

1 Summary

The mRNA of apolipoprotein (apo) B can undergo a specific posttranscriptional base change from C to U at nucleotide position 6666 (Powell et al., 1987). This editing creates a premature translational stop codon UAA out of a glutamin codon 2153 and leads to the translation of the carboxyterminal truncated apo B-48. The full-length protein apoB-100 is the major structural protein of very low density lipoproteins (VLDL), which are secreted by the liver. In the circulation, VLDL are metabolized into the atherogenic low density lipoproteins (LDL), elevated concentrations of which are the main cause for atherosclerosis and coronary artery disease (Brown & Goldstein, 1986). The chylomicrons, which are secreted from the small intestine and contain apo B-48 as a consequence of apo B mRNA editing, are rapidly metabolized and do not serve as precursors for LDL formation. In contrast to humans and many other mammalian species, which edit only the intestinal apo B mRNA, some species such as horse, dog, rat and mouse can edit also the hepatic apo B mRNA leading to low plasma LDL levels (Greeve et al., 1993). The catalytic subunit APOBEC-1 (apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1) is the only missing component of the apo B mRNA editing enzyme in human or rabbit liver. Adenovirus-mediated gene transfer of APOBEC-1 into rabbit liver induces hepatic apo B mRNA editing and results in a drastic reduction of LDL levels (Greeve et al., 1996). However, transgene expression of APOBEC-1 in mouse and rabbit liver under the control of the strong apo E promoter can induce hepatocellular carcinoma in both species (Yamanaka et al., 1995). We set out to establish APOBEC-1 transgenic rabbits expressing APOBEC-1 in the liver under the liver-specific promoter of the rat APOBEC-1 gene (Greeve et al., 1998). To investigate how long term low level expression of APOBEC-1 in liver effects liver physiology, LDL levels and susceptibility for atherosclerosis.

We generated three independent APOBEC-1 transgenic founder NZW rabbits in which APOBEC-1 is under control of the liver-specific promoter of the rat APOBEC-1 gene. These rabbits are viable and fertile, in contrast to the previously described APOBEC-1 transgenic animals with very high level expression of APOBEC-1 in the liver mediated by the apo E promoter. Two of the transgenic founders transmit the transgene to the F1 generation and rat APOBEC-1 is expressed in low levels in liver, intestine, kidney, lung, brain and muscle. The low expression of rat APOBEC-1 in liver is not sufficient to induce editing of the hepatic apo B mRNA. The low activity of the transgenic rat APOBEC-1 promoter is due to altered methylation pattern of this promoter. In rat, the proximal promoter of APOBEC-1 is highly methylated, but the core region of the promoter with the transcriptional start site remains unmethylated. In transgenic rabbits, however, specifically this site is also methylated leading to a strong reduction of promoter activity.

2 Zusammenfassung

mRNA Editing, die posttranskriptionale Basenveränderung in mRNA, ist eine besondere Modifikation der Genexpression. Durch Editing der mRNA von Apolipoprotein (Apo) B an Nukleotidposition C6666 von C zu U wird ein vorzeitiges Translationsstopkodon gebildet, so dass nur eine carboxyterminal verkürzte Apo B Form, Apo B-48, translatiert wird (Powell et al., 1987). Das entscheidende Strukturprotein Apo B-100 der *Very Low Density* Lipoproteine (VLDL) wird in der Leber synthetisiert, aus denen im Blut die für die Auslösung der Koronaren Herzkrankheit und Arteriosklerose entscheidenden atherogenen *Low Density* Lipoproteine (LDL) gebildet werden (Brown & Goldstein, 1986). Beim Menschen und vielen anderen Spezies wird die Apo B mRNA nur im Dünndarm editiert, der damit Apo B-48 enthaltende, sehr rasch metabolisierende Chylomikronen bildet, welche nicht in die atherogenen LDL umgewandelt werden. Bei einer Reihe von Tierspezies (Maus, Hund, Ratte und Pferd) mit sehr niedrigen LDL-Spiegeln im Blut wird die Apo B mRNA, nicht wie beim Menschen, nur im Dünndarm, sondern auch in der Leber editiert (Greeve et al., 1993). Die katalytische Untereinheit APOBEC-1 (*apo B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1*) ist die einzige fehlende Komponente des Apo B mRNA Editing Enzyms in der Leber von Spezies wie Mensch und Kaninchen. Somatischer Gentransfer von APOBEC-1 in die Leber von Kaninchen durch rekombinante Adenoviren erzeugt Editing der hepatischen Apo B mRNA und führt zu einer drastischen Senkung der Plasma-LDL-Spiegel (Greeve et al., 1996). In APOBEC-1 transgenen Mäusen und Kaninchen, bei denen die Expression von APOBEC-1 durch den starken Apo E Promotor in der Leber induziert wird, kommt es zur Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen (Yamanaka et al., 1997). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung und molekulare Charakterisierung von APOBEC-1 transgenen Kaninchen mit dem leberspezifischen Promotor des APOBEC-1 Gens der Ratte (Greeve et al., 1998), um die Auswirkungen einer Induktion von Editing der Apo B mRNA in der Leber auf die LDL-Plasmaspiegel und die Entwicklung von Arteriosklerose *in vivo* in Langzeitverläufen zu untersuchen.

Es wurden drei APOBEC-1 NZW-*Founder*-Kaninchen hergestellt, in denen die APOBEC-1 Expression durch den leberspezifischen Promotor des Ratten APOBEC-1 Gens vermittelt wird. Diese Kaninchen sind gesund und fruchtbar, ganz im Gegensatz zu den zuvor hergestellten APOBEC-1 transgenen Kaninchen mit starker Expression unter Kontrolle des Apo E Promotors. Zwei von diesen transgenen *Founder*-Kaninchen vererben das Transgen weiter an die F1-Generation. Die transgenen Kaninchen exprimieren APOBEC-1 in Leber, Dünndarm, Niere, Lunge, Gehirn und Skelettmuskel. Allerdings ist die Expression zu gering, um Editing der Apo B mRNA zu induzieren. Der proximale leberspezifische Promotor ist schon in der Rattenleber teilweise methyliert und nur der *Core*-Bereich um den Transkriptionsstart bleibt unmethyliert. In den transgenen Kaninchen ist dieses spezifische Methylierungsmuster verloren gegangen, was zu einer starken Reduktion der Promotoraktivität führte.