

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik III
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

**Untersuchung der Funktion von Apolipoprotein AV im
homolog defizienten Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Nathalie Fabig aus Hannover

Hamburg, 2006

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 29.08.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Th. Schinke

Meinen Eltern Anita und Karl-Rainer Fabig gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN | VI |
| ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG | VII |
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. FETTSTOFFWECHSELSTÖRUNGEN UND IHRE KLINISCHE BEDEUTUNG..... | 1 |
| 1.2. LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL | 2 |
| 1.3. APOLIPOPROTEIN AV | 7 |
| 1.3.1. Genlokus und Charakteristika des Apo AV | 7 |
| 1.3.2. Apo AV als Leberregenerationsprotein | 8 |
| 1.3.3. Die Wirkung von Apo AV auf den Triglyzeridspiegel | 8 |
| 1.3.4. Lipoproteinlipase und plasmatische TG-Hydrolyse | 9 |
| 1.3.5. Die Wirkung von Apo CIII auf den Triglyzeridspiegel..... | 10 |
| 1.3.6. Hepatische VLDL-Produktion und mögliche Beeinflussung durch ApoAV | 10 |
| 1.4. ZIEL DER ARBEIT | 12 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN..... | 13 |
| 2.1. MATERIAL..... | 13 |
| 2.1.1. Chemikalien | 13 |
| 2.1.2. Enzyme und Proteine | 14 |
| 2.1.3. Nucleotide..... | 14 |
| 2.1.4. Narkosemittel | 14 |
| 2.1.5. Verbrauchsmaterial | 14 |
| 2.1.6. Geräte | 14 |
| 2.1.7. Standard-Pufferlösungen..... | 15 |
| 2.2. METHODIK | 16 |
| 2.2.1. Tierhaltung und Versuchsgenehmigungen | 16 |
| 2.2.2. Apo AV Knockout Mäuse | 16 |
| 2.2.3. Kreuzungsstrategie | 16 |
| 2.2.4. Genotypisierung | 17 |
| 2.2.4.1. Prinzip..... | 17 |
| 2.2.4.2. Schwanzbiopsie Entnahme..... | 18 |
| 2.2.4.3. Verdau der Schwanzbiopsie | 18 |
| 2.2.4.4. DNA-Extraktion | 18 |
| 2.2.4.5. PCR..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4.5.1. Apo AV-WT-PCR..... | 18 |
| 2.2.4.5.2. Apo AV-Neo-PCR..... | 19 |
| 2.2.4.6. Gel-Elektrophorese..... | 20 |
| 2.2.5. Lipoproteinprofil | 21 |
| 2.2.5.1. Blutentnahme | 21 |
| 2.2.5.2. Prinzip der Ultrazentrifugation..... | 21 |
| 2.2.5.3. Fast Performance Liquid Chromatography..... | 21 |
| 2.2.5.4. Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden | 22 |
| 2.2.6. Metabolische-Studien | 22 |
| 2.2.6.1. Prinzip..... | 22 |
| 2.2.6.2. VLDL-Produktionsstudie..... | 23 |
| 2.2.6.3. Turnoverstudien..... | 23 |
| 2.2.6.4. Messung der Radioaktivität..... | 24 |
| 2.2.6.5. Lipidextraktion | 25 |
| 3. ERGEBNISSE | 26 |
| 3.1. MAUSZUCHT | 26 |
| 3.2. LIPOPROTEINPROFIL | 27 |
| 3.3. METABOLISCHE STUDIEN | 28 |
| 3.3.1. VLDL-Produktionsstudie | 28 |
| 3.3.2. Turnoverstudien | 29 |
| 3.3.2.1. VLDL-Triglyzerid-Abbaustudie | 29 |
| 3.3.2.2. VLDL-Apolipoprotein-Abbaustudie | 30 |
| 3.3.2.3. VLDL-Abbaustudie verschiedener VLDL..... | 31 |
| 3.3.2.4. VLDL-Abbaustudie mit rekombinantem Apo AV | 32 |
| 4. DISKUSSION..... | 34 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 38 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | 39 |
| LEBENS LAUF | 45 |
| EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | 47 |

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

| | |
|------------|--|
| Apo | Apolipoprotein |
| Aqua dest. | Aqua destillatum |
| AV het | Apo AV heterozygote Maus |
| AV KO | Apo AV defiziente Maus |
| AV Tg | Apo AV 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 | Ribonuclein acid |
| rpm | Rounds per minute |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TG | Triglyzeride |
| VLDL | Very low density lipoprotein |
| Wt | Wildtyp-Maus |

ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG

Plasma-Triglyzeride werden in Mäusen durch Apolipoprotein AV (Apo AV) reduziert. Dieser Effekt könnte auf einem beschleunigten Katabolismus, auf einer verminderten hepatischen Produktion oder auf einer verminderten intestinalen Resorption von Chylomikronen (CM) bzw. Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (VLDL) beruhen. Diese Arbeit untersucht den Effekt von Apo AV im homolog defizienten Mausmodell anhand von metabolischen Studien, mit denen sich für VLDL bzw. CM die Produktion bzw. der Abbau bestimmen lässt. Anhand dieser Experimente war eine weitere Aufklärung des Mechanismus der Apo AV vermittelten Triglyzerid-Senkung zu erwarten.

1. EINLEITUNG

1.1. FETTSTOFFWECHSELSTÖRUNGEN UND IHRE KLINISCHE BEDEUTUNG

Die Arteriosklerose ist eine chronisch inflammatorische Systemerkrankung, die mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lichtungseinengung der Arterien einhergeht. Sie ist die Hauptursache für die koronare Herzkrankheit (KHK), die periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Erkrankungen. Ihre Folgen sind die häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in der Bundesrepublik Deutschland und der gesamten westlichen Welt (Brucknerberger 2004; 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 (Assmann et al. 2002; Grundy et al. 1998; Smith et al. 2000). Zu den häufigen Störungen des Fettstoffwechsels zählen Hypertriglyzeridämie, LDL (Low-density-Lipoprotein)-Erhöhungen und HDL (High-density-Lipoprotein)-Erniedrigungen als eigenständige Risikofaktoren der Arteriosklerose. Eine Metaanalyse zeigt, dass ein Anstieg der Triglyzeride (TG) 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). Des Weiteren scheinen aus Triglyzeriden stammende freie Fettsäure eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Förderung des Metabolischen Syndroms (eine Kombination aus Fettsucht, Neigung zu Diabetes mellitus, erhöhtem Blutdruck und Blutfetterhöhung) einzunehmen. Neben diversen exogenen Faktoren wie Alkoholkonsum, Medikamenteneinnahme und falscher Ernährungsweise können auch endogene Faktoren Hypertriglyzeridämien 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 Locus auf den Plasmatriglyzeridspiegel vielfach beschrieben (Groenendijk et al. 2001; Hubacek 2005; Talmud et al. 2002).

1.2. LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Lipide liegen im wässrigen Milieu des Blutes nicht in freier Form vor, sondern werden im Verbund mit spezifischen Proteinen, den Apolipoproteinen, transportiert. Apolipoproteine übernehmen, unterstützt von Phospholipiden, mit ihren hydrophilen und hydrophoben Kettenabschnitten die Funktion als Emulgatoren, Aktivatoren, Inhibitoren, Stabilisatoren und Rezeptorliganden für apolare Lipide (TG und Cholesterinester [CE]). Ihre Bildung erfolgt vor allem in der Leber und in der Darmmukosa. Die großmolekularen Lipid-Protein-Komplexe werden als Lipoproteine bezeichnet. In diesen Transportpartikeln sind die hydrophilen Anteile der Protein- und Phospholipidmoleküle zur Wasserphase hin ausgerichtet und von einer Hydrathülle umgeben. Die apolaren Lipide werden in das hydrophobe Innere der Partikel eingelagert und in dieser Form transportiert. Nicht veresterte freie Fettsäuren sind im Plasma an Albumin gebunden. Durch Ultrazentrifugation können Lipoproteine aufgrund verschiedener spezifischer Gewichte in fünf Hauptgruppen unterteilt werden: Chylomikronen (CM), Very-low-density-Lipoproteins (VLDL), Intermediate-density-Lipoproteins (IDL), Low-density-Lipoproteins und High-density-Lipoproteins (Havel et al. 1955). Die anteilige Zusammensetzung der verschiedenen Lipide in den Lipoproteinen ist Tab.1 zu entnehmen.

| Lipoproteinklasse | CM | 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 |
| Hauptfunktion | Transport exogener Lipide | Transport endogener Lipide | Transport endogener Lipide | Chol-Transport zu allen Zellen | 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, CII, CIII, E |
| Zusammensetzung | TG 86%, Chol 3% | TG 55%, Chol 12% | TG 23%, Chol 29% | TG 6%, Chol 42% | TG 3%, Chol 13% |

Tab. 1: Eigenschaften der wichtigsten Plasmalipoproteine. Chylomikronen (CM), Very-low-density-Lipoproteins (VLDL), Intermediate-density-Lipoproteins (IDL), Low-density-Lipoproteins (LDL) und High-density-Lipoproteins (HDL). Triglyzeride (TG), Cholesterin (Chol), Zusammensetzung in % der Trockenmasse.

Die Proteinkomponenten der Lipoproteine werden in unterschiedliche Haupttypen und zum Teil in verschiedene Subtypen (z.B. ApoAI – ApoAV) unterteilt. Die Charakteristika der wichtigsten Apolipoproteine sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

| Apolipoprotein | Funktionen |
|----------------|--|
| AI | Strukturkomponente des HDL, LCAT-Aktivator |
| AII | Inhibitor der Lipoproteinlipase und der hepatische Lipase |
| AIV | Triglyzeridstoffwechsel, LCAT-Aktivator |
| AV | Triglyzerid-Senkung (Pennacchio et al. 2001) |
| B48 | Strukturprotein von CM; Ligand am LRP-1 |
| B100 | Strukturprotein von VLDL, IDL und LDL; Ligand des LDL-Rezeptors |
| CI | Inhibitor Bindung verschiedener Lipoproteine an den LDL-Rezeptor und an den LRP; LCAT-Aktivator |
| CII | Aktivator der Lipoproteinlipase |
| CIII | Inhibitor der Lipoproteinlipase, evtl. Hemmung der hepatischen Aufnahme von Chylomikronen und VLDL-Remnants |
| E | Ligand bei der Bindung verschiedener Lipoproteine an den LDL-Rezeptor, an LRP-1 und 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-Azyl-Transferase; LRP: LDL-Rezeptor related protein.

Der Stoffwechsel der Lipoproteine wird in einen exogenen und einen endogenen Weg sowie das reverse Cholesterin-Transport-System unterteilt. Über den exogenen Weg werden die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide transportiert. In der Dünndarmmukosa werden sie zunächst mit Apolipoproteinen (Apo AI, Apo AIV, Apo B48) komplexiert. Die so entstandenen Chylomikronen werden an die Lymphe abgegeben und gelangen über den Ductus thoracicus unter Umgehung der Leber in den venösen Kreislauf. Nach ihrer Sekretion werden Apo C-Proteine aus den HDL auf die Chylomikronen übertragen. Apo CII dient als Kofaktor der endothelialen Lipoproteinlipase (LPL), welche Triglyzeride der Chylomikronen an den kapillären Gefäßwandzellen im Fett- und Muskelgewebe hydrolysiert. Die dadurch entstandenen freien Fettsäuren können im Anschluss von den entsprechenden peripheren Zellen aufgenommen werden. Im Verlauf dieser Lipolyse nehmen die Chylomikronen Apo E aus den HDL auf und geben Apo AI, Apo AIV und Apo C an die HDL ab. Die nun Cholesterinester- und Apo E-reichen, kleinen Chylomikronen werden Chylomikronen-Remnants genannt und gelangen zusammen mit der sich vom Endothel gelösten LPL zur Leber. Apo E, Apo B48 sowie Lipoproteinlipase vermitteln eine Bindung von Chylomikronen-Remnants an Proteoglykane und schließlich ihre Aufnahme über das LDL-Rezeptor related protein-1 (LRP-1) (Beisiegel et al. 1991). In den Hepatozyten werden die Chylomikronen-Remnants lysosomal abgebaut. Apo E und Lipoproteinlipase können recycled werden (Heeren et al. 2001). Zusammengefasst werden also die durch die Nahrung aufgenommenen Triglyzeride in Form von Fettsäuren an das Fett- und Muskelgewebe geliefert und das ebenfalls durch die Nahrung aufgenommene Cholesterin wird der Leber zugeführt. Dort wird es entweder für die Gallensäurebiosynthese verwendet, in Biomembranen eingebaut oder als Lipoprotein-gebundenes Cholesterin wieder zurück in den Blutkreislauf sezerniert. Alternativ dazu kann das von der Leber aufgenommene Cholesterin auch als freies Cholesterin über die Galle ausgeschieden werden.

Das periphere Gewebe wird im Hungerzustand über den endogenen Weg mit Triglyzeriden und Cholesterin versorgt. Dieser Weg beginnt mit der VLDL-Produktion in der Leber. Das in den Hepatozyten produzierte Apo B100 wird mit einer kleinen Menge endogen synthetisierter bzw. aus Chylomikronen aufgenommener Triglyzeride und Cholesterin komplexiert. In einem zweiten Schritt werden bevorzugt *de novo* synthetisierte Phospholipide eingebaut. Im Blut nehmen die VLDL Apo E und Apo C aus HDL auf und übertragen Phospholipide im Austausch gegen freies Cholesterin auf HDL. Lipoproteinlipase hydrolysiert etwa 90% der Triglyzeride in den VLDL, dabei wird der größte Teil der Apo Cs und ein Teil des freien Cholesterins in HDL zurücktransferiert. Die

nun kleineren Lipoproteine werden als VLDL-Remnants bezeichnet, sie sind relativ reich an Cholesterinestern und Apo E. Sie werden - vermittelt durch Apo E und LPL - über LDL- und LRP-Rezeptoren in die Leber aufgenommen und metabolisiert. 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. Auf ihrem Weg zu LDL verliert die VLDL seinen Apo E Anteil und nimmt aus HDL-Cholesterinester auf. LDL enthalten als einziges Apoprotein Apo B100, ihre Hauptfunktion ist die Verteilung von Cholesterin auf alle Körperzellen. Die LDL-Aufnahme in die Zellen erfolgt über LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose, wobei vor allem Apo B100 als Rezeptorligand des LDL-Rezeptors dient. Nach lysosomaler Degradation der LDL-Partikel gelangt das freie Cholesterin ins Zytoplasma. Seine Konzentration im Zytoplasma reguliert unter anderem die Expression der LDL-Rezeptoren und damit auch die Höhe des Cholesterin-Spiegels im Plasma.

Beim reversen Cholesterintransport nehmen die Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL) eine Schlüsselstellung ein. HDL-Partikel bestehen aus einer Vielzahl von in Größe, Dichte und Apolipoproteingehalt variierenden Untergruppen. Sie entstehen durch Komplexbildung von Phospholipiden und Apolipoproteinen (Apo AI, AII, AIV, AV und Apo E). Freies Cholesterin wird zum Teil von Makrophagen via ABC-A1 auf HDL übertragen und dort durch die Lezithin-Cholesterol-Azyl-Transferase (LCAT) verestert (Bodzioch et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999). Die Cholesterinester-Aufnahme in die Leber verläuft auf verschiedenen Wegen. Es können ganze HDL-Partikel rezeptorvermittelt in die Hepatozyten aufgenommen werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer selektiven Cholesterinester-Aufnahme aus dem Kern des HDL, ohne Aufnahme von Apolipoproteinen, unter Mitwirkung des so genannten Scavenger-Rezeptor SR-B1 (Rinninger et al. 1999). Ein anderer Teil des veresterten Cholesterins wird durch die Cholesterolester-Transferprotein (CETP) vermittelte Abgabe an Apo B-enthaltene Lipoproteinklassen (LDL) zur Leber zurückgeführt. 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).

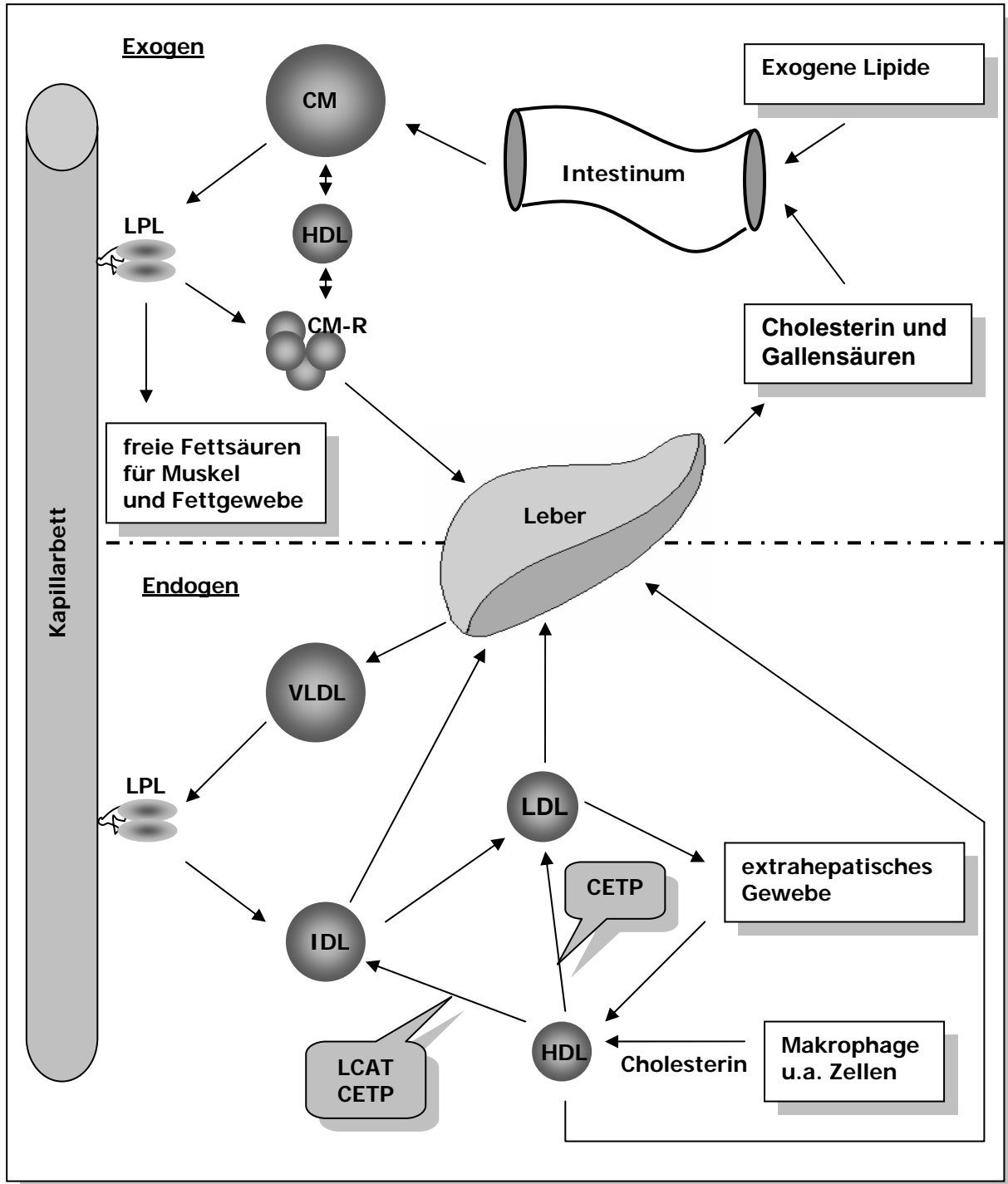


Abb. 1: Stoffwechsel der Lipoproteine. Das exogene und das endogene System beginnen mit der Sekretion triglyzeridreicher Lipoproteine, den Chylomikronen (CM) und VLDL. In beiden Systemen werden die Triglyzeride in der Peripherie durch die endotheliale Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert. Es entstehen Lipoproteine mit hohem Gehalt an Cholesterinestern, die Chylomikronen-Remnants (CM-R) und die Low-density Lipoproteine (LDL). Sie werden durch rezeptorvermittelte Endozytose abgebaut. Der reverse Cholesterintransport befördert Cholesterin aus den peripheren Geweben zur Leber. Die Leber ist das einzige Organ, das größere Mengen Cholesterin ausscheiden kann. Am reversen Cholesterintransport sind High-density Lipoprotein (HDL), Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) und Cholesterolester-Transferprotein (CETP).

1.3. APOLIPOPROTEIN AV

Das Apolipoprotein AV (Apo AV) wurde im Jahre 2001 durch vergleichende Sequenzanalysen (Pennacchio et al. 2001) und als Regenerationsprotein der frühen Phase der Leber entdeckt (van der Vliet et al. 2001).

1.3.1. Genlokus und Charakteristika des Apo AV

Auf Chromosom 11q23 befindet sich 27 kbp distal (3') von Apo AIV das Apo AV-Gen. Es liegt also in unmittelbarer Nähe des Apo AI/CIII/AIV-Lokus und kann deshalb mit zu diesem Gencluster hinzugerechnet werden. Der starke Einfluss dieses Genlokus 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 Apo CIII, 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 (Kinnunen and Ehnolm 1976; Krauss et al. 1973; McConathy et al. 1992; Wang et al. 1985). So korreliert ein hoher Apo CIII Spiegel positiv mit Triglyzeridwerten im Plasma (Ito et al. 1990).

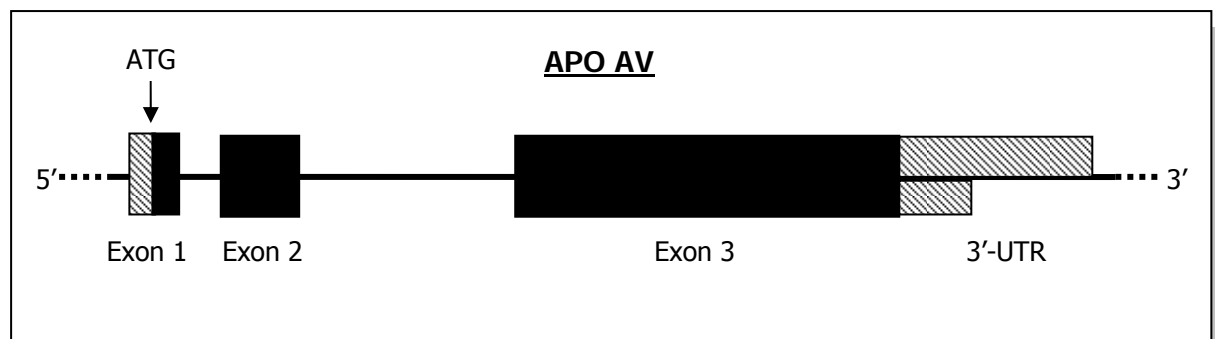


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des humanen Apo AV-Gens. Die translatierten Regionen sind schwarz. Die zwei unterschiedlichen Längen der untranslatierten 3'-Region (3'-UTR) veranschaulichen die verschiedenen Größen der zwei Apo AV-Transkripte.

Das murine Apo AV ist ein aus 368 Aminosäuren bestehendes Protein und besitzt mit anderen Apolipoproteinen signifikante Ähnlichkeiten, insbesondere mit den murinen Apo AI und Apo AIV (jeweils zu 25% homolog). 366 Aminosäuren bilden das humane Apo AV, es ist zu 71% identisch mit dem murinen Apo AV und besitzt ebenfalls eine ausgeprägte Homologie mit dem humanen Apo AIV (Pennacchio et al. 2001). Das 39 kDa große Protein Apo AV wird ausschließlich in der Leber synthetisiert und kommt, im Gegensatz zu den anderen Apolipoproteinen z.B. Apo AI (1200-1400mg/l), bei normolipämischen Subjekten nur in einer sehr geringen Plasmakonzentration (0,05-0,5 µg/ml) vor (Baroukh et al. 2004). Hier ist Apo AV mit VLDL und HDL assoziiert.

1.3.2. Apo AV als Leberregenerationsprotein

Eine tierexperimentelle Analyse von Genen, die an der Leberregeneration beteiligt sind, zeigte im Rahmen einer partiellen Hepatektomie von Ratten nach 6 Stunden eine Hochregulation eines bis dato unbekanntes Proteins Apo AV. Da der Apo AV-Plasmaspiegel schnell wieder sank, ging man davon aus, dass das frei zirkulierende Apo AV eine sehr geringe Halbwertszeit besitzt. Während der gesamten Leberregenerationsphase blieb jedoch der Plasmaspiegel der Apo AV enthaltenden Lipoproteine annähernd konstant, was eine spezifische Funktion des Apo AV bei der frühen Phase der hepatischen Regeneration wahrscheinlich macht. Die Autoren vermuten eine Apo AV vermittelte Stimulation der Lipidaufnahme in die Hepatozyten zur Unterstützung der *de novo* Synthese von Biomembranen (van der Vliet et al. 2001). Eine vollständige Aufklärung der genauen Funktion des Apolipoproteins AV bei der Leberregeneration ist noch nicht publiziert.

1.3.3. Die Wirkung von Apo AV auf den Triglyzeridspiegel

Bisherige Daten von Menschen und Mäusen weisen darauf hin, dass die wichtigste Eigenschaft von Apo AV die Senkung der Plasmatriglyzeride ist. Experimente an genetisch veränderten Mäusen zeigten, dass Apo AV transgene Tiere einen um zwei Drittel niedrigeren und Apo AV Knockout Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel als die jeweilige Kontrollgruppe haben (Pennacchio et al. 2001). Bei Wildtyp Mäusen mit adenoviral überexprimiertem Apo AV fand man wesentlich erniedrigte Triglyzerid- und Cholesterin-Plasmaspiegel vor (van der Vliet et al. 2002). Verschiedene Studien weisen auch auf einen Zusammenhang zwischen Punktmutationen (SNPs) im Apo AV-Gen und Plasmatriglyzeridwerte und der Familiären Kombinierten Hyperlipoproteinämie (FCHL) hin (Evans et al. 2003; Pennacchio et al. 2001; 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 Apo AV-Gens mehrfach beschrieben worden (Prieur 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; Schoonjans et al. 1996; Staels et al. 1995). So wird z.B. wird die hepatische Produktion von Apo CIII inhibiert und möglicher Weise die Expression der Lipoproteinlipase bzw. die Transkriptionsrate des Apo AV-Gens durch PPAR α stimuliert. Große Bedeutung erhält dieser Zellkernrezeptor unter anderem durch seine Aktivierung durch die zur Therapie des Metabolischen Syndroms und zur allgemeinen Triglyzeridsenkung eingesetzten Fibrate (Cziraky 2004; Fruchart and Duriez 2006; Scott 2003).

Der molekulare Mechanismus der Triglyzeridsenkung durch Apo AV war zu Beginn der Studie ungeklärt. Eine Senkung der Plasma-Triglyzeride könnte entweder durch eine verminderte Produktion oder durch einen beschleunigten Abbau triglyzeridreicher Lipoproteine zustande kommen. Da Apo AV eine hohe Affinität zu Lipiden und eine niedrige Elastizität besitzt wurde vermutet, dass Apo AV den zweiten Schritt der VLDL-Zusammensetzung durch Bindung an Lipide und zelluläre Membranen beeinträchtigt und es dadurch zu einer reduzierten VLDL-Produktion in der Leber kommt (Weinberg et al. 2003). Weiterhin könnte Apo AV den Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen im Plasma durch Aktivierung der Lipoproteinlipase oder durch Beeinflussung der Konzentration bzw. Funktion anderer Apolipoproteine beschleunigen.

1.3.4. Lipoproteinlipase und plasmatische TG-Hydrolyse

Die Lipoproteinlipase als zentrales Enzym der plasmatischen Triglyzerid-Hydrolyse erscheint als Angriffspunkt des Apo AV wahrscheinlich. Sie ist ein homodimer vorliegendes Glykoprotein und vermittelt die Hydrolyse von Triglyzeriden aus Chylomikronen und VLDL. Hierbei ist sie an heparansulfatreiche Proteoglykane der Kapillarendothelien gebunden. Die bei der Hydrolyse entstehenden freien Fettsäuren können von den Parenchymzellen der Organe aufgenommen und assimiliert werden. Die Lipoproteinlipase findet sich vor allem im Fettgewebe, im Herzen, in der Lunge und in der Skelettmuskulatur. Im Hungerzustand wird die Expression der Lipoproteinlipase im Fettgewebe vermindert, im Herz und in der Skelettmuskulatur gesteigert (Übersichten in Goldberg 1996; Zechner 1997). Weiterhin ist die Lipoproteinlipase strukturell an der zellulären Aufnahme von Lipoproteinen und der selektiven Cholesterinester-Aufnahme beteiligt (Beisiegel et al. 1991; Olivecrona et al. 1995). Homozygote Defizienz der LPL-Aktivität führt zur Chylomi-

kronämie. Heterozygote Mutationen im LPL-Gen wurden mit der FCHL und der koronaren Herzkrankheit assoziiert (Übersichten in Brunzell 1995; Goldberg and Merkel 2001). LPL ist nur in ihrer dimeren Form aktiv und benötigt Apo CII als einen essentiellen Cofaktor (Übersicht in Brunzell 1995). Ihre Aktivität kann durch Apo CIII gemindert werden.

1.3.5. Die Wirkung von Apo CIII auf den Triglyzeridspiegel

Tierexperimentelle Studien belegten, dass ein hoher Apo CIII-Spiegel mit hohen Plasmatriglyzeriden korreliert (Aalto-Setälä et al. 1992; Aalto-Setälä et al. 1996). Da Apo CIII und Apo AV eine genau gegensätzliche Wirkung auf die Plasmatriglyzeride besitzen, wurde u.a. vermutet, dass die Wirkung von Apo AV durch Apo CIII vermittelt wird. Dafür spricht, dass bei Mäusen Modifikationen an diesem Genlocus häufig zu Veränderungen in benachbarten Genregionen führten (Vergnes et al. 2000; Weinstock et al. 1997). Apo AV transgene Mäuse (Apo AV^{tr}) haben einen um 40% verminderten und Apo AV defiziente Mäuse (Apo AV^{KO}) einen um 90% erhöhten Apo CIII-Plasmaspiegel (Pennacchio et al. 2001). Dagegen sprechen *in vitro* Studien (Schaap et al. 2004) und Experimente an Mäusen, die doppelt defizient bzw. transgen für Apo CIII und Apo AV sind (Baroukh et al. 2004). Sie legen nahe, dass die Wirkung von Apo AV auf die Triglyzeridspiegel zumindest zum Teil unabhängig von Apo CIII ist.

1.3.6. Hepatische VLDL-Produktion und mögliche Beeinflussung durch ApoAV

Die hepatische VLDL-Produktion beginnt mit der Synthetisierung von Apo B100 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). Für die initiale Akkumulation der Triglyzeride und die anschließenden Transfer auf Apo B scheint ein microsomales Transferprotein (MTP) von essentieller Bedeutung zu sein (Kulinski et al. 2002; Millar and Packard 1998). Die naszierenden VLDL-Partikel werden durch Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, sowie durch Ausbildung von Disulfidbrücken modifiziert und 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 Apo AV, Apo E- und Apo C-Moleküle auf, die zum einen als Cofaktoren der LPL die Hydrolyse der Triglyzeride aktivieren bzw. inhibieren (Apo CII bzw. Apo CIII), zum anderen aber eine vorzeitige Entfernung aus der Zirkulation verhindern (Apo CI, Apo CIII). Apo AV, das eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit dem

mikrosomalen Triglyzerid-Transferprotein besitzt (Beckstead et al. 2003), 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).

1.4. ZIEL DER ARBEIT

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, den molekularen Mechanismus der Apo AV vermittelten Triglyzeridsenkung weiter zu erforschen. Es wurde ein bereits etabliertes Mausmodell mit homolog Apo AV defizienten Tieren (Apo AV KO) verwendet (Pennacchio et al. 2001).

Bei den Apo AV defizienten Mäusen, so genannten Knockout Tieren, wurden die Apo AV codierenden Exons durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt.

Zunächst wurde das Lipoproteinprofil von Plasmaproben der Mäuse mittels FPLC und Ultrazentrifugation mit anschließendem Triglyzerid- bzw. Cholesterolassay erstellt. Da in dem etablierten Tiermodell Veränderungen der Lipoprotein-Produktion und/oder des – Abbaus zu erwarten sind, wurden metabolische Studien durchgeführt, mit denen sich für VLDL bzw. CM die Produktion bzw. der Abbau bestimmen lässt. Es erfolgte die Charakterisierung durch Abbau- und Organaufnahmestudien mit radioaktiv markierten bzw. mit Apo AV inkubierten VLDL und Chylomikronen. Des Weiteren wurde eine VLDL-Produktionsstudie mit radioaktiv markiertem Glyzerol durchgeführt. Durch diese Experimente war zu erwarten, dass der Mechanismus der Apo AV vermittelten TG-Senkung weiter aufgeklärt wird.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheit 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 |
| Cholesterin und TG, 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 |
| Szintillationsflüssigkeit, 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 mA5wt/1FW Primer mA5wt/2BW Primer AVNeo/1FW Primer AVNeo/2BW | MWG Biotech AG, Ebersberg |

2.1.4. Narkosemittel

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

2.1.5. 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 |

2.1.6. Geräte

| Gerät | Hersteller |
|-------------------------------|----------------------------------|
| Betacounter Tri-carb, 1600 TR | Packard, Frankfurt |
| FPLC [®] -Anlage | Amersham-Biosciences, London, UK |
| Fraktionssammler | Pharmacia LKB, Upsala Schweden |
| Feinwaage | Sartorius, Göttingen |
| Gel-Elektrophoresekammer | Biorad, München |
| Gammaconter Cobra II | Packard, Frankfurt a. M. |
| 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 |

2.1.7. Standard-Pufferlösungen

| Puffer | Inhaltsstoffe |
|---|---|
| PCR-Puffer (Stamm-puffer 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 1 M MgCl_2 , 570 μl 1 M DTT, 9,65 ml 1 mg/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. |
| 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. Tierhaltung und Versuchsgenehmigungen

Die Mäuse wurden in pathogenarmen Räumen der Versuchstierhaltung des UKE untergebracht. Um Infektionsfreiheit zu gewährleisten, wurden alle Mauslinien vor Aufnahme in die Tierhaltung einem Embryotransfer unterzogen. Bei allen verwendeten Tieren waren sämtliche Serologien negativ, insbesondere wurde auf Seronegativität des Maus-Hepatitis-Virus (MHV) geachtet.

Freier Zugang zu Wasser und Futter, einer normalen Nager-Diät, wurde gewährleistet. 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. Apo AV Knockout Mäuse

Bei diesen Tieren, bezogen vom Genome Sciences Department, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, USA, wurden 3 Apo AV codierende Exons durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt (Pennacchio et al. 2001).

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.

2.2.3. Kreuzungsstrategie

Die heterozygoten Mäuse (Apo AV +/-) wurden zunächst mit Wildtyp-Mäusen (Wt; Apo AV +/+) verpaart. Es wurde erwartet, dass die Hälfte der Nachkommen heterozygot bezüglich der Apo AV Defizienz und die anderen 50% Wildtyp Tiere sein würden. Um eine Homozygotie bezüglich des Neo-Gens (Apo AV -/-), also ein vollständiges Fehlen des Apo AV Gens zu erreichen, wurden heterozygote Tiere miteinander verpaart. Nach den Mendelschen Regeln erwartete man bei den Nachkommen folgende Genotypen: 50% heterozygote (Apo AV +/-), 25% knockout (Apo AV -/-) und 25% Wildtyp (Apo AV +/+) Tiere. Um eine bessere Quote für *in vivo* Experimente zu erlangen, wurden nun Apo AV heterozygote und knockout Tiere verpaart. Aus diesem Verpaarungsschema sollten nun 50% heterozygote und 50% knockout Tiere hervorgehen.

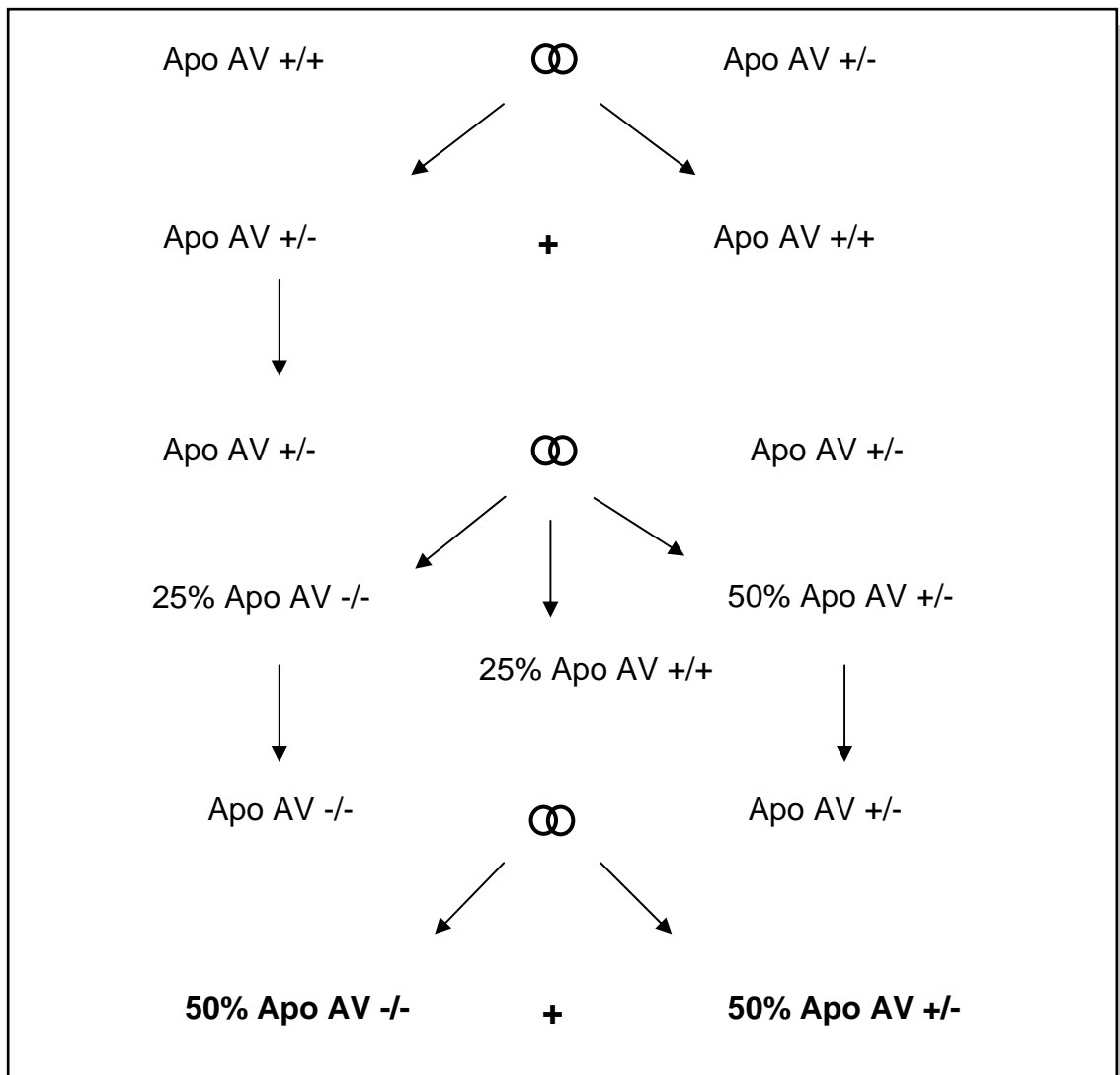


Abb. 3: Kreuzungsschema zur Generierung der gewünschten Genotypen. Um Apo AV defiziente Mäuse (Apo AV -/-) zu erzeugen, wurden Apo AV heterozygote Tiere (Apo AV +/-) in drei Kreuzungsschritten mit folgenden Tieren verpaart 1. Wildtyp (Apo AV +/+), 2. heterozygote (Apo AV +/+) und 3. knockout Tiere (Apo AV -/-). Daraus entstanden Mäuse mit homozygoter und mit heterozygoter Apo AV Defizienz (zu erwartende Häufigkeit von jeweils 50 %).

2.2.4. Genotypisierung

2.2.4.1. Prinzip

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch DNA-Gewinnung und Reinigung aus einer Schwanzspitzenbiopsie, anschließender PCR und Analyse der PCR-Produkte mittels AgaroseGel-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 Proteinase K verdaut.

2.2.4.2. Schwanzbiopsie Entnahme

Um die Mäuse mit Ether zu narkotisieren wurden sie in ein abdeckbares Gefäß gesetzt, welches Ether-getränkte Zellstofftücher enthielt. Anhand der Atemfrequenz und -tiefe konnte die Narkosetiefe gesteuert werden: Bei tiefer Atmung mit niedriger Frequenz ist eine ausreichende Narkosetiefe erreicht. Die Mäuse wurden am Schwanz aus dem Ethertopf genommen, und mit einem Skalpell 5 mm der Schwanzspitze entfernt. Noch narkotisiert wurde jede Maus am Ohr mit einer Ohrlochzange markiert, damit sie für die nachfolgenden Versuche identifizierbar blieb. 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 zweifache 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-CL pH 8,0, 80 ml 5 M NaCl und 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 hinzugefügt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Endkonzentrationen des Puffers setzten sich wie folgt zusammen: Harnstoff 2 M; Sarkosyl 0,25 %; Tris-CL pH 8,0, 0,05 M; 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. DNA-Extraktion

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 400 µl davon in das die verdaute Schwanzspitze enthaltene 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 der Hämatokritkapillare aus dem Ethanol in 200 µl TE-Puffer überführt werden. Die genomische DNA ist bei 4 °C über mehrere Wochen stabil und kann durch PCR untersucht werden.

2.2.4.5. PCR

2.2.4.5.1. Apo AV-WT-PCR

Zur Bestimmung des Maus-Apo AV-WT-Gens (Apo AV +/+ und Apo AV +/-) wurde eine bereits etablierte 2-Primer-PCR verwendet.

In Gegenwart des intakten Maus-Apo AV-WT-Gens amplifizieren die Primer mAVwt/1FW (5' -ACA GTT GGA GCA AAG GCG TGA T-3') und Primer mAVwt/2BW (5' -CTT GCT CGA AGC TGC CTT TCA G-3') eine Bande von 516 Basenpaaren (bp). Bei einem Reaktionsvolumen von 26,5 µl wurden 20 µl PCR-Puffer, je 1 µl der Primer mAVwt/1FW und mAVwt/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 53 °C und 3 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte wurden bis zur Gel-Elektrophorese bei 4° C aufbewahrt.

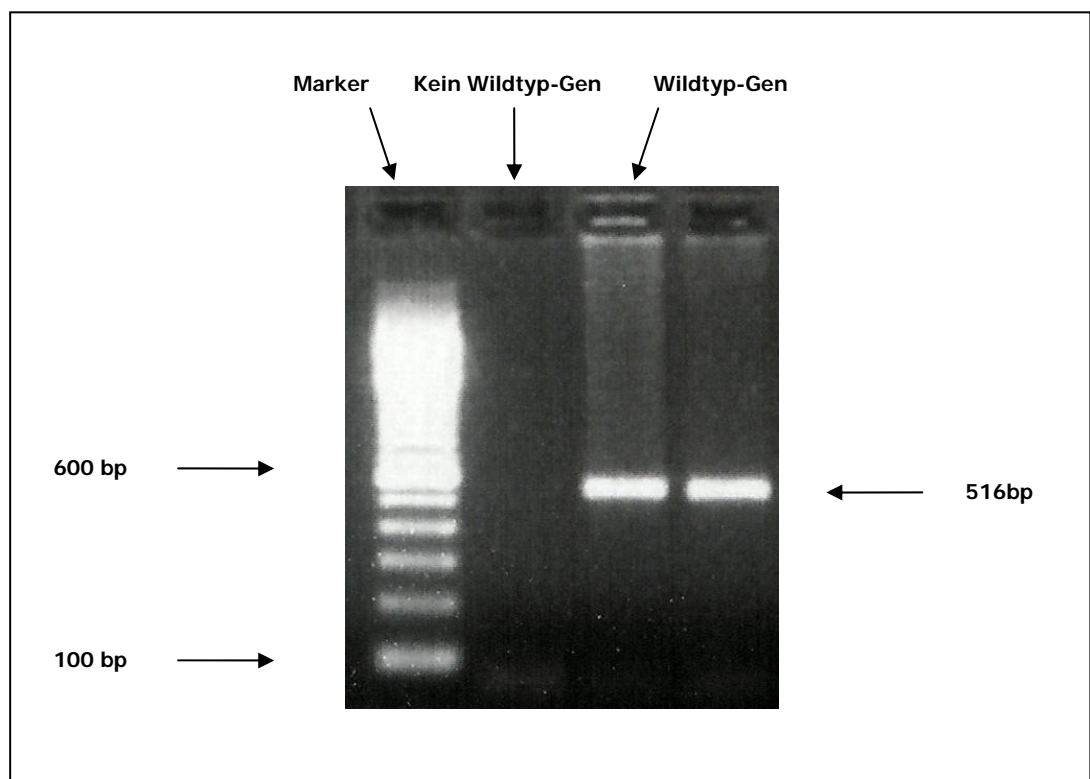


Abb. 4: PCR für das Wildtyp-Gen: Es wurde ein 100bp Marker verwendet, dessen stärkste Bande die Größe von 600bp aufweist. Bei Vorliegen des Wildtyp-Gens (Apo AV +/+ und Apo AV +/-) ist eine 516bp große Bande vorhanden.

2.2.4.5.2. Apo AV-Neo-PCR

Zum Nachweis des Neomycin-Resistenz-Gens (Apo AV +/- und Apo AV -/-) wurde eine 2-Primer-PCR angewendet.

Primer AVNeo/1FW (5' -CTT TTT GTC AAG ACC GAC CTG-3') und

Primer AVNeo/2BW (5' -AAT ATC ACG GGT AGC CAA CGC-3')

amplifizieren in Gegenwart des Neomycin-Resistenz-Gens eine Bande von 545 bp. Bei einem Reaktionsvolumen von 25,5 µl wurden 20 µl PCR-Puffer, je 0,5 µl der Primer

AVNeo/1FW und AVNeo/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 53 °C und 3 min bei 72 °C.

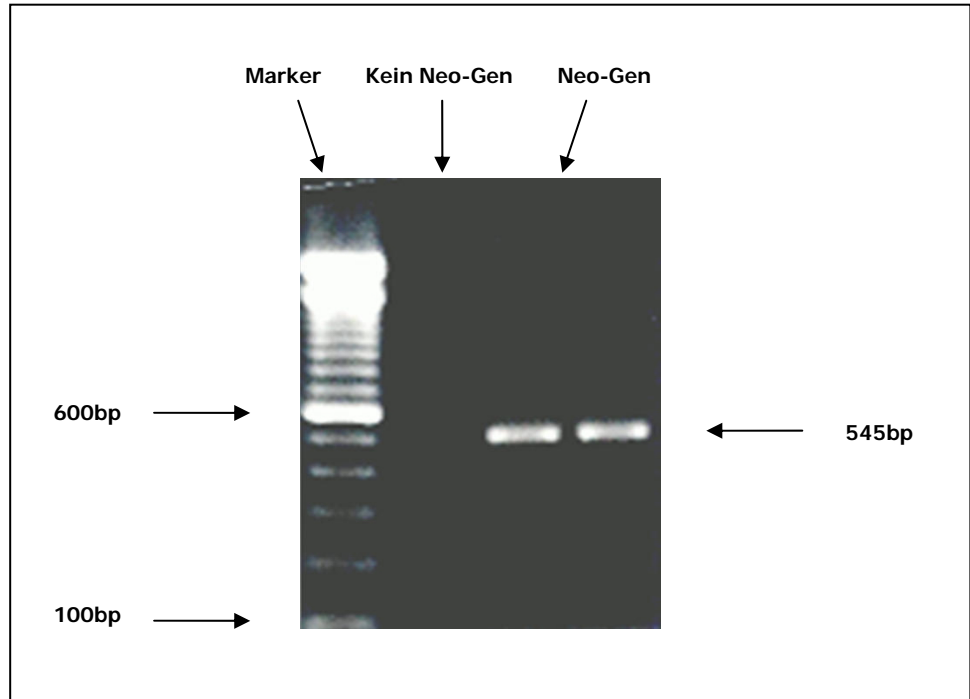


Abb. 5: PCR für das Neo-Gen: Es wurde ein 100bp Marker verwendet, dessen stärkste Bande die Größe von 600bp aufweist. Bei Vorliegen des Neo-Gens (Apo AV +/- und Apo AV -/-) ist eine 545bp große Bande vorhanden.

2.2.4.6. Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5 %iges Agarosegel verwendet. Für das Gel wurden 100 ml TBE-Puffer mit 1,5 g Agarose in der Mikrowelle für 2 min bei 600 W erhitzt und anschließend 5 μl 10 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Das Gemisch wurde in eine Gelkammer mit einem 15- oder 20-zähligen Kamm gegossen. Nach circa 20 min war das Gel fest, nun konnte der Kamm gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt werden. Diese wurde soweit mit TBE-Puffer gefüllt, dass das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche wurden 13 μl eines 100 bp Markers (1:10 verdünnt mit Bromphenolblau-Puffer) zur Größenbestimmung der Banden hineingegeben. In die folgenden Taschen wurden nun 13 μl der PCR-Probe pipettiert, die zuvor mit 3 μl Bromphenolblau-Puffer vermischt wurden (für den BPB-Puffer löst man eine Spatelspitze BPB in Aqua dest. und verdünnt hiermit 87%iges Glycerin auf 80%).

Bei einer Spannung von 100-120 V wurde das Gel für mindestens 1h laufen gelassen und anschließend wurden die Banden unter UV-Licht durch Interkalation der DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und das Gel fotografiert.

2.2.5. Lipoproteinprofil

2.2.5.1. Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden erwachsene Tiere mit Ether in eine Kurzzeitrnarkose versetzt. Mittels einer heparinisierten Hämatokritkapillare wurde das Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus gewonnen. Bei Blutentnahmen von mehr als 100 µl wurden je 100 µl Blut 2 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5) zur Antikoagulation hinzugefügt. Anschließend wurde das Plasma durch Zentrifugation (5 Minuten bei 7000 rpm) von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes getrennt und abgenommen.

Für die Nüchternblutentnahme wurde den Mäusen nach 8 Stunden Fasten (8.00 - 16.00 Uhr) Blut abgenommen. Mäuse fressen vorwiegend in der Dunkelphase. Fasten über Nacht wäre unphysiologisch, da die Tiere am nächsten Morgen 24 Stunden nichts gefressen hätten. Daher entspricht ein Fasten tagsüber bei Mäusen am ehesten einer Nüchternblutentnahme beim Menschen.

2.2.5.2. Prinzip der Ultrazentrifugation

Zur sequentiell Auftrennung von Lipoproteinen in einer Dichte von 1,006 g/ml und 1,062 g/ml wurde Plasma ultrazentrifugiert (Havel et al. 1955). 60 µl PBS wurde in Ultrazentrifugenröhrchen 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. Nach diesen 2,5 h befand sich in den oberen 60 µl die VLDL und in den unteren LDL, IDL und HDL. Mit einer Hamilton-Spritze wurde die untere Phase in ein neues Ultrazentrifugenröhrchen überführt.

Die obere Phase mit den VLDL wurde zur weiteren Verwendung in ein verschließbares Reaktionsgefäß überführt.

2.2.5.3. Fast Performance Liquid Chromatography

Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration nach der Methode von Rudel *et al.* eingesetzt (Rudel et al. 1986). Dazu wurde eine Fast performance liquide chromatography (FPLC[®])-Anlage (Amersham-Biosciences) mit einer Superose[®]-6-Säule (Pharmacia LKB, Upsala Schweden) verwendet, die einen für Plasmalipoproteine optimalen Trennbereich von 5-5000 kDa besitzt. Gut 200 µl des zuvor

gepoolten Plasmas wurden in ein automatisches Probenentnahmegesetz injiziert. Die Probenschleife mit einem Gesamtvolumen von 200µl wurde automatisch befüllt und das restliche Plasma in einen Abfallbehälter geleitet. Das Plasma wurde auf die Säule geleitet und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in FPLC-Puffer (1 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgetrennt. Das Probengemisch trennte sich durch unterschiedliche Flussgeschwindigkeit nach Größe der verschiedenen Komponenten an den Gelmolekülen. Das so entstandene Eluat wurde in 0,5-ml-Fractionen gesammelt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C aufbewahrt und in den Fractionen Cholesterin und Triglyzeride photometrisch bestimmt.

2.2.5.4. Bestimmung von Cholesterin und Triglyzeriden

Das Prinzip des Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Assays beruht auf einem enzymatischen Farbtest, wobei die Extinktion des in der Reaktion entstehenden rötlichen Farbstoffes proportional zur Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Konzentration ist. Eine Standardreihe im Dreifachansatz, aus der sich später der Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Gehalt der Plasmaproben errechnen ließ, wurde auf jede verwendete Mikrotiterplatte aufgetragen.

Es wurden 5 µl Plasma bzw. 10 µl Probe nach Lipoprotein-Zentrifugation im Dreifachansatz eingesetzt. Der jeweilige Standard der Reagenzien (200 mg/ml bei der Cholesterin-Bestimmung und 250 mg/ml bei der Triglyzerid-Bestimmung) wurde auf 50 und 100 mg/ml verdünnt und jeweils 5 µl im Dreifachansatz eingesetzt. Jede Probe wurde mit 200 µl der Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Reagenzien (Standardlösungen für Assays; Roche Diagnostics, Mannheim) in der Mikrotiterplatte gemischt. Anschließend wurden die Assays inkubiert 5 min bei 37 °C (Cholesterin) bzw. 30 min bei Raumtemperatur (Triglyzerid). Die Extinktion des rötlichen Farbstoffes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. 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. Cholesterin-Gehalt in mg/ml berechnet werden.

2.2.6. Metabolische-Studien

2.2.6.1. Prinzip

In dem etablierten Tiermodell sind Veränderungen der Lipoprotein-Produktion und/oder des –Abbaus zu erwarten. Es wurden metabolische Studien durchgeführt, mit denen sich für VLDL bzw. CM die Produktion bzw. der Abbau bestimmen lässt. In der Produktionsstudie wurde die plasmatische Hydrolyse durch Tyloxapol inhibiert,

anschließend erfolgte eine intravenöse Injektion radioaktiv markierten Glycerins. Turnoverstudien erfolgten entweder mit *in vitro* markierten humanen Chylomikronen eines Apo CII-defizienten Spenders bzw. murinen VLDL oder mit *in vivo* markierten VLDL, die zum Teil mit rekombinantem Apo AV versetzt waren.

2.2.6.2. VLDL-Produktionsstudie

Sechs Mäuse je Genotyp wurden 5 h vor Beginn des Experiments gefastet. Den mit Ether narkotisierten Mäusen wurde die zur Injektion vorgesehene Stelle rasiert und eine 10%ige Triton WR 1339-Lösung (500 mg/kg Tyloxapol, Sigma, Deisenhofen) zur Inhibition der plasmatischen Hydrolyse in die Schwanzvene injiziert. Zur Untersuchung der hepatischen VLDL-Produktion wurden nach 2 min 100 µCi [³H]-Glycerin (Amersham, Arlington Heights, USA) intravenös injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 30, 60 und 120 min) erfolgten Blutentnahmen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus, wiederum in Narkose. Zunächst wurden die Gesamt-Triglyzeride des Plasmas bestimmt, anschließend erfolgte eine Extraktion des Lipidanteils nach der Methode von Dole *et al.* (Dole 1956). Um die Radioaktivität speziell in der VLDL-Fraktion bestimmen zu können, wurde 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.

2.2.6.3. Turnoverstudien

Zur Untersuchung des Umsatzes von Triglyzeriden wurde VLDL *in vivo* markiert. Hierfür wurden 500 µCi an Albumin gebundene [1-³H]-Palmitinsäure (Amersham, Arlington Heights, USA) in die Schwanzvene von Mäusen des entsprechenden Genotyps injiziert. Nach 60 min wurde eine Blutentnahme durchgeführt. Anschließend wurde die VLDL per Ultrazentrifugation gewonnen und für einen Versuch mit rekombinantem Apo AV inkubiert.

Um den Abbau von Lipoprotein-Partikeln zu untersuchen, wurden humane Chylomikronen eines Apo CII-defizienten Spenders oder murine VLDL verschiedener Genotypen *in vitro* mit ¹²⁵Iod markiert. Die Markierungen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. rer. nat. J. Heeren (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt.

Bei allen durchgeführten Abbaustudien wurden die Mäuse (7-8/Gruppe) 6 h vor Beginn des Experiments gefastet.

Um die Abbaurate von Triglyzeriden aus VLDL zu untersuchen wurden *in vivo* markierte Apo AV defiziente ³H-VLDL den Knockout Mäusen und der heterozygoten

Vergleichsgruppe injiziert. 1, 2, 5, 10, 20 und 30 min nach der Injektion wurde unter Narkose Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen, zentrifugiert und dessen Radioaktivität gemessen. Nach den 30 min wurden die Mäuse mit Ketaxyl (Dosierung: 10 µl/g Körpergewicht) narkotisiert. 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. Es wurden Herz, 4 Muskelbiopsate aus Ober- und Unterschenkel, 4 Leberlappen, Milz, Lunge, Fettgewebe und Niere entnommen und gewogen und danach in passende Counterröhrchen überführt.

Zur Untersuchung der Abbaurate von der Proteinkomponente, wurden murine Apo AV defiziente VLDL-Apolipoproteine *in vitro* mit ¹²⁵Iod markiert (Pittman and Taylor 1986). Nach Injektion der VLDL in Apo AV defiziente und heterozygote Tiere, wurde der retroorbitale Plexus nach 2, 5, 10, 20 und 30 min punktiert. Nach Injektion der Ketaxyl-Narkose wurden die Organe wie oben beschrieben entnommen.

Um den Einfluss möglicher anderer veränderter Apolipoproteine, an der Triglyzeridsenkung zu untersuchen, wurde VLDL *in vivo* in Wildtyp-, Apo AV transgenen- und Apo AV defizienten Mäusen markiert. Die verschiedenen VLDL wurden Wildtyp Mäusen injiziert. Nach 1, 2, 5, 10 und 20 min erfolgte eine Punktion des retroorbitalen Plexus.

Um den Unterschied des Abbaus triglyzeridreicher Lipoproteine sehr geringer Dichte selektiv mit und ohne Apo AV ermitteln zu können, wurden *in vivo* markierte Apo AV defiziente ³H-VLDL entweder mit PBS oder 30 µg/ml rekombinantem Apo AV inkubiert. Die Herstellung erfolgte freundlicherweise von Herrn PD Dr. rer. nat. J. Heeren (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Die radioaktiven VLDL mit und ohne rekombinantem Apo AV wurden zwei Gruppen von Knockout Mäusen injiziert. 1, 2, 5, 10, 20 und 30 min nach der Injektion wurde Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen, zentrifugiert und dessen Radioaktivität gemessen.

2.2.6.4. Messung der Radioaktivität

Zur Messung der ³H-Counts wurden die Organe in 2 ml Solvable (Packard Instruments, Frankfurt) aufgelöst. Die gelösten Organe und die Plasmaproben wurden in entsprechenden Röhrchen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und anschließend zweifach für je 2 Minuten gemessen. Die ¹²⁵I-Messung in den entsprechenden Röhrchen erfolgte zweifach für je eine Minute in einem Gammacounter.

2.2.6.5. Lipidextraktion

Bei doppelt markierten Partikeln erfolgte die Extraktion der Lipide aus Plasma nach der Methode von Dole *et al.* (Dole 1956). Die 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 H₂SO₄ (20 ml), also insgesamt 1020 ml hergestellt.

Dem Plasma wurden 100 µl PBS hinzugefügt. Anschließend wurde 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. Die Proben wurden 10 min stehen gelassen, dabei 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. MAUSZUCHT

Um die gewünschten Genotypen zu erhalten, wurden zunächst fünf Verpaarungen mit heterozygoten (Apo AV +/-) Mäusen durchgeführt. Aus dieser Zucht resultierten 49 Jungtiere (Männchen und Weibchen), davon waren 11 Mäuse homozygot Apo AV defizient. In einem zweiten Kreuzungsschritt wurden heterozygote (Apo AV +/-) mit knockout Mäusen (Apo AV -/-) verpaart. In 11 Würfen waren 117 Jungtiere. Wie nach den Mendelschen Regeln erwartet werden konnte, waren die Nachkommen wie folgt verteilt: 51,3% heterozygote (Apo AV +/-) und 48,7% knockout (Apo AV -/-) Tiere. Hieraus resultiert bei heterozygotem Genotyp (Apo AV +/-) eine verminderte Expression von murinem Apo AV und eine vollständige Defizienz bei homozygoten Tieren (Apo AV -/-). Bei letzteren beobachtet man circa 4fach erhöhte TG Werte gegenüber der Wildtyp Kontrollgruppe (Apo AV +/+).

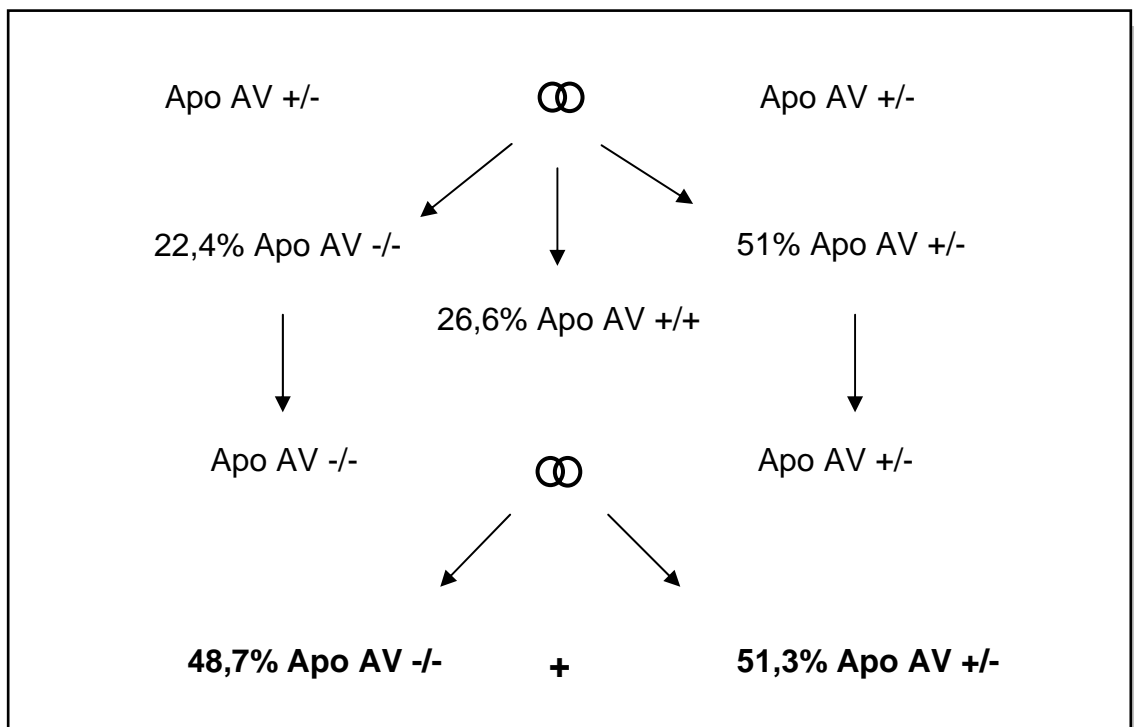


Abb. 6: Ergebnisse der Mauskreuzungen. Im zweiten Kreuzungsschritt wurden Apo AV heterozygote Tiere (Apo AV +/-) mit Apo AV knockout Tieren (Apo AV -/-) verpaart. Daraus entstanden Mäuse mit homozygoter (Häufigkeit von 48,4%) und mit heterozygoter (Häufigkeit von 51,3%) Apo AV-Defizienz.

3.2. LIPOPROTEINPROFIL

Um das Lipoproteinprofil der Apo AV defizienten Mäuse zu bestimmen, wurde gepooltes Plasma mittels FPLC getrennt. Anschließend wurde der Triglyzerid- und Cholesteringehalt der einzelnen Fraktionen durch enzymatische Farbttests bestimmt. Im Lipoproteinprofil fand man in der höchsten Fraktion bei Apo AV KO Mäusen (31 mg/dl) im Vergleich zu Wt-Mäusen (13 mg/dl) in der VLDL-Fraktion deutlich erhöhte Triglyzeride (s. Abb.7). Der Cholesteringehalt zeigte zwischen Wildtyp und knockout Mäusen in der VLDL-Fraktion einen signifikanten Unterschied (Wt-Mäuse 1 mg/dl vs. Apo AV KO Mäuse 3,4 mg/dl). In der HDL-Fraktion fand sich bei Apo AV KO Mäusen ein Cholesteringehalt von 12mg/dl im Vergleich zu 14,5 mg/dl bei Wt-Mäusen, in dieser Fraktion zeigte sich kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 8).

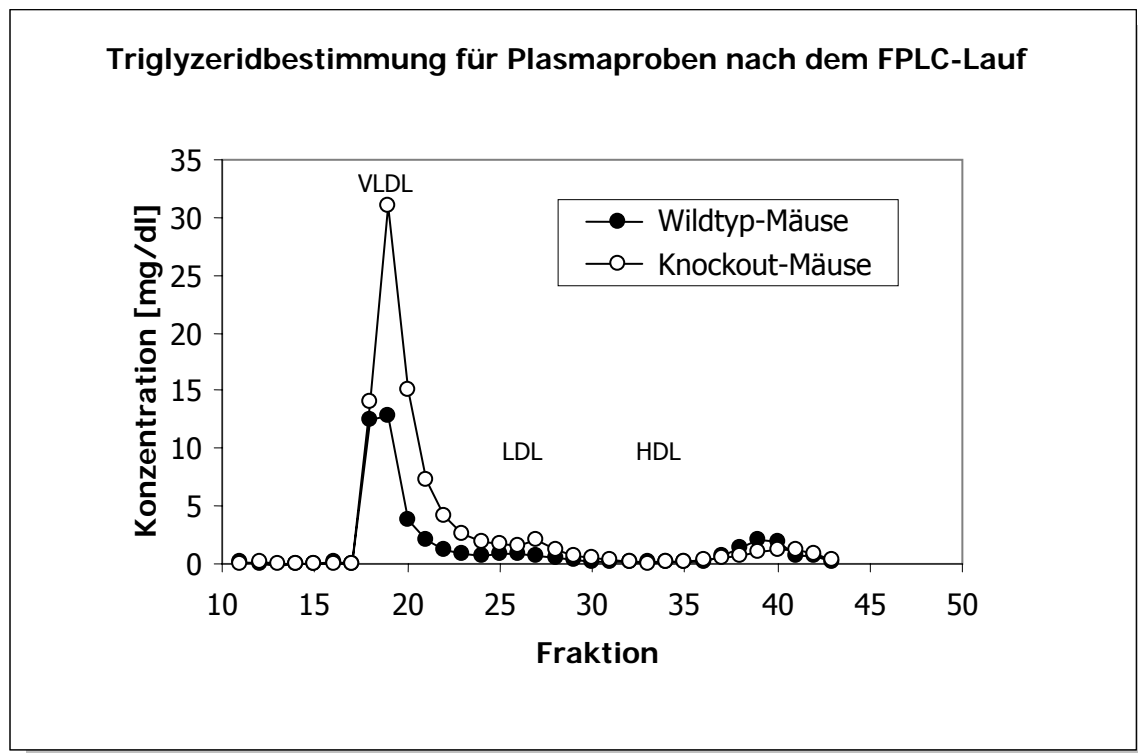


Abb. 7: Triglyceridbestimmung der Plasmaproben nach FPLC-Lauf. In der VLDL-Fraktion der Knockout Mäuse wurde eine mehr als doppelt so hohe Konzentration der Triglyzeride gemessen als in denen der Wildtyp Tiere.

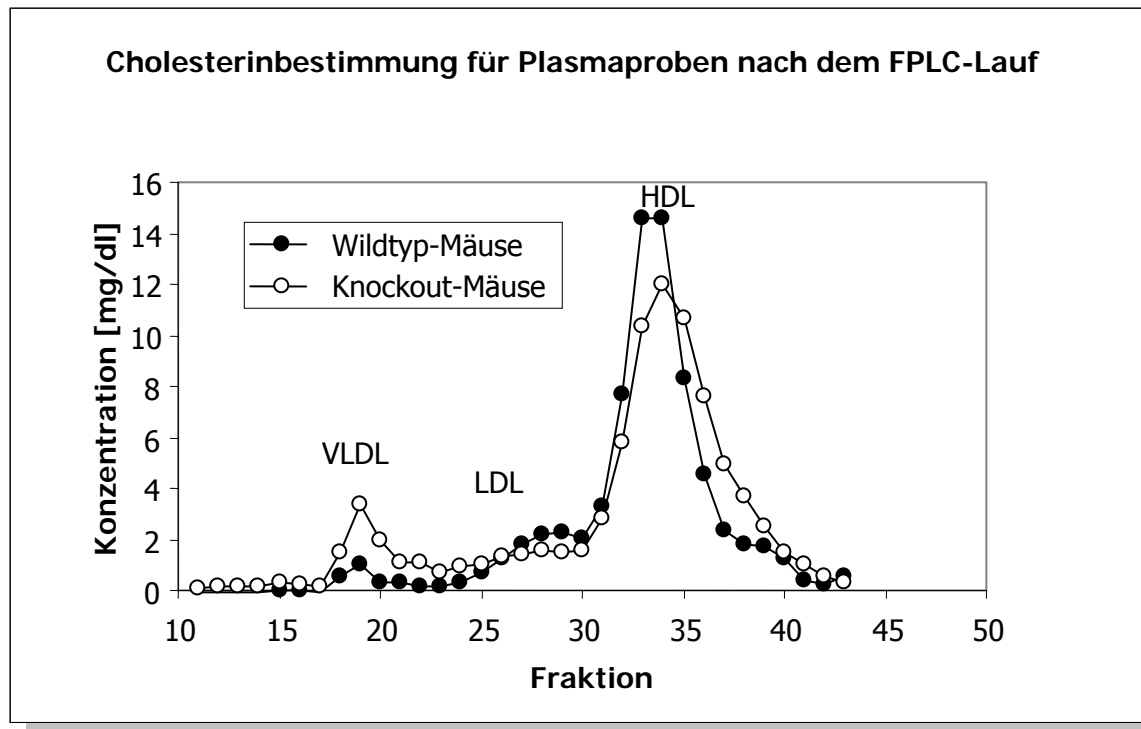


Abb. 8: Cholesterinbestimmung der Plasmaproben nach FPLC-Lauf. In der VLDL-Fraktion zeigte sich bei Apo AV KO Mäusen eine signifikant erhöhte Cholesterinkonzentration. Der Cholesteringehalt in der HDL-Fraktion ist bei Wt-Mäusen deutlich erhöht.

3.3. METABOLISCHE STUDIEN

3.3.1. VLDL-Produktionsstudie

Um die hepatische VLDL-Produktion zu ermitteln, wurden 2 min nach Triton-Injektion 100 μCi [^3H]-Glycerin in die Schwanzvene appliziert. Vor der Glycerin-Injektion sowie 30, 60 und 120 min danach wurde den Apo AV het und Apo AV KO Mäusen Blut entnommen. Nach Zentrifugation wurde die Triglyzeridkonzentration im Plasma photometrisch bestimmt. Hierauf folgten eine Lipidextraktion, eine Lipoprotein-zentrifugation, sowie eine Radioaktivitätsmessung der VLDL-Fraktion, um die selektiven VLDL-Triglyzeride als Maß für die Neuproduktion ermitteln zu können.

Es zeigte sich, dass die Radioaktivität der VLDL-Triglyzeride von Apo AV KO Mäusen nach 60 min signifikant mit 31% über den gemessenen Werten von Apo AV het Tieren lagen (Radioaktivität nach 60 Min. in $\text{cpm}/\mu\text{l}$: $3509,0 \pm 739,2$ bei Apo AV KO Mäusen, $2677,5 \pm 526,7$ bei Apo AV het Mäusen).

Bei der Konzentration der Triglyzeride waren die Werte für 30 und 60 min signifikant (Triglyzeride nach 30 min in mg/dl : Apo AV KO $709,2 \pm 113,1$, Apo AV het $462,2 \pm 93,4$; nach 60 min in mg/dl : Apo AV KO $995,1 \pm 258,9$, Apo AV het $720,4 \pm 121,6$). Diese

Beobachtungen könnten darauf deuten, dass Apo AV die hepatische TG-Synthese (Glyzerol-Einbau) vermindern könnte. Die bei Apo AV KO gefundenen erhöhten Plasma-TG wären dann Folge dieser erhöhten Produktion. Andererseits waren keine Unterschiede im Anstieg der Gesamt-VLDL-TG-Produktion zwischen Apo AV KO und Apo AV het Tieren festzustellen. Dies macht einen fundamentalen Anteil von Apo AV bei einer eventuellen Inhibition der TG-Produktion in der Leber unwahrscheinlich.

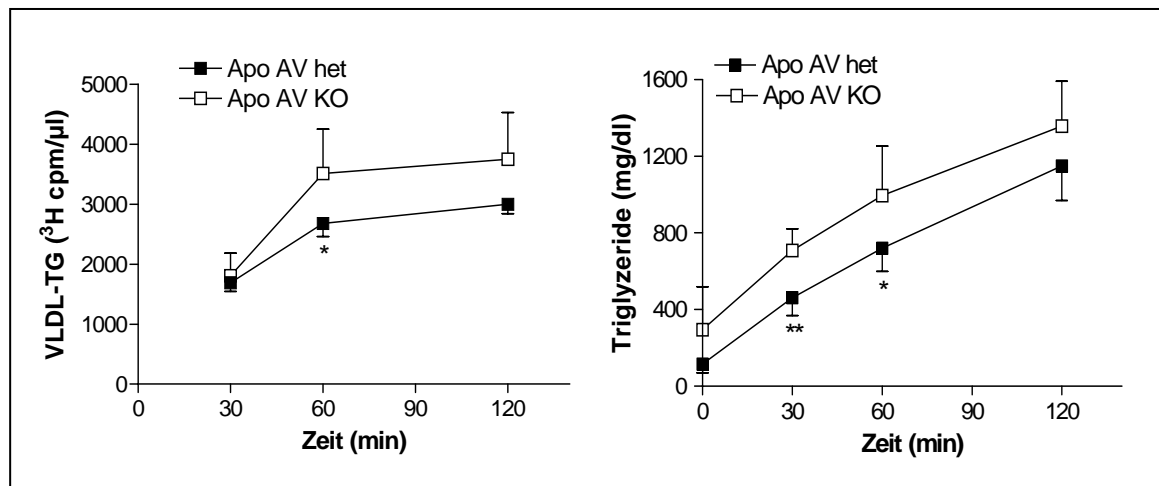


Abb. 9: VLDL-Produktionsstudie. [^3H]-Glycerin wurde Apo AV heterozygoten und knockout Mäusen injiziert. Apo AV defiziente Tiere zeigten bezüglich der Plasma Werte für Radioaktivität und Triglyzeridkonzentration signifikante Erhöhungen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; cpm: counts per minute). Alle erhobenen Daten sind Mittelwert \pm SD.

3.3.2. Turnoverstudien

3.3.2.1. VLDL-Triglyzerid-Abbaustudie

Der folgende Versuch diente der Untersuchung der Abbauraten von Triglyzeriden in Lipoproteinen sehr geringer Dichte. Um VLDL-Triglyzeride *in vivo* zu markieren, wurde Apo AV defizienten Mäusen [$1\text{-}^3\text{H}$]-Palmitinsäure injiziert. Die so radioaktiv markierten und Apo AV defizienten VLDL wurden isoliert und anschließend Apo AV KO Mäusen und der heterozygoten Vergleichsgruppe injiziert. 1, 2, 5, 10, 20 und 30 min nach der Injektion wurde Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen, zentrifugiert und dessen Radioaktivität gemessen. Beide Gruppen zeigten einen zwei-phasig exponentiellen Abfall der Triglyzeride. Die kurze Halbwertszeit der VLDL-Triglyzeride bei Apo AV defizienten Tieren (19,8 min) ist signifikant länger als bei den zu vergleichenden Geschwistertieren (3,4 min, s. Abb. 10). Die entnommenen Organe der Vergleichsgruppen wiesen bezüglich der Aufnahme von Fettsäuren aus VLDL-Triglyzeriden keine signifikanten Unterschiede auf.

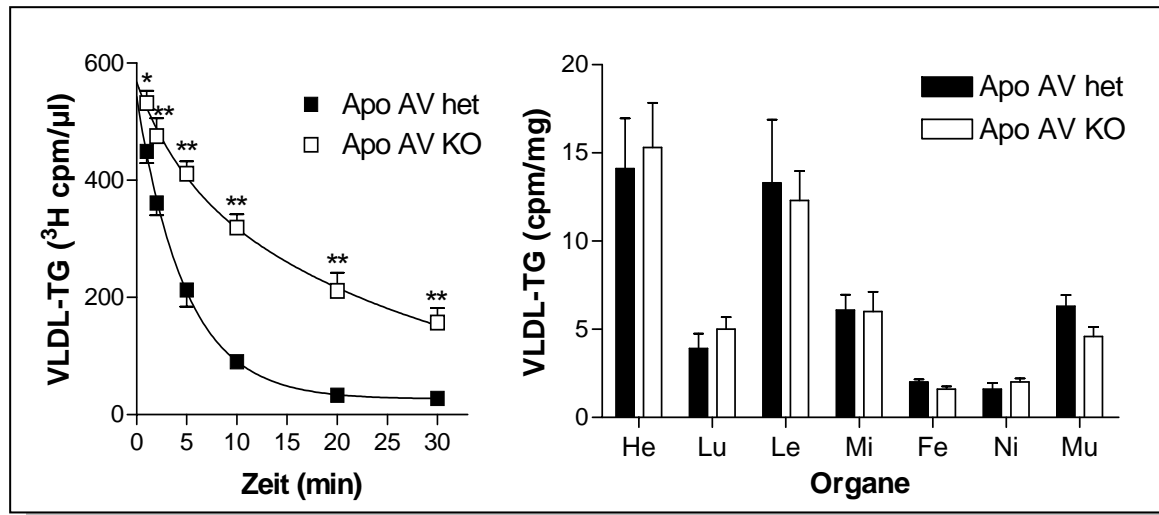


Abb. 10: VLDL-Triglyzerid-Abbau im Plasma und in Organen. In vivo markierte VLDL-Triglyzeride wurden Apo AV het und Apo AV KO Mäusen injiziert. Die Halbwertszeit der Plasma-VLDL-Triglyzeride bei Apo AV defizienten Mäusen ist signifikant länger als bei den zu vergleichenden Geschwistertieren ($*p < 0,05$; $**p < 0,001$). Der Abbau der VLDL-Triglyzeride in Organen zeigt zwischen den Vergleichsgruppen keine signifikanten Unterschiede (cpm: counts per minute; He: Herz; Lu: Lunge; Le: Leber; Mi: Milz; Fe: Fett; Ni: Niere; Mu: Muskel). Alle erhobenen Daten sind Mittelwert \pm SD.

3.3.2.2. VLDL-Apolipoprotein-Abbaustudie

Für diesen Versuch zur Untersuchung der Abbauraten von ganzen VLDL-Partikeln, wurden Apo AV defiziente VLDL *in vitro* mit ^{125}I markiert. Nach Injektion der VLDL in Apo AV defiziente und heterozygote Tiere wurde der retroorbitale Plexus nach 2, 5, 10, 20 und 30 min punktiert. Die Radioaktivitätsmessung des gewonnenen Plasmas ergab für knockout Tiere einen bei 5, 10 und 30 min signifikant langsameren Abbau der VLDL im Vergleich zu ihren heterozygoten Vergleichstieren. Die Menge an radioaktiver VLDL sank bei Apo AV defizienten Tieren mit einem Ausgangswert von 2786 cpm/µl auf 1114 cpm/µl. Bei der heterozygoten Vergleichsgruppe betrug der Ausgangswert 2553 cpm/µl und sank innerhalb von 30 Minuten auf 853 cpm/µl (s. Abb. 11). Die entnommenen Organe der Vergleichsgruppen wiesen bezüglich der Organaufnahme der VLDL nur in der Leber einen deutlichen Unterschied auf (Apo AV KO 272 ± 62 cpm/mg vs. Apo AV het 343 ± 41 cpm/mg). Diese Daten weisen auf eine Apo AV vermittelte beschleunigte hepatische Aufnahme von VLDL hin.

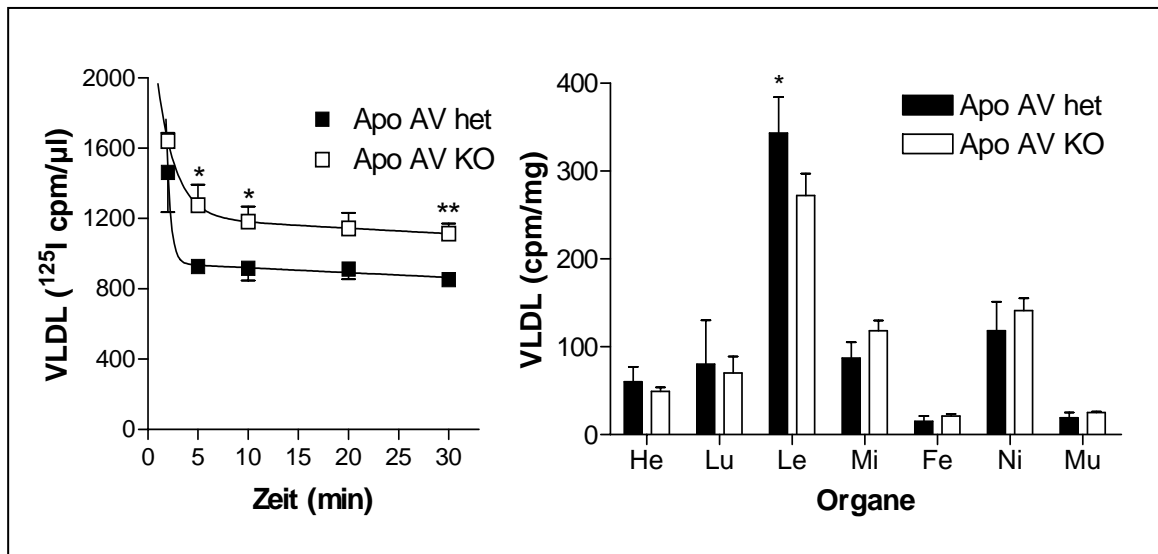


Abb. 11: VLDL-Apolipoprotein-Abbau im Plasma. *In vitro* markierte VLDL-Apolipoproteine wurden heterozygoten und Knockout Mäusen injiziert. Der Abbau der Plasma-VLDL bei Apo AV defizienten Mäusen ist signifikant länger als bei den zu vergleichenden Geschwistertieren. Der Abbau der VLDL in Organen zeigt zwischen den Vergleichsgruppen außer in der Leber keine signifikanten Unterschiede (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; cpm: counts per minute; He: Herz; Lu: Lunge; Le: Leber; Mi: Milz; Fe: Fett; Ni: Niere; Mu: Muskel). Alle erhobenen Daten sind Mittelwert \pm SD.

In beiden VLDL-Abbaustudien konnte man sehen, dass Apo AV KO Tiere einen signifikant langsameren plasmatischen Katabolismus von Lipoproteinen sehr geringer Dichte haben, sowie eine deutlich geringere hepatische Aufnahme für Lipoproteine besitzen als ihre Vergleichsgruppe.

3.3.2.3. VLDL-Abbaustudie verschiedener VLDL

Aufgrund der unmittelbaren Nähe des Apo AV-Genlocus zu dem Gencluster von Apo AI/CIII/AIV könnte bei Mäusen die bezüglich des Apo AV Gens verändert sind auch andere Apolipoproteine den Abbau von VLDL beeinflussen. Um diese zu prüfen wurde der folgende Versuch durchgeführt. Der Triglyzeridanteil der VLDL wurde *in vivo* in Wildtyp, Apo AV transgenen und Apo AV defizienten Mäusen markiert. So erhielt man VLDL mit normalem murinen Apo AV, VLDL mit überexprimiertem humanen Apo AV und Apo AV defiziente VLDL. Die verschiedenen VLDL wurden Wildtyp Mäusen injiziert. Nach 1, 2, 5, 10 und 20 min erfolgte eine Punktion des retroorbitalen Plexus. Messung der Radioaktivität des Plasmas ergab keine Unterschiede zwischen den Abbauraten der verschiedenen VLDL. Einzig signifikant ist der Unterschied zwischen transgener und knockout VLDL für den 5 min Wert (* $p < 0,05$).

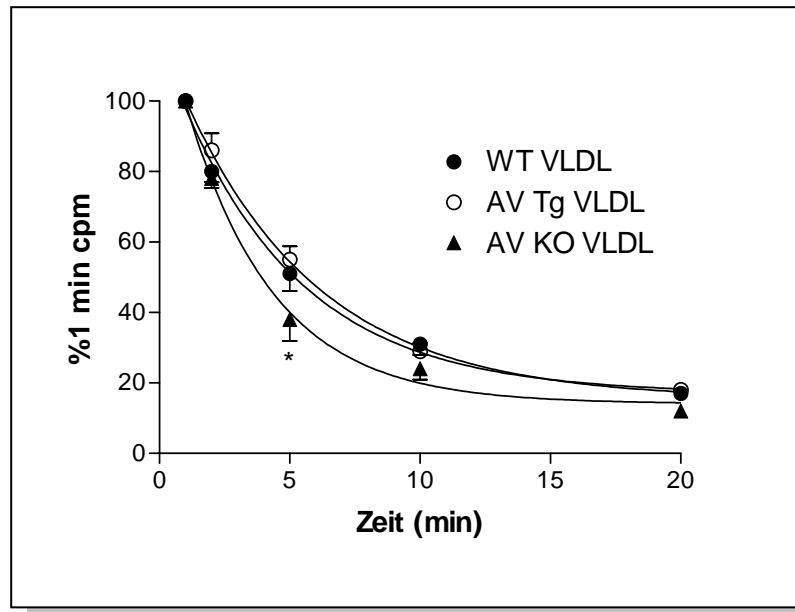


Abb. 12: Turnoverstudie mit verschiedener VLDL. VLDL mit normalem Apo AV, überexprimiertem Apo AV und ohne Apo AV wurden Wildtyp Mäusen injiziert. Es sind keine Unterschiede in der VLDL-Abbaurrate zu sehen. Sämtliche Daten wurden in Relation zum 1 min Wert in Prozent angegeben (* $p < 0.05$). (WT: Wildtyp; AV Tg: Apo AV transgen; AV KO: Apo AV Knockout)

3.3.2.4. VLDL-Abbaustudie mit rekombinantem Apo AV

Der folgende Versuch beschäftigte sich mit der Frage ob die Apo AV vermittelte Beschleunigung der Triglyzerid-Hydrolyse *in vivo* eine direkte Wirkung des Apo AV ist oder durch Veränderung der Komposition anderer Lipoproteine zustande kommt. An TG markierte VLDL wurden wie beschrieben hergestellt. Die Apo AV defizienten VLDL wurde entweder mit PBS oder 30 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantem Apo AV inkubiert und knockout Mäusen injiziert. In den Mäusen war die Abbaurrate der mit Apo AV versetzten VLDL signifikant schneller (Halbwertszeit 3,7 min) im Vergleich zu der Abbaurrate Apo AV defizienter VLDL (Halbwertszeit von ca. 40 min, s. Abb. 13).

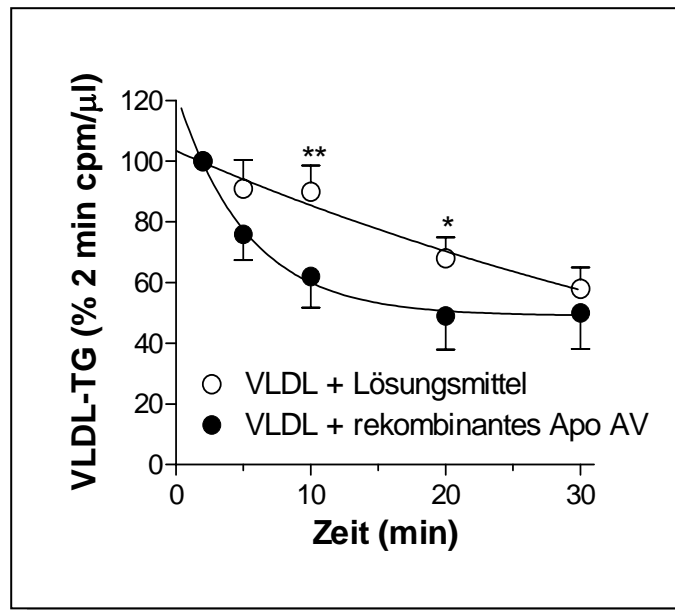


Abb. 13: VLDL-Turnoverstudie mit rekombinantem Apo AV. In knockout Mäusen mit Apo AV versetzter VLDL war die Abbaurrate signifikant schneller im Vergleich zu der Abbaurrate Apo AV defizienter VLDL. Sämtliche Daten wurden in Relation zum 2 min Wert in Prozent angegeben (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularen Mechanismus der Apo AV vermittelten Triglyzeridreduktion im Plasma weiter zu erforschen. Zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten an Menschen und Mäusen weisen darauf hin, dass die wichtigste Eigenschaft von dem im Jahre 2001 entdeckten Apo AV die Senkung der Plasmatriglyzeride ist. *In vivo* Studien an genetisch veränderten Mäusen zeigten, dass Apo AV transgene Tiere einen um zwei Drittel niedrigeren und Apo AV knockout Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel als die jeweilige Kontrollgruppe haben (Pennacchio et al. 2001). Darüber hinaus sind Punktmutationen im Apo AV-Gen mit einer signifikanten Erhöhung der Triglyzeridkonzentration im menschlichen Blutplasma und mit der Familiär Kombinierten Hyperlipoproteinämie (FCHL) in Zusammenhang gebracht worden (Evans et al. 2003; Pennacchio et al. 2001; Pennacchio and Rubin 2003; Talmud et al. 2005; Tang et al. 2006). Der molekulare Mechanismus der Apo AV vermittelten Beschleunigung der Triglyzerid-Hydrolyse war zu Beginn der Studie nicht bekannt. Eine Reduktion der plasmatischen Triglyzeridkonzentration könnte durch verminderte hepatische VLDL-Produktion und verminderte intestinale Chylomikronen-Absorption, durch Beschleunigung des Katabolismus triglyzeridreicher Partikel oder durch kombinierte Effekte zustande kommen. Um dieser Fragestellung weiter nachzugehen wurden Apo AV knockout Mäuse verwendet, die kein murines Apo AV besitzen (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 Apo AV heterozygoten-Kontrollgruppen verglichen werden konnten.

Im erstellten Lipoproteinprofil zeigten sich zwischen Wildtyp und knockout Mäusen beträchtliche Unterschiede bezüglich der Triglyzeridkonzentration in der VLDL-Fraktion. Apo AV defiziente Tiere besitzen gegenüber Wildtyp-Mäusen einen um fast zwei Drittel erhöhten VLDL-Triglyzeridspiegel. Diese Daten deuten an, dass der triglyzeridsenkende Effekt des Apo AV bei den triglyzeridreichen VLDL deutlich wird. In anderen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde ein ähnlicher Effekt auf Chylomikronen nachgewiesen. 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).

Apo AV könnte aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften (hohe Affinität zu Lipiden, niedrige Elastizität) die Zusammensetzung durch Bindung an Lipide und zelluläre

Membranen von VLDL und Chylomikronen beeinflussen und dadurch die Produktion triglyzeridreicher Partikel senken (Weinberg et al. 2003). Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Apo AV Protein und einem mikrosomalen Triglyzerid-Transferprotein festgestellt worden sind (Beckstead et al. 2003). *In vitro* Studien von Schaap et al. zeigten bei Mäusen mit adenoviral-induzierter Überexpression von murinem Apo AV eine 30%ige Verringerung der VLDL-Produktionsrate (Schaap et al. 2004). Da die Produktion der Proteinkomponenten des VLDL nicht verändert wurde, vermuteten die Autoren eine Apo AV-vermittelte Hemmung des Lipidtransfers auf Apo B100, dem zweiten Schritt der hepatischen VLDL-Zusammensetzung.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vivo* VLDL-Produktionsstudie an Apo AV knockout Tieren und einer heterozygoten Kontrollgruppe durchgeführt. Obwohl 60 Minuten nach Injektion des Tritons und des [³H]-Glyzerins ein erhöhter Glyzerol-Einbau in TG bei AV-Defizienz nachgewiesen wurde, wurde die Gesamt-VLDL-TG-Produktion nicht signifikant beeinflusst (Parallelität der Kurven). Dies macht einen fundamentalen Anteil von AV bei einer eventuellen Inhibition der TG-Produktion in der Leber unwahrscheinlich.

In einer VLDL-Triglyzerid-Abbaustudie über 30 Minuten fand sich eine dramatisch verlangsamte plasmatische Abbaurate der injizierten VLDL-Triglyzeride bei Apo AV defizienten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Die Messung der Organaufnahmen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Am ehesten ist hier von geringgradigen Unterschieden unterhalb der Nachweisgrenze auszugehen. In einer Abbaustudie von VLDL-Apolipoproteinen fand sich ebenfalls eine extrem verlangsamte plasmatische Elimination bei Apo AV knockout Tieren. Bei der Radioaktivitätsmessung der Organe war nur in der Leber (+26%) eine signifikante Erhöhung der Aufnahme nachweisbar ($p < 0,05$). Der Katabolismus von VLDL und Chylomikronen ist unter Apo AV Anwesenheit deutlich beschleunigt, wobei Triglyzeride noch schneller abgebaut werden als ganze Lipoproteine. Aus diesen Ergebnissen könnte man folgern, dass Apo AV die Effizienz der plasmatischen Triglyzerid-Hydrolyse resultierend aus einer gesteigerten Konversion von VLDL und Chylomikronen in ihre jeweiligen Remnants erhöht. Letztendlich würde dieses zu einer effizienteren Clearance in der Leber führen. Andere Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Ergebnissen, so konnten Schaap et al. an Mäusen mit adenoviraler Expression von murinem Apo AV eine Reduktion der Plasmatriglyzeride sehen durch eine Inhibition der VLDL-Triglyzerid-Produktion

(Schaap et al. 2004). Fruchart-Najib et al. berichteten über einen verstärkten Abbau von VLDL in Apo AV / Apo CIII doppelt-transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Fruchart-Najib et al. 2004). Im Jahr 2005 belegte die Arbeitsgruppe von Marcais, dass eine seltene Punktmutation Q139X im Apo AV-Gen zu einer schweren Hypertriglyzeridämie der betroffenen Personen führt. Dies führten die Autoren auf eine Suppression der plasmatischen Lipolyse triglyzeridreicher Lipoproteine zurück (Marcais et al. 2005). Weitere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe belegten, dass die intestinale Triglyzeridabsorption und Chylomikronenproduktion sowie die hepatische VLDL-Produktion von Apo AV unbeeinflusst bleiben (Merkel et al. 2005).

Eine plausible Erklärung für die molekularen Mechanismen der Apo AV-induzierten Beschleunigung der plasmatischen Hydrolyse könnte eine Interaktion von Apo AV mit proteoglykangebundener Lipoproteinlipase sein. Apo AV könnte eine Art Vermittlerrolle zwischen triglyzeridreichen Lipoproteinen und endothelständiger LPL einnehmen (Merkel et al. 2005).

In einer weiteren Turnoverstudie wurden Wildtyp Tieren radioaktiv markierte VLDL von Mäusen verschiedenen Genotyps (transgen, Wildtyp und Knockout) injiziert. Nach 20 Minuten waren keine signifikanten Unterschiede in den Abbauraten der verschiedenen VLDL messbar. Erstaunlicherweise wurden die Apo AV defizienten VLDL schneller abgebaut als die der Transgenen. Dieses überraschende Ergebnis könnte dadurch zustande kommen, dass die *in vivo* produzierten VLDL durch die genetischen Variationen der Tiere dahingehend verändert wurden, dass andere Komponenten dieser Lipoproteine die Abbaurate unabhängig von Apo AV beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass KO-VLDL vermehrt hydrolysierbare Triglyzeride besitzen, die abgebaut werden können, im Gegensatz zu transgenen-VLDL.

Da alle bisherigen Abbaustudien mit Tieren, die genetisch veränderte Plasma-Lipoproteine haben, durchgeführt worden sind, können die gesehenen Effekte durch Veränderungen von Produktionsrate oder Plasmaspiegel anderer Apolipoproteine verursacht sein. Zudem ist auch bekannt, dass Apo AV transgene Mäuse (Apo AV tr) einen um 40% verminderten und Apo AV defiziente Mäuse einen um 90% erhöhten Apo CIII-Plasmaspiegel aufweisen (Pennacchio et al. 2001). Um nun die direkte Wirkung von Apo AV nachzuweisen und andere Beeinträchtigungen auszuschließen wurde die folgende Studie durchgeführt. *In vivo* markiertes Apo AV defizientes VLDL wurde *in vitro* mit rekombinanten Apo AV assoziiert und anschließend AV knockout Mäusen injiziert. Einer Kontrollgruppe wurde das

radioaktive VLDL ohne rekombinantes Apo AV verabreicht. Die Konzentration des rekombinanten Apo AV war physiologisch um den Faktor 1:100 niedriger als die anderer Apolipoproteine. Unter diesen Umständen beschleunigt Apo AV die Turnoverrate von Triglyzeriden aus Lipoproteinen sehr geringer Dichte deutlich. Dies bewies einen direkten Einfluss von Apo AV auf die Hydrolyse, wie aus anderen Studien zu vermuten war.

Die vorliegende Arbeit hat zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Apo AV induzierten Senkung der plasmatischen Triglyzeride mit beigetragen. Die erhobenen Daten zeigen, dass Apo AV die plasmatische Triglyzeridkonzentration durch Beschleunigung der Hydrolyse von Lipoproteinen sehr geringer Dichte senken kann. Die hepatische VLDL-Produktion wird durch Apo AV geringfügig gesenkt, dieser Effekt scheint jedoch nicht von physiologischer Bedeutung zu sein. Diese Ergebnisse bieten neben den grundlagenwissenschaftlichen Aspekten auch neue Ansätze bei der Früherkennung, Prophylaxe und Therapie von Fettstoffwechselstörungen und der Arteriosklerose.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Apolipoprotein AV wurde im Jahr 2001 durch vergleichende Sequenzanalyse und als ein mit der frühen Phase der Leberregeneration assoziiertes Protein entdeckt. Apo AV ist assoziiert mit Änderungen im Triglyzeridspiegel und mit der Familiären Kombinierten Hyperlipoproteinämie. *In vivo* Studien an genetisch veränderten Mäusen zeigten, dass Apo AV transgene Tiere einen um zwei Drittel niedrigeren und Apo AV knockout Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel als die jeweilige Kontrollgruppe haben.

Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Apo AV vermittelten Senkung der plasmatischen Triglyzeride wurden *in vivo* Studien mit Apo AV defizienten Mäusen und Kontrollen durchgeführt. Hierdurch konnten Auf- und Abbauraten von radioaktiv markierten Lipoproteinen sehr geringer Dichte zwischen knockout Mäusen und heterozygoten Kontrollgruppen verglichen werden.

Im erstellten Lipoproteinprofil zeigten sich zwischen Wildtyp und Apo AV knockout Mäusen beträchtliche Unterschiede bezüglich der Triglyzeridkonzentration in der VLDL-Fraktion. Apo AV defiziente Tiere besitzen gegenüber Wildtyp Mäusen einen um fast zwei Drittel erhöhten VLDL-Triglyzeridspiegel.

In der anschließenden Produktionsstudie zeigte sich, dass die hepatische VLDL-Produktion durch Apo AV geringfügig gesenkt wird, dieser Effekt scheint jedoch nicht von physiologischer Bedeutung zu sein. Abbaustudien mit VLDL-Triglyzeriden und – Apolipoproteinen ergaben eine deutliche Beschleunigung der plasmatischen Elimination dieser Partikel in Gegenwart von Apo AV, wobei Triglyzeride noch schneller abgebaut werden als ganze Lipoproteine. Bezüglich der Organaufnahme zeigte sich nur in der Leber eine signifikante Erhöhung der Aufnahme VLDL-Apolipoproteinen.

Die Apo AV-vermittelte Reduktion der Plasmatriglyzeride beruht demnach auf einer Akzeleration der Hydrolyse triglyzeridreicher Partikel. Die hepatische VLDL-Produktion wird durch AV nicht beeinträchtigt.

Diese Ergebnisse sind von potenzieller Bedeutung für die Aufklärung der Entstehung von Fettstoffwechselstörungen und der Arteriosklerose beim Menschen und eröffnen neue Möglichkeiten für einen Therapieansatz.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aalto-Setälä K, Fisher EA, Chen X, Chajek-Shaul T, Hayek T, Zechner R, Walsh A, Ramakrishnan R, Ginsberg HN, Breslow JL. (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, Weinstock PH, Bisgaier CL, Wu L, Smith JD, Breslow JL. (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, Cullen P, Schulte H. (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, Bauge E, Akiyama J, Chang J, Afzal V, Fruchart JC, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Pennacchio LA. (2004) Analysis of apolipoprotein A5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1297-1302
- Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, Forte TM, Bielicki JK, Berger T, Luty R, Kay CM, Ryan RO. (2003) Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry* 42:9416-9423
- Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-Olivecrona G. (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, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22:347-351
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouellette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J, Jr., Hayden MR. (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 JD. (1995) Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: *The metabolic and molecular bases of inherited*

- disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS et al., eds), New York: McGraw-Hill, pp 1913-1932
- Bundesamt S. (2005) Todesursachen in Deutschland, Wiesbaden: Statistisches Bundesamt Deutschland
- Cziraky MJ. (2004) Management of dyslipidemia in patients with metabolic syndrome. *J Am Pharm Assoc (Wash DC)* 44:478-488; quiz 489-490
- Dixon JL, Ginsberg HN. (1992) Hepatic synthesis of lipoproteins and apolipoproteins. *Semin Liver Dis* 12:364-372
- Dole VP. (1956) A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *Journal of Clinical Investigation* 35:150-154
- Evans D, Buchwald A, Beil FU. (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 JC, Duriez P. (2006) Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today (Barc)* 42:39-64
- Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC. (2004) Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* 319:397-404
- Goldberg IJ. (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 37:693-707
- Goldberg IJ, Merkel M. (2001) Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci* 6:D388-D405.
- Groenendijk M, Cantor RM, de Bruin TW, Dallinga-Thie GM. (2001) The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* 157:1-11
- Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC, 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 RJ, Eder HA, Bragdon JH. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation* 34:1345-1353

- Heeren J, Grewal T, Jackle S, Beisiegel U. (2001) Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem* 276:42333-42338
- Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J. (1995) Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. Suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* 270:13470-13475
- Hokanson JE, Austin MA. (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 JA. (2005) Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants. *Clin Chem Lab Med* 43:897-902
- Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL. (1990) Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 249:790-793
- Kinnunen PK, Ehnolm C. (1976) Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett* 65:354-357
- Krauss RM, Herbert PN, Levy RI, Fredrickson DS. (1973) Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ Res* 33:403-411
- Kulinski A, Rustaeus S, Vance JE. (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, Verges B, Charriere S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, Perrot L, Draï J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Durlach V, Moulin P. (2005) ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* 115:2862-2869
- McConathy WJ, Gesquiere JC, Bass H, Tartar A, Fruchart JC, Wang CS. (1992) Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. *J Lipid Res* 33:995-1003
- McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. (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, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J. (2005) Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 280:21553-21560

- Millar JS, Packard CJ. (1998) Heterogeneity of apolipoprotein B-100-containing lipoproteins: what we have learnt from kinetic studies. *Curr Opin Lipidol* 9:197-202
- O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, Schultze AE, Konrad RJ. (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
- Olivecrona G, Hultin M, Savonen R, Skottova N, Lookene A, Tugrul Y, Olivecrona T. (1995) Transport of lipoprotein lipase in plasma and lipoprotein metabolism. In: *Atherosclerosis X* (F.P. W, Davignon J, Sniderman A, eds), New York: Elsevier, pp 250-253
- Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294:169-173.
- Pennacchio LA, Rubin EM. (2003) Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:529-534
- Pittman RC, Taylor CA, Jr. (1986) Methods for assessment of tissue sites of lipoprotein degradation. *Methods in Enzymology* 129:612-628
- Prieur X, Coste H, Rodriguez JC. (2003) The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- α and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem* 278:25468-25480
- Ragozin S, Niemeier A, Laatsch A, Loeffler B, Merkel M, Beisiegel U, Heeren J. (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, Wang N, Ramakrishnan R, Jiang XC, Tall AR. (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 LL, Marzetta CA, Johnson FL. (1986) Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration. *Methods Enzymol* 129:45-57
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW. (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, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. (1996) PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-

- specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO Journal* 15:5336-5348
- Scott CL. (2003) Diagnosis, prevention, and intervention for the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 92:35i-42i
- Singaraja RR, Stahmer B, Brundert M, Merkel M, Heeren J, Bissada N, Kang M, Timmins JM, Ramakrishnan R, Parks JS, Hayden MR, Rinninger F. (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 SC, Jr., Amsterdam E, Balady GJ, Bonow RO, Fletcher GF, Froelicher V, Heath G, Limacher MC, Maddahi J, Pryor D, Redberg RF, Roccella E, Ryan T, Smaha L, Wenger NK. (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, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J. (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
- Talmud PJ, Hawe E, Martin S, Olivier M, Miller GJ, Rubin EM, Pennacchio LA, Humphries SE. (2002) Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* 11:3039-3046
- Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. (2005) Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem* 280:28215-28220
- Tang Y, Sun P, Guo D, Ferro A, Ji Y, Chen Q, Fan L. (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 HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA. (2001) Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 276:44512-44520
- van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA. (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, Baroukh N, Ostos MA, Castro G, Duverger N, Nanjee MN, Najib J, Fruchart JC, Miller NE, Zakin MM, Ochoa A. (2000) Expression of human apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in mice induces hyperlipidemia but reduces atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2267-2274

- Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. (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 CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *J Clin Invest* 75:384-390
- Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, Ryan RO. (2003) Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* 278:34438-34444
- Weinstock PH, Bisgaier CL, Hayek T, Aalto-Setälä K, Sehayek E, Wu L, Sheffele P, Merkel M, Essenburg AD, Breslow JL. (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

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Geburtsdatum und -ort | 29.12.1980 in Hannover |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

Schulbildung

| | |
|-------------|---|
| 1987 - 2000 | Grundschule und Gymnasium in Hamburg, Abitur (Note 2,0) |
| 1997 – 1998 | Rockwood Summit Highschool, Fenton, Missouri, USA |

Studium

| | |
|-------------------|---|
| 10/2000 - 10/2006 | Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg |
| 09/2002 | Physikum (Note 2,66) |
| 09/2003 | 1. Staatsexamen (Note 3) |
| 09/2005 | 2. Staatsexamen Medizin (Note 2,33) |
| 10/2006 | 3. Staatsexamen (Note 1) |

Klinische Ausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 10/2005 - 01/2006 | Praktisches Jahr, Chirurgie, Department of General Surgery, Tauranga Hospital, Tauranga, New Zealand und Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf |
| 02/2006 - 06/2006 | Praktisches Jahr, Pädiatrie, Altonaer Kinderkrankenhaus, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Hamburg |
| 07/2006 - 10/2006 | Praktisches Jahr, Innere Medizin, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| seit 02/2007 | Assistenzärztin, Abteilung Nephrologie, Zentrum Innere Medizin, Medizinische Hochschule Hannover |

Wissenschaftliche Ausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 10/2002 – 05/2004 | Experimenteller Teil einer Dissertation zum Thema „Untersuchung der Funktion von Apolipoprotein AV im homolog defizienten Mausmodell“ im Lipase-Labor, ehemals Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf; Doktorvater: PD Dr. med. M. Merkel |
| 05/2003 – 09/2003 | wissenschaftliche Hilfskraft im Lipase-Labor |
| 09/2003 – 04/2004 | Stipendium des Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie- Molekularer Stoffwechsel“, Sprecher: Prof. Dr. med. H.J. Seitz |

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.

Herrn Professor Dr. med. H. J. Seitz danke ich sehr für die Möglichkeit eines Stipendiums des durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft geförderten Grauiertenkollegs 336.

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 Hilfe im Laboralltag danken.

Herzlich danke ich für Ihre mentale Unterstützung und engagierte Hilfe meinem Partner Daniel Kayser, meinem verstorbenem Vater Karl-Rainer Fabig, meiner Mutter Anita Fabig, sowie meinem Bruder Pascal Fabig.

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.