

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

Direktor: Prof. Dr. med. R. Stahl

***Untersuchung der funktionellen Interaktion von  
Apoprotein A5 und Lipoproteinlipase in vitro***

*Dissertation*

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Malte Andreas Kluger aus Niebüll

Hamburg, 2007

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 06.02.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzender: Herr PD Dr. M. Merkel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Herr PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss: 3. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

*Meinen Eltern gewidmet*

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	- 4 -
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	- 8 -
VERZEICHNIS UND ABKÜRZUNGEN DER MAUSLINIEN .....	- 8 -
ARBEITSHYPOTHESE .....	- 9 -
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>1.1 Klinische Bedeutung von Störungen des Fettstoffwechsels.....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>1.2 Grundlagen des Lipoproteinstoffwechsels.....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>1.3 Eigenschaften und Funktionen von Apolipoprotein A5 .....</b>	<b>- 16 -</b>
1.3.1 Entdeckung von Apolipoprotein A5.....	- 16 -
1.3.2 Eigenschaften und Funktionen von Apolipoprotein A5 .....	- 16 -
1.3.3 <i>In vivo</i> - Studien zur Funktion von Apolipoprotein A5.....	- 18 -
1.3.4 Apolipoprotein A5 im Kontext des Apo AI-CIII-AIV-Clusters.....	- 18 -
<b>1.4 Eigenschaften und Funktionen der Lipoproteinlipase .....</b>	<b>- 19 -</b>
1.4.1 Eigenschaften der Lipoproteinlipase .....	- 19 -
1.4.2 Funktionen der Lipoproteinlipase.....	- 20 -
1.4.2.1 Katalytische Funktionen .....	- 20 -
1.4.2.2 Nicht-katalytische Funktionen.....	- 20 -
1.4.3 Die Rolle der Lipoproteinlipase bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen .....	- 21 -
1.4.3.1 Familiäre Kombinierte Hyperlipoproteinämie (FCHL) und Arteriosklerose .....	- 21 -
1.4.3.2 Familiäre Chylomikronämie .....	- 21 -
1.4.4 Lipoproteinlipase und Apolipoprotein A5.....	- 22 -
<b>1.5 Ziel der Arbeit.....</b>	<b>- 24 -</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>- 25 -</b>
2.1.1 Verwendete Geräte .....	- 25 -
2.1.2 Chemikalien.....	- 25 -
2.1.3 Enzyme und Proteine.....	- 27 -
2.1.4 Oligonukleotide und Primer .....	- 27 -
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	- 28 -
2.1.6 Standard Pufferlösungen.....	- 28 -
2.1.7 Materialien für den Westernblot.....	- 29 -
2.1.8 Puffer für den HSPG-LPL-Assay .....	- 30 -
<b>2.2 Allgemeine Arbeitsmethoden.....</b>	<b>- 30 -</b>
2.2.1 Sterilisation.....	- 30 -
<b>2.3 Tiere und Tierhaltung .....</b>	<b>- 30 -</b>

2.3.1	Maushaltung .....	- 30 -
2.3.2	Genehmigung der Tierversuche.....	- 31 -
2.3.3	Mauslinien .....	- 31 -
2.3.3.1	Apo A5-defiziente Mauslinie (Apo A5 +/+, Apo A5 +/- und Apo A5 -/-): Linie Apo A5 KO .....	- 31 -
2.3.3.2	Mauslinie mit transgen exprimiertem humanen Apo A5 (hApo A5/tr): Linie Apo A5 Tr .....	- 31 -
<b>2.4</b>	<b>Genotypisierung der Mäuse.....</b>	<b>- 32 -</b>
2.4.1	Prinzip.....	- 32 -
2.4.2	Entnahme einer Schwanzbiopsie .....	- 32 -
2.4.3	Verdau der Schwanzbiopsie .....	- 32 -
2.4.4	DNA-Extraktion .....	- 32 -
2.4.5	PCR.....	- 33 -
2.4.5.1	PCR zur Bestimmung des Genotyps am Maus-Apo A5-Lokus.....	- 33 -
2.4.5.2	PCR zur Bestimmung des hApo A5 Transgens.....	- 35 -
2.4.6	Gelelektrophorese.....	- 36 -
<b>2.5</b>	<b>hApo A5 Westernblot zur Bestimmung des hApo A5 Transgens .....</b>	<b>- 37 -</b>
2.5.1	Prinzip.....	- 37 -
2.5.2	Probenvorbereitung .....	- 37 -
2.5.3	Gel-Elektrophorese.....	- 38 -
2.5.4	Blotting.....	- 38 -
2.5.5	Abblocken der Transfermembran .....	- 39 -
2.5.6	Reaktion mit dem ersten Antikörper.....	- 39 -
2.5.7	Reaktion mit dem zweiten Antikörper.....	- 40 -
2.5.8	Belichtung und Entwicklung des Röntgenfilmes.....	- 40 -
<b>2.6</b>	<b>Auftrennung von Mausplasma in seine Lipoproteinfraktionen .....</b>	<b>- 41 -</b>
2.6.1	Prinzip.....	- 41 -
2.6.2	Blutentnahme und Plasmagewinnung.....	- 41 -
2.6.3	Sequentielle Lipoprotein-Zentrifugation .....	- 42 -
2.6.4	Bestimmung des Triglyzeridgehaltes .....	- 42 -
2.6.5	Bestimmung des Cholesteringehaltes .....	- 43 -
2.6.6	Bestimmung des Proteingehaltes.....	- 43 -
<b>2.7</b>	<b>Triglyzerid-Hydrolyseversuche mit an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) gebundener Lipoproteinlipase (LPL) in vitro.....</b>	<b>- 44 -</b>
2.7.1	Prinzip.....	- 44 -
2.7.2	Lipoproteinlipase (LPL) .....	- 44 -
2.7.3	Rekombinantes humanes Apo A5 .....	- 45 -

2.7.4	Gewinnung von VLDL-Proben als Lipolysesubstrat.....	- 45 -
2.7.5	Vorbereitung einer Mikrotiterplatte für den HSPG-LPL-Assay.....	- 45 -
2.7.6	Durchführung der Lipolyse.....	- 46 -
2.7.7	Bestimmung der freien Fettsäuren (FFA).....	- 46 -
2.7.8	Vergleichsexperiment mit Lipolyse durch freie Lipoproteinlipase (LPL) .....	- 48 -
2.7.9	Kontrollexperiment mit Heparinasebehandlung .....	- 48 -
<b>2.8</b>	<b>Triglyzerid- Hydrolyseversuch mit Lipoproteinlipase (LPL) und Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO) in Zellkultur .....</b>	<b>- 49 -</b>
2.8.1	Verwendete CHO Zell-Linien .....	- 49 -
2.8.2	Kultivierung und Vorbereitung der Zellen .....	- 49 -
2.8.3	Durchführung des Lipolyseexperiments .....	- 50 -
2.8.4	Bestimmung der freien Fettsäuren (FFA).....	- 50 -
<b>2.9</b>	<b>Statistische Auswertung der Messergebnisse .....</b>	<b>- 51 -</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 52 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Hydrolyse von VLDL-Partikeln unterschiedlicher Apo A5-Genotypen durch freie und HSPG-gebundene LPL in vitro .....</b>	<b>- 52 -</b>
3.1.1	Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung.....	- 52 -
3.1.2	Einfluss des Apo A5-Genotyps auf die Triglyzeridhydrolyse <i>in vitro</i> .....	- 52 -
<b>3.2</b>	<b>Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL in vitro mit Apo A5-Anreicherung aus HDL .....</b>	<b>- 53 -</b>
3.2.1	Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung.....	- 53 -
3.2.2	Einfluss der Apo A5-Anreicherung durch HDL auf die Triglyzeridhydrolyse <i>in vitro</i> .....	- 53 -
<b>3.3</b>	<b>Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL in vitro mit Apo A5-Anreicherung aus HDL und Re-Isolation der VLDL-Fraktion.....</b>	<b>- 54 -</b>
3.3.1	Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung.....	- 54 -
3.3.2	Einfluss der Apo A5-Anreicherung durch HDL auf die Triglyzeridhydrolyse <i>in vitro</i> nach Re-Isolation von VLDL.....	- 55 -
3.3.3	Nachweis von Apo A5 im Substrat durch Westernblotting.....	- 56 -
<b>3.4</b>	<b>Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL in vitro mit rekombinalem Apo A5.....</b>	<b>- 56 -</b>
3.4.1	Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung.....	- 56 -
3.4.2	Einfluss von rekombinalem Apo A5 auf die Triglyzeridhydrolyse <i>in vitro</i> .....	- 57 -
<b>3.5</b>	<b>Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL in vitro mit rekombinalem Apo A5 und Re-Isolation der VLDL-Fraktion .....</b>	<b>- 57 -</b>
3.5.1	Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung.....	- 57 -

3.5.2	Einfluss von rekombinantem Apo A5 auf die Triglyzeridhydrolyse <i>in vitro</i> nach Re-Isolation von VLDL.....	57 -
<b>3.6</b>	<b>Untersuchung der Kinetik der Hydrolyse von Apo A5-defizienten VLDL-Partikeln durch HSPG-gebundene LPL <i>in vitro</i> mit und ohne Substitution von rekombinantem Apo A5.....</b>	<b>58 -</b>
3.6.1	Untersuchtes Probenmaterial und Versuchsaufbau .....	58 -
3.6.2	Effekt von Apo A5 auf die Kinetik der Triglyzeridhydrolyse.....	59 -
<b>3.7</b>	<b>LPL-vermittelte VLDL-Hydrolyse mit rekombinantem Apo A5 in einem Zellkultursystem .....</b>	<b>60 -</b>
3.7.1	Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung.....	60 -
3.7.2	Effekt von rekombinantem Apo A5 bei der Triglyzeridhydrolyse auf CHO-Zellen.....	61 -
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62 -</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>68 -</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69 -</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>72 -</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>72 -</b>

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

<b>APO</b>	Apolipoprotein
<b>BP</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CHO</b>	Chinese Hamster Ovary-Cells
<b>CHOL</b>	Cholesterol
<b>CE</b>	Cholesterolester
<b>CETP</b>	Cholesterinester-Transferprotein
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinacid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>FCHL</b>	Familiäre kombinierte Hyperlipoproteinämie
<b>FCS</b>	Fötales Kälberserum
<b>FFA</b>	Freie Fettsäuren
<b>HDL</b>	High density lipoprotein
<b>HSPG</b>	Heparan Sulfat Proteoglykan
<b>IDL</b>	Intermediate density lipoprotein
<b>Kb</b>	Kilobasen
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>LCAT</b>	Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase
<b>LDL</b>	Low density Lipoprotein
<b>LPL</b>	Lipoproteinlipase
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NEFA</b>	Non-esterified fatty acids
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PHP</b>	Postheparinplasma
<b>PPAR</b>	Peroxisomen Proliferator Aktivierter Rezeptor
<b>PPD</b>	Phenyldiamin
<b>RNA</b>	Ribonucleinacid
<b>RPM</b>	Rounds per minute
<b>TBE</b>	Tris-Borsäure-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TG</b>	Triglyzeride
<b>VLDL</b>	Very low density lipoproteins
<b>WASSER</b>	Hiermit ist doppelt destilliertes und autoklaviertes Wasser gemeint

## VERZEICHNIS UND ABKÜRZUNGEN DER MAUSLINIEN

### Linie Apo A5 KO

<b>Apo A5 +/+</b>	Wildtypmaus bezüglich des Apo A5 Locus
<b>Apo A5 +/-</b>	Maus mit heterozygoter Apo A5-Defizienz
<b>Apo A5 -/-</b>	Maus mit homozygoter Apo A5-Defizienz

### Linie hApo A5tr

<b>Apo A5 /tr</b>	Maus mit hemizygoter Expression von transgenem humanem Apo A5
-------------------	---



## **ARBEITSHYPOTHESE**

Apolipoprotein A5 beschleunigt den Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen durch die Aktivierung von Lipoproteinlipase (LPL). Seine Funktion ist *in vitro* von der Anwesenheit von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) abhängig.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Klinische Bedeutung von Störungen des Fettstoffwechsels

Die Arteriosklerose (Gefäßwandverkalkung) ist eine inflammatorische, systemisch vorkommende Erkrankung, die meist durch endotheliale Dysfunktion initiiert wird und zunächst mit einer Verdickung der arteriellen Intimaschicht (Sklerose) einhergeht. Durch Lipideinlagerungen, Einwanderung von Makrophagen und die Proliferation glatter Muskelzellen entwickeln sich atherosklerotische Plaques. Verhärtung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung der betroffenen arteriellen Gefäße sind die Folge und gleichzeitig pathogenetische Grundlage für die Entstehung von koronarer Herzkrankheit (KHK), peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) sowie von zerebrovaskulären Erkrankungen. Arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen sind die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt mit erheblichen sozioökonomischen Konsequenzen (Statistisches Bundesamt 2006).

Trotz intensiver Forschung ist die Ätiologie der Arteriosklerose noch nicht zufrieden stellend aufgeklärt. In zahlreichen tierexperimentellen, klinischen und epidemiologischen Studien konnte belegt werden, dass neben Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus auch Störungen des Fettstoffwechsels zu den Risikofaktoren für die Auslösung und Progression der Erkrankung gehören (Grundy, Balady et al. 1998). Fettstoffwechselstörungen können nicht nur durch exogene Faktoren wie Ernährung, Alkoholkonsum und Medikamenteneinnahme (z.B. hormonale Kontrazeptiva), sondern auch durch endogene Faktoren verursacht werden. Zu diesen endogenen Faktoren gehören auf molekularer Ebene vor allem Veränderungen der Strukturen oder Funktionen von Apolipoproteinen, Enzymen, Rezeptoren und Transferproteinen. Die Lipoproteinlipase (LPL) gehört zu den fettsplattendenden Enzymen und spielt eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel (Übersichten in Goldberg 1996; Zechner 1997). Sie ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Hydrolyse von Triglyzeriden (TG) aus Chylomikronen und Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL). Durch die Lipoproteinlipase wird der Plasma-TG-Spiegel gesenkt und die Organe werden mit freien Fettsäuren zur Energiegewinnung versorgt. Mehr als 100 natürlich vorkommende Mutationen im LPL-Gen sind für den Menschen beschrieben worden. In großen klinischen Studien konnten einige dieser Mutationen mit Familiärer Kombiniertes Hyperlipoproteinämie (FCHL), Chylomikronämie und koronarer Herzkrankheit (KHK) assoziiert werden (Übersicht in Merkel, Eckel et al. 2002).

Auch das erst kürzlich entdeckte Apolipoprotein A5 (Pennacchio, Olivier et al. 2001; van der Vliet, Sammels et al. 2001) scheint einen Einfluss auf die LPL-Aktivität zu haben. Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) an seinem Genlocus sind mit Familiärer Kombiniertes Hyperlipoproteinämie (FCHL) und erhöhten Plasma-TG-Spiegeln assoziiert. *In vivo*-Studien erbrachten Hinweise darauf, dass Apolipoprotein A5 die Plasma-TG durch Beschleunigung des

LPL-vermittelten Abbaus von Chylomikronen und VLDL senkt, ohne dabei die hepatische Synthese oder intestinale Aufnahme zu beeinflussen (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005). Diese Untersuchungen lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die beteiligten physiologischen Mechanismen zu, es werden unter anderem proteoglykanvermittelte Vorgänge diskutiert.

Apolipoprotein A5 ist also nicht nur in den Metabolismus der Lipoproteine involviert, sondern könnte direkt oder indirekt eine pathophysiologische Relevanz bei der Entstehung von Arteriosklerose und den in diesem Zusammenhang diskutierten Folgeerkrankungen haben, da erhöhte TG-Spiegel hier einen wichtigen unabhängigen Risikofaktor darstellen (Hokanson and Austin 1996). Den klinischen Bezug verdeutlichen aktuelle Untersuchungen, die eine Beteiligung von Apo A5 bei der TG-Senkung durch PPAR- $\alpha$  aktivierende Medikamente (z.B. Fibrate) vermuten (Lai, Arnett et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der Plasma-TG-Senkung durch Apolipoprotein A5 über die Beschleunigung der LPL-vermittelten TG-Hydrolyse *in vitro* untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei auf den Interaktionen von freier oder Heparansulfat-Proteoglykan-gebundener LPL mit TG-reichen Lipoproteinpartikeln und Apolipoprotein A5.

## **1.2 Grundlagen des Lipoproteinstoffwechsels**

Die hydrophoben Eigenschaften der Lipide erfordern spezielle Strategien, um ihren Transport im Plasma zu ermöglichen. Freie Fettsäuren zirkulieren an Albumin gebunden, komplexere Lipide werden in Form von Lipoproteinen transportiert. Diese setzen sich aus einem lipophilen Kern und einer amphiphilen Schale zusammen, die als Lösungsvermittler zwischen hydrophilem Plasma und Lipoproteinkern fungiert. Die Einteilung dieser Lipoproteine erfolgt entsprechend ihrem Dichteverhalten in der Ultrazentrifugation in die Hauptgruppen Chylomikronen, Very-low-density-Lipoproteins (VLDL), Intermediate-density-Lipoproteins (IDL), Low-density-Lipoproteins (LDL) und High-density-Lipoproteins (HDL) (Havel, Eder et al. 1955).

Im Kern der Lipoproteine werden wenig polare Substanzen wie TG und CHOL-Ester transportiert, wobei sich die Hülle aus nicht verestertem CHOL und Phospholipiden zusammensetzt, die sowohl in öligem als auch im wässrigen Milieu löslich sind (sog. amphiphile Substanzen). An die Oberfläche der Lipoproteinpartikel assoziiert befinden sich die ebenfalls amphiphilen Apolipoproteine, deren Synthese vornehmlich in der Leber und in der Darmmukosa stattfindet. Neben ihrer Funktion als Strukturelement in den Lipoproteinpartikeln spielen sie auch eine zentrale Rolle bei der Regulation des Fettstoffwechsels, da sie die Aufnahme von Lipoproteinen durch spezifische Rezeptoren vermitteln oder die Funktion der beteiligten Enzyme regulieren. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteinklassen und das Vorkommen

sowie die bisher bekannten Funktionen der wichtigsten Apolipoproteine vermitteln die Tabellen 1 und 2.

**Tabelle 1: Eigenschaften der humanen Plasmaproteinklassen**

Lipoproteinklasse	Dichte (g/ml)	Durchmesser (nm)	Hauptfunktion	Zusammensetzung
<i>Chylomikronen</i>	0,93	75 – 500	Transport exogener Lipide	TG 86%, Chol 3%
<i>VLDL</i>	0,93 – 1,006	30 – 70	Transport endogener Lipide	TG 55%, Chol 12%
<i>IDL</i>	1,006 – 1,019	25 – 40	Transport endogener Lipide	TG 23%, Chol 29%
<i>LDL</i>	1,019 – 1,063	17 – 25	Cholesterintransport zu den peripheren Zellen	TG 6%, Chol 42%
<i>HDL</i>	1,063 – 1,210	2 – 10	Reverser Chol-Transport	TG 3%, Chol 13%

**HDL:** High-density Lipoprotein; **LDL:** Low-density Lipoprotein; **IDL:** Intermediate-density Lipoprotein; **VLDL:** Very low-density Lipoprotein

**Tabelle 2: Eigenschaften der wichtigsten Apolipoproteine**

Apolipoprotein	Vorkommen	Funktionen im Stoffwechsel (soweit bekannt)
<i>Apo A1</i>	HDL	Strukturkomponente des HDL, LCAT-Aktivator, reverser Cholesterin-Transport, Mutationen mit Amyloidose assoziiert (Joy 2003)
<i>Apo A2</i>	HDL	Kontroverse Datenlage, evtl. Einfluss auf reversen Cholesterintransport (Kalopissis, Pastier et al. 2003), evtl. LCAT-Inhibitor und Aktivator von CETP und Hepatischer Lipase (Tailleux, Duriez et al. 2002)
<i>Apo A4</i>	HDL	Triglyceridstoffwechsel, LCAT-Aktivator
<i>Apo A5</i>	HDL, VLDL, Chylomikronen	Triglyzerid-Senkung durch Lipolysesteigerung, Leberregeneration (?)
<i>Apo B48</i>	Chylomikronen	Zusammenbau und Freisetzung von Chylomikronen aus dem Dünndarm, Ligand von LRP
<i>Apo B100</i>	LDL, VLDL, IDL	Zusammenbau und Freisetzung von VLDL aus der Leber und Strukturprotein von VLDL, IDL und LDL; Ligand des LDL-Rezeptors
<i>Apo C1</i>	HDL, VLDL	Evtl. Hemmung der hepatischen Aufnahme von Remnant-Partikeln und CETP-Hemmung (Gautier, Masson et al. 2002)
<i>Apo C2</i>	HDL, VLDL, IDL	Aktivierender Cofaktor der Lipoproteinlipase
<i>Apo C3</i>	HDL, IDL, VLDL, Chylomikronen	Inhibitor von Lipoproteinlipase und hepatischer Lipase, evtl. Hemmung der hepatischen Aufnahme von Chylomikronen und VLDL-Remnants
<i>Apo E</i>	HDL, VLDL, IDL, Chylomikronen, Chylomikronen-Remnants	Ligand bei der Bindung verschiedener Lipoproteine an den LDL-Rezeptor, an LRP oder möglicherweise an einen eigenen hepatischen Apo-E-Rezeptor; bestimmte Polymorphismen sind mit Alzheimer (Apo E4) und Familiärer Hyperlipidämie Typ III (Apo E2: beeinträchtigt Bindung der Partikel an LDL-Rezeptor) assoziiert

**HDL:** High-density Lipoprotein; **LDL:** Low-density Lipoprotein; **IDL:** Intermediate-density Lipoprotein; **VLDL:** Very low-density Lipoprotein; **LCAT:** Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase; **LRP:** LDL-Rezeptor-verwandtes-Protein; **CETP:** Cholesterinester-Transferprotein

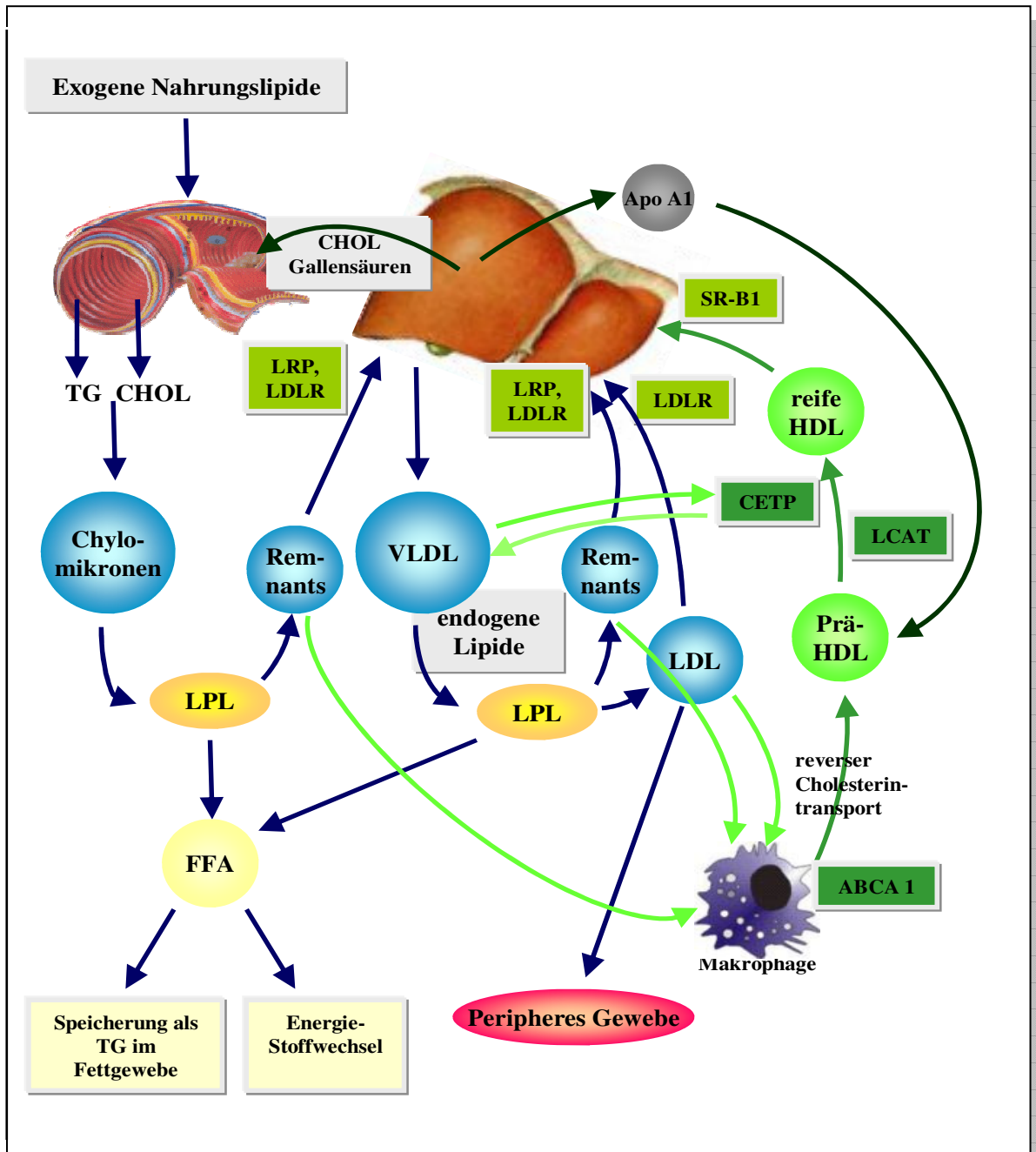
Der Metabolismus der Lipoproteine gliedert sich in einen exogenen und einen endogenen Ast, wobei letzterer auch den vor allem HDL-vermittelten reversen CHOL-Transport beinhaltet. Der exogene Weg beginnt mit der Aufnahme der Nahrungslipide. Die enthaltenen Triglyzeride (TG) werden vor der Resorption gespalten, von den absorbierenden Dünndarmepithelzellen jedoch

wieder zu TG resynthetisiert und zusammen mit anderen Lipiden und einer Hülle aus Phospholipiden, Apo B48 und weiteren Proteinen in Chylomikronen eingebaut. In die Lymphbahnen sezerniert, gelangen die Chylomikronen über den *ductus thoracicus* unter Umgehung der Leber in den linken Venenwinkel und damit in den systemischen Blutkreislauf. Im Plasma werden dann weitere Apoproteine auf die Chylomikronen übertragen. Im Fett- und Muskelgewebe zirkulieren die Chylomikronen durch das Kapillarnetz, wo ihre TG durch die Apo C2-aktivierte endothelständige Lipoproteinlipase in Glycerin und freie Fettsäuren gespalten werden, die nun entweder dem Skelettmuskel als Energiequelle dienen (mitochondriale  $\beta$ -Oxidation) oder zu TG resynthetisiert im Fettgewebe gespeichert werden. Die Chylomikronenreste („Remnants“) gelangen zur Leber und werden dort Apo E-vermittelt an die hepatischen LDL-Rezeptoren und an die LDL-Rezeptor-verwandten-Proteine (LRP) gebunden und über Endozytose aufgenommen (Heeren, Grewal et al. 2001). Nach ihrem lysosomalem Abbau speisen sie mit ihren CHOL-Estern den Cholesterinpool der Leber, Apo E kann im Anschluss rezerniert werden (Heeren, Grewal et al. 2003).

Auch der endogene Lipidstoffwechselweg ist in der Lage, die peripheren Gewebe mit TG als Substrat der Energiegewinnung oder mit Cholesterin als Rohstoff für die Hormon-, Vitamin- und Membranbiosynthese zu versorgen. In den Hepatozyten werden VLDL-Partikel generiert, die neben den endogen synthetisierten auch die aus Chylomikronenremnants stammenden Phospholipide, Cholesterinester und TG sowie die Apoproteine C1, C2, C3, A5 und Apo E enthalten. Wie schon für die Chylomikronen beschrieben, verlieren auch die VLDL-Partikel ihre TG durch die LPL-vermittelte Hydrolyse am Kapillarendothel. Es entstehen VLDL-Remnants. Die VLDL-Remnants werden ebenfalls durch den LDL-Rezeptor und das LRP in die Hepatozyten aufgenommen und dort metabolisiert, wobei Teile der VLDL-Remnants über Zwischenstufen intermediärer Dichte (IDL) in Apo B100-haltige LDL-Partikel überführt werden. LDL-Partikel sind fast frei von TG und enthalten hohe Konzentrationen an CHOL. Die Hauptfunktion der LDL ist die Verteilung von CHOL für vielfältige Biosynthesevorgänge auf periphere Körperzellen. Die Aufnahme dieser Partikel in die Zellen erfolgt dabei über die LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose, als Rezeptorligand fungiert an dieser Stelle Apo B100. Die zytoplasmatische Cholesterinkonzentration ist ein wichtiger Parameter der Regulation der LDL-Rezeptorexpression und damit ebenfalls der Höhe des Plasma-CHOL-Spiegels. Diesen Regelkreis machen sich auch einige lipidsenkende Medikamente zunutze (z.B. die Gruppe der HMG-CoA-Inhibitoren; „Statine“).

HDL entstehen durch Assoziation von Phospholipiden und Apoproteinen mit Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase (LCAT) und Cholesterolester-Transferprotein (CETP), wobei Apo A1 eine für die Strukturbildung der Partikel essentielle Bedeutung hat. HDL werden vor allem in der Leber („Prä-HDL“) gebildet. Die „Prä-HDL“-Partikel können mit aus VLDL-Remnants stammenden

CHOL beladen werden, wobei diese LCAT-vermittelt verestert werden. Am zellulären Cholesterinefflux ist auch ABCA 1 (ATP-binding Cassette Transporter A1) als Phospholipid-Translocase entscheidend beteiligt (Wang, Silver et al. 2001). Zelluläres Cholesterin und Phospholipide werden mit seiner Hilfe auf lipidarme Apolipoproteine wie Apo A1 transferiert. Dieser Prozess soll den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im anti-arteriosklerotischen reversen CHOL-Transport darstellen (Wahrle, Jiang et al. 2005). HDL-Partikel können also Cholesterin aus anderen Lipoproteinklassen sowie aus peripheren Zellen, insbesondere aus Makrophagen, aufnehmen und zur Leber transportieren. Ganze HDL-Partikel können nun rezeptorvermittelt in die Hepatozyten aufgenommen werden oder es findet eine selektive Cholesterinester-Aufnahme aus dem Kern des Partikels unter Mitwirkung des Rezeptors SR-B1 statt (Rinninger, Wang et al. 1999). Da die Richtung dieses Cholesterintransportes von der Peripherie auf die Leber gerichtet ist (reverser Transport) und Cholesterin auf diese Weise über die Galleflüssigkeit ausgeschieden werden kann, korreliert die HDL-Konzentration im Plasma negativ mit dem Vorkommen der koronaren Herzkrankheit. Bei Patienten mit einem angeborenen HDL-Mangel hingegen (z.B. Tangier-Krankheit: verminderte Apo A1-Synthese, z.B. durch mutationsbedingten Funktionsverlust von ABCA1) akkumuliert Cholesterin in der Peripherie. Diese Vorgänge sind in der Abbildung 1 noch einmal schematisch dargestellt.



**Abb.1: Schematische und stark vereinfachte Darstellung des Stoffwechsels der Lipoproteine**  
**CHOL:** Cholesterin; **TG:** Triglyzeride; **VLDL:** Very low density Lipoprotein; **LDL:** Low density Lipoprotein; **HDL:** High density Lipoprotein; **LPL:** Lipoproteinlipase; **FFA:** Freie Fettsäuren; **LDLR:** LDL-Rezeptor; **LRP:** LDL-Rezeptor-related Protein; **CETP:** Cholesterinestertransferprotein; **LCAT:** Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase; **ABCA 1:** ATP-Binding-Cassette-Transporter 1; **SR-B1:** Scavenger-Rezeptor B1

### **1.3 Eigenschaften und Funktionen von Apolipoprotein A5**

#### **1.3.1 Entdeckung von Apolipoprotein A5**

Zwei Arbeitsgruppen waren es, die im Jahre 2001 unabhängig von einander das Apolipoprotein A5 entdeckten. Durch vergleichende Sequenzanalysen humaner und muriner genomischer DNA gelang es Pennacchio *et al.*, ein putativ apolipoproteinähnliches genomisches Intervall in der Nähe des in seiner Sequenz bereits bekannten Apo AI/CIII/AIV-Clusters auf Chromosom 11q23 zu identifizieren. Die ungefähr 27kbp distal des Apo AIV-Gens gelegene Sequenz zeigte mit seiner erwarteten Proteinsequenz von 368 Aminosäuren eine signifikante Homologie zu den bisher bekannten Apolipoproteinen und dabei die größte Ähnlichkeit zu Apolipoprotein A4 (zu 27% identisch und zu 48% ähnlich). Proteinstrukturanalysen ließen mehrere amphipathische helikale Strukturen und ein N-terminales Signalpeptid erwarten, beides sind charakteristische Merkmale lipidbindender Apolipoproteine. Im nun entwickelten transgenen und defizienten Mausmodell korrelierte die vorhandene Apo A5 Menge negativ mit den Plasma-TG. Das Protein konnte in VLDL und HDL nachgewiesen werden (Pennacchio, Olivier et al. 2001), in jüngster Zeit auch auf Chylomikronen (O'Brien, Alborn et al. 2004). Zeitgleich identifizierten Van der Vliet et al. das Apolipoprotein A5 während der Suche nach Leberregenerationsfaktoren. Durch subtraktive cDNA-Hybridisierung wurden an posthepatektomierten Ratten hochregulierte Gene untersucht, wobei eine für ein 367 Aminosäuren großes Protein kodierende mRNA-Sequenz am Apolipoproteincluster auf Chromosom 11 in der Frühphase der Leberregeneration detektiert werden konnte. Das in der Leber entstehende Protein sollte dabei ein 20 Aminosäuren langes Signalpeptid tragen und als Vorläufer 41 kDa, als reifes Protein 39kDa groß sein. In diesem Zusammenhang wird eine spezifische Funktion des Apo A5 in der frühen Leberregenerationsphase diskutiert. Das im Westernblot von Plasmaproben vor allem in der HDL-Fraktion nachgewiesene Apolipoprotein A5 ist dort in der sehr geringen Konzentration von ungefähr 1µg/ml zu finden (van der Vliet, Sammels et al. 2001). Beim Menschen kommt Apo A5 mit 0,1-0,4 µg/ml in noch geringerer Konzentration im Plasma vor. Zum Vergleich liegt Apo C3 dort mit etwa 100 µg/ml, Apo A 1 sogar mit ca. 1000 µg/ml, also mehr als 2000-fach höher konzentriert vor (Hubacek, Adamkova et al. 2004; Merkel and Heeren 2005; O'Brien, Alborn et al. 2005).

#### **1.3.2 Eigenschaften und Funktionen von Apolipoprotein A5**

Bei Apo A5 handelt es sich um ein sehr lipophiles Apolipoprotein, das stark mit den Plasma-TG-Spiegeln assoziiert ist. Ein wie das endogene Gen in der Leber exprimiertes humanes Apo A5 Transgen zeigte im Mausmodell um zwei drittel verminderte TG-Konzentrationen im Vergleich zu Wildtyptieren. Homozygot Apo A5-defiziente Knockout-Mäuse hingegen wiesen eine 300-prozentige Plasma-TG-Steigerung auf, wobei diese Tiere phänotypisch unauffällig waren und in



der nach Mendel zu erwartenden Rate vorkamen. Auch für den Menschen konnten Mutationen im Apo A5-Gen nachgewiesen werden, die positiv mit den TG-Spiegeln korrelieren (Pennacchio, Olivier et al. 2001; Marcais, Verges et al. 2005) und im Zusammenhang der Familiären Kombinierten Hyperlipoproteinämie (FCHL) diskutiert werden (Ribalta, Figuera et al. 2002; Mar, Pajukanta et al. 2004). So zeigte eine größere Studie Punktmutationen (Single Nucleotide Polymorphisms/ SNP's) in dieser Region, die sowohl bei Männern als auch bei Frauen signifikant mit hohen TG und bei homozygotem Vorliegen mit dem Vorkommen von Myokardinfarkten assoziiert waren ( $p < 0,00001$  gegenüber der Kontrollgruppe) (Hubacek, Skodova et al. 2004). Einige dieser Polymorphismen korrelieren schon bei Schulkindern mit hohen TG-Spiegeln und kleinen small dense LDL-Partikeln (sdLDL), die nur verlangsamt metabolisiert werden und durch Bindung an endotheliale Proteoglykane proatherogen wirken können (Austin, Talmud et al. 2004). Zusätzlich gibt es Publikationen, in denen besonders Träger bestimmter Apo A5-Mutationen im Vergleich zu anderen übergewichtigen und hyperlipämischen Patienten auf eine Fettrestriktion durch signifikant höheren BMI-Abfall auffielen und in ihrem kardiovaskulären Risikoprofil hierdurch deutlich profitieren konnten (Aberle, Evans et al. 2005; Corella, Lai et al. 2007). Andere Apo A5 Varianten sind signifikant mit dem Auftreten von Intimaverdickungen der Karotiden als Surrogatparameter zur Abschätzung der Gesamtartherosklerose assoziiert, wobei dies vor allem für adipöse Patienten galt und von den nüchtern gemessenen TG-Spiegeln unabhängig zu sein schien (Elosua, Ordovas et al. 2006). Kontrovers hierzu diskutieren einige Autoren Daten, die bei Patienten mit Hypertriglyzeridämien neben erhöhten Apo C3- auch erhöhte Apo A5-Spiegel zeigen (Schaap, Nierman et al. 2006). Besonders für Typ-2-Diabetiker gibt es Untersuchungen, die Hinweise auf eine positive Assoziation von Apo A5-Spiegeln und Hypertriglyzeridämie in dieser Patientengruppe liefern (Dallinga-Thie, van Tol et al. 2006), wobei offen ist, ob es sich hierbei bereits um einen Kompensationsmechanismus handelt. Die komplexe Regulation der TG-Spiegel und die Rolle von Apo A5 sind also noch nicht ausreichend verstanden. Die Apo A5-Genexpression reagiert positiv auf PPAR  $\alpha$ -Aktivatoren, zu denen die Medikamentengruppe der TG-senkenden Fibrate gehört. PPAR (Peroxisomen Proliferator Aktivierte Rezeptoren) sind ligandenaktivierte Kernrezeptoren, die durch Bindung an spezifische, mit einem PPAR-Response Element (PPRE) versehene DNA-Sequenzen die Transkription dieser Sequenzen steigern. Für Apo A5 wurde ein putatives PPRE identifiziert, dessen Rolle als wesentlicher Faktor der TG-senkenden Wirkung der Fibrate, dann über Apo A5 vermittelt, diskutiert wird (Vu-Dac, Gervois et al. 2003). Aufgrund aktueller Untersuchungsergebnisse wird vermutet, dass der Wirkmechanismus von Apo A5 in einer Beschleunigung des Katabolismus der TG-reichen Lipoproteine durch Lipoproteinlipase (LPL) an Kapillarendothelien besteht (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Schaap 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005). Veränderungen dieses Genlocus haben vermutlich also auch klinische Relevanz (Talmud 2007).

### **1.3.3 *In vivo*- Studien zur Funktion von Apolipoprotein A5**

Zur Untersuchung der Funktionen von Apolipoprotein A5 *in vivo* wurden zunächst die beiden schon bekannten Mausmodelle (humanes Transgen oder Apo A5-Defizienz, Pennacchio *et al.* 2001) herangezogen. Für die beobachteten dramatischen Unterschiede der Plasma-TG kamen verschiedene potentielle Mechanismen in Frage. Apo A5 könnte die intestinale TG-Aufnahme vermindern oder die hepatische VLDL-Produktion verlangsamen und damit die Plasma-TG-Spiegel verringern. Orale Gavage mit Glycerol-tri(<sup>14</sup>C)-Oleat in Olivenöl nach Inhibition der Plasmahydrolyse durch Tyloxapol (Triton WR1339) zeigte keinen Unterschied der Chylomikronenproduktion zwischen hApoA5tr- und Wildtypmäusen. Zur Untersuchung der VLDL-Produktionsrate wurde (<sup>3</sup>H)-Glycerol nach Tyloxapol-Verabreichung injiziert. Auch dieser Versuchsaufbau zeigte keine signifikanten Unterschiede. Die Resultate weisen darauf hin, dass Apo A5 die Produktion von TG-reichen Lipoproteinen vermutlich unbeeinflusst lässt (Fruchart-Najib, Bauge *et al.* 2004; Merkel, Loeffler *et al.* 2005). Eine andere Hypothese vermutet den Apo A5-Mechanismus in einem beschleunigten Abbau von VLDL und Chylomikronen, das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges ist die Lipoproteinlipase (LPL). Tatsächlich zeigten transgene Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren einen signifikant beschleunigten Abbau von (<sup>125</sup>I)-TC-markierten Chylomikronen und Apo A5-defizienten VLDL-Partikeln sowie eine gesteigerte Aufnahme von Fettsäuren in Skelettmuskulatur, Herz und Fettgewebe. Um zu überprüfen, ob diese Hydrolysesteigerung auch aus LPL-unabhängigen Prozessen resultieren konnte, wurde der Versuch nach Injektion des LPL-Inhibitors Tetrahydrolipostatin (THL) wiederholt. Nach dieser Behandlung konnten keine signifikanten Hydrolyseunterschiede mehr festgestellt werden (Merkel, Loeffler *et al.* 2005). Die Apo A5-vermittelte TG-Hydrolysesteigerung scheint also LPL-abhängig zu sein. Zur Untersuchung der Hypothese, dass Apo A5 die LPL-Aktivität *in vivo* verstärken würde, wurde die Aktivität des Enzyms in Prä- und Post-Heparin-Plasma der verschiedenen Apo A5 Mausgenotypen bestimmt. Heparininjektion löst die Lipoproteinlipase aus ihrer endothelialen Proteoglykanbindung und macht sie einer Aktivitätsbestimmung aus Plasmaproben zugänglich. Es konnten jedoch keine unterschiedlichen Post-Heparin-LPL-Aktivitäten für Apo A5-defiziente, transgene oder Wildtypiere gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Apolipoprotein A5 die durch Lipoproteinlipase vermittelte TG-hydrolyse moduliert, wobei dies nicht durch eine direkte LPL-Aktivierung geschehen muss (Merkel, Loeffler *et al.* 2005).

### **1.3.4 Apolipoprotein A5 im Kontext des Apo AI-CIII-AIV-Clusters**

Der Genbereich, in dessen Nähe Apo A5 identifiziert werden konnte, ist als Apo AI-CIII-AIV-Cluster dafür bekannt, Plasmalipidparameter zu regulieren. Apolipoprotein A1 wird größtenteils in der Leber und zu einem geringen Teil auch im Intestinum synthetisiert und ist, an HDL-Partikel assoziiert, als funktioneller LCAT-Aktivator am reversen Cholesterintransport beteiligt. Auch

Apolipoprotein A4 ist in HDL-Partikeln vorhanden und wird im Darm synthetisiert. Es fungiert ebenfalls als Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase und soll die Lipidabsorption beeinflussen. Neben Apo A5 hat vor allem Apolipoprotein C3 eine große Bedeutung für den TG-Spiegel im Plasma. Das 79 Aminosäuren große Protein stammt aus Leber und Darm und ist in den beiden TG-reichen Lipoproteinen und HDL zu finden. Apo C3 inhibiert die katalytische Aktivität der LPL und korreliert positiv mit dem Plasma-TG-Spiegel. In Bezug auf den Wirkungsmechanismus von Apo A5 ist auch Apo C3 ins Zentrum des Interesses geraten, könnte doch das LPL-blockierende Apolipoprotein, das selbst hohe TG-Spiegel verursacht, in seiner Wirkung durch Apo A5 antagonisiert oder in seiner Synthese und Expression unterdrückt werden. Tatsächlich zeigen Apo A5 transgene Tiere niedrigere Apo C3-Proteinspiegel als die Knockout-Mäuse, auf RNA-Ebene zeigt sich dieser Unterschied jedoch nicht. Der TG-Spiegel der für Apo A5 transgenen Maus ist außerdem nur halb so hoch wie der TG-Spiegel einer Apo C3-Knockout-Maus, so dass der Apo A5-Effekt nicht allein durch Apo C3-Modulation erklärbar wäre (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Neueste Versuche mit einem doppel-transgenen bzw. doppel-knockout Mausmodell für die Apolipoproteine A5 und C3 zeigen bei beiden Linien normale TG-Spiegel. Besäßen diese beiden Apolipoproteine einen gemeinsamen Funktionsmechanismus, würde man bei einem Doppel-Knockout-Tier entweder die Plasma-TG der Apo A5-KO-Maus (+300%TG) oder der Apo C3-KO-Maus (-30%TG) erwarten (Baroukh, Bauge et al. 2004). Da dies nicht der Fall ist, wird für Apo A5 ein von Apo C3 unabhängiger Wirkungsmechanismus vermutet.

## **1.4 Eigenschaften und Funktionen der Lipoproteinlipase**

### **1.4.1 Eigenschaften der Lipoproteinlipase**

Die Lipoproteinlipase ist eine Hydrolase, die in ihrer monomeren Form ein Molekulargewicht zwischen 41,7 und 60 kDa erreicht, abhängig von ihrem Glykosylierungsgrad. Das an der luminalen Seite des Kapillarendothels an heparansulfatreiche Proteoglykane gebundene Enzym hydrolysiert die TG aus Chylomikronen und VLDL, es entstehen dabei vor allem freie Fettsäuren. Die Lipoproteinlipase ist nur in einer homodimeren Form aktiv und benötigt Apo C-II als essentiellen Cofaktor (Übersicht in Brunzell 1995).

Auf Chromosom 8p22 lokalisiert, findet ihre Biosynthese vor allem im Fettgewebe und in der Herz- und Skelettmuskulatur statt, also den Kompartimenten der Energiespeicherung und des vermehrten Energiebedarfs. Nach der Synthese als inaktives Proenzym im endoplasmatischen Retikulum folgen Glykosylierungs- und Aktivierungsschritte im Golgi-Apparat (Garfinkel and Schotz 1987). LPL wird nun an die Zelloberfläche sezerniert und gelangt zu den Kapillarendothelien. An deren Oberfläche bindet das Enzym mit hoher Bindungskapazität an Heparansulfat-Proteoglykane der extrazellulären Endothelzellmatrix (Olivecrona, Hultin et al.

1995). Durch intravenöse Injektion von Heparin kann die LPL wieder von den Proteoglykanen gelöst werden und so frei ins Plasma gelangen.

Die N-terminale Domäne der LPL beinhaltet die katalytische Triade des Enzyms (Faustinella, Smith et al. 1991; Dugi, Dichek et al. 1992), gleichzeitig werden aber auch nicht-katalytische Funktionen des Enzyms beschrieben.

## **1.4.2 Funktionen der Lipoproteinlipase**

### **1.4.2.1 Katalytische Funktionen**

Die Lipoproteinlipase hydrolysiert die bevorzugt aus Chylomikronen und VLDL stammenden TG und Phospholipide. Durch den VLDL-Abbau initiiert sie die Konversion von VLDL zu IDL und LDL. Die entstehenden freien Fettsäuren können von den Parenchymzellen der Organe aufgenommen werden. Über diesen Mechanismus reguliert die LPL die Größe und Komposition der zirkulierenden Lipoproteinpartikel und senkt den Plasma-TG-Spiegel. Die Gatekeeper-Hypothese spricht der LPL eine Bedeutung bei der Adipositas-Genese zu. Die Konzentration von LPL an verschiedenen Organsystemen reguliert die Menge des Energieflusses in Form von Fettsäuren in das jeweilige Kompartiment. Das Verhältnis der LPL-Konzentrationen im Muskel zur Konzentration im Fettgewebe bestimmt dabei, wie viel Energie in Form von Fett gespeichert wird (Greenwood 1985). Über einen noch nicht endgültig aufgeklärten Mechanismus erhöht die aktive Lipoproteinlipase auch den HDL-Spiegel, die Übertragung struktureller Lipoproteinkomponenten auf HDL und veränderte CETP-Funktion werden in diesem Zusammenhang diskutiert (Goldberg 1996). Über ihre katalytische Funktion ist LPL also das essentielle Enzym für den Abbau TG-reicher Lipoproteinpartikel.

### **1.4.2.2 Nicht-katalytische Funktionen**

Die LPL ist an von ihrer katalytischen Aktivität unabhängigen nicht enzymatischen Stoffwechselfvorgängen beteiligt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion der LPL mit verschiedenen Lipoproteinrezeptoren die Bindung und zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen verstärkt (Übersicht in Ref. Beisiegel 1995). Strukturell als Brückenprotein zwischen Lipoproteinen und extrazellulärer Matrix geeignet, interagiert die Lipoproteinlipase sowohl mit Lipoproteinen als auch mit Heparansulfaten. Als Mechanismus diskutiert wird deshalb auch ein Transport der auf diese Weise gebundenen Lipoproteinpartikel in das Zellinnere während des physiologischen Proteoglykan-Turnovers (Obunike, Edwards et al. 1994). Zur Untersuchung der nichtkatalytischen Funktion der LPL *in vivo* wurde ein Mausmodell mit transgener Expression inaktiver humaner LPL im Muskel entwickelt (mit normaler Proteoglykanbindung des Transgens und normaler Expression der murinen LPL). Bei diesen Tieren fand sich eine signifikante

Reduktion der plasmatischen TG sowie in metabolischen Studien mit VLDL eine Erhöhung der Muskelaufnahme von TG, Apo B und Cholesterinestern. Über dieses Modell konnte dargestellt werden, dass die *in vitro* beschriebenen Beobachtungen auch *in vivo* von Bedeutung sind (Merkel, Kako et al. 1998). In Kombination mit anderen genetischen Veränderungen konnte gezeigt werden, dass ausschließlich die selektive CE-Aufnahme direkt von inaktiver LPL vermittelt werden kann. Die durch inaktive LPL verstärkte TG-Hydrolyse und die gesteigerte Lipoproteinaufnahme sind immer auf geringe Mengen aktiver LPL im selben Organ angewiesen (Merkel, Heeren et al. 2002).

### **1.4.3 Die Rolle der Lipoproteinlipase bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen**

#### **1.4.3.1 Familiäre Kombinierte Hyperlipoproteinämie (FCHL) und Arteriosklerose**

Die Familiäre Kombinierte Hyperlipoproteinämie ist eine multifaktorielle und polygene Erkrankung, die etwa jeden 300. Menschen in der Bevölkerung betrifft, allerdings bis zu 20% der Herzinfarktpatienten. Nach heutigem Wissen liegen der Erkrankung oftmals eine Apo B-Überproduktion oder eine Abbaustörung von VLDL zugrunde, es können zahlreiche Genloci betroffen sein (Apo C3, FABP uv.a.m). Manchmal ist die Erkrankung auch durch heterozygote LPL-Defekte verursacht. Die FCHL manifestiert sich meist jenseits des 25. Lebensjahres, wobei die Hypertriglyzeridämie früher als die Hypercholesterinämie auftritt. Es resultiert eine Erhöhung von VLDL, LDL oder beiden mit arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen in einem relativ jungen Alter. Über 100 Mutationen wurden in der LPL kodierenden Genregion oder ihren Promotoren als Ursache einer verminderten LPL-Aktivität beschrieben. Für einige Mutationen konnte ein Zusammenhang mit der FCHL und der Koronaren Herzerkrankung gefunden werden (Merkel, Eckel et al. 2002). Es erscheint schlüssig, dass eine reduzierte LPL-Funktion zu hohen TG-Spiegeln und damit früher Arteriosklerose führen kann.

Andererseits sprechen einige Untersuchungen der LPL auch eine pro-atherogene Wirkung zu, deren Ursache noch nicht abschließend geklärt ist. Hydrolyseprodukte wie freie Fettsäuren oder Lysolecithin könnten chemotaktisch auf Makrophagen wirken und die Membranpermeabilität des Endothels erhöhen. Die während der Hydrolyse entstehenden Lipoprotein-Remnants könnten dann leichter die Arterienwand infiltrieren. Die Brückenfunktion der LPL zwischen Proteoglykanen und Lipoproteinen könnte auch zu einer lokalen Lipoproteinretention führen (Goldberg 1996). Die physiologische Bedeutung dieser pro-atherogenen Mechanismen wird jedoch vor allem im Zusammenspiel mit anderen metabolischen Störungen diskutiert.

#### **1.4.3.2 Familiäre Chylomikronämie**

Pathogenetische Ursache dieser Erkrankung ist ein Lipoproteinlipasemangel, der sich meist schon vor dem zehnten Lebensjahr manifestiert. Homozygote oder kombinierte heterozygote Mutationen

führen zu einem Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms, in dessen Folge Chylomikronen nicht ausreichend abgebaut werden und die TG-Spiegel auf Werte bis weit über 1000mg/dl ansteigen können. Gleichzeitig sind die HDL-Spiegel stark reduziert. Der Lipoproteinlipasemangel tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:1 000 000 auf. Die Patienten sind nicht übergewichtig und entwickeln sich der Norm entsprechend. Neben eruptiven Xanthomen und Hepatosplenomegalie werden anamnestisch häufig kolikartige Bauchschmerzattacken angegeben, die auf rezidivierende Pankreatitiden zurückzuführen sind (Übersicht in Brunzell 1995). Ein rahmiger Chylomikronen-Überstand nach Übernachtinkubation des Plasmas im Kühlschrank ist ein erster Hinweis auf die Diagnose Familiäre Chylomikronämie, die dann durch eine Messung der LPL-Aktivität im Postheparin-Plasma bestätigt wird. Man unterscheidet den Typ I, der normale oder erniedrigte VLDL aufweist, vom Typ V, bei dem sowohl Chylomikronen als auch VLDL stark erhöht sind und Glucoseintoleranz und Übergewicht oft ko-existieren (Fredrickson 1978). Der Typ 5 ist im engeren Sinne also keine reine Chylomikronämie. Das Manifestationsalter der Hyperlipidämie Typ V liegt häufig etwas höher, das Übernacht-Plasma bleibt trotz abgesetzter Chylomikronen trüb, da die VLDL zusätzlich vermehrt sind. Therapeutisch wird die Fettzufuhr in beiden Fällen unter Substitution essentieller Fettsäuren und fettlöslicher Vitamine strikt begrenzt, es kommen mittelkettige Transfettsäuren („MCT-Fette“) zum Einsatz, deren Metabolismus nicht über die Lipoproteinlipase reguliert wird. Des Weiteren sollten die Betroffenen Alkohol, Östrogene und einige andere Medikamente meiden, da diese den TG-Spiegel zusätzlich steigern.

#### **1.4.4 Lipoproteinlipase und Apolipoprotein A5**

In den bereits vorgestellten metabolischen *in vivo* Studien zur Funktion von Apolipoprotein A5 konnte gezeigt werden, dass Apo A5 modulierend in den Chylomikronen- und VLDL-Katabolismus eingreift. Schlüsselenzym des Abbaus der TG-reichen Lipoproteine ist die Lipoproteinlipase. Um einen direkten Zusammenhang zwischen Apo A5 und LPL herzustellen, wurden die *in vivo* Studien mit den Apo A5-Genotypen noch einmal unter Inhibition der katalytischen LPL-Funktion durchgeführt. Die zuvor gezeigten Unterschiede im VLDL-Abbau der verschiedenen Apo A5-Genotypen verschwanden nach der Injektion von Tetrahydrolipostatin (THL, LPL-Inhibitor), so dass eine Beteiligung der LPL am Funktionsmechanismus des Apo A5 sehr wahrscheinlich ist (Merkel, Loeffler et al. 2005). Im Pre-und Postheparin-Versuch wurde jedoch keine veränderte LPL-Aktivität zwischen Wildtyp-, Knockout- und transgenen A5-Tieren gefunden. Es ist denkbar, dass diese Untersuchungsmethode entweder einen für den Mechanismus der Aktivitätssteigerung wichtigen physiologischen Parameter nicht genügend berücksichtigt oder andere Interaktionen als eine direkte LPL-Aktivierung die durch Apolipoprotein A5 gesteigerte TG-Hydrolyse erklären. Der in diesen Experimenten belegte Zusammenhang zwischen Apo A5

und der Lipoproteinlipase macht aber auch verständlicher, warum Varianten im Apo A5 Gen mit ähnlichen Erkrankungen assoziiert sein können wie Mutationen am LPL-Genlocus.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Mit den in früheren Arbeiten etablierten Tiermodellen mit hemizygot-transgener Expression von humanem Apo A5 oder homo- und heterozygoter Apo A5-Defizienz konnten in Stoffwechselstudien wichtige Erkenntnisse zur Funktion von Apo A5 unter physiologischen Bedingungen gewonnen werden. Diese Ergebnisse verlangen danach, den Einfluss von Apolipoprotein A5 auf die Lipoproteinlipase oder den durch sie vermittelten Hydrolysevorgang einer genaueren Untersuchung zugänglich zu machen. Ein *in vitro* Versuchsaufbau ermöglicht hierbei noch konstantere Hintergrundbedingungen als das *in vivo* Experiment und eine gezielte Manipulation einzelner Parameter des Systems. Ein konventioneller LPL-Assay, der die TG-Hydrolyse durch gelöste LPL bestimmt, erbrachte für Plasmaproben der Apo A5-Genotypen keine signifikanten Ergebnisse.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Mechanismen der Beschleunigung des LPL-vermittelten Abbaus TG-reicher Lipoproteine durch Apolipoprotein A5 *in vitro* aufzuklären.

Orientiert am Versuchsaufbau einer niederländischen Arbeitsgruppe (de Man, de Beer et al. 1997) wurde ein LPL-Assay entwickelt, der die Hydrolyse unter relativ physiologischen Bedingungen untersucht, indem das Enzym wie *in vivo* an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden wird. Gleichzeitig wurde immer ein konventioneller LPL-Assay als Kontrolle mitgeführt. Zuletzt wurde der Versuchsaufbau auf ein Zellkultursystem übertragen, wobei sich die verwendeten CHO-Zelllinien ausschließlich durch ihre Proteoglykan-Expression unterschieden. Als Substrate des Assays dienten unterschiedlich präparierte und am ApoA5-Gehalt variierte TG-reiche Lipoproteinpartikel von Mäusen mit verschiedenen ApoA5-Genotypen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav (Modell: Varioklav)	HP Labortechnik, Oberschleißheim
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoresekammer	Biorad, München
Gelelektrophoresekammer für Westernblot	Invitrogen, Frankfurt a.M.
Hamiltonspritze	Carl Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Laborkühlzentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Kendro, Hanau
Mikrotiterplattenlesegerät MRX 2	Dynex Technologies, Frankfurt a. M.
PCR-Thermocycler TP48	Biometra, Göttingen
pH meter 140	Corning, Halstead, UK
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Powersupply Power Ease 500	Invitrogen, Frankfurt a. M.
Rüttler Certomat TC2	B. Braun Biotech, Melsungen
Schüttelinkubator TH15/KS15	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Ultrazentrifuge Model L7-55	Beckman and Coulter, München
Rotor Typ LP42 Ti (Festwinkel)	
Rotor SW 40 (Swing Out)	
Videodokumentationsgerät für Agarose-Gele	Itas, Stuttgart

#### 2.1.2 Chemikalien

Es wurden Chemikalien in der höchsten erhältlichen Qualität verwendet. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Deisenhofen oder Merck, Darmstadt bezogen.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Invitrogen Live Technologies, Frankfurt a.M.
BCA Protein Assay Reagent A und B	Pierce, Rockford IL, USA
Bicine	Sigma, Deisenhofen
Bis-Tris	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholesterin-Reaktionslösung für CHOL-Assay	Roche-Hitachi, Mannheim
Coomassie, Brillantblau, R250	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithioreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham, Uppsala, Schweden
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glyzerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Karl Roth, Karlsruhe
Heparan Sulfat Proteoglykan (HSPG)	Sigma, Deisenhofen
Heparinase I und III	Sigma, Deisenhofen
Kaliumbromid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS=(3-(N-Morpholino) Propansulfansäure)	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker Holland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Merck, Darmstadt
NEFA C-Kit für freie Fettsäuren	Wako, Neuss
N-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Phenol (buffer saturated)	Invitrogen, Frankfurt a. M.
Precipath L-Standardlösung für CHOL und TG Assay	Roche-Hitachi, Mannheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Triglyzerid-Reaktionslösung für TG-Assay	Roche-Hitachi, Mannheim
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt

Wasser

Wasser wurde mit einem Optilab Plus UV der Firma AW Technik GmbH, Hamburg doppelt destilliert und autoklaviert.

**Narkosemittel**

Diethylether

**Hersteller**

Merck, Darmstadt

**2.1.3 Enzyme und Proteine**

**Enzym oder Protein**

Bovines Serum Albumin (BSA)

Proteinase K

Taq DNA Polymerase, 5U/ $\mu$ l

**Hersteller**

Roche, Mannheim

Roche, Mannheim

Invitrogen, Carlsbad, USA

**2.1.4 Oligonukleotide und Primer**

**Oligonukleotide:**

Desoxyadenosintriphosphat (dATP),

Desoxycytidintriphosphat (dCTP),

Desoxyguanosintriphosphat (dGTP),

Desoxythymidintriphosphat (dTTP),

alle für PCR

Marker für 100 bp, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l

Primer mA5Wt/1FW

Primer mA5Wt/2BW

Primer A5Neo/1FW

Primer A5Neo/2BW

Primer hA5Tg/1FW

Primer hA5Tg/2BW

**Hersteller**

Roche, Mannheim

Invitrogen, Carlsbad, USA

MWG Biotech, Ebersberg

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Die an dieser Stelle nicht aufgeführten sterilen Labormaterialien wurden von den Firmen Becton-Dickinson, Heidelberg und Nunc, Wiesbaden bezogen.

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Falcon Tubes 15 und 50 ml	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten „Falcon“ für Zellkultur	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
PCR-Stripes (Reaction Strip 2ml und Cap)	Simport, Canada
Phenolfeste Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß Safe Lock micro-test 0,5ml; 1,5ml; 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schmelzpunktkapillaren (für Blutabnahmen)	Hirschmann, Eberstadt
Hämatokritkapillaren	Hirschmann, Eberstadt
Starkwandige Reagenzglasröhrchen (Assistent)	Francke, Hamburg
Zentrifugationsröhrchen	Beckman, München

### 2.1.6 Standard Pufferlösungen

#### *Phosphate Buffered Saline (PBS)*

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Wasser.

#### *Tris-Borsäure-EDTA-(TBE-)Puffer*

Für 10fach konzentrierten Puffer: 108 g Tris-Base; 55 g Borsäure; 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 l Wasser.

#### *Tris-EDTA-(TE-) Puffer*

10 mM Tris-HCl pH 7,6 und 1 mM EDTA pH 8,0 in 50 ml Wasser.

#### *Jonathan's (J's) PCR-Puffer*

Alle PCR- Reaktionen wurden mit folgendem Stammpuffer durchgeführt:

11% DMSO; 19 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; 76 mM Tris pH 8,8; 7,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 11 mM DTT; 193 mg/ml BSA; 23 mM dNTP.

Zur Herstellung von 50 ml Puffer wurden 5,68 ml DMSO; 0,945 ml 1M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; 3,8 ml Tris; 380 µl 1M MgCl<sub>2</sub>; 570 µl 1M DTT; 9,65 ml 1 mg/ml BSA und 115 µl dNTP gemischt und mit steril-filtrierte destillierten Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Der Puffer wurde in 2ml großen Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20° C gelagert.

### ***Bromphenolblau (BPB)-PCR-Ladepuffer für die Gelelektrophorese***

500µl einer 10 prozentigen Bromphenolblaulösung werden mit 6ml Glycerol versetzt und mit 13,5ml steril-filtrierte Wasser auf 20ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

### ***Lysis-Puffer für den Verdau von Schwanzbiopsien vor DNA-Extraktion:***

Für eine zweifache Konzentration wurden 480g Harnstoff in ca. 150–200ml Wasser auf einer Heizplatte unter Rühren gelöst. Anschließend wurden nacheinander 33ml 30-prozentigen Sarkosyls, 200ml 1 M Tris-HCL pH 8,0, 80ml 5 M NaCl und 40ml 0,5 M EDTA pH 8,0 hinzugefügt und zum Schluss mit Wasser auf 1000ml aufgefüllt. Die Endkonzentrationen des Puffers ergeben sich wie folgt: Harnstoff 2 M; Sarkosyl 0,25%; Tris-HCL pH 8,0, 0,05 M; NaCl 0,1 M; EDTA 5 mM.

## **2.1.7 Materialien für den Westernblot**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Rabbit-Anti hApoA5-Antikörper Polyklonales Kaninchenantiserum gegen den humanen C-Terminus von Apo A5 (Peptidsequenz HSLHDQGSHLG)	Eurogentec, Liège, Belgien
Antirabbit-Ig, HRP linked F(ab') <sub>2</sub> fragment from Donkey	Amersham, Little Chalfont, UK
Magermilchpulver Naturaflor	Töpfer, Dietmannsried
SeeBluePlus2 Marker	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPage Bis-Tris-Gel 4-12%, 1mm/12well	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zellulose-Transfermembran	Biorad, München
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham, Little Chalfont, UK

## **Puffer und Lösungen**

### ***3-(N-Morpholino) Propansulfansäure (MOPS)-SDS-Elektrophoreselaufpuffer***

Für 20-fach konzentrierten Puffer:

104,6g MOPS, 60,6g Tris-Base, 10g Natrium-Dodecyl-Sulfate (SDS) und 3,0g EDTA werden mit Wasser auf 500ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Der pH-Wert sollte nun 7,7 betragen und darf nicht mit Säure oder Base nachträglich eingestellt werden.

### ***Blotpuffer***

4,08g Bicine, 5,23g Bis-Tris und 0,29g EDTA werden in 100ml Methanol pro Gel gelöst und mit Wasser auf 1l Endvolumen aufgefüllt.

### ***Probenpuffer***

Für den konzentrierten Puffer werden 4g Saccharose, 0,682g Tris-Base, 0,666g Tris-HCl, 0,8g Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) und 0,006g EDTA sowie 0,75ml einer 1-prozentigen Coomassie Brilliant Blue Lösung mit Wasser auf 10ml Endvolumen aufgefüllt.

Für die Anwendung werden frisch angesetzt: 90µl Probenpuffer, 18µl Mercaptoethanol und 12µl Wasser.

### ***PBS (1x)-Tween (0,1%)***

100ml PBS (10x) werden vorgelegt, 1g Tween wird mit der Pipette zugegeben und danach auf 1 l Wasser aufgefüllt.

### ***Milchpulver (10%)-PBS-Tween (0,1%)***

5g des Milchpulvers werden in 50ml PBS (1x)-Tween (0,1%) gelöst.

## **2.1.8 Puffer für den HSPG-LPL-Assay**

### ***0,1M Trispuffer pH 8,5***

12,114g Tris-Base werden mit Wasser auf 1l Endvolumen aufgefüllt, der pH-Wert wird bestimmt und mit NaOH als Lauge oder HCl als Säure auf pH 8,5 titriert.

### ***0,1M Tris-(20%) Glycerolpuffer pH8,5***

100ml Glycerol werden in 400ml eines 0,1 molaren Tris-Puffers pH 8,5 gelöst, der pH-Wert wird nachbestimmt und nötigenfalls mit NaOH oder HCl-Lösung korrigiert.

## **2.2 Allgemeine Arbeitsmethoden**

### **2.2.1 Sterilisation**

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden in einem Autoklaven in feuchter Hitze bei 121°C und 2 bar für 30 min sterilisiert. Lösungen mit hitzeempfindlichen Substanzen wurden mit einem 0,2 µm Filter sterilisiert. Wasser wurde mit einem Optilab Plus UV der Firma AW Technik GmbH, Hamburg doppelt destilliert und autoklaviert oder steril filtriert verwendet.

## **2.3 Tiere und Tierhaltung**

### **2.3.1 Maushaltung**

Die Mäuse der beiden Apo A5-Linien wurden in den pathogenarmen Tierställen der Versuchstierhaltung des UKE (Süderfeldstrasse) gehalten. Alle Tiere waren bezüglich der üblichen Serologien, insbesondere des Maushepatitisvirus (MHV), negativ getestet („specific pathogen free“; SPF). Um diesen pathogenfreien Zustand zu erreichen, sind die Mauslinien über einen

Embryotransfer in die Versuchstierhaltung eingeschleust worden. Alle verwendeten Mausstämme lagen auf einem weitgehend homogenen genetischen Hintergrund (FVB) vor. Die Verpaarung der Tiere wurde so geplant, dass alle zu untersuchenden Genotypen entstanden. Soweit es möglich war, wurden alle Kreuzungsschritte mit dem Inzuchtstamm FVB durchgeführt. Die untersuchten Mäuse wurden mit einer standardisierten Nager-Diät („chow-diet“ mit 4% der Energie aus Fett) gefüttert und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

### **2.3.2 Genehmigung der Tierversuche**

Für die Tierversuche bestanden Genehmigungen nach §7 TierSchG (20/99, 51/02, 14/05) und §6 TierSchG (UKE\_VTH-Aktenzeichen A65, A66) wurden angezeigt; Organ- und Blutentnahmen hatten das interne Registrierzeichen Org 163 und 288 der Universität Hamburg. Die Durchführung der Tierexperimente orientierte sich an den Richtlinien der Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB).

### **2.3.3 Mauslinien**

Für die Experimente wurden Plasmaproben von zwei bereits vorher beschriebenen Mauslinien verwendet (Pennacchio, Olivier et al. 2001).

#### **2.3.3.1 Apo A5-defiziente Mauslinie (Apo A5 +/+, Apo A5 +/- und Apo A5 -/-): Linie Apo A5 KO**

Bei den heterozygot Apo A5-defizienten Tieren wurden durch Gen-Targeting drei Exons des Apo A5-Gens durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt. Durch Kreuzung von heterozygoten Männchen und Weibchen entstanden sowohl Wildtyp-Tiere als auch heterozygot und homozygot Apo A5-defiziente Tiere. Alle möglichen Genotypen entstanden entsprechend der Mendel'schen Verteilung (25% Apo A5-/-; 50% Apo A5+/-; 25% Apo A5+/+), die für die Deletion homozygoten Tiere (Apo A5 -/-) erschienen phänotypisch normal (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Die Tiere dieser Apo A5-defizienten Mauslinie wurden von L.A. Pennacchio, Berkeley, USA zur Verfügung gestellt und in die Versuchstierhaltung der Universitätsklinik Eppendorf in Hamburg importiert.

#### **2.3.3.2 Mauslinie mit transgen exprimiertem humanen Apo A5 (hApo A5/tr): Linie Apo A5 Tr**

Diese Tiere wurden durch die Verwendung eines 26-kbp Xho I-Fragmentes generiert, das ausschließlich humanes Apo A5 beinhalten sollte. Ziel war es, ein für humanes Apolipoprotein A5 transgenes Mausmodell zu konstruieren (hApo A5/tr). Der Erfolg dieses Vorhabens wurde durch Hybridisierung eines RNA-Blots aus Organproben der neu generierten Mauslinie und Wildtyp-Kontrollproben mit human-spezifischer Apo A5-cDNA getestet. Die Expression des genomischen Transgens konnte in Lebergewebe der neuen Linie nachgewiesen werden, also an der gleichen

Stelle, an der auch das endogene Apo A5 exprimiert wird (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Die hApo A5-transgenen Tiere, wurden von L.A. Pennacchio, Berkeley, USA zur Verfügung gestellt und in die Versuchstierhaltung der Universitätsklinik Eppendorf in Hamburg importiert. Durch Verpaarung von hemizygot transgenen Mäusen (hApo A5/tr) mit FVB-Wildtyp-Tieren (Apo A5 +/+) entstanden wieder sowohl hemizygot transgene Mäuse als auch Wildtyp-Tiere.

## **2.4 Genotypisierung der Mäuse**

### **2.4.1 Prinzip**

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch DNA-Gewinnung und Reinigung aus einer Schwanzspitzenbiopsie, anschließender zweimaliger PCR und Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese. 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.

### **2.4.2 Entnahme einer Schwanzbiopsie**

Die jungen, 3-4 Wochen alten Mäuse wurden in CO<sub>2</sub>-Sauerstoff-Gemisch narkotisiert. Anhand der Atemfrequenz und -tiefe konnte die Narkosetiefe gesteuert werden: Bei tiefer Atmung mit niedriger Frequenz ist eine ausreichende Narkosetiefe erreicht. Die Mäuse konnten nun am Schwanz aus der Narkosevorrichtung genommen werden. Mit einem Skalpell wurden ihnen etwa 5 mm der Schwanzspitze entfernt. Gleichzeitig wurde jede Maus am Ohr mit einer Ohrlochzange markiert, um eine eindeutige Identitätszuweisung zu ermöglichen. Die durch die Biopsie entstandene Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber versorgt. In der Regel haben die Tierpfleger der Tierhaltung diese Tätigkeit freundlicherweise übernommen.

### **2.4.3 Verdau der Schwanzbiopsie**

Die Schwanzspitze wurde in 400µl Lysis-Puffer mit 50µl 10 mg/ml Proteinase K über Nacht im Schüttelinkubator bei 56°C verdaut.

### **2.4.4 DNA-Extraktion**

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für kurze Zeit bei 4°C im Kühlschrank gelagert, bis sich zwei Phasen gebildet hatten. Nun wurden 400µl der unteren Phase dieses Gemisches in das Reaktionsgefäß gegeben, in dem zuvor über Nacht die Schwanzprobe lysiert worden war. Das Reaktionsgefäß wurde dann eine halbe Minute lang gevortext und für 5 Minuten bei 13.000 RPM in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Die obere Phase des Gemisches wurde mit der Pipette abgenommen und die genomische DNA in 1ml Ethanol ausgefällt. Mit einer Hämokritkapillare konnte die DNA-Probe aus dem Ethanol in 200µl TE-Puffer überführt werden.



Die bei 4 °C über mehrere Wochen stabile genomische DNA konnte anschließend durch PCR untersucht werden.

#### **2.4.5 PCR**

Die aus den Schwanzbiopsien isolierten DNA-Proben wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) auf ihre genomischen Eigenschaften am Apo A5 Locus bzw. auf das Vorhandensein des humanen Apo A5 Transgens untersucht. Das Prinzip der Amplifizierung genetischen DNA-Materials durch PCR wird an dieser Stelle als bekannt vorausgesetzt. Jede DNA-Probe wurde doppelt mittels PCR untersucht, um die Quote von Falschbestimmungen des Genotyps zu senken.

##### **2.4.5.1 PCR zur Bestimmung des Genotyps am Maus-Apo A5-Locus**

Um alle aus der Züchtung entstehenden Genotypen der Linie Apo A5 KO zu erfassen, mussten zwei verschiedene PCR verwendet werden:

##### ***Apo A5-Wildtyp-PCR***

Zur Testung des Wildtyp-Genotyps am Maus-Apo A5 Locus (Apo A5 +/+ oder Apo A5 +/-) wurde eine bereits etablierte 2-Primer-PCR verwendet.

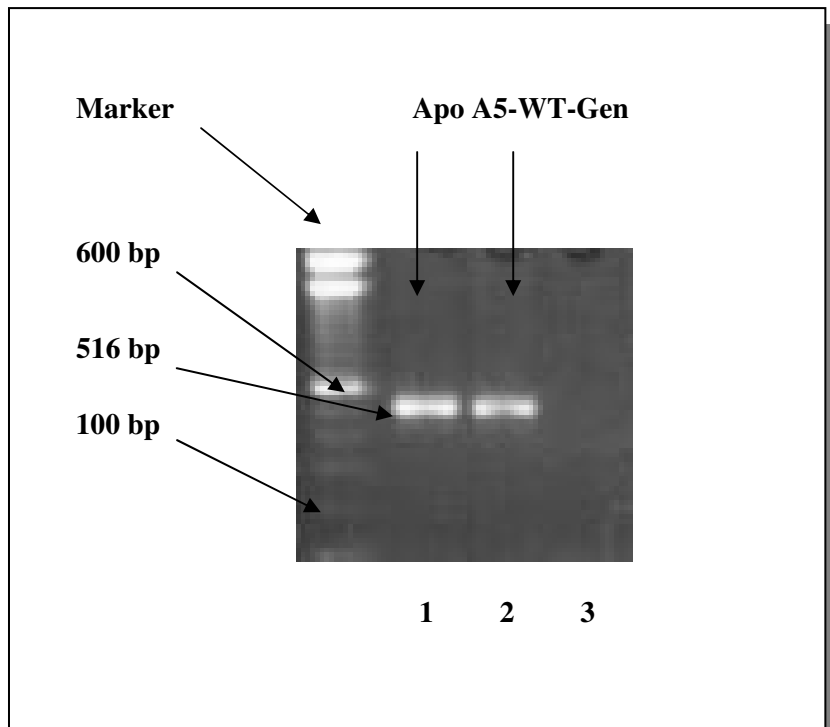
Primer mA5WT/1FW (5'-ACA GTT GGA GCA AAG GCG TGA T-3')

und

Primer mA5WT/2BW (5'-CTT GCT CGA AGC TGC CTT TCA G-3')

amplifizierten in Gegenwart des intakten Maus-Apo A5-Gens eine Bande, die nach Agarosegelelektrophorese bei 516 bp abzulesen war.

Bei einem Reaktionsvolumen von 22,5µl wurden 20µl J's PCR-Puffer, je 1µl der Primer mA5WT/1FW und mA5WT/2BW (10 pmol/µl), 0,5 µl Taq DNA Polymerase und 4µl genomische DNA aus der Schwanzbiopsie eingesetzt. Die Proben wurden 1 Minute lang bei 95°C denaturiert; dann folgten 35 Zyklen à 1 Minute bei 95°C, 1 Minute bei 53°C sowie 3 Minuten bei 72°C. Nach durchlaufen des Programms wurde das PCR-Produkt vom Thermocycler bei 4°C bis zur Überführung in den Kühlschrank oder die Gelelektrophorese gekühlt. Als Negativkontrolle dienten 4µl TE-Puffer, als Positivkontrolle 4µl der genomischen DNA einer in einem vorherigen Durchlauf dieser PCR positiv bestimmten Maus.



**Abb. 2: PCR für das Apo A5-Wildtypgen.** Als Marker wurden 100 bp DNA-Fragmente verwendet, wobei die 600 bp-Bande dicker als die übrigen ist. Bei Vorliegen des Apo A5-Wildtypgens (d.h. beim Apo A5 +/+ oder Apo A5 +/- Genotyp) erscheint eine 516 bp große Bande.  
**1:** Apo A5 +/+ **2:** Apo A5 +/- **3:** Apo A5 -/-

### ***Apo A5-Neo-PCR***

Zur Testung des Neomycin-Resistenzgens als Äquivalent eines Knockouts am murinen Apo A5 Locus (Apo A5 +/- oder Apo A5 -/-) wurde eine bereits etablierte 2-Primer-PCR verwendet.

Primer A5Neo/1FW (5'-CTT TTT GTC AAG ACC GAC CTG-3')

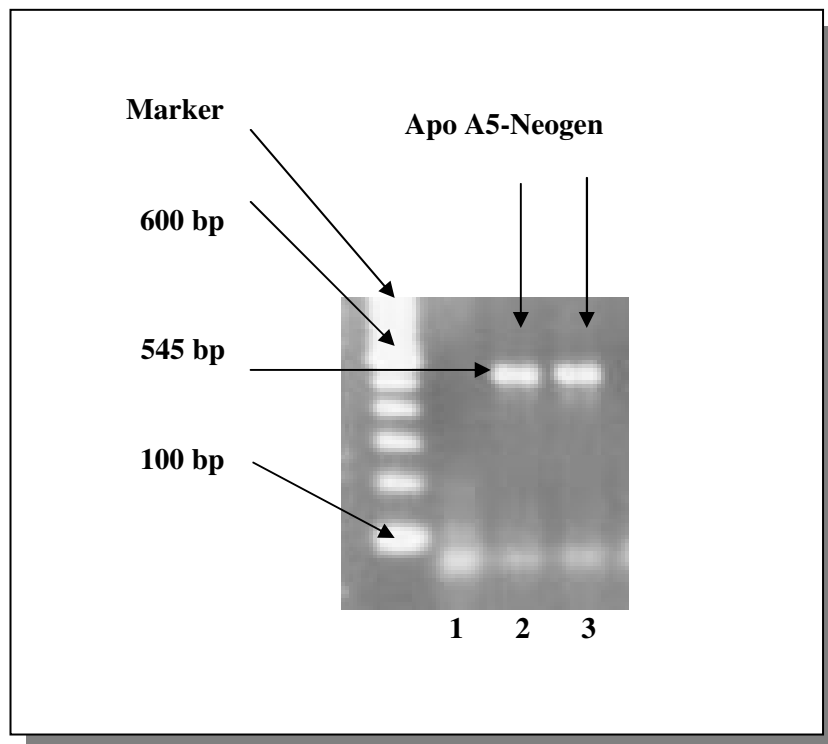
und

Primer A5Neo/2BW (5'-AAT ATC ACG GGT AGC CAA CGC-3')

amplifizierten in Gegenwart des intakten Neomycin-Resistenzgens eine Bande, die nach Agarosegelelektrophorese bei 545 bp abzulesen war.

Bei einem Reaktionsvolumen von 20,7µl wurden 20µl J's PCR-Puffer, je 0,1µl der Primer A5Neo/1FW und A5Neo/2BW (10 pmol/µl), 0,5µl Taq DNA Polymerase und 4µl genomische DNA aus der Schwanzbiopsie eingesetzt. Die Proben wurden 1 Minute lang bei 95°C denaturiert; dann folgten 35 Zyklen à 1 Minute bei 95°C, 1 Minute bei 53°C sowie 3 Minuten bei 72°C. Nach durchlaufen des Programms wurde das PCR-Produkt vom Thermocycler bei 4°C bis zur

Überführung in den Kühlschrank oder die Gelelektrophorese gekühlt. Als Negativkontrolle dienten 4µl TE-Puffer, als Positivkontrolle 4µl der genomischen DNA einer in einem vorherigen Durchlauf dieser PCR positiv bestimmten Maus.



**Abb. 3: PCR für das Apo A5-KO-Neogen.** Als Marker wurden 100 bp DNA-Fragmente verwendet, wobei die 600 bp-Bande dicker als die übrigen ist. Bei Vorliegen des Apo A5-KO-Neogens (d.h. beim Apo A5 +/- oder Apo A5 -/- Genotyp) erscheint eine 545 bp große Bande.  
1: Apo A5 +/+ 2: Apo A5 +/- 3: Apo A5 -/-

#### 2.4.5.2 PCR zur Bestimmung des hApo A5 Transgens

Um alle aus der Züchtung entstehenden Genotypen der Linie hApo A5/Tr zu erfassen, musste eine bereits etablierte PCR verwendet werden:

##### *Apo A5-Transgen-PCR*

Zur Testung des humanen Apo A5 Transgens (hApo A5tr) wurde eine bereits etablierte 2-Primer-PCR verwendet.

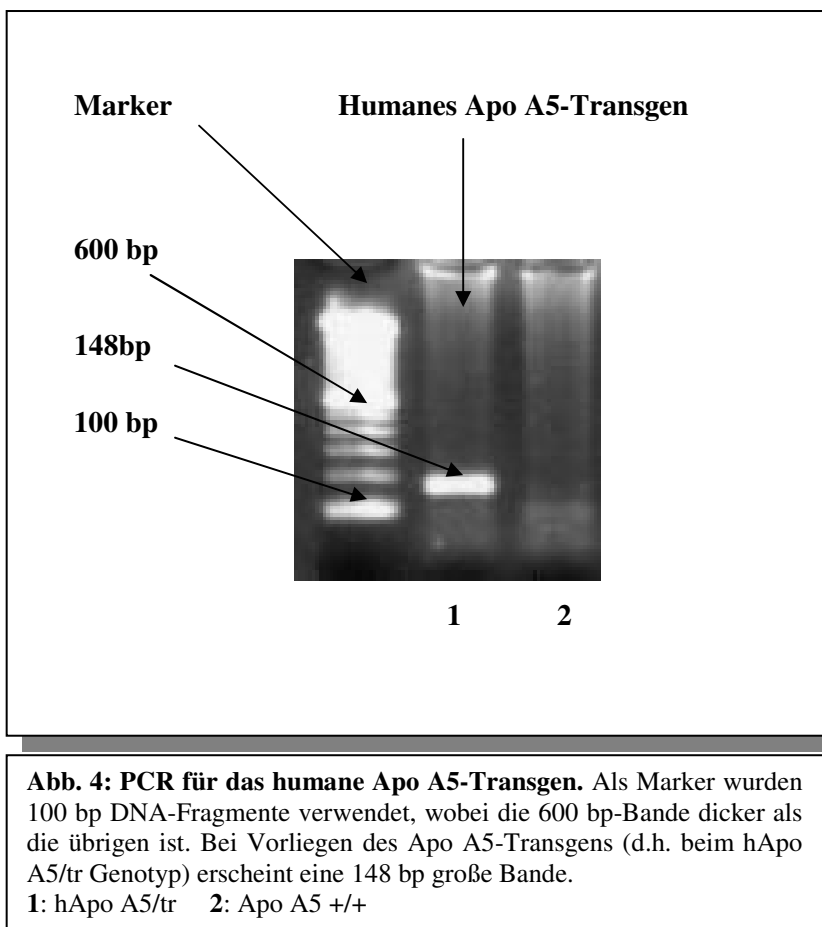
Primer hA5Tg/1FW (5'-CCC GCT GCA GTC CCC AGA AT-3')

und

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

amplifizierten in Gegenwart des intakten Apo A5 Transgens eine Bande, die nach Agarosegelelektrophorese bei 148 bp abzulesen war.

Bei einem Reaktionsvolumen von 21,5µl wurden 20µl J's PCR-Puffer, je 0,5µl der Primer hA5Tg/1FW und hA5Tg/2BW (10 pmol/µl), 0,5µl Taq DNA Polymerase und 4µl genomische DNA aus der Schwanzbiopsie eingesetzt. Die Proben wurden 1 Minute lang bei 95°C denaturiert; dann folgten 35 Zyklen à 1 Minute bei 95°C, 1 Minute bei 53°C sowie 3 Minuten bei 72°C. Nach durchlaufen des Programms wurde das PCR-Produkt vom Thermocycler bei 4°C bis zur Überführung in den Kühlschrank oder die Gelelektrophorese gekühlt. Als Negativkontrolle dienten 4µl TE-Puffer, als Positivkontrolle 4µl der genomischen DNA einer in einem vorherigen Durchlauf dieser PCR positiv bestimmten Maus.



#### 2.4.6 Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5 % Agarose-Gel verwendet. Es wurden dazu 100ml TBE-Puffer mit 1,5g Agarose in einem Becherglas auf der Heizplatte unter Beobachtung für 5-6 min bei höchster Stufe erhitzt und anschließend mit 5µl (10mg/ml) Ethidiumbromid versetzt. Die Masse wurde dann in eine Gießkammer mit einem 15- oder 20-Zahn-Kamm gegossen. Nach 30 Minuten konnte der Kamm gezogen und das abgekühlte Gel in die Elektrophoresekammer gelegt werden, die soweit mit TBE-Puffer gefüllt wurde, dass das Gel vollständig bedeckt war. Die erste Tasche wurde mit 10µl eines 100bp Markers zur Größenbestimmung der PCR-Produkte befüllt. In

die folgenden Taschen wurden nun 10µl der PCR-Proben pipettiert, die zuvor mit 3µl Bromphenolblau (BPB)-Ladepuffer vermischt wurden (also insgesamt 13µl Trennvolumen). Die in das Gel pipettierten Proben wurden dann für 45 Minuten unter eine Spannung von 160 Volt (100mA und 19W) gesetzt und haben sich während der Elektrophorese entsprechend ihrer Ladung und ihres Gewichtes in dem TBE-Gel verteilt. Durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid konnten die Proben unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und mittels Kamera auch festgehalten werden. Die entstehenden Banden definierter Größe ermöglichten, den Genotyp der untersuchten DNA-Probe für den durch die verwendeten Primer bestimmten Genlocus festzustellen.

## **2.5 hApo A5 Westernblot zur Bestimmung des hApo A5 Transgens**

Zur Detektion des humanen Apo A5 Transgens aus Plasmaproben, Lipoproteinfraktionen oder homogenisierten Organlysaten stand ein im Lipaselabor etablierter Westernblot zur Verfügung, der weiter optimiert wurde.

### **2.5.1 Prinzip**

Das Grundprinzip des Westernblotting-Verfahrens ist der Nachweis eines Proteins aus dem eingesetzten Probenmaterial durch eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion. Zunächst werden die im Probenmaterial enthaltenen Proteine in einer Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Um die immunologische Proteindetektion zu ermöglichen, werden die Proteine in einem zweiten Schritt auf eine Nitrozellulose-Membran als stationäre Phase transferiert (Blotting). Nun ist das gesuchte Protein für den spezifischen ersten Antikörper zugänglich und wird mit diesem inkubiert. Ein zweiter Antikörper ist mit einem Enzym konjugiert, das später eine Chemolumineszenzreaktion katalysieren soll. Sein Epitop sind Anteile des eingesetzten Erstantikörpers. Durch Reaktion mit einem jetzt eingesetzten Chemolumineszenz-Substrat kann das untersuchte Protein durch die Belichtung eines Röntgenfilmes detektiert werden.

### **2.5.2 Probenvorbereitung**

Zunächst wurde der Proteingehalt der zu untersuchenden Probe bestimmt. Die Probe wurde dann mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, dass der Proteingehalt in 15µl die Trennkapazität des eingesetzten kommerziellen Elektrophoresegels nicht überschritten hat. Der unter 2.1.7 beschriebene Probenpuffer konnte jetzt frisch angesetzt werden. Den 15µl proteinadaptierter Probe wurden 5µl des Probenpuffers zugefügt. Die Denaturierung der Proteine fand für 10 Minuten im Heizblock bei 96°C statt. Die Denaturierung ermöglichte eine Auftrennung nach Größe der Proteine, das im Probenpuffer enthaltene negativ geladene SDS vereinheitlichte durch Proteinbindung ihre Ladung. Das frisch zum Puffer hinzugefügte reduzierende Mercaptoethanol hat die Eigenschaft Disulfidbrücken zu spalten und linearisierte somit die in der Probe enthaltenen

Proteine. Diese Schritte waren notwendig, um die Gelelektrophorese zu ermöglichen. Auch der verwendete Marker wurde mit dieser Methode vorbehandelt.

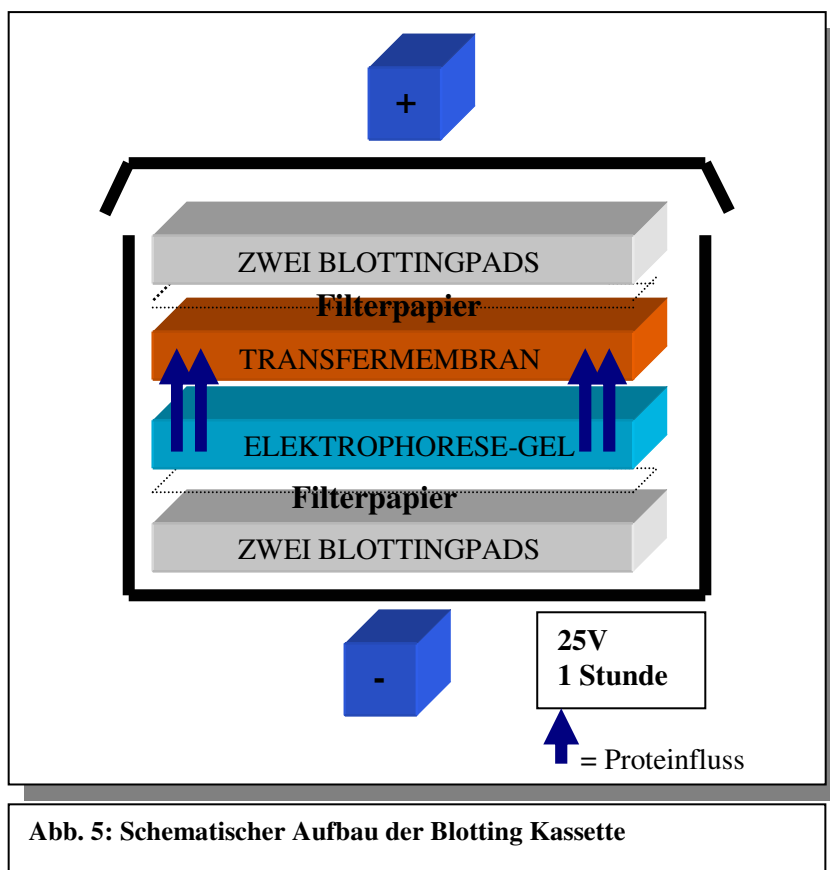
### **2.5.3 Gel-Elektrophorese**

Ein bei 4°C gelagertes kommerzielles 4-12% Bis-Tris Gel wurde mit einer Pasteurpipette dreimal mit MOPS-SDS-(1x)-Laufpuffer gespült (50ml MOPS-SDS-(20x)-Laufpuffer und 950ml Wasser). Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese bis 1cm unter den oberen Rand mit dem Laufpuffer befüllt.

Nun konnten je 15µl des reduzierten Markers und der reduzierten Proben in die insgesamt 12 Wells des Gels einpipettiert werden. Bei angelegter Spannung wanderte das negativ geladene Protein innerhalb des Gels der Spannung folgend in Richtung des Plus-Pols. Die Elektrophorese wurde unter Beobachtung für mindestens eine Stunde bei 200V Spannung (120mA, 25W) durchgeführt, bis die Lauffront am unteren Rand des Gels angekommen war.

### **2.5.4 Blotting**

Um die aufgetrennten Proteine für den Antikörper zugänglich zu machen, mussten sie auf eine Nitrozellulose-Membran als stationäre Phase transferiert werden. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen, seine Kunststoffhülle aufgebrochen und zunächst in eine Schale mit Blotpuffer (vgl. 2.1.7) gelegt. In die Blottingkassette wurden jetzt in einer mit Blotpuffer befüllten Schale Blottingpads, Filterpapiere, Gel und Transfermembran eingelegt. Nach Verschluss der Kassette wurde diese in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Blotpuffer befüllt. Das einstündige Blotting erfolgte unter einer angelegten Spannung von 25V (160mA, 17W). Dabei bewegten sich die immer noch negativ geladenen Proteine dem Strom folgend auf die Zellulose-Membran und wurden dort fest gebunden (Abb. 5).



**Abb. 5: Schematischer Aufbau der Blotting Kassette**

### 2.5.5 Abblocken der Transfermembran

Nach dem Transfer auf die Nitrozellulose-Membran wurde die Blottingkassette vorsichtig auseinander genommen und die Membran mit der in der Kassette zum Gel gewandten Seite nach oben in 50ml Milchpulver (10%)-PBS-Tween (0,1%) gelegt. Die Schale mit Milchpulverlösung und Membran wurde für eine Stunde auf den Schüttler gestellt und geschwenkt. Die nicht durch Proteine belegten Bindungsstellen der Membran wurden durch diese Methode mit Milchpulver abblockt, um später unspezifische Reaktionen zwischen Antikörper und Membran zu verhindern und das Hintergrundrauschen zu minimieren.

### 2.5.6 Reaktion mit dem ersten Antikörper

Bei dem zur Verfügung stehenden Erstantikörper handelte es sich um ein vom Lipaselabor in Auftrag gegebenes polyklonales Antiserum (Kaninchen), gerichtet gegen den C-Terminus des humanen Apo A5 (synthetische Peptidsequenz HSLHDQGHSHLG, Eurogentec, Liège, Belgien). Die Membran wurde aus der Milchpulverlösung entnommen und auf dem Schüttler unter Schwenken viermal mit jeweils 25ml PBS (1x)-Tween (0,1%) gewaschen (dreimal 5 Minuten, einmal 15 Minuten). Der Anti-hApo A5-Antikörper wurde 1:1600 mit Milchpulver-PBS-Tween verdünnt (30µl Antikörper auf 50ml Milchpulver-PBS-Tween). Membran und erster Antikörper

wurden in einem abgedeckten Glasgefäß über Nacht im 4°C Kühlraum auf einem Schüttler inkubiert.

### **2.5.7 Reaktion mit dem zweiten Antikörper**

Die Membran wurde aus der Antikörperlösung entnommen und auf dem Schüttler unter Schwenken viermal mit jeweils 25ml PBS (1x)-Tween (0,1%) bei Raumtemperatur gewaschen (dreimal 5 Minuten, einmal 15 Minuten). Der zweite Antikörper (Horseradish-Peroxidase konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> fragment from Donkey) wurde 1:5000 mit Milchpulver-PBS-Tween verdünnt (10µl Antikörper auf 50ml Milchpulver-PBS-Tween). Membran und erster Antikörper wurden in einem abgedeckten Glasgefäß für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschwenkt.

### **2.5.8 Belichtung und Entwicklung des Röntgenfilmes**

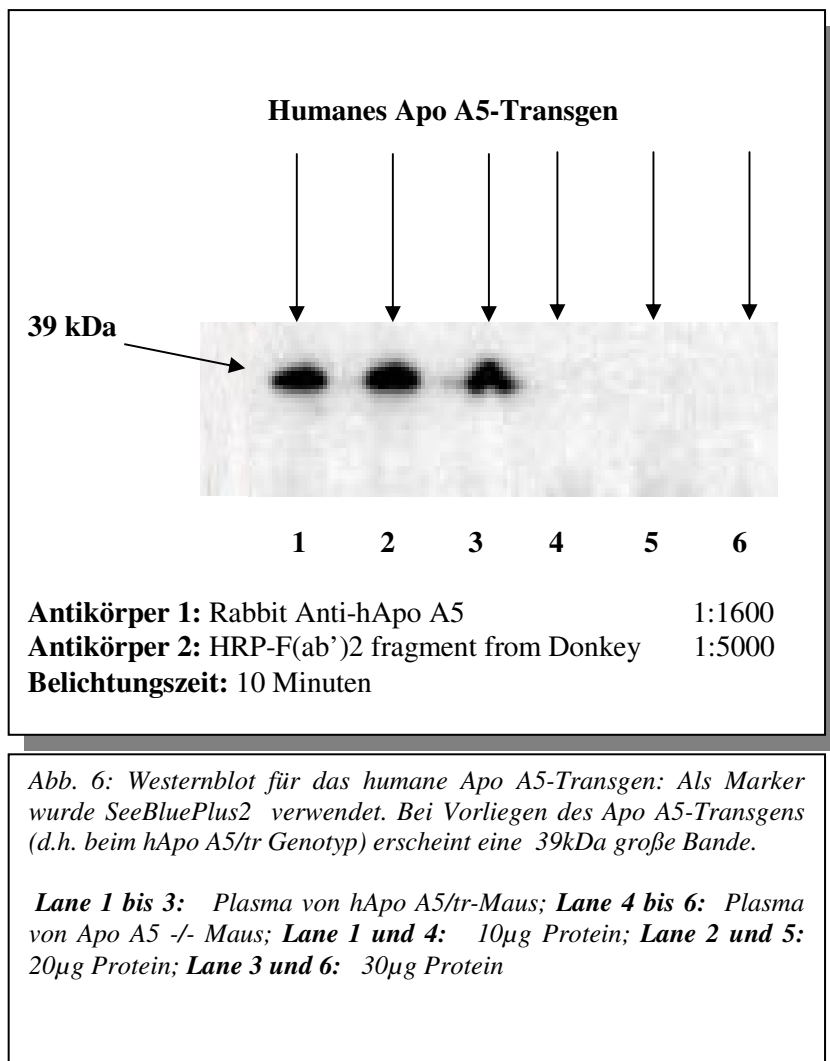
#### **Prinzip**

Die Verwendung des ECL-Systems zur Proteindetektion basiert auf der Umsetzung von Luminol zu Luminol-Endoperoxid durch die Horseradish-Peroxidase des zweiten Antikörpers. Luminol-Endoperoxid zerfällt sofort unter Abstrahlung von Licht, das zur Belichtung eines Röntgenfilms genutzt wird.

#### **Durchführung**

Die Membran wurde aus der Antikörperlösung entnommen und auf dem Schüttler unter Schwenken viermal mit jeweils 25ml PBS (1x)-Tween (0,1%) bei Raumtemperatur gewaschen (dreimal 5 Minuten, einmal 15 Minuten). Während dem letzten Waschschrift wurde das ECL-Westernblot Chemolumineszenz-Substrat vorbereitet (1,5ml „Lösung 1“ und 1,5ml „Lösung 2“ wurden zusammengegeben). Die Membran wurde aus dem Glasgefäß entnommen, über Zellstoff abgetropft und in ein sauberes Glasgefäß gelegt. Als nächstes wurde die ECL-Lösung vorsichtig auf die Membran gegeben. Nach einminütiger Inkubation wurde die Membran erneut auf Zellstoff abgetropft und zwischen zwei Filterpapieren von Flüssigkeit befreit. Die Membran wurde nun in einer Röntgenkammer befestigt. In der Dunkelkammer konnten dann Röntgenfilme eingelegt werden. Die Filme wurden nach verschiedenen Belichtungszeiten entwickelt (in der Regel 1, 5, 10 und 60 Minuten) und anschließend ausgewertet. Der Marker als Größenstandard erlaubte bei der Auswertung die Kalibrierung des Gels. Detektierte Proteinbanden konnten somit ihrer Größe (in kDa) zugeordnet werden. Jedes Bild wurde mit Datum und Angaben über Marker, Proben, Antikörper und ihre Verdünnung sowie Belichtungsdauer beschriftet.





## 2.6 Auftrennung von Mausplasma in seine Lipoproteinfraktionen

### 2.6.1 Prinzip

Zur Isolierung der Lipoproteine aus Mausplasma wurden 60µl Plasma sequentiell in einer Dichte von 1,006 g/ml und 1,062 g/ml ultrazentrifugiert (Havel, Eder et al. 1955) und die VLDL, LDL und HDL enthaltenden Fraktionen mittels eines kommerziell erhältlichen enzymatischen Farbtests auf ihren TG-, Protein- und CHOL-Gehalt untersucht. Hierfür wurden die Methoden an 96-well Mikrotiterplatten angepasst. Diese Untersuchung diente der Überprüfung der Qualität der sequentiellen Auftrennung, der Genotypverifizierung der Mausproben sowie als Grundlage der weiteren Verarbeitung der gewonnenen Lipoproteinfraktionen.

### 2.6.2 Blutentnahme und Plasmagewinnung

Erwachsene Tiere wurden zur Blutentnahme mit der schon vorgestellten CO<sub>2</sub>-Sauerstoff-Narkosevorrichtung in eine Kurzzeitanarkose gelegt und das Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mit einer Schmelzpunkt-Bestimmungskapillare gewonnen (Durchmesser 0,75mm).

Bei einer Blutentnahme von mehr als 100µl wurden pro 100µl Blut 2µl 0,5 M EDTA (pH 7,5) zur Antikoagulation hinzugefügt. Nach der Blutentnahme der Mäuse wurde das Blut durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 RPM) von seinen korpuskulären Bestandteilen getrennt und als Plasma abgenommen.

### **2.6.3 Sequentielle Lipoprotein-Zentrifugation**

60µl PBS wurde in einem Ultrazentrifugationsröhrchen vorgelegt und mittels einer Hamilton-Spritze mit 60µl Plasma unterlegt. Die Ultrazentrifugation wurde für 2,5 Stunden bei 42000 RPM in einem Festwinkel-Rotor Typ LP 42Ti durchgeführt. Am Ende der Zentrifugation befanden sich in den oberen 60µl die VLDL, während in der unteren Phase HDL, LDL und IDL vorlagen.

Die untere Phase wurde nun in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt. Diese wurde mit 60µl KBr mit einer Dichte von 1,12 g/ml mit der Pipette mehrfach durchmischt, um eine Dichte von 1,063 g/ml zu erreichen. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt für mindestens 12 Stunden bei 42000 RPM.

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

Zur Gewinnung größerer Volumina von Lipoproteinfraktionen aus gepoolten Plasmaproben wurde die oben beschriebene sequentielle Lipoprotein-Zentrifugation wie folgt modifiziert: Es wurde ein Swing-Out Rotor Typ SW 40 verwendet, der größere Zentrifugationsröhrchen aufnehmen konnte. 5ml PBS wurden mit 5ml Plasma für den ersten Zentrifugationsschritt unterschichtet, der für 4 Stunden bei 40000 RPM durchgeführt wurde. Analog wurden Volumina und Geschwindigkeit für den zweiten Zentrifugationsschritt variiert.

### **2.6.4 Bestimmung des Triglyzeridgehaltes**

Das Prinzip des TG-Assays ist ein enzymatischer Farbttest, wobei die Extinktion des in der Reaktion entstehenden Farbstoffes proportional zur TG-Konzentration in der Probe ist. Pro eingesetzte Mikrotiterplatte wurde eine Standardreihe mit Leerwert im Dreifachansatz bestimmt, aus der die Software des Computergestützten Mikrotiterplattenlesegerätes die Konzentration in den gemessenen Proben errechnen konnte.

Es wurden 5µl Plasma im Dreifachansatz eingesetzt. Die Precipath L- Standardlösung wurde auf 50, 100 und 250 mg/ml verdünnt und ebenfalls mit 5µl im Dreifachansatz eingesetzt. Jede Probe wurde mit 200µl des Triglyzerid-Reagenz in einer Mikrotiterplatte gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion des entstandenen rötlichen Farbstoffes wurde

photometrisch bei einer Wellenlänge von 505nm bestimmt. Aus der Standard-Reihe wurde durch die Software des Lesegerätes eine Eichkurve erstellt und der Proportionalitätsfaktor errechnet. Die TG-Konzentrationen der einzelnen Proben wurden ebenfalls durch das Programm errechnet und konnten direkt abgelesen werden.

### **2.6.5 Bestimmung des Cholesteringehaltes**

Das Prinzip des CHOL-Assays ist ein enzymatischer Farbttest, wobei die Extinktion des in der Reaktion entstehenden Farbstoffes proportional zur CHOL-Konzentration in der Probe ist. Pro eingesetzte Mikrotiterplatte wurde eine Standardreihe mit Leerwert im Dreifachansatz bestimmt, aus der die Software des Computergestützten Mikrotiterplattenlesegerätes die Konzentration in den gemessenen Proben errechnen konnte.

Es wurden 5µl Plasma im Dreifachansatz eingesetzt. Die Precipath L- Standardlösung wurde auf 55,07, 110,14 und 275,35 mg/ml verdünnt und ebenfalls mit 5µl im Dreifachansatz eingesetzt. Jede Probe wurde mit 200µl des Cholesterol-Reagenz in einer Mikrotiterplatte gemischt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Extinktion des entstandenen rötlichen Farbstoffes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 505nm bestimmt. Aus der Standard-Reihe wurde durch die Software des Lesegerätes eine Eichkurve erstellt und der Proportionalitätsfaktor errechnet. Die CHOL-Konzentrationen der einzelnen Proben wurden ebenfalls durch das Programm errechnet und konnten direkt abgelesen werden.

### **2.6.6 Bestimmung des Proteingehaltes**

Grundlage des BCA-Protein-Assays ist eine enzymatische Farbreaktion, wobei die Extinktion des in der Reaktion entstehenden Farbstoffes proportional zur Protein-Konzentration der Probe ist. Pro Mikrotiterplatte wurde eine Standardreihe samt Leerwert im Dreifachansatz bestimmt, aus der die Software des Computergestützten Mikrotiterplattenlesegerätes die Konzentration in den gemessenen Proben errechnen konnte.

Es wurden 10µl Plasma oder Lipoproteinfraktion im Dreifachansatz eingesetzt. Die Albumin-Protein-Standardlösung mit einer Konzentration von 2g/ml wurde mit Wasser auf eine Standardreihe mit Werten zwischen 0,05g/ml und 2g/ml eingestellt und ebenfalls mit 10µl im Dreifachansatz eingesetzt. Jede Probe wurde mit 200µl des Protein-Reagenz in einer Mikrotiterplatte gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Protein-Reagenz wurde vorher frisch aus 50-Teilen BCA-Reagenz A und einem Teil BCA-Reagenz B angesetzt.

Die Extinktion des entstandenen violetten Farbstoffes konnte nach der Inkubation photometrisch bei einer Wellenlänge von 540nm bestimmt werden. Aus der Standard-Reihe wurde durch die Software des Lesegerätes eine Eichkurve erstellt und der Proportionalitätsfaktor errechnet.

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden ebenfalls durch das Programm errechnet und konnten direkt abgelesen werden.

## **2.7 Triglyzerid-Hydrolyseversuche mit an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) gebundener Lipoproteinlipase (LPL) *in vitro***

*In vivo* ist die Lipoproteinlipase (LPL) an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) der extrazellulären Kapillarendothel-Matrix gebunden. Konventionelle LPL-Hydrolyseexperimente mit freier LPL *in vitro* berücksichtigen dies jedoch nicht. Eine niederländische Arbeitsgruppe (de Man *et al.* 1997) hat einen Assay vorgestellt, der LPL an Heparansulfat-Proteoglykane bindet, um die durch Lipoproteinlipase vermittelte Hydrolyse TG-reicher Lipoproteine *in vitro* unter möglichst physiologischen Bedingungen darzustellen. An dieser Idee orientiert sollte im Lipaselabor ein Versuchsaufbau entwickelt werden, der die *in vitro* Lipolyse durch LPL an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden durchführt und gleichzeitig einen Vergleich mit der durch freie LPL vermittelten TG-Hydrolyse des gleichen Probenmaterials ermöglicht.

Das hier beschriebene Procedere bezüglich der Konzentrationen und Volumina beschreibt die in Vorversuchen ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen.

### **2.7.1 Prinzip**

Eine 96-well Zellkultur-Mikrotiterplatte wurde mit kommerziellen Heparansulfat-Proteoglykanen beschichtet. Freie Bindungsstellen der Platte wurden mit Fettsäure-freiem (FFA-free)-BSA geblockt. Lipoproteinlipase wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an die Proteoglykane gebunden. Zugabe von VLDL-Partikeln löste den Lipolysebeginn aus. Tritonzugabe beendete die LPL-vermittelte TG-Hydrolyse. Parallel wurde in nicht HSPG- beschichteten Wells die TG-Hydrolyse mit freier LPL durchgeführt. Die Konzentration an freien Fettsäuren wurde mit einem enzymatischen Farbttest bestimmt.

### **2.7.2 Lipoproteinlipase (LPL)**

Bovine Lipoproteinlipase wurde von Dr. G. Olivecrona, Umea, Schweden, isoliert und freundlicherweise von PD Dr. Jörg Heeren aus dem Institut für Biochemie II und Molekulare Biologie (Direktorin Prof.Dr.Dr. Beisiegel) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

Es wurde Lipoproteinlipase mit einer Konzentration von 0,5µg/µl eingesetzt, die à 12µl aliquotiert bei -80°C gelagert wurde. Für den HSPG-LPL-Assay wurde LPL mit 0,1 M Tris-(20%)-Glyzerol, pH 8,5 auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

### **2.7.3 Rekombinantes humanes Apo A5**

Rekombinantes humanes Apo A5 wurde mittels eines freundlicherweise von Dr. Ryan, Oakland, USA, zur Verfügung gestellten Plasmids hergestellt. Die Proteinsynthese des rekombinanten Apo A5 sowie die Überführung in PBS und Aliquotierung wurden dankenswerterweise von Dr. Alexander Laatsch und PD. Dr. Jörg Heeren (beide aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II – Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf; Direktorin Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel) übernommen. Das rekombinante Apolipoprotein A5 wurde in Aliquots à 400 µl bei -20°C gelagert.

### **2.7.4 Gewinnung von VLDL-Proben als Lipolysesubstrat**

Das Blut von Mäusen verschiedener Genotypen wurde durch retrobulbäre Punktion wie beschrieben gewonnen und zu Plasma weiterverarbeitet. Um die durch eventuell verschiedenen Hormonstatus verursachten Unterschiede nicht berücksichtigen zu müssen, wurden zur Probengewinnung ausschließlich männliche Mäuse verwendet. Auch wurde für eine gute Vergleichbarkeit darauf geachtet, dass die Untersuchten Gruppen eine ähnliche Altersstruktur aufwiesen. Das Plasma wurde streng nach Genotypen sortiert gepoolt, um individuelle Varianzen auszugleichen. Die Lipoproteinfraktionen wurden durch sequentielle Lipoprotein-Zentrifugation isoliert, wobei primär die VLDL-Fraktion verwendet werden sollte. Die TG-Konzentrationen der VLDL-Isolate wurden für alle Experimente auf 1mM eingestellt (mit 0,1M Tris-(1%)FFA-free BSA, pH 8,5). Für einige Experimente wurden jedoch auch andere in diesem Schritt isolierte Lipoproteinfraktionen verwendet (vgl. Abschnitt 3, Ergebnisse).

### **2.7.5 Vorbereitung einer Mikrotiterplatte für den HSPG-LPL-Assay**

Eine sterile 96-well Mikrotiterplatte für den Zellkulturgebrauch wurde ausführlich und exakt für den geplanten Versuch markiert und beschriftet. Die für den Ansatz mit Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-gebundener Lipoproteinlipase (LPL) vorgesehenen Wells wurden mit 100µl einer HSPG-PBS (1x)-Lösung (0,005µg HSPG/µl PBS(1x), hergestellt mit kommerziellen HSPG von Sigma, Deisenhofen) befüllt und über Nacht für 18 Stunden im 4°C Kühlraum auf dem Schüttler inkubiert. Diese HSPG-Konzentration hat sich in Vorversuchen als besonders geeignet erwiesen. Nach dreimaligem Auswaschen der überschüssigen Proteoglykane mit je 250µl PBS (1x) wurde mit einprozentigem freie Fettsäure-freiem BSA-PBS(1x), 250µl/well, für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator geblockt. Nach der Entfernung der Blocklösung wurde die LPL in der gewünschten Konzentration (verdünnt in Tris-Glyzerol, vgl. 2.7.2) in die vorgesehenen Wells pipettiert (pro Well 100µl) und eine Stunde lang bei 4°C im Kühlraum inkubiert.

### **2.7.6 Durchführung der Lipolyse**

Die Platte wurde erneut gewaschen (dreimal mit je 250µl 0,1M Tris Puffer pH 8,5 pro well). Durch die Zugabe der auf 1mM-TG eingestellten VLDL-Proben begann die TG-Hydrolyse, die für 10 Minuten bei 37°C im Inkubator durchgeführt wurde. Nach 10 Minuten wurde dieser Lipolyseprozess durch die Zugabe von 10µl einer 10 -prozentigen Triton X-100 Lösung unter sofortiger Eiskühlung gestoppt und die Proben der Bestimmung von freien Fettsäuren zugeführt.

### **2.7.7 Bestimmung der freien Fettsäuren (FFA)**

Zur Bestimmung der Konzentration an freien Fettsäuren wurde ein kommerzielles NEFA C-Kit (von WAKO Chemicals, Neuss) auf 96-well Platten adaptiert. Es handelt sich hierbei um einen enzymatischen Farbstest zur quantitativen Bestimmung freier Fettsäuren, dessen Extinktionsmaximum bei 550nm liegt. Die mitgelieferte FFA-Standardlösung wurde auf 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,0625 mmol/l verdünnt und neben einem Leerwert im Dreifachansatz bestimmt. Auch die zu messenden Proben wurden im Dreifachansatz gemessen, wobei zur anschließenden Leerwertkorrektur auch die FFA-Konzentrationen der in die Hydrolyse eingesetzten Ausgangssubstrate bestimmt wurden. Zur Kontrolle sind auch die BSA-haltigen Puffer einer Fettsäurebestimmung mit diesem Verfahren unterzogen worden. Jeweils 10µl Standardlösung oder Probe pro Well wurden unter Eiskühlung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Zunächst wurden 100µl Lösung A in jedes Well gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden zu jeder Probe 200µl Reagenz B pipettiert und die Platte erneut für 10 Minuten in den 37°C warmen Inkubator gestellt. Die Messung fand dann sofort im Mikrotiterplattenlesegerät statt, dessen Software aus den Standards und dem Leerwert aufgrund vorheriger entsprechender Programmierung neben einer Eichkurve auch gleich die Konzentration an freien Fettsäuren in mmol/l berechnete. Abbildung 7 zeigt den Versuchsaufbau in schematischer Darstellung.

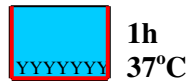
1. **Inkubation mit Heparansulfat-Proteoglykanen:**  
(HSPG als "Y" dargestellt)



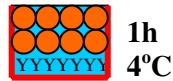
2. **3x Waschen mit PBS**  
(PBS gelb dargestellt)



3. **Abblocken der freien Bindungsstellen mit PBS 1% BSA**  
(BSA rot dargestellt)



4. **Inkubation mit LPL**  
(LPL orange dargestellt)



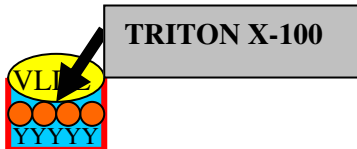
5. **3x Waschen mit Tris-Puffer**  
(Tris-Puffer beige dargestellt)



6. **Lipolysebeginn: Zugabe von VLDL**  
(VLDL als gelbe Ellipse)



7. **Lipolysestopp durch Triton X-100**



8. **Messung der freien Fettsäuren (FFA) im Mikrotiterplattenlesegerät**

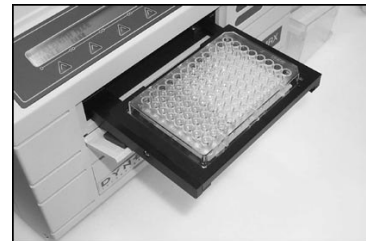


Abb. 7: HSPG-LPL-Assay im Flussdiagramm (vereinfacht)

### **2.7.8 Vergleichsexperiment mit Lipolyse durch freie Lipoproteinlipase (LPL)**

Um die oben beschriebene Hydrolyse TG-reicher Lipoproteine durch HSPG-gebundene LPL mit dem konventionellen Ansatz des freien LPL-Assays vergleichen zu können, wurde das im Folgenden erläuterte Vergleichsexperiment immer parallel zu dem HSPG-LPL-Assay durchgeführt:

Eine sterile Mikrotiterplatte für den Zellkulturgebrauch wurde zunächst exakt für den geplanten Versuch markiert und beschriftet und dann mit einprozentigem freie Fettsäure-freiem BSA-PBS(1x), 250µl/well, für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator geblockt. Anschließend wurde die Platte gewaschen (dreimal mit je 250µl 0,1M Tris Puffer pH 8,5 pro well). Nun wurden die auf 1mM-TG eingestellten VLDL-Proben (die jeweils identisch mit Proben aus dem HSPG-gebundenen Ansatz waren, 100µl/Well) zugegeben. Die TG-Hydrolyse, die für 10 Minuten bei 37°C im Inkubator durchgeführt wurde, begann nach Zugabe von LPL in einer Menge, die, auf das eingesetzte VLDL-Volumen bezogen, die gleiche Konzentration wie im HSPG-gebundenen Ansatz ergab. Nach 10 Minuten wurde auch dieser Lipolyseprozess durch die Zugabe von 10µl einer 10 - prozentigen Triton X-100 Lösung unter sofortiger Eiskühlung gestoppt und die Proben der bereits beschriebenen Bestimmung von freien Fettsäuren zugeführt.

### **2.7.9 Kontrollexperiment mit Heparinasebehandlung**

Um sicherzustellen, dass der HSPG-LPL-Assay in seinem Proteoglykan-gebundenen LPL-Ansatz auch tatsächlich nur die TG-Hydrolyse untersucht, die von dem gebundenen Enzym ausgeht, wurde das folgende Kontrollexperiment durchgeführt:

Heparinase I (EC 4.2.2.7, Synonym: Heparin Lyase) und Heparinase III (EC 4.2.2.8, Synonym: Heparansulfat Eliminase) sind rekombinant aus Flavobakterium heparinum gewonnene Enzyme, und besitzen Heparansulfat als spezifisches Target. Überlegung bei diesem Kontrollexperiment ist es, dass nach einer Heparinasebehandlung, die nach der Inkubation mit HSPG und Lipoproteinlipase stattfindet und einem nachfolgenden Waschschrift bei Zugabe der VLDL-Partikel keine TG-Hydrolyseaktivität zu erwarten ist, wenn die Lipoproteinlipase vorher tatsächlich an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden war.

Sterile Mikrotiterplatten wurden hierzu wie bereits unter 2.7.5 beschrieben mit HSPG und LPL inkubiert und dann für 20 Minuten bei 37°C mit einem Gemisch von je 2,4 U/ml Heparinase I und III in (1x)PBS (davon 100µl/Well) inkubiert. Anschließend wurde die Lipolyse wie unter 2.7.6 beschrieben durchgeführt und freie Fettsäuren analog dazu bestimmt.



## **2.8 Triglyzerid- Hydrolyseversuch mit Lipoproteinlipase (LPL) und Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO) in Zellkultur**

Um die Ergebnisse aus dem Heparansulfat-Proteoglykan gebundenen LPL-Assay auch in einem anderen System validieren zu können, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau für Zellkulturen entwickelt.

### **2.8.1 Verwendete CHO Zell-Linien**

Bei Chinese Hamster Ovary Zellen handelt es sich um epithelähnliche Zelllinien, die 20 Chromosomen besitzen. Die CHO-K1 Zellen (ATCC CCL61) wurden als Subklone der parentalen CHO-Zelllinie gewonnen, die 1957 von T.T. Puck aus einem Ovarbiopsat eines erwachsenen chinesischen Hamsters isoliert wurde (Puck, Cieciura et al. 1958). CHO K1- Zellen sind in Bezug auf die Heparansulfat-Proteoglykan Expression Wildtyp-Zellen. Da ihnen die Möglichkeit der aktiven Prolinbiosynthese fehlt, muss ihnen dieses mit dem Medium zugesetzt werden. Diese Zelllinie wurde für einen Versuchsaufbau mit HSPG-gebundener Lipoproteinlipase herangezogen. Zellen der Linie CHO pgsA-745 (ATCC CRL 2242) sind Heparansulfat-Proteoglykan defizient. Durch einen Defekt in der Xylosyltransferase ist die Synthese von Heparansulfat-Proteoglykanen komplett unterbunden, sie sollten in diesem Versuchsaufbau die nicht HSPG-gebundene LPL repräsentieren.

Beide Zelllinien wurden dem Lipaselabor freundlicherweise von Dr. Jörg Heeren aus dem Institut für Biochemie II und Molekulare Biologie (Direktorin Prof. Dr. Dr. U.Beisiegel) zur Verfügung gestellt.

### **2.8.2 Kultivierung und Vorbereitung der Zellen**

Die CHO-Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen im 37°C Brutschrank (humidified) bei 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Als Medium wurde Ham's F 12 (Gibco, Carlsbad, USA) verwendet, dem 10% Fötale Kälberserum (Gibco, Carlsbad, USA) und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco, Carlsbad, USA) zugesetzt wurden. Bei dichtem Zellrasen wurde zunächst das Medium abgesaugt und einmal mit 5ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung (1%) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in ein Falcon-Tube überführt, in dem schon etwas Medium vorgelegt war. Die Zellen wurden ausgezählt und die gewünschte Zellzahl in einer neuen Flasche oder in einer 24-well Platte ausgesät.

### **2.8.3 Durchführung des Lipolyseexperiments**

Die CHO-Zellen wurden in 24-Well Zellkulturplatten ausgesät. Pro Well wurden 75 000 Zellen in 1ml Ham's F12 Medium (10%FCS, 1%Pen-Strep) eingesetzt. Nach zwei bis drei Tagen Kultivierung und bei einem ausreichend dichten Zellrasen konnte das Experiment durchgeführt werden. Bis zum Beginn der Lipolyse wurden die Arbeitsschritte unter einer sterilen Zellkulturbank durchgeführt, Inkubationsschritte fanden bei 37°C im Brutschrank oder bei 4°C im Kühlraum statt. Tris-haltige Puffer aus dem Versuchsaufbau mit kommerziellen Proteoglykanen (vgl.2.7) wurden durch (1x)PBS ersetzt.

Die VLDL-Einstellung auf 1mM TG wurde dementsprechend mit (1x)PBS-(1%)BSA durchgeführt, die verschiedenen Lipoproteinlipase Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit (1x)PBS erreicht.

Das Medium wurde zunächst abgesaugt, danach wurde vorsichtig zweimal mit 500µl eiskaltem (1x)PBS pro Well gewaschen. Verschiedene LPL-Konzentrationen (Flüssigkeitsvolumen 250µl pro Well) wurden für eine Stunde bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem (1x)PBS wurden die TG-reichen Partikel in einem Volumen von 250µl pro Well einpipettiert, um die Hydrolyse zu starten. Nach 10 minütiger Hydrolyse im Brutschrank bei 37°C wurden 150µl Volumen aus jedem Well in ein mit 15µl 10-prozentigen Triton X-100 befülltes Reaktionsgefäß gefüllt. Der Inhalt dieser Gefäße wurde jetzt zur Bestimmung der freien Fettsäuren herangezogen.

### **2.8.4 Bestimmung der freien Fettsäuren (FFA)**

Zur Bestimmung der Konzentration an freien Fettsäuren wurde das kommerzielle NEFA C-Kit (von WAKO Chemicals, Neuss) auf 96-well Platten adaptiert. Es handelt sich hierbei um einen enzymatischen Farbttest zur quantitativen Bestimmung freier Fettsäuren, dessen Extinktionsmaximum bei 550nm liegt. Die mitgelieferte FFA-Standardlösung wurde auf 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,0625 mmol/l verdünnt und neben einem Leerwert im Dreifachansatz bestimmt. Auch die zu messenden Proben wurden im Dreifachansatz gemessen, wobei zur anschließenden Leerwertkorrektur auch die FFA-Konzentrationen der in die Hydrolyse eingesetzten Ausgangssubstrate bestimmt wurden. Zur Kontrolle sind auch die BSA-haltigen Puffer einer Fettsäurebestimmung diesem Verfahren unterzogen worden. Jeweils 10µl Standardlösung oder Probe pro Well wurden unter Eiskühlung in die Mikrotiterplatte pipettiert. Zunächst wurden 100µl Lösung A in jedes Well gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden zu jeder Probe 200µl Reagenz B pipettiert und die Platte erneut für 10 Minuten in den 37°C warmen Inkubator gestellt. Die Messung fand sofort im Mikrotiterplattenlesegerät statt, dessen Software aus den Standards und dem Leerwert aufgrund vorheriger entsprechender Programmierung neben einer Eichkurve auch gleich die Konzentration an freien Fettsäuren in mmol/l berechnet.

## **2.9 Statistische Auswertung der Messergebnisse**

Soweit nicht anders gekennzeichnet, werden Ergebnisse als Mittelwert $\pm$  SD angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's T-Test oder, wenn mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, mit One-way Analysis Of Variance (ANOVA) getestet. Sämtliche Graphen und Diagramme wurden mit dem Computerprogramm Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) erstellt.

### 3 ERGEBNISSE

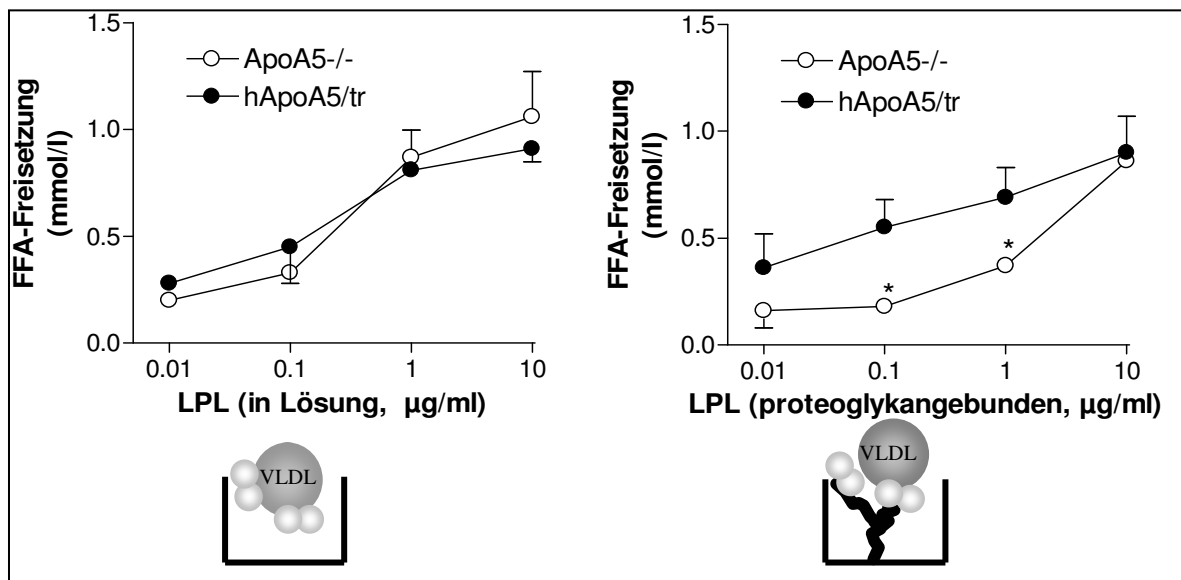
#### 3.1 Hydrolyse von VLDL-Partikeln unterschiedlicher Apo A5-Genotypen durch freie und HSPG-gebundene LPL *in vitro*

##### 3.1.1 Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung

Für die erste Reihe von Experimenten wurden hApo A5/tr und Apo A5<sup>-/-</sup> Tiere verwendet. Blutproben wurden durch Retrobulbärpunktion gewonnen und nach Genotyp sortiert gepoolt. Aus dem Plasma wurde die VLDL-Fraktion durch sequentielle Lipoprotein-Ultrazentrifugation isoliert. Der TG-Gehalt beider Isolate wurde auf 1mM eingestellt und diese wurden wie beschrieben im HSPG-LPL-Assay mit gebundener und gelöster Lipoproteinlipase untersucht. LPL wurde in einem breiten Konzentrationsbereich (drei Zehnerpotenzen: 0,01 bis 10µg/ml) eingesetzt.

##### 3.1.2 Einfluss des Apo A5-Genotyps auf die Triglyzeridhydrolyse *in vitro*

Die untersuchten Lipoproteinisolat enthielten entweder gar kein Apo A5 oder transgenes humanes Apo A5 im Überschuss. Im Falle des Assays mit gelöster LPL konnten für den breiten LPL-Konzentrationsbereich keine signifikanten Unterschiede in der Hydrolyserate festgestellt werden. Im Gegensatz dazu hydrolysierte Lipoproteinlipase, die an Proteoglykane gebunden war, VLDL-Partikel signifikant effizienter in Gegenwart von Apolipoprotein A5 (200% bzw. 86% schneller im Vergleich zur Hydrolyse der Apo A5-defizienten VLDL bei mittleren LPL-Konzentrationen: für LPL 0,1µg/ml: Apo A5<sup>-/-</sup> 0,18±0,02mmol/l FFA; hApo A5/tr 0,55±0,13 mmol/l FFA/ für LPL 1µg/ml: Apo A5<sup>-/-</sup> 0,37±0,01 mmol/l FFA; hApo A5/tr 0,69±0,14 mmol/l FFA). Bei sehr hohen LPL-Konzentrationen verschwand dieser Unterschied (Abb. 8).



**Abb. 8: LPL-Hydrolyse von VLDL verschiedener Mauslinien *in vitro*.**

VLDL wurde durch Ultrazentrifugation isoliert und für 10 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen freier LPL (*links*) und auf Proteoglykanen immobilisierter LPL (*rechts*) inkubiert. Für freie LPL zeigten sich keine Unterschiede in der Lipolyserate. Bei HSPG-gebundener LPL wurde VLDL von hApoA5/tr-Mäusen signifikant schneller hydrolysiert als VLDL von ApoA5<sup>-/-</sup>-Mäusen. Freie Fettsäuren wurden mit einem kommerziellen Kit bestimmt. Daten als Mittelwert ± SD; n=3; \*p<0,05

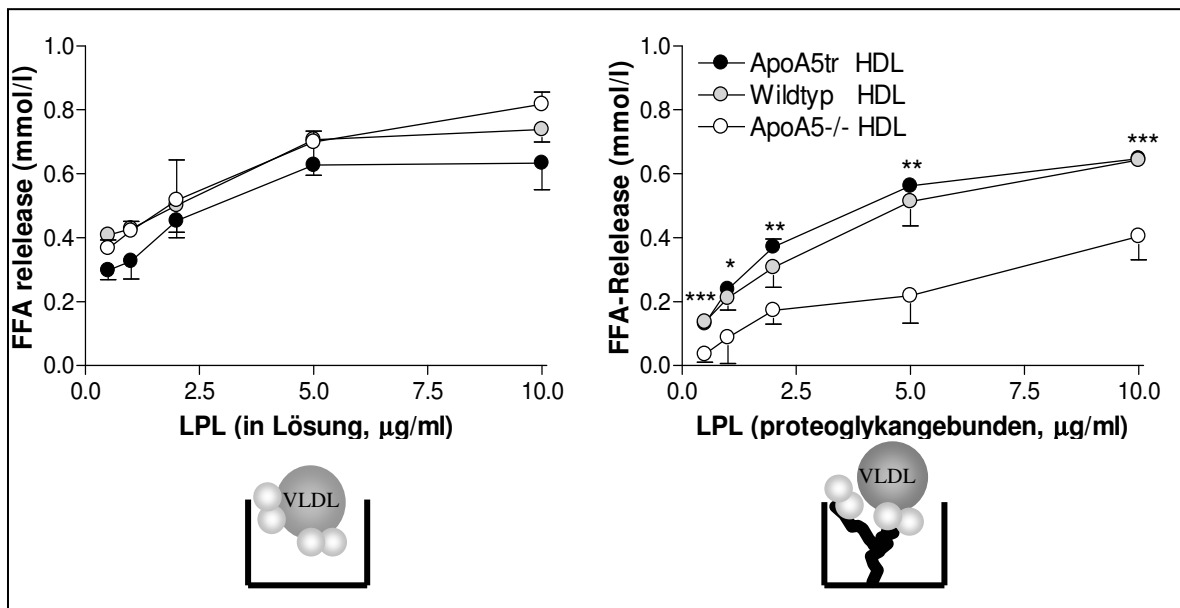
## **3.2 Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL *in vitro* mit Apo A5-Anreicherung aus HDL**

### **3.2.1 Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung**

Im Versuchsaufbau mit Proben der unterschiedlichen Genotypen (vgl.3.1) könnten neben dem unterschiedlichen Gehalt an Apo A5 auch andere nicht kontrollierbare Parameter, beispielsweise variable Konzentrationen anderer Proteine, die Hydrolyserate beeinflussen. Es sollte deshalb in der folgenden Testreihe versucht werden, Apo A5 nachträglich zu einer zunächst defizienten Probe hinzuzufügen. Außerdem sollte der vorgeschlagene Mechanismus einer Übertragung von Apo A5 von HDL auf TG-reiche Lipoproteinpartikel in der postprandialen Phase näher untersucht werden (Fruchart-Najib et al. 2004). Es wurden Blutproben von Wildtyp-Tieren sowie von Apo A5 transgenen und defizienten Tieren gewonnen und nach Genotyp sortiert gepoolt. Anschließend wurden VLDL und HDL wie beschrieben isoliert. Die VLDL-Fraktion der Apo A5-defizienten Tiere wurde für eine Stunde bei 37°C mit den HDL-Fraktionen der drei Apo A5-Genotypen inkubiert. Der TG-Gehalt der drei entstehenden Substrate wurde auf 1mM eingestellt. Die Hydrolyserate wurde im HSPG-LPL-Assay ermittelt, am Ende des Versuchs stand die Bestimmung der entstandenen freien Fettsäuren.

### **3.2.2 Einfluss der Apo A5-Anreicherung durch HDL auf die Triglyzeridhydrolyse *in vitro***

Untersucht wurden Lipoproteingemische, die entweder Apo A5-defizient waren oder, durch HDL zugeführt, eine geringere Menge murines oder eine größere Menge transgenes humanes Apo A5 enthalten sollten. Die Hydrolyserate der verschiedenen Substrate im gelösten LPL-Assay war erneut gleich. Im HSPG-gebundenen Lipolyseassay wurden VLDL-Partikel, die mit humanem Apo A5 aus hApo A5/tr-HDL versetzt wurden mit bis zu 1,5-fach höherer Geschwindigkeit umgesetzt als die Partikel, die mit Apo A5-defizienter HDL versetzt worden waren (für LPL 5µg/ml: Apo A5-defiziente VLDL 0,219±0,087 mmol/l FFA; hApo A5/tr-HDL enthaltende VLDL 0,562±0,022 mmol/l FFA). Mit Wildtyp-HDL inkubierte VLDL-Partikel wurden mit einer mittleren Geschwindigkeit umgesetzt (Abb. 9).



**Abb. 9: LPL-Hydrolyse von Apo A5-defizienter VLDL nach HDL-Inkubation *in vitro*.**

VLDL von Apo A5  $-/-$  wurde durch Ultrazentrifugation isoliert und für 30 Minuten bei 37°C mit HDL von hApo A5tr, Apo A5  $+/+$  und Apo A5  $-/-$  inkubiert. Die Substrate wurden für 10 Minuten durch verschiedene Konzentrationen freier LPL (*links*) und auf Proteoglykanen immobilisierter LPL (*rechts*) hydrolysiert. Für freie LPL zeigten sich keine Unterschiede in der Lipolyserate. Bei HSPG-gebundener LPL wurde VLDL mit hApoA5tr-HDL signifikant schneller hydrolysiert als VLDL mit ApoA5-/- HDL. Freie Fettsäuren wurden mit einem kommerziellen Kit bestimmt. Daten als Mittelwert  $\pm$  SD;  $n=3$ . \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  (ANOVA)

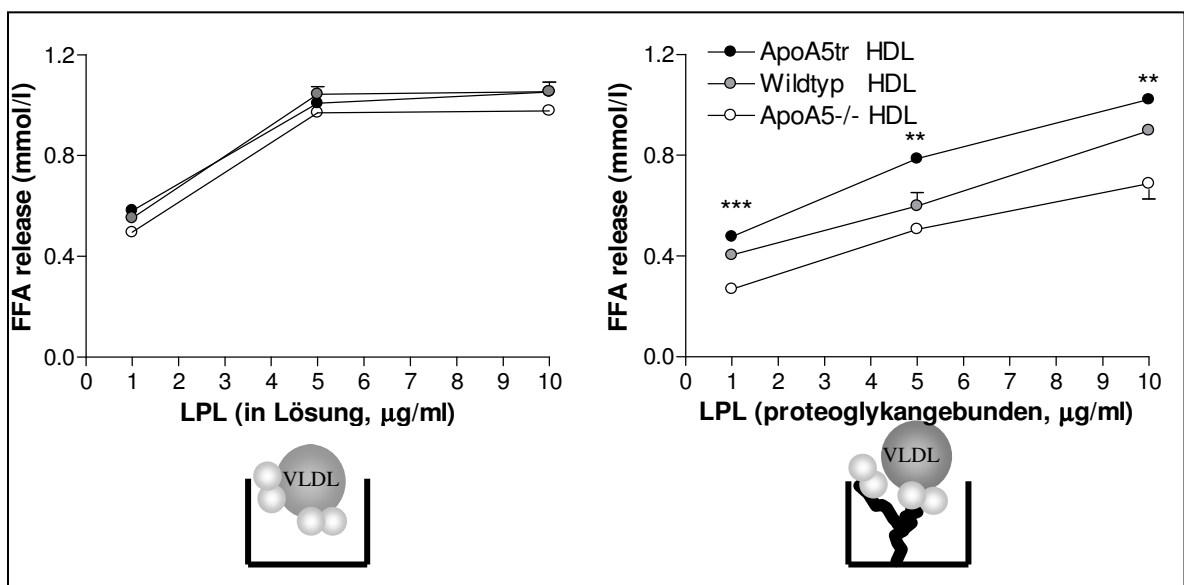
### 3.3 Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL *in vitro* mit Apo A5-Anreicherung aus HDL und Re-Isolation der VLDL-Fraktion

#### 3.3.1 Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung

Um die bereits gewonnene Ergebnisse auf der einen Seite durch Wiederholung zu sichern und um auf der anderen Seite ein stärkeres Augenmerk auf den Übertritt von Apolipoprotein A5 von der HDL-Fraktion auf VLDL-Partikel zu richten, wurde in der folgenden Versuchsreihe die VLDL-Fraktion nach der Inkubation von Apo A5-Knockout-VLDL mit HDL der drei Genotypen durch eine zweite Ultrazentrifugation re-isoliert. Sollte Apo A5 von HDL auf VLDL-Partikel übertreten können, müsste Apo A5 nach der HDL-Inkubation und Re-Isolation auf den VLDL-Partikeln nachweisbar sein und die TG-Hydrolyse auf ähnlich starke Weise beeinflussen wie im vorherigen Versuch (vgl. 3.2). Die Hydrolyse wurde im HSPG-LPL-Assay untersucht, nachdem die TG-Konzentration der drei Substrate wieder auf 1mM eingestellt worden war. Anschließend wurden die freien Fettsäuren gemessen. Das Substrat, das durch Inkubation mit der HDL-Fraktion der transgenen hApo A5/tr-Maus hergestellt worden war, wurde zusätzlich im Westernblot mit dem Kaninchen-Antikörper gegen humanes Apo A5 getestet.

### 3.3.2 Einfluss der Apo A5-Anreicherung durch HDL auf die Triglyzeridhydrolyse *in vitro* nach Re-Isolation von VLDL

Die Ergebnisse dieses Experiments waren mit den vorher gewonnenen Ergebnissen vergleichbar. Die Hydrolyse durch gelöste Lipoproteinlipase zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Partikeln. Der Assay mit HSPG-gebundener LPL jedoch zeigte eine beschleunigte Hydrolyse der VLDL-Partikel, die aus dem mit transgener HDL angereicherten Gemisch re-isoliert wurden (für LPL 5µg/ml: Apo A5-defiziente VLDL 0,506±0,031 mmol/l FFA; hApo A5/tr-HDL enthaltende VLDL 0,786±0,038 mmol/l FFA; Steigerung um 55%). Auch in diesem Versuchsaufbau nahm die Umsatzgeschwindigkeit der mit Wildtyp-HDL inkubierten Probe eine Mittelstellung ein (Abb. 10).

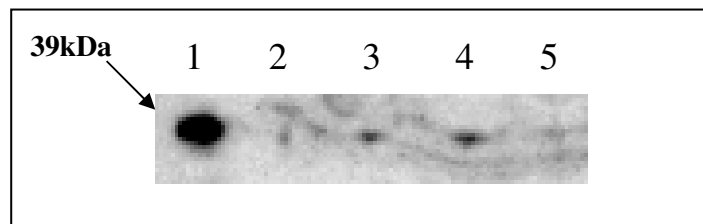


**Abb. 10: *In vitro* LPL-Hydrolyse von Apo A5-defizienter VLDL nach HDL-Inkubation und VLDL Re-Isolierung.**

VLDL von Apo A5 -/- wurde durch Ultrazentrifugation isoliert und für 30 Minuten bei 37°C mit HDL von hApo A5tr, Apo A5 +/- und Apo A5 -/- inkubiert. VLDL wurde dann durch Ultrazentrifugation re-isoliert. Die Substrate wurden für 10 Minuten durch verschiedene Konzentrationen freier LPL (*links*) und auf Proteoglykanen immobilisierter LPL (*rechts*) hydrolysiert. Für freie LPL zeigten sich keine Unterschiede in der Lipolyserate. Bei HSPG-gebundener LPL wurde VLDL mit hApoA5tr-HDL signifikant schneller hydrolysiert als VLDL mit ApoA5-/- HDL. Der auch bei Re-Isolation erhalten gebliebene Apo A5-Effekt belegt, dass Apo A5 von HDL auf VLDL transferiert wurde. Freie Fettsäuren wurden mit einem kommerziellen Kit bestimmt. Daten als Mittelwert ± SD; n=3. \*\*p< 0,01; \*\*\*p<0,001

### 3.3.3 Nachweis von Apo A5 im Substrat durch Westernblotting

Um zu überprüfen, ob in dem re-isolierten Substrat aus Knockout-VLDL und transgener HDL wirklich humanes Apo A5 enthalten war, wurde ein Westernblot durchgeführt. Es zeigen sich schwache, für humanes Apo A5 positive Banden in diesen Proben bei 39kDa. Die als Negativkontrolle mitgeführten VLDL-Proben einer Apo A5-defizienten Maus zeigten diese Bande nicht. Es konnte also gezeigt werden, dass Apolipoprotein bei der Inkubation tatsächlich von der HDL-Fraktion auf die VLDL-Partikel übergetreten und auch nach erneuter Ultrazentrifugation auf diesen Partikeln nachweisbar war (Abb. 11).



**Abb. 11: hApo A5-Nachweis aus re-isolierten VLDL-Partikeln im Westernblot.**

Apo A5 ist nach der Ultrazentrifugation auf ursprünglich Apo A5-defizienten VLDL-Partikeln nachweisbar, die mit hApo A5/tr-HDL inkubiert worden waren.

*Lane 1: HDL-Fraktion hApoA5/tr, 30µg Protein (Positivkontrolle); Lane 2: KO-VLDL+ApoA5/tr-HDL, 10µg Protein; Lane 3: KO-VLDL+ApoA5/tr-HDL, 20µg Protein; Lane 4: KO-VLDL+ApoA5/tr-HDL, 30µg Protein; Lane 5: KO-VLDL+Apo A5-/-HDL, 30µg Protein (Negativkontrolle)*

## 3.4 Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL *in vitro* mit rekombinantem Apo A5

### 3.4.1 Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung

Die bisher beobachteten Veränderungen könnten möglicherweise auch aus einem Transfer von anderen Apolipoproteinen als nur Apo A5 von der HDL-Fraktion auf VLDL-Partikel resultieren. Um eine bessere Aussage über eine ausschließlich Apo A5-spezifische Beeinflussung der Lipolysegeschwindigkeit machen zu können, wurde für die nächsten Versuche rekombinantes Apolipoprotein A5 verwendet. Das rekombinante Protein machte es möglich, bei den verwendeten Substraten gezielt nur den Apo A5-Gehalt als Parameter zu variieren und damit den schlecht kontrollierbaren Einfluss anderer Faktoren zu minimieren. VLDL von Apo A5-defizienten Mäusen wurde wie beschrieben isoliert. Diese Lipoproteinfraktion wurde für 30 Minuten bei 37°C mit verschiedenen Mengen des rekombinanten Apo A5 oder PBS inkubiert. Der TG-Gehalt war schon vorher auf 1mM eingestellt worden. Die Substrate wurden in den HSPG-LPL-Assay eingesetzt, direkt im Anschluss wurden die freien Fettsäuren bestimmt.



### **3.4.2 Einfluss von rekombinantem Apo A5 auf die Triglyzeridhydrolyse *in vitro***

Auch in diesem Versuchsaufbau hatte der Apo A5-Gehalt keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der durch freie Lipoproteinlipase vermittelten Hydrolyse. Rekombinantes Apo A5 führte jedoch zu einem dosisabhängigen Anstieg der Hydrolyserate, wenn LPL an Proteoglykane gebunden war. Diese Steigerung betrug im mittleren LPL-Bereich bis zu 79% für VLDL mit einer Apo A5-Konzentration von 10µg/ml verglichen mit Apo A5-defizienter VLDL (für LPL 5µg/ml: Apo A5-defiziente VLDL 0,321±0,021 mmol/l FFA; 10µg/ml rekombinantes Apo A5 enthaltende VLDL 0,575±0,056 mmol/l FFA; p<0,01 (ANOVA); vgl. Abb. 12).

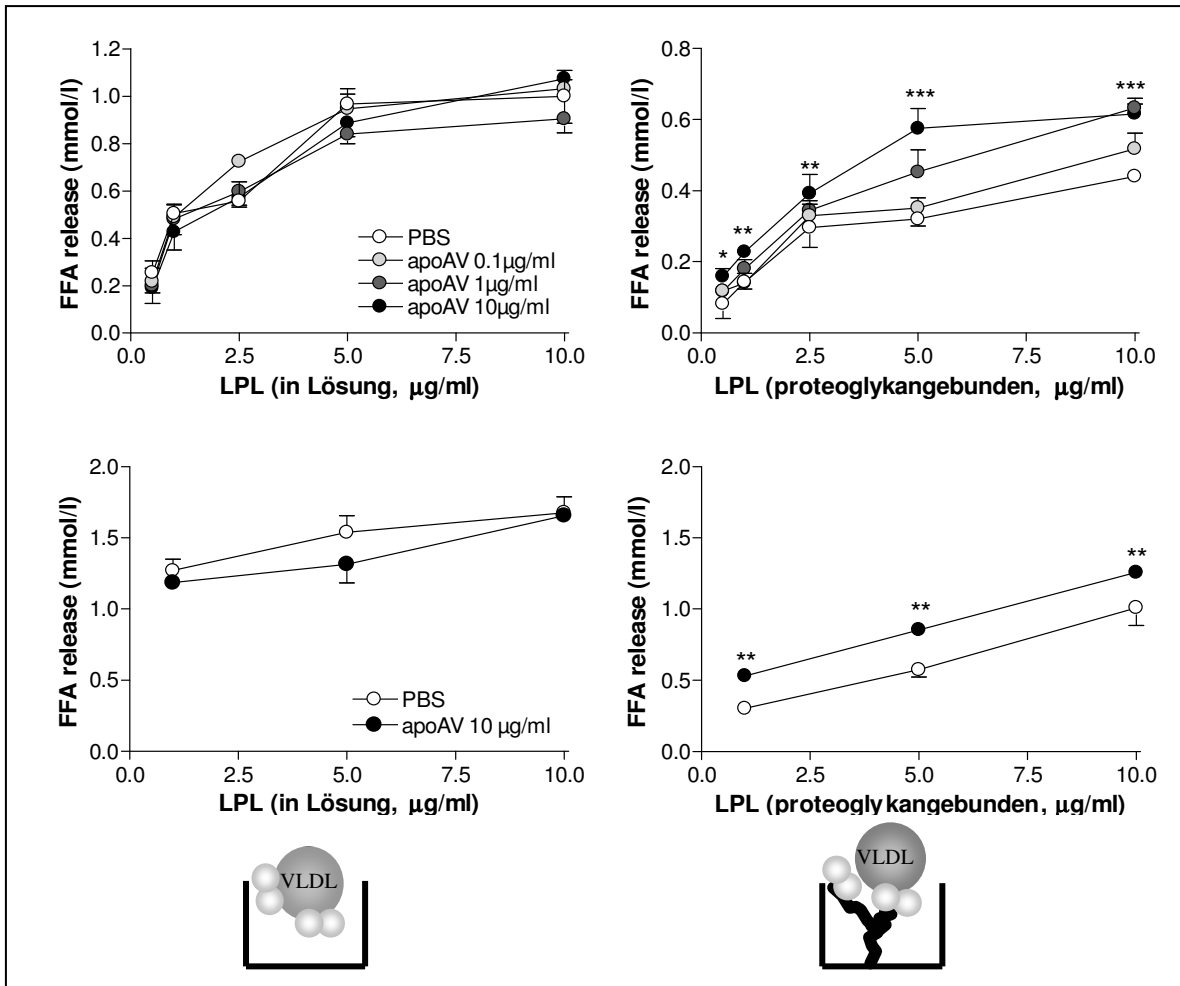
### **3.5 Hydrolyse von VLDL-Partikeln Apo A5-defizienter Mäuse durch freie und HSPG-gebundene LPL *in vitro* mit rekombinantem Apo A5 und Re-Isolation der VLDL-Fraktion**

#### **3.5.1 Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung**

Um analog zu den mit HDL durchgeführten Versuchen auch für rekombinantes Apo A5 zu prüfen, ob es fest an die VLDL-Fraktion assoziiert wird, wurde auch hier ein Versuchsaufbau gestaltet, bei dem nach der Inkubation mit PBS oder Apo A5 (10µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C die VLDL-Fraktion erneut durch sequentielle Lipoprotein-Zentrifugation nach Havel isoliert wurde. Der TG-Gehalt wurde auf 1mM eingestellt und die Substrate im HSPG-LPL-Lipolyseassay untersucht. Anschließend wurden die entstandenen freien Fettsäuren bestimmt.

#### **3.5.2 Einfluss von rekombinantem Apo A5 auf die Triglyzeridhydrolyse *in vitro* nach Re-Isolation von VLDL**

Auch in diesem Versuchsaufbau fand sich ein signifikanter Anstieg der Lipolyserate nur im Falle der an Proteoglykane gebundenen LPL. Für eine LPL-Konzentration von 5µg/ml betrug dieser Anstieg über 48% (für Apo A5-defiziente VLDL 0,575±0,052 mmol/l FFA; für 10µg/ml rekombinantes Apo A5 enthaltende VLDL 0,854±0,047 mmol/l FFA; p<0,01 (Student'scher T-Test); vgl. Abb. 12). Die trotz erneuter Ultrazentrifugation erhalten gebliebene Hydrolysesteigerung macht eine Bindung des rekombinanten Apolipoprotein A5 an VLDL-Partikel sehr wahrscheinlich.



**Abb. 12: *In vitro* LPL-Hydrolyse Apo A5-defizienter VLDL mit und ohne Substitution durch rekombinantes Apolipoprotein A5.**

ApoA5<sup>-/-</sup> VLDL wurde durch Ultrazentrifugation isoliert und mit rekombinantem Apo A5 oder PBS inkubiert. Die VLDL-Partikel wurden dann ohne (*oben*) oder nach Re-Isolation (*unten*) für 10 Minuten mit verschiedenen Mengen freier (*links*) oder HSPG-gebundener LPL (*rechts*) inkubiert. Bei Hydrolyse durch freie LPL zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Bei proteoglykangebundener LPL wurde die Hydrolyserate durch steigende Apo A5-Konzentrationen signifikant erhöht. Diese Unterschiede waren auch zu finden, wenn VLDL re-isoliert wurde, was zeigt, dass Apo A5 an VLDL bindet. Die Freisetzung freier Fettsäuren wurde mit einem kommerziellen Kit gemessen. Daten als Mittelwert  $\pm$  SD; n=3, \* p<0.05; \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001 (One-way ANOVA (*oben*) oder Student's T-Test (*unten*)).

### 3.6 Untersuchung der Kinetik der Hydrolyse von Apo A5-defizienten VLDL-Partikeln durch HSPG-gebundene LPL *in vitro* mit und ohne Substitution von rekombinantem Apo A5

#### 3.6.1 Untersuchtes Probenmaterial und Versuchsaufbau

VLDL wurde aus Blutproben von Apo A5-defizienten Mäusen durch Ultrazentrifugation isoliert. Die isolierten Partikel wurden für 30 Minuten bei 37°C mit rekombinantem Apolipoprotein A5 oder PBS inkubiert. Um eine Aussage über die Beeinflussung der LPL-Enzymkinetik durch Apo A5 machen zu können, wurde die TG-Konzentration der eingesetzten VLDL-Partikel bei

konstanter LPL-Konzentration zwischen 0,5 und 9 mM variiert und die entstehenden freien Fettsäuren nach 10 minütiger Hydrolyse bei 37°C bestimmt.

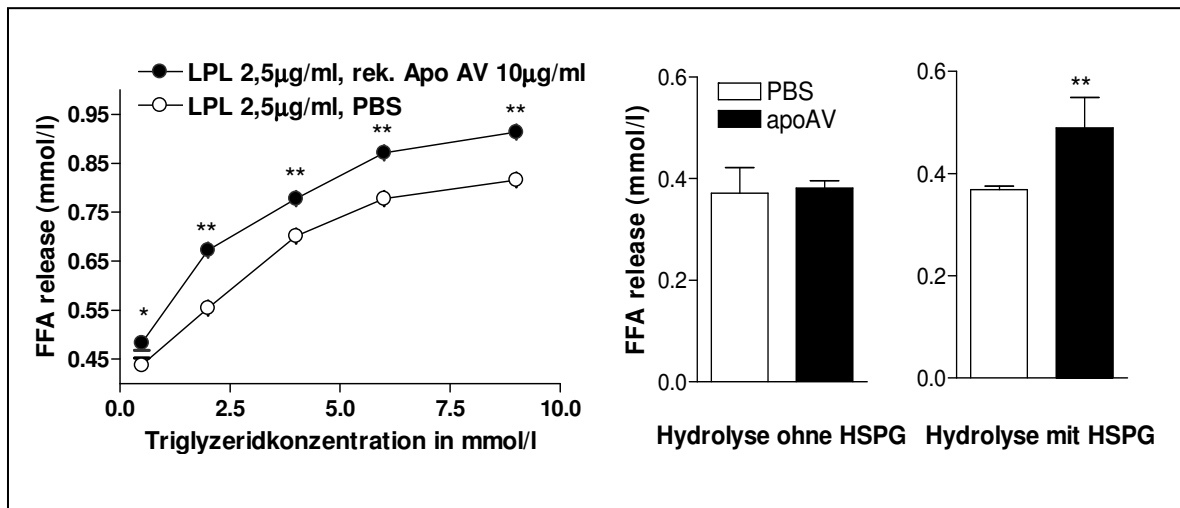
In allen bisherigen Experimenten wurde LPL and die Proteoglykane gebunden, bevor die Hydrolyse begonnen wurde. Um zu untersuchen, ob diese vorherige LPL-HSPG-Bindung für den Apo A5-Effekt obligatorisch ist, wurden VLDL und LPL mit und ohne rekombinantes Apo A5 bei 4°C vorinkubiert. Nach Reisolation von VLDL durch Ultrazentrifugation wurde die Hydrolyse dieses Substrates für 10 Minuten bei 37°C in Mikrotiterplatten durchgeführt, die entweder HSPG-beschichtet waren oder unbehandelt.

### **3.6.2 Effekt von Apo A5 auf die Kinetik der Triglyzeridhydrolyse**

Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung der TG-Hydrolyse zeigten erneut, dass Apo A5 die Lipolyserate von proteoglykangebundener LPL erhöhen kann.

Die Untersuchung der Hydrolyserate bei variablen TG-Konzentrationen zeigte eine höhere Produktionsrate freier Fettsäuren für die Apo A5-haltigen Substrate. Dieser Effekt war bei niedrigen Konzentrationen gering ausgeprägt (für 0,5mM etwa 10% Steigerung; vgl. Abb. 13). Bei 2,0 mM TG-Konzentration im Substrat war der Hydrolyseunterschied schon auf über 21% angestiegen (0,554±0,013mmol/l FFA (PBS) versus 0,673±0,010mmol FFA (10µg/ml Apo A5); Abb. 13). Eine weitere Erhöhung des TG-Gehaltes der untersuchten Proben führte nicht zu einem größeren relativen Hydrolyseunterschied des Apo A5 enthaltenden Ansatzes im Vergleich zum Apo A5-defizienten Substrat, wobei der Hydrolyseunterschied in absoluten Zahlen ungefähr erhalten blieb. Bei sehr hohen TG-Konzentrationen setzte eine Plateaubildung ein, die für die beginnende Sättigung des hydrolysierenden Enzyms spricht (vgl. Abb. 13, linke Spalte).

In den Experimenten, für die LPL vor Hydrolysebeginn an die VLDL Partikel gebunden wurde, konnte gezeigt werden, dass die vorherige Bindung von LPL und Heparansulfat-Proteoglykanen keine obligatorische Voraussetzung für den Apo A5-Effekt ist. Auch hier konnte Apo A5 die Hydrolyserate steigern, allerdings nur, wenn HSPG im System vorhanden war (Hydrolyse mit HSPG; LPL 5µg/ml: PBS: 0,360±0,008mmol/l FFA; Apo A5: 0,490±0,059mmol/l FFA; Steigerung 32%; vgl. Abb. 13, rechte Spalte).



**Abb. 13: Charakterisierung der durch Apo A5 beschleunigten Hydrolyse:** VLDL von Apo A5  $-/-$  Tieren wurde isoliert und mit PBS oder 10  $\mu\text{g/ml}$  rek. Apo A5 für 30 min. bei 37°C inkubiert. Die Hydrolyserate durch HSPG-gebundene LPL (5 $\mu\text{g/ml}$ ) wurde bei verschiedenen TG-Konzentrationen bestimmt. Apo A5 konnte die maximale Hydrolyserate durch HSPG-gebundene LPL signifikant erhöhen (*links*). Um zu prüfen, ob Apo A5 auch VLDL-gebundene LPL aktiviert, wurde Apo A5 $-/-$  VLDL mit LPL (5 $\mu\text{g/ml}$ ) und rek. Apo A5 (10 $\mu\text{g/ml}$ ) oder PBS für 30 min. bei 4°C inkubiert. Nach VLDL-Reisolation durch Ultrazentrifugation wurde das Substrat für 10 min. in Wells mit oder ohne HSPG bei 37°C inkubiert und die freigewordenen Fettsäuren wurden bestimmt (*rechts*). Daten als Mittelwert  $\pm$  SD; n=3. T-Test: Apo A5 vs. PBS; \*p<0,05; \*\*p<0,01

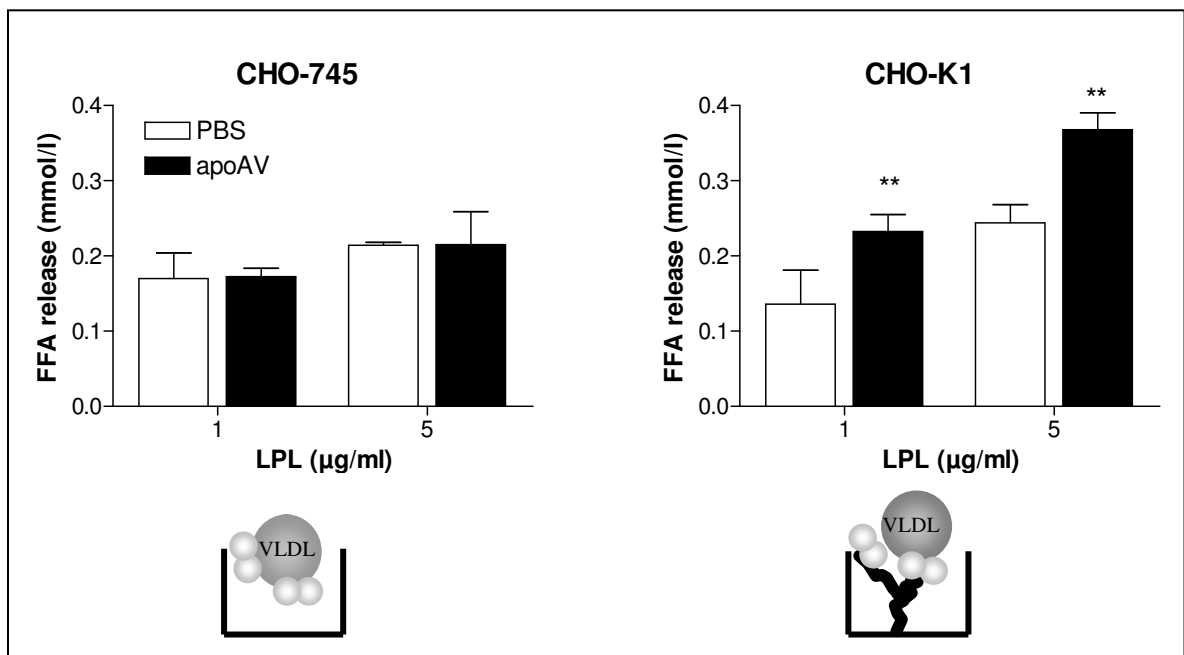
### 3.7 LPL-vermittelte VLDL-Hydrolyse mit rekombinantem Apo A5 in einem Zellkultursystem

#### 3.7.1 Untersuchtes Probenmaterial und Substratvorbereitung

Um einen Eindruck von der Relevanz der Proteoglykanbindung von LPL für die durch Apolipoprotein A5 gesteigerten Hydrolyse TG-reicher Lipoproteine zu erhalten, sollten die bislang gefundenen Ergebnisse in einem den physiologischen Verhältnissen noch ähnlicherem System überprüft werden. Es wurden proteoglykandefiziente Chinese-Hamster-Ovary Zellen (CHO-745) und proteoglykanexprimierende CHO K1-Wildtypzellen ausgesät, die im Verlauf des Lipolyseexperiments mit LPL inkubiert wurden. Die Zellen traten im Versuchsablauf an die Stelle der kommerziellen Heparansulfat-Proteoglykane. Als Substrat wurde VLDL von Apo A5 $-/-$  Mäusen isoliert und für 30 Minuten bei 37°C mit PBS oder mit rekombinantem Apo A5 (5 $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Den CHO-Zellen wurde für eine Stunde bei 4°C LPL in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Danach wurde mit PBS gewaschen und die Substrate zum Hydrolysebeginn zugegeben. Nach Beendigung der Lipolyse wurden die freien Fettsäuren bestimmt.

### 3.7.2 Effekt von rekombinantem Apo A5 bei der Triglyzeridhydrolyse auf CHO-Zellen

Wie schon in den Versuchen auf kommerziellen Heparansulfat-Proteoglykanen konnte auch im Zellkulturversuch gezeigt werden, dass Apolipoprotein A5 die VLDL-Hydrolyse durch Lipoproteinlipase in Anwesenheit von Proteoglykanen beschleunigen kann. Dies ist der Fall, wenn die Zellen, wie der Wildtyp K1, normale Proteoglykane exprimieren (CHO K1: 1µg/ml LPL: Steigerung um 71%;  $p < 0,05$ ; 5µg/ml LPL: Steigerung um 50%;  $p < 0,01$ ). Ein Defekt der Xylosyltransferase in den Zellen der Linie 745 verhindert die Synthese von Heparansulfat-Proteoglykanen. Auf diesem Hintergrund vermag es das rekombinante Apolipoprotein nicht, die Hydrolyserate signifikant zu steigern (Abb. 14).



**Abb. 14: LPL-Hydrolyse von Apo A5 -/- VLDL durch an CHO-Zellen gebundene LPL mit und ohne Substitution von rekombinantem Apo A5.**

VLDL von Apo A5 -/- Mäusen wurde durch Ultrazentrifugation isoliert und für 1 Stunde bei 37°C mit rekombinantem Apo A5 oder PBS inkubiert. Die Lipolyse wurde für 10 Minuten auf normalen CHO K1 oder proteoglykandefizienten CHO 745-Zellen durchgeführt. Auf proteoglykandefizienten CHO 745-Zellen war die Hydrolysegeschwindigkeit gleich. Auf CHO K1-Wildtypzellen wurde die Geschwindigkeit durch Apo A5-Zugabe erhöht. Daten als Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=2$ . T-Test: Apo A5 vs. PBS \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Zusammenfassend zeigen diese Experimente konsistent, dass Apolipoprotein A5 die durch Lipoproteinlipase vermittelte TG-Hydrolyse zu steigern vermag, allerdings nur wenn das Enzym an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden ist. Hydrolyse durch freie, nicht HSPG-gebundene LPL zeigt diese Unterschiede nicht. Diese Ergebnisse konnten in unterschiedlichen Systemen gewonnen werden, wobei dabei zusätzlich verschiedene potentielle Möglichkeiten der Apolipoprotein A5-Anreicherung berücksichtigt wurden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Apo A5 in der Lage ist, von der Fraktion der High Density Lipoproteine auf VLDL-Partikel überzutreten.

## 4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Apolipoprotein A5 und die seiner Wirkung zugrunde liegenden Mechanismen näher zu untersuchen. In vorherigen Forschungsprojekten wurden Mauslinien etabliert, die entweder Apo A5-defizient waren oder ein humanes ApoA5-Transgen exprimierten. Bei Tieren mit homozygoter Apo A5-Defizienz waren die Plasma-TG-Spiegel auf über 400% angestiegen, die hemizygot transgenen Mäuse besaßen nur ein Drittel der Wildtyp-Plasma-TG (Pennacchio, Olivier et al. 2001). In metabolischen *in vivo* Studien mit diesen Tieren konnten mehrere Arbeitsgruppen unabhängig von einander zeigen, dass intestinale TG-Absorption und VLDL-Produktionsraten zwischen diesen Mauslinien nicht signifikant verschieden waren (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005). Es kam jedoch trotzdem zu einer starken Erniedrigung der postprandialen TG-Antwort bei den transgenen Mäusen und zwar durch einen beschleunigten VLDL- und Chylomikronen-Katabolismus (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Schaap, Rensen et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005). Da es sich in diesen Studien jedoch um Tiere verschiedener Genotypen mit potentiell unterschiedlichen Lipoproteinzusammensetzungen handelte, war dies noch kein Beweis einer direkten Wirkung von Apolipoprotein A5. Diese Feststellung gewinnt zusätzlich an Bedeutung durch Untersuchungen, die tatsächlich Unterschiede des Apo C3-Plasmaspiegels zwischen den beiden Mausmodellen belegten (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Um diese Unsicherheiten zu beseitigen, wurden Apo A5-defiziente VLDL-Partikel *in vitro* mit rekombinantem Apo A5 angereichert und Apo A5-defizienten Mäusen injiziert. Unter diesen Bedingungen konnte Apolipoprotein A5 den Turnover von VLDL-TG signifikant steigern. Durch Wiederholung dieses Experiments unter Verwendung des LPL-Inhibitors THL stellte sich heraus, dass der Effekt von Apo A5 auf den Plasma-TG-Spiegel von Lipoproteinlipase abhängig war. Zum gleichen Ergebnis führten *in vivo* Experimente mit LPL-defizienten Mäusen, die das humane Apo A5-Transgen eingekreuzt bekommen hatten. Das transgene Apo A5 konnte den TG-Spiegel von Wildtyp-Tieren und heterozygot LPL-defizienten Mäusen senken, die Tiere mit einem homozygot-defizienten Hintergrund jedoch nicht vor dem neonatalen Tod retten (Merkel, Loeffler et al. 2005). LPL spielt die Hauptrolle im Katabolismus der TG-reichen Lipoproteine. Um die Frage nach einer Beeinflussung der Plasma-Lipoproteinlipase durch Apolipoprotein A5 zu beantworten, wurde die LPL-Aktivität in Pre- und Post-Heparin-Plasma der verschiedenen Apo A5-Genotypen bestimmt. Es konnten hier keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden, was darauf hinweist, dass Apo A5 die LPL-Aktivität in Post-Heparin-Plasma möglicherweise nicht beeinflusst. Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits postuliert, dass die Plasmalipolyse durch andere Faktoren als die Post-Heparin-Aktivität der Lipoproteinlipase limitiert wird (Olivecrona and Olivecrona 1995; Goldberg 1996). Einige Autoren vermuten, auf Studien mit inaktiver LPL gestützt, dass nicht die Verfügbarkeit von freier LPL, sondern die Lipoprotein-HSPG-Bindung den limitierenden Schritt der TG-Hydrolyse darstellt

(Merkel, Heeren et al. 2002). Zusätzlich spiegelt das Post-Heparin-Plasma nicht die physiologische Situation wieder, in der die Lipoproteinlipase an Heparansulfat-Proteoglykane der extrazellulären Matrix gebunden vorliegt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Apolipoprotein A5 auf den durch Lipoproteinlipase vermittelten Katabolismus der TG-reichen Lipoproteine unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen und neue Erkenntnisse über seinen Wirkungsmechanismus zu gewinnen. Zu diesem Zweck wurde die TG-Hydrolyse durch proteoglykangebundene LPL in einem *in vitro* Lipolyseassay untersucht.

Grundlage des HSPG-LPL-Assays war ein früher beschriebener Versuchsaufbau (de Man, de Beer et al. 1997). Mikrotiterplatten wurden mit Heparansulfat-Proteoglykanen beschichtet, in weiteren Schritten wurde LPL in verschiedenen Konzentrationen an die Proteoglykane gebunden. VLDL-Partikel wurden von diesem System in freie Fettsäuren umgesetzt, deren Produktion pro Zeiteinheit gemessen und als Äquivalent der Lipolyserate verwendet wurde. Zahlreiche Vorversuche mit humanen VLDL-Proben ermöglichten, die Zuverlässigkeit des Versuchsaufbaus zu sichern. Als Kontrollversuch wurde die mit HSPG und LPL versehene Platte mit Heparinase behandelt, wobei ein Verlust der Hydrolyseaktivität dieses Ansatzes belegen konnte, dass tatsächlich die durch proteoglykangebundene LPL vermittelte Hydrolyse gemessen wurde. Dieses Hydrolysesystem ahmt die natürliche Situation der TG-Hydrolyse am Gefäßendothel nach und erlaubte so, den Einfluss von Apo A5 auf die Lipoproteinlipase unter weitestgehend physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Um möglichst viele Aspekte der Lipolyse zu erfassen, wurde mit allen Proben auch stets ein konventioneller LPL-Assay mit dem gelöstem Enzym durchgeführt.

Zunächst wurde die Hydrolyse mit VLDL-Proben homozygot Apo A5-defizienter und hemizygot transgener Mäuse bei verschiedenen LPL-Konzentrationen untersucht. Bei mittleren Konzentrationen war die Hydrolyserate im proteoglykangebundenen LPL-Ansatz zweifach beschleunigt. Im konventionellen LPL-Assay waren die Hydrolyseraten nicht signifikant verschieden. Dieser Effekt darf jedoch nicht direkt dem Apolipoprotein A5 zugeordnet werden, da es sich um Plasmaproben zweier verschiedener Genotypen handelte und unter Umständen auch andere Parameter als der Apo A5-Gehalt variierten. Besonders das als potenter LPL-Inhibitor bekannte Apolipoprotein C3 aus dem selben Gencluster darf an dieser Stelle nicht übersehen werden, fanden doch schon die Erstbeschreiber der beiden untersuchten Mauslinien Apo C3-Spiegel, die bei Knockout-Mäusen um 90% erhöht und bei den transgenen Tieren um bis zu 40% reduziert waren (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Da die transgenen Apo A5-Mäuse jedoch nur die Hälfte der Plasma-TG von Apo C3-Knockout-Mäusen aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht allein durch Apolipoprotein C3 erklärt werden und eine ausschließliche Wirkung von Apo A5 über Apo C3-Modulation erschien unwahrscheinlich. Gleichzeitig wurden bei den transgenen Tieren

auch erniedrigte Apolipoprotein B-Spiegel gefunden, so dass diskutiert wird, ob die Apo B- und Apo C3-Reduktion nicht nur Ausdruck einer gesteigerten VLDL-Clearance ist. Auch Apo A5 und Apo C3 doppeltransgene Mäuse wiesen einen niedrigeren Apo C3-Plasmaspiegel auf als ausschließlich Apo C3-transgene Tiere, wobei gezeigt werden konnte, dass die Expression auf mRNA-Ebene identisch war (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004).

Um die Vergleichbarkeit der eingesetzten Substrate zu erhöhen und um die durch nicht-kontrollierbare Faktoren beeinflussten Unterschiede zu reduzieren, wurde in den folgenden Experimenten versucht, Apo A5-defiziente VLDL-Partikel über HDL-Partikel mit Apolipoprotein A5 anzureichern. Es wurden hierzu die VLDL-Frakturen von Apo A5 defizienten, transgenen und Wildtyp-Tieren verwendet. Grundlage dieses Versuchsaufbaus war die Feststellung, dass Apo A5 am stärksten auf HDL-Partikeln nachweisbar ist (van der Vliet, Sammels et al. 2001). In dieser Versuchsreihe kam es zu einer maximal 150-prozentigen Hydrolysesteigerung bei den Proben, die transgene HDL enthielten (im Vergleich zu Apo A5-defizienter HDL), wobei der Unterschied wiederum nur im proteoglykangebundenen Assay signifikant nachweisbar war. Zu einem ähnlichen, wenn auch weniger ausgeprägten Effekt kam es, wenn VLDL nach der Inkubation mit den unterschiedlichen HDL-Proben durch Ultrazentrifugation re-isoliert wurde. Ein von diesen Substraten durchgeführter Westernblot konnte zeigen, dass humanes Apolipoprotein A5 auf den ursprünglich defizienten VLDL-Partikeln nachgewiesen werden konnte, wenn die Probe vor der Ultrazentrifugation mit transgener HDL inkubiert worden war. Diese Untersuchung weist auf eine mögliche Donor-Funktion der High Density Lipoproteine für Apo A5 hin und stützt die Hypothese des postprandialen Apo A5-Shifts von HDL auf VLDL, den Fruchart-Najib *et al.* drei Stunden nach oraler Fettbelastung nachweisen konnten. Funktionell könnte dieser Shift die postprandiale Lipolyse und Clearance von VLDL und Chylomikronen aus dem Plasma durch verstärkte Interaktion mit LPL verbessern (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004).

Um nun einen ausschließlich Apo A5-spezifischen Effekt auf die Lipoproteinlipase zu untersuchen, stand für die weiteren Experimente das rekombinante Protein zur Verfügung. Anreicherung defizienter VLDL-Proben mit rekombinantem Apolipoprotein A5 in physiologischen Konzentrationen führte zu Ergebnissen, die mit den Vorversuchen vergleichbar waren. Dosisabhängig vermochte es das rekombinante Apo A5, die Hydrolyserate um bis zu 79% zu steigern, wobei die Lipoproteinlipase dafür proteoglykangebunden sein musste. Ein ähnlicher, wenn auch geringerer Effekt (maximal 48% Lipolysesteigerung) konnte erzielt werden, wenn die VLDL-Proben nach der Inkubation re-isoliert wurden, was die Assoziation von rekombinantem Apo A5 und VLDL sehr wahrscheinlich macht. Hydrolyseunterschiede aufgrund von Abweichungen der sonstigen Apolipoproteinkomposition dürfen an dieser Stelle ausgeschlossen



werden, da die untersuchten Partikel ausschließlich in ihrem Apolipoprotein A5-Gehalt variierten und ansonsten identisch waren. Betont werden soll noch einmal, dass keines der Experimente einen Einfluss von Apo A5 auf die durch freie LPL vermittelte TG-Hydrolyse nachweisen konnte. Fruchart-Najib *et al.* berichten jedoch von einer 60-prozentigen Lipolysesteigerung durch freie LPL bei sehr hohen Mengen des rekombinanten Apo A5 (600µg/ml, ungefähr 1000-fache Plasmakonzentration). Es handelte sich dabei allerdings um humane VLDL-Proben, die vorher nicht Apo A5-defizient waren (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004). Schaap *et al.* schreiben von einem Einfluss von Apo A5 auf die LPL-Hydrolyse TG-reicher apolipoproteinfreier Emulsionen (Schaap, Rensen et al. 2004). Es wäre möglich, dass es bei sehr hohen Konzentrationen von Apo A5 zu unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen kommt, die unter Umständen die Hydrolyse beschleunigen oder LPL stabilisieren, denn beide Arbeitsgruppen beobachteten eine Langzeit-Hydrolyse mit einer Dauer von bis zu 120 Minuten. Die hier vorgestellten Experimente imitieren möglichst physiologische Bedingungen mit physiologischen murinen Substraten und lebensnahen Konzentrationen der beteiligten Enzyme und Proteine.

Um die gewonnenen Ergebnisse noch einmal in einem separaten, wenn auch ähnlichen System zu überprüfen, wurden Hydrolyseversuche auf Chinese-Hamster-Ovary Zellen durchgeführt, wobei Wildtypzellen mit proteoglykandefizienten Zellen verglichen wurden. Zellen wurden ausgesät und LPL an ihre Oberfläche gebunden. Dann wurde die Lipolyse mit Apo A5-defizienter VLDL mit oder ohne Zugabe von rekombinantem Apolipoprotein A5 durchgeführt. Eine Apo A5-abhängige TG-Hydrolysesteigerung um maximal 71% konnte nur auf den proteoglykan-produzierenden Wildtypzellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte so gezeigt werden, dass der hydrolysesteigernde Effekt von Apo A5 nicht auf Proteoglykane spezifischen Ursprungs begrenzt ist.

Die dargestellten Experimente zeigen, dass Apolipoprotein A5 in der Lage ist, den durch Lipoproteinlipase vermittelten Plasma-TG-Katabolismus zu beschleunigen. Das Fehlen dieses Effektes bei der Hydrolyse durch das freie Enzym legt eine Interaktion von Apolipoprotein A5, Lipoproteinlipase und Proteoglykanen der extrazellulären Matrix nahe. Bereits 1995 konnten Olivecrona *et al.* zeigen, dass LPL mit hoher Affinität an Heparinanteile von Heparansulfat-Proteoglykanen bindet, was unter anderem die geringe Nachweisbarkeit des Enzyms im Pre-Heparin-Plasma verständlicher macht. Verschiedene Autoren vermuten, dass andere Faktoren als die Post-Heparin LPL-Aktivität die Plasmalipolyse begrenzen, limitierender Schritt könnte die HSPG-Lipoprotein-Bindung sein (Olivecrona and Olivecrona 1995; Goldberg 1996; Merkel, Heeren et al. 2002). Lutz *et al.* konnten 2001 durch Studien mit Proteoglykan-bindungsdefizienter LPL *in vivo* zeigen, dass die Bindung das Enzym stabilisiert, in spezifischen Kapillarbetten

lokalisiert und Lipide aus Lipoproteinen in die Gewebe leitet. Heparinbindung ist für die biologische Aktivität einer Vielzahl von Proteinen notwendig, darunter befinden sich Enzyme, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Koagulationsproteine (Lutz, Merkel et al. 2001). Es erscheint daher nicht unwahrscheinlich, dass auch ein Protein wie Apo A5 die Heparin-Bindung der Lipoproteinlipase beeinflussen oder diese Bindung Grundvoraussetzung seines Wirkungsmechanismus sein könnte.

Verschiedene Modelle wären für den Einfluss von Apo A5 auf proteoglykangebundene LPL denkbar. Durch VLDL-Modifikation oder Beeinflussung der HSPG-Konformation könnte die Substratverfügbarkeit für proteoglykangebundene LPL erhöht werden. Es ist möglich, dass Apo A5 die Anlagerung von TG-reichen Lipoproteinen an proteoglykangebundene LPL effizienter macht, indem Apo A5-haltige Partikel innerhalb der Proteoglykan-Schicht an die Orte der Hydrolyse gebracht werden. Gestützt würde diese Hypothese durch *in vivo* Experimente mit Apo A5-defizienten Mäusen, die gleichzeitig ein humanes LPL-Transgen besaßen. Hohe LPL-Konzentrationen konnten die Apo A5-Defizienz vollständig ausgleichen und Plasma-TG-Spiegel normalisieren (Merkel, Loeffler et al. 2005). Das wäre in diesem Modell zu erwarten, weil die Kapillarproteoglykane komplett mit LPL gesättigt wären und auch ohne Apo A5 die Zufallsbegegnung von Lipoproteinpartikel und gebundener LPL schon eine maximale Hydrolyserate ermöglichen würde. Erklärt wäre damit auch, warum der Apo A5-Effekt in den *in vitro* -Experimenten bei geringen und mittleren LPL-Konzentrationen am stärksten war.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Beeinflussung der LPL-Kinetik im Sinne einer  $V_{\max}$ -Erhöhung durch Apolipoprotein A5, beispielsweise mittels Konformationsveränderungen oder allosterischer Aktivierung. Voraussetzung wäre hierbei, dass die HSPG-Bindung der Lipoproteinlipase das Enzym in seiner Konformation oder Tertiär- und Quartärstruktur so verändert, dass Apo A5 erst dann an die entsprechende Stelle binden kann oder sein hydrolysesteigernder Einfluss auf LPL erst hierdurch funktionell zur Geltung kommt. Apo A5 könnte proteoglykangebundene LPL direkt aktivieren oder stabilisieren, beispielsweise durch Stärkung ihrer dimeren Konformation, Stabilisierung des LPL/HSPG-Komplexes oder auch durch Bindung an eine LPL-Aktivierungsstelle, die an freier LPL nicht verfügbar ist. Apo A5 könnte aber auch die VLDL-Konformation so verändern, dass die Partikel besser hydrolysierbar sind. Kinetische Studien (vgl. Abb.13) unterstützen dieses Modell, da Apo A5 seinen Effekt auf die TG-Hydrolyse auf einer HSPG-Matrix auch vermitteln konnte, wenn LPL und Apo A5 vor Hydrolysebeginn an VLDL-Partikel assoziiert wurden. LPL könnte hier allerdings auch in der initialen Hydrolysephase von den VLDL-Partikeln auf die Proteoglykane übertreten, wie es *in vivo* schon in der Gegenrichtung gezeigt werden konnte (Heeren, Niemeier et al. 2002). Ligandenblots und Biacore-Untersuchungen

(Malmqvist 1999; Lookene, Beckstead et al. 2005; Nilsson, Lookene et al. 2007), die eine direkte Interaktion von Apo A5 und LPL zeigen konnten, machen die hier vorgestellten Varianten plausibel (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005). Auch die von Fruchart-Najib *et al.* negierte direkte Bindung von Apo A5 an HSPG wäre für keines der Modelle eine unbedingte Voraussetzung.

Zusammengefasst demonstrieren die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse konsistent, dass Apolipoprotein A5 die Plasmahydrolyse TG-reicher Lipoproteine durch die Beeinflussung ihrer Interaktion mit HSPG-gebundener Lipoproteinlipase beschleunigen kann. Dieser Effekt konnte *in vitro* nicht für freie LPL nachgewiesen werden.

Trotz seiner sehr geringen Plasmakonzentrationen wird Apolipoprotein A5 als wichtiger und derzeit wohl potentester Plasma-TG-Modulator angesehen (Baroukh, Bauge et al. 2004). Schon die erstbeschreibenden Autoren vermuteten in Apo A5 einen prognostischen Indikator für die Hypertriglyzeridämie-Empfänglichkeit von Patienten (Pennacchio, Olivier et al. 2001). Seine medikamentöse Beeinflussung durch PPAR  $\alpha$ -Aktivatoren (z.B. Fibrate) hat längst therapeutische Relevanz, wobei die dem Wirkprinzip zugrunde liegende Rolle von Apo A5 erst seit kurzem bekannt ist (Prieur, Coste et al. 2003; Vu-Dac, Gervois et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte der Mechanismus, über den Apolipoprotein A5 den Plasma-TG-Spiegel LPL-vermittelt reguliert, weiter aufgeklärt werden. Die Ergebnisse liefern neue Aspekte zur Pathogenese von Fettstoffwechselerkrankungen und Arteriosklerose. Sie könnten Grundlage neuer Strategien in der medikamentösen Therapie von Fettstoffwechselstörungen und der Prophylaxe von Folgeerkrankungen werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Apolipoprotein A5 ist ein neues Mitglied des Apo AI/CIII/AIV/AV-Clusters auf Chromosom 11. Seine Plasmakonzentration korreliert im murinen Tiermodell negativ mit den Triglyzerid-(TG)-Spiegeln. Einige genetische Polymorphismen (SNP's) des Apolipoprotein A5-Gens konnten mit Fettstoffwechselstörungen wie der Familiären Kombinierten Hyperlipoproteinämie (FCHL) (Ribalta, Figuera et al. 2002) und in speziellen Konstellationen auch mit dem Auftreten von Myokardinfarkten beim Menschen assoziiert werden (Hubacek, Skodova et al. 2004). Im Mausmodell mit transgenen und homolog defizienten Tieren konnte gezeigt werden, dass Apo A5 die Plasmaclearance von Chylomikronen und VLDL beschleunigt, ohne dabei die intestinale Chylomikronen- oder die hepatische VLDL-Produktion zu beeinflussen (Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005). Die Lipoproteinlipase (LPL) ist der Hauptmediator der Plasmahydrolyse TG-reicher Lipoproteine.

Um die physiologische Situation, in der LPL an Proteoglykane gebunden ist, zu berücksichtigen, wurde nun die Funktion von Apo A5 *in vitro* bei der LPL-vermittelten Hydrolyse von TG in TG-reichen Lipoproteinen in An- und Abwesenheit von Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) untersucht. Apo A5 stammte dabei entweder aus VLDL-Partikeln, aus der HDL-Fraktion von transgenen Mäusen (hApoA5/Tr) oder aus einer rekombinanten Quelle. In der Abwesenheit von Proteoglykanen vermochte es Apo A5 nicht, die Hydrolyserate zu verändern. Die durch proteoglykangebundene LPL vermittelte TG-Hydrolyse konnte durch Apo A5 jedoch dosisabhängig um bis zu 200% gesteigert werden, wobei zahlreiche Varianten des Versuchsaufbaus mit unterschiedlichen Substratzusammensetzungen und Enzymkonzentrationen einen ähnlichen Effekt zeigten. Die Ergebnisse konnten anschließend in einem Zellkulturversuch unter Verwendung einer proteoglykandefizienten Zelllinie bestätigt werden. Westernblot-Untersuchungen konnten zeigen, dass Apolipoprotein A5 von der HDL-Fraktion auf VLDL-Partikel übertragen werden kann, was auf dem Hintergrund einer Apo A5-vermittelten Lipolysesteigerung Bestandteil von Regulationsmechanismen postprandialer TG-Spiegel sein könnte.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Apolipoprotein A5 die TG-Hydrolyse durch LPL beschleunigen kann, wenn diese proteoglykangebunden ist, nicht jedoch wenn das Enzym frei vorliegt. Sowohl eine proteoglykanabhängige Veränderung der Enzymkinetik durch Apo A5 als auch eine verstärkte Kontaktaufnahme der Lipoproteinpartikel mit proteoglykangebundener LPL als Ort der Lipolyse sind dabei denkbar. Dieser Mechanismus ist für das Verständnis von Fettstoffwechselstörungen und die Prophylaxe und Therapie der Arteriosklerose beim Menschen von potentieller Bedeutung.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aberle, J., D. Evans, et al. (2005). "A polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with weight loss after short-term diet." Clin Genet **68**(2): 152-4.
- Austin, M. A., P. J. Talmud, et al. (2004). "Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans." Biochim Biophys Acta **1688**(1): 1-9.
- Baroukh, N., E. Bauge, et al. (2004). "Analysis of apolipoprotein A5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(7): 1297-302.
- Beisiegel, U. (1995). "Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism." Current Opinion In Lipidology **6**(3): 117-22.
- Brunzell, J. D. (1995). Familial lipoprotein lipase deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. The metabolic and molecular bases of inherited disease. D. Valle. New York, McGraw-Hill. **II**: 1913-1932.
- Corella, D., C. Q. Lai, et al. (2007). "APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study." J Mol Med **85**(2): 119-28.
- Dallinga-Thie, G. M., A. van Tol, et al. (2006). "Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes." Diabetologia **49**(7): 1505-11.
- de Man, F. H., F. de Beer, et al. (1997). "Lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulfate proteoglycan-bound lipoprotein lipase." J Lipid Res **38**(12): 2465-72.
- Dugi, K. A., H. L. Dichek, et al. (1992). "Human lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates." Journal of Biological Chemistry **267**(35): 25086-91.
- Elosua, R., J. M. Ordovas, et al. (2006). "Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study." J Lipid Res **47**(5): 990-6.
- Faustinella, F., L. C. Smith, et al. (1991). "Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis." Journal of Biological Chemistry **266**(15): 9481-5.
- Fredrickson, D., J.L. Goldstein and M.S. Brown (1978). The familial hyperlipoproteinemias. The Metabolic Basis of Inherited Disease. W. J. Stanbury JB, Fredrickson DS. New York, McGraw-Hill: 604-679.
- Fruchart-Najib, J., E. Bauge, et al. (2004). "Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5." Biochem Biophys Res Commun **319**(2): 397-404.
- Garfinkel, A. S. and M. C. Schotz (1987). "Lipoprotein lipase." Elsevier, New York: 335-357.
- Gautier, T., D. Masson, et al. (2002). "Apolipoprotein CI deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoCI-knocked out mice." J Biol Chem **277**(35): 31354-63.
- Goldberg, I. J. (1996). "Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis." Journal of Lipid Research **37**(4): 693-707.
- Greenwood, M. R. (1985). "The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper." Int J Obes **9 Suppl 1**: 67-70.
- Grundy, S. M., G. J. Balady, et al. (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**(18): 1876-87.
- Havel, R. J., H. A. Eder, et al. (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." Journal of Clinical Investigation **34**: 1345-1353.
- Heeren, J., T. Grewal, et al. (2001). "Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo." J Biol Chem **276**(45): 42333-8.
- Heeren, J., T. Grewal, et al. (2003). "Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization." J Biol Chem **278**(16): 14370-8.

- Heeren, J., A. Niemeier, et al. (2002). "Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo." J Mol Med **80**(9): 576-84.
- Hokanson, J. E. and M. A. Austin (1996). "Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies." J Cardiovasc Risk **3**(2): 213-9.
- Hubacek, J. A., V. Adamkova, et al. (2004). "New variants in the apolipoprotein AV gene in individuals with extreme triglyceride levels." Physiol Res **53**(2): 225-8.
- Hubacek, J. A., Z. Skodova, et al. (2004). "The influence of APOAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction." Clin Genet **65**(2): 126-30.
- Kalopissis, A. D., D. Pastier, et al. (2003). "Apolipoprotein A-II: beyond genetic associations with lipid disorders and insulin resistance." Curr Opin Lipidol **14**(2): 165-72.
- Lai, C. Q., D. K. Arnett, et al. (2007). "Fenofibrate effect on triglyceride and postprandial response of apolipoprotein A5 variants: the GOLDN study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1417-25.
- Lookene, A., J. A. Beckstead, et al. (2005). "Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism." J Biol Chem **280**(27): 25383-7.
- Lutz, E. P., M. Merkel, et al. (2001). "Heparin-binding defective lipoprotein lipase is unstable and causes abnormalities in lipid delivery to tissues." J Clin Invest **107**(9): 1183-92.
- Malmqvist, M. (1999). "BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions." Biochem Soc Trans **27**(2): 335-40.
- Mar, R., P. Pajukanta, et al. (2004). "Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia." Circ Res **94**(7): 993-9.
- Marcais, C., B. Verges, et al. (2005). "Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment." J Clin Invest **115**(10): 2862-9.
- Merkel, M., R. H. Eckel, et al. (2002). "Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation." J Lipid Res, **43**: 1997-2006.
- Merkel, M. and J. Heeren (2005). "Give me A5 for lipoprotein hydrolysis!" J Clin Invest **115**(10): 2694-6.
- Merkel, M., J. Heeren, et al. (2002). "Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake." J Biol Chem **277**(9): 7405-11.
- Merkel, M., Y. Kako, et al. (1998). "Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases VLDL uptake. Direct evidence that LPL bridging occurs in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 13841-13846.
- Merkel, M., B. Loeffler, et al. (2005). "Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase." J Biol Chem **280**(22): 21553-60.
- Nilsson, S. K., A. Lookene, et al. (2007). "Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family." Biochemistry **46**(12): 3896-904.
- O'Brien, P. J., W. E. Alborn, et al. (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**(2): 351-9.
- Obunike, J. C., I. J. Edwards, et al. (1994). "Cellular differences in lipoprotein lipase-mediated uptake of low density lipoproteins." Journal of Biological Chemistry **269**(18): 13129-13135.
- Olivecrona, G., M. Hultin, et al. (1995). Transport of lipoprotein lipase in plasma and lipoprotein metabolism. Atherosclerosis X. A. Sniderman. New York, Elsevier: 250-253.

- Olivecrona, G. and T. Olivecrona (1995). "Triglyceride lipases and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **6**(5): 291-305.
- Pennacchio, L. A., M. Olivier, et al. (2001). "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." Science **294**(5540): 169-73.
- Prieur, X., H. Coste, et al. (2003). "The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element." J Biol Chem **278**(28): 25468-80.
- Puck, T. T., S. J. Cieciura, et al. (1958). "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects." J Exp Med **108**(6): 945-56.
- Ribalta, J., L. Figuera, et al. (2002). "Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia." Clin Chem **48**(9): 1597-600.
- Rinninger, F., N. Wang, et al. (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**(5): 1325-32.
- Schaap, F. G., M. C. Nierman, et al. (2006). "Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia." J Lipid Res **47**(10): 2333-9.
- Schaap, F. G., P. C. Rensen, et al. (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**(27): 27941-7.
- Statistisches Bundesamt, W. (2006). "Todesursachenstatistik 2005."
- Tailleux, A., P. Duriez, et al. (2002). "Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis." Atherosclerosis **164**(1): 1-13.
- Talmud, P. J. (2007). "Rare APOA5 mutations-Clinical consequences, metabolic and functional effects An ENID review." Atherosclerosis.
- van der Vliet, H. N., M. G. Sammels, et al. (2001). "Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration." J Biol Chem **276**(48): 44512-20.
- Vu-Dac, N., P. Gervois, et al. (2003). "Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators." J Biol Chem **278**(20): 17982-5.
- Wahrle, S. E., H. Jiang, et al. (2005). "Deletion of Abca1 increases Abeta deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease." J Biol Chem **280**(52): 43236-42.
- Wang, N., D. L. Silver, et al. (2001). "ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein." J Biol Chem **276**(26): 23742-7.
- Zechner, R. (1997). "The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism." Curr Opin Lipidol **8**(2): 77-88.

## DANKSAGUNG

Während der Abfassung einer Dissertation ist die Unterstützung vieler Menschen notwendig, denen ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen möchte.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H. Greten als Direktor der I. Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf zu Beginn der Arbeit und vor allem Herrn Prof. Dr. med. R. Stahl als Direktor der III. Medizinischen Klinik für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit an der von ihm geleiteten Klinik beenden zu können.

Besonders herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Martin Merkel für die Aufgabenstellung, aber vor allem für die ausgezeichnete Betreuung und die Förderung während und auch nach der Durchführung dieser Arbeit. Er war für mich jederzeit ansprechbar, konnte bei jeder Frage und jedem Problem helfen und hatte die entscheidenden weiterführenden Ideen.

Dem Graduiertenkolleg 336 unter der Leitung von Prof. Dr. H.-J. Seitz danke ich recht herzlich für die Förderung als Stipendiat, die zahlreichen Möglichkeiten zur wissenschaftlichen Weiterbildung und die anregenden Kontakte zu Doktoranden anderer Fachrichtungen, Institute und Arbeitsgruppen.

Für die ausführliche und geduldige wissenschaftliche Unterstützung, vor allem während der Optimierung des HSPG-Assays, danke ich Herrn PD Dr. Jörg Heeren. Herrn Dr. Alexander Laatsch danke ich für all seine Bemühungen rund um das rekombinante Apolipoprotein A5. Beide arbeiten am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II – Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktorin Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel).

Für die zuverlässige technische Unterstützung und souveräne Einarbeitung danke ich Frau Britta Löffler, Frau Sandra Ehret und Frau Joanna Schmidt.

Herrn Birol Aydin, Frau Nathalie Fabig, Frau Gesa Geppert und Herrn Dr. med. Daniel Kayser danke ich für die harmonische Zusammenarbeit und die gute Ergänzung im Laboralltag.

Für ihre engagierte Unterstützung während meines Studiums und der Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich meinen Eltern.

Ganz besonders danke ich meiner Partnerin Svenja, die einfach immer für mich da ist.



## **LEBENS LAUF**

**ANSCHRIFT:** Malte Andreas Kluger  
Tierparkallee 11  
22527 Hamburg

### **PERSÖNLICHE DATEN:**

Geburtstag: 04. August 1979  
Geburtsort: Niebüll, Kreis Nordfriesland  
Familienstand: ledig

### **SCHULISCHE AUSBILDUNG:**

1986-1990 Grundschole Risum-Lindholm  
1990-1999 Friedrich-Paulsen-Schole Niebüll  
1999 Abitur (Note 1,3): Leistungskurse Englisch und Chemie,  
Prüfungsfächer Französisch und Geschichte

### **UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG:**

10/2000 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg  
08/2002 Physikum (Note 2): mündliche Prüfung in den Fächern  
Anatomie und Physiologie  
08/2003 Erstes Staatsexamen (Note 2)  
09/2003 Beginn einer experimentellen Doktorarbeit bei PD Dr. Merkel  
08/2005 Zweites Staatsexamen (Note 1,66): mündliche Prüfung in den  
Fächern Anästhesie und Pädiatrie  
11/2006 Drittes Staatsexamen (Note 1) in den Fächern Innere Medizin,  
Chirurgie, Neurologie und Urologie; Gesamtnote der Ärztlichen  
Prüfung „sehr gut“ (1,49)

**STIPENDIUM:** GRK 336 „molekulare Endokrinologie – molekularer Stoff-  
wechsel“ (Leitung: Prof. Dr. Seitz) von 01. April - 30. Sept. 2004

### **PRAKTISCHES JAHR:**

1. Tertial: In den Abteilungen Unfall-, Gefäß- und Viszeralchirurgie des  
AK Altona, Oktober 2005 bis Februar 2006  
2. Tertial In der Abteilung für Neurologie des AK Harburg, Februar bis  
Juni 2006  
3. Tertial Im Zentrum für Innere Medizin des Universitätskrankenhauses  
Hamburg-Eppendorf, Juni bis September 2006

Seit Februar 2007 Mitarbeiter in der III. Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses  
Hamburg-Eppendorf

## **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.