Rezeptors muß daher hochvernetzt und verknäuelte vorliegen. Das erklärt die extreme Stabilität der Bindungsdomäne des Rezeptors; er kann in stark denaturierenden Agentien gekocht werden und behält trotzdem seine Bindungsaktivität, solange die Disulfidbrücken intakt bleiben^[65].

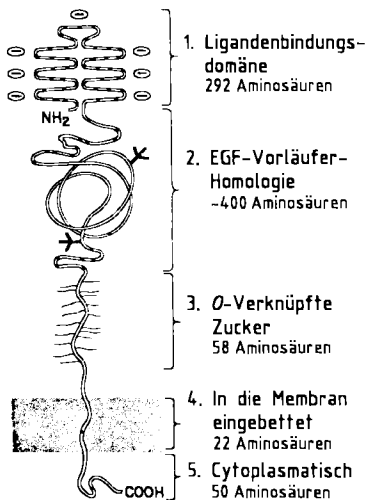


Abb. 7. Der LDL-Rezeptor: Ein einziges Protein mit fünf Domänen. Die Bedeutung der Domänen wird im Text diskutiert.

Eine interessante Eigenschaft jeder Cystein-reichen Wiederholungssequenz ist die Ansammlung von negativ geladenen Aminosäuren in der Nähe des jeweiligen COOH-Terminus^[65,66]. Die Ladungen in diesen Sequenzen sind einer Häufung positiver Reste komplementär, von denen man annimmt, daß sie sich auf einer Seite einer einzigen α -Helix in Apo E befinden, dem bestuntersuchten Liganden des LDL-Rezeptors^[68]. Elegante Untersuchungen von Mahley und Innerarity^[68] mit mutierten und proteolytierten Formen von Apo E und mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Regionen von Apo E zeigten, daß die Stelle für die Bindung dieses Proteins an den LDL-Rezeptor in dieser positiv geladenen Region liegt. Man ist versucht zu spekulieren, daß die negativ geladenen Aminosäuren der Cystein-reichen Wiederholungssequenzen des LDL-Rezeptors multiple Bindungsstellen bilden, von denen jede ein einzelnes Apo-E-Molekül über dessen positiv geladene α -Helix bindet^[65].

Die zweite Domäne des LDL-Rezeptors besteht aus etwa 400 Aminosäuren und ist zu 35% einem Abschnitt der extrazellulären Domäne des Vorläufermoleküls des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) homolog^[63,64,69]. Der EGF-Vorläufer enthält 1217 Aminosäuren und durchzieht – wie der LDL-Rezeptor – einmal die Plasmamembran^[69–72]. Die aus der klonierten cDNA^[70,71] abgeleitete Aminosäuresequenz des EGF-Vorläufers weist darauf hin, daß der EGF, ein Peptid aus 53 Aminosäuren, durch Proteolyse aus dem EGF-Vorläufer freigesetzt wird. Die Sequenz von EGF ist der des LDL-Rezeptors nicht homolog. Die Homologie besteht bei einem Abschnitt des EGF-Vor-

läufers, der auf der NH_2 -terminalen Seite von EGF selbst liegt. Die Funktion dieser Region im LDL-Rezeptor und im EGF-Vorläufer ist unbekannt.

Die dritte Domäne des LDL-Rezeptors befindet sich direkt außerhalb der in die Membran eingebetteten Domäne; es handelt sich um eine Sequenz von 58 Aminosäuren, die 18 Serin- oder Threoninreste enthält^[63,66]. Diese Domäne wird von einem einzigen Exon codiert. Nach Proteolyse-Untersuchungen enthält diese Region gehäuft die O-verknüpften Zuckerketten^[64].

Durch Proteolyse-Experimente wurde gezeigt, daß die vierte Domäne aus einer Sequenz von 22 hydrophoben Aminosäuren besteht, die in die Plasmamembran eingebettet ist. Der Vergleich von Aminosäuresequenzen menschlicher LDL-Rezeptoren mit denen von Rindern zeigte, daß die in die Membran eingebettete Region wenig konserviert ist^[65]. Von den 22 Aminosäuren dieser Region unterscheiden sich 7, aber alle haben hydrophobe Eigenschaften.

Die fünfte Domäne bildet den cytoplasmatischen Teil. LDL-Rezeptoren von Mensch und Rind enthalten beide ein COOH-terminales Segment aus 50 Aminosäuren, das sich in das Cytoplasma erstreckt^[63,64]. Diese Lage der Domäne wurde durch Einsatz von anti-Peptid-Antikörpern gegen die COOH-terminale Sequenz bestimmt^[64]. Wurden „inside-out“-Membranvesikel, die Rezeptoren enthielten, mit Pronase verdaut, so verschwanden die Antikörper-reaktiven Stellen, und das Molekulargewicht des Rezeptors nahm um etwa 5000 Dalton ab. Diese cytoplasmatische Region ist in allen Spezies stark konserviert. Von den 50 Aminosäuren dieser Sequenz unterscheiden sich bei Mensch und Rind nur vier, und diese Variationen sind bezüglich der Ladung konservativ^[65].

Die cytoplasmatische Domäne des LDL-Rezeptors spielt eine wichtige Rolle für das Anhäufen in Coated Pits, entweder durch Wechselwirkung mit Clathrin oder mit einem Protein, das mit Clathrin auf der cytoplasmatischen Seite assoziiert ist^[4]. Dieser Schluß basiert auf der molekularen Analyse von drei natürlich vorkommenden Mutationen am LDL-Rezeptor-Locus, die zwar Rezeptoren entstehen lassen, die LDL normal binden, sich aber nicht in Coated Pits mit Clathrinhülle sammeln. Alle drei Mutationen bewirken Defekte im cytoplasmatischen Teil (unten diskutiert)^[65,73].

Das LDL-Rezeptor-Gen: Ein Mosaik-Gen

Das haploide menschliche Genom enthält eine einzige Kopie des LDL-Rezeptor-Gens^[66] auf Chromosom 19^[74]. Sequenzen, die fast das gesamte Gen umfassen, wurden von Thomas Südhof und David Russell^[66] aus dem Bakteriophagen lambda und aus Cosmid-Genbanken isoliert. Dabei wurde die Position jedes Introns auf dem Gen kartiert und die Sequenz jeder Exon-Intron-Verbindungsstelle bestimmt.

Das LDL-Rezeptor-Gen umfaßt etwa 45 000 Basen und besteht aus 18 Exons und 17 Introns^[66]. Zwischen den Exons des Gens und den funktionellen Domänen des Proteins besteht ein augenfälliger Zusammenhang (Abb. 8). Das erste Intron befindet sich genau am Ende der DNA, die die später abgespaltene Signalsequenz codiert. Die Bindungsdomäne wird von Exon 2 bis 6 codiert. Innerhalb dieser Domäne (mit den sieben Cystein-reichen Wiederho-

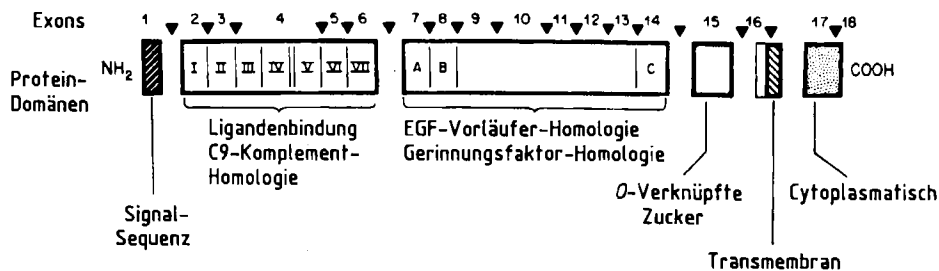


Abb. 8. Korrelation der Exon-Organisation mit den Proteindomänen des menschlichen LDL-Rezeptors. Die Domänen des Proteins sind schwarz umrahmt und im unteren Teil benannt. Den sieben Cystein-reichen, aus 40 Aminosäuren bestehenden Wiederholungssequenzen in der LDL-Bindungsdomäne (Abb. 7) sind römische Ziffern von I bis VII zugeordnet. Die Sequenzen IV und V sind durch acht Aminosäuren getrennt. A, B und C bezeichnen die drei Cystein-reichen Wiederholungssequenzen in der Domäne, die dem EGF-Vorläufer homolog ist. Die Positionen, an denen die Codierungsregion von Introns unterbrochen wird, sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die Nummern der Exons befinden sich zwischen den Pfeilspitzen (nach [66]).

lungssequenzen) befinden sich Introns genau an den Enden der Sequenzen I, II, V, VI und VII (Abb. 8). Die Sequenzen III, IV und V liegen in einem einzigen Exon. Die Bindungsdomäne wird durch ein Intron bei der Aminosäure 292 terminiert, dem letzten Rest der siebenten Wiederholungssequenz. Die Bindungsdomäne besteht demnach aus einem einzigen Exon, das mehrmals dupliziert wurde und von einer einzigen, 40 Aminosäure langen Sequenz zu sieben Wiederholungssequenzen führte. Jede dieser sieben Sequenzen des LDL-Rezeptors ist einem Segment aus 40 Aminosäuren homolog, das in der Mitte der C9-Komponente von Komplement vorkommt, einem Plasmaprotein aus 537 Aminosäuren, das Teil der Komplement-Kaskade ist^[66,75].

Die nächsten acht Exons des LDL-Rezeptors (Exon 7 bis 14) codieren die Region, die dem EGF-Vorläufermolekül homolog ist (Abb. 8). Das Gen für den EGF-Vorläufer enthält die gleichen acht Exons^[69]. Diese Exons bilden einen Block, der aus einem Ur-Gen im Laufe der Evolution herausgenommen und in die Mitte des EGF-Vorläufer-Gens und des LDL-Rezeptor-Gens plazierte wurde. Drei dieser Exons treten auch in einer anderen Gen-Klasse auf. Sie codieren eine Cystein-reiche Sequenz aus 40 Aminosäuren (A, B und C in Abb. 8), die dreimal im LDL-Rezeptor wiederholt wird und einmal in einigen Proteinen des Blutgerinnungssystems einschließlich Faktor IX, Faktor X und Protein C vorkommt^[69,76]. Diese Exons wurden also von mindestens drei Gen-Familien genutzt.

Die Domäne der O-verknüpften Zucker wird von nur einem Exon codiert (Exon 15). Teile der beiden Exons 16 und 17 codieren die in die Membran eingebettete Region, und die cytoplasmatische Domäne wird von den Exons 17 (teilweise) und 18 codiert (Abb. 8).

Der Befund, daß im LDL-Rezeptor-Gen und in anderen Genen die gleichen Exons auftreten, ist eine starke Stütze für *Gilberts* Hypothese über Natur und Funktion von Introns^[77]. Wie ursprünglich von *Gilbert* vorgeschlagen, erlauben es die Introns den funktionellen Domänen, die durch diskrete Exons codiert werden, zwischen verschiedenen Proteinen zu wechseln; dadurch wird eine Evolution der Proteine als mosaikartige Kombination bestehender funktioneller Einheiten möglich. Der LDL-Rezeptor ist ein Beispiel für ein solches Mosaik-Protein^[66,78]. Es ist wahrscheinlich, daß auch andere Rezeptoren der Zelloberfläche mosaikartige Strukturen sind, die von Exons, die auch in anderen Genen vorkommen, codiert werden.

Defekte im LDL-Rezeptor-Gen

Die Mutationen im LDL-Rezeptor-Gen von FH-Patienten ermöglichten die Aufklärung der entscheidenden Schritte bei der Rezeptor-vermittelten Endocytose. Als wir dieses Manuskript schrieben, untersuchten wir die Fibroblasten von 110 Patienten mit dem klinischen Phänotyp der homozygoten FH. Alle haben Defekte im LDL-Rezeptor, aber nicht alle Defekte sind gleich. Nach strukturellen Kriterien können mindestens zehn Mutationen unterschieden werden^[65]. Sie verteilen sich auf vier Klassen, wie Abbildung 9 zeigt. Viele anscheinend FH-Homozygote sind tatsächlich zusammengesetzte Heterozygote, die von jedem Elternteil ein anderes Mutanten-Allel geerbt haben.

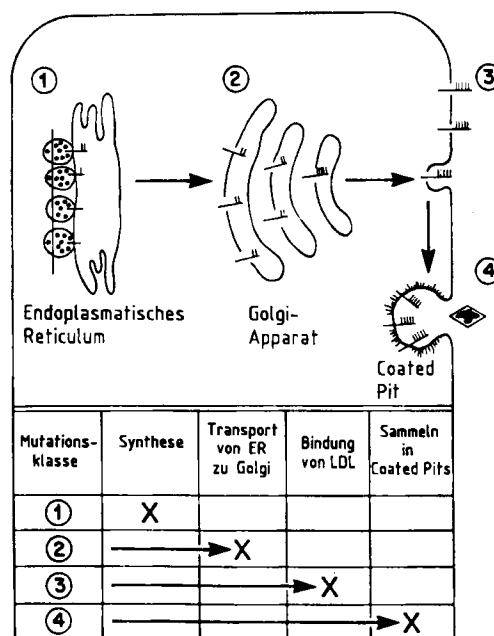


Abb. 9. Vier Klassen von Mutationen, welche Struktur und Funktion des LDL-Rezeptors verändern und FH verursachen. Jede Klasse betrifft eine andere Region des Gens und somit einen anderen Schritt des Prozesses, durch den der Rezeptor synthetisiert, im Golgi-Apparat umgesetzt und zu den Coated Pits transportiert wird. Jede Mutationsklasse kann weiter in verschiedene Mutanten-Allele unterteilt werden, die detailliert in [65] beschrieben werden (nach [132]).

Mutationen der Klasse I:

Es werden keine Rezeptoren synthetisiert

Dies ist die häufigste Klasse von Mutanten-Allelen, zu denen etwa die Hälfte aller bisher untersuchten Mutatio-

nen gehört. Durch polyklonale und monoklonale Antikörper wurde bestimmt, daß diese Gene entweder kein LDL-Rezeptor-Protein oder nur Spuren davon produzieren. Eines dieser Allele wurde molekularbiologisch analysiert; das Gen trägt eine große Deletion, die sich vom Exon 13 zu einem *Alu*-Wiederholungselement im Intron 15 erstreckt^[79]. Diese Deletion kann leicht auf Southern-Blots von Genom-DNA erkannt werden. Wir fanden keine Hinweise auf eine ähnliche Deletion bei anderen Patienten mit Rezeptor-negativem Phänotyp; diese spezielle Deletion muß daher selten sein.

Mutationen der Klasse II: Der Rezeptor wird synthetisiert, aber nur langsam vom ER zum Golgi-Apparat transportiert

Dies ist die zweithäufigste Mutationsklasse. Die Allele produzieren Rezeptoren, die als Vorläufermoleküle mit Molekulargewichten zwischen 100 000 und 135 000 synthetisiert werden. Die meisten haben ein ähnliches Molekulargewicht (120 000) wie der normale Vorläufer. In diesen Rezeptoren kommen Mannose-haltige, *N*-verknüpfte Zucker sowie der Kern-Zucker *N*-Acetylgalactosamin der *O*-verknüpften Zuckerketten vor^[56, 80]. Die *N*-verknüpften Zucker werden jedoch nicht in die komplizierte Endoglycosidase-H-resistente Form überführt, und die *O*-verknüpften Zucker werden nicht elongiert. Die mutierten Rezeptoren gelangen nicht zur Zelloberfläche, sondern scheinen im ER zu bleiben, bis sie abgebaut werden. Einige Mutationen dieser Klasse sind vollständig, das heißt, daß keine weitere Umsetzung der Kohlenhydrate erkennbar ist. Andere sind unvollständig; einige Rezeptoren gelangen in den üblichen Prozeß, wandern aber nur mit einem Zehntel der normalen Geschwindigkeit an die Oberfläche^[80, 81]. Der molekulare Defekt dieser Mutationsklasse wurde noch nicht bestimmt.

Mutationen der Klasse III: Die Rezeptoren werden umgesetzt und erreichen die Zelloberfläche, binden LDL aber nicht normal

In ihrer reifen Form können diese mutierten Rezeptoren ein normales Molekulargewicht von 160000 oder ein ab-

weichendes von 140 000 oder 210 000 haben^[65]. Sie werden alle als Vorläufer synthetisiert, die um 40 000 Dalton kleiner als die reife Form zu sein scheinen. Ihre Kohlenhydrate werden normal umgesetzt, und sie erreichen die Zelloberfläche. Sie binden eine Vielzahl von Antikörpern gegen den LDL-Rezeptor; ihre Fähigkeit, LDL zu binden, ist jedoch deutlich herabgesetzt. Wir vermuten, daß Austausch, Deletion oder Duplikation von Aminosäureresten in der Cystein-reichen LDL-Bindungsdomäne oder der EGF-Vorläufer-Region an diesen Mutationen beteiligt sind; bisher konnte aber keine auf molekularer Ebene aufgeklärt werden.

Mutationen der Klasse IV: Die Rezeptoren erreichen die Zelloberfläche und binden LDL, sammeln sich aber nicht in Coated Pits

Untersuchungen auf zellulärer Ebene über diese Internalisierungs-defekten Mutationen zeigten die Bedeutung der Coated Pits für die Rezeptor-vermittelte Endocytose^[42, 43]. Drei dieser Mutationen wurden auf molekularer Ebene aufgeklärt. Alle zeigten Veränderungen im cytoplasmatischen Teil des Rezeptors, d.h. sie betrafen die 50 Aminosäuren am COOH-Terminus, die sich ins Cytoplasma erstrecken (Abb. 10). Diese Mutationen konnten aufgeklärt werden, indem Gen-Banken hergestellt und anschließend Exon 17 und 18 – sie codieren die cytoplasmatische Domäne – isoliert und sequenziert wurden. Im drastischsten Fall wurde ein Tryptophan-Codon an einer Stelle, die zwei Reste von der in die Membran eingebetteten Region entfernt liegt, in ein Nonsense-Codon (Stop) umgewandelt^[73]. Dadurch entsteht ein Rezeptor mit nur zwei Aminosäuren im cytoplasmatischen Teil. Andere Mutationen wurden durch Duplikation der vier Nucleotide, die dem Codon für die sechste Aminosäure des cytoplasmatischen Teils folgen, verursacht^[73]. Diese Duplikation verändert das Leserahmen und führt zu einer Sequenz von acht Zufallsamino-säuren, denen ein Stop-Codon folgt. Dieser Rezeptor hat nur sechs der normalen Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne. Proteinchemische Untersuchungen bestätigten, daß diesen beiden Proteinen der normale COOH-Terminus fehlt^[73].

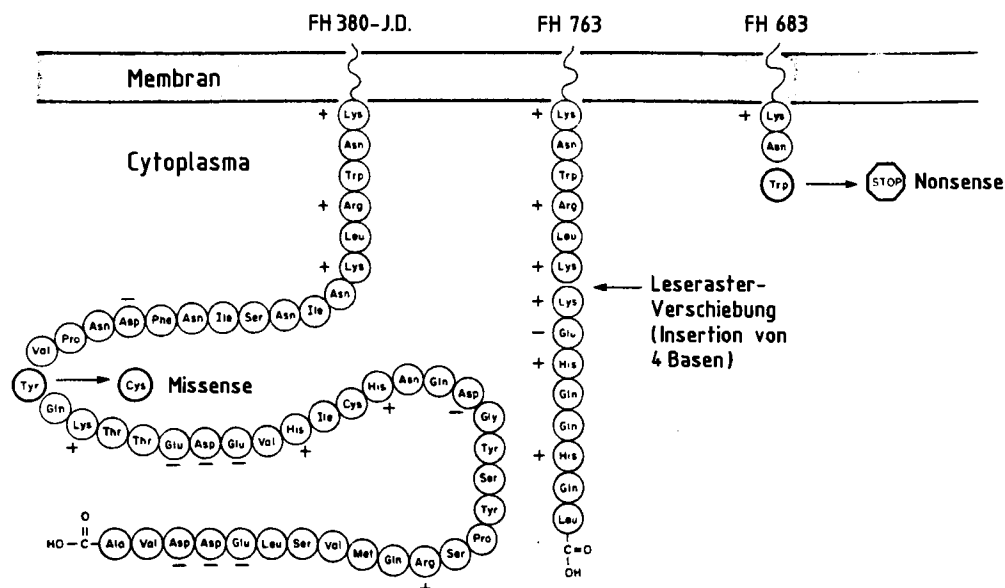


Abb. 10. Mutationen, welche die cytoplasmatische Domäne des LDL-Rezeptors von drei FH-Homozygoten mit der Internalisierungs-defekten Form von FH betreffen.

Die dritte Mutation ist die informativste. Bei diesem Patienten, dem ersten mit Internalisierungsdefekt (J. D., siehe Abb. 3), wurde durch einen einzigen Basenaustausch ein Cystein- durch einen Tyrosinrest in Position 807 ersetzt, also etwa in der Mitte der cytoplasmatischen Domäne (Abb. 10). Kürzlich konnten wir diesen Aminosäureaustausch in normaler cDNA des LDL-Rezeptors durch Oligonucleotid-gesteuerte Mutagenese nachvollziehen. Wurde die veränderte cDNA durch Gentransfermethoden in Ovarienzellen chinesischer Hamster eingeführt, so entstand ein Rezeptor, der zwar LDL binden, sich aber nicht in den Coated Pits sammeln konnte. Dieses Ergebnis bestätigte, daß eine einzige Base für den Internalisierungsdefekt in den Zellen von J. D. maßgeblich war^[82].

Da alle drei Internalisierungs-defekten Mutationen den cytoplasmatischen Teil betreffen, muß diese Region eine entscheidende Rolle beim Sammeln von LDL-Rezeptoren in Coated Pits spielen. Es ist wahrscheinlich, daß der cytoplasmatische Teil an Clathrin oder an ein anderes Protein, das selbst mit Clathrin assoziiert ist, bindet. Etwas ver-

spleißten mRNA verursacht wird. Die Rezeptoren werden an die Oberfläche transportiert, wo einige an die Membran gebunden bleiben. Die weit überwiegende Mehrzahl wird jedoch in das Kulturmedium abgegeben (^[83] und unveröffentlichte Beobachtungen). Die wenigen Rezeptoren, die an der Oberfläche bleiben, binden LDL, sammeln sich aber nicht in Coated Pits und gehören somit zum Internalisierungs-defekten Phänotyp. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der in die Membran eingebetteten Region für die Verankerung des LDL-Rezeptors in der Plasmamembran.

Abbildung 11 zeigt die Lage von neun Mutationen des LDL-Rezeptor-Gens, die auf molekularer Ebene analysiert wurden. Jede bisher untersuchte FH-Familie hatte eine andere Mutation; es kamen auch multiple Typen von Mutationseignissen vor. Zwei von neun Mutationen bestanden aus dem Austausch einer einzigen Base, zwei andere beruhten auf Insertionen (eine kleine und eine große), und fünf Mutationen wurden durch große Deletionen verursacht. Viele Deletionen traten in repetitiven *Alu*-Elementen auf.

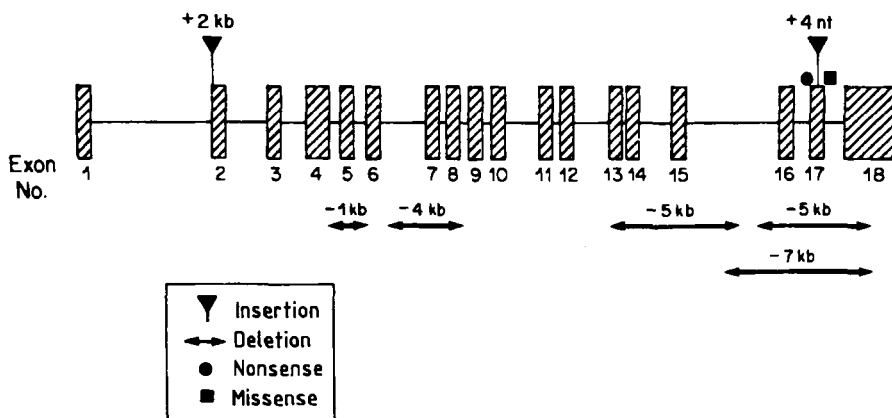


Abb. 11. Mutationsorte im LDL-Rezeptor-Gen. Bis heute wurden neun Mutationen durch Klonierung und DNA-Sequenz-Analyse oder durch Restriktionsendonuclease-Analyse von genomischer DNA identifiziert. Fünf der neun Mutationen sind genau in [73, 79, 82, 83] beschrieben. kb bedeutet Kilobasen; nt bedeutet Nucleotide.

wirrend ist momentan, daß andere Zelloberflächenrezeptoren, die sich ebenfalls in Coated Pits sammeln, keine offensichtliche Homologie der Aminosäuresequenzen ihrer cytoplasmatischen Regionen mit denen des LDL-Rezeptors aufweisen^[65]. Welche Strukturen die Anhäufung von Rezeptoren in Coated Pits verursachen, bleibt also ein Geheimnis.

Wir konnten mehrere interessante Varianten von Mutationen der Klasse IV identifizieren, bei denen die Mutantengene LDL-Rezeptoren produzieren, die in das Kulturmedium abgegeben werden. Bei zwei Mutanten dieser Klasse (beide aus nichtverwandten Familien) besteht die Mutation aus einer großen Deletion. Sie resultiert aus einer Rekombination zwischen zwei repetitiven *Alu*-Sequenzen, der einen in Intron 15 und der anderen in der 3'-nicht-translatierten Region von Exon 18. Die Deletionen in beiden Mutanten sind ähnlich, aber nicht gleich, was darauf hinweist, daß beide Mutationen durch unabhängige Ereignisse entstanden sind (^[83] und unveröffentlichte Beobachtungen). Bei beiden Mutationen gehen die Exons verloren, welche die in die Membran eingebettete Region codieren. Wahrscheinlich verfügen diese vorzeitig terminierten Proteine über eine kurze Zufalls-Aminosäuresequenz am COOH-Terminus, die von einem „Durchlesen“ einer unge-

Die Funktionen des LDL-Rezeptors im Körper

Die Funktion des LDL-Rezeptors konnte auf eine Weise aufgeklärt werden, die dem normalen Vorgehen bei der Untersuchung von Stoffwechselwegen in Tieren gerade entgegengesetzt ist. Diese Wege werden gewöhnlich am intakten Tier oder an Geweben studiert und dann später in isolierten Zellen untersucht. Der LDL-Rezeptor wurde zuerst in einer völlig künstlichen Umgebung beobachtet, das heißt in Gewebekultur. Sofort erhob sich die Frage: Welche Gewebe exprimieren LDL-Rezeptoren im Körper, und wie arbeiten sie? Wir wußten zu Beginn unserer Untersuchungen, daß der Rezeptor eine Rolle im Körper spielt, da die Auswirkungen eines LDL-Rezeptor-Mangels in FH-Homozygoten verheerend und in FH-Heterozygoten entsprechend weniger stark ausgeprägt waren. Natürlich muß der Rezeptor irgendwo eine Funktion haben. Aber wo?

Detektion der Expression von LDL-Rezeptoren in vivo

Die ersten Zellen, bei denen LDL-Rezeptor-Aktivität in vivo festgestellt werden konnte, waren im Blut zirkulierende Lymphocyten. In den ersten Versuchen, die 1975 mit Y. K. Ho durchgeführt wurden, isolierten wir Lymphocy-

ten aus der Blutbahn und inkubierten sie 67 Stunden in vitro in Abwesenheit von exogenem Cholesterin, um die Rezeptor-Synthese zu „dereprimieren“^[84]. Unter diesen Bedingungen exprimierten die Lymphocyten überschüssige LDL-Rezeptoren, wie durch Bestimmung der Hochaffinitäts-Aufnahme von ^{125}I -LDL gefunden wurde (Abb. 12A). Lymphocyten von FH-Homozygoten exprimierten keine meßbare LDL-Rezeptor-Aktivität, Lymphocyten von FH-Heterozygoten zeigten eine mittlere Aktivität. Dieses Ergebnis ist mit der Anwesenheit nur eines funktionellen Gens in Einklang^[85]. LDL-Rezeptoren waren auch in Lymphocyten direkt nach deren Isolierung aus dem Blut nachweisbar, obwohl die Aktivität niedriger als nach 67stündiger Derepression lag^[85]. LDL-Rezeptoren wurden also von mindestens einem Zelltyp in vivo exprimiert.

Ein anderer früher Hinweis auf die Funktion von LDL-Rezeptoren in vivo kam aus Untersuchungen über die Geschwindigkeit, mit der intravenös injiziertes ^{125}I -LDL aus dem Plasma verschwindet (Abb. 12B). Dieses LDL wird bei FH-Heterozygoten viel langsamer als bei gesunden Kontrollpersonen aus dem Kreislauf entfernt^[86,87]. Bei FH-Homozygoten ist dieser Effekt noch ausgeprägter^[87-89]. Die Schwerfälligkeit des LDL-Katabolismus in vivo korreliert mit dem Mangel an LDL-Rezeptoren, wie er in isolierten Lymphocyten bestimmt wurde.

In Tierexperimenten konnte die Funktion des LDL-Rezeptors in vivo detaillierter gezeigt werden. Zusammen mit Sandip K. Basu arbeiteten wir ein Assay zur Bestimmung der Bindung von ^{125}I -LDL an Membranen homogenisierter Kulturzellen und verschiedenen Geweben der Kuh und anderer Tiere aus^[90]. Durch dieses Assay fand Petri Kovanen, daß die meisten Gewebe der Kuh ^{125}I -LDL mit beträchtlicher Affinität binden; Nebenniere und Corpus luteum der Ovarien hatten die höchste Aktivität pro Gramm^[91]. Auf das Organgewicht bezogen produzierte die Leber die weitaus meisten LDL-Rezeptoren. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Untersuchungen von fötalem Ge-

webe des Menschen erzielt^[91]. In Zusammenarbeit mit Havel's Laboratorium zeigten wir, daß ^{125}I -LDL von perfundierter Rattenleber durch einen Rezeptor-vermittelten Vorgang mit hoher Affinität aufgenommen wurde, der durch Gabe von 17α -Ethinylostradiol erheblich beschleunigt werden konnte^[92].

In der Leber konnte ein hoher Gehalt an LDL-Rezeptoren auch dann festgestellt werden, wenn markiertes LDL in die Blutbahn von Versuchstieren injiziert und die Aufnahme in verschiedene Gewebe verglichen wurde. Steinberg und Mitarbeiter^[93] sowie Dietschy und Mitarbeiter^[94] zeigten, daß etwa 70% der Aufnahme von markiertem LDL in den Körper durch einen LDL-Rezeptor-abhängigen Mechanismus in der Leber stattfand, daß aber – bezogen auf das Gewicht – die Aufnahme in der Nebenniere am höchsten war. Auch andere Gewebe zeigten eine Rezeptor-vermittelte Aufnahme von LDL; sie lag über der von nicht-spezifischen Markern wie etwa markiertem Albumin.

Die Bestimmung von Rezeptor-vermittelter LDL-Aufnahme in Tiergewebe wurde durch zwei Fortschritte erleichtert: 1) Steinberg und Mitarbeiter entwickelten eine Methode zur Markierung von LDL mit radioaktiver Saccharose und später mit Tyramin-cellobiose^[95]. Die letztere Methode lieferte – im Gegensatz zur ^{125}I -LDL-Markierung von Tyrosinresten – einen radioaktiven Marker, der nach Aufnahme und Abbau in den Lysosomen eingeschlossen blieb und es so ermöglichte, geringe Aufnahmegeschwindigkeiten über längere Zeit kumulativ zu quantifizieren; 2) Shepherd und Packard^[96] zeigten, daß LDL, dessen Argininreste durch Reaktion mit Cyclohexandion modifiziert worden waren, viel langsamer als natives LDL aus dem menschlichen Blutstrom verschwindet. Schon davor hatten Arbeiten aus unserem Laboratorium^[97] und aus dem Laboratorium von Mahley^[98] gezeigt, daß die Modifizierung von Arginin- oder Lysinresten in LDL die Bindung an den LDL-Rezeptor verhindern. Diese Beobachtungen führten zu einer groben Schätzung des Anteils an der LDL-

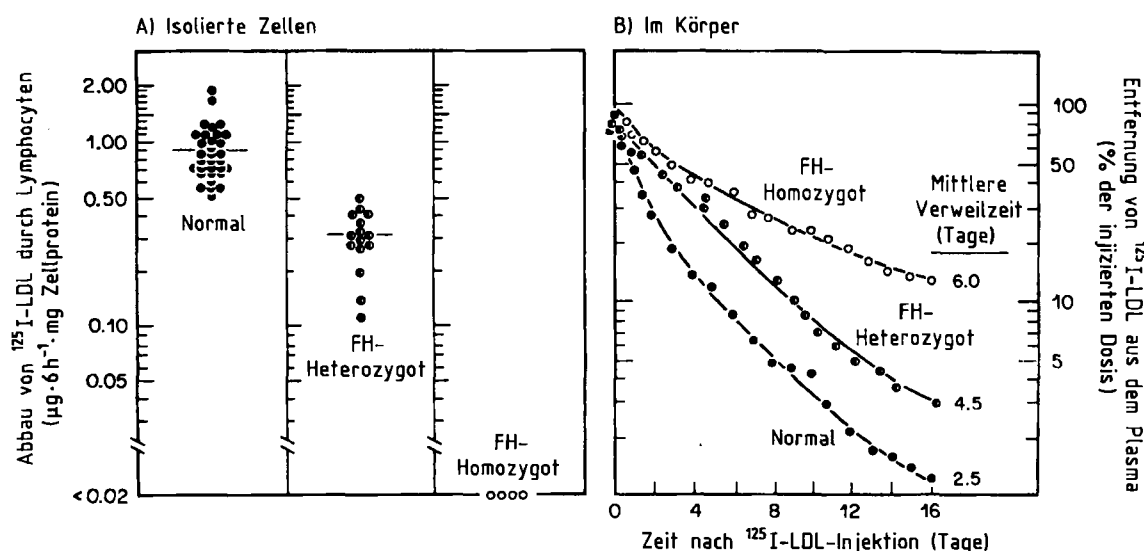


Abb. 12. Bestimmung der Zahl der LDL-Rezeptoren A) in Lymphocyten des Blutes und B) in lebenden Personen. A) Lymphocyten wurden aus dem venösen Blut von 32 gesunden Kontrollpersonen (●), 15 FH-Heterozygoten (◐) und 4 FH-Homozygoten (○) isoliert. Nach 67 h Inkubation bei 36°C in einem Medium mit 10% Lipoprotein-freiem Serum wurde die LDL-Rezeptor-Aktivität durch Bestimmung des Abbaus von ^{125}I -LDL bei 37°C gemessen (Daten aus [85]). B) Für das Ganzkörper-Assay wurden Spuren ^{125}I -LDL intravenös injiziert; die im Kreislauf verbleibende Aktivität wurde während der nächsten 16 Tage in Proben von venösem Blut gemessen [87, 89]. Je größer die Anzahl der LDL-Rezeptoren in den Körperzellen war (vgl. A), desto schneller wurde ^{125}I -LDL aus dem Blut entfernt.

Clearance, der auf LDL-Rezeptoren zurückgeführt werden kann.

Schon früher hatten wir den Rezeptor-abhängigen Anteil an der gesamten LDL-Clearance durch Vergleich der Abbaugeschwindigkeit von intravenös injiziertem ^{125}I -LDL in gesunden und FH-homozygoten Individuen geschätzt^[99]. Der Anteil des gesamten LDL-Pools im Plasma, der pro Zeiteinheit entfernt wurde, war in gesunden Kontrollpersonen dreimal höher als in FH-Homozygoten^[47]. Aus dieser Beobachtung schlossen wir, daß etwa zwei Drittel der LDL-Clearance vom LDL-Rezeptor vermittelt werden^[99]. Untersuchungen über die Abbaugeschwindigkeit von nativem und Lysin- oder Arginin-modifiziertem LDL in gesunden Menschen und in Versuchstieren vielerlei Arten trugen zu diesem Schluß bei^[100].

Das WHHL-Kaninchen und die Rolle des LDL-Rezeptors für die IDL-Clearance

Eine der wichtigsten Funktionen von LDL-Rezeptoren in vivo wurde erst in den letzten Jahren durch Untersuchungen an WHHL-Kaninchen („Watanabe heritable-hyperlipidemic rabbits“) aufgeklärt. *Yosio Watanabe*, ein Tierarzt in Kobe, Japan, entdeckte diesen Mutantenstamm Ende der siebziger Jahre^[101]. Diese Kaninchen tragen eine Mutation im LDL-Rezeptor-Gen, die den Mutationen der Klasse II bei menschlicher FH ähnelt^[81, 102]. Als homozygote Form führt diese Mutation zu extrem hohen LDL-Cholesterin-Werten; die Kaninchen entwickeln schon früh eine Arteriosklerose^[101, 102].

Die WHHL-Kaninchen leisteten bei der Aufklärung eines verwirrenden Merkmals der homozygoten FH unschätzbare Dienste. Kinetische Untersuchungen des ^{125}I -LDL-Metabolismus durch *Myant* und Mitarbeiter^[88] sowie *Bilheimer* und *Grundy*^[87, 89] zeigten, daß FH-Patienten einen zweifachen Defekt aufweisen. Zusätzlich zum langsamen Abbau von LDL schienen FH-Homozygote und -Heterozygote auch an einer Überproduktion von LDL zu leiden. Wie kann ein genetischer Defekt im LDL-Rezeptor gleichzeitig zu Überproduktion und verlangsamtem Abbau von LDL führen? Die Antwort liegt im komplizierten Biosyntheseweg von LDL.

Untersuchungen von *Gitlin*^[103] und später von *Bilheimer*, *Levy* und *Eisenberg*^[104] ließen vermuten, daß LDL nicht direkt von der Leber sekretiert wird, sondern in der Blutbahn aus einem blut-eigenen Vorläufer, dem Lipoprotein mit sehr niedriger Dichte (VLDL), entsteht (Abb. 13A). VLDL ist ein großes, Triglycerid-reiches Lipoprotein, das von der Leber abgegeben wird; es transportiert Triglyceride zu den Fettgeweben und Muskeln. Die Triglyceride von VLDL werden in den Kapillaren durch das Enzym Lipoprotein-Lipase entfernt, und VLDL kehrt als kleinere Partikel mit dem neuen Namen Lipoprotein mit mittlerer Dichte (IDL) in den Blutstrom zurück. Die IDL-Partikel haben die meisten ihrer Triglyceride abgegeben, ihre Cholesterylester aber behalten. Manche IDL-Partikel werden schnell von der Leber aufgenommen, manche bleiben in der Blutbahn, wo ihre Triglyceride weiter hydrolysiert werden und LDL entsteht. Eine ungewöhnliche Eigenschaft von IDL-Partikeln ist das Vorkommen mehrerer Apo-E-Kopien zusätzlich zu einer einzigen Kopie von Apo B-100.

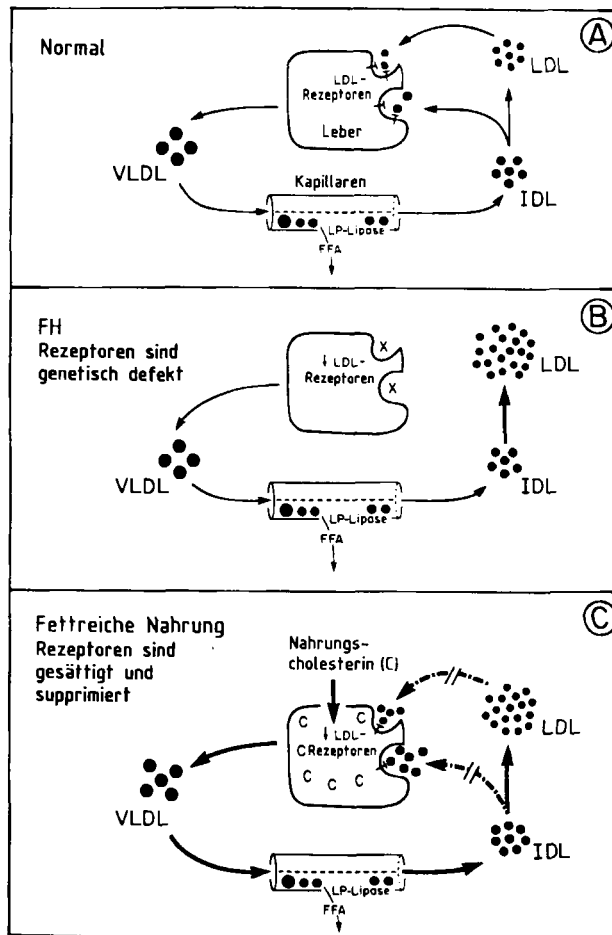


Abb. 13. Schematisches Modell des Mechanismus, durch den LDL-Rezeptoren in der Leber die Produktion und den Katabolismus von Plasma-LDL A) in gesunden Menschen, B) in FH-Patienten und C) in Personen, deren Nahrung reich an gesättigten Fettsäuren und Cholesterin ist, kontrollieren. VLDL bezeichnet das Lipoprotein mit sehr geringer Dichte, IDL das Lipoprotein mit mittlerer Dichte (nach [132]).

Die Apo-E-Kopien ermöglichen es dem IDL, mit sehr hoher Affinität an LDL-Rezeptoren zu binden. Bei der Umwandlung von IDL zu LDL verläßt Apo E die Partikel, und nur Apo B-100 bleibt zurück. Danach ist die Affinität für den LDL-Rezeptor stark herabgesetzt^[102].

Zusammen mit *Toru Kita* zeigten wir, daß die Überproduktion von LDL in WHHL-Kaninchen darauf beruht, daß IDL nicht aus dem Plasma entfernt wird^[102, 105] (Abb. 13B). Bei Gabe von ^{125}I -VLDL an WHHL-Kaninchen wird das entstehende IDL nicht wie bei gesunden Tieren von der Leber aufgenommen^[105]. Diese Befunde lassen vermuten, daß IDL normalerweise durch Bindung an die LDL-Rezeptoren in der Leber aus dem Plasma entfernt wird. Wenn auch ähnlich detaillierte Experimente nicht am Menschen durchgeführt werden können, sind die Beobachtungen von *Soutar*, *Myant* und *Thompson*^[106] doch mit der Annahme vereinbar, daß eine verstärkte Umwandlung von IDL zu LDL auch in FH-Homozygoten stattfindet und so zu einer scheinbaren Überproduktion von LDL führt.

Abbildung 13A zeigt die Doppelrolle des LDL-Rezeptors im LDL-Metabolismus, die durch Untersuchungen an WHHL-Kaninchen aufgeklärt wurde. Erstens limitiert der Rezeptor die LDL-Überproduktion, indem er vermehrt den Vorläufer IDL aus der Blutbahn entfernt. Zweitens

verstärkt er den LDL-Abbau, indem er die zelluläre Aufnahme von LDL vermittelt. Ein Mangel an LDL-Rezeptoren führt zu LDL-Akkumulation als Ergebnis sowohl von Überproduktion als auch von verzögerter Entfernung aus dem Blut (Abb. 13B). Durch diese doppelte Funktion werden die LDL-Rezeptoren zu entscheidenden Modulatoren des LDL-Spiegels im Plasma von Mensch und Tier.

Perspektiven

Rezeptor-Regulation: Implikationen für eine Therapie

Die Kenntnis der fundamentalen Eigenschaften des LDL-Rezeptors birgt wichtige Implikationen für die Therapie von FH und anderen hypercholesterinämischen Krankheiten. Dieses Wissen ermöglicht es auch, über die Bedeutung des LDL-Rezeptors als Schutzfaktor gegen Arteriosklerose des Menschen zu spekulieren.

Die therapeutischen Implikationen zielen auf eine erhöhte Produktion von LDL-Rezeptoren in der Leber und dadurch eine Senkung der LDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma. In FH-Heterozygoten kann dieses Ziel durch eine Stimulierung des normalen Gens erreicht werden, so daß es mehr LDL-Rezeptoren als gewöhnlich produziert und dadurch das defekte Allel kompensiert^[107]. Untersuchungen an Kulturfibroblasten zeigten, daß die Produktion von LDL-Rezeptoren vom Cholesterinbedarf der Zellen gesteuert wird^[9,36]. Ist der Cholesterinbedarf hoch, so enthalten die Zellen hohe Konzentrationen der mRNA für den LDL-Rezeptor. Ist der Bedarf gering, so akkumuliert sich überschüssiges Cholesterin in den Zellen, und die Konzentration der mRNA sinkt^[36,37].

Da hauptsächlich in der Leber LDL-Rezeptoren exprimiert werden, läßt sich das Therapieproblem auf die Entwicklung von Methoden zur Erhöhung des Bedarfs der Leber an Cholesterin zurückführen. Dies kann durch zwei Techniken erreicht werden: 1) Inhibierung der Reabsorption von Gallensäuren im Darm und 2) Inhibierung der Cholesterin-Synthese. Wie Abbildung 14 zeigt, können diese Methoden getrennt oder kombiniert angewendet werden.

Die Leber braucht Cholesterin zur Bildung von Gallensäuren; auf diesem Weg verläßt Cholesterin hauptsächlich den Körper^[18]. Es wird aber nur ein kleiner Teil der von der Leber sekretierten Gallensäuren auch wirklich ausgeschieden. Die Hauptmenge der Gallensäuren wird im ter-

minimalen Ileum reabsorbiert und kehrt zur weiteren Verwendung in die Leber zurück. Die Leber wandelt also nur einen kleinen Teil des Cholesterins in Gallensäuren um (Abb. 14, links). Der Cholesterin-Bedarf der Leber kann durch Gabe von Polymeren verstärkt werden, welche die Gallensäuren im Darm binden und ihre Reabsorption verhindern. Da die Leber nun keine Gallensäuren zur Wiederverwendung bekommt, muß sie ständig neue bilden, und ihr Bedarf an Cholesterin steigt. Um Cholesterin zu beschaffen, reagiert die Leber doppelt: 1) Sie synthetisiert mehr Cholesterin durch vermehrte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und 2) sie versucht, mehr Plasma-Cholesterin aufzunehmen, indem sie mehr LDL-Rezeptoren produziert. Die vermehrte LDL-Rezeptor-Aktivität führt zu einer Senkung der LDL-Konzentration im Plasma (Abb. 14, Mitte). Die Wirkung der Gallensäure-Polymer-Therapie (und der physiologisch äquivalenten Ileus-Bypass-Chirurgie) ist jedoch nicht durchschlagend. Die Zunahme der Cholesterin-Produktion macht den Bedarf der Leber an Cholesterin teilweise wieder wett, so daß nur 15 bis 20% mehr LDL-Rezeptoren synthetisiert werden und nur 15 bis 20% weniger LDL-Cholesterin im Plasma vorliegt.

Die zweite Methode zur Erhöhung der LDL-Rezeptor-Produktion – die Inhibierung der Cholesterin-Synthese – ist bedeutend effektiver. Diese Methode basiert auf der Entdeckung einer Klasse von Pilzmetaboliten im Jahre 1976, welche die HMG-CoA-Reduktase inhibieren. Die erste Verbindung dieser Klasse, die *Akira Endo* von der Sankyo Drug Company in Japan entdeckte, bekam den Namen Compactin^[108]. Eine neuere Verbindung wurde in den Merck, Sharp and Dohme Laboratories in den USA entwickelt und heißt Mevinolin^[109]. Diese beiden Verbindungen sind potente kompetitive Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase; die Inhibitionskonstante liegt bei etwa 10^{-9} M^[108].

Wird Compactin oder Mevinolin im Tierexperiment gegeben, so inhibieren sie zunächst die Synthese von Cholesterin in der Leber; dies setzt einen komplizierten regulatorischen Mechanismus in Tätigkeit, durch den der Spiegel des LDL-Cholesterins im Plasma gesenkt wird. Zusammen mit *Kovanen* und *Kita* zeigten wir, daß durch die Inhibition der Cholesterin-Synthese ein zweifacher kompensatorischer Mechanismus hervorgerufen wird: 1) Die Hepatocyten synthetisieren vermehrt HMG-CoA-Reduktase, und 2) sie synthetisieren mehr LDL-Rezeptoren^[110]. Ist ein neues Gleichgewicht erreicht, so gleicht der Anstieg der HMG-CoA-Reduktase fast den inhibitorischen Effekt von Compactin aus. Die Cholesterin-Synthese des gesamten Körpers ist nur leicht verringert^[111]. Inzwischen ist der LDL-Spiegel im Plasma als Antwort auf die Vermehrung der LDL-Rezeptoren gesunken. Das Sinken des LDL-Spiegels im Plasma wird durch eine Vermehrung der LDL-Rezeptoren ausgeglichen, und so bleibt die absolute Cholesterinmenge, die in die Leber über den Rezeptorweg eintritt, genauso hoch wie früher^[107]. Der Unterschied zu früher besteht darin, daß die Zulieferung nun bei einem niedrigeren Plasma-LDL-Spiegel stattfindet^[107].

Wird Mevinolin allein an FH-Heterozygote gegeben, so senkt es die Konzentration an Plasma-LDL um 30%. Wird Mevinolin zusammen mit dem Polymer Cholestyramin gegeben, so blockiert es die kompensatorische Steigerung der Cholesterin-Synthese, und die Zahl der LDL-Rezeptoren

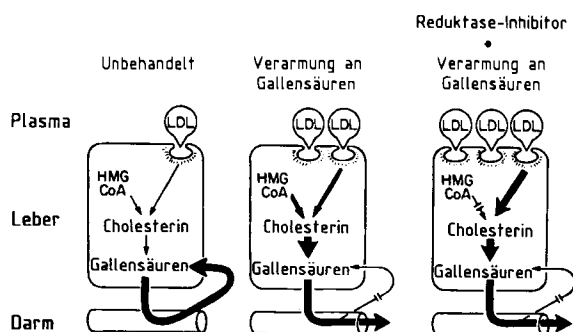


Abb. 14. Prinzip der Verwendung eines Gallensäure-bindenden Polymers und eines Inhibitors der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase zur Behandlung von FH-Heterozygoten. Eine genaue Diskussion dieser Abbildung ist im Text nachzulesen.

wird noch wirkungsvoller vermehrt (Abb. 14, rechts). Die Konzentration an Plasma-LDL fällt um 50 bis 60%^[112].

Als wichtiges Prinzip zeigte sich bei diesen Untersuchungen, daß die Stimulation der LDL-Rezeptor-Aktivität die Konzentration des LDL-Cholesterins im Plasma senkt, ohne die Cholesterinzulieferung sehr zu stören^[107,111]. Zur Zeit werden Mevinolin und verwandte Verbindungen klinisch getestet. Ihre Wirksamkeit für die Senkung der LDL-Cholesterin-Konzentration des Plasmas ist gesichert, doch weiß man noch nichts über die Langzeit-Toxizität für den Menschen. Falls sich diese Medikamente als nicht toxisch erweisen, werden sie eine wichtige Rolle bei der Therapie von FH-Heterozygoten und wahrscheinlich auch von anderen hypercholesterinämischen Patienten spielen.

Diese Behandlung von FH-Heterozygoten kann leider nicht auf Homozygote übertragen werden, besonders nicht auf jene, die total defekte LDL-Rezeptor-Gene haben. Diese Patienten sprechen nicht auf die oben genannten Medikamente an, da sie keine LDL-Rezeptoren synthetisieren können^[113]. Gegenwärtig beschränkt sich die Therapie dieser Patienten auf die extrakorporale Entfernung von LDL aus dem Plasma durch wiederholte Plasmapherese^[114]. Diese Prozedur muß alle zwei bis drei Wochen wiederholt werden, ist technisch schwierig und für Arzt und Patient sehr belastend.

Vor kurzem wurde eine direktere Therapie an der FH-Homozygoten S. J. vorgenommen, die zwei Mutantengene am LDL-Rezeptor-Locus aufweist. Es handelt sich um eine sechsjährige Patientin unseres Kollegen *David Bilheimer* in Dallas, die eine Plasma-Cholesterin-Konzentration von über 1000 mg/dL (mehr als sechsfach über den normalen Werten) hatte und wiederholte Herzinfarkte erlitt. Nachdem sie auf zwei Bypass-Operationen und Mitralklappenersatz nicht ansprach, wurde eine kombinierte Herz-Leber-Transplantation durch ein Chirurgenteam unter der Leitung von *Thomas E. Starzl* an der University of Pittsburgh vorgenommen^[115]. Das Leber-Transplantat sollte die Quelle für LDL-Rezeptoren bilden. Die Herztransplantation war notwendig, da ihr eigenes Herz durch den arteriosklerotischen Prozeß in einem schlechten Zustand war.

Sofort nach der Operation sank die Plasma-Cholesterin-Konzentration von 1100 mg/dL auf 200–300 mg/dL und blieb in den folgenden dreizehn Monaten in diesem Bereich (Abb. 15A). Danach gab man ihr den HMG-CoA-

Reduktase-Inhibitor Mevinolin, und ihr Cholesterin-Wert fiel weiter auf 150–200 mg/dL (Abb. 15A). Die Leber-Transplantation senkte nicht nur den Plasma-Cholesterin-Wert, sondern stellte auch die Ansprechbarkeit auf Mevinolin her, die von einem normalen LDL-Rezeptor-Gen abhängig ist. Untersuchungen des Lipoprotein-Umsatzes sechs Monate nach der Operation bestätigten, daß die neuen LDL-Rezeptoren der transplantierten Leber die drastische Senkung des Plasma-Cholesterin-Wertes hervorgerufen hatten (Abb. 15B). S. J. ist zur Zeit symptomfrei; ihre Xanthome haben sich aufgelöst. Sie braucht jedoch ständig Cyclosporin, um ein Abstoßen der transplantierten Organe zu verhindern, und ihre Zukunftsaussichten sind ungewiß.

Die Wirkung der Leber-Transplantation bei S. J. unterstreicht die Bedeutung der Leber-LDL-Rezeptoren in vivo und läßt es möglich erscheinen, daß andere FH-Homozygote in ähnlicher Weise auf Transplantationen reagieren. Man hofft, daß in einigen Fällen eine Leber-Transplantation vorgenommen werden kann, bevor eine Herz-Transplantation notwendig wird.

Spekulationen: LDL-Rezeptoren und das allgemeine Problem der Arteriosklerose

Wir verlassen jetzt die Welt der wissenschaftlich gesicherten Fakten und begeben uns in das Reich der kontroversen Spekulationen über die Beziehung zwischen Cholesterin-Konzentration, LDL-Rezeptoren und Arteriosklerose in der breiten Bevölkerung. Immerhin bilden FH-Heterozygote nur 5% der Herzinfarktpatienten im Alter unter 60 Jahren. Aber was verursacht die anderen 95% der Herzinfarkte?

Epidemiologische Untersuchungen der Bevölkerungen vieler Länder während der letzten drei Jahrzehnte deuteten auf einen allgemeinen Zusammenhang zwischen hohen Cholesterin-Konzentrationen des Blutes und Herzinfarkten hin. Eines der interessantesten Beispiele ist die Sieben-Länder-Studie über Erkrankungen der Koronararterien unter der Leitung von *Ansel Keys*^[116]. Eine ähnliche Korrelation innerhalb einer einzigen Population wurde bei ausgedehnten Untersuchungen in Framingham, Massachusetts, festgestellt^[117].

Alle diese Untersuchungen haben gezeigt, daß die Häufigkeit von Herzinfarkten proportional mit dem Plasma-

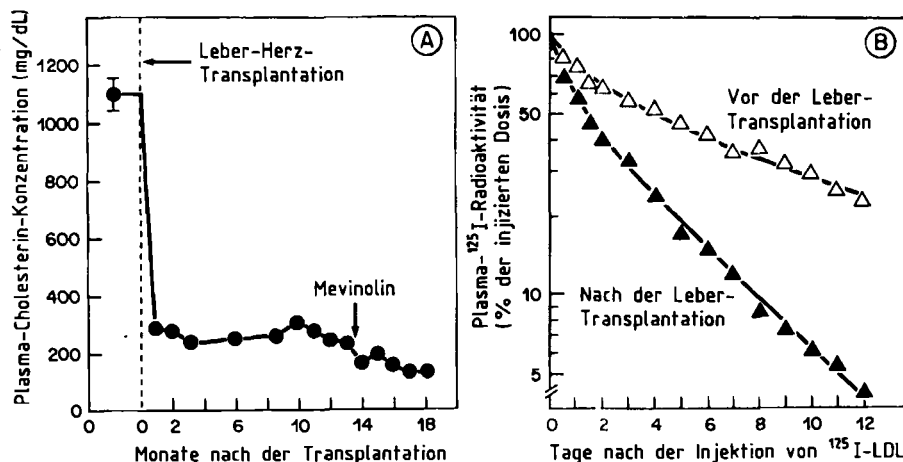


Abb. 15. LDL-Metabolismus von S. J., einer Patientin mit homozygoter FH vor und nach der Herz-Leber-Transplantation. A) Plasma-Cholesterin-Konzentration. B) Abbau von ¹²⁵I-LDL im Plasma nach intravenöser Injektion von Spuren ¹²⁵I-LDL vor (Δ) und nach (▲) der Herz-Leber-Transplantation (Daten in B nach [115]).

Cholesterin-Wert, oder genauer mit der LDL-Cholesterin-Konzentration des Plasmas, steigt. Liegen die LDL-Cholesterin-Werte unter 100 mg/dL (das entspricht einer Plasma-Cholesterin-Konzentration von insgesamt etwa 170 mg/dL), so kommen Herzinfarkte selten vor. Steigen die LDL-Cholesterin-Werte über 200 mg/dL (Plasma-Cholesterin insgesamt etwa 280 mg/dL), so sind Herzinfarkte häufig. Kontroverse Meinungen bestehen über die Zwischenwerte, das heißt Individuen mit einer Konzentration des Plasma-LDL-Cholesterins zwischen 100 und 200 mg/dL (Plasma-Cholesterin insgesamt 170–280 mg/dL). In diesem Bereich kommen die meisten Herzinfarkte vor. Irgendwo in diesem Bereich der Cholesterin-Konzentration liegt eine Schwelle, bei der die Häufigkeit von Herzinfarkten steigt. Wieviele Herzinfarkte in diesem Zwischenbereich können dem Plasma-Cholesterin zugeschrieben werden? Es gibt keine definitive Antwort auf diese Frage. Zusätzlich zum Cholesterin sind Menschen dieser Gruppe durch Rauchen, Bluthochdruck, Streß, Diabetes mellitus und weitgehend unverstandene genetische Faktoren belastet. Trotzdem kann vorgeschlagen werden, daß in dieser Gruppe ein Zusammenhang zwischen Plasma-Cholesterin und Herzinfarkten besteht und daß die Häufigkeit von Herzinfarkten abnehmen würde, wenn die Plasma-Cholesterin-Konzentration gesenkt werden könnte^[10].

Die Befunde über den LDL-Rezeptor stützen die Vermutung der Epidemiologen, daß die in der westlichen Industriegesellschaft beobachteten Plasma-Cholesterin-Werte unverhältnismäßig hoch liegen^[9]. Speziell als Stütze dient die Kenntnis der Affinität des LDL-Rezeptors für LDL. Bei einer Cholesterin-Konzentration von 2,5 mg/dL wird LDL vom Rezeptor optimal gebunden^[28]. Angesichts des Verhältnisses der LDL-Konzentration im Plasma und in der interstitiellen Flüssigkeit von 10:1 genügt eine LDL-Cholesterin-Konzentration von 25 mg/dL im Plasma, um die Körperzellen mit Cholesterin zu versorgen^[118]. Das entspricht etwa einem Fünftel der Konzentration, die gewöhnlich in der westlichen Industriegesellschaft vorkommt (Abb. 16)^[119]. Es gibt Hinweise, daß eine Plasma-konzentration von LDL-Cholesterin im Bereich von 25–60 mg/dL (Plasma-Cholesterin insgesamt 110–150 mg/dL) tatsächlich der physiologische Wert für den Menschen sein könnte. Erstens liegt der LDL-Cholesterin-Wert im Plasma von anderen Säugetieren, die keine Arteriosklerose entwickeln, gewöhnlich unter 80 mg/dL (Abb. 16)^[120]. In diesen Tieren entspricht die Affinität der LDL-Rezeptoren für ihr LDL etwa der Affinität des menschlichen LDL-Rezeptors für menschliches LDL; das weist darauf hin, daß diese Spezies bei der Evolution ähnliche Plasma-LDL-Werte erreicht hatten^[9, 119]. Zweitens liegt die LDL-Konzentration von neugeborenen Menschen etwa bei 30 mg/dL^[121], also in einem für die Rezeptorbindung geeigneten Bereich (Abb. 16). Drittens bleibt das Plasma-LDL-Cholesterin bei fettarm aufgezogenen Menschen im Bereich von 50–80 mg/dL. Werte über 100 mg/dL werden nur von Personen erreicht, die gesättigte tierische Fette und Cholesterin in großen Mengen zu sich nehmen, wie dies in der westlichen Industriegesellschaft üblich ist^[116, 122].

Welcher Mechanismus liegt nun diesen hohen Plasma-LDL-Konzentrationen zugrunde? Zahlreiche Hinweise deuten auf zwei Hauptfaktoren: Ernährung und Vererbung. Enthält die Nahrung wenig tierische Fette, so bleibt

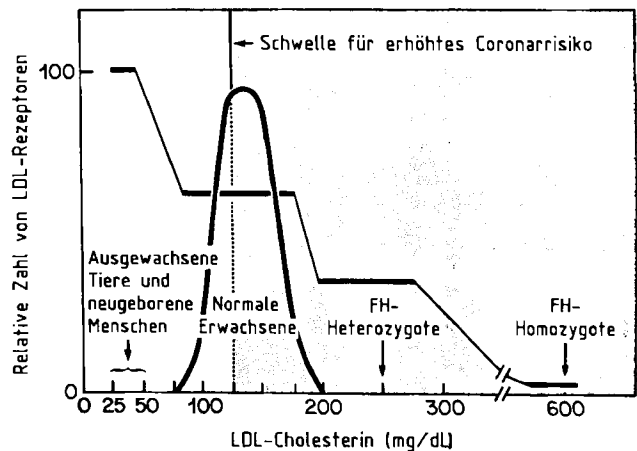


Abb. 16. Der Bereich der LDL-Konzentrationen „normaler“ Erwachsener in der westlichen Industriegesellschaft, durch eine Glockenkurve gekennzeichnet^[127], wird mit dem Bereich ausgewachsener Tiere^[120], dem von neugeborenen Menschen^[121] und dem von FH-Patienten^[14] verglichen. Die Werte im rechten Teil der Abbildung liegen über der Schwelle, bei der vermehrt Arteriosklerose vorkommt; mehr als die Hälfte der Erwachsenen haben LDL-Werte oberhalb dieser Schwelle. Die LDL-Konzentration ist der Anzahl der LDL-Rezeptoren umgekehrt proportional (nach [10]).

die Konzentration des Plasma-LDL-Cholesterins gewöhnlich niedrig. Bei Aufnahme mäßiger Mengen tierischer Fette steigt die Plasma-Cholesterin-Konzentration jedoch schon an^[116, 122]. Nicht bei jedem Menschen ist der Anstieg gleich. Das zeigt sehr deutlich, daß genetische und ernährungsbedingte Faktoren eine Rolle spielen.

Wie könnte eine an tierischen Fetten und Cholesterin reiche Nahrung die Konzentration des Plasma-LDL-Cholesterins erhöhen? Wir nehmen an, daß zwei Eigenschaften des LDL-Rezeptors beteiligt sind – Sättigung und Suppression. Steigt der Plasma-LDL-Spiegel, so werden die Rezeptoren gesättigt. Diese Rezeptorsättigung bildet die obere Grenze der Geschwindigkeit, mit der LDL aus dem Plasma entfernt werden kann^[123]. Jeder Rezeptor kann nur eine LDL-Partikel binden. Sind die Rezeptoren gesättigt, so kann die LDL-Entfernung nur durch eine ansteigende Clearance durch Nicht-Rezeptor-Stoffwechselwege beschleunigt werden; diese Wege sind aber wenig wirkungsvoll. Die LDL-Konzentration muß recht hoch sein, um diese alternativen Stoffwechselwege einzuleiten^[99]. Bei normalen LDL-Werten limitiert hauptsächlich die Sättigung der LDL-Rezeptoren die Entfernung von LDL aus dem Plasma^[123].

Sind die LDL-Rezeptoren einmal gesättigt, so ist die Geschwindigkeit der LDL-Entfernung der Rezeptorenzahl proportional. Wird diese Zahl verringert, so muß die Plasma-LDL-Konzentration steigen. Aus Tierexperimenten weiß man, daß durch fettreiche Nahrung die Zahl der LDL-Rezeptoren in der Leber abnimmt^[123, 124]. Nach unserer Meinung wird dieser Mechanismus über eine Rückkopplungssuppression wie oben beschrieben gesteuert. Akkumuliert sich also überschüssiges Cholesterin aus der Nahrung in der Leber, so produziert die Leber weniger LDL-Rezeptoren (Abb. 13C). Der Eintritt von Nahrungscholesterin in die Leber wird von einem Rezeptor vermittelt, der Chylomikronen-Reste bindet, dessen Aktivität sich von der LDL-Rezeptor-Aktivität genetisch unterscheidet^[125]. Der Rezeptor für abgebaute Chylomikronen wird

von einer Cholesterin-Akkumulation nicht beeinflusst^[126], so daß hohe Cholesterin-Konzentrationen von der Leber erreicht werden, wenn die Nahrung überschüssiges Fett enthält.

Die Kombination von Sättigung und Suppression trägt einen wesentlichen Teil zur LDL-Akkumulation im Plasma bei, wenn die Nahrung reich an gesättigten Fetten und Cholesterin ist. Da eine solche Nahrung bei abnehmender oder gleichbleibender Kapazität zur Entfernung von LDL auch die LDL-Produktion steigen lassen kann, würde die LDL-Konzentration sogar noch größer werden.

Wenn der LDL-Rezeptor jedoch wirklich die Entfernung von LDL aus dem Plasma limitiert, dann könnten Maßnahmen zur Erhöhung seiner Aktivität bei solchen Menschen wirksam sein, die hohe Plasma-LDL-Cholesterin-Konzentrationen, aber keine defekten LDL-Rezeptor-Gene haben. Eine Therapie auf dieser Basis könnte bei der Entwicklung von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren ansetzen. Heute kann man noch nicht entscheiden, ob eine solche Therapie die Herzinfarkt-Anfälligkeit von Menschen mit einem leicht erhöhten Plasma-LDL-Cholesterin-Wert von 100–200 mg/dL senken könnte. Nach vielen Indizienbeweisen ist eine Besserung durchaus zu erwarten^[127], doch gibt es einfach noch keine eindeutigen Daten. Da potente Rezeptor-stimulierende Medikamente inzwischen zugänglich sind, ist zu hoffen, daß diese Hypothese bald geprüft werden kann.

Zusätzlich zur Bedeutung von Diät und Medikamenten für die Behandlung hoher Cholesterin-Konzentrationen müssen Ärzte und Gesundheitsbehörden die genetische Variabilität der Individuen beachten. Diese Variabilität besteht auf drei Ebenen: 1) Der Grad, mit dem das Plasma-Cholesterin bei Cholesterin-reicher Nahrung ansteigt, ist variabel. Nicht alle Menschen entwickeln eine Hypercholesterinämie. Einige Volksgruppen, darunter die Pima-Indianer, behalten trotz fettreicher Nahrung einen niedrigen Plasma-Cholesterin-Wert^[10]. 2) Auch wenn der Plasma-Cholesterin-Wert steigt, kann die Anfälligkeit für Arteriosklerose variieren; viele FH-Heterozygote (10–20%) erleiden bis ins achtzigste oder neunzigste Lebensjahr trotz erheblicher angeborener Hypercholesterinämie keinen Herzinfarkt^[14]. 3) Die genetische Empfänglichkeit für zusätzliche Risikofaktoren ist variabel; manche Menschen können Bluthochdruck und Zigarettenrauch jahrzehntelang ertragen, ohne Arteriosklerose zu entwickeln; andere sind höchst empfindlich.

Angesichts der genetischen Variabilität der Empfänglichkeit müssen Diät- und Medikamentenempfehlungen individuell angepaßt werden. Die Familiengeschichte des Betroffenen muß immer berücksichtigt werden, besonders, wenn in der Familie schon Herzinfarkte und Schlaganfälle in jungen Jahren vorgekommen sind. Ein wichtiges Ziel für die zukünftige Forschung wird die Aufklärung dieser genetischen Variabilität sein. Es ist zu hoffen, daß man die Gene, die für solche Prädispositionen zuständig sind, identifizieren und in jedem Individuum analysieren wird. Gibt es z. B. Allele, die subtile Defekte im LDL-Rezeptor hervorrufen und allgemein für ernährungsbedingte Hypercholesterinämie prädisponieren? Existieren leicht abnormale Allele an anderen Loci, wie etwa jene für Cholesterin-Absorption und -Synthese oder Gallensäuren-Synthese? Es ist wahrscheinlich, daß eine Variabilität an solchen

Loci vorkommt: sie zu entdecken ist eine wissenschaftliche Herausforderung.

Rezeptor-Recycling: Ein neuer zellulärer Stoffwechselweg

Die Untersuchungen des LDL-Rezeptors haben einen Prozeß aufgeklärt, durch den in Membranen eingebettete Rezeptoren kontinuierlich in die Zelle gelangen und sie wieder verlassen. Die Rezeptoren wandern von einer Organelle zu anderen als Ergebnis zweier aufeinanderfolgender Ereignisse: 1) Abtrennung von anderen Proteinen durch laterale Bewegung in der Membranebene und 2) Abschnürung der mit Rezeptoren angereicherten Membranen zu Vesikeln, die dann mit anderen Organellen verschmelzen. Die Rezeptoren wurden als „wandernde“ Membranproteine bezeichnet, um sie von den „seßhaften“ Membranproteinen zu unterscheiden, die sich nicht in dieser Weise bewegen^[4]. Zweck dieser intrazellulären Wanderung ist die Integration multipler Organellen, damit kohärente biochemische Stoffwechselwege entstehen. Die Wanderung der LDL-Rezeptoren verbindet auf diese Weise die Zelloberfläche mit dem Endosom und dem Lysosom. Das in den Lysosomen aus LDL freigesetzte Cholesterin übt in zwei Organellen, dem Endoplasmatischen Reticulum und dem Kern, regulatorische Effekte aus. Durch die selektive Bewegung von Membranproteinen von einer Organelle zur anderen wird eine Multi-Organellen-Regulation ermöglicht.

Welche Signale bestimmen nun den Weg jedes wandernden Membranproteins? Wir beginnen gerade, einigen Einblick in die Signale zu erhalten, die zur Inkorporation von LDL-Rezeptoren in eine ordnende Struktur, die Coated Pits, nötig sind. Wir wissen aber immer noch nichts über die Signale, durch welche die Proteine veranlaßt werden, solche Organellen wie das ER zu verlassen und zu anderen Organellen, etwa dem Golgi-Apparat, zu wandern. Das Verständnis dieser sortierenden Signale ist eine große Herausforderung für die Zellbiologie.

Abschließende Bemerkungen

Konrad Bloch faßte in seinem Nobel-Vortrag von 1964 seine brillanten Untersuchungen über die Biosynthese von Cholesterin zusammen. Abschließend sagte Bloch voraus, daß die Cholesterin-Forschung der Zukunft damit beschäftigt sein würde, die Mechanismen der homöostatischen Kontrolle aufzuklären^[128]. Ein Jahrzehnt später, 1973, konnten mit dem LDL-Rezeptor-Konzept die Homöostase des Plasma-Cholesterins und regulatorische Abnormalitäten des Cholesterin-Metabolismus bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie erklärt werden. Während der nächsten zwölf Jahre wurde der LDL-Rezeptor von einer genetischen Abstraktion zu einem gut charakterisierten Protein mit definierten strukturellen Domänen. Durch Untersuchungen dieses Rezeptors gelangten wir zu einem Verständnis der Rezeptor-vermittelten Endocytose und lernten den Rundweg kennen, auf dem die Rezeptoren ständig in die Zelle gelangen und sie wieder verlassen. Wir haben gelernt, daß Rezeptoren multiple funktionelle Domänen enthalten, durch die jeder Schritt dieser Bewegung gesteuert wird, und daß diese Domänen von Exons codiert

werden, die auch in den Genen vieler anderer Proteine auftreten können. Wir haben gelernt, daß genetische Defekte in den LDL-Rezeptoren zur Akkumulation von Cholesterin im Plasma und zu vorzeitiger Arteriosklerose führen kann. Zusammen mit anderen haben wir gelernt, daß die LDL-Rezeptoren hauptsächlich in der Leber wirken und daß die Leber-Transplantation eine aussichtsreiche Therapie für Kinder mit homozygoter FH ist. Schließlich haben wir gelernt, daß eine Rezeptor-Regulation durch Diät und Medikamente den LDL-Cholesterin-Wert gründlich verändern kann und daß Sättigung und Suppression der Rezeptoren zur großen Zahl der Hypercholesterinämie-Fälle in Industriegesellschaften beitragen. Es ist zu hoffen, daß diese Erkenntnisse zu einem tieferen Verständnis der Biologie der Zelle und dadurch zu einer wirkungsvolleren Therapie von Krankheiten wie der familiären Hypercholesterinämie führen.

Unseren großen Dank möchten wir Dr. Donald W. Seldin aussprechen, der seit über dreißig Jahren Vorsitzender des Department of Internal Medicine at the University of Texas Southwestern Medical School ist und der die intellektuelle Umgebung schuf, die unsere Arbeit ermöglichte. Wir danken vielen Studenten, Postdoctoral Fellows und Fakultätsangehörigen, die in den letzten zwölf Jahren mitgearbeitet haben. Schließlich danken wir dem National Heart, Lung, and Blood Institute of the National Institutes of Health, der Moss Heart Foundation und der Leland Fikes Foundation für ihre langfristige finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 30. Januar 1986 [A 581]
Übersetzt von Dipl.-Biol. Christiane Koszka, Wien

- [1] A. E. Garrod: *Inborn Errors of Metabolism*, Oxford University Press, London 1923, 2. Aufl., S. 1-216; G. W. Beadle, Genes and chemical reactions in neurospora, *Science* 129 (1959) 1715-1719; E. L. Tatum, A case history in biological research, *ibid.* 129 (1959) 1711-1714; L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer, I. C. Wells, Sickle cell anemia: A molecular disease, *ibid.* 110 (1949) 543-548; V. M. Ingram, Gene mutations in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin, *Nature (London)* 180 (1957) 326-328.
- [2] J. L. Goldstein, M. S. Brown, Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2804-2808.
- [3] M. S. Brown, J. L. Goldstein, Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 788-792.
- [4] J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, M. S. Brown, Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis, *Nature (London)* 279 (1979) 679-685; M. S. Brown, R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein, Recycling receptors: The round-trip itinerary of migrant membrane proteins, *Cell* 32 (1983) 663-667.
- [5] Heinrich O. Wieland (1928), Adolf O. R. Windaus (1928), Leopold Ruzicka (1939), Robert Robinson (1947) und Otto P. H. Diels (1950) erhielten den Nobel-Preis für Chemie teilweise für Arbeiten, die zur Aufklärung der Cholesterin-Struktur führten – ein brillantes Kapitel in der Geschichte der Organischen Chemie. Konrad Bloch und Feodor Lynen wurden 1964 mit dem Nobel-Preis für Medizin oder Physiologie für ihre denkwürdigen Untersuchungen über den Biosyntheseweg von Cholesterin ausgezeichnet, einer komplizierten Reaktionsfolge von mindestens 30 Schritten. Robert B. Woodward, der Pionier der stereochemischen Cholesterin-Synthese, bekam 1965 den Nobel-Preis für Chemie „for his outstanding achievement in the art of organic synthesis“. Derek H. R. Barton und Odd Hassel, die 1969 mit dem Nobel-Preis für Chemie „for developing and applying the principles of conformation in chemistry“ ausgezeichnet wurden, sicherten unter anderem die all-Sessel-Konformation von Cholesterin. John W. Cornforth, der mit George Popjak zusammenarbeitete und die Orientierung aller Wasserstoffatome im Cholesterin-Molekül ermittelte, erhielt 1975 den Nobel-Preis für Chemie „for his work on the stereochemistry of enzyme-catalyzed reactions“.
- [6] J. L. Oncley, Lipoproteins of human plasma, *Harvey Lect.* 50 (1956) 71-91.
- [7] J. W. Gofman, O. Delalla, F. Glazier, N. K. Freeman, F. T. Lindgren, A. V. Nichols, B. Strisower, A. R. Tamplin, The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease, *Plasma* 2 (1954) 413-484.
- [8] D. S. Fredrickson, Plasma lipoproteins and apolipoproteins, *Harvey Lect.* 68 (1974) 185-237.
- [9] J. L. Goldstein, M. S. Brown, The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 897-930.
- [10] M. S. Brown, J. L. Goldstein, How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis, *Sci. Am.* 251 (1984) Nr. 5, S. 58-66; *Spektrum Wiss.* 1985, Nr. 1, S. 96-109.
- [11] C. Müller, Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris, *Acta Med. Scand.* 89 (1938) (Suppl.) 75-84.
- [12] A. K. Khachadurian, The inheritance of essential familial hypercholesterolemia, *Am. J. Med.* 37 (1964) 402-407.
- [13] D. S. Fredrickson, R. I. Levy, Familial hyperlipoproteinemia, Kap. 28 in J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson (Hrsg.): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 3. Aufl., McGraw-Hill, New York 1972, S. 545-614.
- [14] J. L. Goldstein, M. S. Brown, Familial hypercholesterolemia, Kap. 33 in J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, D. S. Fredrickson, J. L. Goldstein, M. S. Brown (Hrsg.): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5. Aufl., McGraw-Hill, New York 1983, S. 672-712.
- [15] J. L. Goldstein, H. G. Schrott, W. R. Hazzard, E. L. Bierman, A. G. Motulsky, Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia, *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 1544-1568.
- [16] D. Patterson, J. Slack, Lipid abnormalities in male and female survivors of myocardial infarction and their first-degree relatives, *Lancet* i 1972, 393-399.
- [17] E. A. Nikkila, A. Aro, Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease, *Lancet* i 1973, 954-958.
- [18] J. M. Dietschy, J. D. Wilson, Regulation of cholesterol metabolism, *N. Engl. J. Med.* 282 (1970) 1128-1138, 1179-1183, 1241-1249.
- [19] E. F. Neufeld, J. C. Frattoloni, Inborn errors of mucopolysaccharide metabolism, *Science* 169 (1970) 141-146.
- [20] J. M. Bailey, Regulation of cell cholesterol content, in R. Porter, J. Knight (Hrsg.): *Atherogenesis: Initiating Factors*, Ciba Found. Symp., Vol. 12, Elsevier, Amsterdam 1973, S. 63-92.
- [21] G. H. Rothblat, Lipid metabolism in tissue culture cells, *Adv. Lipid Res.* 7 (1969) 135-162.
- [22] M. S. Brown, S. E. Dana, J. L. Goldstein, Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 2162-2166.
- [23] N. L. R. Bucher, K. McGarrahan, E. Gould, A. V. Loud, Cholesterol biosynthesis in preparations of liver from normal, fasting, x-irradiated, cholesterol-fed, triton, or Δ^4 -cholesten-3-one-treated rats, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 262-267; N. L. R. Bucher, P. Overath, F. Lynen, β -Hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 40 (1960) 491-501.
- [24] M. D. Siperstein, Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues, *Curr. Top. Cell. Regul.* 2 (1970) 65-100.
- [25] M. S. Brown, S. E. Dana, J. L. Goldstein, Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 789-796.
- [26] E. W. Sutherland, Studies on the mechanism of hormone action, *Science* 177 (1972) 401-408.
- [27] J. L. Goldstein, M. S. Brown, Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts: Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 5153-5162.
- [28] J. L. Goldstein, S. K. Basu, G. Y. Brunschede, M. S. Brown, Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans, *Cell* 7 (1976) 85-95.
- [29] J. L. Goldstein, S. E. Dana, J. R. Faust, A. L. Beaudet, M. S. Brown, Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein: Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 8487-8495.
- [30] C. de Duve, Lysosomes revisited, *Eur. J. Biochem.* 137 (1983) 391-397.

- [31] J. L. Goldstein, G. Y. Brunschede, M. S. Brown, Inhibition of the proteolytic degradation of low density lipoprotein in human fibroblasts by chloroquine, concanavalin A, and Triton WR 1339, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 7854-7862.
- [32] C. de Duve, T. DeBarys, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens, F. Van Hoof, Lysosomotropic agents, *Biochem. Pharmacol.* 23 (1974) 2495-2534.
- [33] K. L. Luskey, J. R. Faust, D. J. Chin, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Amplification of the gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, but not for the 53-kDa protein, in UT-1 cells, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 8462-8469.
- [34] G. Gil, J. R. Faust, D. J. Chin, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme, *Cell* 41 (1985) 249-258.
- [35] J. L. Goldstein, S. E. Dana, M. S. Brown, Esterification of low density lipoprotein cholesterol in human fibroblasts and its absence in homozygous familial hypercholesterolemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 4288-4292.
- [36] M. S. Brown, J. L. Goldstein, Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts, *Cell* 6 (1975) 307-316.
- [37] D. W. Russell, T. Yamamoto, W. J. Schneider, C. J. Slaughter, M. S. Brown, J. L. Goldstein, cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: Feedback regulation of a receptor mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 7501-7505.
- [38] G. E. Palade, Fine structure of blood capillaries, *J. Appl. Phys.* 24 (1953) 1424.
- [39] R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 2434-2438; R. G. W. Anderson, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts, *Cell* 10 (1977) 351-364.
- [40] T. F. Roth, K. R. Porter, Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*, *L. J. Cell Biol.* 20 (1964) 313-332.
- [41] M. S. Brown, J. L. Goldstein, Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein, *Cell* 9 (1976) 663-674.
- [42] J. L. Goldstein, M. S. Brown, N. J. Stone, Genetics of the LDL receptor: Evidence that the mutations affecting binding and internalization are allelic, *Cell* 12 (1977) 629-641.
- [43] R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein, M. S. Brown, A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts, *Nature (London)* 270 (1977) 695-699.
- [44] B. M. F. Pearse, Clathrin: A unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 1255-1259.
- [45] G. Carpenter, S. Cohen, ¹²⁵I-labeled human epidermal growth factor: Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts, *J. Cell Biol.* 71 (1976) 159-171.
- [46] S. Terris, D. F. Steiner, Binding and degradation of ¹²⁵I-insulin by rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 8389-8398.
- [47] E. F. Neufeld, G. N. Sando, A. J. Garvin, L. H. Rome, The transport of lysosomal enzymes, *J. Supramol. Struct.* 6 (1977) 95-101.
- [48] A. Gonzalez-Noriega, J. H. Grubb, V. Talkad, W. S. Sly, Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling, *J. Cell Biol.* 85 (1980) 839-852.
- [49] G. Ashwell, J. Harford, Carbohydrate-specific receptors of the liver, *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 531-554; R. J. Stockert, D. J. Howard, A. G. Morell, I. H. Scheinberg, Functional segregation of hepatic receptors for asialoglycoproteins during endocytosis, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 9028-9029.
- [50] A. Helenius, J. Kartenbeck, K. Simons, E. Fries, On the entry of Semliki Forest virus into BHK-21 cells, *J. Cell Biol.* 84 (1980) 404-420.
- [51] I. H. Pastan, M. C. Willingham, Journey to the center of the cell: Role of the receptosome, *Science* 214 (1981) 504-509.
- [52] J. L. Carpentier, P. Gorden, R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein, M. S. Brown, S. Cohen, L. Orci, Co-localization of ¹²⁵I-epidermal growth factor and ferritin-low density lipoprotein in coated pits: A quantitative electron microscopic study in normal and mutant fibroblasts, *J. Cell Biol.* 95 (1982) 73-77.
- [53] F. R. Maxfield, Weak bases and ionophores rapidly and reversibly raise the pH of endocytic vesicles in cultured mouse fibroblasts, *J. Cell Biol.* 95 (1982) 676-681.
- [54] M. Marsh, E. Bolzau, A. Helenius, Penetration of Semliki forest virus from acidic prelysosomal vacuoles, *Cell* 32 (1983) 931-940.
- [55] W. J. Schneider, U. Beisiegel, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2664-2673.
- [56] R. D. Cummings, S. Kornfeld, W. J. Schneider, K. K. Hobgood, H. Tolleshaug, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Biosynthesis of the N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 15261-15273.
- [57] C. G. Davis, A. Elhammer, D. W. Russell, W. J. Schneider, S. Kornfeld, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, in Druck.
- [58] T. P. Bersot, R. W. Mahley, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Interaction of swine lipoproteins with the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 257 (1976) 2395-2398.
- [59] T. L. Innerarity, R. W. Mahley, Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins, *Biochemistry* 17 (1978) 1440-1447.
- [60] H. Tolleshaug, J. L. Goldstein, W. J. Schneider, M. S. Brown, Post-translational processing of the LDL receptor and its genetic disruption in familial hypercholesterolemia, *Cell* 30 (1982) 715-724.
- [61] A. Helenius, I. Mellman, D. Wall, A. Hubbard, Endosomes, *Trends Biochem. Sci.* 8 (1983) 245-250; I. Pastan, M. C. Willingham, Receptor-mediated endocytosis: Coated pits, receptosomes and the Golgi, *ibid.* 8 (1983) 250-254.
- [62] M. S. Brown, R. G. W. Anderson, S. K. Basu, J. L. Goldstein, Recycling of cell surface receptors: Observations from the LDL receptor system, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46 (1981) 713-721; S. K. Basu, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, M. S. Brown, Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts, *Cell* 24 (1981) 493-502.
- [63] T. Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown, W. J. Schneider, M. L. Casey, J. L. Goldstein, D. W. Russell, The human LDL receptor: A cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA, *Cell* 39 (1984) 27-38.
- [64] D. W. Russell, W. J. Schneider, T. Yamamoto, K. L. Luskey, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Domain map of the LDL receptor: Sequence homology with the epidermal growth factor precursor, *Cell* 37 (1984) 577-585.
- [65] J. L. Goldstein, M. S. Brown, R. G. W. Anderson, D. W. Russell, W. J. Schneider, Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1 (1985) 1-39.
- [66] T. C. Südhof, J. L. Goldstein, M. S. Brown, D. W. Russell, The LDL receptor Gene: A mosaic of exons shared with different proteins, *Science* 228 (1985) 815-822.
- [67] W. J. Schneider, C. J. Slaughter, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, D. J. Capra, M. S. Brown, Use of anti-peptide antibodies to demonstrate external orientation of NH₂-terminus of the LDL receptor in the plasma membrane of fibroblasts, *J. Cell Biol.* 97 (1983) 1635-1640.
- [68] R. W. Mahley, T. L. Innerarity, Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis, *Biochim. Biophys. Acta* 737 (1983) 197-222; T. L. Innerarity, K. H. Weisgraber, K. S. Arnold, S. C. Rall, Jr., R. W. Mahley, Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2: Evidence for modulation of the binding site conformation, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 7261-7267.
- [69] T. C. Südhof, D. W. Russell, J. L. Goldstein, M. S. Brown, R. Sanchez-Pescador, G. I. Bell, Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor, *Science* 228 (1985) 893-895.
- [70] J. Scott, M. Urdea, M. Quiroga, R. Sanchez-Pescador, N. Fong, M. Selby, W. J. Rutter, G. I. Bell, Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins, *Science* 221 (1983) 236-240.
- [71] A. Gray, T. J. Dull, A. Ullrich, Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor, *Nature (London)* 303 (1983) 722-725.
- [72] R. F. Doolittle, D.-F. Feng, M. S. Johnson, Computer-based characterization of epidermal growth factor precursor, *Nature (London)* 307 (1984) 558-566.
- [73] M. A. Lehrman, J. L. Goldstein, M. S. Brown, D. W. Russell, W. J. Schneider, Internalization-defective LDL receptors produced by genes with nonsense and frameshift mutations that truncate the cytoplasmic domain, *Cell* 41 (1985) 735-753.
- [74] U. Francke, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Assignment of the human gene for the low density lipoprotein receptor to chromosome 19: Synteny of a receptor, a ligand, and a genetic disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2826-2830.
- [75] K. K. Stanley, H.-P. Kocher, J. P. Luzio, P. Jackson, J. Tschopp, The sequence and topology of human complement component C9, *EMBO J.* 4 (1985) 375-382.
- [76] R. F. Doolittle, The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins, *Trends Biochem. Sci.* 10 (1985) 233-237.

- [77] W. Gilbert, Why genes in pieces? *Nature (London)* 271 (1978) 501.
- [78] W. Gilbert, Genes-in-pieces revisited, *Science* 228 (1985) 823-824.
- [79] M. A. Lehrman, D. W. Russell, C. G. Davis, J. L. Goldstein, M. S. Brown, noch unveröffentlicht.
- [80] H. Tolleshaug, K. K. Hobgood, M. S. Brown, J. L. Goldstein, The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Multiple mutations disrupting the transport and processing of a membrane receptor, *Cell* 32 (1983) 941-951.
- [81] W. J. Schneider, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Kinetic defects in the processing of the LDL receptor in fibroblasts from WHHL rabbits and a family with familial hypercholesterolemia, *Mol. Biol. Med.* 1 (1983) 353-367.
- [82] M. A. Lehrman, D. W. Russell, C. G. Davis, J. L. Goldstein, M. S. Brown, The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia I. Molecular basis of null and internalization-defective alleles at the LDL receptor locus, im Druck; C. G. Davis, R. G. W. Anderson, M. A. Lehrman, D. W. Russell, M. S. Brown, J. L. Goldstein, The J. D. mutation in familial hypercholesterolemia: II. Substitution of cysteine for tyrosine in cytoplasmic tail produces internalization-defective LDL receptors, im Druck.
- [83] M. A. Lehrman, W. J. Schneider, T. C. Südhof, M. S. Brown, J. L. Goldstein, D. W. Russell, Mutation in LDL receptors: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains, *Science* 227 (1985) 140-146.
- [84] Y. K. Ho, M. S. Brown, D. W. Bilheimer, J. L. Goldstein, Regulation of low density lipoprotein receptor activity in freshly isolated human lymphocytes, *J. Clin. Invest.* 58 (1976) 1465-1474.
- [85] D. W. Bilheimer, Y. K. Ho, M. S. Brown, R. G. W. Anderson, J. L. Goldstein, Genetics of the low density lipoprotein receptor: Diminished receptor activity in lymphocytes from heterozygotes with familial hypercholesterolemia, *J. Clin. Invest.* 61 (1978) 678-696.
- [86] T. Langer, W. Strober, R. I. Levy, The metabolism of low density lipoprotein in familial type II hyperlipoproteinemia, *J. Clin. Invest.* 51 (1972) 1528-1536.
- [87] D. W. Bilheimer, N. J. Stone, S. M. Grundy, Metabolic studies in familial hypercholesterolemia: Evidence for a gene-dosage effect *in vivo*, *J. Clin. Invest.* 64 (1979) 524-533.
- [88] L. A. Simons, D. Reichl, N. B. Myant, M. Mancini, The metabolism of the apoprotein of plasma low density lipoprotein in familial hyperbeta-lipoproteinaemia in the homozygous form, *Atherosclerosis* 21 (1975) 283-298.
- [89] D. W. Bilheimer, J. L. Goldstein, S. M. Grundy, M. S. Brown, Reduction in cholesterol and low density lipoprotein synthesis after portacaval shunt surgery in a patient with homozygous familial hypercholesterolemia, *J. Clin. Invest.* 56 (1975) 1420-1430.
- [90] S. K. Basu, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Characterization of the low density lipoprotein receptor in membranes prepared from human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 3852-3856.
- [91] P. T. Kovanen, S. K. Basu, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue, *Endocrinology* 104 (1979) 610-616; M. S. Brown, P. T. Kovanen, J. L. Goldstein, Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex, *Recent Prog. Horm. Res.* 35 (1979) 215-257.
- [92] Y. S. Chao, E. E. Windler, G. C. Chen, R. J. Havel, Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 α -ethinyl estradiol, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 11360-11366; P. T. Kovanen, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Increased binding of low density lipoprotein to liver membranes from rats treated with 17 α -ethinyl estradiol, *ibid.* 254 (1979) 11367-11373.
- [93] R. C. Pittman, T. E. Carew, A. D. Attie, J. L. Witztum, Y. Watanabe, D. Steinberg, Receptor-dependent and receptor-independent degradation of low density lipoprotein in normal rabbits and in receptor-deficient mutant rabbits, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 7994-8000.
- [94] D. K. Spady, D. W. Bilheimer, J. M. Dietschy, Rates of receptor dependent and independent low density lipoprotein uptake in the hamster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3499-3503.
- [95] D. Steinberg, Lipoproteins and atherosclerosis: A look back and a look ahead, *Arteriosclerosis* 3 (1983) 283-301.
- [96] J. Shepherd, S. Bicker, A. R. Lorimer, C. J. Packard, Receptor mediated low density lipoprotein catabolism in man, *J. Lipid Res.* 20 (1979) 999-1006.
- [97] S. K. Basu, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, M. S. Brown, Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3178-3182.
- [98] R. W. Mahley, T. L. Innerarity, R. E. Pitas, K. H. Weisgraber, J. H. Brown, E. Gross, Inhibition of lipoprotein binding to cell surface receptors of fibroblasts following selective modification of arginyl residues in arginine-rich and B apoproteins, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 7279-7287; K. H. Weisgraber, T. L. Innerarity, R. W. Mahley, Role of the lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts, *ibid.* 253 (1978) 9053-9062.
- [99] J. L. Goldstein, M. S. Brown, Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis, *Metabolism* 26 (1977) 1257-1275.
- [100] M. S. Brown, J. L. Goldstein, Lipoprotein receptors in the liver: Control signals for plasma cholesterol traffic, *J. Clin. Invest.* 72 (1983) 743-747.
- [101] Y. Watanabe, Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). Incidence and development of atherosclerosis and xanthoma, *Atherosclerosis* 36 (1980) 261-268.
- [102] J. L. Goldstein, T. Kita, M. S. Brown, Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis: Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia, *N. Engl. J. Med.* 309 (1983) 288-295.
- [103] D. Gitlin, D. G. Cornwell, D. Nakasato, J. L. Oncley, W. L. Hughes, Jr., C. A. Janeway, Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. II. The lipoproteins, *J. Clin. Invest.* 37 (1958) 172-184.
- [104] D. W. Bilheimer, S. Eisenberg, R. I. Levy, The metabolism of very low density lipoprotein proteins. I. Preliminary *in vitro* and *in vivo* observations, *Biochim. Biophys. Acta* 260 (1972) 212-221.
- [105] T. Kita, M. S. Brown, D. W. Bilheimer, J. L. Goldstein, Delayed clearance of very low density and intermediate density lipoproteins with enhanced conversion to low density lipoprotein in WHHL rabbits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5693-5697.
- [106] A. K. Soutar, N. B. Myant, G. R. Thompson, The metabolism of very low density and intermediate density lipoproteins in patients with familial hypercholesterolaemia, *Atherosclerosis* 43 (1982) 217-231.
- [107] M. S. Brown, J. L. Goldstein, Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors (editorial), *N. Engl. J. Med.* 305 (1981) 515-517.
- [108] A. Endo, M. Kuroda, K. Tanzawa, Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity, *FEBS Lett.* 72 (1976) 323-326; A. Endo, Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase, *J. Med. Chem.* 28 (1985) 401-405.
- [109] A. W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, J. Springer, Mevinolin, a highly potent competitive inhibitor of HMG-CoA reductase and cholesterol lowering agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 3957-3961.
- [110] T. Kita, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase, *J. Clin. Invest.* 66 (1980) 1094-1100; P. T. Kovanen, D. W. Bilheimer, J. L. Goldstein, J. J. Jaramillo, M. S. Brown, Regulatory role for hepatic low density lipoprotein receptors *in vivo* in the dog, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1194-1198.
- [111] S. M. Grundy, D. W. Bilheimer, Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by mevinolin in familial hypercholesterolemia heterozygotes: Effects on cholesterol balance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2538-2542.
- [112] H. Mabuchi, T. Sakai, Y. Sakai, A. Yoshimura, A. Watanabe, T. Waksugi, J. Koizumi, R. Takeda, Reduction of serum cholesterol in heterozygous patients with familial hypercholesterolemia: Additive effects of compactin and cholestyramine, *N. Engl. J. Med.* 308 (1983) 609-613; D. W. Bilheimer, S. M. Grundy, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Mevinolin stimulates receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 4124-4128; D. R. Illingworth, Mevinolin plus colestipol in therapy for severe heterozygous familial hypercholesterolemia, *Ann. Intern. Med.* 101 (1984) 598-604.
- [113] A. Yamamoto, H. Sudo, A. Endo, Therapeutic effects of ML-236B in primary hypercholesterolemia, *Atherosclerosis* 35 (1980) 259-266.
- [114] G. R. Thompson, N. B. Myant, D. Kilpatrick, C. M. Oakley, M. J. Raphael, R. E. Steiner, Assessment of long-term plasma exchange for familial hypercholesterolaemia, *Br. Heart J.* 43 (1980) 680-688.
- [115] D. W. Bilheimer, J. L. Goldstein, S. C. Grundy, T. E. Starzl, M. S. Brown, Liver transplantation provides low density lipoprotein receptors and lowers plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia, *N. Engl. J. Med.* 311 (1984) 1658-1664.
- [116] A. Keys: *Seven countries: A multivariate analysis of death and coronary heart disease*, Harvard University Press, Cambridge, MA 1980, S. 1-381.
- [117] W. B. Kannel, W. P. Castelli, T. Gordon, P. M. McNamara, Serum cho-

- lesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease: The Framingham Study, *Ann. Intern. Med.* 74 (1971) 1-12.
- [118] D. Reichl, N. B. Myant, M. S. Brown, J. L. Goldstein, Biologically active low density lipoprotein in human peripheral lymph, *J. Clin. Invest.* 61 (1978) 64-71.
- [119] J. L. Goldstein, M. S. Brown, Lipoprotein receptors: Genetic defense against atherosclerosis, *Clin. Res.* 30 (1982) 417-426.
- [120] G. L. Mills, C. E. Taylaour, The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals, *Comp. Biochem. Phys.* 40B (1971) 489-501; G. D. Calvert, Mammalian low density lipoproteins, in C. E. Day, R. S. Levy (Hrsg.): *Low Density Lipoproteins*, Plenum Press, New York 1976, S. 281-319.
- [121] P. O. Kwiterovich, Jr., R. I. Levy, D. S. Fredrickson, Neonatal diagnosis of familial type-II hyperlipoproteinaemia, *Lancet* i 1973, 118-122.
- [122] S. J. Connor, W. E. Connor, The interactions of genetic and nutritional factors in hyperlipidemia, in A. Velazquez, H. Bourges: *Genetic Factors in Nutrition*, Academic Press, Orlando, FL 1984, S. 137-155; D. Applebaum-Bowden, S. M. Haffner, E. Hartsook, K. H. Luk, J. J. Albers, W. R. Hazzard, Down-regulation of the low-density lipoprotein receptor by dietary cholesterol, *Am. J. Clin. Nutr.* 39 (1984) 360-367.
- [123] P. T. Kovanen, M. S. Brown, S. K. Basu, D. W. Bilheimer, J. L. Goldstein, Saturation and suppression of hepatic lipoprotein receptors: A mechanism for the hypercholesterolemia of cholesterol-fed rabbits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1396-1400.
- [124] D. Y. Hui, T. L. Innerarity, R. W. Mahley, Lipoprotein binding to canine hepatic membranes: Metabolically distinct apo-E and apo B,E receptors, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 5646-5655; D. K. Spady, S. D. Turley, J. M. Dietschy, Rates of low density lipoprotein uptake and cholesterol synthesis are regulated independently in the liver, *J. Lipid Res.* 26 (1985) 465-472.
- [125] T. Kita, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Y. Watanabe, C. A. Hornick, R. J. Havel, Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits. A mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3623-3627.
- [126] B. C. Sherrill, J. M. Dietschy, Characterization of the sinusoidal transport process responsible for uptake of chylomicrons by the liver, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1859-1867.
- [127] Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: I. Reduction in incidence of coronary heart disease, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* 251 (1984) 351-364; Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results: II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering, *ibid.* 251 (1984) 365-374.
- [128] K. Bloch, The biological synthesis of cholesterol, *Science* 150 (1965) 19-28; deutsche Fassung: Die Biosynthese des Cholesterins, *Angew. Chem.* 77 (1965) 944-954.
- [129] R. J. Deckelbaum, G. G. Shipley, D. M. Small, Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 744-754; J. Elovson, J. C. Jacobs, V. N. Schumaker, D. L. Puppione, Molecular weights of apoprotein B obtained from human low-density lipoprotein (apoprotein B-PI) and from rat very low density lipoprotein (apoprotein B-PIII), *Biochemistry* 24 (1985) 1569-1578.
- [130] M. S. Brown, J. L. Goldstein, Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 3330-3337.
- [131] M. S. Brown, J. L. Goldstein, The LDL receptor and HMG-CoA reductase - Two membrane molecules that regulate cholesterol homeostasis, *Curr. Top. Cell. Regul.* 26 (1985) 3-15.
- [132] J. L. Goldstein, M. S. Brown, Progress in understanding the LDL receptor and HMG CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol, *J. Lipid Res.* 25 (1984) 1450-1461.