

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik  
(Direktor: Professor Dr. med. R. Stahl)

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

*Untersuchung der Interaktion zwischen  
Apolipoprotein A5 und der Lipoproteinlipase in vivo*

*Dissertation*

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Gesa Geppert aus Hamburg

Hamburg, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 11.03.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

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

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

*meinem Großvater Dr. med. Otto Kunkel gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....	III
VERZEICHNIS DER MAUSLINIEN UND GENOTYPEN.....	III
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung in die Thematik .....	1
1.2 Einteilung und Metabolismus der Lipoproteine.....	2
1.3 Eigenschaften und Funktionen der Lipoproteinlipase.....	4
1.3.1 Eigenschaften der Lipoproteinlipase.....	4
1.3.2 Die katalytische und nichtkatalytische Funktion der Lipoproteinlipase .....	5
1.3.3 Die Rolle der Lipoproteinlipase bei der Entstehung von Familiärer Chylomikronämie, Familiärer Kombiniertes Hyperlipoproteinämie und Arteriosklerose.....	7
1.4 Eigenschaften und Funktionen von Apolipoprotein A5 .....	8
1.4.1 Das Apolipoprotein-Cluster A1/C3/A4/A5 .....	8
1.4.2 Eigenschaften des ApoA5 .....	9
1.4.3 Funktionen des ApoA5 .....	10
1.4.4 Die Rolle von ApoA5 bei der Entstehung von FCHL und Arteriosklerose.....	11
1.5 Ziel der Arbeit .....	12
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>13</b>
2.1 Material und allgemeine Arbeitsmethoden .....	13
2.1.1 Chemikalien .....	13
2.1.2 Standard-Pufferlösungen.....	13
2.1.3 Enzyme und Proteine .....	14
2.1.4 Oligonukleotide .....	14
2.1.5 Verbrauchsmaterial .....	15
2.1.6 Geräte.....	15
2.1.7 Sterilisation .....	15
2.2 Tiere .....	16
2.2.1 Allgemeines .....	16
2.2.2 Genehmigung der Tierversuche.....	16
2.2.3 Mauslinien .....	16
2.2.3.1 LPL1 .....	16
2.2.3.2 hLPLtr.....	17
2.2.3.3 ApoA5ko .....	17
2.2.3.4 ApoA5tr.....	17
2.2.4 Kreuzungsstrategien.....	17
2.2.4.1 hLPL A5ko: Mäuse mit und ohne humane LPL als Transgen vor unterschiedlichem ApoA5-Hintergrund .....	17
2.2.4.2 LPL A5tr: Mäuse mit und ohne Überexpression von ApoA5 vor unterschiedlichem LPL-Hintergrund .....	18

2.3 Genotypisierung der Mäuse .....	19
2.3.1 Prinzip .....	19
2.3.2 Schwanzbiopsie .....	19
2.3.3 Verdau der Schwanzbiopsien .....	20
2.3.4 DNA-Extraktion .....	20
2.3.5 PCR .....	20
2.3.5.1 Mauslinie hLPL A5ko .....	20
2.3.5.2 Mauslinie LPL A5tr .....	21
2.3.6 Gelelektrophorese .....	22
2.4 Lipoproteinprofil .....	22
2.4.1 Prinzip .....	22
2.4.2 Blutentnahme .....	23
2.4.3 Auftrennung der Lipoproteine .....	23
2.4.4 Bestimmung von Cholesterol und Triglyzeriden .....	23
2.5 Abbaustudie mit radioaktiv markierten VLDL-Triglyzeriden .....	24
2.5.1 Prinzip .....	24
2.5.2 Markierung .....	24
2.5.3 Durchführung .....	25
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
3.1 Tiermodell mit Expression humaner LPL bei ApoA5-Defizienz .....	26
3.1.1 PCR .....	26
3.1.2 Kreuzungsergebnisse .....	27
3.1.3 Lipoproteinprofil .....	28
3.2 Tiermodell mit transgener ApoA5-Expression bei LPL-Defizienz .....	29
3.2.1 PCR .....	29
3.2.2 Kreuzungsergebnisse .....	30
3.2.3 Lipoproteinprofil .....	31
3.3 Abbaustudie mit radioaktiv markierten VLDL-Triglyzeriden .....	33
3.3.1 Plasmatische Clearance von <sup>3</sup> H-TG-VLDL .....	33
3.3.2 Organaufnahme von <sup>3</sup> H-TG-VLDL .....	34
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>36</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>40</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>41</b>
<b>7 VERZEICHNIS DER TABELLEN UND ABBILDUNGEN .....</b>	<b>48</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>49</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Apo	Apolipoprotein
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
Chol	Cholesterol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetracetat
FCHL	Familiäre Kombinierte Hyperlipoproteinämie
HDL	high density lipoprotein
HMG-CoA-Reduktase	Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IDL	intermediate density lipoprotein
Kb	Kilobasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Rezeptor related protein
Mck	Muskel-Kreatin-Kinase
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
Rpm	Rounds per minute
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TG	Triglyzeride
THL	Tetrahydrolipstatin
TNF	Tumornekrosefaktor
VLDL	very low density lipoprotein

## Verzeichnis der Mauslinien und Genotypen

LPL2	Wildtyp-Maus bezüglich des LPL-Lokus
LPL1	Maus mit heterozygoter LPL-Defizienz
LPL0	Maus mit homozygoter LPL-Defizienz
hLPL	transgene Expression humaner muskelspezifischer LPL
mLPL	mauseigene LPL
ApoA5wt	Wildtyp-Maus bezüglich des ApoA5-Lokus
ApoA5het	Maus mit heterozygoter ApoA5-Defizienz
ApoA5ko	Maus mit homozygoter ApoA5-Defizienz
ApoA5tr	transgene Expression von humanem ApoA5

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Die Atherosklerose wurde 1957 von der World Health Organization (WHO) als „variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ definiert. Die mit diesen morphologischen Veränderungen einhergehenden funktionalen Auswirkungen sind die Hauptursache für koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit sowie cerebrovaskuläre Erkrankungen. Damit sind Atherosklerose und ihre Folgen die wichtigsten Ursachen von Mortalität und Morbidität in den Industrieländern. In Deutschland wurde 2003 der Tod bei fast jedem zweiten Verstorbenen (46,4%) durch eine Erkrankung des Kreislaufsystems ausgelöst (Bundesamt 2005).

Die Ätiologie und kausale Pathogenese der multifaktoriell bedingten Atherosklerose sind dennoch trotz intensiver Bemühungen noch nicht vollständig verstanden. Unter den bekannten Risikofaktoren stehen neben arteriellem Hypertonus, Diabetes mellitus und Nikotinabusus vor allem Fettstoffwechselstörungen im Mittelpunkt internationaler Forschungen. Diese können sowohl durch exogene Faktoren wie Ernährung, Adipositas, Alkoholkonsum und Medikamenteneinnahme als auch durch endogene Faktoren beeinflusst werden. Zu letzteren zählen auf molekularer Ebene vor allem Veränderungen in Struktur und Funktion von Enzymen, Apolipoproteinen, Rezeptoren und Transferproteinen. Neben der schon seit längerem bekannten Lipoproteinlipase (LPL) ist seit kurzem auch das Apolipoprotein ApoA5 Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Der LPL wird als zentrales Enzym im Metabolismus der Plasmalipide eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung der Triglyzerid (TG)-Spiegel im Plasma zugeschrieben. Durch ihre Funktion als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym bei der initialen Hydrolyse der TG von Chylomikronen und Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) trägt sie wesentlich zur Senkung der Plasma-TG bei und reguliert den Energiefluss zum Gewebe, indem sie den Organen Fettsäuren als Energiequelle zur Verfügung stellt (Greenwood 1985, Weinstock *et al.* 1997b). Das heterozygote Vorkommen von Mutationen der LPL in der Bevölkerung wird mit einer Häufigkeit von bis zu 7% angegeben und ist mit Familiärer Kombiniertes Hyperlipoproteinämie (FCHL) sowie KHK assoziiert; Übersicht in (Merkel *et al.* 2002a).

Das kürzlich entdeckte Apolipoprotein ApoA5 hat sich in tierexperimentellen, klinischen und epidemiologischen Studien ebenfalls als bedeutendes Element in der Beeinflussung der plasmatischen TG-Spiegel herausgestellt. Letztere gelten als wichtiger und unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Hokanson u. Austin 1996). Neben erhöhten TG-Spiegeln konnte auch eine Assoziation von Mutationen im Bereich des ApoA5-Gens mit FCHL nachgewiesen werden (Evans *et al.* 2003, Pennacchio *et al.* 2001, Pennacchio u. Rubin 2003).

Sowohl LPL als auch ApoA5 haben damit als genetische Faktoren in der Beeinflussung des TG-Metabolismus eine mögliche medizinische Bedeutung bei der Korrektur von Hypertriglyzeridämie und der damit assoziierten KHK. Die Auswirkungen von Veränderungen von LPL und ApoA5 wurden unabhängig voneinander bereits beschrieben. Dennoch sind hierdurch keine Aussagen zur Interaktion zwischen beiden, sowohl auf molekularer Ebene als auch unter physiologischen Bedingungen, möglich. Neben parallel laufenden *in vitro*-Studien waren in dieser Arbeit die Mechanismen der Interaktion zwischen ApoA5 und LPL *in vivo* Gegenstand der Untersuchungen.

## 1.2 Einteilung und Metabolismus der Lipoproteine

Für die Verteilung der mit der Nahrung aufgenommenen und zum Teil im Körper selbst synthetisierten Lipide wie TG, Cholesterol (Chol), Cholesterolester (CE) und Phospholipide ist deren Transport im Blutplasma erforderlich. Aufgrund ihrer jedoch überwiegend hydrophoben Eigenschaften ist hierzu vor allem eine Bindung an spezifische Transportproteine (Apolipoproteine) nötig. Die dabei entstehenden Lipoproteinkomplexe variieren stark in ihrer Zusammensetzung und ihrem Lipid-Protein-Verhältnis und können daher entsprechend ihrer Dichte durch Ultrazentrifugation aufgetrennt und klassifiziert werden. Man unterscheidet die besonders lipidreichen Chylomikronen, very low density lipoproteins (VLDL), intermediate density lipoproteins (IDL), low density lipoproteins (LDL) und high density lipoproteins (HDL). (Havel et al. 1955)

Den Apolipoproteinen unterliegen wichtige Funktionen bei der Entstehung, dem Transport und dem Metabolismus der Lipoproteine. Sie zeichnen sich durch einen großen Gehalt an amphiphilen Helices aus, deren hydrophile Seitenketten in Richtung Plasma ausgerichtet sind, wohingegen die hydrophobe Seite dem apolaren Kern der Lipoproteine zugewandt ist. Auf diese Weise können sie die Wasser- und Lipidlöslichkeit der Lipoproteine und ihrer Bestandteile vermitteln.

Neben ihrer Funktion als Strukturelement (z.B. ApoA1 bei HDL, ApoB100 bei VLDL und LDL, ApoB48 bei Chylomikronen) sind die Apolipoproteine auch Aktivatoren verschiedener im Lipidstoffwechsel beteiligter Enzyme. So aktivieren ApoA1, ApoC1 und ApoD die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). ApoC2 ist ein äußerst wichtiger Aktivator der LPL, ApoC3 inhibiert diese. Durch ihre Ligandenfunktion an spezifischen Rezeptoren vermitteln ApoB100 und ApoE ihre Internalisierung und damit ihren weiteren Stoffwechsel. (Löffler u. Petrides 1998)

Einteilung, Zusammensetzung und Funktionen der Lipoproteine sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Lipoprotein	Chylomikronen		VLDL	IDL	LDL	HDL
Apolipoproteine	B48,B100,A1, A4,A5,E,C		B100,E,A1, C,A5	B100,E	B100	A1,A2,A4, A5,C,E
Zusammensetzung in % Trockenmasse	TG	86%	55%	23%	6%	3%
	Chol	3%	12%	29%	42%	13%
Lipid-/ Protein- Verhältnis	99/1		90/10	80/20	78/22	50/50
Haupttransport- funktion	exogene Lipide		endogene Lipide	endogene Lipide	Chol ins Gewebe	Chol zur Leber (revers)

**Tab. 1: Einteilung, Zusammensetzung und Funktionen der Lipoproteine**

Der Stoffwechsel der Lipoproteine kann in einen exogenen und einen endogenen Weg gegliedert werden, wobei jedoch vielfältige Interaktionen zwischen den beteiligten Partikeln auftreten.

Der exogene Weg beschreibt zunächst den Transport von mit der Nahrung aufgenommenen TG und Chol ins extrahepatische Gewebe und schließlich auch in die Leber. Dazu werden die in der Nahrung enthaltenen TG und CE durch die Magen- und vor allem Pankreaslipase gespalten. Die dabei entstehenden Fettsäuren, Monoacylglycerine und freies Cholesterin werden durch einfache Diffusion in die Mucosazelle der duodenalen Schleimhaut aufgenommen. Im glatten endoplasmatischen Retikulum erfolgt nun die Reveresterung der Fettsäuren und CE-Bildung. Nach Assoziation mit ApoB48, ApoA1 und ApoA2 im Golgi-Apparat der Mucosazelle werden die so entstandenen Chylomikronen in Sekretgranula verpackt und per Exozytose in den extrazellulären Raum abgegeben. Von hieraus erfolgt ihr Transport über die Lymphe und den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf. Dort nehmen die Chylomikronen ApoC und ApoE von HDL in ihrer Oberfläche auf. Dabei ist besonders ApoC2 als Aktivator der LPL von Bedeutung. Letztere ist an den Endothelzellen der Kapillaren und an der Plasmamembran extrahepatischer Zellen lokalisiert und stellt nach Spaltung der in den Chylomikronen enthaltenen TG die freigesetzten Fettsäuren dem Gewebe für dessen Stoffwechsel zur Verfügung. Die nach ausreichender Hydrolyse von den Zellen abgelöste LPL gelangt mit den nach weiteren Interaktionen, vor allem mit HDL, übrig gebliebenen Chylomikronenresten (Chylomikronen Remnants), die nun vor allem CE, ApoE und ApoB enthalten, zur Leber. Dort binden die Chylomikronen Remnants zunächst über ApoE und LPL an Proteoglycane auf der Oberfläche der Hepatozyten und werden dann vermittelt über den LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor related protein (LRP) internalisiert. Der Abbau der Chylomikronen Remnants erfolgt in den Lysosomen der Hepatozyten, wobei ApoE und LPL wiederverwertet werden (Heeren et al. 2001).

Der endogene Stoffwechsel der Lipoproteine beginnt mit Synthese von VLDL in der Leber. Sie sind TG-reich und enthalten des weiteren Chol, CE und Phospholipide. Diese Bestandteile werden zum einen endogen synthetisiert, zum anderen stammen sie aus dem Abbau der Chylomikronen Remnants. Nach Assemblierung mit ApoC1-3, ApoB100 und ApoE im Golgi-Apparat erfolgt ihre Sekretion ins Blut. Ähnlich den Chylomikronen entstehen auch hier nach ApoC2-aktivierter plasmatischer TG-Hydrolyse und Interaktionen mit HDL, bei denen freies Chol, Phospholipide und Apolipoproteine (ApoC2, ApoC3 und ApoE) übertragen werden, VLDL Remnants, die von der Leber über den LDL-Rezeptor und das LRP aufgenommen werden. Aus einem Teil von ihnen erfolgt nun mittels LPL und hepatischer Lipase die Konvertierung zu LDL. Letztere enthalten kaum TG, sondern vor allem Chol und ApoB100. Ihre Hauptfunktion ist der Transport von Chol ins extrahepatische Gewebe, wo es von den Zellen zumeist als wichtiger Membranbestandteil benötigt wird. Die Aufnahme erfolgt dort nach Bindung an den LDL-Rezeptor, wobei ApoB100 als Ligand fungiert, per Endozytose. In sekundären Lysosomen entsteht nach der Einwirkung von lysosomaler saurer Lipase freies Chol, welches das Lysosom verlässt und zum endoplasmatischen Retikulum gelangt. Dort reguliert es indirekt über verschiedene Ansatzpunkte den Chol-Spiegel im Plasma. Zum einen aktiviert es die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase, die das Chol durch Reveresterung in seine Speicherform überführt, zum anderen nimmt es Einfluss auf die Expression des LDL-Rezeptors sowie die Transkription der Hydroxymethylglutaryl (HMG)-CoA-Reduktase, deren reduzierte Aktivität die Chol-Biosynthese vermindert. Für den reversen Transport von Chol aus dem extrahepatischen Gewebe zurück zur Leber ist HDL verantwortlich. Seine discoidalen Vorstufen stammen aus Leber, Darm und dem Metabolismus von Chylomikronen und VLDL. Sie sind reich an Phospholipiden, CE und ApoE und ApoA. ApoA1 bindet von der Leber synthetisierte LCAT, mit dessen Hilfe und durch das Cholesterolester-Transferprotein (CETP) steigt der Gehalt an CE weiter. Die HDL-Partikel nehmen dadurch ihre runde Form an und können gleichzeitig Chol, welches sie von anderen Lipoproteinklassen und peripheren Zellen, insbesondere Makrophagen übernehmen in ihrer Oberfläche einlagern. Von der Leber werden nun zum einen ganze HDL rezeptorvermittelt aufgenommen, zum anderen erfolgt eine selektive Aufnahme von CE mit Hilfe des Rezeptor SR-B1.

### **1.3 Eigenschaften und Funktionen der Lipoproteinlipase**

#### **1.3.1 Eigenschaften der Lipoproteinlipase**

Die LPL ist ein zentrales Enzym im Metabolismus der Plasmalipide. Der größte Teil ist an der luminalen Seite der Endothelzellen der Gefäße an Proteoglycane gebunden und stellt über die intravaskulär katalysierte Hydrolyse von TG aus TG-reichen Lipoproteinen wie Chylomikronen und VLDL dem Gewebe Energie in Form von Fettsäuren zur Verfügung. Daneben findet sich auch zirkulierende LPL in geringer Konzentration im Plasma (Peterson *et al.* 1985, Vilella *et al.* 1993). Die genomische Sequenz der humanen LPL ist auf dem Chromosom 8p22 lokalisiert. Das Gen

besteht aus etwa 30 Kilobasen (Kb) und ist in 10 Exons untergliedert, wobei zwischen den bereits untersuchten Spezies wie auch zur hepatischen Lipase und Pankreaslipase starke Homologien bestehen (Kirchgessner *et al.* 1987, Sparkes *et al.* 1987, Wang u. Schotz 2002). Die komplementäre DNA der LPL codiert für 475 Aminosäuren (AS), wobei 27 AS als Signalpeptid wirken (Brunzell u. Deeb 2001). Untersuchungen an Zellkulturen von Adipozyten haben gezeigt, dass die LPL zunächst in Form eines inaktiven Proenzym im endoplasmatischen Retikulum gebildet wird. Nach anschließender Glycosylierung und Aktivierung im Golgi-Apparat erfolgt die Sekretion in den extrazellulären Raum (Garfinkel u. Schotz 1987).

LPL wird vor allem in Muskel- und Fettgewebe exprimiert, denen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Lipoproteine zugeschrieben wird. Des Weiteren konnte aber auch eine Expression in Herz, Nervensystem, Nieren, Nebennieren, Pankreas und Makrophagen nachgewiesen werden. Unter besonderen Umständen scheint auch die Leber LPL zu exprimieren; so findet sich beim Neugeborenen als Zeichen hierfür Messenger Ribonucleinsäure (mRNA) in der Leber; Übersicht in (Brunzell u. Deeb 2001). Mit zunehmender peripherer Bildung geht diese jedoch zurück (Chajek *et al.* 1977) und LPL wird in adulter Leber nicht mehr exprimiert (Semenkovich *et al.* 1989). Durch exogene Faktoren, wie nach Tumorimplantation (Masuno *et al.* 1984) oder Gabe von Tumornekrosefaktor (TNF) (Enerback *et al.* 1988), beziehungsweise Aktivierung von peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) (Fruchart *et al.* 1999) lässt sich jedoch eine erneute Expression in der Leber induzieren.

Nach der Synthese und Sekretion der LPL wird ein Teil von der Zelle reinternalisiert und intrazellulär degradiert (Sprecher *et al.* 1996, Wu *et al.* 1996), der andere Teil löst sich von der Zelloberfläche und bindet sich schließlich über Heparansulfate an kapillären Endothelzellen (Olivecrona *et al.* 1995). Diese Bindung ans Endothel ist durch intravenöse Gabe von Heparin zu lösen (Hahn 1943).

### 1.3.2 Die katalytische und nichtkatalytische Funktion der Lipoproteinlipase

Die Funktionen der LPL waren in den letzten Jahren Gegenstand vieler Untersuchungen. Es lassen sich dabei zunächst zwei Bereiche unterscheiden, die katalytische und die nichtkatalytische Funktion.

Erstere umfasst die plasmatische Hydrolyse von TG. Die LPL erfüllt damit als Gatekeeper, Gatekeeper-Hypothese (Greenwood 1985), für die Aufnahme von Fettsäuren in die Organe eine wichtige Rolle im Katabolismus von Chylomikronen und VLDL sowie in der Energieverteilung. Neben der Senkung der TG-Spiegel führt sie auf bislang nicht genau geklärte Weise zu einer reziproken Erhöhung des Plasmaspiegels von HDL (Goldberg 1996). Für die katalytische Funktion ist ein N-terminal gelegenes aktives Zentrum verantwortlich, welches aus drei AS besteht, Ser<sup>132</sup>, Asp<sup>156</sup> und His<sup>241</sup> (Dugi *et al.* 1992, Faustinella *et al.* 1991). Die katalytische Aktivität ist im weiteren abhängig von der Bildung eines Homodimers und dem Vorhandensein von ApoC2 als Cofaktor; Übersicht in (Brunzell u. Deeb 2001, Havel *et al.* 1973, LaRosa *et al.* 1970).

Inhibitorische Wirkung haben dagegen ApoC1 und ApoC3 (Brown u. Baginsky 1972) sowie ApoE (van Dijk et al. 1999). Neben diesen physiologischen Mechanismen ist auch eine pharmakologische Inaktivierung der LPL durch Tetrahydrolipstatin (THL) möglich (Lookene et al. 1994).

Die Auswirkungen von Veränderungen der katalytischen Aktivität wurden anhand tierexperimenteller Studien untersucht. Bei genereller Überexpression von LPL durch Aktivierung organunspezifischer Promotoren zeigten sich den Funktionen der LPL entsprechend verminderte VLDL-TG und erhöhte HDL-Chol-Spiegel im Plasma (Shimada *et al.* 1993, Zsigmond *et al.* 1994). Auf der anderen Seite entwickelten Mäuse, die keine LPL exprimieren (LPL0) nach der Geburt eine massive Hypertriglyzeridämie und präsentierten eine verminderte Lipidaufnahme ins Gewebe. Die Tiere verstarben innerhalb von 24 Stunden postnatal (Coleman *et al.* 1995, Weinstock *et al.* 1995). Eine Erklärung hierfür gab ein Mausmodell mit alleiniger Expression von LPL in der Leber, was zum Überleben der Tiere führte (Merkel et al. 1998). Diese LPL scheint die Verteilung der TG dahingegen beeinflusst zu haben, dass diese vermehrt zur Leber gelenkt und ihre Fettsäuren dort zur Synthese von VLDL und Ketonkörpern genutzt wurden. Letztere stellen eine alternative Energiequelle zur Glukose in der Peripherie dar und konnten so den Zustand postnatalen Energiemangels bei hochfettthaltiger Diät durch mangelnde Glukoseverfügbarkeit auffangen (Merkel et al. 1998).

Neben der beschriebenen katalytischen Funktion zeigte sich bei *in vitro*-Untersuchungen, dass LPL nichtenzymatisch die zelluläre Bindung und Aufnahme TG-reicher Lipoproteine zu vermitteln vermag. So bleibt ein Teil der endothelialen LPL nach der Hydrolyse an die Chylomikronen respektive deren Remnants gebunden (Felts et al. 1975) und trägt in Leberperfusionsstudien an Ratten zur hepatischen Aufnahme dieser Lipoproteine bei (Skottova et al. 1995). Auf der Grundlage, dass auch katalytisch inaktive LPL die Bindung von Chylomikronen an das LRP in Hepatozyten und Fibroblasten verstärken konnte (Beisiegel et al. 1991), wurde ebenfalls eine gesteigerte Bindung und zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen durch direkte LPL-Rezeptor-Interaktion belegt; Übersicht in (Beisiegel 1995). Des weiteren wurde nachgewiesen, dass LPL in der Lage zu sein scheint, die Bindung zwischen Lipoproteinen und Heparansulfat-Proteoglycanen zu vermitteln (Olivecrona u. Olivecrona 1995). In tierexperimentellen Studien an Mäusen konnte aufgezeigt werden, dass peripher synthetisierte inaktive LPL als strukturelle Komponente von TG-reichen Lipoproteinen nach Nahrungsaufnahme deren hepatische Aufnahme signifikant erhöht, wohingegen die Aufnahme in anderen Organen weitgehend unbeeinflusst blieb (Heeren et al. 2002). Ebenso führte inaktive LPL allein zu einer verstärkten selektiven CE-Aufnahme, die Hydrolyse und Aufnahme ganzer Lipoproteinpartikel scheint dagegen nur in Anwesenheit aktiver LPL im gleichen Gewebe möglich (Merkel *et al.* 2002b).

### **1.3.3 Die Rolle der Lipoproteinlipase bei der Entstehung von Familiärer Chylomikronämie, Familiärer Kombiniertes Hyperlipoproteinämie und Arteriosklerose**

Aufgrund der zentralen Rolle im Stoffwechsel der Plasmalipide wurden Veränderungen im LPL-Gen und deren klinischen Auswirkungen beim Menschen untersucht. Es sind inzwischen etwa 100 Mutationen im Gen und mehrere in dessen Promotorregion bekannt (Merkel *et al.* 2002a), die mit Störungen der katalytischen Aktivität, Dimerisation, Heparin-Bindung oder des Transports einhergehen. Als einzig bekannte führt dabei die mit bis zu 20% in der Bevölkerung vertretende Ser447stop zu einer gesteigerten LPL-Aktivität (Humphries *et al.* 1998). Unter den inhibitorisch wirksamen Mutationen kommt Asn219Ser in der kaukasischen Bevölkerung mit 2-5% heterozygoten Trägern am häufigsten vor (Wittekoek *et al.* 1998).

Ein kompletter Ausfall der katalytischen Aktivität durch homozygote oder kombinierte heterozygote Mutationen führt beim Menschen zur Familiären Chylomikronämie. Die Erkrankung tritt mit einer Prävalenz von 1:1 Million ohne Geschlechter- oder Bevölkerungspräferenz auf und manifestiert sich meist bereits im Kindesalter, aber auch ein Erscheinen in der Schwangerschaft oder bei exzessiver Nahrungsaufnahme insbesondere langkettiger Fettsäuren ist möglich (Benlian *et al.* 1996, Brunzell u. Deeb 2001, Fredrickson *et al.* 1978). Es kommt dabei zu einer Akkumulation von Chylomikronen mit TG-Spiegeln im Plasma von >1000mg/dl und einer Verminderung der HDL-Chol-Spiegel. Anamnestisch werden rezidivierende Bauchschmerzattacken aufgrund von Pankreatitiden berichtet, die unter anderem auf eine Ischämie bei massiver Triglyzeridämie zurückgeführt werden. Daneben kommt es zu eruptiven Xanthomen, Gedächtnisverlust und Hepatosplenomegalie. Hinweis gebend ist ein rahmiger Überstand aus Chylomikronen nach Inkubation des Plasmas über Nacht bei 4°C. Diagnostisch beweisend ist eine fehlende oder stark verminderte LPL-Aktivität im Serum nach Injektion von Heparin (Nilsson-Ehle u. Schotz 1976). Auch eine Bestimmung der LPL-Proteinmasse mittels ELISA ist möglich (Peterson *et al.* 1992), wobei jedoch abhängig von der Mutation sowohl erniedrigte als auch normale und sogar erhöhte Werte auftreten können.

Einige heterozygote Mutationen der LPL sind scheinbar mit einem erhöhten Risiko für FCHL und KHK assoziiert. Es kommt zu einer verminderten TG-Hydrolyse und erniedrigten HDL im Plasma. Auch wenn einem derartigen Lipoproteinprofil eine verstärkte Neigung zu Arteriosklerose zugeschrieben wird, konnte eine Assoziation dennoch nicht für alle untersuchten Mutationen in Studien nachgewiesen werden (Merkel *et al.* 2002a). Demnach ist der Einfluss von LPL und ihren Veränderungen auf arteriosklerotische Gefäßveränderungen bis heute nicht vollständig geklärt.

So führt LPL über die Senkung der TG-Spiegel im Plasma zu einem Lipoproteinprofil mit anti-atherogenen Eigenschaften. Dazu scheint ebenfalls die Erhöhung des HDL-Chol beizutragen. Die antiatherogene Wirkung von HDL wird sowohl auf den Rücktransport von Chol aus dem extrahepatischen Gewebe zur Leber als auch darauf zurückgeführt, dass HDL aufgrund seines hohen Gehalts an ApoE in der Lage ist, LDL im extrahepatischen Gewebe kompetitiv vom LDL-

Rezeptor zu verdrängen. Unterstützt werden diese Beobachtungen dadurch, dass eine LPL-Defizienz beim Menschen mit vor allem postprandial erhöhten Lipidspiegeln einhergeht und somit Entstehung und Voranschreiten einer Arteriosklerose begünstigen könnte. Im Tiermodell konnte dementsprechend eine verminderte Atherogenese bei LPL-Überexpression nachgewiesen werden (Fan *et al.* 2001, Shimada *et al.* 1996, Yagyu *et al.* 1999).

Im Gegensatz dazu zeigten andere Studien eine erhöhte LPL-Aktivität in atherosklerotischen Bereichen im Vergleich zu normaler Aorta bei Kaninchen (Zilversmit 1979). Aufbauend auf dem Nachweis, dass Fettsäuren *in vitro* endotheliale Monolayer unterbrechen (Hennig *et al.* 1984) konnte auch eine verstärkte Permeabilität von Arterien durch LPL-vermittelte Hydrolyse von VLDL bestätigt werden (Rutledge *et al.* 1997). Dies könnte den Eintritt von LDL in die Gefäßwand erleichtern. Daneben wirkt LPL über seine Bindungsfähigkeit zu Proteinen an der Zelloberfläche von Endothelien wie Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) und gleichzeitige Bindung von Lipoproteinen als Brücke zwischen beiden (Goldberg 1996, Olivecrona *et al.* 1995) und könnte auf diese Weise zu einer lokalen Retention von Lipoproteinen an der Gefäßwand führen (Pentikainen *et al.* 2002). Eine subendotheliale Retention war bereits *in vitro* nachzuweisen (Saxena u. Goldberg 1994). Ebenfalls lassen *in vivo*-Studien mit heterozygoter LPL-Defizienz eine proatherogene Wirkung von LPL vermuten (Semenkovich *et al.* 1998).

Es scheint, dass weitere Faktoren wie zum Beispiel Adipositas und Hyperinsulinämie Einfluss auf die Auswirkungen von Veränderungen der LPL haben, sowie auch die Art der Mutation eine Rolle spielen könnte.

## 1.4 Eigenschaften und Funktionen von Apolipoprotein A5

### 1.4.1 Das Apolipoprotein-Cluster A1/C3/A4/A5

Es konnte bereits gezeigt werden, dass viele Mitglieder der Apolipoproteinfamilie eine wichtige Rolle in der Beeinflussung des menschlichen Lipoproteinprofils spielen.

In diesem Zusammenhang wurden vor allem Veränderungen im Bereich des Apolipoproteingenclusters A1/C3/A4/A5 gut charakterisiert, der anscheinend großen Einfluss auf die TG-Spiegel im Plasma hat (Groenendijk *et al.* 2001, Talmud *et al.* 2002). Dieser Locus befindet sich auf dem menschlichen Chromosom 11q23 (Bruns *et al.* 1984).

Das durch ihn exprimierte ApoA1 wird vornehmlich in der Leber und zu geringeren Mengen auch intestinal synthetisiert. Als größte Apolipoproteinkomponente der HDL-Fraktion spielt es eine Schlüsselrolle im Chol-Rücktransport aus dem Gewebe. Variationen in diesem Genabschnitt nehmen daher vor allem auf den HDL-Chol-Spiegel Einfluss (Groenendijk *et al.* 2001).

ApoC3 wird ebenfalls von der Leber und intestinal synthetisiert (Brewer *et al.* 1974) und taucht im Plasma als Komponente von Chylomikronen, VLDL und HDL auf (Lenich *et al.* 1988). Seine Konzentration korreliert positiv mit dem TG-Spiegeln im Plasma (Kashyap *et al.* 1981, Schonfeld *et al.* 1979). Diese Wirkung auf den TG-Spiegel wurde *in vitro* mit der Inhibierung der LPL und

hepatischen Lipase durch ApoC3 erklärt (Kinnunen u. Ehnolm 1976, Krauss *et al.* 1973, McConathy *et al.* 1992, Wang *et al.* 1985). Außerdem haben Leberperfusionsstudien gezeigt, dass sich durch ApoC3 die hepatische Aufnahme von TG-reichen Lipoproteinen und deren Remnants verringert (Shelburne *et al.* 1980, Windler u. Havel 1985). Zur weiteren Untersuchung dienten Mäuse mit transgener Überexpression von ApoC3, deren Plasma-TG erhöht waren (Aalto-Setälä *et al.* 1992). Verbunden mit der vermehrten ApoC3-Konzentration im Plasma zeigte sich eine reduzierte Clearance von VLDL und Chylomikronen Remnants, was auf eine verringerte Bindung von TG-reichen Lipoproteinen an den LDL-Rezeptor (van Barlingen *et al.* 1996) und an HSPG (Yang *et al.* 1993) zurückgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei ApoC3-knockout-Mäusen eine Senkung der Plasma-TG um 30% beobachtet (Maeda *et al.* 1994).

ApoA4 wird vor allem intestinal synthetisiert (Groenendijk *et al.* 2001). Da es die LCAT aktiviert (Steinmetz u. Utermann 1985), vermutet man seine Funktion in der Lipidabsorption und im Assembling der Chylomikronen (Weinberg 2002).

Die Bedeutung des Genclusters und definierter Mutationen in diesem Bereich wird daran deutlich, dass sie sowohl beim Menschen als auch bei der Maus mit stark veränderten Plasmalipidprofilen einhergehen.

#### **1.4.2 Eigenschaften des ApoA5**

Durch vergleichende Sequenzanalyse der genomischen DNA von Mensch und Maus wurde kürzlich ein neues Apolipoprotein: ApoA5 entdeckt (Pennacchio *et al.* 2001). Parallel dazu wurde es auch von einer anderen Gruppe als Leberregenerationsprotein beschrieben (van der Vliet *et al.* 2001).

ApoA5 ist etwa 27 kbp distal des ApoA4 auf dem menschlichen Chromosom 11q23 lokalisiert. Es liegt damit in einer Region, die während der Evolution weitgehend erhalten blieb und die Bereiche enthält, welche für Apolipoproteine charakteristisch sind. Bei der Maus besteht die genomische Sequenz aus 4 Exons, deren daraus abgelesene Aminosäuresequenz von 368 AS signifikante Ähnlichkeit zu bereits bekannten Apolipoproteinen aufweist, zum Beispiel zu Maus-ApoA4 (24% Gleichheit, 49% Ähnlichkeit). Beim Menschen befindet sich in diesem Bereich eine ähnliche Region, die für 366 AS kodiert: 71% Gleichheit und 78% Ähnlichkeit mit Maus-ApoA5. Transkripte von 1,3 und 1,9 kb Länge wurden in der Leber von Mensch und Maus nachgewiesen (Pennacchio *et al.* 2001). Eine intestinale Expression, wie bei vielen anderen Apolipoproteinen konnte nicht gezeigt werden. Von der Leber wird ApoA5 ins Plasma abgegeben, wo es mit Hilfe immunologischer Methoden in den VLDL- und HDL-Fractionen nachgewiesen werden konnte (Pennacchio *et al.* 2001). Die Konzentration von ApoA5 im Plasma ist jedoch sehr gering, sie beträgt bei Ratten etwa 1 µg/ml (van der Vliet *et al.* 2001) und beim Menschen 0,05-0,5 µg/ml (Baroukh *et al.* 2004).

### 1.4.3 Funktionen des ApoA5

Bei genetisch veränderten Mäusen sind die Plasma-Spiegel des ApoA5 negativ mit den TG im Plasma korreliert. So konnte bei Mäusen *in vivo* durch die transgene Überexpression von menschlichem ApoA5 eine Senkung der Plasma-TG auf ein Drittel derer der Kontrollgruppe erreicht werden (Pennacchio et al. 2001). Ebenso führte adenoviral-vermittelte Expression von ApoA5 zu einer Senkung des Plasma-TG um 70% und des Gesamt-Chol um 40% (van der Vliet et al. 2002). Damit ist ApoA5 das erste Apolipoprotein, bei dem eine Überexpression in Lage zu sein scheint, den TG-Spiegel zu senken. Im Gegensatz dazu führte das komplette Fehlen von ApoA5 in Knockout-Mäusen zu 4fach höheren TG-Werten im Plasma, wobei sich diese Veränderung durch gesteigerte VLDL-Spiegel ergab (Pennacchio et al. 2001).

Die genauen Mechanismen, die diesen Auswirkungen zugrunde liegen sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Ein direkter Effekt auf die intestinale Lipidresorption konnte nicht gezeigt werden und ist aufgrund der fehlenden intestinalen Expression von ApoA5 auch eher unwahrscheinlich. Stattdessen wurde eine Beeinträchtigung des zweiten Schritts der VLDL-Synthese vermutet, was wiederum mit einer beschriebenen verminderten hepatischen VLDL-Produktion verbunden sei (Weinberg et al. 2003). Auch bei Wildtyp-Tieren mit adenoviraler Überexpression von ApoA5 zeigte sich eine Verringerung der Produktionsrate von VLDL-TG (Schaap et al. 2004). Unterschiede in der hepatischen VLDL-TG-Produktionsrate konnten jedoch nicht in weiteren Studien mit ApoA5 transgenen Mäusen bestätigt werden (Fruchart-Najib et al. 2004). Man fand zwar auch hier erniedrigte VLDL-Spiegel, führte diese aber auf einen gesteigerten Katabolismus zurück, der mit einer direkten Aktivierung der LPL durch physikalische Interaktion erklärt wurde (Fruchart-Najib et al. 2004). Dies unterstützten Beobachtungen, dass *in vitro* rekombinantes ApoA5 in der Lage war, dosisabhängig die Aktivität der LPL auf bis das 2,3fache zu steigern (Schaap et al. 2004). Im weiteren wäre eine Funktion als Rezeptorligand, wie bei anderen Apolipoproteinen denkbar. Auch könnte die Aufnahme von Remnants ins Gewebe durch ApoA5 gesteigert werden, indem es als Brückenprotein zwischen TG-reichen Lipoproteinen und HSPG an der Zelloberfläche vermittelt. Daneben könnte ApoA5 in der Lage sein, den Plasma-Turnover TG-reicher Lipoproteine zu steigern. Sowohl bei transgener als auch bei adenoviraler Überexpression von ApoA5 wurden vor kurzem ein schnellerer VLDL-TG-Turnover sowie eine deutlich reduzierte TG-Antwort nach Fettbelastung beobachtet (Fruchart-Najib et al. 2004, Schaap et al. 2004). Dies wäre zum einen mit einer direkten Aktivierung der LPL erklärbar, zum anderen wäre auch eine indirekte Wirkung des ApoA5 über die Beeinflussung von Funktion oder Konzentration anderer Apolipoproteine wie zum Beispiel ApoC3 denkbar, zumal bekannt ist, dass Veränderungen im Bereich des Genclusters A1/C3/A4/A5 auch häufig benachbarte Gene in ihrer Expression beeinflussen (Vergnes et al. 2000, Weinstock et al. 1997a). Unterstützt wird diese These durch Beobachtungen, dass in ApoA5ko-Tieren der Spiegel von ApoC3 um 90% erhöht, wohingegen er bei ApoA5tr-Tieren um 40% verringert war (Pennacchio et al. 2001). Dass die

Funktion von ApoA5 aber zumindest in Teilen unabhängig von ApoC3 zu sein scheint, lassen Versuche *in vitro* (Schaap et al. 2004) wie auch tierexperimentelle Studien an ApoA5tr- kombiniert mit ApoC3tr-Mäusen (Baroukh et al. 2004) vermuten.

#### **1.4.4 Die Rolle von ApoA5 bei der Entstehung von FCHL und Arteriosklerose**

Auch wenn bis zum heutigen Stand die genauen Mechanismen der Funktionen des ApoA5 noch nicht vollständig aufgeklärt sind, so zeigen die bisherigen Ergebnisse doch die Relevanz dieses Apolipoproteins im Lipidstoffwechsel. In der letzten Zeit wurden mehrere Variationen in Form von single nucleotide polymorphisms in dem Bereich des ApoA5-Gens beschrieben und deren Auswirkungen auf das menschliche Lipoproteinprofil in verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht (Austin *et al.* 2004, Baum *et al.* 2003, Hubacek *et al.* 2004, Pennacchio *et al.* 2001, Talmud *et al.* 2002). Dabei zeigten sich Assoziationen mit erhöhten Plasma-TG und FCHL (Evans *et al.* 2003, Pennacchio *et al.* 2001, Pennacchio u. Rubin 2003), was auf eine durchaus wichtige Rolle des ApoA5 in der Regulation des TG-Metabolismus schließen lässt. Letzterer ist wiederum eng mit der Entstehung und dem Voranschreiten von atherosklerotischen Gefäßveränderungen verbunden. In epidemiologischen Studien an Myokardinfarktpatienten zeigte sich eine signifikante Häufung von homozygoten Trägern bestimmter ApoA5-Polymorphismen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass Veränderungen im ApoA5-Gen neben dem TG-Spiegel im Plasma auch das myokardiale Infarktrisiko beeinflussen (Hubacek et al. 2004).

Klinisch könnte damit die Feststellung von Polymorphismen als prognostischer Indikator für Hypertriglyzeridämie genutzt werden sowie auch Modulationen von ApoA5 möglicherweise zur Reduktion dieses Risikofaktors der KHK denkbar wären.

In der proximal des ApoA5 lokalisierten Promotorregion fanden sich auf PPAR $\alpha$  und farnesoid X Rezeptor ansprechende Elemente, die zu einer Hochregulation des ApoA5-Gens führten (Prieur *et al.* 2003, Vu-Dac *et al.* 2003). Es ist bekannt, dass die pharmakologische Aktivierung von PPAR $\alpha$  zu einer deutlichen Senkung der Plasma-Spiegel TG-reicher Lipoproteine führt (Kersten *et al.* 2000, Staels *et al.* 1998). Auch Fibrate, die in der klinischen Therapie der Hypertriglyzeridämie weit verbreitet sind, beeinflussen die Expression von im Lipidmetabolismus beteiligten Genen durch Aktivierung von PPAR $\alpha$  (Issemann u. Green 1990). Untersuchungen an menschlichen Hepatozyten bestätigten ApoA5 als PPAR $\alpha$ -Zielgen, wobei die Behandlung mit Fibraten zu einer starken Induktion von ApoA5 mRNA führte (Vu-Dac et al. 2003). Auf diese Weise scheinen Fibrate neben einer Induktion der LPL (Schoonjans et al. 1996) und der Herunterregulation der ApoC3-Expression (Staels et al. 1995) auch ApoA5 als wichtigen Mediator zur Senkung der Plasma-TG beim Menschen zu nutzen.

### 1.5 Ziel der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Interaktion von ApoA5 und LPL *in vivo* am Mausmodell zu untersuchen. In früheren Studien wurde bereits die klinische Bedeutung von ApoA5 und LPL im Lipidstoffwechsel deutlich. Sowohl Polymorphismen von ApoA5 als auch Mutationen im LPL-Gen sind beim Menschen mit FCHL assoziiert. Nachdem in metabolischen Studien die TG-senkende Funktion von ApoA5 *in vivo* mittels ApoA5-defizienten und transgenen Tieren gezeigt wurde, sollten in dieser Arbeit die Interaktion zwischen ApoA5 und LPL unter physiologischen Bedingungen *in vivo* betrachtet werden. Hierzu wurde die Abhängigkeit der Effekte des ApoA5 von dem Vorhandensein von aktiver LPL untersucht, indem bei ApoA5-transgenen Tieren sowie Wildtyp-Mäusen die plasmatische Clearance von radioaktiv markierten <sup>3</sup>H-TG-VLDL sowie deren Organaufnahme beobachtet wurden. Bei je der Hälfte der Tiere pro Genotyp war die mauseigene LPL zuvor mit Tetrahydrolipstatin (THL) inhibiert worden.

Im folgenden wurden zur weiteren Klärung des Mechanismus der Interaktion zwei Mauslinien etabliert, zum einen mit Überexpression muskelspezifischer humaner LPL vor ApoA5-defizienten Hintergrund (hLPL A5ko), zum anderen Tiere mit einer transgenen Expression von ApoA5 bei LPL-Defizienz (LPL A5tr). Für die Kreuzung standen jeweils zwei bereits beschriebene Mauslinien zur Verfügung. Beide neu etablierten Linien wurden hinsichtlich ihres Lipoproteinprofils untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und allgemeine Arbeitsmethoden

#### 2.1.1 Chemikalien

Die gesamten verwendeten Chemikalien entsprachen den höchsten erhältlichen Qualitätsstandards. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma, Deisenhofen oder Merck, Darmstadt bezogen.

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Ethylendiamin-Tetracetat (EDTA)	Sigma
Enzymatischer Farbstest für Cholesterin # 1489437	Roche/Hitachi, Mannheim
Enzymatischer Farbstest für Triglyzeride # 1488899	Roche/Hitachi
Ethidiumbromid	Sigma
Harnstoff	Sigma
Histoacryl-Gewebekleber	Braun/Aesculab
Kaliumbromid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Magnesiumchlorid	Sigma
Natriumchlorid	J.T.Baker, Deventer, Holland
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Phenol	Invitrogen
Sarkosyls	Sigma
Solvable	PerkinElmer, Boston, USA
Szintillationsflüssigkeit	Packard, Groningen, Holland

#### 2.1.2 Standard-Pufferlösungen

Bromphenolblau-Puffer

500 µl 10%iges Bromphenolblau und 6 ml Glycerol (wasserfrei) in 13,5 ml Wasser.

Lysispuffer

Um eine 2fache Konzentration zu erhalten, wurde 480 g Harnstoff in ca. 200 ml Wasser unter Rühren auf einer Heizplatte aufgelöst. Danach wurden 33 ml 30%ige Sarkosyls, 200 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0, 80 ml 5 M NaCl und 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 hinzugefügt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Demnach setzt sich der Puffer aus folgenden Endkonzentrationen zusammen: Harnstoff 2 M, Sarkosyls 0,25%, 0,05 M Tris-HCl pH 8,0, NaCl 0,1 M und EDTA 5mM.

Phosphate Buffered Saline (PBS)

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,917 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 l Wasser.

Tris-Borsäure-EDTA- (TBE-) Puffer

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

Tris-EDTA- (TE-) Puffer

500 µl 1 M Tris-HCl pH 7,6 und 100 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 in 50 ml Wasser, anschließend steril filtriert.

PCR-Puffer

Es wurde ein aus folgenden Substanzen zusammengesetzter Stammpuffer für die Durchführung aller PCR-Reaktionen angesetzt:

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 und 23 mM dNTP.

Für die Herstellung von 50 ml Puffer wurden 5,68 ml DMSO, 0,945 ml 1 M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 3,8 ml Tris, 380 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 570 µl 1 M DTT, 9,65 ml 1 mg/ml BSA und 115 µl dNTP eingesetzt, gemischt und mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt sowie anschließend steril filtriert.

### **2.1.3 Enzyme und Proteine**

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Heparin	Liquemin, Hoffmann La-Roche, Grenzach-Whylen
1- <sup>3</sup> H-Palmitinsäure	Amersham-Biosciences
Proteinase K	Roche
Taq-Polymerase	Invitrogen
Tetrahydrolipstatin	Orlistat, La Roche

### **2.1.4 Oligonukleotide**

dNTP-Mix	Invitrogen
100-Bp-Marker	Invitrogen

Die für die PCRs bezogenen Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen.

### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

Sterile Labormaterialien wurden von den Firmen Beckton-Dickinson, Heidelberg, Sarstedt, Nümbrecht und Nunc, Wiesbaden bezogen.

Heparinisierte Hämatokritkapillaren	Hirschmann, Eberstadt
Mikrotiterplatten	Nunc
PCR-Röhrchen	Simport, Beloeil-Quebec, Canada
Zentrifugationsröhrchen	Beckmann, München

### 2.1.6 Geräte

Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Betacounter Tricarb 1600 TR	Packard
BiDest Optilab Plus UV	AW Technik GmbH, Hamburg
Elektrophoresekammer	Biorad
Feinwaage	Biorad
Hamilton- Spritze	Ito-Corporation, Fuji, Japan
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Laborzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Mikrotiterplatten-Lesegerät MRX 2	Dynatech Laboratories
PCR-Thermocycler	Biometra, Göttingen
PH-Meter 140	Corning
Powersupply Power Ease 500	Invitrogen, Groningen
Magnetrührer IKAMAG RH	Jahnke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen
Ultrazentrifuge mit Rotor LP 42 Ti	Beckmann
Videodokumentationsgerät für Agarosegele	Itas, Stuttgart
Vortexer Duo press to mix	Labinco

### 2.1.7 Sterilisation

Hitze stabile Geräte, Gebrauchsmaterialien und Lösungen wurden im Autoklaven mittels gesättigtem, unter Druck stehenden Wasserdampf sterilisiert. Dieser Vorgang wurde in feuchter Hitze bei 121°C und 2 bar für 30 min durchgeführt. Zur Sterilisation von Lösungen, die hitzeempfindliche Substanzen enthalten, wurden diese mit einem 0,2 µm Filter gereinigt. Das genutzte Wasser wurde mit dem BiDest doppelt destilliert und anschließend autoklaviert oder steril filtriert.

## **2.2 Tiere**

### **2.2.1 Allgemeines**

Die Tiere wurden in der pathogenarmen Umgebung („specific pathogen free“: SPF) der Versuchstierhaltung des UKE gehalten und waren, was die üblichen Serologien betrifft, insbesondere bezüglich des Mausepithelitisvirus (MHV) negativ. Eine derartige Reinheit konnte durch einen Embryotransfer gesichert werden, dem die Mauslinien vor Aufnahme in die Versuchstierhaltung unterzogen wurden. Aufgrund des weitgehend gemischten genetischen Hintergrundes und der Tatsache, dass keine Inzuchtstämme zur Verfügung standen, wurden alle Untersuchungen mit Geschwisterkontrollen durchgeführt und die Verpaarungen dementsprechend angelegt.

Außerhalb der für die Experimente notwendigen Konstellationen hatten die Mäuse freien Zugang zu Wasser und Futter. Für letzteres nutzte man eine normale Nagerdiät („chow“ mit 4,5% Energie aus Fett).

### **2.2.2 Genehmigung der Tierversuche**

Für die Tierversuche wurden die Richtlinien der Federation of American Societies for Experimental Biologie (FASEB) eingehalten.

Es bestanden Genehmigungen nach §7 TierSchG (20/99, 51/02, 14/05) und §6 TierSchG (UKE-VTH-Aktenzeichen A65, A66). Organentnahmen hatten das interne Registrierzeichen Org 163 und 288 der Universität Hamburg.

### **2.2.3 Mauslinien**

Für die Abbaustudie und die Kreuzungen standen vier bereits beschriebene Mauslinien zur Verfügung. Entsprechend ihrem jeweiligen genetischen Hintergrund wurden die Mäuse der Linien LPL1 und hLPLtr mit C57Bl/6-Tieren und Mäuse der Linien ApoA5ko und ApoA5tr mit FVB-Tieren verpaart.

#### **2.2.3.1 LPL1**

Diese Mauslinie wurde an der Rockefeller University, New York, USA von J.L. Breslow etabliert und von dort bezogen. Mit Hilfe von Gen-Targeting in embryonalen Stammzellen konnte das Exon 2 des Maus-LPL-Gens durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt werden. Diese heterozygote Defizienz von mLPL hat eine geringere Expression von LPL zur Folge (Weinstock et al. 1995).

### **2.2.3.2 hLPLtr**

Diese Linie stammt von R. Zechner, Graz und zeigt eine muskelspezifische Expression des humanen LPL-Transgens. Dazu wurde ein humanes LPL-Minigen in befruchtete Eizellen injiziert. Die Expression des Transgens in Herz- und Skelettmuskulatur und nicht in anderen Geweben konnte durch Verwendung des Muskel-Kreatin-Kinase- (Mck-) Promotors ermöglicht werden (Johnson et al. 1989), (Mck-LPL, (Levak-Frank et al. 1997)).

### **2.2.3.3 ApoA5ko**

Die hier für die weiteren Zuchten genutzte Mauslinie stammt von L.A. Pennacchio, Berkeley, USA. Diese Tiere können aufgrund der Deletion von drei Exons des ApoA5-Lokus kein ApoA5 exprimieren und sind stattdessen durch Nachweis des Neomycin-Resistenz-Gens zu identifizieren (Pennacchio et al. 2001).

### **2.2.3.4 ApoA5tr**

Wie die vorherige Mauslinie wurde auch diese von L.A. Pennacchio etabliert und bezogen. Hier wurde zusätzlich zum mauseigenen ApoA5 das humane ApoA5-Gen durch Mikroinjektion eines BAC's in befruchtete Mauseier eingebracht. Der Einsatz des Transgens führt zu einer Überexpression von ApoA5 in der Leber, wo auch das mauseigene ApoA5 exprimiert wird (Pennacchio et al. 2001).

## **2.2.4 Kreuzungsstrategien**

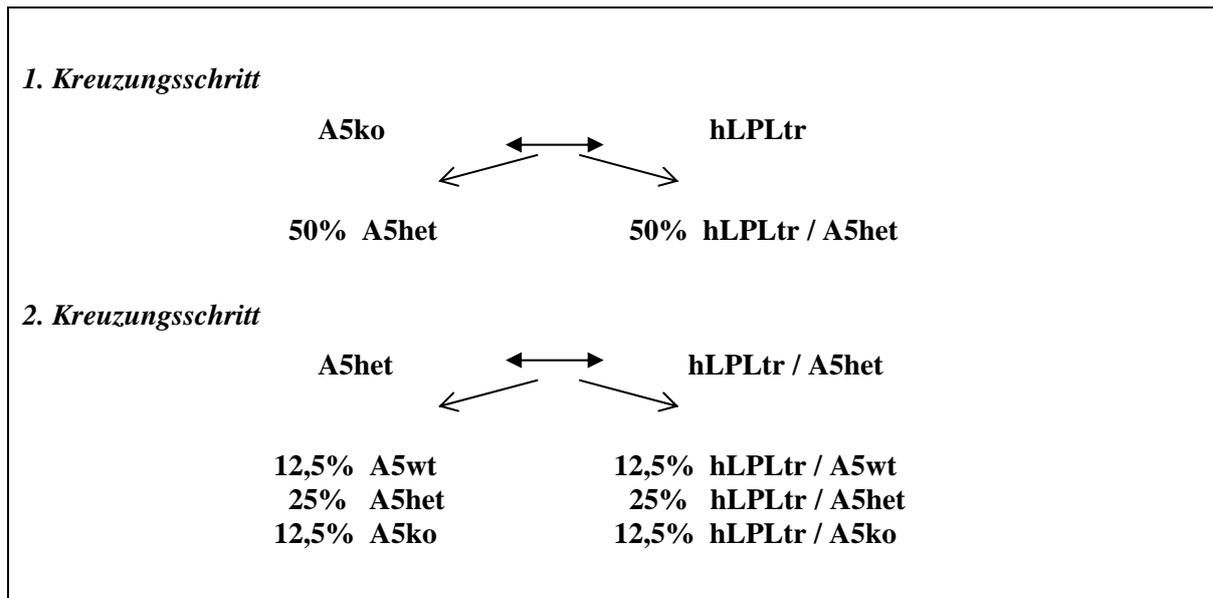
### **2.2.4.1 hLPL A5ko: Mäuse mit und ohne humane LPL als Transgen vor unterschiedlichem ApoA5-Hintergrund**

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine neue Mauslinie mit Hilfe zweier bereits etablierten und oben beschriebenen Linien aufgebaut.

Dazu wurden in einem ersten Schritt homozygote ApoA5 defiziente Mäuse der Linie ApoA5ko mit Tieren der Linie hLPLtr gekreuzt, welche bei Wildtypverhältnissen am ApoA5-Lokus die humane LPL als Transgen exprimieren. Diese Kreuzung ergibt Tiere, die alle heterozygot für ApoA5 sind und dabei je zur Hälfte das Transgen tragen.

Im folgenden Schritt wurden nun diese beiden Gruppen miteinander verpaart. Bei dieser Züchtung entstehen 6 verschiedene Genotypen mit folgender prozentualer Verteilung: je 12,5% ApoA5wt/hLPLtr, ApoA5wt, ApoA5ko/hLPLtr und ApoA5ko sowie je 25% ApoA5het/hLPLtr und ApoA5het.

Eine Übersicht über diese beschriebenen Zuchtschritte zeigt Abbildung 1.



**Abb. 1: Mauslinie hLPL A5ko: Kreuzungsstrategie zur Generierung von Mäusen mit und ohne Expression von humaner LPL vor dem Hintergrund von ApoA5-Defizienz.** hLPLtr: transgene Expression humaner LPL; A5wt: Vorhandensein beider ApoA5-Allele; A5het: ein ApoA5-Lokus wurde durch das Neomycin-Gen ersetzt; A5ko: ApoA5-Defizienz. Die Prozentzahlen geben die Erwartungswerte der Genotypenverteilung der jeweiligen Generation wieder.

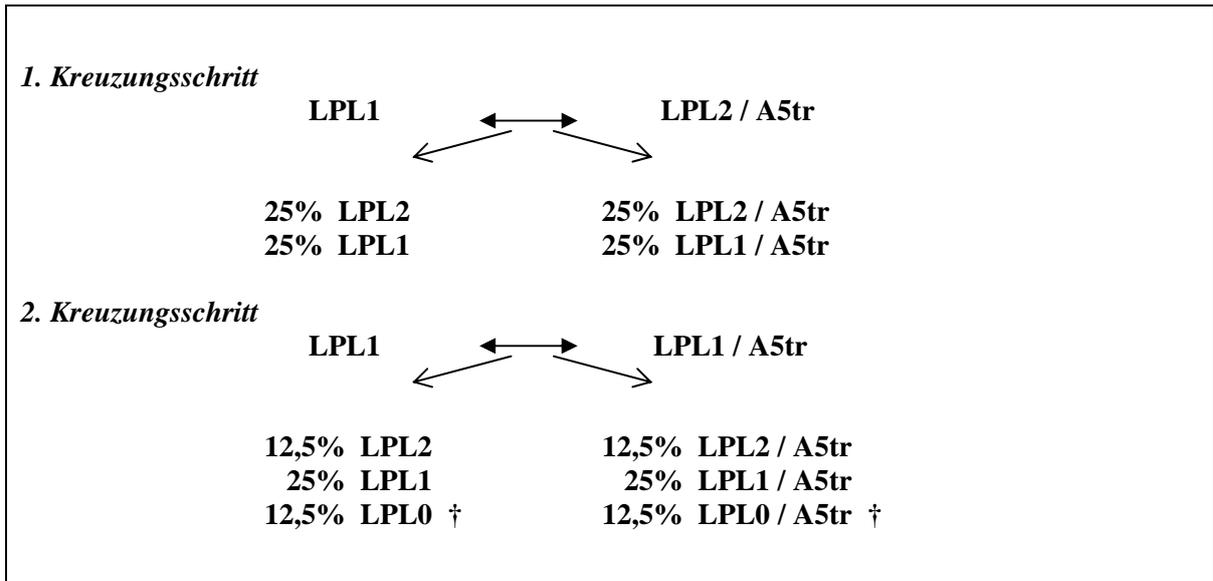
#### 2.2.4.2 LPL A5tr: Mäuse mit und ohne Überexpression von ApoA5 vor unterschiedlichem LPL-Hintergrund

Für die Etablierung einer zweiten Mauslinie mit einem zu der zuvor beschriebenen Linie komplementären genetischen Hintergrund wurden ebenfalls zwei bereits vorhandene Linien genutzt.

Im ersten Schritt verpaarte man die für LPL heterozygoten Tiere der LPL1-Linie mit Mäusen der ApoA5tr-Linie, die das ApoA5-Transgen tragen und dabei keine Veränderungen am LPL-Lokus aufweisen, miteinander. Aus dieser Zucht ergeben sich 4 verschiedene Genotypen zu jeweils 25%: LPL2, LPL2/ApoA5tr, LPL1 und LPL1/ApoA5tr.

Für den 2.Schritt wurden nun nur die Tiere mit heterozygoter Expression von LPL (LPL1) genutzt. Dabei verpaarte man jeweils Mäuse ohne ApoA5-Transgen mit welchen, bei denen das Transgen nachgewiesen werden konnte. Es entstehen bei dieser Kreuzung theoretisch 6 verschiedene Genotypen: LPL2, LPL2/ApoA5tr, LPL0, LPL0/ApoA5tr (jeweils 12,5%) sowie LPL1 und LPL1/ApoA5tr (jeweils 25%). Da Tiere mit homozygoter Deletion der LPL (LPL0) jedoch wie in der Einleitung beschrieben bereits innerhalb von 24 Stunden postnatal versterben, erhöht sich der Prozentsatz der anderen Genotypen bis zur Adoleszenz von jeweils 12,5% auf 16,7% beziehungsweise von 25% auf 33,3%.

Eine Übersicht über die dargelegten Zuchten gibt Abbildung 2.



**Abb. 2: Mauslinie LPL A5tr: Kreuzungsstrategie zur Generierung von Mäusen mit und ohne transgener Expression von ApoA5 vor dem Hintergrund von LPL-Defizienz.** Anzahl der mLPL-Gene: LPL2: Wildtyp-Konstellation; LPL1: heterozygotes Vorhandensein von LPL; LPL0: LPL-Defizienz; A5wt: Wildtyp-Konstellation des ApoA5-Lokus; A5tr: transgene Expression von ApoA5. Die Prozente geben die erwartete Verteilung der Genotypen in der jeweiligen Generation an. † Die entsprechend gekennzeichneten Genotypen versterben aufgrund ihrer LPL-Defizienz innerhalb von 24 Stunden postnatal.

## 2.3 Genotypisierung der Mäuse

### 2.3.1 Prinzip

Zur Bestimmung der verschiedenen sich aus den Zuchten ergebenden Genotypen wurde jeder Maus DNA-fähiges Material mittels Schwanzbiopsie entnommen, isoliert, gereinigt und durch PCR und folgende Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 2.3.2 Schwanzbiopsie

Nach Einleitung einer Kurzzeitnarkose mit Ether wurde den Mäusen ein ca. 5 mm langes Stück vom Schwanzende abgenommen. Dazu wurden die Tiere zusammen mit in Ether getränktem Zellstoff in ein Gefäß gesetzt. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe, zu beurteilen anhand tiefer Atmung mit niedriger Frequenz erreicht war, konnte den Tieren mit einem Skalpell ein entsprechendes Stück der Schwanzspitze abgenommen und anschließend die entstandene Wunde mit Histoacryl-Gewebekleber versorgt werden. In diesem Rahmen wurden die Tiere auch mit einer Ohrlochzange markiert, was deren individuelle Wiedererkennung im folgenden ermöglichte.

### 2.3.3 Verdau der Schwanzbiopsien

Die entnommenen Biopsien wurden zum Verdau in ein verschließbares Reaktionsgefäß mit 400 µl 1fachem Lysispuffer sowie 50 µl 15 mg/ml Proteinase K gegeben und über Nacht bei 50°C im Heizblock leicht geschüttelt. Der Lysispuffer zerstört dabei die Zellmembranen und die Proteinase verdaut die Proteine, so dass sich die DNA aus den Zellen löst.

### 2.3.4 DNA-Extraktion

Zur Extraktion der genomischen DNA wurden zunächst Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:1 gemischt und bis zur Auftrennung in zwei Phasen für etwa 30 min kühl gelagert. Danach konnten je 400 µl der oberen wässrigen Phase abgenommen und in das Reaktionsgefäß mit der verdauten Schwanzspitze überführt werden. Nach dem Vortexen der Gefäße für etwa 20 sec wurden sie bei 10.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend konnten 200-400 µl der oberen Phase in ein zweites mit 1000 µl Ethanol gefülltes Reaktionsgefäß gegeben werden, in dem nach leichtem Schütteln ein DNA-Strang sichtbar wurde. Letzterer wurde wiederum unter Zuhilfenahme einer Hämatokrit-Glaskapillare in ein weiteres mit 200 µl TE-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Nach etwa 30 min bei Raumtemperatur löst sich die genomische DNA wieder und kann dann bei 4°C über mehrere Monate bis zur Genotypisierung aufbewahrt werden.

### 2.3.5 PCR

#### 2.3.5.1 Mauslinie hLPL A5ko

Zur Erfassung der Transgenität als auch der Bestimmung der ApoA5-Konstellation war die Verwendung von drei verschiedenen PCRs nötig:

##### 2.3.5.1.1 PCR zur Bestimmung des hLPL-Transgens

Mittels einer bereits etablierten 2-Primer-PCR konnte das Vorhandensein des Mck-LPL-Transgens überprüft werden. Durch Sequenzierung des Mck-LPL-Minigens wurden die 3'-Sequenzen des Mck-Promotors gewonnen (unpublizierte Daten von Merkel 1998).

Zur Reaktion wurden der promotorspezifische upstream-Primer (5'-CAC AGG GGC TGC CCC CCG GTG ACA TCA AG-3') und der downstream-Primer (5'-CCT GTT ACC GTC CAG CCA TGG ATC ACC-3') eingesetzt. Jeweils 0,5 µl der Primer (100 pmol/µl) wurden mit 17,75 µl des PCR-Puffers und 0,25 µl der Taq-Polymerase vermischt und zu 4 µl der genomischen DNA aus der Schwanzspitzenbiopsie gegeben. Durch Erhitzen auf 95°C für 2 min denaturiert die DNA, es folgen 40 Zyklen a 45 sec bei 94°C und 3 min bei 72°C und abschließend ein Herunterkühlen auf eine Temperatur von 4°C, bei der das PCR-Produkt bis zur Gelelektrophorese aufbewahrt wurde. Bei Vorhandensein des Transgens wurde dabei ein Fragment in der Größe von 477 Bp erwartet (Merkel *et al.* 2002b).

#### 2.3.5.1.2 PCR zur Bestimmung des Genotyps am ApoA5-Lokus

Zur Differenzierung zwischen reinem Wildtyp, knockout und heterozygotem Vorhandensein des ApoA5-Gens wurden zwei bereits etablierte PCRs verwendet.

Das Wildtypallel konnte mit dem upstream-Primer (5'-ACA GTT GGA GCA AAG GCG TGA T-3') und dem downstream-Primer (5'-CTT GCT CGA AGC TGC CTT TCA G-3') nachgewiesen werden. Bei der Elektrophorese sieht man bei Vorhandensein des Wildtypallels eine Bande bei 516 Bp.

Bei dem Knockoutallel wurde das ursprüngliche Gen durch das Neomycin-Gen ersetzt, welches mittels einer weiteren PCR nachgewiesen werden kann. Hierzu wurden ein upstream-Primer (5'-CTT TTT GTC AAG ACC GAC CTG-3') und ein downstream-Primer (5'-AAT ATC ACG GGT AGC CAA CGC-3') genutzt. Man erwartet hier eine Bande bei 545 Bp.

Sowohl in der Wildtyp- als auch in der Knockout-PCR wurden je 20 µl des PCR-Puffers, 0,5 µl Taq-Polymerase und jeweils 0,25 µl der beiden entsprechenden Primer (100 pmol/µl) mit 4 µl DNA vermischt. Nach dem Erhitzen auf 95°C für 1 min, folgen 35 Zyklen mit jeweils 1 min bei 95°C, 1 min bei 53°C und 3 min bei 72°C sowie ein abschließendes Abkühlen auf 4°C (Pennacchio et al. 2001).

#### 2.3.5.2 Mauslinie LPL A5tr

Zur Bestimmung der entstehenden Genotypen kamen zwei PCRs zur Verwendung.

##### 2.3.5.2.1 PCR zur Bestimmung des ApoA5-Transgens

Zur Testung auf die Anwesenheit von ApoA5 als Transgen wurde eine etablierte 2-Primer-PCR genutzt. Der upstream-Primer (5'-CCC GCT GCA GTC CCC AGA AT-3') und der downstream-Primer (5'-CAG GGT CGA GGG CTC TTG TCC T-3') amplifizieren bei Anwesenheit des Transgens eine Bande mit einer Größe von 148 Bp. Für die Reaktion wurden je 0,5 µl Primer (100 pmol/µl) und Taq-Polymerase, 20 µl PCR-Puffer und 4 µl DNA eingesetzt. Dem Erhitzen auf 95°C für 1 min folgen 35 Zyklen mit je 1 min bei 95°C, 1 min bei 53°C und 3 min bei 72 °C und abschließendes Kühlen bei 4°C (Pennacchio et al. 2001).

##### 2.3.5.2.2 PCR zur Bestimmung des Genotyps am LPL-Lokus

Die Differenzierung der Verhältnisse am LPL-Lokus erfolgte durch eine 3-Primer-PCR.

Primer A (5'-CTC GCT GGC ACC GTT GAG CCT CGT TAC-3') und Primer B (5'-ACT GGA GCG CGG TGG AGC GCC GTA GGG CA-3') dienen dabei dem Nachweis eines intakten Maus-LPL-Gens, welches ein Fragment von 250 Bp zeigt. Primer A und Primer C (5'-GCG GGG CGG GGG GGA ACT TCC TGA CTA GGG G-3') ergeben eine Bande bei 405 Bp, wobei Primer C spezifisch für das Neomycin-Gen ist. Diese Bande zeigt folglich das Fehlen des LPL-Allels an.

In der Reaktion wurden jeweils 0,5 µl der drei Primer (100 pmol/µl) mit 24 µl PCR-Puffer und 0,5 µl Taq-Polymerase gemischt und 4 µl DNA hinzugegeben. Nach Erhitzen auf 94°C für 2 min

folgten 35 Zyklen mit je 45 sec bei 94°C und 3 min bei 72°C sowie am Ende eine Abkühlung auf 4°C.

In der Elektrophorese ist bei Wildtypverhältnissen am LPL-Lokus dementsprechend nur eine Bande bei 250 Bp zu sehen, heterozygote Tiere werden am gleichzeitigen Vorhandensein beider Banden erkannt, wohingegen man bei einer kompletten Deletion des LPL-Gens nur eine Bande bei 405 Bp erwarten würde (Levak-Frank et al. 1997).

### **2.3.6 Gelelektrophorese**

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 1,5%iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer unter Rühren mit Hilfe einer Heizplatte aufgelöst und erhitzt bis die Lösung klar wurde. Nach kurzem Abkühlen auf ca. 50°C konnten 5 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in die mit einem 15- oder 20- Kamm vorbereitete Kammer gegossen werden. Sobald das Gel durch das Abkühlen erstarrt ist, können die Kämmen gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt werden. Letztere wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt ist.

Im folgenden werden die einzelnen Taschen befüllt. Zunächst wird in die jeweils erste Tasche 15 µl eines 100-Bp-Markers (1:10 verdünnt mit Bromphenolblau-Puffer) gegeben, um später anhand dieser Vergleichsbande die jeweiligen Größen der Probanden ermitteln zu können. Danach wurden in die weiteren Taschen je 20 µl der PCR-Proben einpipettiert, die zuvor mit 4 µl Bromphenolblau- Puffer vermischt worden waren.

Das Gel wurde anschließend bei einer Spannung von 120 V für etwa 1 Stunde laufengelassen und danach unter UV-Licht fotografiert.

## **2.4 Lipoproteinprofil**

### **2.4.1 Prinzip**

Zur Auftrennung des Plasmas in die einzelnen Lipoproteinfraktionen für die nachfolgende Bestimmung des Chol- und TG- Anteils erfolgte eine sequenzielle Ultrazentrifugation mit einer Dichte von 1,006 g/ml und 1,062 g/ml (Havel et al. 1955). Dazu wurden jeweils 60 µl Plasma eingesetzt. Nach Auftrennung der Fraktionen in VLDL, LDL und HDL erfolgte die enzymatische Chol- und TG- Bestimmung mittels kommerzieller enzymatischer Farbtests. Dabei wurden alle untersuchten Parameter individuell für jede zu testende Maus erfasst. Dazu wurde das Protokoll aufgrund der kleinen Volumina, die nach der Blutentnahme zur Verfügung standen auf 96-well Mikrotiterplatten angepasst.

#### **2.4.2 Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgte im Nüchternzustand nach einer Fastenzeit von 6 Stunden. Da die Tiere vor allem in der Dunkelphase ihr Futter zu sich nehmen, und um diesen physiologischen Tagesrhythmus zu berücksichtigen, wurde die Fastenzeit morgens um etwa 8 Uhr begonnen. So konnten annähernd die Bedingungen einer Nüchternblutentnahme beim Menschen nachgestellt werden. Zur Blutentnahme wurden die Mäuse mittels Ether in eine Kurzzeitnarkose versetzt. In diesem Zustand konnten ca. 200 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mit einer heparinisierten Hämatokritkapillare abgenommen werden. Zur Antikoagulation wurden auf je 100 µl Blut 2 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Blutes für 10 min bei 5000 rpm unter Kühlung bei 4°C, wodurch die korpuskulären Bestandteile vom Plasma getrennt wurden. Letzteres konnte nun bei 4°C bis zur Ultrazentrifugation aufbewahrt werden.

#### **2.4.3 Auftrennung der Lipoproteine**

Für die Auftrennung des Plasmas in die einzelnen Fraktionen wurden zunächst 60 µl PBS in Ultrazentrifugationsröhrchen vorgelegt und anschließend mittels einer Hamilton-Spritze mit 60 µl Plasma unterschichtet. Nach einer Zentrifugation im Rotor Typ LP 41 bei 42.000 rpm für 2,5 h befindet sich die VLDL-Fraktion in den oberen 60 µl. Die unteren 60 µl wurden zunächst wiederum mit einer Hamilton-Spritze entnommen und in ein zweites Ultrazentrifugationsröhrchen überführt, so dass die VLDL-Fraktion nun in ein verschließbares Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4°C bis zur weiteren Untersuchung gelagert werden konnte. Die sich nun in dem neuen Röhrchen befindlichen LDL, IDL und HDL wurden mit 60 µl Kaliumbromid (Dichte 1,12 g/ml) vermischt, um eine Gesamtdichte von 1,062 g/ml zu erhalten. Durch die folgende Zentrifugation bei 42.000 rpm für 6 h trennen sich LDL und IDL vom HDL. HDL befindet sich am Ende aufgrund seiner höheren Dichte in den unteren 60 µl, die wiederum mit einer Hamilton-Spritze entnommen und in einem verschließbaren Reaktionsgefäß bei 4°C aufbewahrt werden. Mit den in den oberen 60 µl befindlichen LDL und IDL wird dementsprechend verfahren.

#### **2.4.4 Bestimmung von Cholesterol und Triglyzeriden**

Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen sowie des Gesamtplasmas auf ihren Gehalt an Chol und TG wurde individuell für jedes Tier mit einem kommerziellen enzymatischen Farbttest durchgeführt. Dabei kommt es proportional zur enthaltenen Konzentration zu einer Entwicklung eines rötlichen Farbstoffes, der bei 504 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Dazu ermittelte man zunächst pro Mikrotiterplatte mit Hilfe von Dreifachansätzen der jeweiligen Standards eine Eichgerade, so dass später aus der Geradengleichung jeder Extinktion eine Konzentration zugeordnet werden kann. Die genutzten Standard-Reagenzien (200 mg/dl bei der Chol-Bestimmung und 250 mg/dl bei der TG-Bestimmung) wurden dazu auf 50, 100 und 200

mg/dl bei der Chol-Bestimmung beziehungsweise 50, 100 und 250 mg/dl bei der TG-Bestimmung verdünnt.

Auch die Proben wurden in einem Dreifachansatz bestimmt. Es wurden jeweils 5 µl der zu untersuchenden Probe beziehungsweise des Standards auf die Titerplatte gegeben und anschließend mit 200 µl der Reaktionsflüssigkeit für TG oder Chol vermischt. Anschließend wurde der TG-Assay bei Raumtemperatur für 30 min und der Chol-Ansatz für mindestens 5 min bei 37°C inkubiert. Danach konnten die Extinktionen gemessen und dementsprechend die jeweiligen Konzentrationen errechnet werden.

Die Ergebnisse der TG- und Chol- Bestimmung des Grundplasmas sowie der unterschiedlichen Fraktionen wurden für jedes Tier individuell zusammengetragen und anschließend nach den zu untersuchenden Genotypen sortiert. Es erfolgten eine Errechnung von Mittelwert, Standardabweichung und zweiseitigem T-Test. Zeigte letzterer eine Signifikanz wird ebenfalls ein P-Wert aufgeführt.

## **2.5 Abbaustudie mit radioaktiv markierten VLDL-Triglyzeriden**

### **2.5.1 Prinzip**

Um den TG-Spiegel im Plasma und dessen Turnover sowie Organaufnahme in Abhängigkeit von den Funktionen des Apolipoproteins ApoA5 von der LPL zu untersuchen, wurde neben der Veränderung des genetischen Hintergrundes in Zuchten auch anhand zweier bestehender Linien ein Mangel an katalytisch aktiver LPL *in vivo* mittels intravenöser Injektion von Tetrahydrolipstatin (THL) nachgestellt. Dieses inaktiviert bereits in kleinen Konzentrationen irreversibel die LPL-Aktivität, wobei anscheinend beide Untereinheiten des LPL-Homodimers THL binden und die Tetramerisation induzieren (Lookene et al. 1994). Im etablierten Tiermodell mit transgener Expression von humanem ApoA5 sind im Vergleich zu Wildtyp-Tieren Veränderungen im Lipoproteinabbau sowie in der organspezifischen Aufnahme zu erwarten.

### **2.5.2 Markierung**

Als Grundlage für den eigentlichen Versuch wurden zunächst zur *in vivo*-Markierung von VLDL-TG ApoA5 defizienten Mäusen der Linie ApoA5ko 500 µCi [ $^3\text{H}$ ]-Palmitinsäure assoziiert mit fettsäurefreiem Albumin injiziert. 60 min später erfolgte die Blutentnahme. In dieser Zeit hatten die Tiere die ihnen zugeführten radioaktiv markierten Fettsäuren in der Leber in ihre VLDL eingebaut. Nach dem Abtrennen der korpuskulären Bestandteile des Blutes konnte mittels Ultrazentrifugation die nun markierte VLDL gewonnen werden. Es wurde die spezifische Aktivität der VLDL bestimmt und die gewünschte Aktivitätsmenge in jeweils 200 µl Kochsalzlösung gelöst (Aalto-Setälä et al. 1992).

### **2.5.3 Durchführung**

Zur Untersuchung des TG-Turnovers wurden 24 Tiere eingesetzt: 12 ApoA5wt-Mäuse und 12 ApoA5tr-Mäuse, die vor Beginn 6 h gefastet wurden. Die Tiere wurden mit Ether narkotisiert, und es bekamen jeweils sechs Tiere pro Genotyp 50 µl/ml THL in 100 µl DMSO als Lösungsmittel oder DMSO allein in die Schwanzvene injiziert.

2 Minuten nach THL- bzw. Lösungsmittelgabe erfolgte die Injektion von 200 µl der hepatisch radioaktiv markierten VLDL (0,1-1x10<sup>6</sup> cpm [<sup>3</sup>H]-Palmitinsäure-TG-VLDL).

Zur späteren TG-Bestimmung fanden nach weiteren 2, 5 und 10 min Blutentnahmen aus dem retroorbitalen Venenplexus statt, von deren Plasma 15 µl in Szintillationsflüssigkeit für die Radioaktivitätsmessung eingesetzt wurden.

Vor der letzten Blutentnahme wurden die Tiere mit 10 µl/g Ketaxyl pro kg Körpergewicht narkotisiert und durch Eröffnung des rechten Vorhofs ausgeblutet und durch Injektion von 10 ml Perfusionslösung (PBS mit 1 U Heparin/ml) in den linken Ventrikel perfundiert. Anschließend konnten die Organe Herz, Lunge, 4 Leberlappen, Milz, Fett (2 Biopsate), Niere und Muskel (4 Biopsate) entnommen und gewogen werden. Sobald sich die Organe in 1,5 ml Solvable aufgelöst haben, wurde jeweils 1 ml in 10 ml Szintillationsflüssigkeit für 2 min mit einem Betacounter gemessen.

### 3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Interaktionen zwischen ApoA5 und LPL *in vivo*. Hierzu wurde in einer Abbaustudie mit radioaktiv markierten VLDL-TG die Abhängigkeit der Funktionen des ApoA5 von dem Vorhandensein von aktiver LPL untersucht. Die Auswirkungen von Tetrahydrolipstatin (THL) auf den Metabolismus von VLDL-TG konnten bei ApoA5tr-Tieren beobachtet und mit denen bei Wildtyp-Tieren verglichen werden.

Nach dieser pharmakologischen Inaktivierung der LPL wurden zur weiteren Untersuchung der Interaktionen von ApoA5 und LPL *in vivo* mittels bereits bestehender Mauslinien zwei neue Linien etabliert. Die Wirkung von exprimierter muskelspezifischer humaner LPL bei ApoA5-defizienten Tieren, sowie durch Kreuzung von ApoA5tr-Mäusen mit LPL1-Mäusen, die Wirkung von ApoA5 als Transgen bei heterozygoter LPL-Defizienz wurden anhand ihres Lipoproteinprofils dargestellt.

#### 3.1 Tiermodell mit Expression humaner LPL bei ApoA5-Defizienz

Ausgangspunkt der Etablierung dieser neuen Linie hLPL A5ko mit Expression muskelspezifischer humaner LPL vor dem genetischen Hintergrund von ApoA5 mit normalem Wildtyp sowie heterozygoter und homozygoter ApoA5-Defizienz waren zwei bereits beschriebene Linien, die miteinander verpaart wurden.

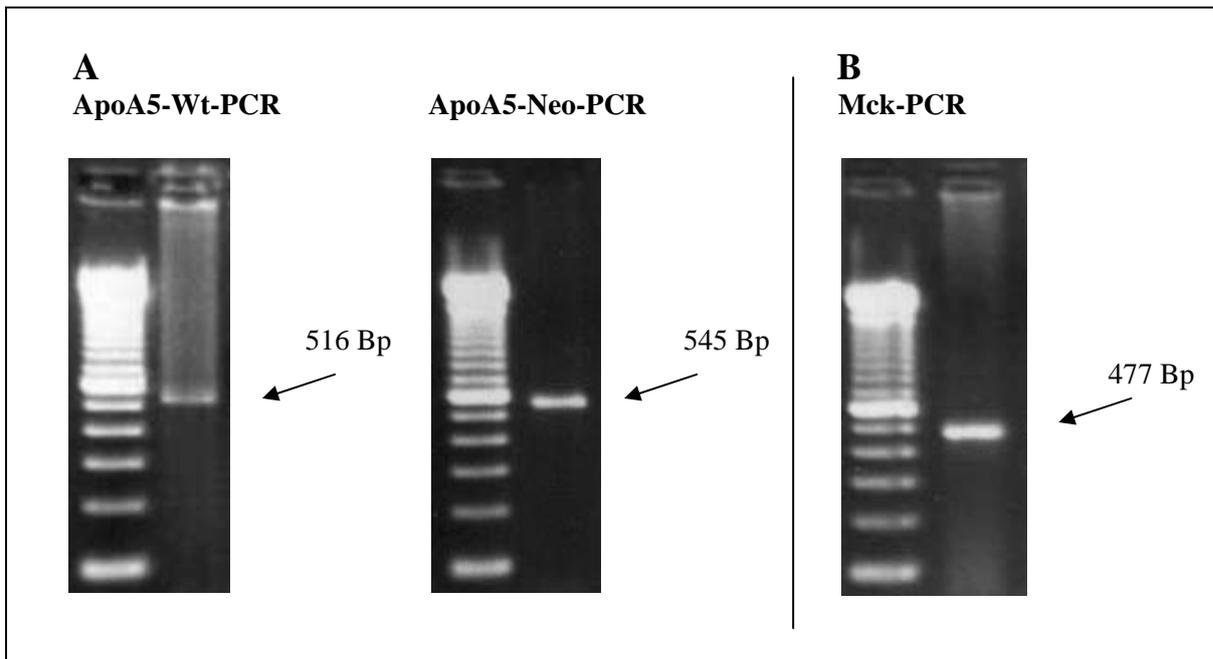
##### 3.1.1 PCR

Zur Genotypisierung wurden drei bereits etablierte PCRs eingesetzt.

Für die Differenzierung der Verhältnisse am ApoA5-Lokus kamen die A5-Wildtyp- und die A5-Neo-PCR zum Einsatz, wobei letztere durch den Nachweis des Neomycin-Gens ein Fehlen von ApoA5 nachweist. Bei normalen ApoA5-Wildtyp zeigt sich bei der Wt-PCR ein Fragment mit der Größe von 516 Bp, wohingegen in der Neo-PCR kein Fragment zu erkennen ist. Sind die Tiere homozygot defizient für ApoA5, so ergibt sich in der Neo-PCR eine Bande in der Höhe von 545 Bp und die Wt-PCR zeigt kein Fragment. Bei heterozygoten Tieren ist in beiden Reaktionen eine Bande zu sehen.

Zur Erfassung der Transgenität der Mäuse für humane LPL wurde ebenfalls eine 2-Primer-PCR verwendet, bei der das Vorhandensein des Transgens beziehungsweise des Mck-Promotors, durch den es exprimiert wird, mit einem Fragment der Größe 477 Bp nachgewiesen wird.

Eine Übersicht der zur Genotypisierung dieser Linie verwendeten PCRs zeigt Abbildung 3.

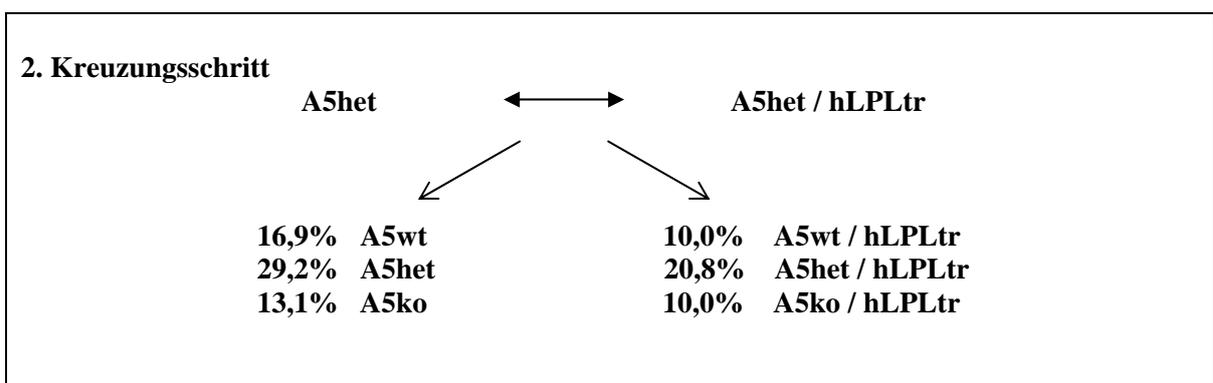


**Abb. 3: PCRs zur Genotypisierung der Mäuse der Linie hLPL A5ko:** A: Bestimmung der Verhältnisse am ApoA5-Lokus, ApoA5wt=516 Bp und ApoA5ko=545 Bp. B: Erfassung des humanen LPL-Transgens durch Vorhandensein oder Fehlen einer Bande bei 477 Bp in der Mck-PCR.

### 3.1.2 Kreuzungsergebnisse

Es wurden zunächst Männchen, welche die humane LPL als Transgen exprimieren mit ApoA5-defizienten Weibchen verpaart. Die folgende Generation war nun heterozygot für ApoA5 und trug zur Hälfte das humane LPL-Transgen. Diese beiden entstandenen Genotypen wurden im zweiten Schritt wiederum miteinander gekreuzt. Aus insgesamt 44 Würfen ergaben sich 218 Jungtiere. Jeder mögliche Genotyp war vertreten und alle Tiere erreichten das Erwachsenenalter.

Eine Übersicht über den zweiten Schritt der Züchtungen gibt Abbildung 4.



**Abb. 4: Kreuzungsergebnisse für Mäuse der Linie hLPL A5ko.** Prozentuale Verteilung der Genotypen nach dem 2.Kreuzungsschritt bei 218 Jungtieren aus 44 Würfen. Anzahl der Maus-ApoA5-Gene: A5wt: Wildtyp-Konstellation am ApoA5-Lokus, A5het: heterozygot ApoA5-defizient, A5ko: homozygot ApoA5-defizient. Transgen: hLPLtr: humanes LPL-Transgen.

### 3.1.3 Lipoproteinprofil

Für die Untersuchung der Auswirkungen von humaner LPL bei unterschiedlichem ApoA5-genetischen Hintergrund *in vivo* erfolgte nach einer Fastenzeit von 6 Stunden eine Nüchternblutentnahme bei 15-20 Wochen alten männlichen Mäusen. Das Plasma sowie dessen Fraktionen VLDL, LDL und HDL wurden hinsichtlich ihres TG- und Chol- Gehaltes untersucht, in Gruppen mit 10-20 Tieren des jeweils gleichen Genotyps zusammengefasst und im Anschluss miteinander verglichen.

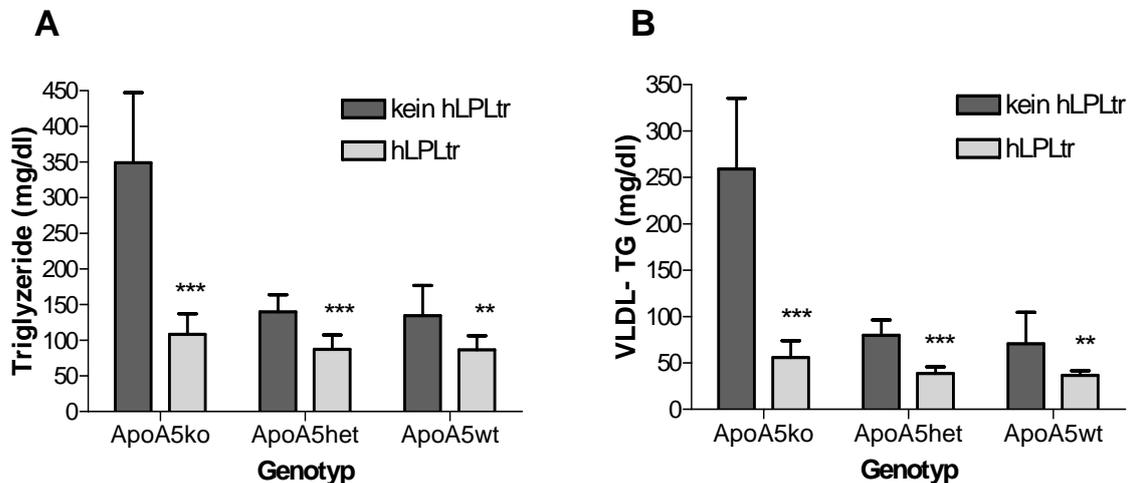
Es zeigte sich, dass LPL in der Lage war, auf dem ApoA5-defizienten Hintergrund die TG im Plasma um 69% (A5ko: 348,9 mg/dl  $\pm$  98,3 mg/dl; A5ko/hLPL: 108,2 mg/dl  $\pm$  28,9 mg/dl;  $p < 0,001$ ) und die VLDL-TG um 78% (A5ko: 259,0 mg/dl  $\pm$  76,3 mg/dl; A5ko/hLPL: 55,9 mg/dl  $\pm$  18,1 mg/dl;  $p < 0,001$ ) zu senken. Dieser Effekt bestätigte sich ebenfalls signifikant bei heterozygoter ApoA5-Defizienz ( $p < 0,001$ ) sowie bei ApoA5-Wildtyp-Tieren ( $p < 0,01$ ), wenn auch mit geringerer prozentualer Abnahme. Daneben trat auch eine deutliche Reduktion um 54% des Chol-Gehaltes der VLDL-Fraktion durch humane LPL bei ApoA5-defizienten Tieren auf, die sich jedoch vor anderem ApoA5-genetischen Hintergrund nicht nachweisen ließ. Gegenteilige Auswirkungen von transgener LPL vor ApoA5-defizientem Hintergrund zeigten sich in der HDL-Fraktion. Hier kam es unter humaner LPL zu einem signifikanten Anstieg des Chol-Gehaltes um 30%. Beim Vergleich der ApoA5wt-Tiere mit ApoA5ko-Mäusen fiel hinsichtlich der LDL-Fraktion ein signifikanter Anstieg des Chol-Gehaltes bei den Knockout-Tieren auf (A5wt: 11,0 mg/dl  $\pm$  8,4 mg/dl, A5ko: 19,7 mg/dl  $\pm$  8,1 mg/dl;  $p < 0,05$ ).

Eine Aufstellung der einzelnen Ergebnisse zeigt Tabelle 2 .

	n	Gesamt-TG (mg/dl)	VLDL-TG (mg/dl)	Gesamt-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
A5wt	16	134,3 $\pm$ 42,5	70,6 $\pm$ 34,0	138,6 $\pm$ 16,0	24,6 $\pm$ 4,3	11,0 $\pm$ 8,4	88,3 $\pm$ 10,6
A5wt/hLPL	10	86,3 $\pm$ 20,0	36,5 $\pm$ 5,0	126,1 $\pm$ 29,8	23,8 $\pm$ 6,1	17,2 $\pm$ 7,4	87,4 $\pm$ 10,1
p		<0,01	<0,01	ns	ns	ns	ns
A5het	20	139,6 $\pm$ 24,2	79,9 $\pm$ 16,5	143,1 $\pm$ 21,2	23,6 $\pm$ 6,8	18,0 $\pm$ 9,9	101,3 $\pm$ 19,9
A5het/hLPL	17	87,3 $\pm$ 20,0	38,6 $\pm$ 6,9	141,2 $\pm$ 30,6	19,2 $\pm$ 7,6	22,3 $\pm$ 12,4	97,8 $\pm$ 23,8
p		<0,001	<0,001	ns	ns	ns	ns
A5ko	11	348,9 $\pm$ 98,3	259,0 $\pm$ 76,3	153,2 $\pm$ 33,3	34,6 $\pm$ 5,6	19,7 $\pm$ 8,1	81,6 $\pm$ 24,0
A5ko/hLPL	13	108,2 $\pm$ 28,9	55,9 $\pm$ 18,1	144,2 $\pm$ 23,9	16,0 $\pm$ 5,0	24,7 $\pm$ 8,5	105,9 $\pm$ 12,7
p		<0,001	<0,001	ns	<0,001	ns	<0,01

**Tab. 2: Plasmalipoproteinspiegel der Mäuse der Linie hLPL A5ko.** TG: Triglyzeride, C: Cholesterol, ns: nicht signifikant. Die angegebenen Werte zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der 10-20 untersuchten Tiere pro Genotyp. n: Tierzahlen pro jeweiligem Genotyp. Verhältnisse am ApoA5-Lokus: A5wt: Wildtyp-Konstellation, A5het: heterozygot ApoA5-defizient, A5ko: homozygot ApoA5-defizient; Transgen: hLPL: humanes LPL-Transgen.

Die folgende Abbildung 5 zeigt graphisch die bei Expression humaner LPL beobachteten Effekte auf den TG-Spiegel im Plasma und der VLDL-Fraktion vor unterschiedlichem ApoA5-genetischen Hintergrund.



**Abb. 5: Triglyzerid-Spiegel bei unterschiedlichem ApoA5-genetischen Hintergrund mit und ohne Überexpression humaner LPL.** A: TG-Spiegel im Gesamtplasma, B: TG-Spiegel in der VLDL-Fraktion. Verhältnisse am ApoA5-Lokus: A5wt: Wildtyp-Konstellation, A5het: heterozygot ApoA5-defizient, A5ko: homozygot ApoA5-defizient; Transgen: hLPL: humanes LPL-Transgen. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung der 10-20 untersuchten Tiere pro Genotyp; T-Test: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.2 Tiermodell mit transgener ApoA5-Expression bei LPL-Defizienz

Um weitere Erkenntnisse über die Interaktion zwischen ApoA5 und LPL zu erlangen, wurde eine weitere Mauslinie LPL A5tr ebenfalls aus zwei bereits beschriebenen Linien etabliert. Durch Verpaarung von ApoA5-Transgen tragenden Tieren mit Mäusen, die heterozygot für LPL (LPL1) sind, konnten die Auswirkungen von ApoA5-Überexpression bei LPL-Defizienz untersucht werden.

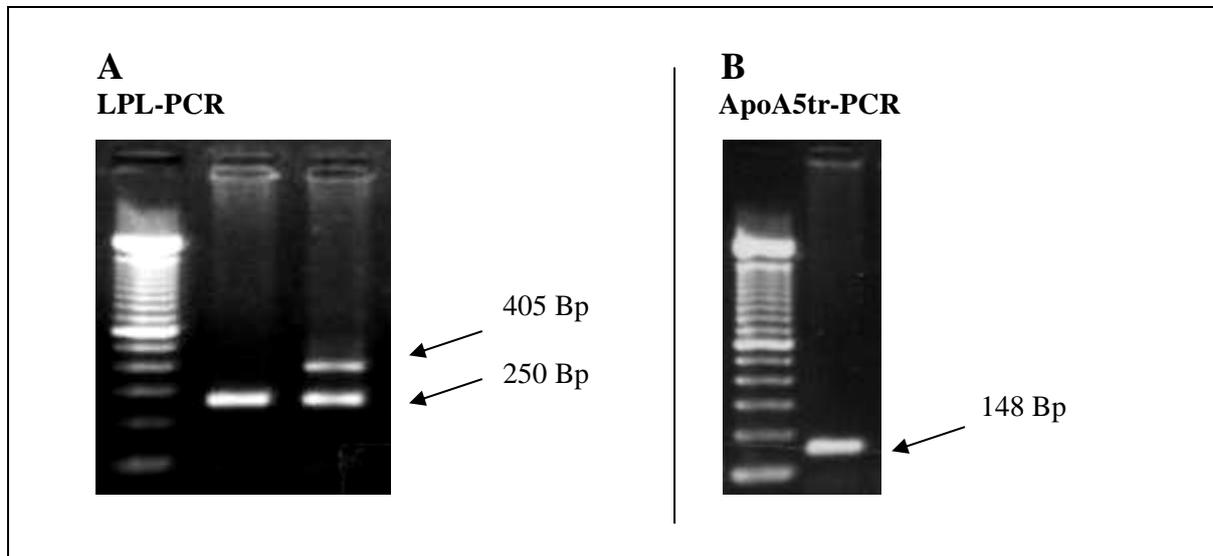
#### 3.2.1 PCR

Für die Feststellung der Genotypen, die bei dieser Mauslinie entstehen können, waren zwei verschiedene PCRs nötig.

Zur Differenzierung der Verhältnisse am Maus-LPL-Lokus wurde eine 3-Primer-PCR verwendet. Das normale Vorliegen beider Allele (LPL2) zeigt sich durch ein Fragment von 250 Bp, wohingegen die Defizienz mit dem Nachweis des Neomycin-Gens mit einem Fragment der Größe 405 Bp angezeigt wird. Bei Mäusen mit heterozygoten Verhältnissen am LPL-Lokus (LPL1) ist folglich sowohl bei 250 Bp als auch bei 405 Bp eine Bande zu erkennen. Tiere mit homozygoter LPL-Defizienz (LPL0) würden dagegen nur ein Fragment von 405 Bp zeigen.

Der Nachweis von ApoA5 als Transgen gelang mit einer 2-Primer-PCR durch Amplifikation eines Fragments von 148 Bp, während bei dessen Fehlen die Tiere kein Transgen exprimierten.

Die genutzten PCRs zur Genotypisierung dieser Linie fasst Abbildung 6 zusammen.

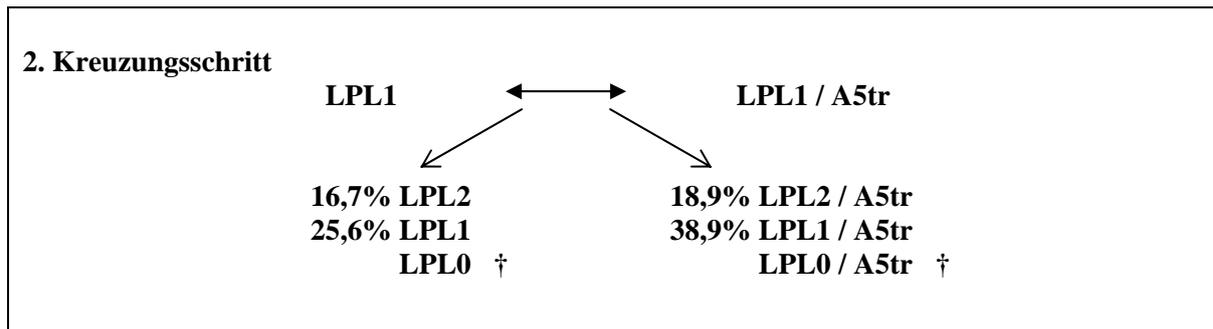


**Abb. 6: PCRs zur Genotypisierung der Mäuse der Linie LPL A5tr.** A: Knockout-PCR für die Bestimmung des Genotyps am Maus-LPL-Lokus: LPL2=250 Bp (mittlere Spur), LPL1=250 Bp und 405 Bp (rechte Spur). B: PCR zur Bestimmung des Transgens: ApoA5tr=148 Bp.

### 3.2.2 Kreuzungsergebnisse

Für die Untersuchung der Auswirkungen von transgener Überexpression von ApoA5 bei unterschiedlichem Hintergrund von LPL wurden LPL-heterozygote Männchen (LPL1) mit ApoA5-Transgen tragenden Weibchen verpaart. Eine direkte Kreuzung mit LPL-defizienten Tieren (LPL0) ist nicht möglich, da diese innerhalb von 24 Stunden postnatal versterben. Im zweiten Zuchtschritt werden nun LPL1-Mäuse ohne ApoA5-Transgen mit LPL1-Mäusen gekreuzt, bei denen das Transgen nachgewiesen wurde. Insgesamt ergaben sich aus 29 Würfen 158 Jungtiere, die bis ins Erwachsenenalter überlebten. Von den bei dem zweiten Zuchtschritt möglichen sechs Genotypen überlebten nur vier die postnatale Zeit, so dass sich deren theoretische prozentuale Verteilung im Erwachsenenalter bei LPL1-Mäusen von 25% auf 33,3% beziehungsweise bei LPL2-Tieren von 12,5% auf 16,7% erhöhte. Die homozygot LPL-defizienten Tiere (LPL0) überlebten unabhängig von einer zur Hälfte wahrscheinlichen ApoA5-Transgen-Expression nicht.

Den zweiten Kreuzungsschritt dieser Linie stellt Abbildung 7 dar.



**Abb. 7: Kreuzungsergebnisse für Mäuse der Linie LPL A5tr.** Prozentuale Verteilung der Mäuse im Erwachsenenalter nach dem 2.Kreuzungsschritt bei 158 Jungtieren aus 29 Würfen je entsprechendem Genotyp. Anzahl der Maus-LPL-Gene: LPL2=Wildtyp-Konstellation am Maus-LPL-Lokus, LPL1=heterozygotes Vorhandensein von LPL, LPL0=homozygote LPL-Defizienz; † Tiere mit LPL0 versterben innerhalb von 24 Stunden postnatal. Transgen: A5tr: humanes ApoA5-Transgen.

### 3.2.3 Lipoproteinprofil

Zur Charakterisierung der Auswirkungen von transgener Überexpression von ApoA5 erfolgte auch hier die Erstellung eines Lipoproteinprofils nach einer Fastenzeit von 6 Stunden. Nach Bestimmung der TG- und Chol- Gehalte der Gesamtplasmen sowie der einzelnen Fraktionen wurden die zum Zeitpunkt der Untersuchung 9-14 Wochen alten Mäuse in Gruppen von 11-23 Tieren pro Genotyp zusammengefasst und miteinander verglichen.

Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Gesamt- und VLDL- TG sowie im Chol- Gehalt der LDL-Fraktion. So führte eine Überexpression von ApoA5 unabhängig vom genetischen Hintergrund der LPL zu einer Senkung der TG im Gesamtplasma (LPL2: 117,3 mg/dl  $\pm$  21,4 mg/dl; LPL2/A5tr: 98,0 mg/dl  $\pm$  20,5 mg/dl;  $p < 0,05$  und LPL1: 263,0 mg/dl  $\pm$  86,4 mg/dl; LPL1/A5tr: 202,7 mg/dl  $\pm$  82,3 mg/dl;  $p < 0,05$ ) und VLDL (LPL2: 65,9 mg/dl  $\pm$  12,2 mg/dl; LPL2/A5tr: 52,7 mg/dl  $\pm$  14,5 mg/dl;  $p < 0,05$  und LPL1: 170,3 mg/dl  $\pm$  61,9 mg/dl; LPL1/A5tr: 128,0 mg/dl  $\pm$  55,3 mg/dl;  $p < 0,05$ ).

Der Vergleich der TG von LPL1- und LPL2- Mäusen bestätigte die Ergebnisse früherer Studien, in denen eine heterozygote LPL-Defizienz zu einer Steigerung der TG in Plasma (LPL1: 263,0 mg/dl  $\pm$  86,4 mg/dl; LPL2: 117,3 mg/dl  $\pm$  21,4 mg/dl;  $p < 0,001$ ) und VLDL-Fraktion (LPL1: 170,3 mg/dl  $\pm$  61,9 mg/dl; LPL2: 65,9 mg/dl  $\pm$  12,2 mg/dl;  $p < 0,001$ ) führte.

Trotz der Reduktion der TG durch transgenes ApoA5 war die Hypertriglyceridämie bei verminderter Expression von LPL bei LPL1/A5tr- im Vergleich zu LPL2/A5tr- Mäusen weiterhin ausgeprägt (Gesamt-TG: LPL1/A5tr: 202,7 mg/dl  $\pm$  82,3 mg/dl; LPL2/A5tr: 98,0 mg/dl  $\pm$  20,5 mg/dl;  $p < 0,001$ ; VLDL-TG: LPL1/A5tr: 128,0 mg/dl  $\pm$  55,3 mg/dl; LPL2/A5tr: 52,7 mg/dl  $\pm$  14,5 mg/dl;  $p < 0,001$ ).

Daneben zeigte sich ein Effekt von ApoA5-Überexpression in der LDL-Fraktion, deren Gehalt an Chol bei ApoA5-Transgen tragenden Tieren unabhängig von dem hier untersuchten genetischen

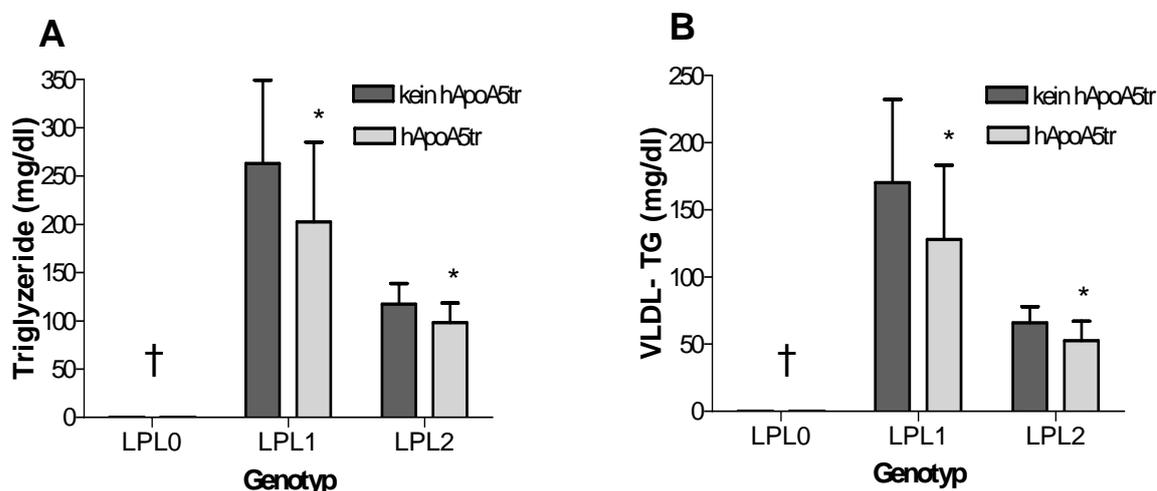
LPL-Hintergrund signifikant vermindert war (LPL2: 24,8 mg/dl  $\pm$  11,3 mg/dl; LPL2/A5tr: 16,1 mg/dl  $\pm$  6,0 mg/dl;  $p=0,01$ ; LPL1: 22,6 mg/dl  $\pm$  11,3 mg/dl; LPL1/A5tr: 15,6 mg/dl  $\pm$  6,2 mg/dl;  $p<0,05$ ), wohingegen das Ausmaß der Expression von LPL keinen Einfluss auf LDL-Chol zu nehmen scheint.

Eine Aufstellung der einzelnen Ergebnisse ist Tabelle 3 zu entnehmen.

	n	Gesamt-TG (mg/dl)	VLDL-TG (mg/dl)	Gesamt-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
LPL2	11	117,3 $\pm$ 21,4	65,9 $\pm$ 12,2	131,4 $\pm$ 20,6	17,8 $\pm$ 5,9	24,8 $\pm$ 11,3	83,7 $\pm$ 22,8
LPL2/A5tr	20	98,0 $\pm$ 20,5	52,7 $\pm$ 14,5	126,4 $\pm$ 3,7	21,4 $\pm$ 7,6	16,1 $\pm$ 6,0	71,8 $\pm$ 19,6
P		< 0,05	< 0,05	ns	ns	0,01	ns
LPL1	16	263,0 $\pm$ 86,4	170,3 $\pm$ 61,9	149,2 $\pm$ 38,4	25,6 $\pm$ 8,0	22,6 $\pm$ 11,3	94,8 $\pm$ 24,1
LPL1/A5tr	23	202,7 $\pm$ 82,3	128,0 $\pm$ 55,3	128,1 $\pm$ 27,0	22,3 $\pm$ 7,1	15,6 $\pm$ 6,2	85,3 $\pm$ 24,4
p		< 0,05	< 0,05	ns	ns	< 0,05	ns

**Tab. 3: Plasmalipoproteinspiegel der Mäuse der Linie LPL A5tr.** TG: Triglyzeride, C: Cholesterol, ns: nicht signifikant. Die angegebenen Werte zeigen Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der 11-23 untersuchten Tiere pro Genotyp. n: Tierzahlen pro jeweiligem Genotyp. Anzahl der Maus-LPL-Gene: LPL2=Wildtyp-Konstellation am Maus-LPL-Lokus, LPL1=heterozygotes Vorhandensein von LPL; Transgen: A5tr: humanes ApoA5-Transgen.

Die folgende Abbildung 8 stellt die signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen innerhalb des Gesamtplasmas und der VLDL-Fraktion graphisch dar.



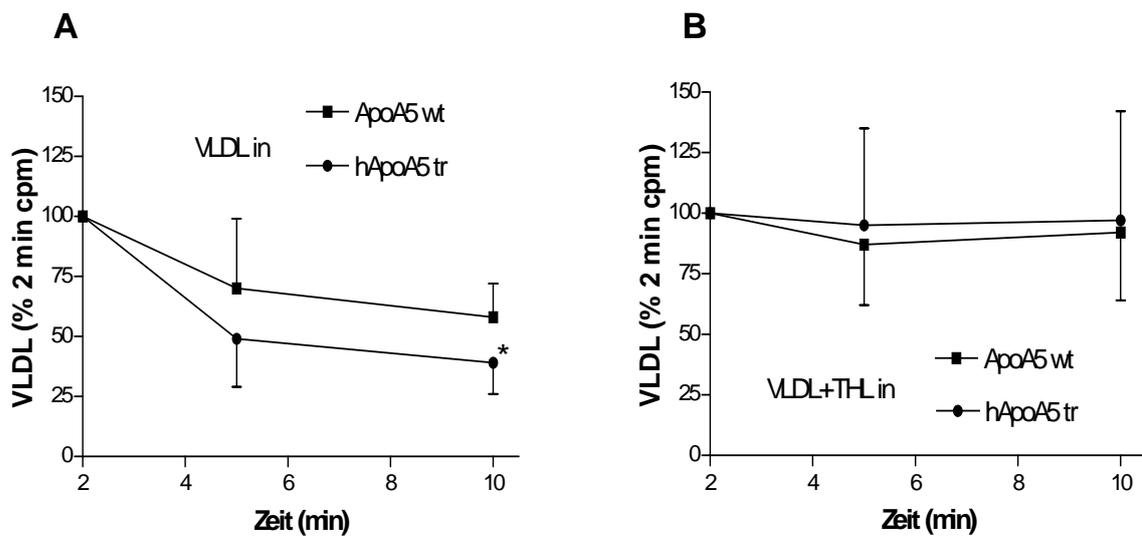
**Abb. 8: Triglyzerid-Spiegel bei unterschiedlichem genetischen Hintergrund für LPL mit und ohne Überexpression von ApoA5.** A: TG-Spiegel im Plasma. B: TG-Spiegel in der VLDL-Fraktion. Die Daten geben jeweils Mittelwert und Standardabweichung der 10-23 Tiere pro untersuchtem Genotyp an; T-Test: \* $p<0,05$ . Anzahl der Maus-LPL-Gene: LPL2=Wildtyp-Konstellation am Maus-LPL-Lokus, LPL1=heterozygotes Vorhandensein von LPL, LPL0=homozygote LPL-Defizienz; † Tiere mit LPL0 versterben innerhalb von 24 Stunden postnatal. Transgen: A5tr: humanes ApoA5-Transgen.

### 3.3 Abbaustudie mit radioaktiv markierten VLDL-Triglyzeriden

Ziel dieser Untersuchung war es, festzustellen, ob ApoA5 in der Lage ist, den VLDL-Turnover unabhängig von der plasmatischen Hydrolyse durch LPL zu steigern. Dazu wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Wirkung einer fehlenden Aktivität von LPL auf den Plasmaspiegel von VLDL-TG sowie deren Aufnahme in Organe bei ApoA5-Transgen tragenden Tieren untersucht und mit Wildtyptieren verglichen werden kann. Den Mäusen beider nach Genotyp zusammengefassten Gruppen wurde jeweils zur Hälfte THL injiziert, das bereits in kleinen Konzentrationen die LPL inhibiert. Zwei Minuten später erfolgte bei allen Tieren die Injektion von *in vivo* radioaktiv markierten ApoA5-defizienten  $^3\text{H-TG-VLDL}$ , deren Aktivität im Plasma durch Blutentnahmen nach weiteren 2, 5 und 10 min sowie in mehreren Organen nach der letzten Blutentnahme bestimmt wurde. Die in den Organen bestimmten Aktivitäten wurden für bessere Vergleichsmöglichkeiten bei Wildtyptieren, denen kein THL gespritzt wurde, gleich 100% gesetzt. Die bei den anderen Gruppen gemessenen Werte konnten dazu ins Verhältnis gebracht werden. Zur Auswertung der Plasmaproben wurde jeweils die Aktivität bei der ersten Blutentnahme nach 2 min gleich 100% gesetzt und deren Verlauf pro beobachtete Gruppe dargestellt.

#### 3.3.1 Plasmatische Clearance von $^3\text{H-TG-VLDL}$

Es zeigte sich bei beiden untersuchten Genotypen ohne die vorherige Injektion von THL eine anhaltende Abnahme der Aktivität im Plasma über den gesamten Beobachtungszeitraum, wobei der VLDL-Katabolismus bei ApoA5-Transgen tragenden Tieren schneller war (bei 10 min: ApoA5wt:  $58 \pm 14\%$ , hApoA5tr:  $39 \pm 13\%$ ;  $p < 0,05$ ). Unter den Tieren, deren LPL mit THL zuvor inhibiert worden war, kam es unabhängig vom genetischen Hintergrund nach der ersten Blutentnahme zu nahezu keiner Abnahme der Aktivität im Plasma mehr, wobei die Unterschiede zwischen den Genotypen aufgehoben waren (bei 10 min: ApoA5wt:  $92 \pm 28\%$ , hApoA5tr  $97 \pm 45\%$ ). Die Graphik zeigt den zeitlichen Verlauf der plasmatischen Aktivität der  $^3\text{H-TG-VLDL}$  in Prozent der 2-Minuten-Aktivität.



**Abb. 9: Plasmatische Clearance von ApoA5-defizienter Maus-VLDL in ApoA5-Wildtyp- und ApoA5-Transgen-Tieren.** A:  $^3\text{H}$ -TG-VLDL-Clearance ohne vorherige Zugabe von THL. B: VLDL-Clearance nach vorheriger Zugabe von THL. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung, T-Test: \* $p < 0,05$ .

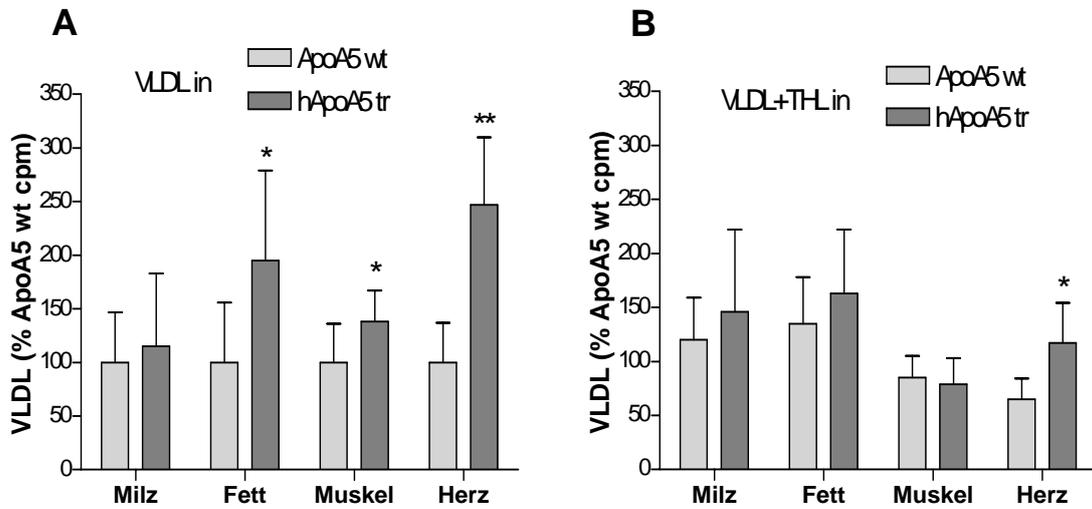
### 3.3.2 Organaufnahme von $^3\text{H}$ -TG-VLDL

Die Tiere mit transgener Expression von ApoA5 hatten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine vermehrte Aufnahme der VLDL-TG in allen untersuchten Organen, wobei sich in Herz ( $p=0,001$ ), Muskel und Fettgewebe ( $p < 0,05$ ) signifikante Unterschiede boten.

Unter den betrachteten Wildtyp-Tieren wiesen jene mit vorheriger Injektion von THL eine im Mittel um 35% geringere Aufnahme der markierten TG im Herzen auf ( $p < 0,05$ ). Auch im Muskel wurden geringere Aktivitäten gemessen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Durch Injektion von THL kam es auch vor ApoA5-transgenen genetischem Hintergrund zu einer signifikanten Reduktion der Aktivitätsaufnahme im Herzen um 37% ( $p < 0,05$ ) und im Muskel um 43% ( $p < 0,01$ ). Bei Vergleich beider Genotypen waren nach THL-Injektion die Unterschiede in den Organaufnahmen bis auf die Aktivität im Herzen aufgehoben.

In Lunge, Leber und Milz zeigten sich sowohl unter den untersuchten Genotypen als auch nach THL-Injektion keine signifikanten Veränderungen.



**Abb. 10: Organaufnahme von ApoA5-defizienter Maus-VLDL in ApoA5-Wildtyp- und ApoA5-Transgen-Tieren.** A: Aufnahme von  $^3\text{H-TG-VLDL}$  ohne vorherige Zugabe von THL. B: Aufnahme nach vorheriger Zugabe von THL. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung in Prozent ApoA5wt von jeweils 6 untersuchten Tieren pro Genotyp, T-Test: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen zwischen ApoA5 und LPL *in vivo* zu untersuchen. Sowohl für ApoA5 als auch für LPL ist es in der Vergangenheit gelungen, ihre wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel bei Mensch und Tier anhand von Versuchen sowie tierexperimentellen und epidemiologischen Studien zu belegen. Neben der schon seit längerem bekannten TG-senkenden Funktion der LPL (Brunzell u. Deeb 2001) ist eine derartige Funktion auch für das vor kurzem entdeckte Apolipoprotein ApoA5 beschrieben worden (Pennacchio et al. 2001). Der Mechanismus, über den ApoA5 in der Lage ist, die TG zu senken, ist dabei bis heute nicht genau geklärt. Vorstellbar sind Inhibitionen der intestinalen Absorption von Chylomikronen oder auch der hepatischen VLDL-Produktion, wie auch ein gesteigerter Metabolismus dieser Partikel. Nicht zuletzt wären auch kombinierte Effekte zur Senkung der TG durch ApoA5 denkbar. Ein direkter Effekt von ApoA5 auf die intestinale Lipidresorption wurde bislang nicht gezeigt und ist auch aufgrund der fehlenden intestinalen Expression eher unwahrscheinlich. Auch die Beobachtung, dass es durch adenoviral-vermittelte Überexpression von ApoA5 zu einer um 30% verminderten VLDL-Produktionsrate kam (Schaap et al. 2004), konnte in weiteren Studien nicht bestätigt werden (Fruchart-Najib et al. 2004). Im Gegensatz dazu waren die Beobachtungen hinsichtlich des Katabolismus einheitlich. Die transgene oder adenoviral-vermittelte Überexpression führte in zwei neueren Studien zu einem gesteigerten Katabolismus von VLDL (Fruchart-Najib *et al.* 2004, Schaap *et al.* 2004). Diese Ergebnisse lassen eine Wirkung des ApoA5 über eine gesteigerte Effizienz der plasmatischen TG-Hydrolyse vermuten. Da LPL als zentrales Enzym im Stoffwechsel der Lipoproteine hierbei eine entscheidende Rolle spielt, sind Interaktionen zwischen ApoA5 und LPL durchaus denkbar und könnten zur Klärung des Mechanismus, über den ApoA5 zur Senkung der TG-Spiegel im Plasma führt, beitragen.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Funktion des ApoA5 von dem Vorhandensein aktiver LPL wurde eine Abbaustudie mit Mäusen durchgeführt, die humanes ApoA5 als Transgen exprimieren. Zu diesem Zweck wurde <sup>3</sup>H-TG-VLDL mit Hilfe von ApoA5-defizienten Tieren *in vivo* gewonnen und den ApoA5<sup>tr</sup>-Tieren injiziert. Bei der Hälfte der untersuchten Mäuse war deren LPL zuvor mit Tetrahydrolipstatin (THL) inhibiert worden. Die Auswertung der plasmatischen Clearance der markierten TG-VLDL sowie deren Organaufnahme zeigten deutlich, dass für den durch ApoA5 signifikant gesteigerten Turnover von VLDL-TG das Vorhandensein aktiver LPL *in vivo* eine prinzipielle Voraussetzung ist.

Um die Interaktion zwischen ApoA5 und LPL *in vivo* weiter untersuchen zu können, wurden zwei neue Mausmodelle etabliert:

Beim ersten Modell konnte durch Einkreuzen des humanen LPL-Gens (Levak-Frank et al. 1995) in ApoA5-defizienten Hintergrund (Pennacchio et al. 2001) der Effekt von überexprimierter LPL bei

verschiedenen Verhältnissen am ApoA5-Gen-Lokus beobachtet werden. Hierzu wurden TG- und Chol- Gehalt im Gesamtplasma sowie in den einzelnen Lipoproteinfraktionen nach einer Fastenzeit von 6 Stunden bestimmt und die Werte der nach Genotyp zusammengefassten Gruppen miteinander verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Plasma- und VLDL- TG sowohl bei ApoA5-defizienten, heterozygoten als auch Wildtyp-Tieren. Gesteigerte LPL-Aktivität war hierbei in der Lage, die Hypertriglyzeridämie bei ApoA5-defizienten Tieren komplett zu normalisieren, indem es die TG im Plasma um 69% und die in der VLDL-Fraktion um 78% senkte. Zur Etablierung einer zweiten Mauslinie mit umgekehrten Verhältnissen wurden Tiere mit Expression des humanen ApoA5-Transgens (Pennacchio et al. 2001) mit LPL-defizienten Tieren (Weinstock et al. 1995) gekreuzt. Es zeigte sich bei der Auswertung der Zuchten zunächst, dass ApoA5 die homozygot LPL-defizienten Tiere nicht vor dem neonatalen Tod bewahren konnte. Bei den Untersuchungen der Lipoproteinprofile der verbleibenden 4 Genotypen war eine signifikante Reduktion der TG-Spiegel in Plasma- und VLDL- Fraktion festzustellen. Vor heterozygotem LPL-defizientem Hintergrund kam es zu einer Senkung der TG im Plasma um 23% und in der VLDL-Fraktion um 25%. Die durch ApoA5 vermittelten Effekte sind demnach durch geringe LPL-Konzentrationen limitiert.

Beide Mausmodelle zusammen sowie die Abbaustudie an ApoA5-transgenen Mäusen unterstützen die These, dass die durch ApoA5 vermittelten Effekte auf die plasmatischen TG-Spiegel wie sie bereits vielfach beschrieben und auch in dieser Arbeit bestätigt wurden, vom Vorhandensein von LPL *in vivo* abhängig sind, wobei letzterer eine zentrale Rolle im Katabolismus TG-reicher Lipoproteine zugeschrieben wird. ApoA5 ist folglich nicht selber in der Lage, über eine eigene Hydrolyse von TG-reichen Lipoproteinen auf die TG-Spiegel im Plasma Einfluss zu nehmen, sondern steigert lediglich die Funktionen des natürlichen lipolytischen Systems.

Der Mechanismus, über den diese Interaktion zwischen ApoA5 und LPL zu einer gesteigerten Hydrolyse von TG führt, bleibt dabei unklar. Es wären dabei verschiedene Ansätze denkbar. Zum einen könnte ApoA5 über eine direkte Modulation der LPL-Aktivität die Hydrolyserate des Enzyms steigern, zum anderen wären aber auch indirekte Effekte möglich. So könnten Veränderungen in der Produktionsrate oder auch der Plasmaspiegel von anderen Apolipoproteinen die Effekte erklären. Derartige Vermutungen wurden bereits aufgestellt, wobei aber eine wenigstens in Teilen unabhängige Funktion des ApoA5 postuliert wurde (Baroukh *et al.* 2004, Pennacchio *et al.* 2001, Schaap *et al.* 2004). In diesem Rahmen wäre es möglich, dass ApoA5 TG-reiche Lipoproteine zum Ort der Hydrolyse entsprechend der endothelial gebundenen LPL leitet und/oder dort die Bindung der Lipoproteine an die LPL oder an HSPG, an die wiederum LPL bindet (Olivecrona *et al.* 1995), verstärkt. Derartige Ligandenfunktionen, wie sie auch bei anderen Apolipoproteinen auftreten, könnten damit die plasmatische Hydrolyse von TG oder auch die Aufnahme von Remnants ins Gewebe verstärken.

Neben diesen Wirkungen von ApoA5 auf den TG-Metabolismus zeigten sich auch Effekte auf dem Chol-Gehalt der LDL-Fraktion. So führte die transgene Überexpression von ApoA5 unabhängig von dem untersuchten LPL-genetischen Hintergrund im zweiten Mausmodell bei den überlebenden Tieren zu einer signifikanten Reduktion des LDL-Chol-Spiegels, bei heterozygoter LPL-Defizienz um 31% und bei Wildtypverhältnissen am LPL-Lokus um 35%. Eine derartige Beeinflussung auf dem Chol-Metabolismus wurde auch im ersten Mausmodell bestätigt. Hier kam es bei homozygoter ApoA5-Defizienz zu einem signifikanten Anstieg des Chol-Gehalts in der LDL-Fraktion um 79% im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren. Auch bei der Betrachtung der entsprechenden genetischen Hintergründe mit LPL-Überexpression zeigte sich eine wenn auch nicht signifikante Steigerung des LDL-Chol um 43%. Diese Chol-senkenden Effekte von ApoA5 auf die LDL-Fraktion *in vivo* sind scheinbar von der Menge der zur Verfügung stehenden LPL unabhängig. Es sind verschiedene Erklärungsmöglichkeiten denkbar. Zum einen könnte eine verminderte Produktion von LDL-Chol zu derartigen Effekten führen, was jedoch eher unwahrscheinlich scheint angesichts der Beobachtungen, dass bei einem durch ApoA5 vermittelten gesteigerten VLDL-Katabolismus sogar eher mehr Vorstufen für die Synthese von LDL zur Verfügung stünden. Auf der anderen Seite würde auch ein vermehrter LDL-Katabolismus mit verringertem LDL-Chol einhergehen. Eine bei verstärkter Hydrolyse von TG beschriebene gesteigerte Durchlässigkeit des Endothels für LDL würde zwar zu einer Reduktion des LDL-Chol führen. Dieser Mechanismus wäre jedoch von der hydrolytischen Funktion der LPL abhängig, wohingegen die Beobachtungen in den beiden Mausmodellen keinen Zusammenhang mit einer LPL-Interaktion vermuten lassen. Stattdessen würde sich eine vermehrte LDL-Clearance auch durch eine gesteigerte Expression des LDL-Rezeptors in der Leber oder eine Beeinflussung des LDL-Rezeptors erklären lassen. Da ApoA5 selbst kaum auf der Oberfläche von LDL vorkommt, ist eine direkte Interaktion mit dem Rezeptor im Sinne einer Ligandenfunktion eher unwahrscheinlich. Dagegen könnte ApoA5 über eine Wechselwirkung mit ApoB100 die Endozytose von LDL über den LDL-Rezeptor deutlich steigern und damit die bei verschiedenem ApoA5-genetischen Hintergrund beobachteten Effekte erklären. Da jedoch keine Untersuchungen an homozygot LPL-defizienten Tieren (LPL0) möglich waren und dementsprechend auch bei allen getesteten Mäusen LPL exprimiert wurde, kann ein zumindest in Teilen LPL-vermittelter Mechanismus nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen an LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen könnten in diesem Zusammenhang Aufschluss bieten.

Es bestätigten sich in den Versuchen die wichtige Rolle von sowohl ApoA5 als auch LPL in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Überexpression von LPL führte zu einer signifikanten Reduktion der TG-Spiegel im Plasma und damit zu einem eher antiatherogenen Lipidprofil, auch wenn der Effekt auf den HDL-Chol-Gehalt nur vor ApoA5-defizientem Hintergrund signifikant in Erscheinung trat. Hier bestätigte sich die inverse Korrelation zwischen Plasma-TG und HDL-Chol.

Eine Erklärung hierfür könnte das vermehrte Vorhandensein von im VLDL-Katabolismus entstehenden Ausgangsstoffen für die HDL-Synthese sein.

Auch die durch ApoA5 gesteigerte Effektivität der TG-Hydrolyse durch LPL trägt zur Senkung der TG-Spiegel im Plasma bei. Unabhängig von LPL scheint ApoA5 daneben auch über die Senkung des LDL-Chol-Gehalts antiatherogene Eigenschaften zu besitzen. Über die Modulation von Aktivität oder Expression von LPL oder auch ApoA5 bieten sich damit mögliche Ansätze, der Entstehung und dem Voranschreiten von atherosklerotischen Gefäßveränderungen und so auch dem Risiko für koronare Herzkrankheit (KHK) klinisch entgegenzuwirken.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bieten neue Aspekte zum Verständnis der Rollen von ApoA5 und LPL im Fettstoffwechsel. Insbesondere konnten weitere Einblicke in den von der LPL kontrollierten TG-Metabolismus gewonnen werden. Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen ApoA5 und LPL *in vivo* haben damit auch einen Beitrag zur Klärung der Pathogenese von Familiärer Kombiniertes Hyperlipoproteinämie (FCHL) und Atherosklerose geleistet.

## 5 Zusammenfassung

Die zentrale Rolle der Lipoproteinlipase (LPL) im Metabolismus der triglyzeridreichen Plasmalipide ist bereits lange bekannt. Ein neu entdecktes Apolipoprotein ApoA5 scheint die Plasma-TG-Spiegel ähnlich stark zu beeinflussen. In einer früheren Arbeit führte eine Überexpression von ApoA5 zu einer Senkung der Plasma-TG auf etwa ein Drittel derer der Kontrollgruppe, wohingegen bei homozygot ApoA5-defizienten Tieren eine Vervierfachung beobachtet wurde (Pennacchio et al. 2001). Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Rolle Interaktionen zwischen ApoA5 und LPL *in vivo* bei den durch unterschiedliche ApoA5-Expression nachgewiesenen Effekten spielen.

In einer Abbaustudie mit radioaktiv markierten <sup>3</sup>H-VLDL-TG konnte die Abhängigkeit der Funktion des ApoA5 von dem Vorhandensein aktiver LPL bei ApoA5-transgenen Tieren untersucht und mit Wildtyp-Tieren verglichen werden. Bei der Hälfte der untersuchten Mäuse war die mauseigene LPL zuvor pharmakologisch mit Tetrahydrolipstatin (THL) inhibiert worden. Die Auswertung der plasmatischen Clearance der markierten TG-VLDL sowie deren Organaufnahme zeigten deutlich, dass für den durch ApoA5 signifikant gesteigerten Turnover von VLDL-TG das Vorhandensein aktiver LPL *in vivo* Voraussetzung war.

Um weitere Erkenntnisse zur Interaktion zwischen ApoA5 und LPL unter physiologischen Bedingungen zu erlangen, wurden zwei neue Mauslinien etabliert und deren Lipoproteinprofile nach einer Fastenzeit von 6 Stunden untersucht.

Das erste Mausmodell entstand durch Einkreuzen humaner LPL vor ApoA5-defizientem Hintergrund (hLPL A5ko). Durch die Überexpression humaner LPL kam es bei homozygot ApoA5-defizienten Tieren zu einer Normalisierung der TG-Spiegel, wobei der TG-Gehalt signifikant im Plasma um 69% und in der VLDL-Fraktion um 78% reduziert war.

Zur Etablierung der zweiten Mauslinie wurde das humane ApoA5-Transgen in LPL-defiziente Tiere eingekreuzt (LPL A5tr). Die Überexpression von ApoA5 war jedoch nicht in der Lage, homozygot LPL-defiziente Tiere vor dem neonatalen Tod zu bewahren. Untersuchungen der überlebenden Genotypen zeigten einen senkenden Effekt von humanem ApoA5 auf die TG-Spiegel. Daneben waren unabhängig von den hier untersuchten Verhältnissen am LPL-Lokus durch ApoA5 vermittelte verringerte LDL-Chol-Spiegel zu beobachten.

Die vorliegenden Daten zeigen also, dass ApoA5 die Plasma-Triglyzeridspiegel zwar stark beeinflussen, seine Funktion jedoch nur in Anwesenheit aktiver LPL ausüben kann. Andersherum kann eine verstärkte LPL-Aktivität einen Mangel an ApoA5 vollständig kompensieren. Diese Ergebnisse zur Interaktion zwischen ApoA5 und LPL *in vivo* haben damit weiter zur Klärung der Funktion beider Proteine in der Pathogenese von FCHL und Atherosklerose beitragen können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aalto-Setälä, K, EA Fisher, X Chen, T Chajek-Shaul, T Hayek, R Zechner, A Walsh, R Ramakrishnan, HN Ginsberg und JL Breslow (1992) Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) ciii transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo ciii and reduced apo e on the particles. *J Clin Invest.* 90:1889-1900.
- Austin, MA, PJ Talmud, FM Farin, DA Nickerson, KL Edwards, D Leonetti, MJ McNeely, HM Viernes, SE Humphries und WY Fujimoto (2004) Association of apolipoprotein a5 variants with ldl particle size and triglyceride in japanese americans. *Biochim Biophys Acta.* 1688:1-9.
- Baroukh, N, E Bauge, J Akiyama, J Chang, V Afzal, JC Fruchart, EM Rubin, J Fruchart-Najib und LA Pennacchio (2004) Analysis of apolipoprotein a5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1297-1302.
- Baum, L, B Tomlinson und GN Thomas (2003) ApoA5-1131t>c polymorphism is associated with triglyceride levels in chinese men. *Clin Genet.* 63:377-379.
- Beisiegel, U (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 6:117-122.
- Beisiegel, U, W Weber und G Bengtsson-Olivecrona (1991) Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:8342-8346.
- Benlian, P, JL De Gennes, L Foubert, H Zhang, SE Gagne und M Hayden (1996) Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *N Engl J Med.* 335:848-854.
- Brewer, HB, Jr., R Shulman, P Herbert, R Ronan und K Wehrly (1974) The complete amino acid sequence of alanine apolipoprotein (apoc-3), and apolipoprotein from human plasma very low density lipoproteins. *J Biol Chem.* 249:4975-4984.
- Brown, WV und ML Baginsky (1972) Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 46:375-382.
- Bruns, GA, SK Karathanasis und JL Breslow (1984) Human apolipoprotein a-i--c-iii gene complex is located on chromosome 11. *Arteriosclerosis.* 4:97-102.
- Brunzell, JD und S Deeb (2001) Familial lipoprotein lipase deficiency, apo cii deficiency, and hepatic lipase deficiency. *In The metabolic and molecular bases of inherited disease.* Vol. 2. WL Sly, editor. McGraw-Hill, New York. 2789-2816.
- Bundesamt (2005) Pressemitteilung vom 14. Februar 2005. Statistisches Bundesamt, Pressestelle, Wiesbaden.
- Chajek, T, O Stein und Y Stein (1977) Pre- and post-natal development of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride hydrolase activity in rat tissues. *Atherosclerosis.* 26:549-561.
- Coleman, T, RL Seip, JM Gimble, D Lee, N Maeda und CF Semenkovich (1995) CooH-terminal disruption of lipoprotein lipase in mice is lethal in homozygotes, but heterozygotes have elevated triglycerides and impaired enzyme activity. *J Biol Chem.* 270:12518-12525.
- Dugi, KA, HL Dichek, GD Talley, HB Brewer, Jr. und S Santamarina-Fojo (1992) Human lipoprotein lipase: The loop covering the catalytic site is essential for interaction with lipid substrates. *J Biol Chem.* 267:25086-25091.

- Enerback, S, H Semb, J Tavernier, G Bjursell und T Olivecrona (1988) Tissue-specific regulation of guinea pig lipoprotein lipase; effects of nutritional state and of tumor necrosis factor on mrna levels in adipose tissue, heart and liver. *Gene*. 64:97-106.
- Evans, D, A Buchwald und FU Beil (2003) The single nucleotide polymorphism -1131t>c in the apolipoprotein a5 (apoa5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia. *J Mol Med*. 81:645-654.
- Fan, J, H Unoki, N Kojima, H Sun, H Shimoyamada, H Deng, M Okazaki, H Shikama, N Yamada und T Watanabe (2001) Overexpression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits inhibits diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Biol Chem*. 26:26.
- Faustinella, F, LC Smith, CF Semenkovich und L Chan (1991) Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. *J Biol Chem*. 266:9481-9485.
- Felts, JM, H Itakura und RT Crane (1975) The mechanism of assimilation of constituents of chylomicrons, very low density lipoproteins and remnants - a new theory. *Biochem Biophys Res Commun*. 66:1467-1475.
- Fredrickson, DS, JL Goldstein und MS Brown (1978) The familial hyperlipoproteinemias. *In* The metabolic basis of inherited disease. Vol. 4. JB Stanbury, JB Wyngaarden und DS Fredrickson, editors. McGraw-Hill, New York. 604-655.
- Fruchart, JC, P Duriez und B Staels (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 10:245-257.
- Fruchart-Najib, J, E Bauge, LS Niculescu, T Pham, B Thomas, C Rommens, Z Majd, B Brewer, LA Pennacchio und JC Fruchart (2004) Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein a5. *Biochem Biophys Res Commun*. 319:397-404.
- Garfinkel, AS und MC Schotz (1987) Lipoprotein lipase. Elsevier, New York:335-357.
- Goldberg, IJ (1996) Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res*. 37:693-707.
- Greenwood, MRC (1985) The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: Lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int J Obes*. 9:67-70.
- Groenendijk, M, RM Cantor, TW de Bruin und GM Dallinga-Thie (2001) The apoai-ciii-aiv gene cluster. *Atherosclerosis*. 157:1-11.
- Hahn, PF (1943) Abolishment of alimentary lipemia following injection of heparin. *Science*. 98:19-20.
- Havel, RJ, HA Eder und JH Bragdon (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 34:1345-1353.
- Havel, RJ, CJ Fielding, T Olivecrona, VG Shore, PE Fielding und T Egelrud (1973) Cofactor activity of protein components of human very low density lipoproteins in the hydrolysis of triglycerides by lipoproteins lipase from different sources. *Biochemistry*. 12:1828-1833.
- Heeren, J, T Grewal, S Jackle und U Beisiegel (2001) Recycling of apolipoprotein e and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem*. 276:42333-42338.
- Heeren, J, A Niemeier, M Merkel und U Beisiegel (2002) Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. *J Mol Med*. 80:576-584.

- Hennig, B, DM Shasby, AB Fulton und AA Spector (1984) Exposure to free fatty acid increases the transfer of albumin across cultured endothelial monolayers. *Arteriosclerosis*. 4:489-497.
- Hokanson, JE und MA Austin (1996) Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: A meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*. 3:213-219.
- Hubacek, JA, Z Skodova, V Adamkova, V Lanska und R Poledne (2004) The influence of apoav polymorphisms (t-1131>c and s19>w) on plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. *Clin Genet*. 65:126-130.
- Humphries, SE, V Nicaud, J Margalef, L Tiret und PJ Talmud (1998) Lipoprotein lipase gene variation is associated with a paternal history of premature coronary artery disease and fasting and postprandial plasma triglycerides: The european atherosclerosis research study (ears). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 18:526-534.
- Issemann, I und S Green (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 347:645-650.
- Johnson, JE, BJ Wold und SD Hauschka (1989) Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 9:3393-3399.
- Kashyap, ML, LS Srivastava, BA Hynd, PS Gartside und G Perisutti (1981) Quantitation of human apolipoprotein c-iii and its subspecies by radioimmunoassay and analytical isoelectric focusing: Abnormal plasma triglyceride-rich lipoprotein apolipoprotein c-iii subspecies concentrations in hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*. 22:800-810.
- Kersten, S, B Desvergne und W Wahli (2000) Roles of ppars in health and disease. *Nature*. 405:421-424.
- Kinnunen, PK und C Ehnolm (1976) Effect of serum and c-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *FEBS Lett*. 65:354-357.
- Kirchgessner, TG, KL Svenson, AJ Lusis und MC Schotz (1987) The sequence of cdna encoding lipoprotein lipase: A member of a lipase gene family. *J Biol Chem*. 262:8463-8466.
- Krauss, RM, PN Herbert, RI Levy und DS Fredrickson (1973) Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins. *Circ Res*. 33:403-411.
- LaRosa, JC, RI Levy, P Herbert, SE Lux und DS Fredrickson (1970) A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun*. 41:57-62.
- Lenich, C, P Brecher, S Makrides, A Chobanian und VI Zannis (1988) Apolipoprotein gene expression in the rabbit: Abundance, size, and distribution of apolipoprotein mRNA species in different tissues. *J Lipid Res*. 29:755-764.
- Levak-Frank, S, H Radner, A Walsh, R Stollberger, G Knipping, G Hoefler, W Sattler, PH Weinstock, JL Breslow und R Zechner (1995) Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice. *J Clin Invest*. 96:976-986.
- Levak-Frank, S, PH Weinstock, T Hayek, W Hofmann, R Verdery, JL Breslow und R Zechner (1997) Induced mutant mice expressing lipoprotein lipase exclusively in muscle have subnormal triglycerides yet reduced hdl-cholesterol levels in plasma. *J Biol Chem*. 272:17182-17190.
- Löffler, G und PE Petrides (1998) *Biochemie und pathobiochemie*. Springer- Verlag, Berlin Heidelberg. 469-481 pp.

- Lookene, A, N Skottova und G Olivecrona (1994) Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (orlistat). *Eur J Biochem.* 222:395-403.
- Maeda, N, H Li, D Lee, P Oliver, SH Quarfordt und J Osada (1994) Targeted disruption of the apolipoprotein c-iii gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem.* 269:23610-23616.
- Masuno, H, T Tsujita, H Nakanishi, A Yoshida, R Fukunishi und H Okuda (1984) Lipoprotein lipase-like activity in the liver of mice with sarcoma 180. *J Lipid Res.* 25:419-427.
- McConathy, WJ, JC Gesquiere, H Bass, A Tartar, JC Fruchart und CS Wang (1992) Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein c-iii. *J Lipid Res.* 33:995-1003.
- Merkel, M, RH Eckel und IJ Goldberg (2002a) Lipoprotein lipase: Genetics, lipid uptake and regulation. *J Lipid Res.* 43:1997-2006.
- Merkel, M, J Heeren, W Dudeck, F Rinninger, H Radner, JL Breslow, G I.J., R Zechner und H Greten (2002b) 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.* 277:7405-7411.
- Merkel, M, PH Weinstock, T Chajek-Shaul, H Radner, B Yin, JL Breslow und IJ Goldberg (1998) Lipoprotein lipase expression exclusively in liver: A mouse model for metabolism in the neonatal period and during cachexia. *J Clin Invest.* 102:893-901.
- Nilsson-Ehle, P und MC Schotz (1976) A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 17:536-541.
- Olivecrona, G, M Hultin, R Savonen, N Skottova, A Lookene, Y Tugrul und T Olivecrona (1995) Transport of lipoprotein lipase in plasma and lipoprotein metabolism. *In Atherosclerosis x.* W F.P., J Davignon und A Sniderman, editors. Elsevier, New York. 250-253.
- Olivecrona, G und T Olivecrona (1995) Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 6:291-305.
- Pennacchio, LA, M Olivier, JA Hubacek, JC Cohen, DR Cox, JC Fruchart, RM Krauss und EM Rubin (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science.* 294:169-173.
- Pennacchio, LA und EM Rubin (2003) Apolipoprotein a5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:529-534.
- Pentikainen, MO, R Oksjoki, K Oorni und PT Kovanen (2002) Lipoprotein lipase in the arterial wall: Linking ldl to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:211-217.
- Peterson, J, WY Fujimoto und JD Brunzell (1992) Human lipoproteinlipase: Relationship of activity, heparin affinity and conformation as studied with monoclonal antibodies. *J Lipid Res.* 33:1165-1171.
- Peterson, J, T Olivecrona und G Bengtsson-Olivecrona (1985) Distribution of lipoprotein lipase and hepatic lipase between plasma and tissues: Effect of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta.* 837:262-270.
- Prieur, X, H Coste und JC Rodriguez (2003) The human apolipoprotein av gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid x-activated receptor response element. *J Biol Chem.* 278:25468-25480.

- Rutledge, JC, MM Woo, AA Rezai, LK Curtiss und IJ Goldberg (1997) Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products. *Circ Res.* 80:819-828.
- Saxena, U und IJ Goldberg (1994) Endothelial cells and atherosclerosis: Lipoprotein metabolism, matrix interactions, and monocyte recruitment. *Curr Opin Lipidol.* 5:316-322.
- Schaap, FG, PC Rensen, PJ Voshol, C Vriens, HN van der Vliet, RA Chamuleau, LM Havekes, AK Groen und KW van Dijk (2004) Apoav reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (vldl-tg) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated vldl-tg hydrolysis. *J Biol Chem.* 279:27941-27947.
- Schonfeld, G, PK George, J Miller, P Reilly und J Witztum (1979) Apolipoprotein c-ii and c-iii levels in hyperlipoproteinemia. *Metabolism.* 28:1001-1010.
- Schoonjans, K, J Peinado-Onsurbe, AM Lefebvre, RA Heyman, M Briggs, S Deeb, B Staels und J Auwerx (1996) Pparalpha and ppargamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a ppre in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15:5336-5348.
- Semenkovich, CF, SH Chen, M Wims, CC Luo, WH Li und L Chan (1989) Lipoprotein lipase and hepatic lipase mRNA tissue specific expression, developmental regulation, and evolution. *J Lipid Res.* 30:423-431.
- Semenkovich, CF, T Coleman und A Daugherty (1998) Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res.* 39:1141-1151.
- Shelburne, F, J Hanks, W Meyers und S Quarfordt (1980) Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. *J Clin Invest.* 65:652-658.
- Shimada, M, S Ishibashi, T Inaba, H Yagyu, K Harada, JI Osuga, K Ohashi, Y Yazaki und N Yamada (1996) Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:7242-7246.
- Shimada, M, H Shimano, T Gotoda, K Yamamoto, M Kawamura, T Inaba, Y Yazaki und N Yamada (1993) Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. *J Biol Chem.* 269:17924-17929.
- Skottova, N, R Savonen, A Lookene, M Hultin und G Olivecrona (1995) Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and chylomicron remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res.* 36:1334-1344.
- Sparkes, RS, S Zollman, I Klisak, TG Kirchgessner, MC Komaromy, T Mohandas, MC Schotz und AJ Lusis (1987) Human genes involved in lipolysis of plasma lipoproteins: Mapping of loci for lipoprotein lipase to 8p22 and hepatic lipase to 15q21. *Genomics.* 1:138-144.
- Sprecher, DL, BV Harris, EA Stein, PS Bellet, LM Keilson und LA Simbartl (1996) Higher triglycerides, lower high-density lipoprotein cholesterol, and higher systolic blood pressure in lipoprotein lipase-deficient heterozygotes. A preliminary report. *Circulation.* 94:3239-3245.
- Staels, B, J Dallongeville, J Auwerx, K Schoonjans, E Leitersdorf und JC Fruchart (1998) Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation.* 98:2088-2093.
- Staels, B, N Vu-Dac, VA Kosykh, R Saladin, JC Fruchart, J Dallongeville und J Auwerx (1995) Fibrates downregulate apolipoprotein c-iii expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme a oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest.* 95:705-712.

- Steinmetz, A und G Utermann (1985) Activation of lecithin: Cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein a-iv. *J Biol Chem.* 260:2258-2264.
- Talmud, PJ, E Hawe, S Martin, M Olivier, GJ Miller, EM Rubin, LA Pennacchio und SE Humphries (2002) Relative contribution of variation within the apoc3/a4/a5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet.* 11:3039-3046.
- van Barlingen, HH, H de Jong, DW Erkelens und TW de Bruin (1996) Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to heparan sulfate: Modulation by apolipoprotein e and apolipoprotein c. *J Lipid Res.* 37:754-763.
- van der Vliet, HN, MG Sammels, AC Leegwater, JH Levels, PH Reitsma, W Boers und RA Chamuleau (2001) Apolipoprotein a-v: A novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem.* 276:44512-44520.
- van der Vliet, HN, FG Schaap, JH Levels, R Ottenhoff, N Looije, JG Wesseling, AK Groen und RA Chamuleau (2002) Adenoviral overexpression of apolipoprotein a-v reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 295:1156-1159.
- van Dijk, KW, MH Hofker und LM Havekes (1999) Dissection of the complex role of apolipoprotein e in lipoprotein metabolism and atherosclerosis using mouse models. *Curr Atheroscler Rep.* 1:101-107.
- Vergnes, L, N Baroukh, MA Ostos, G Castro, N Duverger, MN Nanjee, J Najib, JC Fruchart, NE Miller, MM Zakin und A Ochoa (2000) Expression of human apolipoprotein a-i/c-iii/a-iv gene cluster in mice induces hyperlipidemia but reduces atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2267-2274.
- Vilella, E, J Joven, M Fernandez, S Vilaro, JD Brunzell, T Olivecrona und G Bengtsson-Olivecrona (1993) Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J Lipid Res.* 34:1555-1564.
- Vu-Dac, N, P Gervois, H Jakel, M Nowak, E Bauge, H Dehondt, B Staels, LA Pennacchio, EM Rubin, J Fruchart-Najib und JC Fruchart (2003) Apolipoprotein a5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem.* 278:17982-17985.
- Wang, CS, WJ McConathy, HU Kloer und P Alaupovic (1985) Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein c-iii. *J Clin Invest.* 75:384-390.
- Wang, H und MC Schotz (2002) The lipase gene family. *J Lipid Res.* 43:993-999.
- Weinberg, RB (2002) Apolipoprotein a-iv polymorphisms and diet-gene interactions. *Curr Opin Lipidol.* 13:125-134.
- Weinberg, RB, VR Cook, JA Beckstead, DD Martin, JW Gallagher, GS Shelness und RO Ryan (2003) Structure and interfacial properties of human apolipoprotein a-v. *J Biol Chem.* 278:34438-34444.
- Weinstock, PH, CL Bisgaier, K Aalto-Setälä, H Radner, R Ramakrishnan, S Levak-Frank, AD Essenburg, R Zechner und JL Breslow (1995) Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. *J Clin Invest.* 96:2555-2568.
- Weinstock, PH, CL Bisgaier, T Hayek, K Aalto-Setälä, E Sehayek, L Wu, P Sheffele, M Merkel, AD Essenburg und JL Breslow (1997a) Decreased hdl cholesterol levels but normal lipid absorption, growth, and feeding behavior in apolipoprotein a-iv knockout mice. *J Lipid Res.* 38:1782-1794.

- Weinstock, PH, S Levak-Frank, LC Hudgins, H Radner, JM Friedmann, R Zechner und JL Breslow (1997b) Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10261-10266.
- Windler, E und RJ Havel (1985) Inhibitory effects of c apolipoproteins from rats and humans on the uptake of triglyceride-rich lipoproteins and their remnants by the perfused rat liver. *J Lipid Res.* 26:556-565.
- Wittekoek, ME, SN Pimstone, PW Reymer, L Feuth, GJ Botma, JC Defesche, M Prins, MR Hayden und JJ Kastelein (1998) A common mutation in the lipoprotein lipase gene (n291s) alters the lipoprotein phenotype and risk for cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Circulation.* 97:729-735.
- Wu, DA, X Bu, CH Warden, DD Shen, CY Jeng, WH Sheu, MM Fuh, T Katsuya, VJ Dzau, GM Reaven, AJ Lusis, JI Rotter und YD Chen (1996) Quantitative trait locus mapping of human blood pressure to a genetic region at or near the lipoprotein lipase gene locus on chromosome 8p22. *J Clin Invest.* 97:2111-2118.
- Yagyu, H, S Ishibashi, Z Chen, J Osuga, M Okazaki, S Perrey, T Kitamine, M Shimada, K Ohashi, K Harada, F Shionoiri, N Yahagi, T Gotoda, Y Yazaki und N Yamada (1999) Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice. *J Lipid Res.* 40:1677-1685.
- Yang, CY, ZW Gu, N Valentinova, HJ Pownall, B Lee, M Yang, YH Xie, JR Guyton, TN Vlasik, JC Fruchart und et al. (1993) Human very low density lipoprotein structure: Interaction of the c apolipoproteins with apolipoprotein b-100. *J Lipid Res.* 34:1311-1321.
- Zilversmit, DB (1979) Atherogenesis: A postprandial phenomenon. *Circulation.* 60:473-485.
- Zsigmond, E, E Scheffler, TM Forte, R Potenz, W Wu und L Chan (1994) Transgenic mice expressing human lipoprotein lipase driven by the mouse metallothionein promoter. A phenotype associated with increased perinatal mortality and reduced plasma very low density lipoprotein of normal size. *J Biol Chem.* 269:18757-18766.

## 7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Einteilung, Zusammensetzung und Funktionen der Lipoproteine.....	S. 3
Tabelle 2: Plasmalipoproteinspiegel der Mäuse der Linie hLPL A5ko.....	S.28
Tabelle 3: Plasmalipoproteinspiegel der Mäuse der Linie LPL A5tr.....	S.32
Abbildung 1: Mauslinie hLPL A5ko: Kreuzungsstrategie zur Generierung von Mäusen mit und ohne Expression von humaner LPL vor dem Hintergrund von ApoA5-Defizienz.....	S.18
Abbildung 2: Mauslinie LPL A5tr: Kreuzungsstrategie zur Generierung von Mäusen mit und ohne transgener Expression von ApoA5 vor dem Hintergrund von LPL-Defizienz.....	S.19
Abbildung 3: PCRs zur Genotypisierung der Mäuse der Linie hLPL A5ko.....	S.27
Abbildung 4: Kreuzungsergebnisse für Mäuse der Linie hLPL A5ko.....	S.27
Abbildung 5: Triglyzerid-Spiegel bei unterschiedlichem ApoA5-genetischen Hintergrund mit und ohne Überexpression humaner LPL.....	S.29
Abbildung 6: PCRs zur Genotypisierung der Mäuse der Linie LPL A5tr.....	S.30
Abbildung 7: Kreuzungsergebnisse für Mäuse der Linie LPL A5tr.....	S.31
Abbildung 8: Triglyzerid-Spiegel bei unterschiedlichem genetischen Hintergrund für LPL mit und ohne Überexpression von ApoA5.....	S.32
Abbildung 9: Plasmatische Clearance von ApoA5-defizienter Maus-VLDL in ApoA5-Wildtyp- und ApoA5-Transgen- Tieren.....	S.34
Abbildung 10: Organaufnahme von ApoA5-defizienter Maus-VLDL in ApoA5-Wildtyp- und ApoA5-Transgen- Tieren.....	S.35

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, deren breite Unterstützung und Hilfe ich bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit erfahren habe.

Mein großer Dank gilt allen voran Herrn PD Dr. Martin Merkel und dem Bereich Endokrinologie und Diabetologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Beil für die interessante Aufgabenstellung und die fachlich umfassende gute Betreuung sowie die Ratschläge bei der Fertigstellung.

Für die Einarbeitung in den Laboralltag sowie die zuverlässige technische Unterstützung bei der praktischen Durchführung möchte ich mich bei Britta Löffler und Joanna Schmidt und meinen Kommilitonen Nathalie Fabig, Daniel Kayser und Malte Kluger bedanken.

Gedankt sei auch Herrn PD Dr. Jörg Heeren und Frau Sandra Ehret aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Unterstützung und fachliche Beratung insbesondere im Rahmen der Abbaustudie.

Dank aussprechen möchte ich auch den Mitarbeitern der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für ihren professionellen Umgang mit den Mäusen.

Daneben gilt mein Dank André Wowereit, der mir bei Computerproblemen und beim Einscannen der Bilder zur Seite stand.

Nicht zuletzt geht ein großes Dankeschön an meine Familie, die mich die gesamte Zeit über mit Motivation und Geduld begleitet hat.

## **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.

Unterschrift: *Gesa Geppert*

