

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

***Untersuchung der Apolipoprotein AV vermittelten
Triglyzeridsenkung in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Daniel Kayser aus Hamburg

Hamburg, 2006

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 21.06.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: PD Dr. M. Merkel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Heeren

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND MAUSLINIEN	VI
FRAGESTELLUNG	VII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. FETTSTOFFWECHSELSTÖRUNGEN	1
1.2. LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL UND APOLIPOPROTEINE.....	1
1.3. APOLIPOPROTEIN AV	7
1.3.1. Lokalisation des ApoAV Gens.....	7
1.3.2. Charakteristika des ApoAV Genproduktes	7
1.3.3. Die Rolle des ApoAV bei der Leberregeneration	8
1.3.4. Der Einfluss von ApoAV auf den Plasmatriglyzeridspiegel.....	8
1.3.5. Lipoproteinlipase und plasmatische TG-Hydrolyse.....	9
1.3.6. ApoCIII und Hypertriglyzeridämie.....	9
1.3.7. Hepatische VLDL-Produktion und mögliche Beeinflussung durch ApoAV	9
1.4. ZIEL DER ARBEIT	11
2. MATERIAL UND METHODEN.....	12
2.1. MATERIAL	12
2.1.1. Chemikalien	12
2.1.2. Enzyme und Proteine	13
2.1.3. Nucleotide	13
2.1.4. Material für Westernblot	13
2.1.5. Narkosemittel	13
2.1.6. Verbrauchsmaterial	14
2.1.7. Geräte	14
2.1.8. Standard-Pufferlösungen.....	15
2.2. METHODIK	16
2.2.1. Versuchstiere – allgemeine Maßnahmen	16
2.2.2. ApoAV transgene Mäuse	16
2.2.3. Kreuzungsstrategie	16
2.2.4.1. Allgemeines Prinzip.....	17
2.2.4.2. Schwanzbiopsieentnahme	17
2.2.4.3. Verdau der Schwanzbiopsie.....	17
2.2.4.4. Extraktion genomischer DNA.....	17
2.2.4.5. PCR.....	18
2.2.4.6. Gel-Elektrophorese	18

2.2.5.	Western Blot.....	19
2.2.5.1.	Prinzip.....	19
2.2.5.2.	Blutentnahme bei Mäusen.....	19
2.2.5.3.	Detektion von ApoAV mittels etabliertem Westernblot-Verfahren	19
2.2.6.	Lipoproteinprofil.....	20
2.2.6.1.	Prinzip.....	20
2.2.6.2.	Nüchternblutentnahme.....	21
2.2.6.3.	Lipoproteinzentrifugation	21
2.2.6.4.	Fast performance liquid chromatography	21
2.2.6.5.	Triglyzerid- und Cholesterolbestimmung	22
2.2.7.	<i>In vivo</i> Studien.....	22
2.2.7.1.	Prinzip.....	22
2.2.7.2.	Produktionsstudien.....	22
2.2.7.3.	Abbaustudien	23
2.2.7.4.	Radioaktivitätsmessung	24
2.2.7.5.	Lipidextraktion.....	24
3.	ERGEBNISSE.....	25
3.1.	KREUZUNG DER MÄUSE.....	25
3.2.	WESTERNBLOT	25
3.3.	LIPOPROTEINPROFILE.....	26
3.4.	IN VIVO STUDIEN.....	28
3.4.1.	Produktionsstudien.....	28
3.4.1.1.	Postprandialer Triglyzerid-Spiegel	28
3.4.1.2.	Intestinale Chylomikronenproduktion nach Triton-Gabe	29
3.4.1.3.	Hepatische VLDL-Produktion nach Triton-Gabe.....	30
3.4.2.	VLDL-Abbaustudie.....	31
4.	DISKUSSION	34
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	37
6.	LITERATURVERZEICHNIS	38

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND MAUSLINIEN

ABC	ATP binding cassette transporter
Apo	Apolipoprotein
Aqua dest.	Aqua destillatum
AVtr	ApoAV transgene Maus
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDTA	Trans-1,2-Diaminocyclohexan-NNNN.Tetraessigsäure
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
DNA	Desoxyribonucleinacid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCHL	Familiäre Kombinierte Hyperlipoproteinämie
HDL	High density lipoprotein
IDL	Intermediate density lipoprotein
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHP	Postheparinplasma
RNA	Ribonucleinacid
Rpm	Rounds per minute
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TG	Triglyzeride
VLDL	Very low density lipoprotein
Wt	Wildtyp Maus

FRAGESTELLUNG

Apo AV reduziert in Mäusen die Plasma-Triglyzeride. Beruht dieser Effekt auf einer Beschleunigung des plasmatischen Abbaus von VLDL und Chylomikronen oder auf einer Verminderung der hepatischen bzw. intestinalen Produktion triglyzeridreicher Partikel?

1. EINLEITUNG

1.1. FETTSTOFFWECHSELSTÖRUNGEN

Störungen des Fettstoffwechsels sind in der westlichen Welt weit verbreitet und eine der Hauptursachen der Arteriosklerose, einem chronischen inflammatorischen Prozeß der Gefäßwände, welcher mit Verdickung, Verhärtung, Lumeneinengung und Elastizitätsverlust der Arterien einhergeht. Durch arteriosklerotische Gefäßveränderungen können die koronare Herzerkrankung (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und cerebrovaskuläre Gefäßleiden entstehen. Diese Folgeerkrankungen sind die häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in der Bundesrepublik Deutschland (Bruckenberger 2004; Statistisches Bundesamt 2005). Neben den Fettstoffwechselstörungen sind Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Hypertonie die wichtigsten beeinflussbaren; familiäre Disposition, Lebensalter und männliches Geschlecht die unbeeinflussbaren Risikofaktoren der Arteriosklerose (Grundy et al. 1998; Smith et al. 2000; Assmann et al. 2002).

Bei den Störungen des Lipidmetabolismus sind Hypertriglyzeridämien neben erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Cholesterinwerten als wichtige eigenständige Risikofaktoren der Arteriosklerose und der kardiovaskulären Erkrankungen anzusehen. Eine Metaanalyse zeigt, dass ein Anstieg der Triglyzeride im Blut um 1 mmol/l (89 mg/dl) das kardiovaskuläre Risiko bei Männern um 31 Prozent und bei Frauen um 76 Prozent erhöht (Hokanson and Austin 1996). Zudem scheinen die aus Triglyzeriden stammenden freien Fettsäuren eine Schlüsselposition in der Entstehung und Progression des Metabolischen Syndroms (eine Kombination aus Fettsucht, Neigung zu Diabetes mellitus, erhöhtem Blutdruck und Blutfetterhöhung) einzunehmen. Die Ursachen einer Hypertriglyzeridämie sind vielfältig. Neben diversen exogenen Faktoren wie Alkoholkonsum, Medikamenteneinnahme und falscher Ernährungsweise können auch endogene Faktoren eine Erhöhung der Neutralfette im Blut verursachen. Auf molekularer Ebene sind hier vor allem Veränderungen bzw. Polymorphismen von Apolipoproteinen, Transfer- bzw. Carrierproteinen, Rezeptorstrukturen oder Enzymen, die in den Lipidmetabolismus involviert sind, zu nennen. Insbesondere sind die Einflüsse von genetischen Variationen im Apolipoprotein AI/CIII/AIV/AV Lokus auf den Plasmatriglyzeridspiegel vielfach beschrieben (Groenendijk et al. 2001; Talmud et al. 2002; Hubacek 2005).

1.2. LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL UND APOLIPOPROTEINE

Apolare Lipide wie beispielsweise Triglyzeride können aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit nicht frei im Blut zirkulieren. Sie sind daher auf so genannte Emulgatoren angewiesen, welche eine Lösung in polaren Medien vermitteln. Freie, unveresterte Fettsäuren können zusammen mit Albumin transportiert werden; die meisten anderen Fette, insbesondere TG und Chol werden im Verbund mit amphipatischen Phospholipiden und spezifischen Proteinen - den Apolipoproteinen – transportiert. Diese können mit ihren hydrophoben und hydrophilen Molekülabschnitten die Funktion von Lösungsvermittlern für die apolaren Lipide übernehmen. Die großmolekularen, micellären Lipid-

Protein-Komplexe werden als Lipoproteine bezeichnet. In diesen Transportproteinen sind die hydrophilen Anteile der Phospholipid- und Proteinmoleküle zur Wasserphase hin ausgerichtet und von einer Hydrathülle umgeben. Die apolaren Lipide, wie z.B. Triglyzeride und Cholesterolester werden in den hydrophoben Kern der Partikel eingelagert und in dieser Form in der Wasserphase getragen. Aufgrund unterschiedlicher Dichte und elektrophoretischer Beweglichkeit können die Lipoproteine in fünf Hauptklassen eingeteilt werden. Man unterscheidet Chylomikronen, Very-low-density-Lipoproteins (VLDL), Intermediate-density-Lipoproteins (IDL), Low-density-Lipoproteins (LDL) und High-density-Lipoproteins (HDL). Die Charakteristika der Lipoproteine werden in folgender Tabelle zusammengefasst:

Eigenschaften	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	- 0,93	0,93 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
Durchmesser (nm)	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
Cholesterol-anteil (%)	3 – 8	15 – 25	30	42 – 50	15 – 16
Triglyzerid-anteil (%)	84 – 89	50 – 65	30	7 – 10	3 – 5
Phospholipid-anteil (%)	7 – 9	15 – 20	22	15 – 20	22
Hauptfunktion	Transport exogener Lipide	Transport endogener Lipide	Transport endogener Lipide	Cholesterol-transport	Reverser Chol.-transport
Apolipoproteine	AI; AIV; AV, B48; CII, CIII, E	AI, AV, B100, CII, CIII, E,	B100, CIII, E	B100	AI, AIII, AIV, AV, CIII, E

Tab. 1: Physikalische Eigenschaften, Zusammensetzung, Hauptfunktionen und Apolipoproteine der fünf Lipoprotein Hauptklassen. VLDL: Very low density lipoproteins, IDL: Intermediate density lipoproteins, LDL: Low density lipoproteins, HDL: High density lipoproteins.

Die Proteinkomponenten der Lipoproteine werden Apolipoproteine oder Apoproteine genannt und in fünf Haupttypen (A-E) und zum Teil in verschiedene Subtypen (z.B. ApoAI – ApoAV) unterteilt. Die meisten Apolipoproteine sind aus sich wiederholenden Helices aufgebaut. Genetisch interessant ist die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, was auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung dieser Proteinfamilie schließen lässt. Die amphipathische Struktur der sich wiederholenden Helices gewährleistet eine feste Verankerung in der Hülle der Lipoproteine, wo sie auch am besten mit Rezeptoren und Enzymen des Lipoproteinstoffwechsels zusammenwirken können. Diese Apolipoproteine spielen im Fettstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Sie dienen der Stabilisierung, als Enzymaktivatoren und als Rezeptor(-liganden) des Lipoproteinstoffwechsels. Entsprechend weitreichend können sich Veränderungen ihrer Basensequenz z.B. durch Punktmutationen auswirken.

Ihre Bildung erfolgt vor allem in der Leber und in der Darmmukosa. Die Charakteristika der wichtigsten Apolipoproteine sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Apolipoprotein	Assoziierte Lipoproteine	Funktionen im Stoffwechsel
ApoAI	HDL, Chylomikronen	LCAT-Aktivierung, Strukturprotein im HDL
ApoAIV	HDL, Chylomikronen	LCAT-Aktivierung, Funktionen im Triglyzeridstoffwechsel
ApoAV	HDL, VLDL, Chylomikronen	Senkung des Plasmatriglyzeridspiegels (Pennacchio et al. 2001)
ApoB48	Chylomikronen	Strukturkomponente der Chylomikronen, LRP-Ligand, Produktion und Sekretion der Chylomikronen aus dem Dünndarm
ApoB100	LDL, VLDL	Strukturkomponente im VLDL, IDL und LDL, LDL-Rezeptor-Ligand, Produktion und Sekretion der VLDL aus der Leber
ApoCII	HDL, VLDL, IDL, Chylomikronen	Aktivator der Lipoproteinlipase
ApoCIII	HDL, VLDL, IDL, Chylomikronen	Inhibitor der Lipoproteinlipase, evtl. Hemmung der hepatischen Aufnahme von Chylomikronen und VLDL-Remnants
ApoE	HDL, Chylomikronen (-remnants), VLDL, IDL	Ligand bei der Bindung verschiedener Lipoproteine an den LDL-Rezeptor, an LRP oder möglicherweise an einen eigenen hepatischen Apo-E-Rezeptor

Tab.2: Charakteristika der wichtigsten Apolipoproteine. HDL: High-density Lipoprotein; LDL: Low-density Lipoprotein; IDL: Intermediate-density Lipoprotein; VLDL: Very low-density Lipoprotein; LCAT: Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase; LRP: LDL-Receptor related protein.

Man kann den Lipidstoffwechsel in eine exogene und eine endogene Komponente unterteilen, wobei der endogene Stoffwechselweg aus dem VLDL-Stoffwechsel und dem reversen Cholesterol-Transport durch HDL besteht. Der exogene Weg beginnt postprandial im Dünndarm mit der Assoziation von re-veresterten Triglyzeriden, Cholesterolestern und sonstigen Lipiden aus der Nahrung mit ApoB48, ApoAI, ApoAII, ApoAIV, Phospholipiden und anderen Proteinen. Es entstehen Chylomikronen, die über den Ductus thoracicus (Milchbrustgang) mit der Lymphe in den linken Venenwinkel und damit in den Blutkreislauf gelangen. Im Plasma werden dann ApoC-Proteine und nach neueren Erkenntnissen wohl auch das ApoAV aus HDL-Partikeln auf die Chylomikronen übertragen. Die durch ApoCII aktivierte LPL hydrolysiert vor allem in den Muskel- und Fettgewebkapillaren die Triglyzeride der Chylomikronen. Die hierbei freigesetzten Fettsäuren werden dem peripheren Gewebe zur Verfügung gestellt. Nach weiteren Interaktionen vor allem mit HDL bleibt schließlich ein Cholesterolester- und ApoE reicher Chylomikronenrest (Chylomikronen Remnant) übrig. Nach ausreichender Triglyzerid-Hydrolyse löst sich die LPL vom Endothel und gelangt zusammen mit den Chylomikronen Remnants zur Leber, in der diese durch eine ApoB, ApoE und LPL-getriggerte hepatische Aufnahme schnell aus der Zirkulation entfernt werden (Beisiegel et al. 1991). ApoE sowie LPL vermitteln zunächst die Bindung von Chylomikronenresten an Proteoglykane und schließlich ihre Aufnahme über den LDL-

Rezeptor und das LDL-Rezeptor related protein (LRP). In den Hepatozyten werden die Chylomikronen Remnants lysosomal abgebaut. ApoE und die LPL können aufgrund neuerer Daten wieder verwendet werden (Heeren et al. 2001). Das ebenfalls durch die Nahrung aufgenommene Cholesterol wird der Leber zugeführt, wo es entweder für die Gallensäurebiosynthese verwandt, in Biomembranen eingebaut, oder aber als Lipoprotein-gebundenes Cholesterol wieder zurück in den Blutkreislauf sezerniert wird. Alternativ dazu kann das von der Leber aufgenommene Cholesterol auch frei über die Galle ausgeschieden werden.

Der endogene Stoffwechselweg der Lipoproteine lässt sich in das ApoB100 System, zu welchem die VLDL-, IDL- und LDL-Partikel gehören und das HDL-System unterteilen. Die in den Hepatozyten gebildeten VLDL enthalten sowohl endogen synthetisierte als auch aus aufgenommenen Chylomikronenresten stammende Phospholipide, Cholesterol, Triglyzeride und ApoB100. Im Plasma werden noch die Apolipoproteine CI, CII, CIII, und E von HDL-Partikeln auf die VLDL übertragen. Ob ApoAV bereits in den Hepatozyten oder erst zu einem späteren Zeitpunkt auf die VLDL übertragen wird, ist derzeit noch nicht geklärt. Ebenso wie die Chylomikronen verlieren die VLDL ihre Triglyzeride durch die plasmatische Hydrolyse der endothelständigen LPL. Nach dem Triglyzeridverlust entstehen kleinere und dichtere VLDL, so genannte VLDL-Remnants, die - vermittelt durch ApoE und LPL - über LDL- und LRP-Rezeptoren in die Leber aufgenommen und metabolisiert werden. Ein Teil der VLDL Remnants wird durch weitere Interaktionen, u.a. mit der LPL und der hepatischen Lipase, über die Zwischenstufe IDL zu LDL konvertiert, wobei sie ihren ApoE-Anteil verlieren und Cholesterolester aus HDL-Partikeln aufnehmen. LDL enthalten ApoB100 als einziges Apolipoprotein und sind weitgehend frei von Triglyzeriden. Die Aufgabe der LDL ist die Versorgung der Körperzellen mit Cholesterol. Hierzu werden die LDL-Partikel via Endozytose – vermittelt durch ubiquitär vorkommende LDL-Rezeptoren und ApoB100 als Rezeptorligand - in die Zellen aufgenommen. Nach lysosomaler Degradation des LDL-Partikels gelangt das freie Cholesterol ins Cytoplasma und kann dort weiter verwendet werden. Die Cholesterolkonzentration im Cytoplasma reguliert u.a. die Expression der LDL-Rezeptoren und damit auch die Höhe des Cholesterol-Spiegels im Blut.

Die High-density Lipoproteins (HDL) nehmen eine Schlüsselposition bei dem reversen Cholesteroltransport ein. Die HDL-Partikel werden durch Zusammenlagerung einzelner Phospholipid-Apolipoproteinkomplexe (ApoAI, AII, AIV, möglicherweise AV und ApoE), sowie durch Interaktion mit dem Enzym LCAT (Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase) in der Leber und im Intestinum gebildet, wobei ApoAI das essentielle, strukturbildende Apolipoprotein und der wichtigste Co-Faktor der LCAT zu sein scheint. Der erste Schritt im reversen Cholesteroltransport ist die Übertragung von Cholesterol aus peripheren Zellen - insbesondere Makrophagen – oder aus anderen Lipoproteinen zusammen mit ApoCII und CIII auf HDL. Eine entscheidende Bedeutung für den Cholesterol-Efflux peripherer Zellen, Übertragung von Cholesterol auf ApoA1 und damit für die Bildung von HDL-Partikeln scheint das membranständige Transportprotein ABC-A1 zu besitzen (Bodzioch et al. 1999;

Brooks-Wilson et al. 1999). Nach Fettsäureübertragung vom Lecithin auf das Cholesterol durch die LCAT gelangen die Cholesterolester-Moleküle in den lipophilen Kern der HDL. In der Leber angekommen, werden die Cholesterolester über den so genannten Scavenger-Rezeptor SR-B1 selektiv abgegeben (Rinninger et al. 1999). Eine vollständige Aufnahme der HDL-Partikel in die Leberzellen über Lipoproteinrezeptoren (LDL-R und LRP), sowie eine Cholesterolester Übertragung auf andere Lipoproteinklassen durch Interaktion mit dem Cholesterolester-Transferprotein (CETP) ist ebenfalls möglich. Nach neueren Erkenntnissen spielt der ABC-A1-Transporter eine entscheidende Rolle bei der Regulation des HDL-Plasmaspiegels und beeinflusst die selektive hepatische Aufnahme von HDL-Cholesterolester (McNeish et al. 2000; Ragozin et al. 2005; Singaraja et al. 2006).

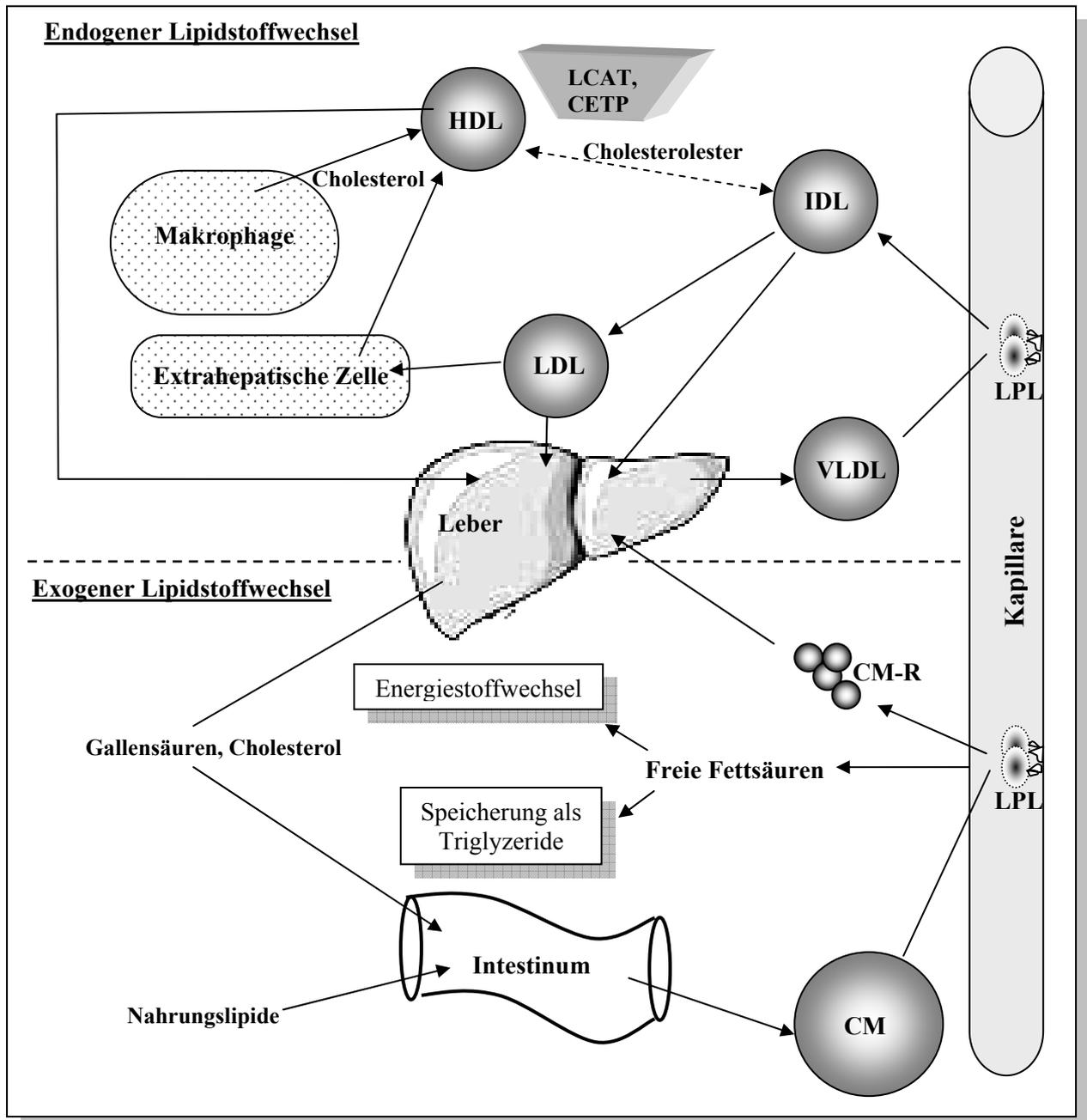


Abb.1: Der Stoffwechsel der Lipoproteine. Der endogene und der exogene Stoffwechselweg beginnen jeweils mit der Produktion triglyzeridreicher Lipoproteine, den VLDL bzw. den Chylomikronen (CM). Nach Triglyzeridhydrolyse der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL) entstehen die cholesterolreicheren LDL bzw. Chylomikronen-Remnants (CM-R). Beide werden durch rezeptorvermittelte Endozytose abgebaut. Der reverse Cholesteroltransport dient der Rückführung von Cholesterol aus peripheren Geweben zur Leber, welche das einzige Organ ist, das größere Mengen an Cholesterol ausscheiden kann. Am reversen Cholesteroltransport sind High-density Lipoprotein (HDL), Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase (LCAT) und Cholesterolester-Transferprotein (CETP) beteiligt.

1.3. APOLIPOPROTEIN AV

Das Apolipoprotein AV wurde im Jahr 2001 unabhängig durch vergleichende Sequenzanalysen (Pennacchio et al. 2001) und als ein mit der frühen Phase der Leberregeneration assoziiertes Protein entdeckt (van der Vliet et al. 2001).

1.3.1. Lokalisation des ApoAV Gens

Das Gen befindet sich 27 kbp distal (3') von ApoAIV, also in unmittelbarer Nähe des ApoAI/CIII/AIV-Lokus auf Chromosom 11q23 und kann damit zu diesem Gencluster hinzugerechnet werden. Der starke Einfluss dieses Genlocus auf mit dem Lipidstoffwechsel assoziierte Parameter bei Menschen und Mäusen ist bereits vielfach beschrieben worden (Groenendijk et al. 2001; Talmud et al. 2002). Von besonderer Bedeutung ist hierbei das ApoCIII, ein von der Leber und Intestinum sezerniertes Polypeptid, welches Bestandteil der HDL, VLDL und Chylomikronen ist und die Lipoproteinlipase, die hepatische Lipase und die hepatische Aufnahme der Reste von triglyzeridreichen Partikeln hemmen kann (Krauss et al. 1973; Kinnunen and Ehnolm 1976; Wang et al. 1985; McConathy et al. 1992). So korreliert ein hoher ApoCIII Spiegel positiv mit Triglyzeridwerten im Plasma (Ito et al. 1990).

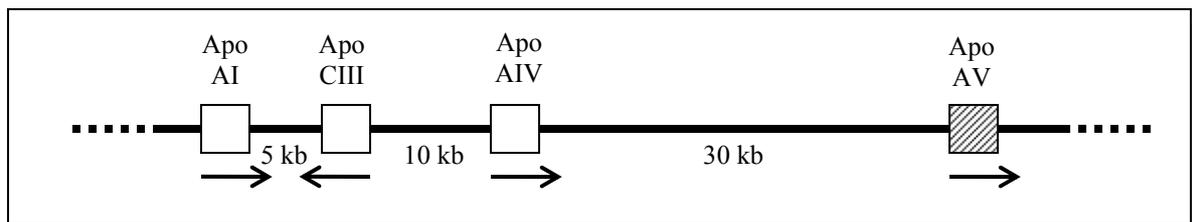


Abb.2: Schematischer Aufbau des Apolipoproteinclusters auf Chromosom 11q23. Die Transkriptionsrichtung sowie die Entfernung zwischen den Genen ist gekennzeichnet.

1.3.2. Charakteristika des ApoAV Genproduktes

Das murine Genprodukt des ApoAV ist ein 368 Aminosäuren langes Protein mit signifikanter Homologie zu vielen bekannten Apolipoproteinen und vor allem zum murinen ApoAIV (24 % identisch, 49 % gleichartig). Das entsprechende humane Protein besteht aus 366 Aminosäuren, dessen Sequenz zu 71 % der des ApoAV der Maus entspricht (78 % gleichartig) und ebenfalls zum humanen ApoAIV eine ausgeprägte Homologie aufweist (Pennacchio et al. 2001). Das 39 kDa schwere Polypeptid mit amphipathischer α -helikaler Sekundärstruktur wird ausschließlich in der Leber synthetisiert und anschließend ins Plasma abgegeben, wo man es – zumindest bei normolipämischen Individuen – in einer im Vergleich zu anderen Lipoproteinen geringen Konzentration von 0,05 – 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Mensch) bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ (Ratten) finden kann (Baroukh et al. 2004). Hier liegt es mit triglyzeridreichen Partikeln und mit HDL assoziiert vor.

1.3.3. Die Rolle des ApoAV bei der Leberregeneration

Im Rahmen einer tierexperimentellen Analyse von Genen, die in die Regeneration der Leber involviert sind, zeigte sich 6 Stunden nach partieller Hepatektomie von Ratten eine signifikante Zunahme der Expression des bis dahin noch unbekanntes Apolipoproteins AV (van der Vliet et al. 2001). Hiernach normalisierte sich der Plasmaspiegel recht schnell, so dass man von einer sehr geringen Halbwertszeit des frei zirkulierenden ApoAV-Proteins ausgegangen ist. Da die Plasmaspiegel der ApoAV enthaltenden Lipoproteine während der gesamten Leberregenerationsphase jedoch annähernd konstant blieben, ist eine spezifische Funktion des ApoAV bei der frühen Phase der hepatischen Regeneration wahrscheinlich. Die Autoren vermuten eine ApoAV vermittelte Stimulation der Lipidaufnahme in die Hepatozyten zur Unterstützung der *de novo* Synthese von Biomembranen. Die exakte Funktion des Apolipoproteins bei der Leberregeneration ist jedoch immer noch nicht vollständig geklärt.

1.3.4. Der Einfluss von ApoAV auf den Plasmatriglyzeridspiegel

Die wohl bedeutsamste Eigenschaft dieses neu entdeckten Apolipoproteins ist die Fähigkeit, die Triglyzeride im Blut zu senken. Der Einfluss von ApoAV auf den plasmatischen Triglyzeridspiegel ist durch zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien gut belegt. So haben ApoAV transgene Mäuse einen um zwei Drittel erniedrigten und ApoAV Knockout Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel als die jeweilige Kontrollgruppe (Pennacchio et al. 2001). Darüber hinaus reduziert eine adenovirale Überexpression von ApoAV bei Mäusen den Triglyzerid- und Cholesterolspiegel erheblich (van der Vliet et al. 2002). Punktmutationen im ApoAV-Gen (so genannte single nuclear polymorphisms, SNPs) sind in zahlreichen klinischen Studien mit signifikanten Unterschieden von Triglyzeridwerten im menschlichen Blutplasma und mit der familiär kombinierten Hyperlipoproteinämie (FCHL) in Zusammenhang gebracht worden (Pennacchio et al. 2001; Evans et al. 2003; Pennacchio and Rubin 2003; Talmud et al. 2005; Tang et al. 2006). Des Weiteren ist ein starker Einfluss von PPAR α auf die Expression des ApoAV-Gens mehrfach beschrieben worden (Priour et al. 2003; Vu-Dac et al. 2003). PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) ist ein Zellkernrezeptor, welcher die Triglyzeride im Plasma durch Variation der Transkriptionsrate von in den Fettstoffwechsel involvierten Genen senken kann (Hertz et al. 1995; Staels et al. 1995; Schoonjans et al. 1996). Neben einer möglichen Stimulation der Lipoproteinlipase-Expression in der Leber oder einer Inhibition der hepatischen ApoCIII Produktion wird die Transkriptionsrate des ApoAV Gens durch PPAR α erhöht. Große Bedeutung erhält dieser Zellkernrezeptor unter anderem durch seine Aktivierung durch die zur Therapie des Metabolischen Syndroms und zur allgemeinen Triglyzeridsenkung eingesetzten Fibrate (Scott 2003; Cziraky 2004; Fruchart and Duriez 2006).

Die aufgezeigten Daten zeigen, dass ApoAV in der Regulation des Triglyzeridmetabolismus eine Schlüsselrolle innehat. Die molekularen Mechanismen der ApoAV-induzierten Triglyzeridsenkung konnten bisher jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Eine Verminderung der Plasmatriglyzeride könnte entweder durch eine Abnahme der Produktion oder durch eine Beschleunigung des Abbaus

triglyzeridreicher Lipoproteine zustande kommen. Aufgrund der chemischen Eigenschaften des ApoAV (hohe Lipidaffinität, niedrige Elastizität) wurde aber auch vermutet, dass es den zweiten Schritt der VLDL-Zusammensetzung in der Leber durch Bindung an Lipide und Zellmembranen beeinträchtigen und hierdurch die VLDL Produktion senken könnte (Weinberg et al. 2003).

Andererseits wäre auch eine beschleunigte Hydrolyse triglyzeridreicher Partikel durch direkte Interaktion mit der Lipoproteinlipase (LPL) oder eine Modifikation anderer Apolipoproteine denkbar.

1.3.5. Lipoproteinlipase und plasmatische TG-Hydrolyse

Die Lipoproteinlipase (LPL) als Schlüsselenzym der plasmatischen Triglyzeridhydrolyse erscheint als Angriffspunkt des ApoAV möglich. Sie ist ein homodimer vorliegendes Glykoprotein und vermittelt die Hydrolyse von Triglyzeriden aus Chylomikronen und VLDL. Die hierbei entstehenden freien Fettsäuren können von den Parenchymzellen der Organe aufgenommen und assimiliert werden. Sie findet sich vor allem im Fettgewebe, im Herzen, in der Lunge und in der Skelettmuskulatur. Im Hungerzustand wird die Ausprägung der LPL im Fettgewebe vermindert, im Herz und in der Skelettmuskulatur gesteigert (Übersichten in Goldberg 1996; Zechner 1997). Durch die Funktion der LPL werden Plasma-Triglyzeride gesenkt, die HDL-Bildung unterstützt und die Organe mit Fettsäuren versorgt. Weiterhin ist die LPL strukturell an der zellulären Aufnahme von Lipoproteinen und der selektiven Cholesterolester-Aufnahme beteiligt. Homozygote Defizienz der LPL-Aktivität führt zur Chylomikronämie. Einige heterozygote Mutationen im LPL-Gen wurden mit FCHL und KHK assoziiert (Übersicht in Brunzell and Fujimoto 1995; Merkel et al. 2002). Die Aktivität der LPL wird durch das Apolipoprotein CII gesteigert und kann durch ApoCIII gemindert werden.

1.3.6. ApoCIII und Hypertriglyzeridämie

Eine positive Korrelation zwischen hohen ApoCIII- und Plasmatriglyzeridspiegeln ist durch mehrere tierexperimentelle Studien belegt (Aalto-Setälä et al. 1992; Aalto-Setälä et al. 1996). Da ApoCIII und ApoAV eine genau gegensätzliche Wirkung auf die Plasmatriglyzeride besitzen wurde vermutet, dass die Wirkung von ApoAV durch ApoCIII vermittelt werden könnte. Dafür spricht die Beobachtung, dass Modifikationen an diesem Genlocus bei Mäusen häufig zu Veränderungen in benachbarten Genregionen führten (Weinstock et al. 1997; Vergnes et al. 2000). Des Weiteren weisen ApoAV transgene Mäuse einen um 40% verminderten und ApoAV defiziente Mäuse einen um 90% erhöhten ApoCIII-Plasmaspiegel auf (Pennacchio et al. 2001). Gegen diesen theoretischen Ansatz sprechen *in vitro* Studien (Schaap et al. 2004) und Experimente an Mäusen, die doppelt defizient bzw. transgen für ApoCIII und ApoAV sind (Baroukh et al. 2004). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkung von ApoAV auf den Triglyzeridspiegel zumindest zum Teil unabhängig von ApoCIII ist.

1.3.7. Hepatische VLDL-Produktion und mögliche Beeinflussung durch ApoAV

Die hepatische VLDL-Produktion beginnt mit der Synthetisierung von ApoB100 im rauen ER mit nachfolgender Sekretion in Form eines VLDL-Precursor-Partikels in das ER-Lumen. Dort wird es mit

Triglyzeriden, die ihrerseits aus dem glatten ER stammen, zu VLDL komplexiert (Dixon and Ginsberg 1992). Ein microsomales Transferprotein (MTP) scheint eine essentielle Bedeutung bei der initialen Akkumulation der Triglyzeride und anschließendem Transfer auf ApoB zu besitzen (Millar and Packard 1998; Kulinski et al. 2002). Nach Modifizierung der neu gebildeten VLDL durch Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, sowie durch Ausbildung von Disulfidbrücken werden die naszierenden VLDL in sekretorischen Vesikeln in den Disse'schen Raum sezerniert. Abhängig von der Beladung mit Triglyzeriden werden große, triglyzeridreiche und weniger dichte VLDL1, sowie dichtere, triglyzeridärmere VLDL2 in den Hepatozyten gebildet (Millar and Packard 1998). Im weiteren Verlauf nehmen die VLDL zusätzlich ApoAV, ApoE- und ApoC-Moleküle auf, die zum einen als Cofaktoren der LPL die Hydrolyse der Triglyzeride aktivieren bzw. inhibieren (ApoCII bzw. ApoCIII), zum anderen aber eine vorzeitige Entfernung aus der Zirkulation verhindern (ApoCI, ApoCIII). Das ApoAV-Protein könnte aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften die Zusammensetzung von VLDL oder Chylomikronen durch Bindung an Lipide und Zellmembranen beeinflussen und hierdurch die Produktion triglyzeridreicher Lipoproteine senken (Weinberg et al. 2003). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem ApoAV Protein und dem mikrosomalen Triglyzerid-Transferprotein festgestellt worden sind (Beckstead et al. 2003).

1.4. ZIEL DER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit soll der Mechanismus der ApoAV-vermittelten Senkung der plasmatischen Triglyzeride weiter untersucht werden.

Hierzu wurden ApoAV transgene Mäuse verwendet, die außer dem murinen ApoAV zusätzlich das entsprechende humane Apolipoprotein exprimieren (Pennacchio et al. 2001). Zunächst wurde das humane ApoAV-Protein im Mausplasma mittels etabliertem Westernblot-Verfahren nachgewiesen. Anschließend wurden *in vivo* Studien durchgeführt, mit denen die Auf- und Abbauraten von radioaktiv markierten Triglyzeriden in triglyzeridreichen Partikeln mit denen von Wildtyp-Kontrollgruppen verglichen werden konnten. Außerdem wurden Lipoproteinprofile von Plasmaproben der verwendeten Mäuse mittels FPLC und Ultrazentrifugation mit anschließendem Triglyzerid- bzw. Cholesterolassay erstellt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Chemikalien

In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (pro analysi) verwendet. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen oder Merck, Darmstadt bezogen.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholesterol und Triglyzeride, Standardlösung für Assays	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithioreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Karl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Heptan	Merck, Darmstadt
Histoacryl-Gewebekleber	Braun-Aesculap, Tuttlingen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumbromid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS=(3-(N-Morpholino) Propansulfansäure)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	J.T. Baker, Holland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
N-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Szintilationsflüssigkeit, Ultima Gold	Packard, Holland
Trans-1,2-Diaminocyclohexan- -NNN; Tetraessigsäure (CDTA)	Merck, Darmstadt
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen

Wasser	Wasser wurde mit einem BiDest der Firma F. Gössner, Hamburg doppelt destilliert und autoklaviert.
--------	---

2.1.2. Enzyme und Proteine

Enzym/Protein	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

2.1.3. Nucleotide

Nucleotid	Hersteller
Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP), alle für PCR	Roche, Mannheim
Marker für 100 bp	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Primer hA5Tg/1FW Primer hA5Tg/2BW	MWG Biotech AG, Ebersberg

2.1.4. Material für Westernblot

Material	Hersteller
1. Antikörper (polyklonal, Kaninchenserum)	Eurogentech, Belgien
2. Antikörper goat anti rabbit IgG HRP linked	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Bis Tris Gel 4–12 % NuPAGE	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences, Freiburg
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Sponge Pads für XCell II	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Protein Marker See Blue Plus 2	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Transfermembran Trans-Blot 7 x 8,4 cm	BIO-RAD, München

2.1.5. Narkosemittel

Narkosemittel	Hersteller
Ketamin, 50 mg/ml	Atarost, Twistringen
Rompun 2 %	Bayer Vital, Leverkusen
Diethylether	Merck, Darmstadt

2.1.6. Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Heparinisierte Hämatokritkapillaren	Hirschmann, Eberstadt
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
PCR-Röhrchen	Simport, Kanada
Phenolfeste Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Starkwandige Reagenzglasröhrchen (Assistent)	Francke, Hamburg
Verschließbare Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugationsröhrchen	Beckman, München

2.1.7. Geräte

Gerät	Hersteller
Betacounter Tri-carb, 1600 TR	Packard, Frankfurt
FPLC Anlage	Amersham Biosciences, Freiburg
Fraktionssammler	Pharmacia LKB, Upsala Schweden
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gel-Elektrophoresekammer	Biorad, München
Gelkammer XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Hamiltonspritze	Carl Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Laborzentrifuge Universal 16 R	Hettich, Tuttlingen
Mikrotiterplattenlesegerät MRX 2	Dynex Technologies, Frankfurt a. M.
PCR-Thermocycler TP48	Biometra, Göttingen
Powersupply Power Ease 500	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Superose 6 Säule	Pharmacia LKB, Upsala Schweden
Ultraturrax T25 basic	IKA-werke, Staufen
Ultrazentrifuge TL 100	Beckman, München
Ultrazentrifuge Model L5-50	Beckman, München
Videodokumentationsgerät für Agarose-Gele	Intas, Göttingen

2.1.8. Standard-Pufferlösungen

Puffer	Inhaltsstoffe
Blotpuffer (für 1 Gel)	4,08 g Bicine, 5,23 g Bis Tris, 0,29 g EDTA und 100 ml Methanol in 1 Liter Aqua dest. Bei 2 Gelen werden 200 ml Methanol verwendet.
FPLC-Puffer	1 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
MOPS-SDS Laufpuffer (20-fach konzentriert)	104,4 g MOPS, 60,6 g Tris-Base, 10,0 g SDS, 3,0 g EDTA in 500 ml Aqua dest.
PCR-Puffer (Stammpuffer für alle PCR-Reaktionen)	11 % DMSO, 19 mM NH_4SO_4 , 76 mM Tris pH 8,8, 7,6 mM MgCl_2 , 11 mM DTT, 193 mg/ml BSA, 23 mM Desoxynukleosidtriphosphat. Ansatz für 50 ml PCR-Puffer: 5,68 ml DMSO, 0,945 ml NH_4SO_4 , 3,8 ml Tris, 380 μl 1M MgCl_2 , 570 μl 1M DTT, 9,65 ml 1mg/ml BSA und 115 μl Desoxynukleosidtriphosphat werden gemischt und mit sterilem, gefiltertem Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt.
Phosphat Buffered Saline (PBS)	8 g NaCl, 0,2 g KCl, Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 in 1 Liter Aqua dest.
PBS-Tween (0,1%)	100 ml PBS, 1 g Tween in 1 Liter Aqua dest.
TBE-Puffer (10-fach konzentriert)	108 g Trisbase, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 Liter Aqua dest.
TE-Puffer	500 μl 1 M Tris-HCl pH 7,6 und 100 μl 0,5 M EDTA pH 8,0 in 50 ml Aqua dest.

2.2. METHODIK

2.2.1. Versuchstiere – allgemeine Maßnahmen

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Mäuse, die bezüglich aller üblichen Serologien – insbesondere des Maus-Hepatitis-Virus (MHV) – negativ waren. Zur Prävention einer möglichen Durchseuchung der Stämme wurden die Tiere zuerst einem Embryotransfer unterzogen und danach in speziellen, pathogenarmen Räumen der Versuchstierhaltung des UKE untergebracht. Dort wurden sie mit normaler Nager-Diät gefüttert und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Sämtliche Kreuzungsschritte wurden mit dem Inzuchtstamm FVB durchgeführt, um schrittweise einen weitgehend genetisch homogenen Hintergrund zu schaffen. Um die Versuchsbedingungen weiter zu verbessern, wurden stets Geschwistertiere miteinander verglichen.

Alle Tierversuche wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit genehmigt, bzw. bei dieser angezeigt. Es bestanden Genehmigungen nach §7 TierSchG (20/99) und §6 TierSchG (UKE-VTH-Aktenzeichen A65, A66). Organentnahmen hatten das interne Registrierzeichen Org 163 der Universität Hamburg.

2.2.2. ApoAV transgene Mäuse

Diese Tiere wurden vom Genome Sciences Department, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, USA bezogen.

Um ApoAV transgene Mäuse zu erzeugen, wurde ein 26 kbp großes Xho I Genfragment, welches das humane ApoAV codiert, in das Mausgenom integriert. Dieses Fragment wird – ebenso wie das endogene Maus ApoAV Gen – ausschließlich in der Leber exprimiert (Pennacchio et al. 2001).

Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe ist der Plasma-Triglyzeridspiegel von transgenen Mäusen um circa zwei Drittel erniedrigt.

2.2.3. Kreuzungsstrategie

Die aus Berkeley bezogenen Mäuse waren ausschließlich hemizygot bezüglich des Transgens. Um eine transgene und eine Wildtyp-Gruppe zu erhalten, wurde jeweils ein hemizygoties Tier mit einer Wildtyp-Maus gekreuzt. Die Nachkommen sollten entsprechend den Mendelschen Regeln zur Hälfte das Transgen tragen und die anderen 50 % das Wildtyp Genom. Homozygotie bezüglich des Transgens erwies sich als ungünstig, da diese mit den üblichen PCRs nicht von hemizygotem Auftreten zu differenzieren war und hierdurch Versuchsergebnisse hätten verfälscht werden können.

2.2.4. Genotypisierung der Mäuse

2.2.4.1. Allgemeines Prinzip

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch DNA-Gewinnung und Reinigung aus einer Schwanzspitzenbiopsie, anschließender PCR und Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Um die DNA aus den Zellen zu lösen, wurden vor der DNA-Extraktion die Zellmembranen durch einen Lysis-Puffer zerstört und die Proteine durch das Enzym Proteinase K verdaut.

2.2.4.2. Schwanzbiopsieentnahme

Die Mäuse wurden zunächst in ein abdeckbares Gefäß, das mit Ether getränkten Zellstoff enthielt, gesetzt und so narkotisiert. Die Narkosetiefe konnte anhand der Atemfrequenz und -tiefe, sowie Blinkreflexen gesteuert werden: Bei tiefer Atmung mit niedriger Frequenz war eine ausreichende Narkosetiefe erreicht und den Mäusen wurde mit einem Skalpell 5 mm der Schwanzspitze entnommen. Gleichzeitig wurde jede Maus mit einer Ohrlochzange markiert, damit sie für die nachfolgenden Versuche identifizierbar war. Die durch die Biopsie entstandene Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber versorgt.

2.2.4.3. Verdau der Schwanzbiopsie

Der Lysis-Puffer wurde wie folgt hergestellt:

Für eine 2fache Konzentration wurde 480 g Harnstoff in ca. 150 – 200 ml Aqua dest auf einer Heizplatte unter Rühren gelöst. Anschließend wurden nacheinander 33 ml 30 %igen Sarkosyls, 200 ml 1 M Tris-HCL pH 8,0, 80 ml 5 M NaCl und 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 hinzugefügt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Endkonzentrationen des Puffers setzten sich wie folgt zusammen: Harnstoff 2 M, Sarkosyl 0.25%, 0,05 M Tris-HCL pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 5 mM.

Die Schwanzspitze wurde in 400 µl Lysis Puffer mit 40 µl 14 mg/ml Proteinase K über Nacht im Heizblock bei 56 °C verdaut.

2.2.4.4. Extraktion genomischer DNA

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 400 µl davon in das die verdaute Schwanzspitze enthaltende Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde gevortext und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die oberste Phase des Gemisches wurde abgenommen, in 1 ml Ethanol gegeben und kräftig geschüttelt. Hierbei fiel die genomische DNA aus und konnte mittels einer Hämatokritkapillare aus dem Ethanol in 200 µl TE-Puffer überführt werden. Die so erhaltene DNA ist bei 4 °C über mehrere Wochen stabil und kann durch PCR untersucht werden.

2.2.4.5. PCR

Zur Bestimmung des Apo AV Transgens wurde eine bereits etablierte 2-Primer-PCR verwendet.

Primer hA5Tg/1FW (5'-CCC GCT GCA GTC CCC AGA AT-3') und

Primer hA5Tg/2BW (5'-CAG GGT CGA GGG CTC TTG TCC T-3')

amplifizieren eine Bande von 148 bp (=Basenpaaren) in Gegenwart des intakten Apo AV Transgens.

Bei einem Reaktionsvolumen von 25,5 µl wurden 20 µl PCR-Puffer, je 0,5 µl der Primer hA5Tg/1FW und hA5Tg/2BW (10 pmol/µl), 0,5 µl Taq DNA Polymerase, und 4 µl genomische DNA aus der Schwanzspitze eingesetzt. Die Proben wurden 1 min bei 95 °C denaturiert, dann folgten 35 Zyklen a 1 min bei 95 °C, 1 min bei 57 °C und 3 min bei 72 °C.

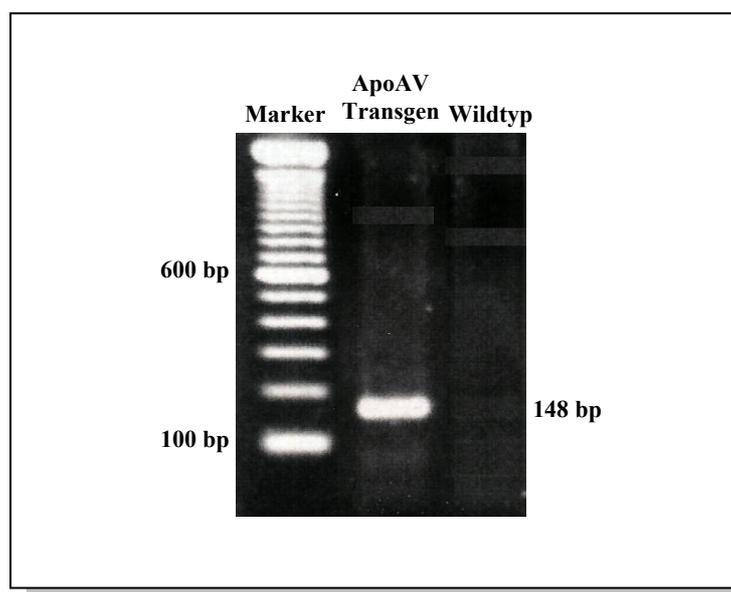


Abb. 3: PCR zum Nachweis des ApoAV Transgens. Als Marker wurden 100 bp DNA-Fragmente verwendet, wobei die 600 bp-Bande dicker als die übrigen erscheint. Bei Vorliegen des Transgens wurde eine Bande auf Höhe von 148 bp sichtbar.

2.2.4.6. Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5 %iges Agarose-Gel verwendet. Hierfür wurden 100 ml TBE-Puffer mit 1,5 g Agarose in der Mikrowelle für 2 min bei 600 Watt erhitzt und anschließend 5 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid hinzupipettiert. Das Gemisch wurde dann in eine Gelkammer mit einem 15- oder 20-zähligen Kamm gegossen. Sobald das Gel abgekühlt und fest war, konnte der Kamm gezogen und das nun mit Taschen versehene Gel in die Elektrophoresekammer gelegt werden. Diese wurde dann soweit mit TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche wurden 10 µl eines 100 bp Markers zur Größenbestimmung der Banden hinein gegeben. In die folgenden Taschen wurden nun 15 µl der PCR-Proben pipettiert, die zuvor mit 3 µl Bromphenolblau (BPB)-Puffer vermischt wurden, also insgesamt 18 µl (für den BPB-Puffer löst man eine Spatelspitze BPB in Aqua dest. und verdünnt hiermit 87 %-iges Glycerin auf 80 %). Das Amplikon (= PCR-

Produkt) wurde nun bei 110 Volt eine Stunde lang aufgetrennt, wonach die Banden unter UV-Licht (254 nm) durch Interkalation der DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden konnten.

2.2.5. Western Blot

2.2.5.1. Prinzip

Der Westernblot ermöglicht das gezielte Aufspüren eines bestimmten Proteins bzw. Polypeptids mit hoher Sensitivität und Spezifität. Das Verfahren beruht auf elektrophoretischer Auftrennung eines Proteingemisches mittels SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese mit anschließender Übertragung („blotting“) und Fixation auf Nitrozellulosemembranen. Die Detektion und Identifizierung der Proteine bzw. Polypeptide erfolgt durch Antigen-Antikörper-Reaktionen und anschließender Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten monoklonalen Zweitantikörper. Dieser kann nach Zugabe von ECL-Lösung auf einem Röntgenfilm durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

2.2.5.2. Blutentnahme bei Mäusen

Erwachsene Tiere wurden zur Blutentnahme mit Ether in eine Kurzzeitnarkose gelegt und das Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mittels heparinisierter Hämatokritkapillare gewonnen. Bei einer Blutentnahme von mehr als 100 µl wurden je 100 µl Blut 2 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5) zur Antikoagulation hinzugefügt. Nach der Blutentnahme der Mäuse wurde das Plasma durch Zentrifugation (5 Minuten bei 7000 rpm) von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes getrennt und abgenommen.

2.2.5.3. Detektion von ApoAV mittels etabliertem Westernblot-Verfahren

Zunächst wurde das frisch gewonnene Mausplasma mit einem β-Mercaptoethanol und SDS enthaltenden Samplebuffer 10 min bei 94 °C aufgeköcht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch β-Mercaptoethanol und Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der anlagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist.

Die Auftrennung der Plasmaproteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese. Hierfür wurde zunächst ein fertig erhältliches Bis-Tris Gel (4-12%) in die Gelkammer eingesetzt und diese hiernach mit MOPS-Laufpuffer aufgefüllt. In die erste Tasche des Gels wurden dann 10 µl des Protein-Markers, in die restlichen Taschen jeweils 15 µl der Plasmaproben gefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte nach Anlegen einer Spannung von 200 V für 35 Minuten.

Der nächste Schritt bestand aus dem Transfer der getrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Dabei wurde ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt (1 h bei 25 V, 17 W) und Blotpuffer anstatt des MOPS-Laufpuffers verwendet, wodurch die Proteine aus der

Gelmatrix auf die Membran gelangen und dort gebunden werden konnten, um sie den Antikörpern bei nachfolgender Inkubation zugänglich zu machen.

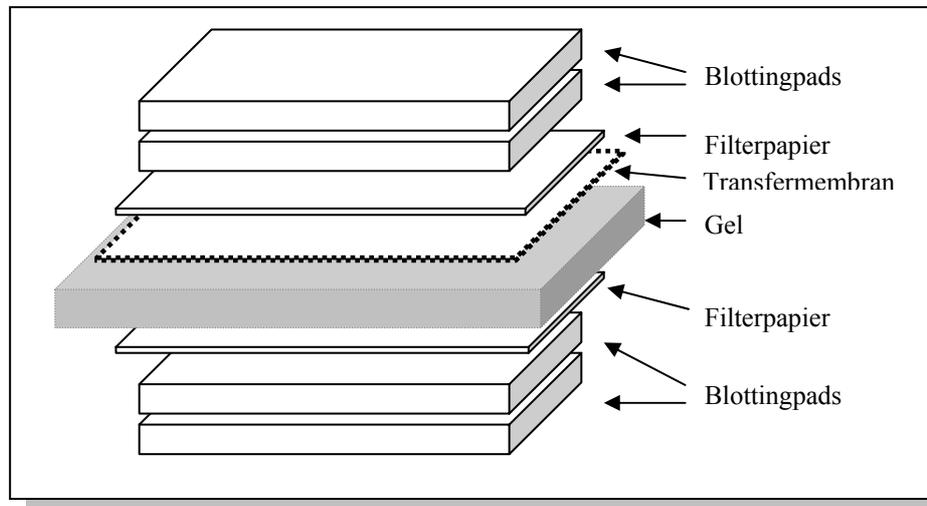


Abb. 4: Schema des Proteintransfers: In diesem „Sandwich“ – welches sich unter elektrischer Spannung in einer Blotpufferlösung befindet - wandern die Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran.

Hierauf folgte ein einstündiges Blocken unspezifischer Bindungen mit 50 ml BSA 10 % unter ständigem Schwenken. Nach insgesamt 4 Waschgängen - 1 x 15 min und 3 x 5 min - mit PBS-Tween 0,1 % wurde die Membran mit dem ersten Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Antikörper diente das Antiserum eines Kaninchens („rabbit α hAV“) in 1:1600facher Verdünnung. Diese polyklonalen Antikörper richten sich gegen das C-terminale Ende des humanen ApoAV-Peptids.

Nach Wiederholung der Waschprozedur mit PBS-Tween 0,1 % wurde schließlich mit dem zweiten Antikörper ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zweitantikörper bestand aus monoklonalen HRP gekoppelten goat anti-rabbit IgGs in 1:5000facher Verdünnung.

Nach erneutem Waschen mit PBS-Tween 0,1 % wurde die Membran 1 min in ECL-Lösung gelegt, abgetrocknet und in eine lichtundurchlässige Röntgenkammer mit Röntgenfilm transferiert. Nach genau einer Minute Belichtungszeit wurde der Film wieder entfernt und zur Filmentwicklung in ein Röntgengerät der Radiologischen Abteilung des UK Eppendorfs geschoben.

Nach der Entwicklung ist eine Bande auf Höhe von 39 kDa zu erwarten, da dies dem Molekulargewicht von ApoAV entspricht.

2.2.6. Lipoproteinprofil

2.2.6.1. Prinzip

Zur Bestimmung der Lipoproteinprofile einzelner Mäuse wurde bei diesen eine Nüchternblutentnahme durchgeführt und 60 μ l des so erhaltenen Plasmas sequentiell in einer Dichte von 1,006 g/ml und 1,062 g/ml ultrazentrifugiert (Havel et al. 1955). Alternativ zur Ultrazentrifugation wurde die so genannte Fast Performance Liquid Chromatographie (FPLC) zur Bestimmung der Lipoproteinprofile

der beiden verwendeten Mauslinien angewendet. Die VLDL, LDL und HDL enthaltenden Fraktionen wurden dann mittels eines kommerziell erhältlichen enzymatischen Farbttests auf Triglyzerid- und Cholesterolgehalt untersucht.

2.2.6.2. Nüchternblutentnahme

Für die Nüchternblutentnahme wurde den Mäusen nach 8stündigem Fasten (von 8.00 Uhr bis 16.00 Uhr) in bereits beschriebener Weise Blut abgenommen. Diese Fastenperiode hat sich als sinnvoll erwiesen, da Mäuse fast ausschließlich in der Dunkelpphase fressen. Insbesondere ein Fasten über Nacht erscheint unphysiologisch, da dies bei Versuchsdurchführung am nächsten Morgen eine fast 24stündige Nahrungskarenz der Tiere zur Folge hätte. Daher entspricht ein Fasten tagsüber bei Mäusen am ehesten einer Nüchternblutentnahme beim Menschen

2.2.6.3. Lipoproteinzentrifugation

60 µl PBS wurde in einem Ultrazentrifugationsröhrchen vorgelegt und mittels einer Hamilton-Spritze mit 60 µl Plasma unterlegt. Die Ultrazentrifugation wurde für 2,5 h bei 42000 rpm in einem Swing out Rotor Typ SW41 durchgeführt. Am Ende dieses Prozesses befanden sich in den oberen 60µl die VLDL, während in der unteren Phase HDL, LDL und IDL vorlagen.

Die untere Phase wurde nun mit einer Hamilton Spritze in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 60 µl KBr mit einer Dichte von 1,12 g/ml gemischt, um eine Dichte von 1,063 g/ml zu erreichen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für mindestens 6h bei 42000 rpm.

Die obere Phase mit den VLDL wurde zur weiteren Verwendung in ein verschließbares Reaktionsgefäß überführt. Nach der zweiten Zentrifugation enthielten die unteren 60 µl die HDL, die oberen die LDL und IDL. Zuerst wird die untere, dann die obere Phase abgenommen und ebenfalls zur weiteren Verwendung in ein verschließbares Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.6.4. Fast performance liquid chromatography

Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration nach der Methode von Rudel eingesetzt (Rudel et al. 1986). Dazu wurde eine Fast performance liquide chromatography (FPLC®)-Anlage (Amersham-Biosciences) mit einer Superose®-6-Säule verwendet, die einen für Plasmalipoproteine optimalen Trennbereich von 5-5000 kDa besitzt. 200 µl des zuvor gepoolten Plasmas wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in FPLC-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 0,15 M NaCl und 10mM EDTA) aufgetrennt. Das Probengemisch trennte sich durch unterschiedliche Adhärenz der verschiedenen Komponenten an den Gelmolekülen. Das Eluat wurde in insgesamt 35 0,5-ml-Fractionen gesammelt und bei 4° C aufbewahrt. In den so gewonnenen Fractionen kann nun der Triglyzerid- bzw. Cholesterolgehalt photometrisch bestimmt werden.

2.2.6.5. Triglyzerid- und Cholesterolbestimmung

Triglyzerid- bzw. Cholesterolassays beruhen auf einem enzymatischen Farbttest, wobei die photometrisch bestimmte Extinktion des in der Reaktion entstehenden Farbstoffes proportional zur Triglyzerid- bzw. Cholesterol-Konzentration ist. Eine Standardreihe im Dreifachansatz, aus der sich später der Gehalt an Triglyzeriden oder Cholesterol der Plasmaproben errechnen ließ, wurde für jede verwendete Mikrotiterplatte bestimmt. Es wurden 5 µl Plasma bzw. 10 µl Probe nach sequentieller Lipoprotein-Zentrifugation bzw. FPLC im Dreifachansatz eingesetzt. Der jeweilige Standard der Reagenzien (200 mg/ml bei der Cholesterol-Bestimmung und 250 mg/ml bei der Triglyzerid-Bestimmung) wurde auf 50 und 100 mg/ml verdünnt und jeweils 5µl im Dreifachansatz verwendet. Jede Probe wurde mit 200 µl der Triglyzerid-, bzw. Cholesterol-Reagenzien (Standardlösungen für Assays; Roche, Mannheim) in einer Mikrotiterplatte gemischt. Anschließend wurden die Assays 5 min bei 37 °C (Cholesterol) bzw. 30 min bei Raumtemperatur (Triglyzeride) inkubiert. Aus der Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt und der Proportionalitätsfaktor errechnet. Somit konnte aus der Extinktion der Proben durch Multiplikation mit dem Proportionalitätsfaktor der Triglyzerid- bzw. Cholesterol-Gehalt in mg/ml berechnet werden.

2.2.7. *In vivo* Studien

2.2.7.1. Prinzip

Bei dem verwendeten Tiermodell sind Veränderungen der Produktion und/oder des Abbaus triglyzeridreicher Lipoproteine zu erwarten. Es wurden metabolische Studien durchgeführt, mit denen sich der Abbau und die Produktion von VLDL bzw. Chylomikronen bestimmen lassen. Zunächst wurde der postprandiale Anstieg der Chylomikronenproduktion durch orale Gabe von Olivenöl mit radioaktiv markierter Ölsäure bestimmt. In den weiteren Produktionsstudien wurde den Mäusen zunächst Tyloxapol injiziert, um sämtliche enzymatische Abbauprozesse zu blockieren. Hierauf folgte entweder eine orale Applikation radioaktiv markierter Ölsäure (Chylomikronen Produktion) oder eine venöse Injektion radioaktiv markierter VLDL.

Für die Abbaustudie wurde *in vivo* markiertes VLDL von ApoAV defizienten Mäusen intravenös appliziert.

2.2.7.2. Produktionsstudien

Bei allen durchgeführten Produktionsstudien wurden die Mäuse 8 h vor Beginn des Experiments gefastet.

Um den postprandialen Anstieg der Triglyzeridparameter im Blutplasma nach oraler Fettbelastung zu untersuchen, wurden zunächst jeweils 100 µl Olivenöl - welches zuvor mit 40µCi [1-¹⁴C]-Ölsäure (Amersham Biosciences, Freiburg) markiert worden ist – oral verabreicht und die Versuchstiere anschließend mit Ether narkotisiert. Anschließend wurde Blut zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 30,

60, 120, 180 und 240 Minuten) aus dem retroorbitalen Plexus entnommen. Aus dem durch nachfolgende Zentrifugation (5 min bei 7000 rpm) gewonnenen Plasma wurde dann der Lipidanteil nach der Methode von Dole *et al* extrahiert und die dort vorhandene Radioaktivität gemessen. Zusätzlich wurde der Triglyzerid-Gehalt der Proben photometrisch bestimmt.

Um die plasmatische Hydrolyse zu inhibieren, wurde den Versuchstieren bei den nachfolgenden Produktionsstudien zunächst das Detergens Triton WR 1339 verabreicht. Vor intravenöser Applikation des Tritons wurden die Mäuse (je 6 Tiere pro Genotyp) mit Ether narkotisiert und die zur Injektion vorgesehene Stelle rasiert. Anschließend wurde den Mäusen eine 10 %ige Triton WR 1339 Lösung (Tyloxapol, Sigma) in einer Dosierung von 500 mg/kg injiziert. Zur Bestimmung der intestinalen Chylomikronenproduktion wurde den Mäusen wiederum 100 µl Olivenöl, welches 40 µCi [1-¹⁴C]-Ölsäure (Amersham Biosciences, Freiburg) enthielt, oral verabreicht und der Versuch in oben beschriebener Weise fortgeführt.

Um die hepatische VLDL Produktionsrate bestimmen zu können, wurden zwei Minuten nach der Triton-Injektion jeweils 100 µCi [2-³H] Glycerol in die Schwanzvene appliziert und nach 2, 60 und 120 Minuten unter Narkose Blut in bereits beschriebener Weise entnommen. Anschließend wurde ebenfalls eine Lipidextraktion mit anschließender Radioaktivitätsmessung und photometrischer Triglyzerid-Bestimmung durchgeführt. Um die Radioaktivität speziell in der VLDL-Fraktion bestimmen zu können, wurde anschließend eine Lipoprotein-zentrifugation (2,5 h bei 42000 rpm in einem Swing out Rotor Typ SW41) durchgeführt und die Radioaktivität in der so erhaltenen VLDL-Fraktion gemessen.

2.2.7.3. Abbaustudien

Zur Untersuchung des Umsatzes von Triglyzeriden in VLDL wurden diese *in vivo* markiert. Hierfür wurden 500µCi an Albumin gebundene [1-³H] Palmitinsäure (Amersham, Arlington Heights, USA) in die Schwanzvene von ApoAV defizienten Mäusen injiziert und nach 60 min Blutentnahmen durchgeführt. Durch Lipoprotein-zentrifugation wurde anschließend die VLDL-Fraktion der Plasmaproben isoliert.

8 h vor Beginn des Experiments wurden die Mäuse (7-8/Gruppe) gefastet. Unter Barbiturat-Narkose wurden ihnen dann die radioaktiven VLDL-Partikel in die Schwanzvene injiziert, Blutentnahmen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus folgten unter Narkose 2, 5 und 10 min danach. Nach den 10 min wurden die Mäuse erneut mit 10µl/g Körpergewicht Ketaxyl narkotisiert und anschließend der Brust- und Bauchraum eröffnet. Zur Blutentnahme wurde hier der rechte Ventrikel punktiert. Anschließend wurde nach Öffnung des rechten Vorhofs das Gefäßsystem der Maus über den linken Ventrikel langsam mit 10 ml einer Lösung (PBS mit 1 U Heparin/ml, 37°C) perfundiert. Zur Untersuchung der spezifischen Organaufnahme der markierten VLDL-Fettsäuren wurden Herz, 4 Muskelbiopsate aus Ober- und Unterschenkel, 4 Leberlappen, Milz, Lunge, Fettgewebe und Niere entnommen, gewogen und danach in passende Counterröhrchen überführt.

2.2.7.4. Radioaktivitätsmessung

Zur Messung der ^3H - Counts wurden die Organe zunächst in 2 ml Solvable (Packard Instruments, Frankfurt) aufgelöst, die gelösten Organe und die Plasmaproben in entsprechende Röhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und anschließend zweifach für je 2 Minuten in einem Beta-Counter gemessen. Mit dem Beta-Strahler ^{14}C wurde entsprechend verfahren.

2.2.7.5. Lipidextraktion

Die Plasmalipide wurden nach der Methode von Dole *et al.* (Dole 1956) extrahiert. Die hierfür vorgesehenen Mengenangaben wurden an die geringen Volumina der Mausorgane angepasst. Zunächst wurde die Extraktionslösung aus 78 % Isopropanol (800 ml), 20 % Heptan (200 ml) und 2 % 1 M H_2SO_4 (20 ml), also insgesamt 1020 ml hergestellt.

Dem Plasma wurden 100 μl PBS hinzugefügt, anschließend die Extraktionslösung (1000 μl) zu den Proben gegeben und das Gemisch 30 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Danach wurden erst Heptan (400 μl) und dann Wasser (600 μl) hinzupipettiert und die Proben anschließend 10 min stehen gelassen. Hierbei entstanden zwei Phasen. Von der oberen Phase, welche die gelösten Lipide enthielt, wurden 300 μl abgenommen und in Betacounter-Röhrchen transferiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. KREUZUNG DER MÄUSE

Die aus Berkeley bezogenen Mäuse waren ausschließlich hemizygot bezüglich des Transgens. Diese Tiere wurden wiederum mit Wildtyp Mäusen verpaart. Wie bei einem den Mendelschen Regeln folgenden Erbgang zu erwarten war, besaßen circa die Hälfte der Nachkommen (44 %) das ApoAV Transgen, die anderen 56 % waren Wildtyp Tiere. Dies ist eine optimale Verteilung für vergleichende *in vivo* Experimente.

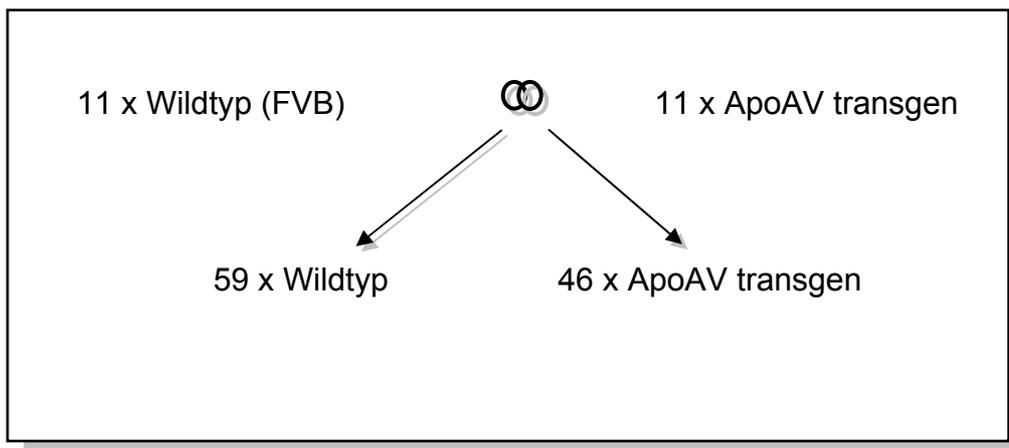


Abb. 5: Ergebnis der Mauskreuzung: Die ApoAV transgenen Tiere wurden aus Berkeley bezogen. Die Kreuzungen mit FVB-Tieren (Wildtyp) ergaben – wie nach den Mendelschen Regeln zu erwarten war – Nachkommen mit und ohne das ApoAV Transgen im Verhältnis von circa 1:1 (hier: 44 % Transgene und 56 % Wildtyp).

3.2. WESTERNBLOT

Um das humane ApoAV-Protein im Plasma von ApoAV transgenen Mäusen zu identifizieren, wurde ein Westernblot-Verfahren etabliert. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht die Spezifität des eingesetzten Erstantikörpers gegen das C-terminale Ende des humanen ApoAV-Peptids. Nach Auftragung von Plasmaproben einer transgenen Maus erkennt man eine kräftige Bande auf Höhe von circa 39 kDa. Da diese Bande aufgrund des ApoAV-Molekulargewichtes von 39 kDa auf der richtigen Höhe zu sein scheint und sich bei Wildtyp-Plasmaproben keine Bande erkennen lässt, kann man von einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion gegen das Proteinprodukt des Transgens ausgehen. Mischt man nun das Plasma von ApoAV transgenen Tieren und Wildtyp Mäusen in gleichem Verhältnis, so ergibt dies eine schwache Bande auf dem verwendeten Röntgenfilm. Dies lässt neben der Spezifität des Westernblots auf die Möglichkeit einer quantitativen Beurteilung des humanen ApoAV Gehalts im Mausplasma schließen.

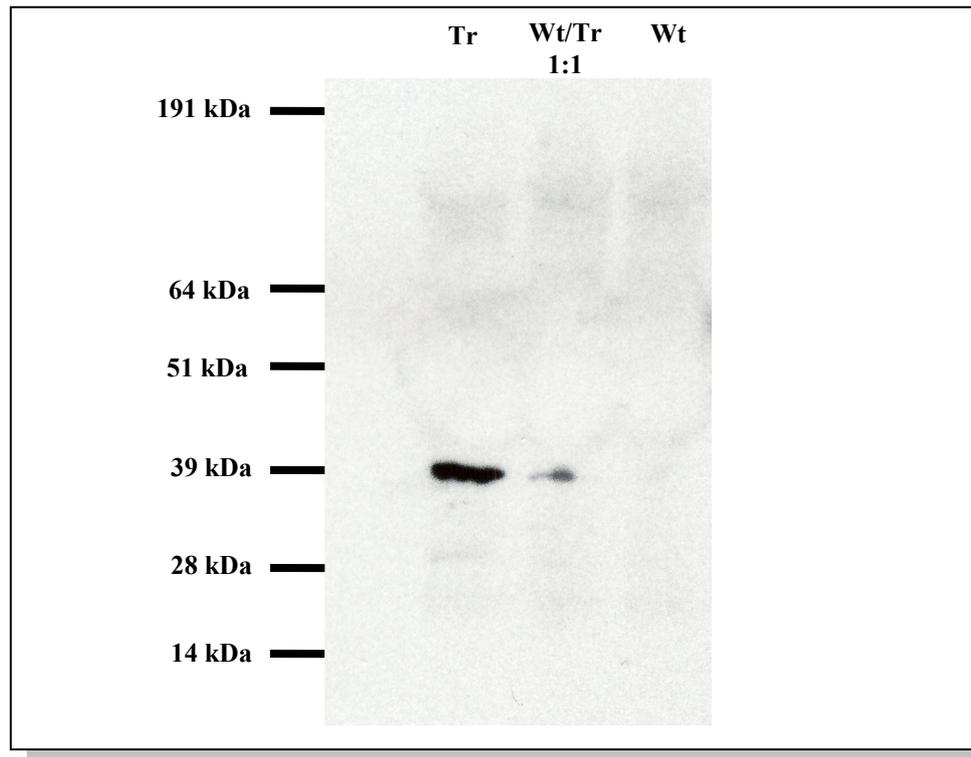


Abb. 6: Westernblot zum Nachweis des humanen ApoAV-Proteins: Die große sichtbare Bande entspricht dem humanen ApoAV-Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kDa. Die kleinere Bande kommt durch das Auftragen eines Gemisches von Plasmaproben von Wildtyp und transgenen Mäusen im Verhältnis von 1:1 zustande. Tr: Plasma einer ApoAV transgenen Maus, Wt: Plasma einer Wildtyp Maus

3.3. LIPOPROTEINPROFILE

Um Lipoproteinprofile von ApoAV transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren zu erstellen, wurden Plasmaproben mittels FPLC getrennt und der Triglyzerid- bzw. Cholesterolgehalt der einzelnen Fraktionen photometrisch bestimmt.

Hierbei zeigten sich beträchtliche Unterschiede in den Triglyzeridwerten der VLDL Fraktionen. Der Gehalt an VLDL-Triglyzeriden in den FPLC-Fraktionen der transgenen Mäuse lag mit etwa 4,8 mg/dl deutlich unter dem Wert von 12,8 mg/dl der Wildtyp Tiere. Geringere Unterschiede gab es in den HDL Fraktionen der zu vergleichenden Mäuse (1,2 mg/dl bei transgenen Tieren, 2,1 mg/dl bei Wildtyp Tieren).

Die Cholesterol-Werte der LDL- und HDL-Fraktionen differierten ebenfalls mit der Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen bei transgenen Mäusen, die Unterschiede sind hier jedoch geringer. Die HDL-Cholesterol-Konzentration ist bei den ApoAV transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen um 32 % erniedrigt (Transgen: 10,0 mg/dl, Wildtyp: 14.6 mg/dl); die LDL-Konzentrationen betragen 1,2 mg/dl (transgene Mäuse) und 2,3 mg/dl (Wildtyp).

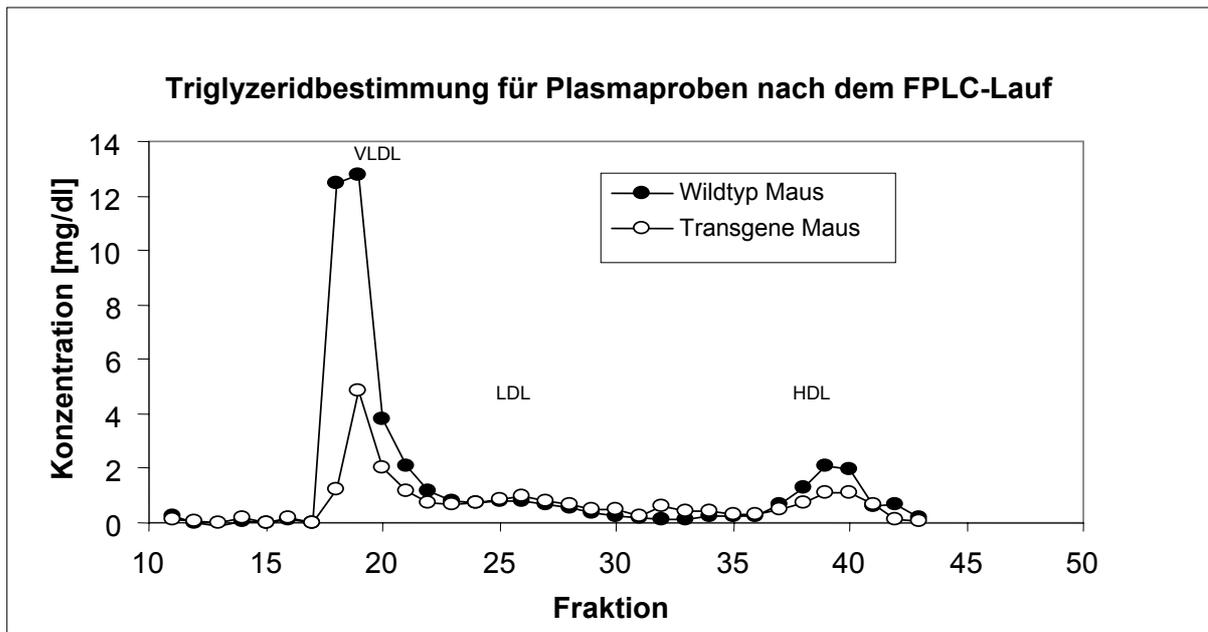


Abb. 7: Triglyzeridbestimmung von Plasmaproben nach Auftrennung mittels FPLC. In der VLDL Fraktion ApoAV transgener Mäuse zeigten sich erheblich niedrigere Triglyzeridwerte (4,8 mg/dl) als bei der Wildtyp Kontrollgruppe (12,8 mg/dl). Darüber hinaus sind die gemessenen Triglyzeride der HDL Fraktion transgener Tiere ebenfalls erniedrigt (1,2 mg/dl gegenüber 2,1 mg/dl). VLDL: Very low density lipoproteins, LDL: Low density lipoproteins, HDL: High density lipoproteins, FPLC: Fast performance liquid chromatography

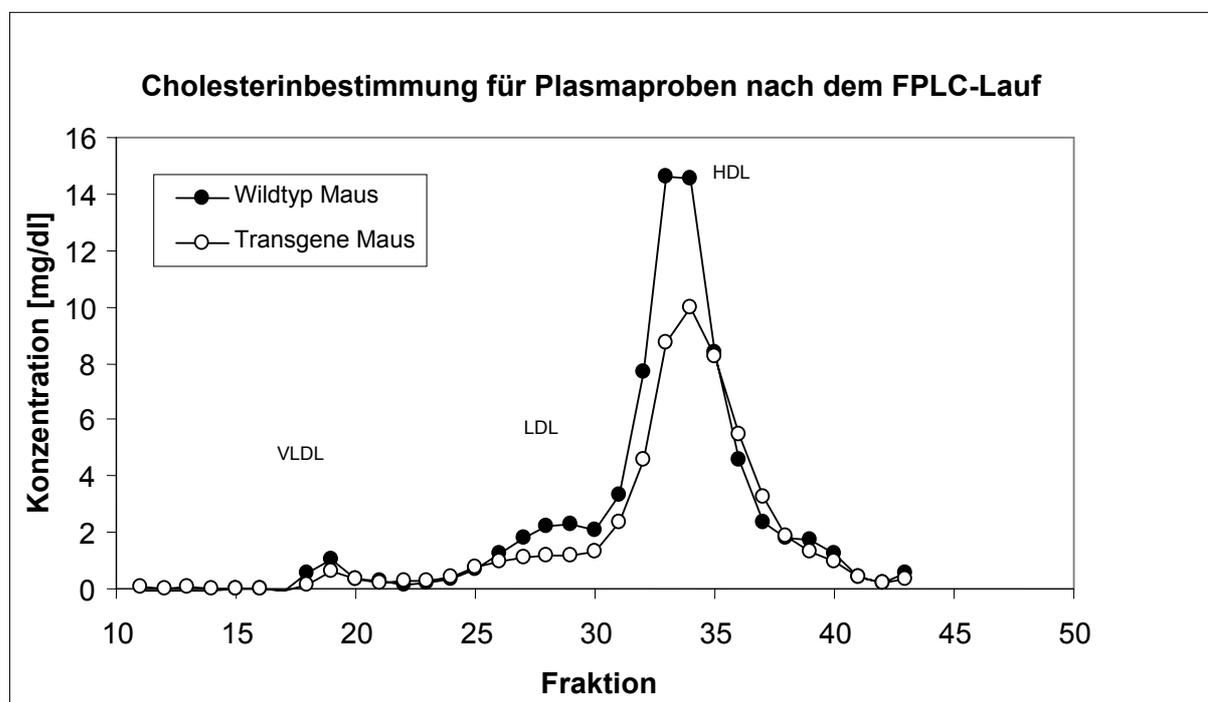


Abb. 8: Cholesterinbestimmung von Plasmaproben nach Auftrennung mittels FPLC. In der LDL und HDL Fraktion ApoAV transgener Mäuse zeigten sich niedrigere Cholesterol-Werte als bei den Kontrolltieren (LDL: 1,2 mg/dl gegenüber 2,3 mg/dl, HDL: 10,0 mg/dl gegenüber 14,6 mg/dl). VLDL: Very low density lipoproteins, LDL: Low density lipoproteins, HDL: High density lipoproteins, FPLC: Fast performance liquid chromatography

3.4. IN VIVO STUDIEN

3.4.1. Produktionsstudien

3.4.1.1. Postprandialer Triglyzerid-Spiegel

Um den Einfluss von ApoAV auf die Konzentration von Triglyzeriden im Blutplasma und in Chylomikronen nach oraler Fettbelastung zu untersuchen, wurden Studien mit Olivenöl, welches 40 μCi Glycerol-tri-[1- ^{14}C]oleat enthielt, durchgeführt. 0, 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten nach oraler Applikation dieser Ölsäure wurde Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen, zentrifugiert und der Lipidanteil aus dem gewonnenen Plasma extrahiert. Die Radioaktivität und der Triglyzerid-Gehalt der Proben wurden anschließend gemessen. Hierbei zeigte sich ein signifikant verminderter postprandialer Konzentrationsanstieg von Triglyzeriden und ^{14}C -Ölsäure bei ApoAV transgenen Mäusen.

Die photometrisch bestimmten Konzentrationen von Plasma-Triglyzeriden der transgenen Mäuse stiegen bei einem Ausgangswert von 84 g/ml bis auf 239 mg /dl an und fielen anschließend wieder leicht ab. Bei Wildtyp-Tieren erreichte die Triglyzeridkonzentration einen Höchstwert von 575 mg/dl bei einem Ausgangswert von 178 mg /dl.

Die gemessene Radioaktivität der markierten Ölsäure verhielt sich entsprechend. Der bei den transgenen Tieren gemessene Höchstwert von 220 cpm lag deutlich unter dem Wert von 494 cpm, welcher bei den Wildtyp-Mäusen ermittelt werden konnte.

Während der Anstieg der Plasma-Triglyzeride ein Resultat der intestinalen und hepatischen Produktion triglyzeridreicher Partikel zu sein scheint, repräsentiert die markierte Ölsäure in der Lipidfraktion des Plasmas den Triglyzeridgehalt der intestinal sezernierten Chylomikronen.

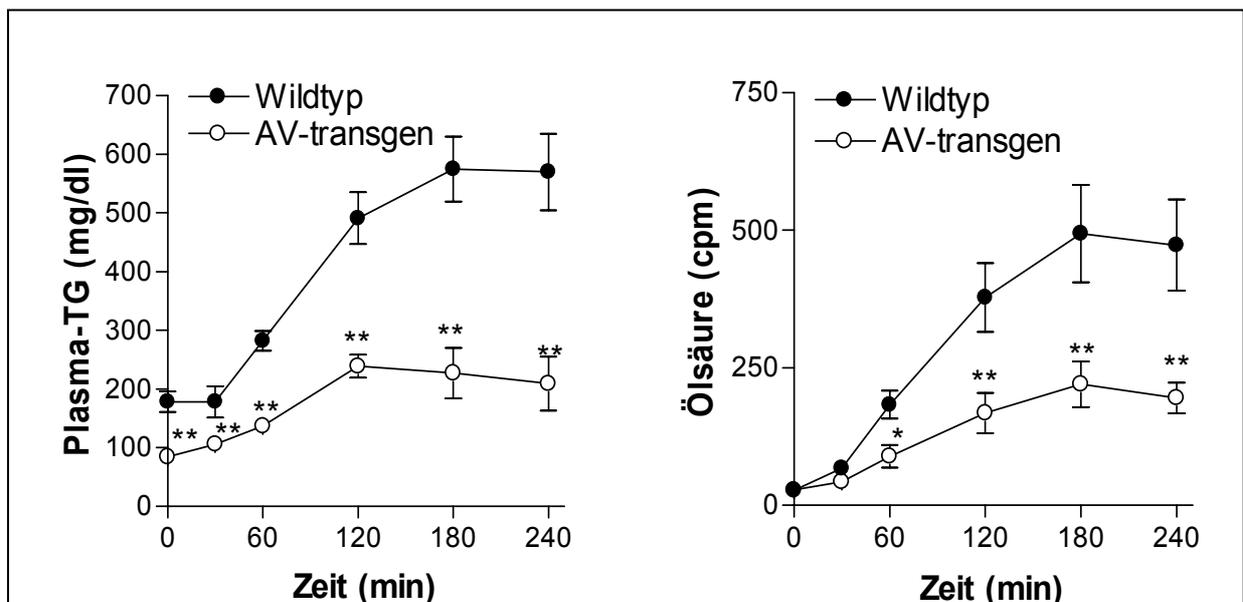


Abb. 9: Triglyzerid-Konzentration nach oraler Fettbelastung. Eine orale Applikation von Olivenöl und ^{14}C -Ölsäure zeigte einen signifikant verminderten postprandialen Anstieg der Triglyzerid-Konzentrationen bei ApoAV transgenen Mäusen. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) cpm: counts per minute, AV: ApolipoproteinAV

3.4.1.2. Intestinale Chylomikronenproduktion nach Triton-Gabe

Der verminderte Anstieg der Triglyzeridkonzentration im Plasma nach Olivenöl-Gabe bei ApoAV transgenen Mäusen könnte sowohl durch eine gesteigerte Hydrolyse triglyzeridreicher Partikel als auch durch eine verminderte intestinale Triglyzeridresorption oder eine Behinderung der Chylomikronen-Zusammensetzung zustande kommen. Um die intestinale Chylomikronen-Produktionsrate zu bestimmen, wurden vor der oralen Olivenöl/¹⁴C-Ölsäuregabe sämtliche plasmatische Hydrolyseprozesse durch das Detergens Triton WR 1339 (Tyloxapol) blockiert. Durch diese Blockade könnte bei erneuter Differenz der gemessenen Parameter eine gesteigerte Hydrolyse als Ursache der zuvor beobachteten Unterschiede ausgeschlossen werden.

Unter Tyloxapol-Gabe zeigte sich, dass eine Blockade der plasmatischen Abbauprozesse zu einem Anstieg der Triglyzeridkonzentration (durch hepatische und intestinale Produktion triglyzeridreicher Partikel) und der gemessenen Radioaktivität (selektive intestinale Chylomikronensekretion) im Blutplasma führen. Bis zu vier Stunden nach Olivenöl-Gabe ist hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen den zu vergleichenden Gruppen festzustellen, wobei die gemessenen Werte der transgenen Mäuse die der Wildtyp-Tiere erstaunlicherweise leicht übersteigen. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu einer möglichen ApoAV-vermittelten Verminderung der Produktion triglyzeridreicher Partikel.

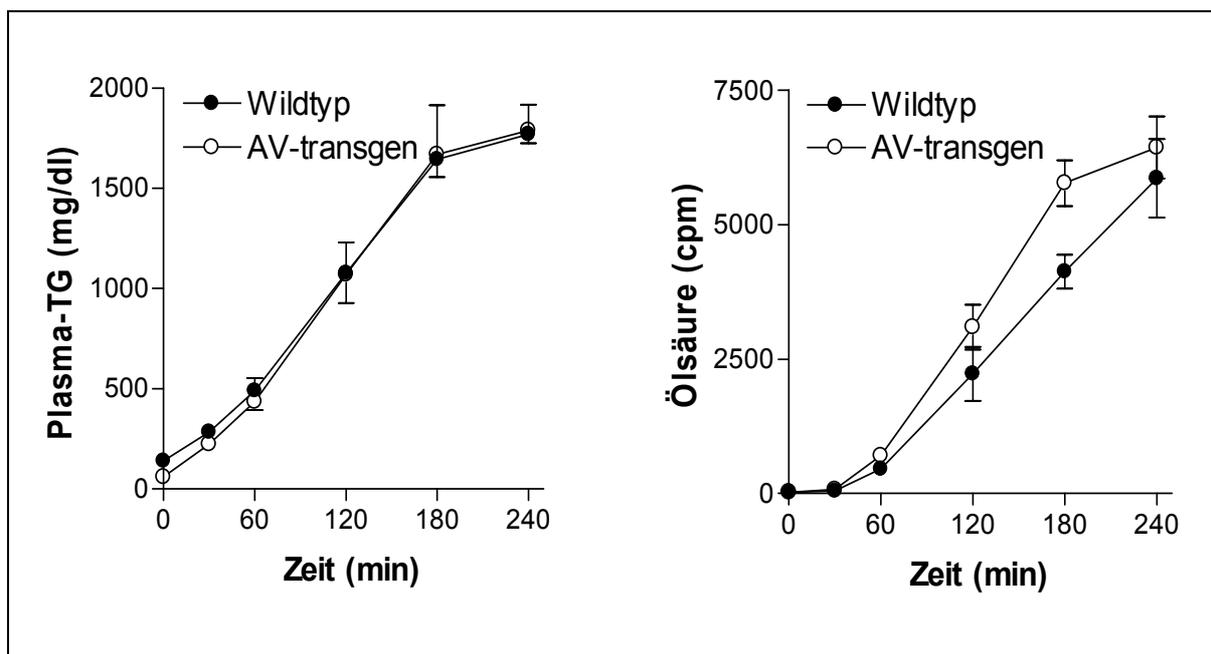


Abb. 10: Intestinale Chylomikronenproduktion nach Tyloxapol-Injektion. Eine orale Applikation von Olivenöl und ¹⁴C-Ölsäure nach vorheriger Tyloxapol-Gabe zeigte keine signifikanten Unterschiede in Plasma-Triglyzeridspiegeln (intestinale und hepatische Produktion triglyzeridreicher Partikel) und gemessener Radioaktivität (selektive Chylomikronenproduktion). cpm: counts per minute, TG: Triglyzeride, AV: ApolipoproteinAV

3.4.1.3. Hepatische VLDL-Produktion nach Triton-Gabe

Um die hepatische VLDL Produktionsrate bestimmen zu können, wurden zwei Minuten nach Triton-Injektion [$2\text{-}^3\text{H}$] Glycerol in die Schwanzvene appliziert und nach 2, 60 und 120 Minuten Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Nach Zentrifugation und Lipidextraktion wurde die Radioaktivität im Plasma gemessen und die Triglyzeridkonzentration photometrisch bestimmt. Hierauf folgten eine Lipoprotein-zentrifugation und eine erneute Radioaktivitätsmessung in der VLDL-Fraktion, um die selektiven VLDL-Triglyzeride ermitteln zu können.

Es zeigte sich, dass die Konzentration und Radioaktivität der plasmatischen Triglyzeride von ApoAV transgenen Mäusen leicht über den gemessenen Werten von Wildtyp-Tieren lagen (Radioaktivität nach 60 Min. in cpm: $2677,0 \pm 321,0$ bei Wildtyp-Tieren, $3223,0 \pm 569,90$ bei ApoAV transgenen Mäusen). Diese Beobachtungen wären mit einer ApoAV-vermittelten Minderung der VLDL Produktionsrate nicht vereinbar.

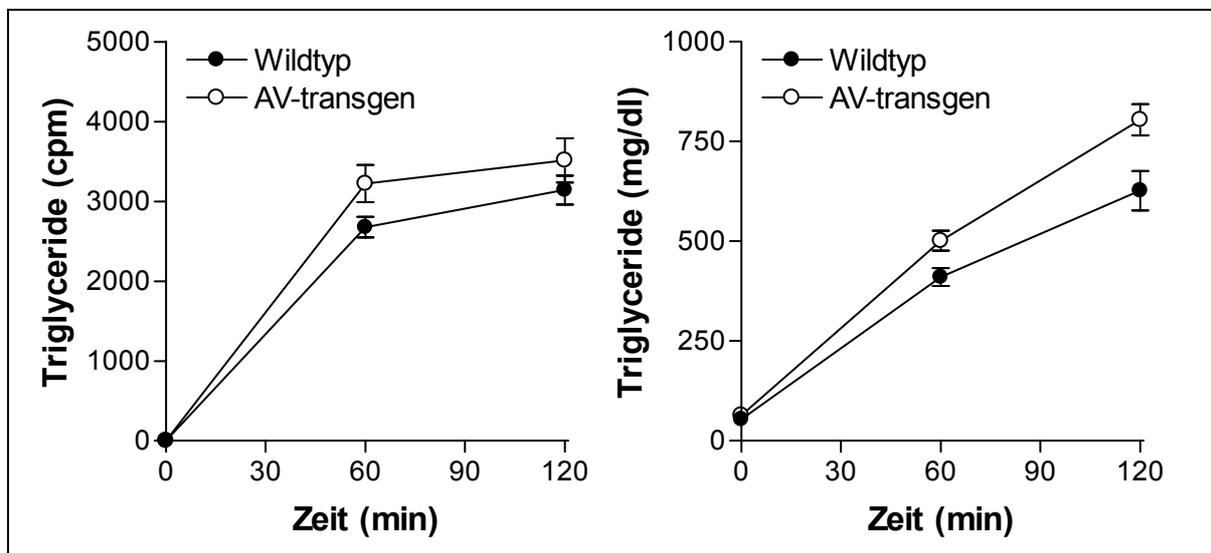


Abb. 11: Hepatische VLDL-Produktion nach Tyloxapol-Injektion. Die photometrisch bestimmte Triglyzeridkonzentration und die gemessene Radioaktivität des Plasmas gaben keinen Hinweis auf eine verminderte VLDL-Produktion bei ApoAV transgenen Mäusen. cpm: counts per minute, AV: ApolipoproteinAV

Die nach Lipoprotein-zentrifugation gemessene Radioaktivität der VLDL-Fraktion liefert ein entsprechendes Bild. Die ermittelten Werte für ApoAV transgene Tiere liegen leicht über den Messergebnissen für Wildtyp-Mäuse (Wildtyp: $1987,0 \pm 220,0$, Transgen: $2022,0 \pm 345,0$) Es gab demzufolge über zwei Stunden keinen signifikanten Unterschied beim Einbau des radioaktiv markierten Glycerols in neu zusammengesetzte VLDL-Partikel.

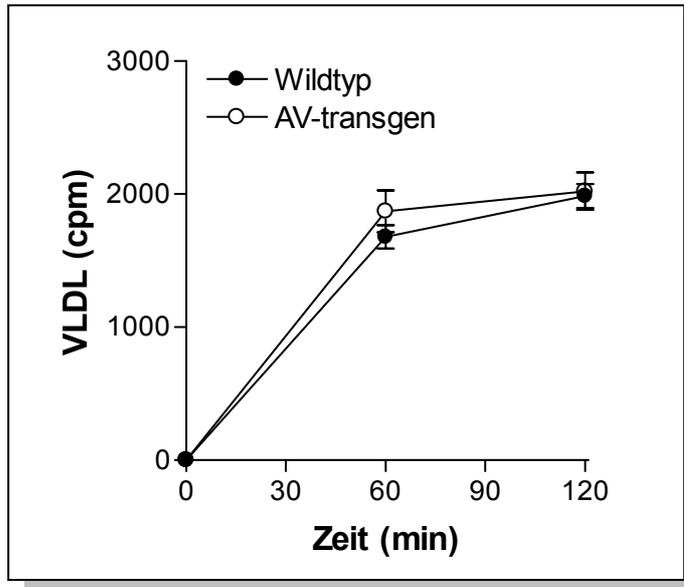


Abb. 12: Hepatische VLDL Produktion. Die Messung der Radioaktivität in der VLDL-Fraktion nach Lipoproteincentrifugation ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen ApoAV transgenen Tieren und Wildtyp-Mäusen. cpm: counts per minute, AV: Apolipoprotein AV

3.4.2. VLDL-Abbaustudie

Um die Geschwindigkeit des Abbaus triglyzeridreicher VLDL ermitteln zu können, wurde der Triglyzeridanteil dieser Lipoproteine *in vivo* markiert. Hierfür wurden 500 μ Ci an Albumin gebundene [1- 3 H] Palmitinsäure in ApoAV defiziente Mäuse injiziert, Blutentnahmen durchgeführt und die VLDL-Fraktion isoliert. Nach Injektion dieser markierten VLDL in Wildtyp Tiere und transgene Mäuse wurden Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt und die Radioaktivität gemessen.

Zur Untersuchung der spezifischen Organaufnahme von markierten VLDL-Fettsäuren wurden die Mäuse mit 10 μ l/g Körpergewicht Ketaxyl narkotisiert, Herz, 4 Muskelbiopsate aus Ober- und Unterschenkel, 4 Leberlappen, Milz, Lunge, Fettgewebe und Niere entnommen und die Radioaktivität gemessen.

ApoAV transgene Tiere zeigten eine signifikant schnellere Elimination der markierten VLDL-Triglyzeride als die Wildtyp-Kontrollgruppe. Nach 10 Minuten konnte in Gegenwart des ApoAV Transgens nur noch eine Radioaktivität von 34 % des Ausgangswertes ermittelt werden. Im Plasma der Wildtyp-Tiere war nach 10 Minuten noch eine Radioaktivität von 56 % des Ausgangswertes nachweisbar.

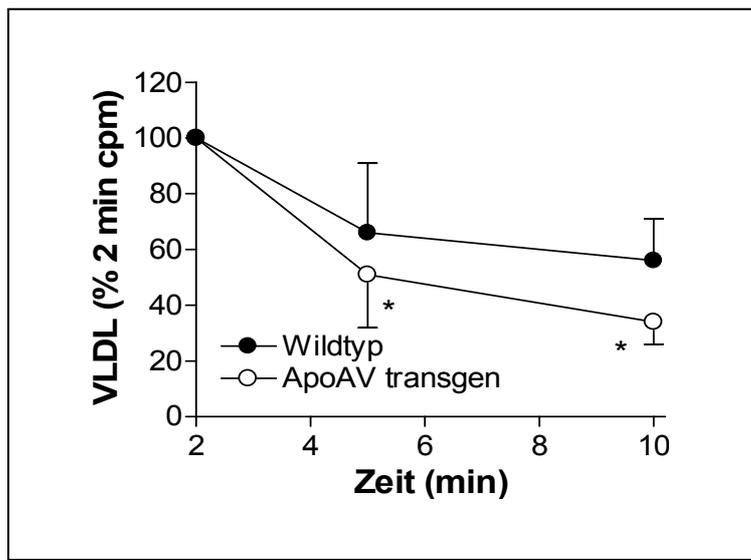


Abb. 13: VLDL-Hydrolyse. Nach Injektion radioaktiv markierten Glycerols zeigte sich ein signifikant schnellerer Abbau bei ApoAV transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Sämtliche Daten wurden in Relation zum 2 min Wert in Prozent angegeben. (* $p < 0,05$) cpm: counts per minute, VLDL: very low density lipoproteins.

Bei der Messung der Organaufnahmen markierter VLDL-Triglyzeride zeigte sich eine signifikant erhöhte Aufnahme in Muskel (+ 40 %), Herz (+ 150 %) und Fettgewebe (+ 95 %) bei ApoAV transgenen Tieren.

Diese Daten lassen erkennen, dass ApoAV transgene Mäuse eine beschleunigte plasmatische Hydrolyse und schnellere Organaufnahmen der VLDL-Fettsäuren aufweisen.

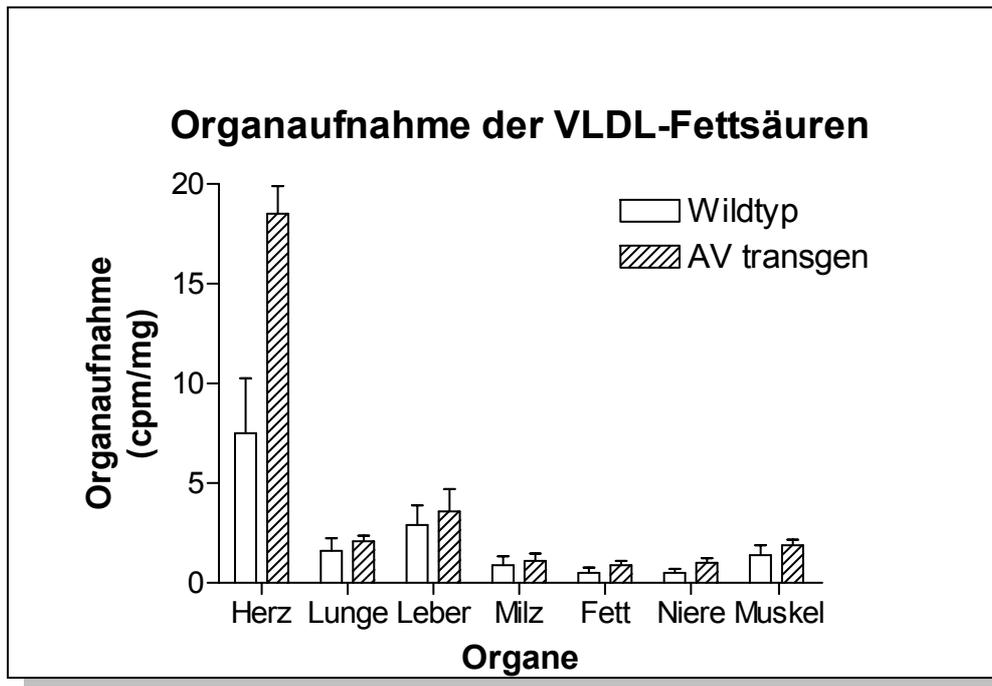


Abb. 14: Organaufnahme der VLDL-Fettsäuren: Nach Organentnahme und anschließender Radioaktivitätsmessung zeigte sich eine signifikant erhöhte Aufnahme in Herz (+ 150 %), Fettgewebe (+ 95 %) und Muskel (+ 40 %) bei ApoAV transgenen Tieren. AV: ApolipoproteinAV, cpm: counts per minute, VLDL: very low density lipoproteins

4. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus der ApoAV-induzierten Senkung der plasmatischen Triglyzeride weiter zu untersuchen. Der Einfluss des erst kürzlich entdeckten Apolipoproteins AV auf die Konzentration von Triglyzeriden im Blutplasma ist durch zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien belegt. ApoAV transgene Mäuse weisen einen um zwei Drittel erniedrigten und ApoAV defiziente Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel auf als die jeweilige Kontrollgruppe (Pennacchio et al 2001). Darüber hinaus sind Punktmutationen im ApoAV-Gen mit einer signifikanten Erhöhung der Triglyzeridkonzentration im menschlichen Blutplasma und mit der Familiär Kombinierten Hyperlipoproteinämie (FCHL) in Zusammenhang gebracht worden (Pennacchio et al. 2001; Evans et al. 2003; Pennacchio and Rubin 2003; Talmud et al. 2005; Tang et al. 2006). Die molekularen Mechanismen der ApoAV-vermittelten Triglyzeridsenkung konnten bisher jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Um dieser Frage weiter nachzugehen wurden ApoAV transgene Mäuse verwendet, die außer dem murinen ApoAV zusätzlich das entsprechende humane Apolipoprotein exprimieren (Pennacchio et al 2001). Es wurden Lipoproteinprofile erstellt und *in vivo* Studien durchgeführt, mit denen die Auf- und Abbauraten von radioaktiv markierten Triglyzeriden in triglyzeridreichen Partikeln mit denen von Wildtyp-Kontrollgruppen verglichen werden konnten.

Bei den erstellten Lipoproteinprofilen von ApoAV transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren zeigten sich insbesondere in den VLDL Fraktionen beträchtliche Unterschiede zwischen den gemessenen Triglyzeridkonzentrationen. Der VLDL-Triglyzeridgehalt der transgenen Mäuse betrug nur etwa ein Drittel des bei Wildtyp Tieren gemessenen Wertes. Geringere Unterschiede gab es außerdem in den HDL Fraktionen der zu vergleichenden Mäuse. Diese Daten deuten bereits daraufhin, dass der triglyzeridsenkende Effekt des ApoAV vor allem bei den triglyzeridreichen VLDL, HDL und eventuell bei den nur postprandial nachweisbaren Chylomikronen deutlich wird. Dies deckt sich mit der erst postexperimentell publizierten Arbeit von O'Brien et al., in welcher eine Assoziation von ApoAV mit den triglyzeridreichen Lipoproteinen VLDL und Chylomikronen sowie HDL nachgewiesen werden konnte (O'Brien et al. 2005).

Die denkbaren Mechanismen der ApoAV-induzierten Verminderung der plasmatischen Triglyzeride sind vielfältig. Ein niedriger Plasma-Triglyzeridspiegel könnte entweder aus einer Blockade der intestinalen Triglyzeridresorption, der Zusammensetzung von Chylomikronen oder VLDL, einer Steigerung des Abbaus dieser triglyzeridreichen Lipoproteine oder kombinierten Effekten resultieren. Aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften könnte das ApoAV-Protein die hepatische Zusammensetzung von VLDL oder die Chylomikronensynthese in den Enterozyten durch Bindung an Lipide und Zellmembranen beeinflussen und hierdurch die Produktion triglyzeridreicher Lipoproteine senken (Weinberg et al. 2003). Gestützt wird diese Hypothese insbesondere dadurch, dass gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem ApoAV Protein und einem mikrosomalen Triglyzerid-

Transferprotein durch Beckstead et al. festgestellt worden sind (Beckstead et al. 2003). Des Weiteren berichteten Schaap et al. von einer 30%igen Verringerung der VLDL-Produktionsrate in Mäusen mit adenoviral-induzierter Überexpression von murinem ApoAV (Schaap et al. 2004). Da die Produktion der Proteinkomponenten des VLDL nicht verändert wurde, vermuteten die Autoren eine ApoAV-vermittelte Hemmung des Lipidtransfers auf ApoB100, dem zweiten Schritt der hepatischen VLDL-Zusammensetzung.

Die in dieser Arbeit durchgeführte *in vivo* VLDL-Produktionsstudie mit ApoAV transgenen Mäusen und einer Wildtyp-Kontrollgruppe zeigte 120 Minuten nach Injektion des Tritons und des radioaktiv markierten Glycerols bei ApoAV transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren jedoch weder eine Hemmung des hepatischen Glycerol-Einbaus in Triglyzeride, noch eine Verminderung der VLDL-Sekretion in das Blutplasma. Die gemessenen Werte der transgenen Mäuse lagen sogar noch leicht über denjenigen der Wildtyp-Kontrollgruppe. Der Grund hierfür könnte eine gesteigerte hepatische Aufnahme von Triglyzeriden in Gegenwart des ApoAV Transgens sein (siehe unten). Das von Schaap et al. erzielte Ergebnis könnte durch die adenoviral bedingte unphysiologisch erhöhte hepatische Produktion des hydrophoben ApoAV-Proteins mit konsekutiver intrahepatozellulärer Akkumulation und Verdrängung von Lipiden während der Phase des Triglyzeridtransfers zustande gekommen sein.

In einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie über die Konzentration von Triglyzeriden in Chylomikronen und im Blutplasma nach einer oralen Fettbelastung zeigte sich ein signifikant verminderter postprandialer Anstieg der plasmatischen Triglyzerid-Konzentration bei transgener Expression des ApoAV-Proteins ($p < 0,01$). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten (Fruchart-Najib et al. 2004; Schaap et al. 2004). Eine denkbare Erklärung hierfür könnte eine Behinderung der intestinalen Triglyzerid-Absorption oder der Chylomikronen-Zusammensetzung durch ApoAV sein. Daher wurde die Intestinale Chylomikronen-Produktion über vier Stunden nach oraler Fettbelastung und Tyloxapol-Gabe gemessen. Da die Aufnahme der markierten Ölsäure in Chylomikronen bei Wildtyp-Mäusen und transgenen Tieren in dieser Studie in gleichem Ausmaß erfolgte, ist eine Behinderung des Chylomikronen-Zusammenbaus oder der intestinalen Triglyzerid-Resorption durch ApoAV äußerst unwahrscheinlich.

Die bisherigen Beobachtungen stehen im Widerspruch zu einer möglichen ApoAV-vermittelten Verminderung der Produktion triglyzeridreicher Partikel. Somit müssten die beobachteten Effekte auf einem gesteigerten bzw. effizienteren plasmatischen Abbau dieser triglyzeridreichen Lipoproteine beruhen.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten VLDL-Abbaustudie fand sich über 10 Minuten eine signifikant beschleunigte plasmatische Elimination der injizierten radioaktiv markierten VLDL-Triglyzeride in Gegenwart des ApoAV Transgens ($p < 0,05$). Bei der Messung der Organaufnahmen

zeigte sich eine signifikant erhöhte Aufnahme in Herz (+ 150 %), Fettgewebe (+ 95 %) und Muskel (+ 40 %) bei ApoAV transgenen Tieren. Diese Daten lassen vermuten, dass ApoAV eine Beschleunigung der plasmatischen Hydrolyse und eine erhöhte Aufnahme von VLDL-Triglyzeriden in bestimmte Organe bewirken kann. Auch andere Autoren kamen zu ähnlichen Resultaten; Fruchart-Najib et al. berichteten über einen verstärkten Abbau von VLDL in ApoAV / ApoCIII doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Fruchart-Najib et al. 2004). Schaap et al. beobachteten einen schnelleren Umsatz von lipoproteinfreien VLDL-artigen, triglyzeridreichen Partikeln in Mäusen mit adenoviraler Expression von murinem ApoAV (Schaap et al. 2004).

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden insbesondere durch eine zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlichte Studie über die seltene Punktmutation Q139X im ApoAV-Gen gestützt. Die Autoren belegen, dass diese Mutation zu einer schweren Hypertriglyzeridämie durch Suppression der plasmatischen Lipolyse triglyzeridreicher Lipoproteine führt (Marcais et al. 2005).

Die auf molekularer Ebene ablaufenden Mechanismen, welche die ApoAV-induzierte Beschleunigung der plasmatischen Hydrolyse bewirken, sind jedoch noch nicht abschließend geklärt. Eine plausible Möglichkeit wäre die Interaktion von ApoAV mit proteoglykangebundener Lipoproteinlipase, wobei ApoAV eine Art Vermittlerrolle zwischen triglyzeridreichen Lipoproteinen und endothelständiger LPL einnehmen würde (Merkel et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit kann der Mechanismus der ApoAV-vermittelten Senkung der plasmatischen Triglyzeride weiter aufgeklärt werden. Die erhobenen Daten zeigen, dass ApoAV den Triglyzeridspiegel durch eine Beschleunigung der plasmatischen Hydrolyse triglyzeridreicher Partikel senken kann. Die intestinale Triglyzeridabsorption und Chylomikronenproduktion sowie die hepatische VLDL-Produktion bleiben von ApoAV unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse bieten neben den grundlagenwissenschaftlichen Aspekten auch neue Ansätze bei der Früherkennung, Prophylaxe und Therapie von Fettstoffwechselstörungen und der Arteriosklerose.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Apolipoprotein AV wurde im Jahr 2001 unabhängig durch vergleichende Sequenzanalysen und als ein mit der frühen Phase der Leberregeneration assoziiertes Protein entdeckt. Der Einfluss von ApoAV auf den plasmatischen Triglyzeridspiegel ist durch zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien gut belegt. So haben ApoAV transgene Mäuse einen um zwei Drittel erniedrigten und ApoAV Knockout Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel als die jeweilige Kontrollgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der ApoAV-vermittelten Senkung der plasmatischen Triglyzeride näher untersucht. Hierzu wurden ApoAV transgene Mäuse verwendet, die außer dem murinen ApoAV zusätzlich das entsprechende humane Apolipoprotein exprimieren.

Zunächst wurden Lipoproteinprofile von ApoAV transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren erstellt. Hierbei zeigte sich ein signifikant erniedrigter Gehalt an Triglyzeriden in den VLDL- und HDL-Fraktionen der mittels FPLC-Technik aufgetrennten Plasmaproben von transgenen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das humane ApoAV-Protein im Plasma von transgenen Mäusen wurde dann mittels etabliertem Westernblot-Verfahren nachgewiesen und anschließend *in vivo* Studien durchgeführt, mit denen die Auf- und Abbauraten von radioaktiv markierten Triglyzeriden in triglyzeridreichen Partikeln transgener Tiere mit denen von Wildtyp-Mäusen verglichen werden konnten.

Hierbei zeigte sich, dass ApoAV transgene Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen signifikant verminderten postprandialen Anstieg sowohl der plasmatischen Triglyzerid Gesamt-Konzentration als auch des selektiven Triglyzeridanteils in Chylomikronen aufwiesen. VLDL- und Chylomikronen-Produktionsstudien ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine ApoAV assoziierte Hemmung der intestinalen Triglyzeridresorption oder der Produktion triglyzeridreicher Partikel. Nach initialer Blockade der plasmatischen Hydrolyse mit anschließender Fett- bzw. Glycerolbelastung konnte kein signifikanter Unterschied der photometrisch und radioaktiv gemessenen Konzentrationen von VLDL-, Chylomikronen- und Gesamt-Triglyzeriden zwischen ApoAV transgenen Mäusen und der entsprechenden Wildtyp-Kontrollgruppe festgestellt werden. Die anschließend durchgeführte Abbaustudie mit markierten VLDL-Triglyzeriden ergaben eine signifikante Beschleunigung der plasmatischen Elimination dieser Partikel in Gegenwart des ApoAV Transgens mit einer erhöhten Aufnahme von Triglyzeriden in Muskel, Herz und Fettgewebe.

Die ApoAV-vermittelte Reduktion der plasmatischen Triglyzeride beruht demnach auf einer Beschleunigung der Hydrolyse triglyzeridreicher Partikel. Die Produktion der entsprechenden Lipoproteine wird nicht signifikant verändert. Dieses Ergebnis ist von potenzieller Bedeutung für die Aufklärung der Entstehung von Fettstoffwechselstörungen und der Arteriosklerose beim Menschen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aalto-Setälä, K., E.A. Fisher, X. Chen, T. Chajek-Shaul, T. Hayek, R. Zechner, A. Walsh, R. Ramakrishnan, H.N. Ginsberg, and J.L. Breslow. 1992. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J Clin Invest.* 90:1889-1900.
- Aalto-Setälä, K., P.H. Weinstock, C.L. Bisgaier, L. Wu, J.D. Smith, and J.L. Breslow. 1996. Further characterization of the metabolic properties of triglyceride-rich lipoproteins from human and mouse apoC-III transgenic mice. *J Lipid Res.* 37:1802-1811.
- Assmann, G., P. Cullen, and H. Schulte. 2002. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation.* 105:310-315.
- Baroukh, N., E. Bauge, J. Akiyama, J. Chang, V. Afzal, J.C. Fruchart, E.M. Rubin, J. Fruchart-Najib, and L.A. Pennacchio. 2004. Analysis of apolipoprotein A5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1297-1302.
- Beckstead, J.A., M.N. Oda, D.D. Martin, T.M. Forte, J.K. Bielicki, T. Berger, R. Luty, C.M. Kay, and R.O. Ryan. 2003. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry.* 42:9416-9423.
- Beisiegel, U., W. Weber, and G. Bengtsson-Olivecrona. 1991. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88:8342-8346.
- Bodzioch, M., E. Orso, J. Klucken, T. Langmann, A. Bottcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch-Ozcurumez, W.E. Kaminski, H.W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K.J. Lackner, and G. Schmitz. 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 22:347-351.
- Brooks-Wilson, A., M. Marcil, S.M. Clee, L.H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J.A. Collins, H.O. Molhuizen, O. Loubser, B.F. Ouelette, K. Fichter, K.J. Ashbourne-Excoffon, C.W. Sensen, S. Scherer, S. Mott, M. Denis, D. Martindale, J. Frohlich, K. Morgan, B. Koop, S. Pimstone, J.J. Kastelein, J. Genest, Jr., and M.R. Hayden. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 22:336-345.
- Bruckenberg, E. 2004. Herzbericht 2004 mit Transplantationschirurgie, Hannover.
- Brunzell, J.D., and W.Y. Fujimoto. 1995. Body fat distribution and dyslipidemia. *Am J Med.* 99:457-458.
- Cziraky, M.J. 2004. Management of dyslipidemia in patients with metabolic syndrome. *J Am Pharm Assoc (Wash DC).* 44:478-488; quiz 489-490.
- Dixon, J.L., and H.N. Ginsberg. 1992. Hepatic synthesis of lipoproteins and apolipoproteins. *Semin Liver Dis.* 12:364-372.
- Dole, V.P. 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *Journal of Clinical Investigation.* 35:150-154.

- Evans, D., A. Buchwald, and F.U. Beil. 2003. The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med.* 81:645-654.
- Fruchart, J.C., and P. Duriez. 2006. Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today (Barc).* 42:39-64.
- Fruchart-Najib, J., E. Bauge, L.S. Niculescu, T. Pham, B. Thomas, C. Rommens, Z. Majd, B. Brewer, L.A. Pennacchio, and J.C. Fruchart. 2004. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun.* 319:397-404.
- Goldberg, I.J. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research.* 37:693-707.
- Groenendijk, M., R.M. Cantor, T.W. de Bruin, and G.M. Dallinga-Thie. 2001. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis.* 157:1-11.
- Grundy, S.M., G.J. Balady, M.H. Criqui, G. Fletcher, P. Greenland, L.F. Hiratzka, N. Houston-Miller, P. Kris-Etherton, H.M. Krumholz, J. LaRosa, I.S. Ockene, T.A. Pearson, J. Reed, R. Washington, and S.C. Smith, Jr. 1998. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation.* 97:1876-1887.
- Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation.* 34:1345-1353.
- Heeren, J., T. Grewal, S. Jackle, and U. Beisiegel. 2001. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem.* 276:42333-42338.
- Hertz, R., J. Bishara-Shieban, and J. Bar-Tana. 1995. Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem.* 270:13470-13475.
- Hokanson, J.E., and M.A. Austin. 1996. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk.* 3:213-219.
- Hubacek, J.A. 2005. Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med.* 43:897-902.
- Ito, Y., N. Azrolan, A. O'Connell, A. Walsh, and J.L. Breslow. 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science.* 249:790-793.
- Kinnunen, P.K., and C. Ehnolm. 1976. Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett.* 65:354-357.
- Krauss, R.M., P.N. Herbert, R.I. Levy, and D.S. Fredrickson. 1973. Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ Res.* 33:403-411.
- Kulinski, A., S. Rustaeus, and J.E. Vance. 2002. Microsomal triacylglycerol transfer protein is required for luminal accretion of triacylglycerol not associated with ApoB, as well as for ApoB lipidation. *J Biol Chem.* 277:31516-31525.
- Marcais, C., B. Verges, S. Charriere, V. Pruneta, M. Merlin, S. Billon, L. Perrot, J. Draï, A. Sassolas, L.A. Pennacchio, J. Fruchart-Najib, J.C. Fruchart, V. Durlach, and P. Moulin. 2005. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest.* 115:2862-2869.

- McConathy, W.J., J.C. Gesquiere, H. Bass, A. Tartar, J.C. Fruchart, and C.S. Wang. 1992. Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. *J Lipid Res.* 33:995-1003.
- McNeish, J., R.J. Aiello, D. Guyot, T. Turi, C. Gabel, C. Aldinger, K.L. Hoppe, M.L. Roach, L.J. Royer, J. de Wet, C. Broccardo, G. Chimini, and O.L. Francone. 2000. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:4245-4250.
- Merkel, M., R.H. Eckel, and I.J. Goldberg. 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* 43:1997-2006.
- Merkel, M., B. Loeffler, M. Kluger, N. Fabig, G. Geppert, L.A. Pennacchio, A. Laatsch, and J. Heeren. 2005. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 280:21553-21560.
- Millar, J.S., and C.J. Packard. 1998. Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr Opin Lipidol.* 9:197-202.
- O'Brien, P.J., W.E. Alborn, J.H. Sloan, M. Ulmer, A. Boodhoo, M.D. Knierman, A.E. Schultze, and R.J. Konrad. 2005. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem.* 51:351-359.
- Pennacchio, L.A., M. Olivier, J.A. Hubacek, J.C. Cohen, D.R. Cox, J.C. Fruchart, R.M. Krauss, and E.M. Rubin. 2001. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science.* 294:169-173.
- Pennacchio, L.A., and E.M. Rubin. 2003. Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:529-534.
- Prieur, X., H. Coste, and J.C. Rodriguez. 2003. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem.* 278:25468-25480.
- Ragozin, S., A. Niemeier, A. Laatsch, B. Loeffler, M. Merkel, U. Beisiegel, and J. Heeren. 2005. Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1433-1438.
- Rinninger, F., N. Wang, R. Ramakrishnan, X.C. Jiang, and A.R. Tall. 1999. Probucol enhances selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters in vitro by a scavenger receptor B-I-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1325-1332.
- Rudel, L.L., C.A. Marzetta, and F.L. Johnson. 1986. Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration. *Methods Enzymol.* 129:45-57.
- Schaap, F.G., P.C. Rensen, P.J. Voshol, C. Vrans, H.N. van der Vliet, R.A. Chamuleau, L.M. Havekes, A.K. Groen, and K.W. van Dijk. 2004. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem.* 279:27941-27947.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, A.M. Lefebvre, R.A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, and J. Auwerx. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO Journal.* 15:5336-5348.

- Scott, C.L. 2003. Diagnosis, prevention, and intervention for the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 92:35i-42i.
- Singaraja, R.R., B. Stahmer, M. Brundert, M. Merkel, J. Heeren, N. Bissada, M. Kang, J.M. Timmins, R. Ramakrishnan, J.S. Parks, M.R. Hayden, and F. Rinninger. 2006. Hepatic ATP-Binding Cassette Transporter A1 Is a Key Molecule in High-Density Lipoprotein Cholesteryl Ester Metabolism in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
- Smith, S.C., Jr., E. Amsterdam, G.J. Balady, R.O. Bonow, G.F. Fletcher, V. Froelicher, G. Heath, M.C. Limacher, J. Maddahi, D. Pryor, R.F. Redberg, E. Roccella, T. Ryan, L. Smaha, and N.K. Wenger. 2000. Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: tests for silent and inducible ischemia: Writing Group II. *Circulation.* 101:E12-16.
- Staels, B., N. Vu-Dac, V.A. Kosykh, R. Saladin, J.C. Fruchart, J. Dallongeville, and J. Auwerx. 1995. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest.* 95:705-712.
- Statistisches Bundesamt. 2005. Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Talmud, P.J., E. Hawe, S. Martin, M. Olivier, G.J. Miller, E.M. Rubin, L.A. Pennacchio, and S.E. Humphries. 2002. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet.* 11:3039-3046.
- Talmud, P.J., J. Palmén, W. Putt, L. Lins, and S.E. Humphries. 2005. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem.* 280:28215-28220.
- Tang, Y., P. Sun, D. Guo, A. Ferro, Y. Ji, Q. Chen, and L. Fan. 2006. A genetic variant c.553G > T in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and altered triglyceride levels in a Chinese population. *Atherosclerosis.* 185:433-437.
- van der Vliet, H.N., M.G. Sammels, A.C. Leegwater, J.H. Levels, P.H. Reitsma, W. Boers, and R.A. Chamuleau. 2001. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem.* 276:44512-44520.
- van der Vliet, H.N., F.G. Schaap, J.H. Levels, R. Ottenhoff, N. Looije, J.G. Wesseling, A.K. Groen, and R.A. Chamuleau. 2002. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 295:1156-1159.
- Vergnes, L., N. Baroukh, M.A. Ostos, G. Castro, N. Duverger, M.N. Nanjee, J. Najib, J.C. Fruchart, N.E. Miller, M.M. Zakin, and A. Ochoa. 2000. Expression of human apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in mice induces hyperlipidemia but reduces atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2267-2274.
- Vu-Dac, N., P. Gervois, H. Jakel, M. Nowak, E. Bauge, H. Dehondt, B. Staels, L.A. Pennacchio, E.M. Rubin, J. Fruchart-Najib, and J.C. Fruchart. 2003. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem.* 278:17982-17985.
- Wang, C.S., W.J. McConathy, H.U. Kloer, and P. Alaupovic. 1985. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest.* 75:384-390.
- Weinberg, R.B., V.R. Cook, J.A. Beckstead, D.D. Martin, J.W. Gallagher, G.S. Shelness, and R.O. Ryan. 2003. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem.* 278:34438-34444.

- Weinstock, P.H., C.L. Bisgaier, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, E. Sehayek, L. Wu, P. Sheffele, M. Merkel, A.D. Essenburg, and J.L. Breslow. 1997. Decreased HDL cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behavior in apolipoprotein A-IV knockout mice. *J Lipid Res.* 38:1782-1794.
- Zechner, R. 1997. The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 8:77-88.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Daniel Kayser
Geburtsdatum und /-ort	02.11.1979 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung und Zivildienst

1986 - 1999	Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium in Hamburg
06/1999	Abitur (Note 1,9)
1999 – 2000	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, KV Hamburg Nord

Studium

seit WS 2000	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
09/2002	Physikum (Note 2,0)
09/2003	1. Staatsexamen (Note 2,0)
09/2005	2. Staatsexamen (Note 2,0)
10/2005 – 09/2006	Praktisches Jahr:
1. Tertial:	Department of Surgery, Tauranga Hospital, Tauranga, New Zealand und Klinik und Poliklinik für Chirurgie, UKE
2. Tertial:	Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde, UKE
3. Tertial:	Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, UKE
voraussichtlich 11/2006	3. Staatsexamen

Wissenschaftliche Ausbildung

seit 10/2002	Experimenteller Teil einer Dissertation zum Thema „Untersuchung der Apolipoprotein AV vermittelten Triglyzeridsenkung in vivo“ im Lipase-Labor, ehemals Medizinische Klinik I (Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. H.Greten), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; Laborleiter: PD Dr. med. M. Merkel
05/2003 – 06/2004	wissenschaftliche Hilfskraft im Lipase-Labor

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. H. Greten, ehemaliger Direktor der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf danke ich für die Möglichkeit, an der von ihm geleiteten Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Martin Merkel für die Aufgabenstellung und für die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit.

Für die zuverlässige technische Unterstützung danke ich Frau Iris Gerke und Frau Joanna Schmidt.

Ebenfalls danke ich Frau Professor Dr. rer. physiol. Dr. h.c. U. Beisiegel für die Möglichkeit, verschiedene Geräte im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des UKE, nutzen zu dürfen. Herrn PD Dr. rer. nat. J. Heeren, danke ich für die Herstellung der radioaktiven Substrate und die tatkräftige Unterstützung bei den Turnover-Studien.

Außerdem möchte ich Frau Dr. rer. nat. Britta Löffler für die wissenschaftliche Unterstützung und die kompetente Hilfe im Laboralltag danken.

Für Ihre mentale Unterstützung und engagierte Hilfe beim Korrekturlesen danke ich meiner Partnerin Nathalie Fabig und deren Eltern Anita und Karl-Rainer Fabig, meinen Eltern Gabriele und Dieter Kayser, sowie meinem Bruder Dennis Kayser.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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