

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Aus dem Zentrum für Experimentelle Medizin,
Institut für Biochemie und Molekularbiologie II – Molekulare Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Die Funktion von Apolipoprotein A5 im Lipoproteinstoffwechsel und bei der Atherogenese in einem Apolipoprotein E - defizienten Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Anika Naumann
aus Staßfurt

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.12.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Priv.- Doz. Dr. med. Martin Merkel

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Priv.- Doz. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Franz Rinninger

Inhaltsverzeichnis

FRAGESTELLUNG	6
1 EINLEITUNG	7
1.1 BESTANDTEILE DES FETTSTOFFWECHSELS	7
1.2 LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL	10
1.2.1 Der exogene Weg	10
1.2.2 Der endogene Weg	11
1.2.3 Reverser Cholesterin-Transport	12
1.3 DYSLIPOPROTEINÄMIEN	13
1.4 ATHEROSKLEROSE	15
1.4.1 Formale Pathogenese	15
1.4.2 Pathogenetische Bedeutung der Lipoproteine	17
1.4.3 Multifaktorielle Genese	18
1.4.4 Atherosklerosemodell Maus	20
1.5 APOLIPOPROTEIN A5	23
1.5.1 Entdeckung	23
1.5.2 Funktionen	24
1.5.3 Polymorphismen	25
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 MATERIAL	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Enzyme und Proteine	28
2.1.3 Nucleotide	28
2.1.4 Narkosemittel	28
2.1.5 Verbrauchsmaterial	29
2.1.6 Geräte	29
2.1.7 Standard-Pufferlösungen	30
2.2 METHODIK	31
2.2.1 Versuchstiere – allgemeine Maßnahmen	31
2.2.2 ApoA5-transgene Mäuse	31
2.2.3 ApoA5-transgene Mäuse auf dem ApoE-defizienten Hintergrund	31
2.2.4 Kreuzungsstrategie	32
2.2.5 Genotypisierung der Mäuse	32

2.2.5.1	Allgemeines Prinzip	32
2.2.5.2	Verdau der Schwanzbiopsie	32
2.2.5.3	Extraktion genomischer DNA	33
2.2.5.4	PCR zur Bestimmung des Transgens	33
2.2.5.5	PCR zur Bestimmung des ApoE-Genotyps	34
2.2.5.6	Gel-Elektrophorese	35
2.2.6	Lipoproteinprofil	35
2.2.6.1	Prinzip	35
2.2.6.2	Blutentnahme	35
2.2.6.3	Lipoproteinzentrifugation	36
2.2.6.4	Fast performance liquid chromatography (FPLC)	36
2.2.6.5	Triglyzerid- und Cholesterinbestimmung	37
2.2.7	Atherosklerose-Präparation	37
2.2.7.1	Prinzip	37
2.2.7.2	Durchführung	38
2.2.8	<i>In vivo</i> -Studien	38
2.2.8.1	Prinzip	38
2.2.8.2	Markierung der Lipoproteine	39
2.2.8.3	Durchführung der Turnoverstudien	39
2.2.8.4	Radioaktivitätsmessung	40
2.2.8.5	Lipidextraktion	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	KREUZUNG DER MÄUSE	42
3.2	LIPOPROTEINPROFILE	43
3.3	ATHEROSKLEROSE	48
3.3.1	Atherosklerotische Läsionen	48
3.3.2	Korrelationen	50
3.4	<i>IN VIVO</i> -STUDIEN	52
3.4.1	In vitro-Markierung von ApoE-defizienten VLDL mit [³ H]-Cholesterylether	52
3.4.2	Markierung von ApoE-defizienten VLDL mit [¹²⁵ I]-Tyramincellobiose	53
3.4.3	Dreifachmarkierung der ApoE-defizienten VLDL mit ¹⁴ C, ³ H und ¹²⁵ I	55
3.4.4	Liposomen-Abbau mit [³ H]- und [¹⁴ C]-Doppel-Marker	59
4	DISKUSSION	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	69

6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	70
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
8	DANKSAGUNG	77
9	LEBENS LAUF	78
10	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	79

FRAGESTELLUNG

Hypertriglyzeridämie ist ein wichtiger Risikofaktor der koronaren Herzerkrankung. Apolipoprotein A5 (ApoA5) ist ein Apoprotein, das die Plasma-Triglyzeridspiegel bei Mäusen und Menschen reduzieren kann. Kann ApoA5 über eine Senkung der Triglyzeride oder andere bisher unkläre Funktionen atheroprotektiv wirken? Beruhen die Lipidveränderungen auf einer Beschleunigung der plasmatischen Hydrolyse oder auf einer gesteigerten Organaufnahme triglyzeridreicher Lipoproteine? Welche Stellung nimmt ApoA5 im Lipidstoffwechsel und in der Atherosklerose-Entstehung ein?

In der vorliegenden Arbeit soll die Auswirkung einer Überexpression von ApoA5 auf die Entstehung von Atherosklerose untersucht werden. Hierzu wurden ApoE-defiziente-Mäuse als Atherosklerosemodell verwendet, die außer dem murinen ApoA5 zusätzlich das entsprechende humane Apolipoprotein exprimieren. Zunächst wurden Lipoproteinprofile dieser Mäuse mit Hilfe von Ultrazentrifugationen und FPLC-Läufen mit anschließender Triglyzerid- bzw. Cholesterinbestimmung erstellt, um die Auswirkungen von ApoA5 auf diesem Hintergrund zu verstehen. Im Rahmen der Atherosklerose-Untersuchung wurden Mäuse im Alter von 22 Wochen sakrifiziert, die Arteria brachiocephalica und das Herz von etwa 20 Mäusen pro Gruppe präpariert, hinsichtlich Atherosklerose gefärbt und quantifiziert. Außerdem wurden *in vivo*-Turnoverstudien durchgeführt, um die Aufnahme sowie den Abbau der radioaktiv markierten triglyzeridreichen Partikel mit Kontrollgruppen zu vergleichen und so eine Aussage über die veränderte Stoffwechsel-Situation machen zu können.

1 EINLEITUNG

1.1 BESTANDTEILE DES FETTSTOFFWECHSELS

Triglyzeride werden entweder mit der Nahrung aufgenommen oder von der Leber produziert, um die Energieversorgung der Organe zu sichern. Cholesterin kann zwar von allen Geweben hergestellt werden, wird aber aufgrund energetischer Effizienz überwiegend aus dem zirkulierenden Pool entnommen. Lipide sind wasserunlöslich und müssen daher im Blut an Transportproteine gebunden werden und bilden mizellartige sphärische Komplexe mit Proteinen, die Lipoproteine. Phospholipide und andere hydrophile Lipide dienen als oberflächenaktive Substanzen der Lösungsvermittlung von hydrophoben Cholesterylestern, Triglyzeriden und lipophilen Vitaminen. Apolipoproteine, der Proteinanteil der Lipoproteine, sorgen für deren Stabilität und Funktionalität durch Interaktion mit Enzymen oder Lipoproteinrezeptoren [1]. Nach der Dichte werden 5 Hauptklassen von Lipoproteinen unterschieden [2] (siehe Tabelle 1): Chylomikronen (CM), Very Low Density Lipoproteins (VLDL), Intermediate Density Lipoproteins (IDL), Low Density Lipoproteins (LDL) und High Density Lipoproteins (HDL). Dabei korreliert die Dichte invers mit der Größe, der Triglyzerid-Gehalt nimmt mit zunehmender Dichte ab, während der Proteingehalt mit zunehmender Dichte zunimmt und der Cholesterin-Gehalt in der LDL-Fraktion ein Maximum erreicht.

Tabelle 1: Lipoprotein-Hauptklassen.

Physikalische Eigenschaften, Zusammensetzung, Hauptfunktionen und Apolipoproteine der Lipoprotein-Hauptklassen (modifiziert nach dem Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Schwandt-Parhofer, 3. Auflage von Dezember 2006, Schattauer-Verlag).

Eigenschaften	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte (g/ml)	- 0,93	0,93 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,21
Durchmesser (nm)	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
Cholesterin (%)	3 – 8	15 – 25	30	42 – 50	15 – 16
Triglyzeride (%)	84 – 89	50 – 65	30	7 – 10	3 – 5
Phospholipide (%)	7 – 9	15 – 20	22	15 – 20	22
Hauptfunktion	Transport exogener Lipide	Transport endogener Lipide	Transport endogener Lipide	Cholesterintransport	Reverser Cholesterintransport
Apolipoproteine	A4, A5, B48, C2, C3, E	A5, B100, C2, C3, E	B100, C3, E	B100	A1, A2, A4, A5, E

Apolipoproteine sind Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und entweder mit Lipiden beladen oder unabhängig sezerniert werden. Sie dienen hauptsächlich als Strukturkomponenten von Lipoproteinen, besitzen aber auch eigene aktivierende oder inhibierende Effekte auf Enzyme, Enzymkofaktoren sowie Rezeptoren. Die Sekundärstruktur der A- und C-Apolipoproteinfamilie besteht hauptsächlich aus amphiphatischer α -Helix, während die B-Familie eher aus β -Faltblättern aufgebaut ist. Die Gene der A-, C- und E-Familie verteilen sich im menschlichen Genom auf nur 2 Cluster [3]: ApoC1/2/4/ApoE auf Chromosom 19q3.2-19q3.3 und ApoA1/C3/A4/A5 auf Chromosom 11q23-11q24. In den derzeit bekannten Klassen (ApoA-M) erstreckt sich das Molekulargewicht von 6,5 bis 500 kD, die Plasmakonzentration von 0,1 mg/l bis über 1 000 mg/l. Eine Auflistung der wichtigsten Apolipoproteine und ihrer Funktion erfolgt in der nachstehenden Tabelle.

Tabelle 2: Charakteristika der wichtigsten Apolipoproteine.

LCAT Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase, LDLR LDL-Rezeptor, LRP1 LDL-Receptor-related Protein 1, LPL Lipoproteinlipase (modifiziert nach dem Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Schwandt-Parhofer, 3. Auflage von Dezember 2006, Schattauer-Verlag).

Apolipoprotein	Assoziierte Lipoproteine	Funktionen im Stoffwechsel
ApoA1	HDL	LCAT-Aktivierung, Strukturprotein der HDL, Bindung an HDL-Rezeptoren, Prostazyklin-Stabilisierung
ApoA4	HDL, CM	LCAT-Aktivierung, Triglyzeridstoffwechsel
ApoA5	HDL, VLDL, CM	Aktivierung der Hydrolyse
ApoB48	CM	Hauptstrukturprotein der CM, LRP1-Ligand
ApoB100	LDL, VLDL	Strukturprotein von VLDL und LDL, LDLR-Ligand
ApoC1	VLDL, CM	Unterdrückung der Bindung naszierender Lipoproteine an den LDLR und an LRP1, LCAT-Aktivator
ApoC2	VLDL, CM	Aktivator der LPL
ApoC3	VLDL, CM	Inhibitor der LPL, evtl. Hemmung der hepatischen Aufnahme von CM und VLDL-Restpartikeln
ApoE	HDL, CM, VLDL	Ligand bei der Bindung verschiedener Lipoproteine an den LDLR, an LRP1 oder möglicherweise an einen eigenen hepatischen ApoE-Rezeptor

Verschiedene Enzyme und Proteine spielen im Lipoproteinstoffwechsel bedeutende Rollen: Triglyzeridlipasen (Lipoproteinlipase, hepatische Lipase, endotheliale Lipase), Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase (LCAT) sowie das Cholesterylester-Transferprotein (CETP). Die Lipoproteinlipase (LPL) ist ein Glykoprotein, das hauptsächlich in Fett, Herz, Lunge und Skelettmuskulatur gebildet wird. Sie liegt als Homodimer an membranständige Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) der Kapillarendothelien gebunden vor [4]. Heparin kann die LPL aus dieser Bindung verdrängen und damit ins Plasma freisetzen.

Im aminoterminalen Teil des Enzyms befindet sich das katalytische Zentrum, im carboxyterminalen Teil die Lipidbindungsstelle. Die Expression der LPL wird u. a. durch Insulin reguliert. Für die Hydrolyse der triglyzeridreichen Lipoproteine (TRL) ist ApoC2 als Kofaktor [4] nötig. Die Hauptaktivität liegt in der Spaltung von Triglyzeriden mit geringerer Aktivität für die Lecithin-Spaltung. Nach der Triglyzerid-Hydrolyse bleibt die LPL an den Restpartikeln gebunden, die darüber vom LDL-Receptor-related Protein 1 (LRP1) erkannt und aufgenommen werden [5, 6]. Bei einem angeborenen LPL-Mangel können die CM nicht mehr effektiv genug abgebaut werden mit der Folge einer starken Hypertriglyzeridämie und Chylomikronämie.

Die hepatische Lipase wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Sie hydrolysiert IDL, LDL und HDL₂ mit stärkerer Aktivität für Phospholipide als die LPL und bindet ebenfalls an Lipoproteinrezeptoren. Lipide der HDL werden bevorzugt durch die endotheliale Lipase gespalten, während die Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase mit Hilfe von ApoA1 Cholesterylester bildet und so die Konversion von HDL₃ zu HDL₂ vermittelt. Nach der Veresterung ist das CETP für den Austausch der Kern-Lipide zwischen den HDL und VLDL verantwortlich.

Zu der Familie des LDL-Rezeptors (LDLR) gehören neben den bekanntesten, dem LDLR selbst und dem LRP1, auch das Megalin, der VLDL-Rezeptor, der ApoE-Rezeptor 2 und das LR11. Diese Rezeptoren sind an der Lipoproteinaufnahme und vermutlich auch anderen noch unbekanntenen Funktionen beteiligt.

Der LDLR spielt eine entscheidende Rolle im Cholesterin-Stoffwechsel [7], findet sich daher auf fast allen Zelltypen und bindet über die Apoproteine ApoB100 oder ApoE Lipoproteine [8]. Seine Expression unterliegt einem Regelkreislauf durch den zellulären Cholesterin-Gehalt sowie der Regulation unter anderem durch Östrogen oder Insulin.

Eines der größten bekannten Membranproteine, das LDLR-related Protein 1 [9], ist multifunktionell und bindet ApoE [10], LPL, ApoB100, Apo(a), Laktoferrin u. v. m. und vermittelt hauptsächlich den Abbau bzw. die Aufnahme der CM-Restpartikel. Auch dieser Rezeptor wird von vielen Geweben exprimiert, aber nicht durch den Sterolgehalt der Zelle reguliert.

Den VLDL-Rezeptor findet man auf Endothelzellen vor allem extrahepatischer Gewebe, er bindet ApoE sowie LPL. Ein dem LRP1 ähnliches Glykoprotein ist das Megalin, das jedoch selten zusammen mit diesem in einer Zelle exprimiert wird. Über Scavenger-Rezeptoren werden modifizierte Proteine unspezifisch aufgenommen, weshalb ihnen eine große Bedeutung bei der Atherosklerose-Entstehung zugeschrieben wird.

1.2 LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Der Lipoprotein-Stoffwechsel lässt sich wie folgt unterteilen: Der exogene Weg vermittelt den Transport von Nahrungslipiden in die Organe, im endogenen Weg werden von der Leber synthetisierte Lipoproteine zu extrahepatischen Geweben transportiert und im reversen Cholesterintransport wird das Cholesterin peripherer Gewebe zur Leber transportiert, um ausgeschieden oder weiter verarbeitet zu werden. Nachfolgend werden die einzelnen Wege näher beschrieben und in Abbildung 1 zusammengefasst.

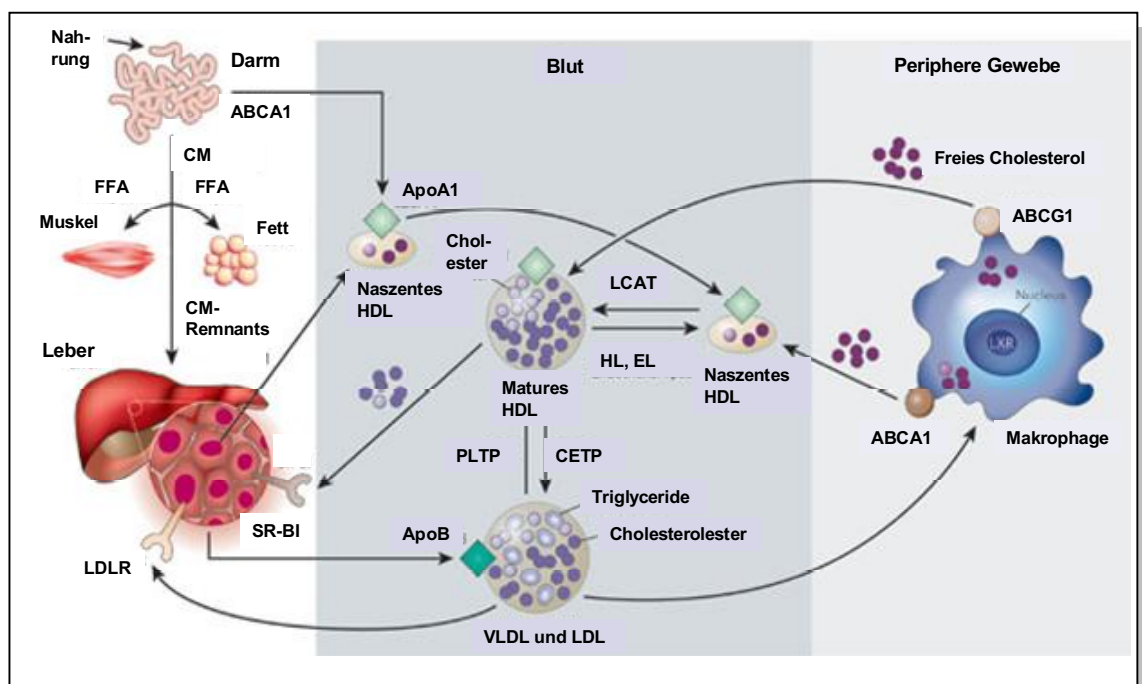


Abbildung 1: Lipoprotein-Metabolismus.

Im Darm werden Fette aus der Nahrung aufgenommen und in große triglyzeridreiche Lipoproteine, CM, verpackt. Nach Lipolyse durch die endothelständige LPL entstehen CM-Restpartikel, die durch rezeptorvermittelte Endozytose in der Leber abgebaut werden, während die freien Fettsäuren (FFA) von peripheren Organen aufgenommen werden. Die Leber belädt ApoB mit Lipiden und sezerniert VLDL, die durch Lipolyse zu LDL umgeformt werden. Diese cholesterinreichen Partikel werden entweder über den LDLR oder über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen. HDL werden von der Leber durch die Sekretion von lipidfreiem ApoA1 generiert. ApoA1 nimmt über das Membranprotein ABCA1 Cholesterin aus den peripheren Geweben auf und transportiert es zur Leber, wo es als Cholesteryl-ester über den Scavenger-Rezeptor BI aufgenommen wird. Modifiziert nach Rader et al. [11].

1.2.1 Der exogene Weg

Im Rahmen der Lipidverdauung kommt es zur mechanischen Vermischung der wasserunlöslichen Lipide im Gastrointestinaltrakt. Die Fetttröpfchen werden mit Lysophospholipiden, Nahrungscholesterin sowie Gallensäuren emulgiert und durch Lipasen in den verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes gespalten.

Im Jejunum werden die Fette (freie Fettsäuren und Monoacylglyceride) entlang eines Diffusionsgradienten energieunabhängig absorbiert bzw. über Rezeptoren internalisiert, bevor die Monoacylglyceride intrazellulär schnell wieder zu Triglyceriden reverestert werden. Das meiste Cholesterin wird in nichtveresterter Form in die Mizellen verpackt und über intestinale Transporter (NPC1L1) aufgenommen [12]. Das resorbierte und vor Ort synthetisierte Cholesterin wird über die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase 2 (ACAT-2) reverestert. Das mikrosomale Triglycerid-Transferprotein vermittelt die Anlagerung von Lipiden an ApoB48. Durch die Komplexierung der hydrophoben Lipide mit Phospholipiden, freiem Cholesterin und besagten Apolipoproteinen entstehen CM, die in die Lymphe abgegeben werden und etwa eine Stunde nach der Mahlzeit über den Ductus thoracicus im Blut erscheinen.

Diese neu synthetisierten CM besitzen zunächst nur ApoA1, B48 und A4 an ihrer Oberfläche. Im Blut erfolgt die Aufnahme von ApoC2 und A5 aus den HDL, so dass die LPL die Triglyceride spalten kann. Die bei der Hydrolyse entstehenden freien Fettsäuren werden von peripheren Zellen, wie Myozyten und Adipozyten aufgenommen. Im Austausch mit den HDL nehmen die CM ApoE auf und geben ihre nicht-benötigten Oberflächenproteine ab. Auf ihrem Weg verlieren die CM Triglyceride, Phospholipide, ApoA1/2/4 und nehmen Cholesterylester (CE), ApoC1/2/3 sowie ApoE von den HDL auf. Dabei katalysiert das Phospholipidtransferprotein den Transfer der Phospholipide und das CETP den Austausch von CE gegen Triglyceride.

Die entstandenen cholesterinreichen CM-Restpartikel [13] werden von Vertretern der LDLR-Familie, v. a. über LRP1 hepatisch aufgenommen [14]. Über die Lipoproteinlipase [15] und ApoE erfolgt die Bindung an LRP1 oder über ApoE an den LDL-Rezeptor mit anschließender Endozytose. Intrazellulär wird der Lipidkern auf lysosomalem Weg verarbeitet, während die Oberflächen-Restpartikel, insbesondere LPL, ApoE [16] und ApoC, wieder an HDL abgegeben werden und so rezirkulieren.

1.2.2 Der endogene Weg

Die VLDL-Produktion der Leber wird unter anderem durch Insulin und den hepatischen Gehalt an freien Fettsäuren beeinflusst und dient der Versorgung peripherer Gewebe mit Cholesterin und Triglyceriden. ApoB wird an Ribosomen synthetisiert, mit Hilfe des mikrosomalen Transferproteins mit Triglyceriden sowie Cholesterylestern komplexiert und als naszierende VLDL in den Disse-Raum abgegeben. Veränderungen der Triglycerid-Sekretion werden über die Beladung, weniger über die Anzahl der Partikel reguliert.

Während der Zirkulation nehmen VLDL ApoE und ApoC sowie Cholesterylester über das CETP von den HDL auf.

Die LPL hydrolysiert etwa 90 % der VLDL-Triglyzeride, so dass die Restpartikel entweder direkt in die Leber aufgenommen werden oder über weitere Austausch- und Hydrolysevorgänge in IDL und schließlich LDL umgewandelt werden, die wiederum über den LDLR oder unspezifisch über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen werden können. LDL-Partikel transportieren etwa 70 % des gesamten Cholesterins und werden ebenfalls zu etwa 70 % vom LDLR aufgenommen. Nur die Leber kann das Cholesterin über die Synthese von Gallensäuren ausscheidbar machen, was die Bedeutung dieses Organs für den Lipoproteinstoffwechsel verdeutlicht.

1.2.3 Reverser Cholesterin-Transport

Um überschüssiges Cholesterin aus der Peripherie zur Leber als Verstoffwechslungszentrum zu transportieren, werden HDL benötigt. Diskoidale naszierende HDL werden von den Hepatozyten sezerniert. Durch Enzyme und Austauschvorgänge entstehen HDL-Präkursoren, die an periphere Zellen binden und dort unter anderem über das Membranprotein ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) Cholesterin aufnehmen, das mit Hilfe der LCAT verestert wird. Die Aufnahme in die Leber erfolgt dann über Cholesterin-Übertragung auf ApoB-haltige Lipoproteine durch das CETP, Holoendozytose sowie direkte Bindung an den Scavenger-Rezeptor BI [17, 18] oder Cluster of Differentiation (CD) 36. Das überschüssige Cholesterin kann dort in Form von Gallensäuren ausgeschieden oder über die Synthese von Steroidhormonen aus der Zirkulation entfernt werden. Postprandial werden Triglyzeride, Phospholipide und Apolipoproteine aus den TRL auf HDL übertragen. Die dabei entstehenden größeren HDL₂ werden durch die hepatische Lipase zu dichteren HDL₃ konvertiert und stehen so als Akzeptoren für freies Cholesterin zur Verfügung.

1.3 DYSLIPOPROTEINÄMIEN

Primäre Störungen des Lipoproteinstoffwechsels beruhen auf hereditären Proteindefekten, die deren Enzym-, Rezeptor- oder Transportfunktion beeinflussen. Heute noch weit verbreitet ist die Klassifikation nach Fredrickson (siehe Tabelle 3), die auf der Elektrophorese-Auftrennung der Lipoproteine beruht [19], jedoch nicht die HDL-Werte berücksichtigt. Nach klinisch-praktischer Einteilung unterscheidet man die häufigen Formen Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie und gemischte Hyperlipoproteinämie sowie HDL-Erniedrigung (bei diabetischer Dyslipidämie) und Lipoprotein (a)-Erhöhung. Seltene Formen sind die Hypo-/Abetalipoproteinämie oder eine schwere HDL-Defizienz (ApoA1-Defizienz, Tangier's Disease).

Sekundäre Dyslipoproteinämien sind sehr viel häufiger als primäre Störungen und treten im Rahmen des Diabetes mellitus, anderer endokrinologischer Erkrankungen, Leber- und Nierenerkrankungen, Stress sowie unter Medikation auf, meist in Form gemischter Hyperlipidämien.

Tabelle 3: Klassifikation der Hyperlipoproteinämien nach Fredrickson.

Die Typen werden jeweils durch verschiedene Cholesterin- und Triglyzeridkonstellationen sowie eine vorherrschende Lipidklasse charakterisiert.

Typ	Erhöhte Lipoproteinfraktion	Cholesterin	Triglyzeride
I	CM	Normal bis ↑	↑↑↑↑
IIa	LDL	↑↑	Normal
IIb	LDL und VLDL	↑↑	↑↑
III	Restpartikel, β-VLDL	↑↑	↑↑↑
IV	VLDL	Normal bis ↑	↑↑
V	VLDL und CM	↑ bis ↑↑	↑↑↑↑

Im Weiteren wird auf einige Charakteristika sowie Ursachen der Hypertriglyzeridämien eingegangen.

Bei der Hypertriglyzeridämie verändert sich die Komposition der TRL durch vermehrte Triglyzerid-Synthese (Typ IV nach Fredrickson), für das Auftreten von atherosklerotischen Veränderungen sind jedoch weitere Faktoren nötig. Die familiäre kombinierte Hyperlipidämie [20], bei der sowohl Cholesterin- als auch Triglyzerid-Stoffwechsel betroffen sind, stellt die primär lipidologische Manifestation des metabolischen Syndroms dar. Starke Hypertriglyzeridämien (Tg > 1 000 mg/dl) mit Pankreatitiden sowie Xanthomen kennzeichnen die Chylomikronämie (Typ I nach Fredrickson). Dem Auftreten von Chylomikronen im Nüchternplasma liegt eine Defizienz der LPL, des Kofaktors ApoC2 oder eine Mutation des ApoA5 zu Grunde. Die familiäre Dysbetalipoproteinämie (Typ III nach Fredrickson) stellt sich durch cholesterinreiche VLDL-Restpartikel, Xanthome, periphere arterielle Verschlusskrankheit, koronare Herzerkrankung oder Schlaganfälle dar [21]. Ursächlich ist häufig die Homozygotie für das ApoE2-Allel mit resultierender Einschränkung der Funktion in Kombination mit weiteren Risikofaktoren, wie z. B. einer Insulinresistenz, so dass es zur Akkumulation der cholesterinreichen Restpartikel kommt [22].

Sekundäre Hypertriglyzeridämien treten bei einer Vielzahl von Erkrankungen und physiologischen Zuständen auf: Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Alkoholkonsum, Nierenerkrankungen, Schwangerschaft u. v. m. [23].

1.4 ATHEROSKLEROSE

1.4.1 Formale Pathogenese

Als Arteriosklerose bezeichnet man die Gesamtheit aller aus Alterung, Stoffwechselstörungen oder hämodynamisch bedingten Veränderungen der arteriellen Gefäßwand. Der Begriff der Atherosklerose bezeichnet die Intimaverfettung, narbige Fibrosierung und Kalzinose, die zu einer makroskopisch wahrnehmbaren Gefäßverhärtung führt. Es handelt sich um einen polyätiologischen Krankheitsprozess mit primären Alterungsvorgängen der Arterien und sekundär die Gefäßwände verändernden metabolischen Anomalien.

Russell Ross trug entscheidend zum Verständnis der Atherosklerose als entzündlichen Prozess der Gefäßwand mit seiner „Response to injury Hypothesis“ bei [24, 25], wobei im Laufe der Jahre die Begriffe Inflammation und endotheliale Dysfunktion in der Pathogenese zunehmend an Bedeutung gewannen.

Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion [26] kommt es zum Ausfall verschiedener Funktionen des Endothels, wie der NO-vermittelten Vasodilatation, gerinnungshemmenden oder antiproliferativen Eigenschaften.

Oxidierete Lipoproteine fördern zusätzlich die Leukozytenadhäsion. Monozyten wandern in den subintimalen Raum, differenzieren zu Makrophagen, die freie Radikale absetzen und so die Bildung von gefäßrelaxierendem Stickstoffmonoxid (NO) hemmen bzw. den Abbau fördern.

Die Endothelaktivierung stellt einen inflammatorischen Prozess mit Erhöhung des C-reaktiven Proteins dar [27], einem prädiktiven Faktor für kardiovaskuläre Ereignisse. Oxidierte LDL bewirken neben der Endothelschädigung, zelltoxische Effekte, Chemotaxis, verminderte NO-Produktion und die Inhibition des reversen Cholesterin-Transports.

Die Phänotypisierung des Atheroms und seiner Vorstufen kann in verschiedene Stadien gefasst werden [28]. Atherosklerotische Veränderungen bilden sich vor allem an Stellen des arteriellen Gefäßsystems, an denen der laminare Fluss unterbrochen ist. Auf Grundlage der nicht sichtbaren, aber messbaren endothelialen Dysfunktion beginnt das Wachstum einer Läsion als Fettstreifen (a), kann sich über eine intermediäre Läsion (b) zu einer rupturgefährdeten Läsion weiterentwickeln (c) und mit einer fortgeschrittenen stenosierenden Läsion (d) enden (Abbildung 2).

- (a) Atherogene Lipoproteine, wie LDL, werden in der Intima durch Oxidation oder enzymatische Angriffe modifiziert, was eine vermehrte Phagozytose durch Makropagen induziert. Es bilden sich lipidbeladene Schaumzellen, deren Akkumulation zur Bildung von Fettstreifen führt. Diese werden auch schon bei Kindern gefunden.
- (b) Vaskuläre glatte Muskelzellen produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix, in der sich atherogene Lipoproteine ansammeln. Dies bildet einen chronischen Entzündungsreiz, so dass Monozyten und T-Lymphozyten einwandern.
- (c) Glatte Muskelzellen bilden vom Endothel ausgehend eine fibröse Kappe über dem gesamten Prozess als Abgrenzung zum Blutstrom. Abgestorbene Schaumzellen setzen u. a. kristallines Cholesterin frei. Es entsteht ein nekrotischer Kern, der zur weiteren Migration von Entzündungszellen führt. Dieser Plaque kann rupturieren und thrombogenes Material freisetzen. Der zunehmende Gefäßverschluss kann zu einem akuten Herzinfarkt führen.
- (d) Wenn der Plaque nicht rupturiert und weiter wächst, kann dieser ebenfalls das Gefäßlumen verlegen.

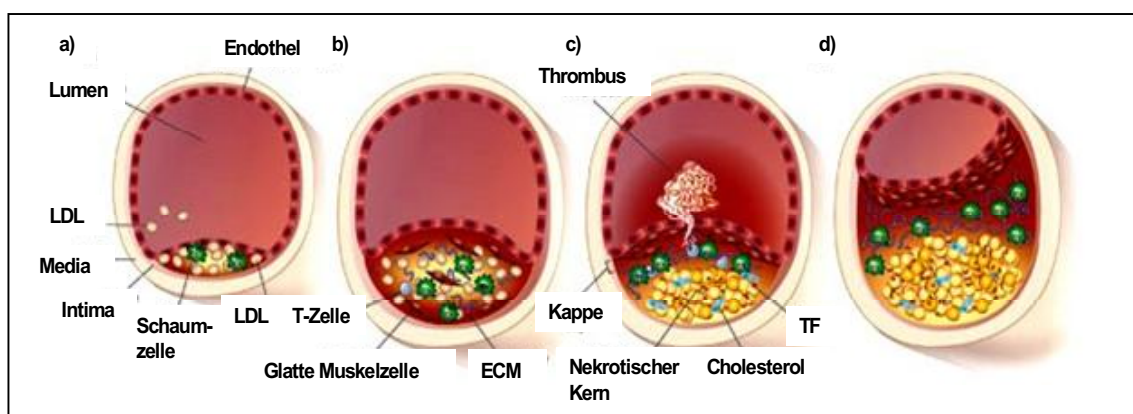


Abbildung 2: Verlauf der Atherosklerose.

Eine Läsion beginnt als fatty streak (a), kann sich über ein intermediäres Stadium (b) zu einer rupturgefährdeten Läsion (c) entwickeln und schließlich zu einer fortgeschrittenen Obstruktion führen (d). ECM Extrazellulärmatrix, TF Tissue Factor. Modifiziert nach Rader et al.[11].

1.4.2 Pathogenetische Bedeutung der Lipoproteine

In der Media beginnt schon ab dem 20. Lebensjahr der Schwund an α -aktinpositiven glatten Muskelzellen (gMZ), deren Volumen durch nicht-elastische Matrixelemente ersetzt wird. Dies entspricht dem Prozess der leiomuskulären Mediaatrophie und einer Zunahme der Extrazellulärmatrix (ECM), wobei die Kontraktilität und damit die Windkessel-Funktion der Arterien nachlassen. Zunehmend kommt es zur Intimasklerose und interstitiellen Mediakalzinose bei weiterem gMZ-Schwund und Kalzium-Anstieg.

Bei der ständigen Lipoproteintranszytose in die Gefäßwand bleibt auch ein Teil der Lipoproteine an der ECM hängen, besonders LDL zeigen große Affinität zu kollagenen Fasern [29]. Nach rezeptorvermittelter Endozytose der primär extrazellulär abgelagerten Lipoproteine in die Makrophagen kommt es durch zelluläre Reaktionen zur Atherosklerose-Progression.

Der transendotheliale Lipoproteintransport ist in der aufsteigenden Aorta druck- und pulswellengradientenabhängig am stärksten, was die häufige Erstmanifestation von Plaques in dieser Region erklärt. Auch die zunehmende Mediaatrophie führt über Elastizitätsverlust zum Anstieg des Pulsgradienten und damit zur Stagnation des interstitiellen Flüssigkeitstransports. Je länger LDL im Blut zirkulieren, desto wahrscheinlicher wird die Adhäsion an Endothelzellen und auch die Gefahr chemischer Modifikationen, wie Oxidation [30] oder nicht-enzymatischer Glykierung, steigt.

Diese veränderten Lipoproteine werden über den unspezifischen Scavenger-Rezeptor aufgenommen, der kein Sättigungsverhalten zeigt [31]. Der Cholesterin-Abtransport ist den Makrophagen jedoch nur über Abgabe an HDL möglich. So kommt es zur Ablagerung der entstehenden Schaumzellen am Endothel mit möglicher weiterer Progression bis zum komplizierten Atherom.

In Abbildung 3 ist die Beteiligung und Interaktion der verschiedenen Zelltypen zusammenfassend dargestellt.

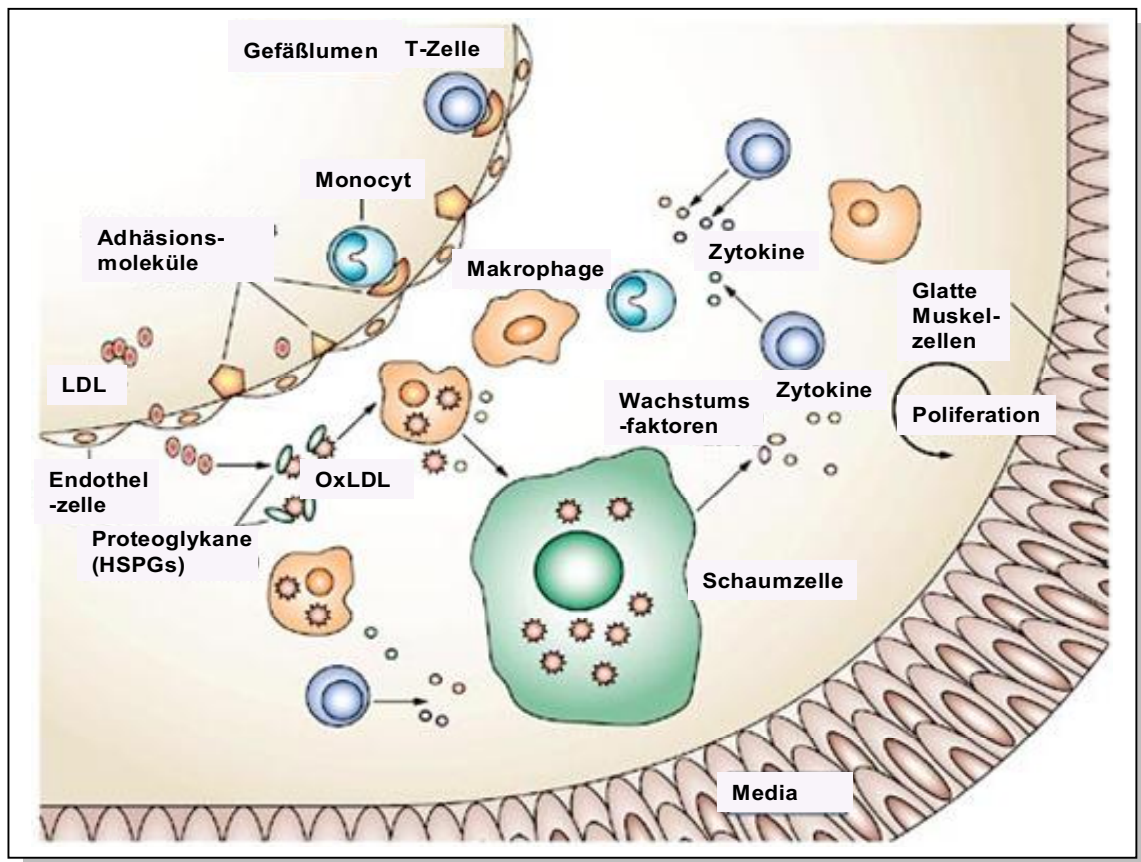


Abbildung 3: Atherosklerose-Mechanismen.

Schon früh in der Entstehung der Atherosklerose werden LDL oxidiert (OxLDL), was zur endothelialen Dysfunktion sowie der Expression vaskulärer Zelladhäsionsmoleküle und Chemokine führt. Als Antwort auf die Aktivierung werden Monozyten rekrutiert, die in der Gefäßwand zu Makrophagen differenzieren. Diese Fresszellen nehmen die chemisch veränderten LDL auf, werden so zu Schaumzellen, die Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren. Es kommt zur Proliferation der gmZ und schließlich zur Entstehung von Plaques. Modifiziert nach Sherer et al. [32].

1.4.3 Multifaktorielle Genese

Neben dem wie oben beschriebenen Haupt-Risikofaktor eines erhöhten LDL-Cholesterins spielen auch niedrige HDL-Spiegel bei der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung (KHK) eine Rolle [33]. Zum einen sind HDL die entscheidenden Partikel im reversen Cholesterin-Transport, zum anderen wirken sie über antiinflammatorische, zytoprotektive und antikoagulative Eigenschaften vasoprotektiv.

Mindestens elf genetische Loci zeigen Verbindungen zwischen Lipiden und Atherosklerose. Die stärksten Korrelationen findet man zwischen HDL und Punktmutationen (single nucleotide polymorphisms – SNP's) des CETP, LDL und ApoE/C SNP's sowie Triglyzeriden und ApoA1/C3/A4/A5 SNP's [34].

Eine Assoziation der Hypertriglyzeridämie mit kardiovaskulären Erkrankungen ist schon seit den 70er Jahren bekannt. In verschiedenen Studien konnte eine geschlechtsspezifische Risikoerhöhung durch diesen Risikofaktor nachgewiesen werden [35-39]. In Verbindung mit erhöhtem LDL und hohem LDL : HDL-Verhältnis ist das Risiko einer koronaren Herzerkrankung 6-fach erhöht [40]. Ein Zusammenhang zwischen LDL-Spiegeln und Atherosklerose gilt heute praktisch als erwiesen.

Triglyzeride selbst sind nicht atherogen. TRL sind zu groß, um das Endothel zu infiltrieren, so dass beispielsweise Patienten mit Chylomikronämie nicht an prämaturer Arteriosklerose leiden. Die atherogene Wirkung kommt über die cholesterinreichen Abbauprodukte [41] sowie indirekt über die Entstehung kleiner dichter LDL und die HDL-Erniedrigung zu stande. Die Restpartikel werden subendothelial retiniert und können dort die Atherogenese initiieren [42]. Die Konzentration der Restpartikel wird durch die Aktivität der hepatischen Lipase, des plasmatisch-lipolytischen Komplexes und hepatische Lipoprotein-Rezeptoren beeinflusst.

Es besteht eine direkte Korrelation des Plasma-Triglyzerid-Spiegels mit der Restpartikel-Konzentration [43], die als mögliche Erklärung für die Assoziation von Gen-Polymorphismen verschiedener Apoproteine mit dem KHK-Risiko dient. Insbesondere die postprandialen Lipoproteine sind an der Atherogenese beteiligt. So zeigte sich bei Frauen mit einer Erhöhung der postprandialen Triglyzeride um 85mg/dl ein 5fach erhöhtes Herzinfarkt-Risiko [44].

Das Atherosklerose-Risiko ist meist ein Zusammenspiel vieler genetischer Varianten mit geringen phänotypischen Einzelwirkungen in deren Wechselwirkung mit anderen Genen und Umweltfaktoren [45]. Neben den exogenen Faktoren spielt demnach auch die familiäre Belastung eine wichtige Rolle. Arterielle Hypertonie führt über Endotheldysfunktion und Veränderungen der vaskulären Zusammensetzung zu einer fast linearen Beziehung mit kardiovaskulärer Mortalität. Nikotinabusus kann das KHK-Risiko verdoppeln [46], da es zur Aktivierung des sympathoadrenergen Systems, Entzündungsprozessen, Fibrinogen-Anstieg, Thrombosierung, Veränderungen der Blutviskosität, Endothelschädigung und anderem kommt.

Inaktivität, Adipositas und Diabetes mellitus sind weitere wichtige Risikofaktoren, die häufig miteinander vergesellschaftet sind, meist im Rahmen eines metabolischen Syndroms. Dabei sind die viszeralen Fettdepots mit atherogen wirkenden Hormonen, wie Endothelin, Resistin oder Tumor-Nekrosefaktor α , sowie die diabetische Dyslipidämie am gefährlichsten.

Homocystein wird über eine vasoaggressive und prokoagulatorische Komponente als kardiovaskulärer Risikofaktor eingestuft. Störungen des Blutflusses allgemein, ob durch Veränderungen der Plasmaviskosität, Erythrozytenaggregation oder Membranfluidität, sind häufig für thrombotische Komplikationen verantwortlich.

1.4.4 Atherosklerosemodell Maus

Insbesondere bei der Untersuchung der Maus im Hinblick auf Atherosklerose müssen zunächst Unterschiede der Mausstämme beachtet werden, auf deren Hintergrund genetische Veränderungen durchgeführt werden können. Mausinzuchtstämme weisen durch Bruder-Schwester-Verpaarungen eine definierte Genetik auf, so dass genetisch fast identische Mäuse für die Experimente herangezogen werden können, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu erreichen. Bei diesen Stämmen können nun beispielsweise mittels Knock-out- oder Transgen-Technik bestimmte Gene bzw. die dadurch bedingten Veränderungen untersucht werden.

Der am häufigsten verwendete Stamm der C57BL6 ist sehr viel empfindlicher gegenüber atherosklerotischen Veränderungen als Mäuse der FVB-Linie und entwickelt dementsprechend größere Läsionen [47, 48]. Da sich mittlerweile jedoch viele Mauslinien etabliert haben, kann eine bestimmte genetische Veränderung auch auf einem weniger atherosklerose-empfindlichen Hintergrund bestehen, so dass beispielsweise Rückkreuzungen des Stammes über mehrere Generationen nötig werden, spezielle Diäten eingesetzt werden müssen oder mit dem geringeren Effekt gearbeitet werden muss.

Mäuse sind allgemein sehr atherosklerose-resistent [49], unter anderem aufgrund ihres höheren HDL-Spiegels und des sehr niedrigen LDL-Spiegels. Daher wurden Mausmodelle mit verschiedenen Veränderungen im Lipidstoffwechsel eingeführt, die zu hyperlipämischen Zuständen führen: ApoE-KO, LDLR-KO, LDLR-KO ApoB^{100/100}, ApoE3-Leiden, ApoE2-Knock-in und weitere.

Allgemeine Prädilektionsstellen für atherosklerotische Plaques befinden sich an der Aortenwurzel, am Aortenbogen, den Hauptabgängen der Aorta, den Pulmonalarterien sowie den Karotiden, wobei man die frühesten Läsionen in der Arteria brachiocephalica detektieren kann [50].

Jedoch zeigten sich zwischen den verschiedenen Modellen deutliche Unterschiede in der Suszeptibilität, so dass sich hauptsächlich die ApoE-KO- und die LDLR-KO-Maus als Atherosklerose-Modell durchgesetzt haben.

Der Vorteil der am häufigsten genutzten ApoE-KO-Mäuse auf einem C57BL6-Hintergrund liegt darin, dass sie spontan Läsionen im kompletten arteriellen Gefäßsystem entwickeln, die den menschlichen Läsionen zudem sehr ähnlich sind [51]:

- Im Alter von 8 Wochen beginnt die Monozytenadhäsion;
- mit 10 Wochen finden sich Schaumzellläsionen;
- mit 20 Wochen entwickeln sich Plaques mit fibröser Kappe, gMZ, Bindegewebe, nekrotischem Kern und Schaumzellen.

Allerdings ist das Ausschalten des ApoE-Gens ein nicht unerheblicher Eingriff in den Lipidmetabolismus.

Apolipoprotein E ist ein hauptsächlich in der Leber synthetisiertes Glykoprotein. Es wird zwischen TRL, IDL und HDL ausgetauscht und vermittelt als Ligand für Lipoproteinrezeptoren der LDLR-Familie die Aufnahme der Partikel sowie ihrer Restpartikel. Da es von Monozyten bzw. Makrophagen des Endothels produziert wird, kann es auch lokal wirken und so unter anderem die LPL-Aktivität oder den Cholesterin-Efflux modulieren.

ApoE kommt in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlicher Rezeptoraffinität vor, die über verschiedene Konzentrationen der LDL-Restpartikel auch das Atherosklerose-Risiko beeinflussen [52]; ApoE3 ist dabei mit 60 % die häufigste Variante mit normaler Funktion.

ApoE spielt aber nicht nur im Lipoproteinstoffwechsel, sondern auch bei der Immunantwort, in der Muskeldifferenzierung und bei neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle, womit seine Bedeutung für den gesamten Organismus deutlich wird.

Mit Hilfe homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen wurde 1992 die ApoE-Knockout-Maus (ApoE-KO-Maus) generiert [53]. Auf normaler Nager-Diät haben diese Mäuse aufgrund der Akkumulation cholesterinreicher Partikel Gesamtcholesterinwerte von 494 mg/dl im Vergleich zu 60 mg/dl der Wildtyp-Maus, auch die Triglyzeride sind mit 110 mg/dl im Vergleich zu 64 mg/dl deutlich erhöht [54].

Ein anderes häufig verwendetes Mausmodell ist die LDLR-Knockout-Maus [55, 56], die mit Gesamt-Cholesterin-Werten um 250 mg/dl an einer leichteren Hypercholesterinämie leidet und insgesamt mit höheren LDL-Werten dem menschlichen Lipidprofil ähnlicher ist. Jedoch entwickelt sie keine spontanen Läsionen bzw. erst sehr spät, so dass hier eine spezielle Diät unverzichtbar ist.

Mit Hilfe von cholesterinreichen Diäten, wie der Western-type-diet (WTD), kann man zwar die Plaque-Progression beschleunigen, allerdings können diese selbst inflammatorisch wirken oder über Adipositas bzw. Diabetes mellitus die Atherosklerose-Entstehung beeinflussen [57], was die Beurteilung des Effektes der genetischen Veränderung erschwert.

1.5 APOLIPOPROTEIN A5

1.5.1 Entdeckung

Bei einer Studie zum Thema Leberregeneration [58] wurde 2001 ein Protein entdeckt, das sechs Stunden nach partieller Hepatektomie stark hochreguliert wurde, daraus resultierte zunächst der Name RAP 3, regeneration-associated-protein 3. Zur gleichen Zeit wurde das Protein von einer anderen Gruppe durch Sequenz-vergleichende Analysen zwischen Maus und menschlicher DNA entdeckt [59]. Das ApoA5-Gen (Abb. 4) auf Chromosom 11q23, nahe des ApoA1/C3/A4-Clusters, besteht aus 4 Exons und codiert ein Protein von 366 Aminosäuren mit 71%iger Ähnlichkeit zum Maus-ApoA5 und 27%iger Homologie zum menschlichen ApoA4.

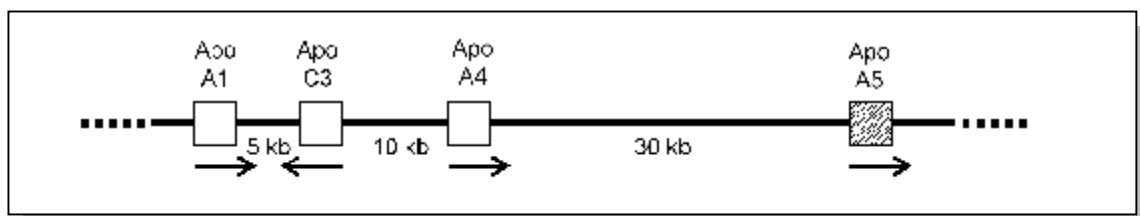


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Apolipoproteinclusters auf Chromosom 11q23 .
Die Entfernung zwischen den Genen ist gekennzeichnet. kb Kilobase.

Strukturanalysen zeigten viele amphipatische helikale Domänen sowie ein N-terminales Signalpeptid, charakteristische Eigenschaften von lipidbindenden Apolipoproteinen [60]. Im Northern Blot wurden zwei leberspezifische Transkripte gefunden, die durch alternative Polyadenylylation entstehen. Das 39 kD schwere Protein ist auf den HDL und TRL zu finden, aber im Vergleich zu anderen Lipoproteinen in sehr geringen Konzentrationen, 500fach niedriger konzentriert als ApoC3. Beim Menschen wurde eine mittlere Konzentration von 157 ng/ml gefunden, wobei in Frauen signifikant höhere A5-Spiegel auffielen [61]. Aufgrund der Triglyzerid-senkenden Wirkung in Mäusen wurde untersucht, ob ApoA5 eine Rolle in der Fibrat-Wirkung hat [62]. Dabei wurde entdeckt, dass die ApoA5-Gen-Expression über Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise den Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor α , [63] reguliert wird. Außerdem zeigte sich paradoxerweise ein deutlich besseres Ansprechen auf die Therapie, wenn eine Mutation im A5-Gen vorlag.

1.5.2 Funktionen

Nach der Entdeckung wurden verschiedene Mausmodelle untersucht. Die A5-KO-Maus, bei der das ApoA5-Gen deletiert ist, zeigte 4-fach erhöhte Triglyzerid-Werte im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen, während die Triglyzeride der A5-transgenen Tiere, die zusätzlich zum murinen ApoA5-Gen das humane in der Leber exprimierten, zwei Drittel niedriger waren [64]. Bei adenoviral überexprimiertem ApoA5 [65] wird das Protein 20-fach höher exprimiert, was eine 70%ige Triglyzerid (Tg) -Erniedrigung, aber auch 40%ige Cholesterin-Erniedrigung, insbesondere in der HDL-Fraktion, zur Folge hat. Passend dazu zeigten sich in ApoA5-defizienten Mäusen teilweise deutlich erhöhte HDL-Spiegel [66].

Beim Menschen wurden sowohl negative Korrelationen zwischen Plasma-A5-Spiegeln und Triglyzeriden gefunden als auch in zunehmendem Maße Hinweise für eine positive Korrelation. In normolipämischen Menschen konnte entweder keine Korrelation zwischen A5-Konzentrationen und Plasma-Tg-Konzentrationen [61, 67] oder eine negative Korrelation gefunden werden [68], während bei hyperlipämischen Menschen, wie beispielsweise Typ 2- Diabetikern, positive Korrelationen nachgewiesen wurden [67, 69-73]. Nach diesen Zusammenhängen konnte in Mäusen, die das humane Transgen exprimieren, nicht jedoch das murine ApoA5-Gen, ebenfalls eine positive Assoziation nachgewiesen werden [74].

In einer weiteren Studie mit adenoviral-überexprimiertem ApoA5 wurde eine Erniedrigung der VLDL-Triglyzerid-Synthese über Inhibition der intrahepatischen Lipidierung von ApoB100 gefunden, bei unbeeinflusster VLDL-Partikelanzahl [75]. Insgesamt konnte aber kein Einfluss von ApoA5 auf die TRL-Produktion nachgewiesen werden [76-78]. Aufgrund starker Hydrophobizität, vieler α -helikaler Strukturen, hoher Affinität, geringer Elastizität und langsamer Bindungskinetik an hydrophoben Grenzschichten wurde eine hemmende Rolle im VLDL-Zusammenbau postuliert [79]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte die A5-Assoziation mit intrazellulären Lipidtröpfchen gezeigt werden, die als Erklärung für die geringe Plasmakonzentration eine Rolle in der Speicherung oder Mobilisierung der intrazellulären Lipide nahe legt [80].

Da ApoC3 und ApoA5 scheinbar gegensätzliche Funktionen haben, wurde überlegt, ob ihre Wirkung voneinander abhängig ist. Dies konnte aber in Doppel-KO- und Doppel-transgenen Mäusen ausgeschlossen werden [81]. Dennoch sind die ApoC3-Spiegel in A5-transgenen und A5-KO-Mäusen verändert. Trotz antagonistischer Wirkung werden beide Apoproteine scheinbar synergistisch reguliert [82].

Auch bei hyperlipämischen Menschen findet man teilweise hochregulierte Spiegel von ApoA5 und ApoC3 [67]. Es wird von einem komplexen Zusammenspiel ausgegangen.

ApoA5 stimuliert in Anwesenheit von ApoC2 und HSPG's [83] über direkte sowie indirekte Interaktion die LPL-vermittelte Hydrolyse und führt so zur verbesserten Metabolisierung der TRL [75, 78, 84, 85]. Dementsprechend sind ApoA5-transgene Mäuse durch einen beschleunigten VLDL-Katabolismus sowie einen niedrigeren postprandialen Triglyzerid-Anstieg [78] gekennzeichnet. In ApoA5-defizienten Mäusen ist die Hydrolyse der TRL verlangsamt, auch sind die Restpartikel schlechtere Rezeptor-Liganden [77].

Eine ApoA5-Defizienz kann über LPL-Überexpression ausgeglichen werden, nicht jedoch umgekehrt [78]. Über eine Bridging-Funktion der TRL zur LPL sowie über die Stabilisierung des LPL-Dimers entfaltet ApoA5 seine indirekten Wirkungen [75, 86].

Insgesamt zeigt sich aber deutlich, dass die LPL der wichtigste Faktor für die Hydrolyse ist und ApoA5 nur als Modulator wirken kann [78]. In weiteren Studien konnte eine vermehrte Restpartikel-Aufnahme, insbesondere LPL-exprimierender Gewebe, gezeigt werden. Auch die vermehrte Ansammlung des Proteins an der hepatozellulären Membran legt eine Funktion in der Partikelaufnahme nahe. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte die Bindung von ApoA5 an das LRP1 und SorLA nachgewiesen werden, wobei sich die Rezeptorbindungsstelle und die Heparinbindungsstelle für die HSPG's zum Teil überlappen [87].

1.5.3 Polymorphismen

Triglyzerid-Werte werden zu 20 bis 80 % vererbt und zum anderen stark durch exogene Faktoren beeinflusst [88]. Der ApoA5-Locus wird für interindividuelle Triglyzerid-Unterschiede verantwortlich gemacht, so wie das gesamte ApoA1/C3/A4/A5-Cluster [89, 90]. A5-Punktmutationen beim Menschen werden überwiegend mit erhöhten Triglyzerid-Werten in Zusammenhang gebracht [91-95]. 70 % der ApoA5-Punktmutationen findet man bei adipösen Menschen [96]. ApoA5-Mutationen sind im Weiteren mit der familiär kombinierten Hyperlipidämie, erhöhten Werten des C-reaktiven Proteins, veränderten ApoA5-Konzentrationen sowie verringerter Insulin-Sensitivität assoziiert.

Der Haplotyp A5*1 beinhaltet als häufigste Variante keine Punktmutationen mit normalen Triglyzerid-Werten. Die Haplotypen A5*2 (mit den seltenen Allelen: -1131T>C, c.-3A>G, IVS3+476G>T und c.1259T>C) und A5*3 (S19W-Variante des Signalpeptids) sind mit erhöhten Triglyzerid-Werten verbunden, treten beide zusammen auf, sind die Triglyzeride um 85 % erhöht [97].

Beim A5*2-Haplotyp fallen eine höhere Restpartikel-Anzahl, kleinere LDL sowie ein insgesamt stärker atherogenes Lipidprofil auf [98], was bei Frauen in der Framingham Heart Studie zu 2-fach erhöhtem KHK-Risiko geführt hat [99], während andere Studien für diese Genvariante keine Assoziation finden konnten. Außerdem konnte eine Korrelation zum Auftreten des Metabolischen Syndroms mit dieser Genvariante gefunden werden [100-102], obwohl unter Hochfettdiät eine verminderte Gewichtszunahme festgestellt wurde [103].

Der A5*3-Haplotyp ist insbesondere durch erhöhte IDL-Lipide gekennzeichnet, die ebenfalls in einigen Studien mit erhöhtem KHK-Risiko einhergehen [104, 105]. Für die Variante des Signalpeptids des ApoA5 (S19W) wurde eine verminderte Translokation und Sekretion beschrieben [106], im Mausmodell bestätigten sich erniedrigte A5-Spiegel [107].

Die Penetranz dieser Mutationen ist allerdings sehr gering, dementsprechend ist die Ausprägung abhängig von anderen Lipid-erhöhenden Genveränderungen sowie exogenen Einflüssen, insbesondere A5-Diät-Interaktionen [103, 108]. Da diese Faktoren bei den KHK-Studien häufig nicht beachtet wurden, sind die Ergebnisse schwierig zu beurteilen.

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass A5*3 unabhängig von ApoC3-Mutationen wirkt, während für A5*2 ein Einfluss von C3-Varianten nicht immer ausgeschlossen werden konnte [72, 90, 109]. In manchen Studien zum Thema Atherosklerose-Empfindlichkeit [98, 99, 104, 105, 110, 111], aber nicht in allen, waren ApoA5-Varianten mit erhöhtem Herzinfarkt-Risiko assoziiert [73, 89]. Leider wurde hierfür meist der A5*2-Haplotyp genutzt, ohne dass der C3-Genotyp betrachtet wurde, so dass die Beurteilbarkeit hier deutlich eingeschränkt ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien

In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (pro analysi) verwendet, die soweit nicht gesondert erwähnt, von Sigma-Aldrich oder Merck bezogen wurden.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Aqua injectabilia	Braun, Melsungen
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Chol-/Tg-Standardlösung für Assays	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithioereitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Deisenhofen
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Heptan	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumbromid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T. Baker, Holland
N-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
PBS	Gibco (Invitrogen)
PCR-Puffer (10x)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Solvable	PerkinElmer, Boston
Szintillationsflüssigkeit, Aquasafe 500 plus	Zinsser Analytic, Frankfurt a.M.
Tissue Tek	Sakura, Niederlande
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Trizma Base	Sigma, Deisenhofen
Wasser	Wasser wurde mit einem BiDest der Firma F. Gössner, Hamburg, doppelt destilliert und autoklaviert.

2.1.2 Enzyme und Proteine

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

2.1.3 Nucleotide

Nucleotid	Hersteller
Desoxyadenosintriphosphat (dATP) Desoxycytidintriphosphat (dCTP) Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Marker für 100 bp	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Primer hA5Tg/1FW Primer hA5Tg/2BW Primer Apo NE Primer Apo 2E Primer Apo 3E	MWG Biotech AG, Ebersberg

2.1.4 Narkosemittel

Narkosemittel	Hersteller
Ketamin, 100 mg/ml	Gräub AG, Bern
Rompun 2 %	Bayer Vital, Leverkusen

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
β-Counter-Röhrchen	PerkinElmer, Boston
Einbetttschälchen Tissue Tek Cryomold	Sakura Finetek, Niederlande
γ-Counter-Röhrchen	Sarstedt
heparinisierte Hämatokritkapillaren	Hirschmann, Eberstadt
Kanülen	Braun, Melsungen
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
PCR-Tubes	Corning Inc., New York
Petrischalen	Nunc, Dänemark
Skalpelle	Braun, Tuttlingen
Spritzen	BD Discardit II, Spanien
starkwandige Reagenzgläser (Assistent)	Francke, Hamburg
Reagenzgläser Elka (Assistent)	Francke, Hamburg
verschießbare Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugationsröhrchen	Beckman, München

2.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Absauggerät Miniport	Servox Medizintechnik, Köln
Betacounter Wallac 1409	Perkin Elmer, Boston
FPLC Anlage	Amersham Biosciences, Freiburg
Fraktionssammler	Pharmacia LKB, Upsala Schweden
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gel-Elektrophoresekammer	Biorad, München
Gammacounter 1272-004	Perkin Elmer, Boston
Hamiltonspritze	Kloehn Co., Inc., Kalifornien
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Laborzentrifuge 5402	Eppendorf, Köln
Laborzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Mikroskop h33	Hund, Wetzlar

Gerät	Hersteller
Mikrotiterplattenlesegerät Biotrak II	Amersham Biosciences
PCR-Thermocycler TP48	Biometra, Göttingen
Powersupply Power Ease 500	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Schüttelinkubator	Edmund Bühler
Superose 6 Säule	Pharmacia LKB, Upsala Schweden
Tissue Lyser	Qiagen, Retsch
Ultrazentrifuge L-90K mit Rotor SW 40	Beckman-Coulter, München
Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor LP42TI	Beckman, München
Videodokumentationsgerät für Agarose-Gele	Intas, Göttingen

2.1.7 Standard-Pufferlösungen

Puffer	Inhaltsstoffe
FPLC-Puffer	1 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0
Jonathans-PCR-Puffer (J's)	Ansatz für 50 ml: 5,68 ml DMSO; 0,945 ml (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 3,8 ml 1M Tris HCl pH 8,8; 380 µl 1M MgCl ₂ ; 570 µl 1M DTT; 9,65 ml 1mg/ml BSA und je 115 µl Desoxynukleosidtriphosphate werden gemischt und mit sterilem, gefiltertem Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt.
Lade-Puffer	500 µl 10 % Bromphenolblau; 6 ml Glycerol; 13,5 ml H ₂ O
Lysis-Puffer (2-fach)	480 g Harnstoff; 40 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 33 ml 30 % Sarkosyl; 200 ml 1M Tris-HCl pH 8,0; 80 ml 5M NaCl
Phosphat Buffered Saline (PBS)	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ in 1 Liter Aqua dest.
TBE-Puffer (10-fach konzentriert)	108 g Trisbase; 55 g Borsäure; 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 Liter Aqua dest.
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	500 µl 1 M Tris-HCL pH 7,6 und 100 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 in 50 ml Aqua dest.

2.2 METHODIK

2.2.1 Versuchstiere – allgemeine Maßnahmen

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Mäuse, die bezüglich aller üblichen Serologien, insbesondere des Maus-Hepatitis-Virus, negativ waren. Zur Prävention einer möglichen Durchseuchung der Stämme wurden die Tiere zuerst einem Embryotransfer unterzogen und danach in speziellen, pathogenarmen Räumen der Versuchstierhaltung des UKE untergebracht. Dort wurden sie mit normaler Nager-Diät gefüttert und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Sämtliche Kreuzungsschritte wurden mit dem Inzuchtstamm FVB durchgeführt, um schrittweise einen weitgehend genetisch homogenen Hintergrund zu schaffen. Um die Versuchsbedingungen weiter zu verbessern, wurden stets Geschwistertiere miteinander verglichen. Alle Tierversuche wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit genehmigt, bzw. bei dieser angezeigt. Es bestanden Genehmigungen nach § 7 TierSchG (51/02; 14/05) und § 6 TierSchG (UKE-VTH-Aktenzeichen A65, A66). Organentnahmen hatten das interne Registrierzeichen Org 163 der Universität Hamburg.

2.2.2 ApoA5-transgene Mäuse

Diese Tiere wurden vom Genome-Sciences-Department, Lawrence-Berkeley-National-Laboratory, Berkeley, USA bezogen. Um ApoA5-transgene Mäuse zu erzeugen, wurde ein 26 kbp großes XhoI-Genfragment, welches das humane ApoA5 kodiert, in das Mausgenom integriert. Dieses Fragment wird, ebenso wie das endogene Maus ApoA5-Gen, ausschließlich in der Leber exprimiert [59]. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe ist der Plasma-Triglyzeridspiegel von transgenen Mäusen etwa zwei Drittel erniedrigt.

2.2.3 ApoA5-transgene Mäuse auf dem ApoE-defizienten Hintergrund

Für die Untersuchung von Atherosklerose-Unterschieden sollte der ApoA5-Transgen-Effekt auf einem ApoE-KO-Hintergrund betrachtet werden. Dazu wurden FVB-E-Knockout-Mäuse (FVBE0) freundlicherweise von PD D. Teupser aus der Uniklinik Leipzig zur Verfügung gestellt [57] und konnten so mit ApoA5-transgenen Mäusen gekreuzt werden. In weiteren Schritten wurde der Hintergrund homozygot gezüchtet.

2.2.4 Kreuzungsstrategie

Die aus Berkeley bezogenen Mäuse waren ausschließlich hemizygot bezüglich des Transgens. Um eine transgene und eine Wildtyp-Gruppe zu erhalten, wurde jeweils ein hemizygot Tier mit einer Wildtyp-Maus gekreuzt.

Die Nachkommen sollten entsprechend den Mendelschen Regeln zur Hälfte das Transgen tragen und die anderen 50 % das Wildtyp-Genom. Homozygotie bezüglich des Transgens erwies sich als ungünstig, da diese mit den üblichen PCRs nicht von hemizygotem Auftreten zu differenzieren war und hierdurch Versuchsergebnisse hätten verfälscht werden können. Die FVBE0 wurde mit einer FVB-ApoA5-transgenen Maus verpaart, so dass man einen ApoE-heterozygoten Wurf erhielt, der zur einen Hälfte das Transgen, zur anderen nur den ApoA5-Wildtyp exprimiert. Im Weiteren wurden die Mäuse so verpaart, dass der ApoE-KO-Hintergrund homozygot und das ApoA5-Transgen heterozygot blieben.

2.2.5 Genotypisierung der Mäuse

2.2.5.1 Allgemeines Prinzip

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch DNA-Gewinnung und Reinigung aus einer Schwanzspitzenbiopsie, anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Analyse der Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Um die DNA aus den Zellen zu lösen, wurden vor der DNA-Extraktion die Zellmembranen durch einen Lysis-Puffer zerstört und die Proteine durch das Enzym Proteinase K verdaut. Mit Hilfe der PCR wird die DNA zunächst denaturiert, bevor spezielle Primer binden und in der Elongationsphase einen definierten Genabschnitt vervielfältigen. Dieses Fragment kann dann anschließend in der Gel-Elektrophorese dargestellt werden.

2.2.5.2 Verdau der Schwanzbiopsie

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

2.2.5.3 Extraktion genomischer DNA

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und 400 µl davon in das Reaktionsgefäß mit der verdauten Schwanzspitze gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde für 5 Minuten bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die oberste Phase des Gemisches wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol gegeben und kräftig geschüttelt. Hierbei fiel die genomische DNA aus. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 13 000 rpm und 4 °C erneut zentrifugiert. Dabei setzte sich das DNA-Pellet ab, so dass das Phenol-Chloroform-Ethanol-Gemisch mit Hilfe einer Pumpe vorsichtig abgesaugt werden konnte. Nach dem Trocknen wurde die DNA mit 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Die so erhaltene DNA ist bei 4 °C über mehrere Wochen stabil und kann durch PCR untersucht werden.

2.2.5.4 PCR zur Bestimmung des Transgens

Zur Bestimmung des ApoA5-Transgens wurde eine bereits etablierte PCR verwendet.

Primer ha5Tg/1FW (5'-CCC GCT GCA GTC CCC AGA AT-3') und

Primer ha5Tg/2BW (5'-CAG GGT CGA GGG CTC TTG TCC T-3')

amplifizieren eine Bande von 148 bp in Gegenwart des intakten ApoA5-Transgens.

Bei einem Reaktionsvolumen von 25,5 µl wurden

- 20,4 µl J's Puffer;
- je 0,5 µl der Primer ha5Tg/1FW und ha5Tg/2BW (je 10 pmol/µl);
- 0,1 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) und
- 4 µl genomische DNA eingesetzt.

Die Proben wurden 1 Minute bei 95 °C denaturiert, dann folgten 35 Zyklen mit je 1 Minute bei 95 °C, 1 Minute bei 53 °C und 3 Minuten bei 72 °C.

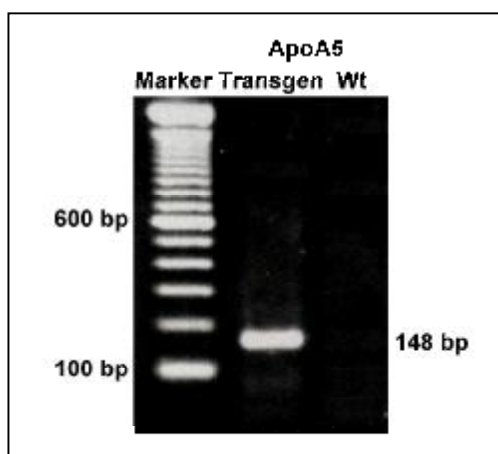


Abbildung 5: PCR zum Nachweis des ApoA5-Transgens.

Als Marker wurden 100 bp-DNA-Fragmente verwendet, wobei die 600 bp-Bande dicker als die übrigen erscheint. Bei Vorliegen des Transgens wurde eine Bande auf Höhe von 148 bp sichtbar. bp Basenpaar, Wt Wildtyp.

2.2.5.5 PCR zur Bestimmung des ApoE-Genotyps

Zur Bestimmung des Genotyps im ApoE-Locus wurde eine 3-Primer-PCR verwendet.

Primer Apo NE (5'-CGC CGC TCC CGA TTC GCA GCG CAT CGC-3'),

Primer Apo 2E (5'-CTC TGT GGG CCG TGC TGT TGG TCA CAT TGC TGA CA-3') und

Primer Apo 3E (5'-CTC GAG CTG ATC TGT CAC CTC CGG CTC TCC C-3')

amplifizieren eine Bande von 600 bp in Gegenwart des ApoE-Wildtyps und eine Bande von 400 bp, wenn das ApoE-Gen ausgeschaltet ist.

Bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden

- 2 µl 10xPCR-Puffer;
- 2 µl MgCl₂;
- 0,25 µl des Primer-Mix (alle Primer je 10 pmol/µl zu gleichen Anteilen gemischt);
- 1 µl DMSO; 1,6µl dNTP's;
- 0,25 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl);
- 10,9 µl Wasser und
- 2 µl genomische DNA eingesetzt.

Die Proben wurden 1 Minute bei 95 °C denaturiert, d ann folgten 35 Zyklen mit je 30 s bei 95 °C, 30 s bei 57 °C und 40 s bei 72 °C.

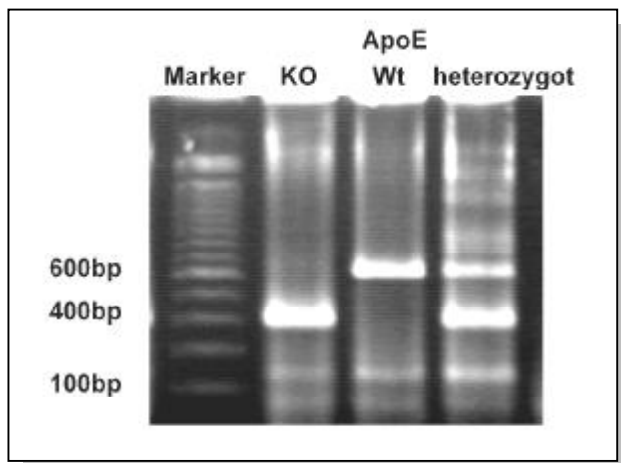


Abbildung 6: PCR zur Detektion des ApoE-Genotyps.

Als Marker wurden 100 bp DNA-Fragmente verwendet. Wenn ApoE komplett ausgeschaltet wurde, wird eine Bande bei 400 bp sichtbar, für den Wildtyp bei 600 bp, der heterozygote Knockout zeigt beide Banden. bp Basenpaar, KO Knockout, Wt Wildtyp.

2.2.5.6 Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde ein 2%iges Agarose-Gel verwendet. Hierfür wurden 100 ml TBE-Puffer mit 2 g Agarose in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt, bis eine klare Flüssigkeit entstanden war und in eine Gelkammer mit einem 20-zähligen Kamm gegossen. Sobald das Gel abgekühlt und fest war, konnte der Kamm gezogen und das nun mit Taschen versehene Gel mit seinem Schlitten in die Elektrophoresekammer gelegt werden.

Diese wurde dann soweit mit TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche wurden 5 µl eines 100 bp-Markers zur Größenbestimmung der Banden hineingegeben. In die folgenden Taschen wurden nun 20 µl der PCR-Proben pipettiert, die zuvor mit 4 µl Lade-Puffer vermischt wurden. Bei einer Spannung von 100 bis 120 Volt wurde das Gel für 45 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel für mindestens 10 Minuten in ein Nachfärbebad mit TBE-Puffer und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gelegt, so dass die Banden danach unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten.

2.2.6 Lipoproteinprofil

2.2.6.1 Prinzip

Zur Bestimmung der Lipoproteinprofile einzelner Mäuse wurde bei diesen eine Nüchternblutentnahme durchgeführt und 60 µl des so erhaltenen Plasmas sequentiell in einer Dichte von 1,006 g/ml und 1,063 g/ml ultrazentrifugiert [112]. Alternativ zur Ultrazentrifugation wurde die so genannte Fast Performance Liquid Chromatographie (FPLC) zur Bestimmung der Lipoproteinprofile der verwendeten Genotypen angewendet. Die VLDL, LDL, HDL und das Plasma wurden dann mittels eines kommerziell erhältlichen enzymatischen Farbtests auf Triglyzerid- und Cholesteringehalt untersucht.

2.2.6.2 Blutentnahme

Mittels einer heparinisierten Hämatokritkapillare wurde das Blut bei den narkotisierten Mäusen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus gewonnen. Bei Blutentnahmen von mehr als 100 µl wurden pro 100 µl Blut je 2 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) zur Antikoagulation hinzugefügt. Anschließend wurde das Plasma durch Zentrifugation (10 Minuten bei 10 000 rpm) von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes getrennt und abgenommen.

Für die Nüchternblutentnahme wurde den Mäusen nach 4-stündigem Fasten (von 07:00 Uhr bis 11:00 Uhr) Blut abgenommen. Diese Fastenperiode hat sich als sinnvoll erwiesen, da Mäuse vorwiegend in der Dunkelphase fressen. Ein Fasten über Nacht erscheint unphysiologisch, da dies eine fast 24-stündige Nahrungskarenz der Tiere zur Folge hätte. Daher entspricht ein Fasten tagsüber bei Mäusen am ehesten einer Nüchternblutentnahme beim Menschen.

2.2.6.3 Lipoproteinenzentrifugation

60 µl PBS wurde in einem Ultrazentrifugationsröhrchen vorgelegt und mittels einer Hamilton-Spritze mit 60 µl Plasma unterschichtet. Die Ultrazentrifugation wurde für 2,5 Stunden bei 42 000 rpm und 4 °C in einer Beckman-Zentrifuge L7-55 mit einem Rotor Typ LP 42TI durchgeführt. Am Ende dieses ersten Schrittes befanden sich in den oberen 60 µl die VLDL, während in der unteren Phase HDL, LDL und IDL vorlagen.

Die untere Phase wurde nun mit einer Hamilton-Spritze in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 60 µl Kalium-Bromid mit einer Dichte von 1,12 g/ml gemischt, um eine Dichte von 1,063 g/ml zu erreichen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 6 Stunden bei 42 000 rpm und 4 °C. Die obere Phase mit den VLDL wurde zur weiteren Verwendung in ein verschließbares Reaktionsgefäß überführt.

Nach der zweiten Zentrifugation enthielten die unteren 60 µl die HDL, die oberen die LDL und IDL. Zuerst wird die untere, dann die obere Phase abgenommen und ebenfalls zur weiteren Verwendung in verschließbare Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.6.4 Fast performance liquid chromatography (FPLC)

Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration nach der Methode von Rudel [113] eingesetzt. Dazu wurde eine Fast performance liquide chromatography (FPLC®)-Anlage (Amersham-Biosciences) mit einer Superose®-6-Säule verwendet, die einen für Plasmalipoproteine optimalen Trennbereich von 5-5000 kDa besitzt. 200 µl des zuvor gepoolten Plasmas wurden in ein automatisches Probenentnahmegesetz injiziert. Die Probenschleife wird automatisch befüllt, das Plasma auf die Säule geleitet und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in FPLC-Puffer aufgetrennt. Das Probengemisch trennte sich durch unterschiedliche Flussgeschwindigkeit bzw. Adhärenz nach Größe der verschiedenen Komponenten.

Das Eluat wurde in insgesamt 40 0,5-ml-Fractionen gesammelt und bei 4 °C aufbewahrt. In den so gewonnenen Fractionen konnte der Triglyzerid- bzw. Cholesteringehalt photometrisch bestimmt werden.

2.2.6.5 Triglyzerid- und Cholesterinbestimmung

Triglyzerid- bzw. Cholesterinassays beruhen auf einem enzymatischen Farbstest, wobei die photometrisch bestimmte Extinktion des in der Reaktion entstehenden Farbstoffes proportional zur Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Konzentration ist. Für jede Mikrotiterplatte wurde jeweils eine Standardreihe im Doppelansatz bestimmt, aus der sich später der Gehalt an Triglyzeriden und Cholesterin der Plasmaproben errechnen ließ. Der jeweilige Standard der Reagenzien (etwa 200 mg/dl bei der Cholesterin-Bestimmung und etwa 250 mg/dl bei der Triglyzerid-Bestimmung, je nach Kit) wurde auf 0,5; 1,25; 2,5; 3,75; 7,5 und 15 mg/dl verdünnt und jeweils 100 µl im Doppelansatz verwendet. Die Plasmen bzw. Fractionen wurden entsprechend verdünnt, so dass die Messwerte innerhalb der Standardreihe lagen. Jede Probe wurde mit 200 µl der Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Reagenzien in einer Mikrotiterplatte gemischt. Anschließend wurden die Assays 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion des rötlichen Farbstoffes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt.

Aus der Standardreihe wurde eine Eichgerade erstellt und der Proportionalitätsfaktor errechnet. Somit konnte aus der Extinktion der Proben durch Multiplikation mit dem Proportionalitäts- und dem Verdünnungsfaktor der Triglyzerid- bzw. Cholesterin-Gehalt in mg/dl berechnet werden.

2.2.7 Atherosklerose-Präparation

2.2.7.1 Prinzip

Bei dem verwendeten Tiermodell sind im Vergleich zum Wildtyp verstärkte atherosklerotische Veränderungen mit dem Alter zu erwarten. Um mögliche Unterschiede zwischen den Genotypen zu erkennen, wurde eine Quantifizierung dieser Veränderungen durchgeführt. Dazu wurden die Brachiocephalarterie [114] als erster präparierbarer Abzweig der Aorta sowie das Herz mit der Aortenwurzel [115] der Mäuse im Alter von 22 Wochen präpariert. Das Schneiden, Färben und Quantifizieren der Proben übernahmen freundlicherweise Franziska Jeromin und Claudia Weise aus der Uniklinik Leipzig.

2.2.7.2 Durchführung

Die Mäuse wurden zwecks einer Nüchternblutabnahme von 07:00 bis 11:00 Uhr gefastet. Danach erfolgte die Betäubung mit Rompun/Ketanest. In Narkose-Stadium 2 wurden Hals-, Brust- und Bauchraum eröffnet. Die Blutentnahme erfolgte aus dem rechten Ventrikel, bevor der rechte Vorhof angeschnitten und das Kreislaufsystem über den linken Ventrikel mit 10 ml Heparin-PBS (10 U/ml) perfundiert wurde. Aus dem Blut wurde, wie schon beschrieben, Plasma hergestellt und über sequentielle Ultrazentrifugationen untersucht. Von diesem Zeitpunkt an wurde unter dem Mikroskop weitergearbeitet. Der Brustkorb wurde weitgehend entfernt, am Brustbein ziehend wurde die Verbindung der Schlüsselbeine durchtrennt, so dass die Halsweichteile freilagen. Zunächst konnte die Arteria Carotis bis zu ihrer Gabelung freipräpariert werden. Anschließend wurden die Aortenwurzel und die Arteria brachiocephalica (BCA) vorsichtig von dem umgebenden Fett gelöst, um schließlich den anderen Ast, die Arteria Subclavia, von der 1. Rippe frei zu präparieren. Danach konnten die Arteria Carotis und die Arteria Subclavia kurz nach ihrem Abgang von der BCA und die BCA an ihrer Wurzel abgeschnitten werden, so dass man ein y-förmiges Präparat in PBS überführen konnte. Die Arterie wurde auf-dem-Kopf-stehend in ein Einbetttschälchen mit Tissue Tek überführt und sogleich bei -80 °C eingefroren. Das Herz wurde von Lunge und Fett gelöst, auf Höhe der ehemaligen BCA die Aorta durchtrennt und mit einem Skalpell parallel zur Klappenebene geteilt, bevor es in Tissue Tek eingefroren werden konnte. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Präparate zunächst in Aluminiumfolie eingewickelt bei -80 °C gesammelt und dann auf Trockeneis nach Leipzig geschickt.

2.2.8 *In vivo*-Studien

2.2.8.1 Prinzip

Bei dem verwendeten Tiermodell sind Veränderungen des Abbaus triglyzeridreicher Lipoproteine und der organspezifischen Aufnahme einzelner Komponenten zu erwarten. Metabolische Turnoverstudien erfolgten entweder mit *in vivo*- oder *in vitro*-markierten VLDL von ApoE-KO-Mäusen sowie mit künstlich hergestellten Lipid-Mizellen. Nach der Partikelinjektion in die Schwanzvene werden zu festgelegten Zeitpunkten Blutentnahmen durchgeführt und am Ende des Versuchs die Organe entnommen. Als Kontrollgruppen dienten entweder heterozygote ApoE-KO-Tiere oder Wildtyp-Mäuse jeweils mit und ohne ApoA5-Transgen.

2.2.8.2 Markierung der Lipoproteine

Zum Verständnis von Hydrolyse- und Organaufnahme-Vorgängen wurden sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-markierte TRL genutzt. Für die *in vivo*-Markierung wurde an Albumin gebundene [³H]-Palmitinsäure (Amersham, USA) in die Schwanzvene von narkotisierten ApoE-KO-Mäusen injiziert. Nach etwa 60 Minuten wurden diese Mäuse ausgeblutet, Plasma gewonnen, im Verhältnis 1 : 6 mit Dichtelösung (1,21 mg/dl) vermischt und unter PBS geschichtet, so dass nach vier Stunden Ultrazentrifugation bei 38 000 rpm und 4°C die VLDL mit den eingebauten Palmitinsäure-Triglyzeriden abgenommen werden konnten. Bei den *in vitro*-Markierungen wurden zunächst ApoE-KO-VLDL wie beschrieben gewonnen und anschließend mit [¹²⁵I]-Tyramincellobiose, [³H]-Cholesterylether sowie mit [¹⁴C]-Triolein markiert. Im Rahmen einer Mehrfach-Markierung wurden VLDL über Nacht mit CETP, [¹⁴C]-Triolein-Triglyzeriden und [³H]-Cholesterylether inkubiert und am nächsten Morgen die Aktivität bestimmt, damit in passendem Verhältnis jodiert werden konnte. In einem weiteren Versuchsansatz wurden künstlich hergestellte Mizellen *in vitro* mit [³H]-Cholesterylether sowie mit [¹⁴C]-Triolein markiert und deren Umsatz beurteilt. [¹²⁵I]-Tyramincellobiose und [³H]-Cholesterylether werden in dem Versuchszeitraum nicht wesentlich metabolisiert und können einmal aufgenommen, die Zellen nicht wieder verlassen. Die von den einzelnen Organen aufgenommene Radioaktivität kann somit direkt miteinander verglichen werden und erlaubt eine Einschätzung der Organaufnahme ganzer Lipoproteine sowie der selektiven Cholesterylester-Aufnahme. Hingegen wird das [¹⁴C]-Triolein-Triglyzerid-Label schnell metabolisiert und dient als Hydrolyse-Marker.

Sämtliche Markierungen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. rer. nat. Jörg Heeren (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt.

2.2.8.3 Durchführung der Turnoverstudien

Bei allen durchgeführten Turnoverstudien wurden die Mäuse mindestens vier Stunden vor Beginn des Experiments gefastet. Die VLDL wurden maximal zwei Tage vor dem Experiment isoliert und erst am Tag der Durchführung markiert. Nach Injektion von 200 µl Substrat erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 5, 10, 20, 30, 40 und 60 Minuten) die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Plexus bei den narkotisierten Mäusen. Das Blut wurde bei 10 000 rpm für 10 Minuten in einer Minifuge zentrifugiert, das Plasma abgenommen und je nach Markierung die Radioaktivität gemessen.

Bereits vor der letzten Blutentnahme wurden die Mäuse mit Rompun/Ketanest betäubt, so dass wenig später nach Erlöschen der Reflexe der Brust- und Bauchraum eröffnet werden konnten. Anschließend wurde nach Einschneiden des rechten Vorhofs das Gefäßsystem der Maus über den linken Ventrikel langsam mit etwa 10 ml einer Lösung (PBS mit 10 U Heparin/ml) perfundiert. Zur Untersuchung der spezifischen Organaufnahme der markierten Partikel wurden Herz, Muskelbiopsate aus dem Oberschenkel, Leber, Milz, epidymiales Fettgewebe und Niere entnommen, gewogen und danach in passende Counter-
röhrchen überführt.

2.2.8.4 Radioaktivitätsmessung

Zur Messung der [³H]-Aktivität wurden die Organe zunächst über Nacht bei 60 °C im Wasserbad in einem Reagenz, Solvable, aufgelöst (siehe Tabelle), die gelösten Organe und die Plasmaproben in entsprechende Röhrchen mit 10 bzw. 5 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und anschließend für je 1 Minute in einem Beta-Counter gemessen. Mit dem Beta-Strahler ¹⁴C wurde entsprechend verfahren.

Tabelle 4: Organverdau mit Solvable. Gewichtsadaptierte Volumenangaben mit organspezifischem Verdau nach einem Protokoll von Packard (J. Thomson, D.A. Burns).

Organ	Solvable		30 % H ₂ O ₂	
Leber	7 ml	über Nacht	2 mal 0,1 ml	weitere 30 min
Milz	2 ml	im Wasserbad	2 mal 0,1 ml	im Wasserbad,
Fett	4 ml	bei 60°C		danach 2 ml
Muskel	3 ml	verdauen		gelöstes Organ
Herz	2 ml	lassen	2 mal 0,1 ml	messen
Niere	3 ml		2 mal 0,1 ml	

Bei der Einfachmarkierung mit ¹²⁵I konnten die Organe und Plasmen sofort in Gamma-Röhrchen überführt und je 1 Minute im Counter gemessen werden. Bei der Dreifachmarkierung wurde zunächst die Radioaktivität der Organe und Plasmen für ¹²⁵I im Gamma-Counter bestimmt.

Anschließend wurden die Lipide extrahiert und die Radioaktivität für ³H und ¹⁴C mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit pro Probe für 10 Minuten gemessen. Durch dieses Vorgehen wurde eine Interferenz zwischen den Gamma- und Beta-Strahlern vermieden.

2.2.8.5 Lipidextraktion

Bei den dreifach-markierten Partikeln sowie nach dem Mizellen-Turnover erfolgte die Extraktion der Lipide aus Organen und Plasmen nach der Methode von Dole [116]. Die hierfür vorgesehenen Mengenangaben wurden an die geringen Volumina der Mausorgane angepasst. Zunächst wurde die Extraktionslösung aus 78 % Isopropanol (800 ml), 20 % Heptan (200 ml) und 2 % 1 M H₂SO₄ (20 ml), also z. B. insgesamt 1 020 ml hergestellt. Dem Plasma wurden 100 µl PBS hinzugefügt, das Gemisch in ein Reagenzglas umpipettiert und das Counterröhrchen noch einmal mit 100 µl PBS gespült. Anschließend wurde die Extraktionslösung (1 000 µl) zu den Proben gegeben und das Gemisch 30 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Danach wurden erst Heptan (400 µl) und dann Wasser (600 µl) hinzupipettiert und die Proben anschließend 10 Minuten stehen gelassen. Hierbei entstanden zwei Phasen. Von der oberen Phase, welche die gelösten Lipide enthielt, wurden 300 µl abgenommen und in Beta-Counterröhrchen transferiert sowie weitere 100 µl als Kontrolle im Gamma-Counter gemessen. Die Organe wurden von den Gamma-Counterröhrchen in verschließbare 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, gewichtsadaptierte Mengen PBS und eine Bleikugel hinzugegeben, um sie im Tissue-Lyser jeweils mindestens 2-mal 3 Minuten bei 20/s zu homogenisieren. Danach konnte die Organsuspension in Reagenzgläser überführt und Extraktionslösung (3 333 µl) hinzugegeben werden. Das Gemisch wurde ebenfalls 30 s bei höchster Stufe gevortext. Anschließend wurden wieder erst Heptan (1 333 µl), dann Wasser (2 000 µl) hinzugefügt, so dass sich die Phasen bildeten. Von der oberen Phase wurden 1 000 µl mit den gelösten Lipiden abgenommen, sowie 100 µl für die Kontrolle im Gamma-Counter.

3 ERGEBNISSE

3.1 KREUZUNG DER MÄUSE

Die aus Berkeley bezogenen Mäuse waren ausschließlich hemizygot bezüglich des Transgens. Diese Tiere wurden mit Wildtyp-Mäusen verpaart. So besaß etwa die Hälfte der Nachkommen das ApoA5-Transgen, die anderen waren Wildtyp-Tiere. Dies ist eine optimale Verteilung für vergleichende *in vivo*-Experimente. In einer anderen Verpaarung wurde eine ApoE-KO-Maus mit einer ApoA5-transgenen Maus gekreuzt, so dass man einen ApoE-heterozygoten Wurf erhielt, der dann ebenfalls zur Hälfte A5-transgen (57 %) und zur anderen A5-Wildtyp (43 %) war. Aus diesen Nachkommen wurden fünf neue Verpaarungen gestartet, um homozygote ApoE-KO-Mäuse zu erhalten, während das ApoA5-Transgen auf Grund der oben genannten Probleme stets hemizygot erhalten wurde. Auch hier entstanden den Mendelschen Regeln folgend zu etwa 50 % heterozygote Nachkommen, je einem Viertel homozygote ApoEKO- und Wildtyp-Tiere. Innerhalb dieser Gruppen spaltete sich wiederum das ApoA5-Transgen zu je etwa 50 % auf. Eine Übersicht über die Kreuzungsschritte gibt Abbildung 7.

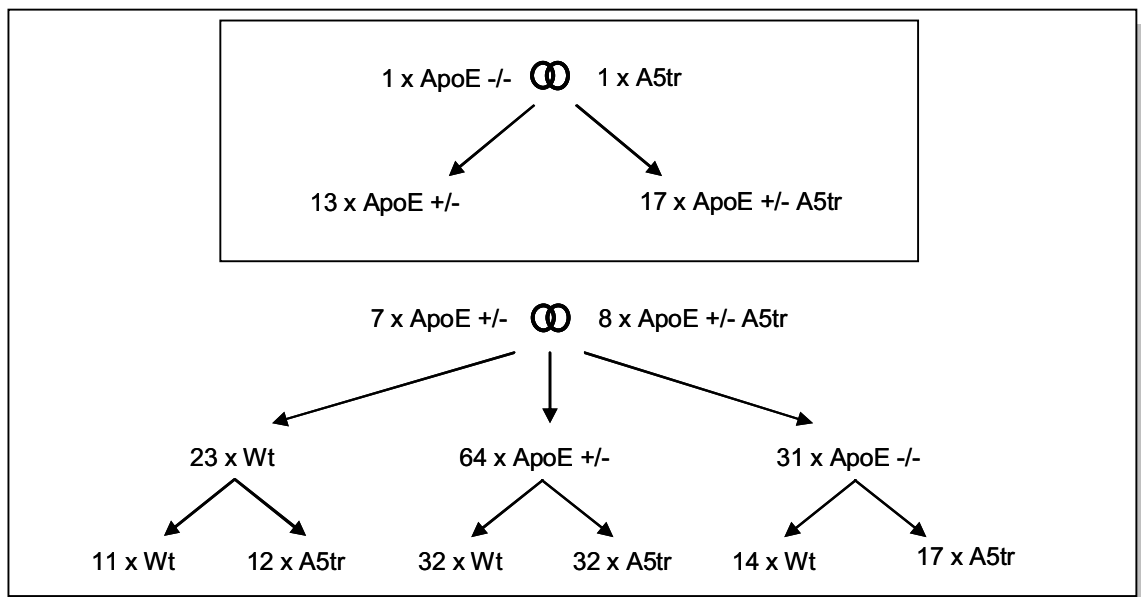


Abbildung 7: Ergebnis der Mausekreuzung.

Im ersten Schritt Schaffung ApoE-heterozygoter Nachfahren mit und ohne ApoA5 Transgen, im nächsten Schritt Ziel der ApoE-KO-Homozygotie durch Verpaarung der heterozygoten Tiere bei gleichzeitiger ApoA5-Transgen-Hemizygotie. So entstanden überwiegend heterozygote Nachkommen, aber auch schon ApoE-KO-Mäuse sowie Wildtyp-Mäuse mit und ohne A5-Transgen. ApoE-/- homozygoter ApoE-Knockout, ApoE +/- heterozygoter ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, Wt Wildtyp.

3.2 LIPOPROTEINPROFILE

Zur Charakterisierung der Linie, d. h. zur Darstellung des Einflusses von ApoA5 auf dem ApoE-KO-Hintergrund, wurden mit Hilfe von sequentiellen Ultrazentrifugationen sowie FPLC-Läufen Lipidprofile erstellt. Dazu wurde der Triglyzerid- bzw. Cholesteringehalt der einzelnen Fraktionen mit einem enzymatischen Farbttest photometrisch bestimmt. Nach den Zentrifugationen zeigten sich signifikante Unterschiede in den Lipidwerten, insbesondere der Triglyzeride (siehe Tabelle 5 und Abbildung 8).

Der Gehalt an VLDL-Triglyzeriden der transgenen Mäuse lag mindestens zwei Drittel unter dem der ApoE-KO-Wildtyp-Tiere. Etwas geringere, aber immer noch deutliche Unterschiede gab es in den LDL- und sogar HDL-Triglyzeriden der zu vergleichenden Mäuse (siehe Tabelle). Die VLDL- sowie die LDL-Cholesterin-Werte der Gruppen zeigten ebenfalls eine eindeutige Tendenz zu niedrigeren Konzentrationen bei den transgenen Mäusen, die Unterschiede scheinen hier jedoch altersabhängig geringer zu werden. Bei der HDL-Cholesterin-Konzentration konnte bei den ApoA5-transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen kein Unterschied detektiert werden. Allerdings fiel auf, dass die Männchen im Vergleich zu den Weibchen signifikant mehr HDL-Cholesterin besaßen bei ebenfalls signifikant höherem Körpergewicht.

Tabelle 5: Zusammenfassung Cholesterin- und Triglyzeridwerte.

Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw) der Cholesterin- und Triglyzeridwerte in den einzelnen Fraktionen nach sequentieller Ultrazentrifugation, T-Test zur Errechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen, Lipid-Daten in mg/dl. apoE^{-/-} ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, n.s. nicht signifikant.

Weibchen		apoE ^{-/-} A5tr (n=21)	apoE ^{-/-} (n=20)	
		Mittelwert ± Stabw	Mittelwert ± Stabw	T-Test
Cholesterin	Plasma	515 ± 106	685 ± 165	p < 0,001
	VLDL	193 ± 49	332 ± 104	p < 0,001
	LDL	201 ± 34	265 ± 63	p < 0,001
	HDL	30 ± 8	30 ± 7	n.s.
Triglyzeride	Plasma	170 ± 79	578 ± 215	p < 0,001
	VLDL	97 ± 50	421 ± 167	p < 0,001
	LDL	18 ± 5	37 ± 11	p < 0,001
	HDL	11 ± 5	15 ± 7	p < 0,05

Fortsetzung Tabelle 5: Zusammenfassung Cholesterin- und Triglyzeridwerte.

Mittelwerte und Standardabweichungen (Stabw) der Cholesterin- und Triglyzeridwerte in den einzelnen Fraktionen nach sequentieller Ultrazentrifugation, TTest zur Errechnung der Signifikanz zwischen den Gruppen, Lipid-Daten in mg/dl. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, n. s. nicht signifikant.

Männchen		apo-/- A5tr (n=17)	apoE-/- (n=21)	
		Mittelwert \pm Stabw	Mittelwert \pm Stabw	T-Test
Cholesterin	Plasma	468 \pm 72	630 \pm 150	p < 0,001
	VLDL	202 \pm 45	343 \pm 100	p < 0,001
	LDL	164 \pm 18	213 \pm 38	p < 0,001
	HDL	43 \pm 10	49 \pm 8	n.s.
Triglyzeride	Plasma	138 \pm 51	339 \pm 175	p < 0,001
	VLDL	81 \pm 30	244 \pm 138	p < 0,001
	LDL	17 \pm 3	27 \pm 8	p < 0,001
	HDL	9 \pm 3	12 \pm 5	p < 0,05

Aufgrund der geschlechtsspezifischen Unterschiede in Hormonhaushalt, Metabolismus, aber auch HDL-Cholesterin, wurde immer zwischen den Geschlechtern unterschieden. Insgesamt waren die Lipiddaten der Weibchen stets höher als die der Männchen, wengleich der ApoA5-Einfluss in beiden Gruppen deutlich ausgeprägt war.

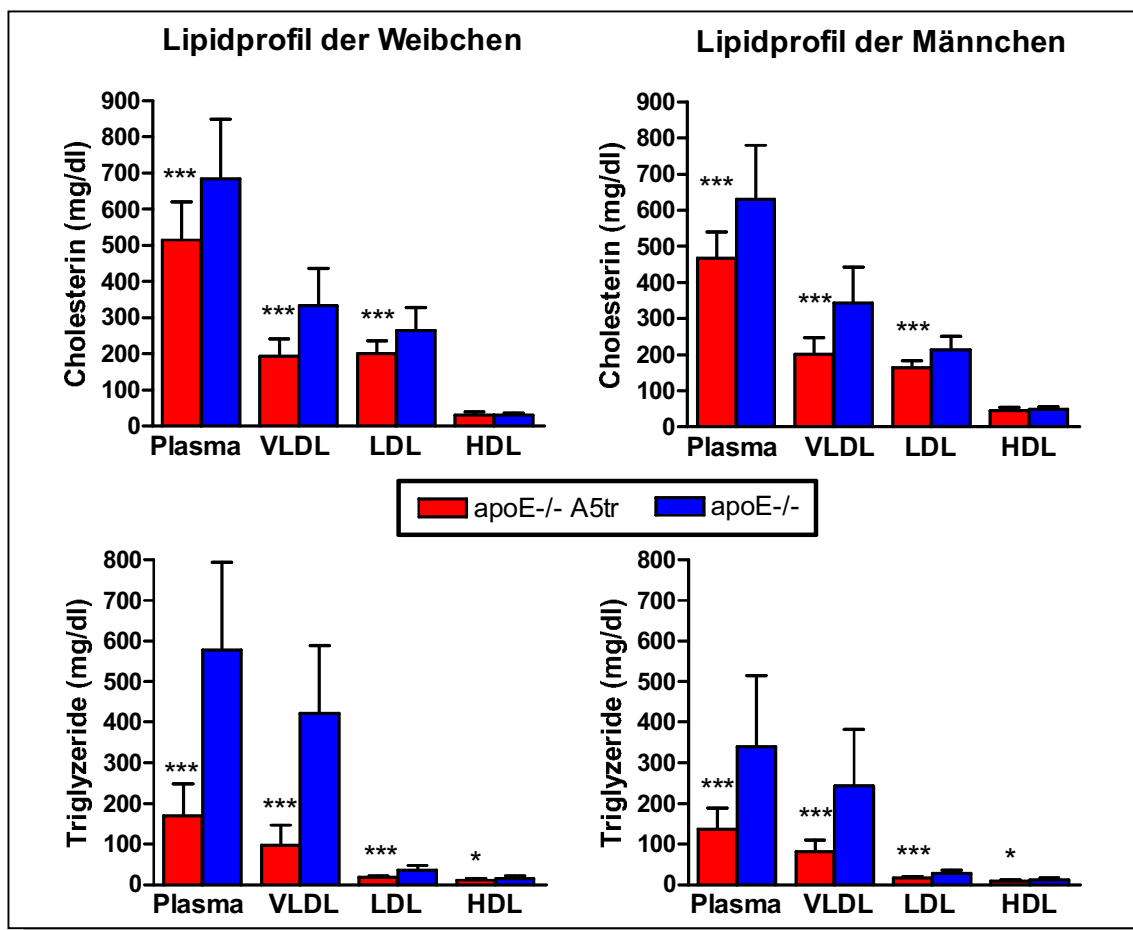


Abbildung 8: Lipiddaten der 22 Wochen alten Mäuse.

Bei beiden Geschlechtern fällt der deutlich lipidsenkende Effekt des ApoA5-Transgens auf. Die Triglyzerid-Werte sind in allen Fraktionen signifikant niedriger, während beim Cholesterin keine Beeinflussung der HDL-Fraktion zu finden ist. Insgesamt sind die Lipide der Weibchen höher.

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$, apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden FPLC-Läufe durchgeführt (Abbildungen 9 und 10). Zunächst wurden vier Gruppen etwa 16 Wochen alter Männchen gebildet (Transgen und Wildtyp auf dem ApoE-KO-Hintergrund gegenüber dem heterozygoten Knockout), die Plasmen zu gleichen Anteilen gemischt und schließlich mit Hilfe der Superose-6-Säule aufgetrennt.

Dabei fiel zunächst der deutliche Unterschied im VLDL-Cholesterin zwischen dem homozygoten und heterozygoten ApoE-KO-Hintergrund auf (etwa 35 bis 40 mg/dl gegenüber etwa 3 mg/dl), jedoch gab es kaum noch Unterschiede in Bezug auf das Transgen. Das Plasma dieser ApoE-KO-Gruppe zeigte ebenfalls 2,5-fach höhere Cholesterinwerte gegenüber der heterozygoten Gruppe (apoE-/- 625 ± 276 mg/dl; apoE+/- 265 ± 110 mg/dl), jedoch geringere ApoA5-abhängige Unterschiede.

Im Triglyzerid-Profil wurde der ApoA5-Effekt wieder deutlich, wenngleich wesentlich ausgeprägter bei dem homozygoten Knockout (apoE^{-/-}A5tr etwa 15 mg/dl, apoE^{-/-} etwa 40 mg/dl).

Im Plasma der heterozygoten Tiere zeigte sich eine Halbierung der gemessenen Triglyzerid-Werte (apoE^{+/-} A5tr 126 ± 16 mg/dl; apoE^{+/-} 209 ± 80 mg/dl), bei dem vollständigen ApoE-Knockout eine Verminderung um zwei Drittel (apoE^{-/-} A5tr 120 ± 27 mg/dl; apoE^{-/-} 313 ± 256 mg/dl).

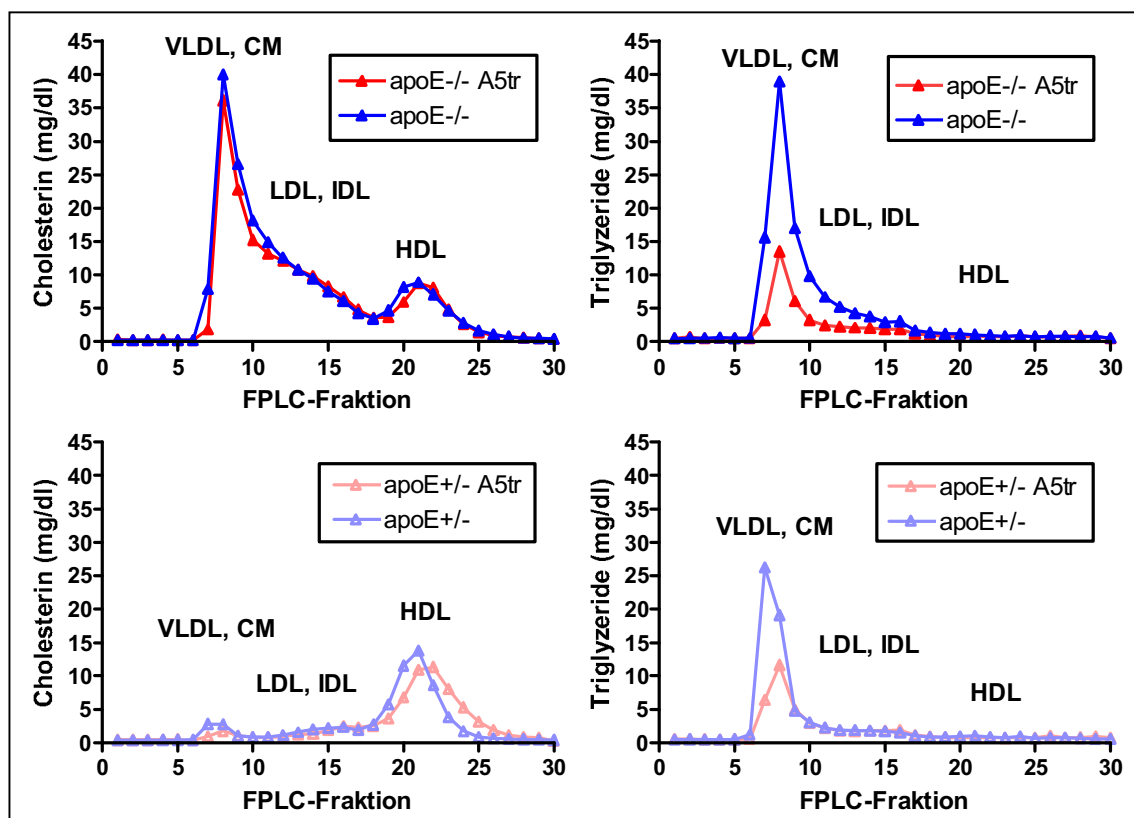


Abbildung 9:

Cholesterin- und Triglyzeridbestimmung nach FPLC von gepoolten Plasma-Proben.

In dem Lipidprofil der 16 Wochen alten Männchen ist unabhängig vom ApoE-Genotyp kein ApoA5-abhängiger Cholesterin-Unterschied erkennbar. Im Vergleich von homo- und heterozygotem E-Knockout fällt der fehlende bzw. deutlich verminderte VLDL-Cholesterin-Peak auf.

Bei den Triglyzerid-Messungen sind deutliche A5-abhängige Unterschiede auf beiden Hintergründen zu sehen, während der ApoE-Genotyp einen geringeren Einfluss hat.

apoE^{-/-} ApoE-Knockout, apoE^{+/-} heterozygoter ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

Zum Vergleich wurde dann nochmals Plasma von zehn Wochen alten Männchen in seine Fraktionen getrennt, dabei allerdings nur die zwei Gruppen, ApoE-KO mit und ohne Transgen betrachtet. Diese Profile konnten sämtliche vorher erhobenen Daten bestätigen.

Beim Cholesterin zeigte sich eine Halbierung der Werte im VLDL-Peak (etwa 16 mg/dl mit Transgen gegenüber etwa 30 mg/dl beim ApoA5-Wildtyp), in den anderen Fraktionen gab es kaum Änderungen durch ApoA5. Im Plasma ist diese Senkung ebenfalls nachzuweisen (apoE^{-/-} A5tr 329 ± 52 mg/dl; apoE^{-/-} 418 ± 16 mg/dl).

Hingegen zeigte sich bei den Triglyceriden eine deutliche ApoA5-abhängige Verringerung der Lipide im gesamten Profil (VLDL: etwa 5 mg/dl beim Transgen, etwa 22 mg/dl beim Wildtyp), was sich mit den Abfall der Plasmawerte auf etwa ein Drittel bestätigen lässt (apoE^{-/-} A5tr 99 ± 31 mg/dl; apoE^{-/-} 265 ± 140 mg/dl).

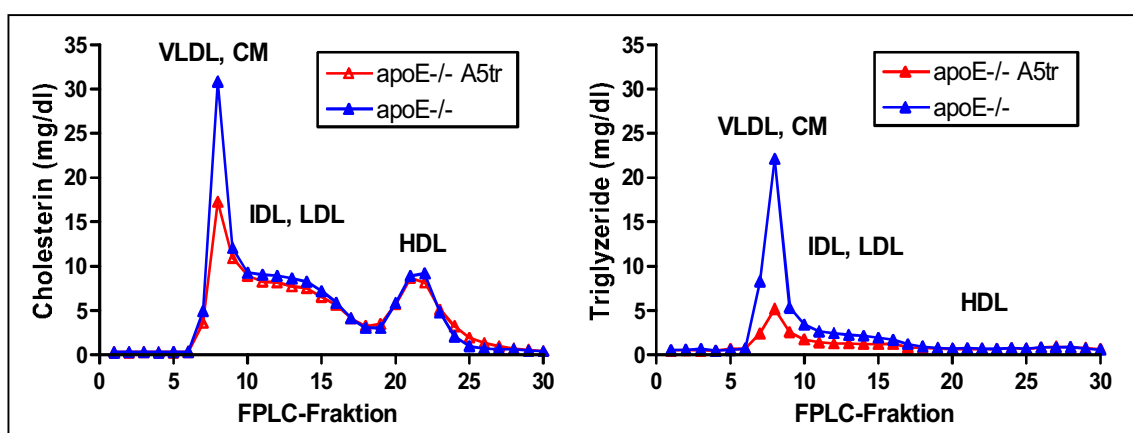


Abbildung 10:

Cholesterin- und Triglyceridbestimmung nach FPLC von gepoolten Plasma-Proben.

Bei den etwa 10 Wochen alten Männchen zeigen sowohl das Cholesterin als auch die Triglyceride ApoA5-abhängige Erniedrigungen, insbesondere im VLDL-Peak. apoE^{-/-} ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

In Abhängigkeit vom Alter erkennt man insgesamt höhere Lipidwerte bei den Tieren mit 16 Wochen im Vergleich zu denen mit 10 Wochen sowie eine Verringerung des ApoA5-abhängigen Cholesterin-Unterschiedes. Die Triglycerid-Senkung bei den ApoA5-transgenen Mäusen bleibt altersunabhängig in allen Fraktionen erhalten, insbesondere aber der VLDL.

3.3 ATHEROSKLEROSE

3.3.1 Atherosklerotische Läsionen

Für die Atherosklerose-Untersuchungen wurde das etablierte Modell der ApoE-defizienten Maus verwendet. Da der FVB-Zuchtstamm relativ atherosklerose-resistent ist, wurden die Mäuse erst im Alter von 22 Wochen sakrifiziert, anstatt sonst üblicher 16 Wochen bei ApoE-KO-Mäusen. Es wurde keine besondere Diät verwendet, um andere Einflussfaktoren, wie diät-induzierte Adipositas, zu vermeiden. Nach 4-stündigem Fasten wurde zunächst noch einmal Blut für die Ultrazentrifugation abgenommen, bevor die BCA und das Herz präpariert wurden. Aus den Daten der Quantifizierung nach Öl-Rot-Färbung aus Leipzig ist ein deutlicher ApoA5-abhängiger Unterschied in den Läsionen der Aortenwurzel zu erkennen (Daten siehe Tabelle 6, Abbildung 11, eine beispielhafte Darstellung in Abbildung 12). Bei den Weibchen findet sich eine mittlere Reduktion der quantifizierten Läsionen um 50 % und bei den Männchen um 42 %. Allerdings wird auch die für Atherosklerose typische große Varianz und geschlechtsunterschiedliche Verteilung deutlich. Bei den Männchen findet man insgesamt kleinere bzw. weniger Läsionen. Dies gilt auch für die BCA, wobei hier das Problem auftrat, dass in beiden Geschlechtern zu geringe Veränderungen zu finden waren, um sie quantitativ gut auszuwerten. Bei den Weibchen konnte zwar auch ein Trend der Atherosklerose-Reduktion durch ApoA5 gesehen werden, hingegen zeigten die wenigen quantifizierbaren Läsionen bei den Männchen einen entgegengesetzten Trend.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Atherosklerose-Daten.

Herzdaten repräsentieren die Aortenwurzel; in der BCA zeigten sich insgesamt zu geringe Läsionen, um verwertbare Aussage zu treffen. Bei den Weibchen fallen insgesamt größere Läsionsareale auf, bei beiden Geschlechtern wird die Atherosklerose-Progression durch das A5-Transgen verlangsamt. apoE^{-/-}-ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, n. s. nicht signifikant.

Weibchen		apoE ^{-/-} A5tr (n=21)	apoE ^{-/-} (n=20)	
		Mittelwert \pm Stabw	Mittelwert \pm Stabw	T-Test
Gewicht (g)		28,3 \pm 3,2	28,75 \pm 2,99	n.s.
Atherosklerose	Herz	8754 \pm 4789	17447 \pm 11460	p < 0,01
(μm^2)	BCA	215 \pm 470	2226 \pm 4645	n.s.

Männchen		apo ^{-/-} A5tr (n=17)	apoE ^{-/-} (n=21)	
		Mittelwert \pm Stabw	Mittelwert \pm Stabw	T-Test
Gewicht (g)		31,88 \pm 3,46	32,38 \pm 3,09	n.s.
Atherosklerose	Herz	5707 \pm 6427	9809 \pm 4677	p < 0,01
(μm^2)	BCA	225 \pm 552	95 \pm 352	n.s.

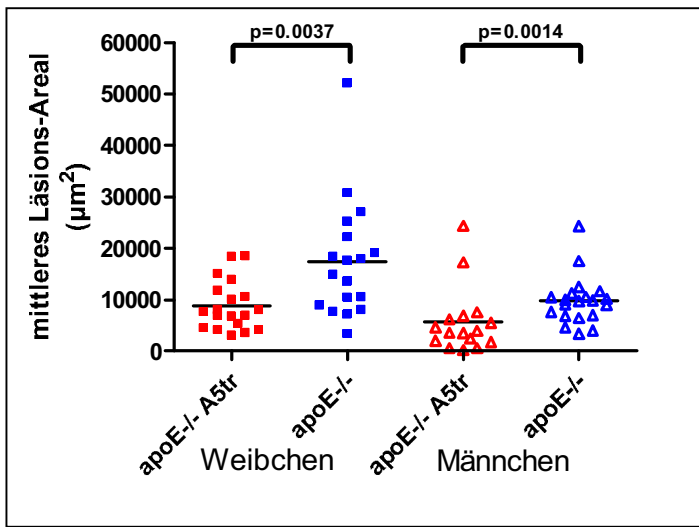


Abbildung 11: Atherosklerose in der Aortenwurzel.

Nach Genotyp und Geschlecht aufgetrennte Läsionsdaten in der Aortenwurzel. Die Mäuse wurden unter chow-diet im Alter von 22 Wochen sakrifiziert. Trotz recht großer Varianz ist das Läsions-Areal in beiden Geschlechtern A5-abhängig reduziert. apoE-/-ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

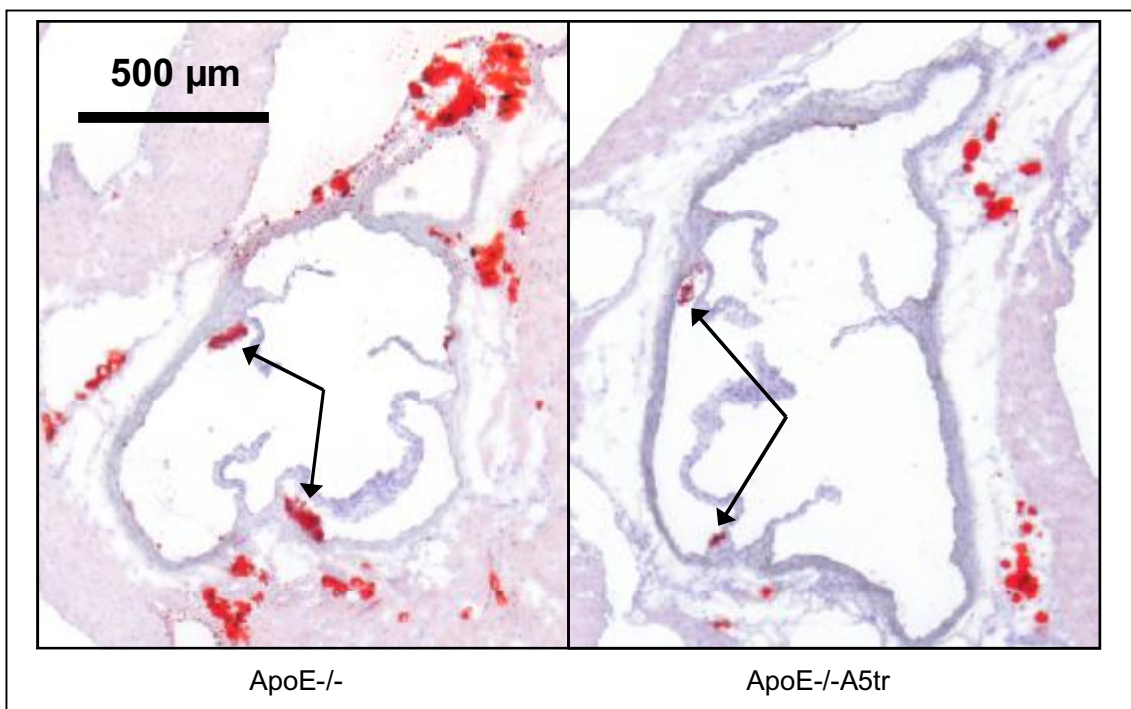


Abbildung 12: Atherosklerotische Plaques in der Aortenwurzel.

Beispielhafte Darstellung der gefärbten Plaques in einem Aortenschnitt. Im Vergleich der beiden Genotypen fällt ein deutlich größeres Läsions-Areal in der ApoE-KO-Maus ohne A5-Transgen auf. ApoE-/--homozygoter ApoE-KO, A5tr ApoA5-Transgen.

3.3.2 Korrelationen

Die erhobenen Lipid- und Atherosklerose-Daten wurden miteinander korreliert. Dazu wurden Graphen mit Regressionslinien zwischen der entsprechenden Lipidfraktion und den zugehörigen Läsionsdaten erstellt. So konnte die Verteilung der einzelnen Genotypen bzw. Geschlechter beurteilt werden. In Abbildung 13 sind sowohl geschlechtsspezifische als auch nach Genotyp sortierte Regressionsgeraden dargestellt, während sich der Korrelationsquotient jeweils auf die gesamte Genotyp-Gruppe bezieht.

Wie zu erwarten war, bestanden außer beim HDL-Cholesterin positive Korrelationen, die jedoch aufgrund zu geringer Anzahlen nicht signifikant wurden. Der stärkste Zusammenhang war bei den Triglyzeriden zu beobachten. Wenn man die Verteilung der Geschlechter betrachtet, fällt auf, dass die Weibchen schon bei niedrigeren Lipiden mehr Atherosklerose entwickeln. Die transgenen Mäuse mit geringerem Cholesterin u. v. a. Triglyzeriden siedeln sich im unteren Teil der Regressionslinie und somit bei kleineren Läsionen an. Für HDL-Cholesterin wurde aufgrund des geschlechtsspezifischen Unterschiedes strikt getrennt korreliert. So ergab sich bei den Weibchen ein leicht negativer, jedoch bei den Männchen ein positiver Zusammenhang. Alle anderen geschlechtsspezifischen Korrelationen zeigen den gleichen Trend wie die Gesamt-Korrelation. Dennoch sind bei den Weibchen insgesamt stärkere Zusammenhänge zwischen Lipiden und Läsions-Areal zu finden.

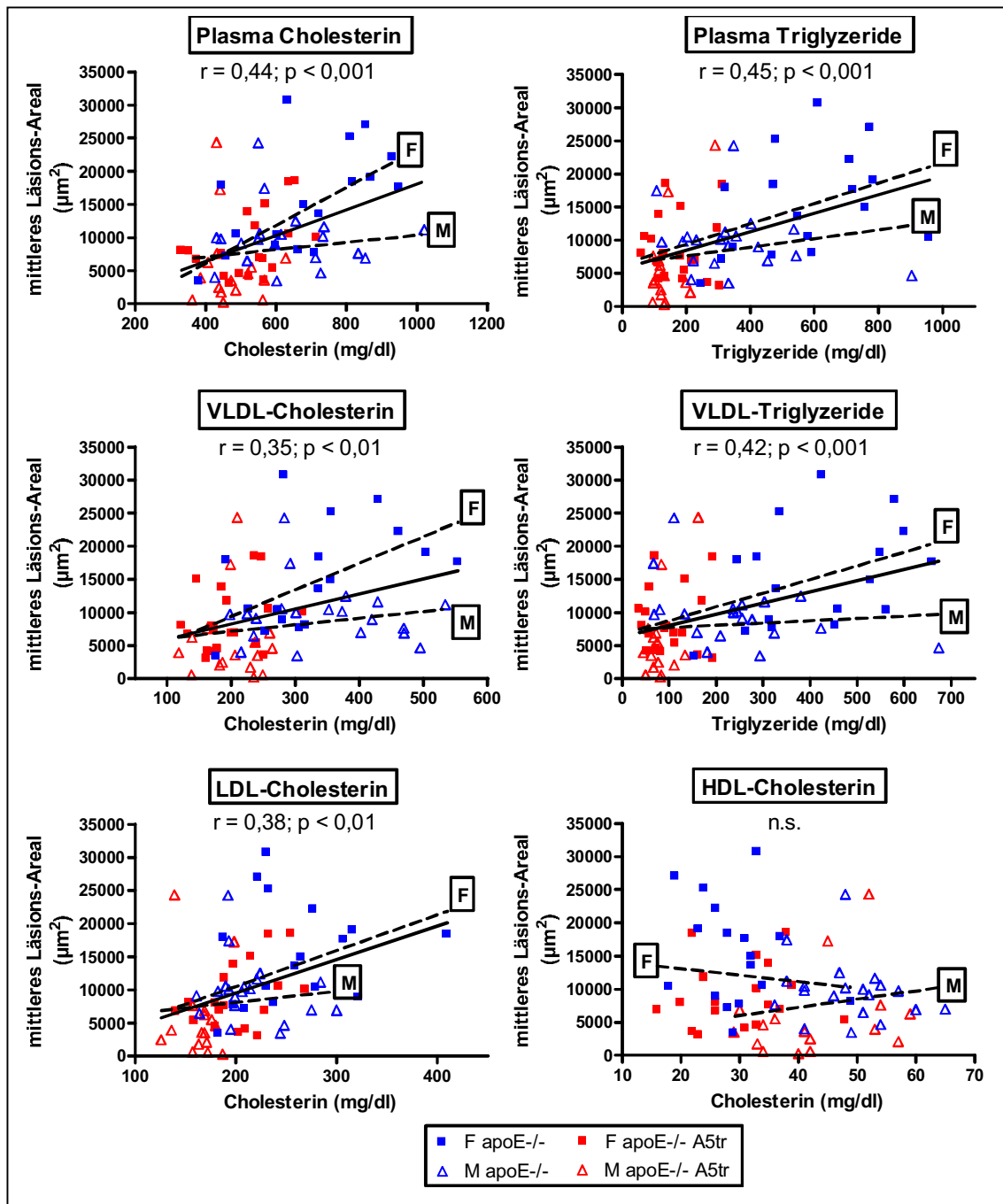


Abbildung 13: Korrelation zwischen Atherosklerose und Lipiden.

In der Verteilung der verschiedenen Genotypen und Geschlechter um die Regressionslinie des zugehörigen Lipid-Parameters fällt auf, dass die A5-transgenen Tiere mit niedrigeren Lipiden auch weniger Atherosklerose entwickeln. Die stärkste Korrelation findet sich hier bei den Triglyzeriden. Im HDL-Cholesterin erkennt man die geschlechtsunterschiedlichen Korrelationen, aber nicht signifikant. apoE-/-ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, F Female, M Male, n. s. nicht signifikant.

3.4 IN VIVO-STUDIEN

3.4.1 In vitro-Markierung von ApoE-defizienten VLDL mit [³H]-Cholesterylether

Zum Verständnis des starken Einflusses von Apolipoprotein A5 auf die Lipide wurden Abbaustudien mit radioaktiv-markierten triglyzeridreichen Lipoproteinen durchgeführt. Dazu wurden zunächst VLDL aus möglichst alten ApoE-KO-Mäusen gewonnen, diese mit einem nicht-abbaubaren Marker markiert und zum Zeitpunkt 0 in die Schwanzvene injiziert. Bei einem Turnover mit [³H]-Cholesterylether wurden Blutentnahmen an 2, 5, 10, 20, 40 und 60 Minuten durchgeführt, im Anschluss Leber, Milz, epidymidales Fett und der Oberschenkelmuskel entnommen. Das Plasma konnte nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit direkt gemessen werden, die Organe mussten zunächst über Nacht mit Hilfe von Solvable, einem kommerziellen Reagenz, verdaut werden.

Schon nach 2 Minuten wird der verlangsamte Abbau in den ApoE-KO-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit dem heterozygoten Hintergrund deutlich. Die ApoE-defizienten Tiere besitzen nach der ersten Blutentnahme noch deutlich mehr markierte VLDL im Plasma. Sowohl in der prozentualen als auch in der direkten Darstellung der Aktivität zeigen die heterozygoten Tiere während des gesamten Versuchs einen schnelleren Abbau. Betrachtet man den Einfluss des ApoA5-Transgens in den Gruppen, bestätigt sich in allen Darstellungen eine Beschleunigung des Abbaus. Diese kann aber nicht die ApoE-Defizienz ausgleichen. Auch tritt der Effekt des Transgens auf dem ApoE-KO-Hintergrund deutlich verzögert ein, mit einem Maximum nach 40 Minuten, während in der heterozygoten Gruppe nach 20 Minuten ein signifikanter Unterschied entsteht. Am Ende des Turnovers ist der Transgen-Effekt nicht mehr wirksam (Abbildung 14).

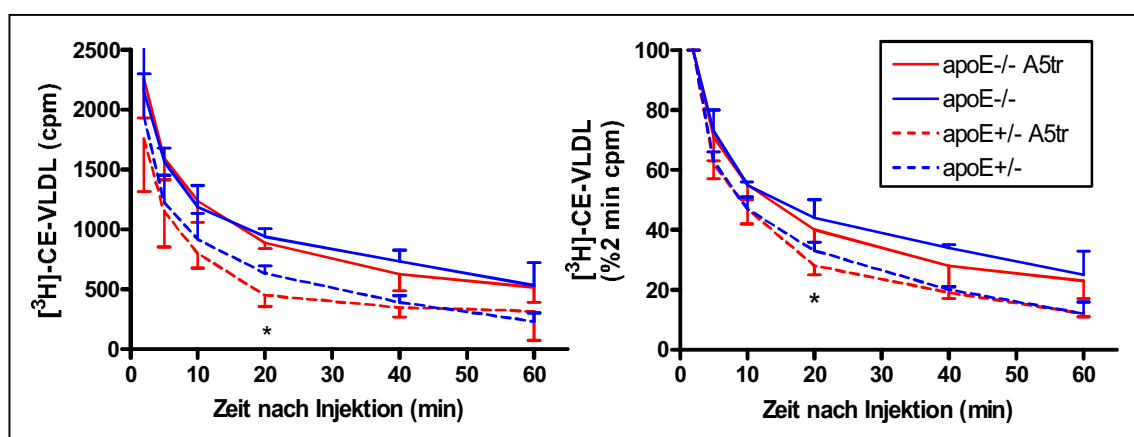


Abbildung 14: Plasma-Turnover von [³H]-CE-VLDL.

Sowohl auf dem homozygoten als auch auf dem heterozygoten ApoE-Knockout-Hintergrund fällt die Aktivität in den A5-transgenen Tieren schneller ab. Dabei finden sich die größten Unterschiede erst verspätet bei dem homozygoten E-KO. * p<0,05. apoE-/--ApoE-Knockout, apoE+/--heterozygoter ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

In den Organen der heterozygoten Gruppe sind keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen bis auf eine erhöhte Aufnahme im Fettgewebe der ApoA5-Wildtyp-Maus, die aber aufgrund hoher Standardabweichungen keine Signifikanz zeigt. Auf dem ApoE-KO-Hintergrund findet man eine signifikant erhöhte Leber-Aufnahme durch das ApoA5-Transgen, während in Milz, Fett und Muskel am ehesten eine Tendenz zur vermehrten Anreicherung besteht (Abbildung 15).

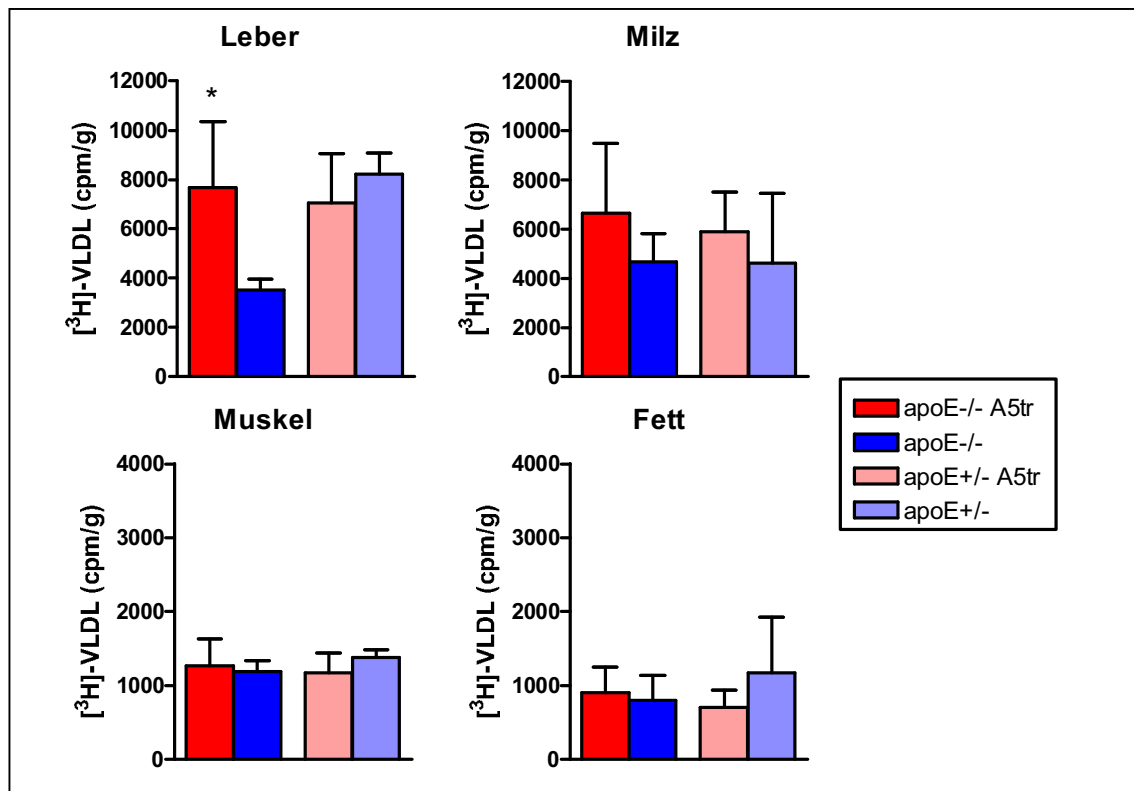


Abbildung 15: Organaufnahme von [3H]-VLDL.

In allen entnommenen Organen fällt in der ApoE-KO-Gruppe ein deutlicher ApoA5-abhängiger Effekt mit vermehrter Partikel-Aufnahme auf, der in der Leber signifikant wird. In der Kontrollgruppe ist aufgrund hoher Standardabweichungen kein Effekt auf die Aufnahme erkennbar. Beachte Skalen-Unterschiede. * $p < 0,05$. apoE-/-ApoE-Knockout, apoE+/-heterozygoter ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

3.4.2 Markierung von ApoE-defizienten VLDL mit [¹²⁵I]-Tyramincellobiose

Bei einem anderen Turnover wurden E-Knockout-VLDL mit [¹²⁵I]-Tyramincellobiose markiert (Abbildungen 16 und 17). Auch diese Markierung wird im Versuchszeitraum nicht metabolisiert und kann einmal aufgenommen die Zellen nicht mehr verlassen, dient also als Aufnahme-Parameter. Dabei wurden Blutentnahmen zu 2, 5, 10, 20 und 30 Minuten durchgeführt und Leber, Milz, Herz, epidymidales Fett und Oberschenkelmuskel entnommen. Bei der Nutzung dieses Gamma-Strahlers konnten Plasma und Organe direkt, ohne weitere Behandlungen vorzunehmen, gemessen werden.

Auch hier wird zunächst der Unterschied zwischen dem ApoE-KO- und dem Wildtyp-Hintergrund der Kontrollgruppe deutlich, die Wildtyp-tiere starten nach 2 Minuten bei etwa einem Drittel weniger Aktivität und bleiben auch bis zum Ende des Versuchs deutlich schneller in ihrem Metabolismus.

Will man sich den A5-Transgen-Effekt ansehen, fällt zunächst der scheinbar paradoxe Unterschied zwischen Prozent- und Aktivitätsdarstellung auf. Dies deutet darauf hin, dass der größte A5-bedingte Effekt in beiden Gruppen schon in den ersten 2 Minuten abgelaufen ist, obwohl in der ApoE-KO-Gruppe die transgenen Tiere zum Ende des Turnovers wieder schneller mit ihrer Aktivität abfallen. Auf dem Wildtyp-Hintergrund ist im Versuchszeitraum kaum noch ein Effekt durch das ApoA5-Transgen sichtbar. Die niedrigeren Start-Aktivitäten der transgenen Tiere beider Gruppen sind ein weiteres Indiz für die schnelle ApoA5-Wirkung.

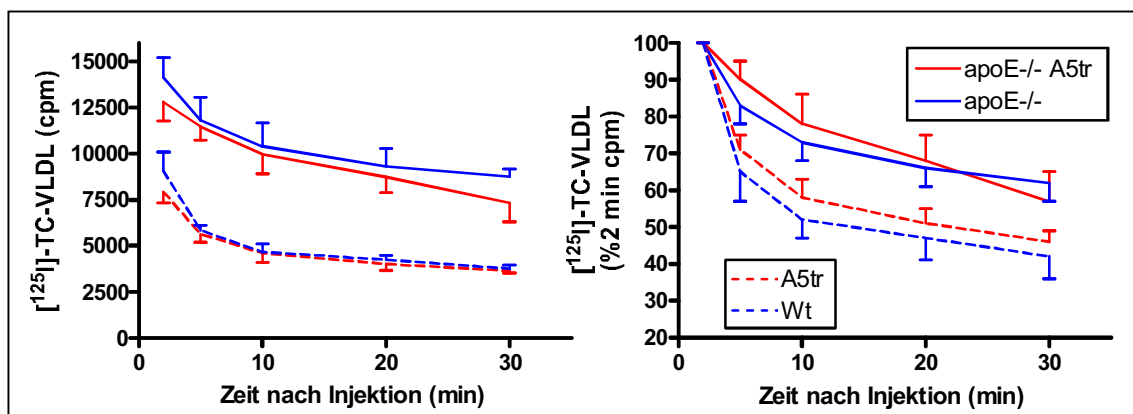


Abbildung 16: Plasma-Turnover von $[^{125}\text{I}]\text{-TC-VLDL}$.

In beiden Gruppen fällt auf, dass die A5-transgenen Tiere schon bei niedrigerer Aktivität starten und dieser Effekt über den zeitlichen Verlauf zumindest erhalten bleibt. Die ApoE-KO-Tiere starten im Vergleich zum Wildtyp-Hintergrund bei wesentlich höheren Aktivitäten aufgrund der verlangsamten Verstoffwechslung. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, Wt Wildtyp.

Die Organdaten sind in Abbildung 17 dargestellt. Auf dem Wildtyp-Hintergrund ist in Leber, Muskel und Fett kein A5-bedingter Unterschied erkennbar. In der Milz besteht die Tendenz zu mehr Aufnahme im Wildtyp, im Herzen findet sich mehr Aktivität pro Gramm Organgewicht bei den transgenen Mäusen, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich der Hintergründe sticht hier die 6-mal niedrigere Leberaufnahme in den ApoE-KO-Mäusen hervor, die bei den ApoA5-transgenen Tieren mit einer signifikant erhöhten Aufnahme gegenreguliert wird.

In Milz und Herz der ApoE-KO-Mäuse sind keine Unterschiede zu erkennen, während sich im Fett ein leichter Trend zur erhöhten Aufnahme bei den transgenen Tieren und im Muskel mehr Aktivität bei den Wildtyp-Tieren abzeichnen.

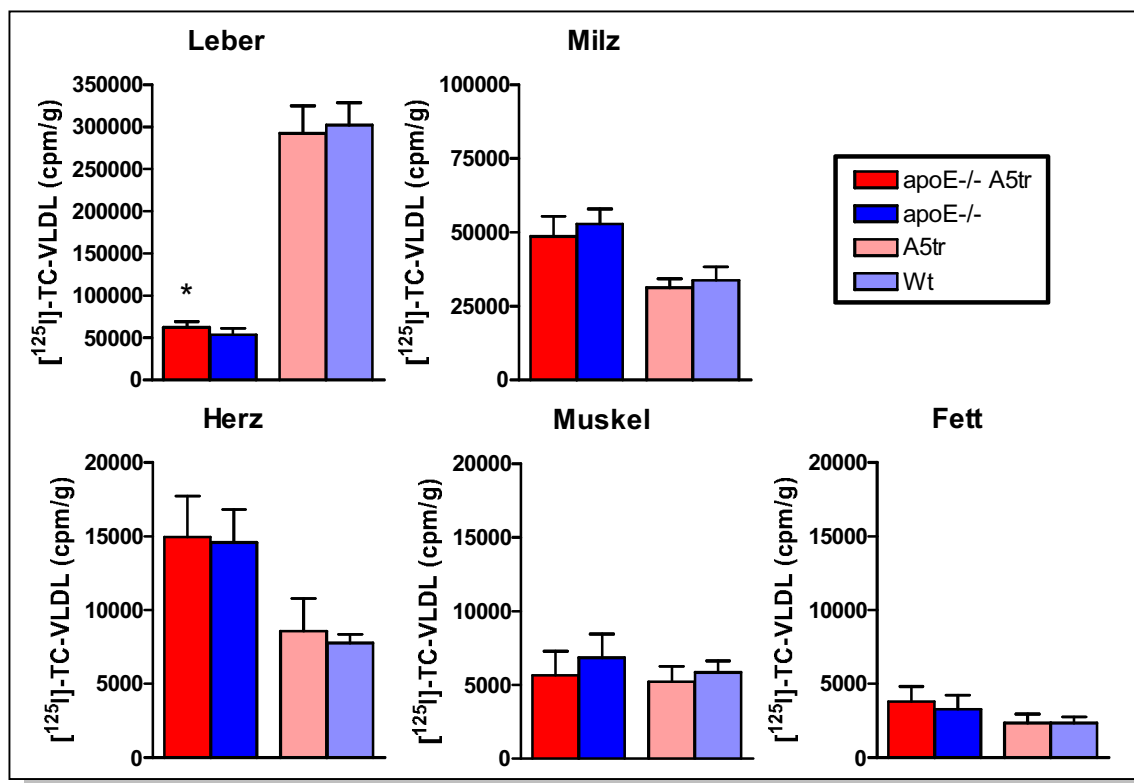


Abbildung 17: Organaufnahme von [125I]-TC-VLDL.

In der ApoEKO-Gruppe sieht man die deutlich verminderte Aufnahme in die Leber, während in den anderen Organen am ehesten leichte Tendenzen zur vermehrten Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp-Hintergrund erkennbar sind. Außerdem findet man in der Leber eine ApoA5-abhängige signifikant erhöhte Aufnahme, im Fett aufgrund hoher Standardabweichungen nur eine Tendenz. Beachte Skalen-Unterschiede. * $p < 0,05$. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, Wt Wildtyp.

3.4.3 Dreifachmarkierung der ApoE-defizienten VLDL mit ^{14}C , ^3H und ^{125}I

Zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus wurde die Partikel-Aufnahme mit dreifachmarkierten ApoE-Knockout-VLDL untersucht, um gleichzeitig Aufnahme und Hydrolyse messen zu können. Blutentnahmen wurden nach 2, 5, 10 und 20 Minuten durchgeführt, anschließend Leber, Milz, Muskel, Fett und Herz wie gewohnt entnommen (Abbildungen 18-21).

Aufgrund einer zu geringen Anzahl an Tieren mit dem Wildtyp-Hintergrund sowie zur besseren Übersichtlichkeit sind diese nicht dargestellt. Dennoch war hier wieder bei allen drei Markierungen der Unterschied zwischen den Hintergründen deutlich, wobei die ApoE-defizienten Tiere während des gesamten Versuchszeitraums höhere Plasmaaktivitäten zeigten.

Die VLDL werden von den ApoA5-transgenen Mäusen schneller abgebaut bzw. aufgenommen, was sich in einer geringeren Aktivität sämtlicher Markierungen im Vergleich zu den ApoE-defizienten Tieren ohne zusätzliches ApoA5-Transgen darstellt.

Bei der [^3H]-Markierung entstehen bereits nach 5 Minuten die größten Unterschiede, während der Effekt bei der Iod-Markierung und [^{14}C]-Markierung erst nach 10 Minuten am deutlichsten erscheint, aber zu keiner Zeit signifikant wird. Betrachtet man die prozentuale Darstellung fällt der größte Unterschied zwischen beiden Gruppen in der Hydrolyse auf. Auch hier nähern sich am Ende des Turnovers beide Gruppen wieder an, so dass man von einem früh und schnell ablaufenden Effekt durch das ApoA5-Transgen ausgehen muss.

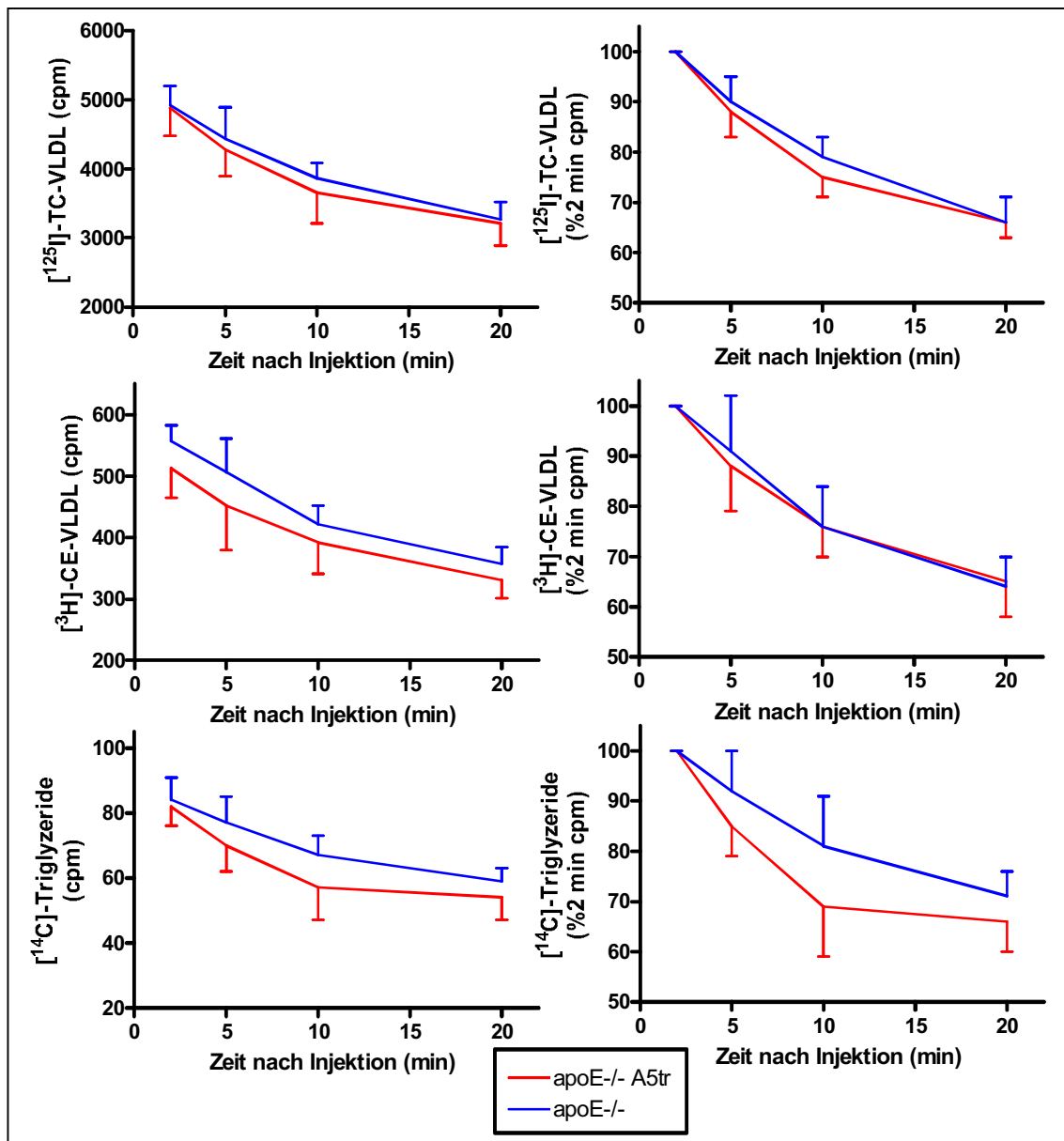


Abbildung 18: Plasma-Turnover nach Dreifachmarkierung.

Bei sämtlichen Markierungen beschleunigt das A5-Transgen den Metabolismus der ApoE-defizienten Maus. Jedoch zeigt sich der größte A5-abhängige Effekt in der Hydrolyse, insbesondere nach 10 Minuten. Beachte unterschiedliche Skalierung. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

Die Organdaten differieren sehr stark bzw. haben große Standardabweichungen (siehe Abbildungen 19, 20 und 21). Die ApoE-KO-Mäuse zeigten eine etwa 6fach geringere Leber-Aufnahme im Vergleich zu den Tieren auf dem Wildtyp-Hintergrund, während sich in den übrigen Organen eine geringfügig höhere Aufnahme darstellte.

In Bezug auf das A5-Transgen werden in Muskel und Fett Tendenzen zur vermehrten Aufnahme sichtbar, etwas geringer auch in Leber und Herz (Abbildungen 19 und 20). Jedoch konnten keine signifikanten Ergebnisse verzeichnet werden.

Da der Hydrolyse-Marker ^{14}C nicht in den Organen verbleibt bzw. weiter metabolisiert wird, sind diese Daten unter Vorbehalt zu betrachten. Insgesamt wird aber die Tendenz zur vermehrten Aufnahme in Leber, Herz, Fett und Muskel mithilfe des ApoA5-Transgens bestätigt.

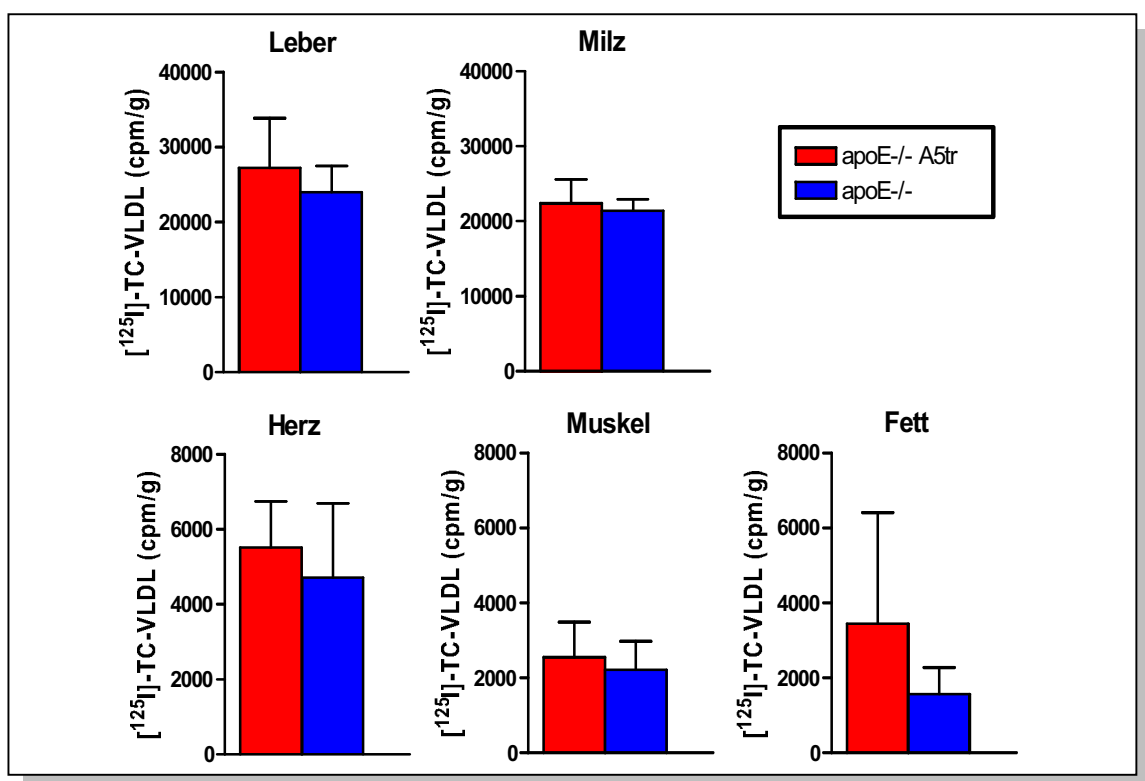


Abbildung 19: Organenaufnahme-Daten von ^{125}Iod .

In allen Organen zeigen sich Tendenzen zur A5-abhängigen vermehrten Aufnahme, ohne dass signifikante Ergebnisse zu verzeichnen sind. Auffällig ist ein fast eben so hoher Partikel-Anteil in Leber und Milz. Beachte Skalen-Unterschiede. apoE-/-ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

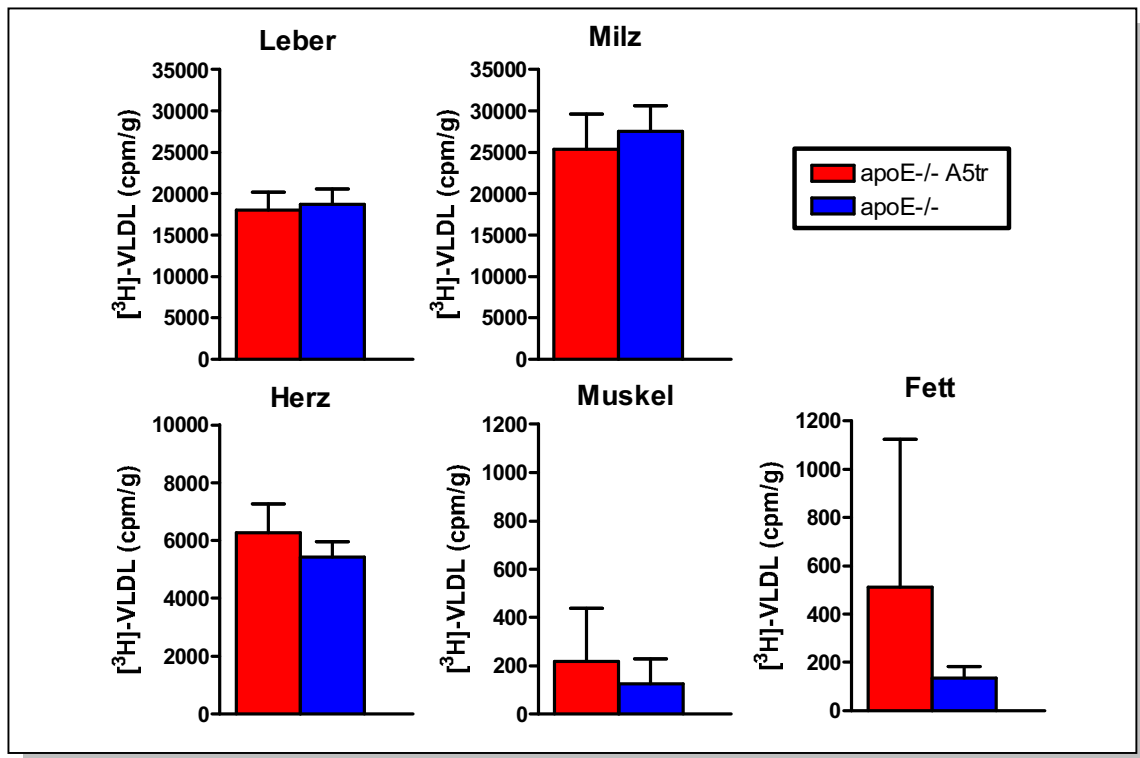


Abbildung 20: Organaufnahme-Daten von ^3H .

In Leber und Milz zeigt sich eine etwas geringere Aufnahme bei den transgenen Tieren bei höherem Partikel-Anteil in der Milz. Herz, Muskel und Fett bestätigen Tendenzen zur vermehrten Aufnahme bei den transgenen Mäusen. Beachte Skalen-Unterschiede. apoE-/- ApoE-KO, A5tr A5-Transgen.

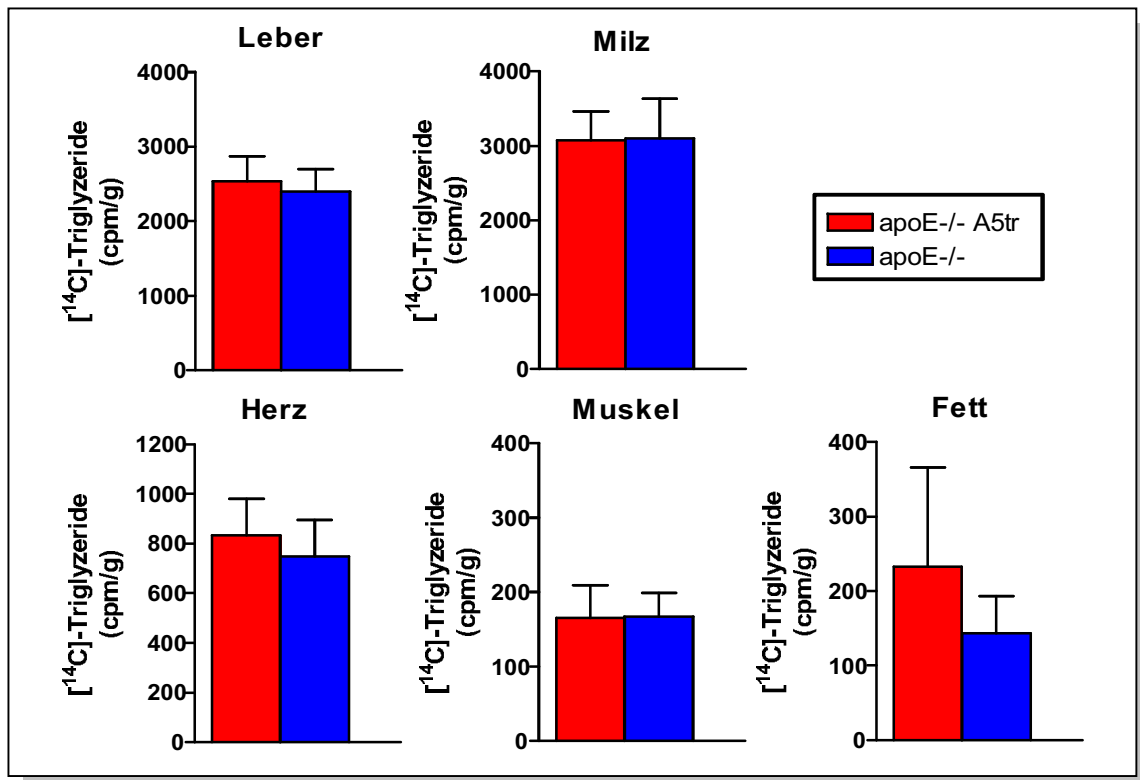


Abbildung 21: Organaufnahme-Daten von ¹⁴C.

Bei diesem Hydrolyse-Marker muss die Organaufnahme unter Vorbehalt betrachtet werden. Leber und Milz zeigen ähnliche Aktivitäten bei kaum sichtbarem Unterschied zwischen den Gruppen. In Herz und Fett erneut vermehrte Anreicherung bei den A5-transgenen Mäusen, im Muskel kein Unterschied feststellbar. Beachte Skalen-Unterschiede. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen.

3.4.4 Liposomen-Abbau mit [³H]- und [¹⁴C]-Doppel-Marker

Um die durch die Organentnahmen bestimmten Daten zu bestätigen, wurden künstlich hergestellte Lipid-Mizellen verwendet und für die Organaufnahme und Hydrolyse ebenfalls doppelt markiert. Hierbei wurden Blutentnahmen zu 2, 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten durchgeführt, Leber, Milz, Herz, epidymidales Fett und Muskel entnommen.

Leider wurde deutlich, dass diese Liposomen für Turnover-Versuche ungeeignet sind, da kaum noch Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen zu sehen waren und selbst der Unterschied zwischen Wildtyp- und ApoE-KO-Maus paradoxe Veränderungen zeigte (Abbildung 22). Zunächst wird deutlich, dass die Wildtyp-Mäuse bei etwa zwei Drittel der Aktivität der ApoE-KO-Mäuse starten und damit die sonst sehr offensichtliche Differenz fast verloren geht. Insgesamt ist hier die Aktivität auch sehr viel geringer im Vergleich zur injizierten Menge. Dennoch scheint der Turnover in den transgenen Tieren beschleunigt, insbesondere bei der Hydrolyse in den ersten 20 Minuten.

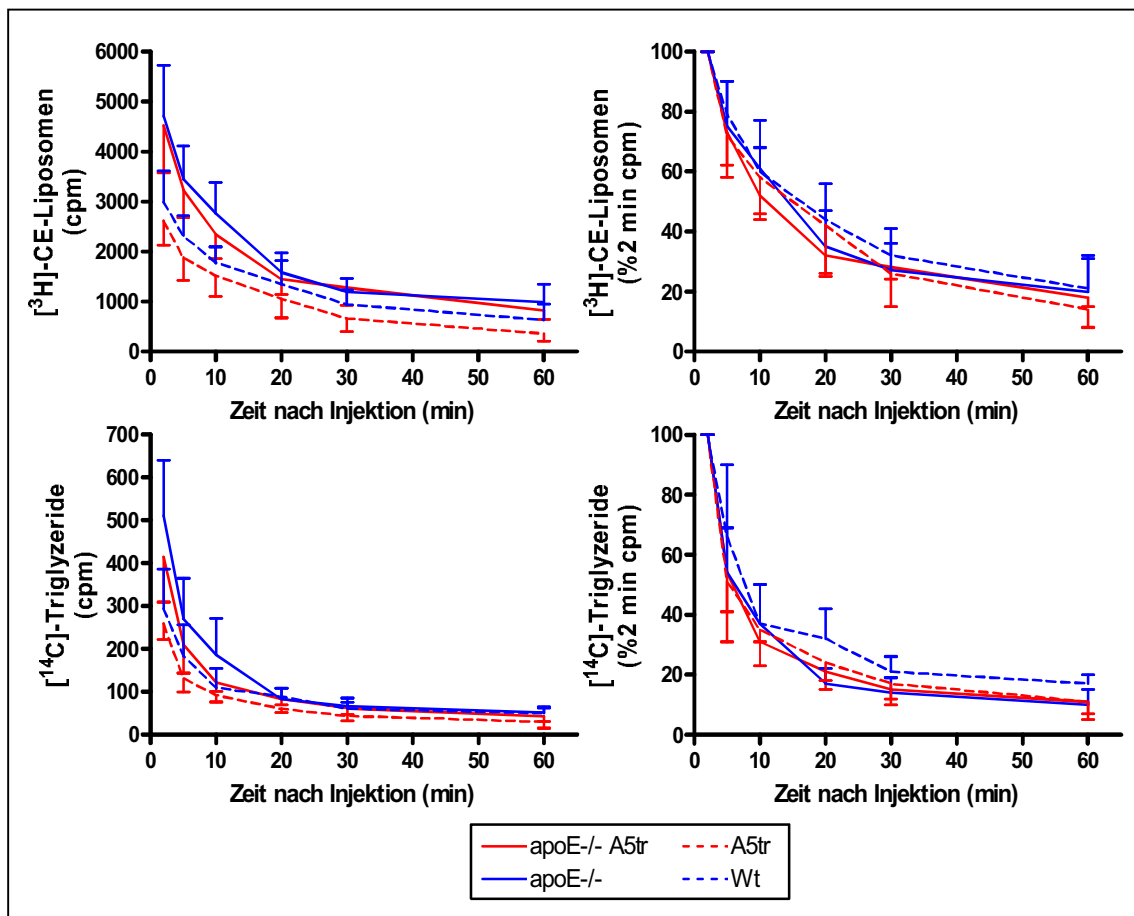


Abbildung 22: Plasma-Turnover von doppelt-markierten Mizellen.

Geringer Unterschied der Anfangs-Aktivität zwischen E-KO- und Wildtyp-Hintergrund, aber auch in beiden Gruppen A5-abhängige beschleunigte Aufnahme sowie Hydrolyse. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, Wt Wildtyp.

Bei den Organdaten (Abbildungen 23 und 24) fällt gleich die 5fach höhere Aktivität in der Milz im Vergleich zur Leber auf, die wiederum für die eher schlechte Qualität bzw. Nutzbarkeit der Partikel spricht. In Fett und Muskel zeigt sich in beiden Gruppen die Tendenz zur vermehrten Aufnahme, hingegen in Herz und Leber verminderte Aktivität bei den transgenen Tieren. Insgesamt muss dieser Turnover also eher skeptisch betrachtet werden.

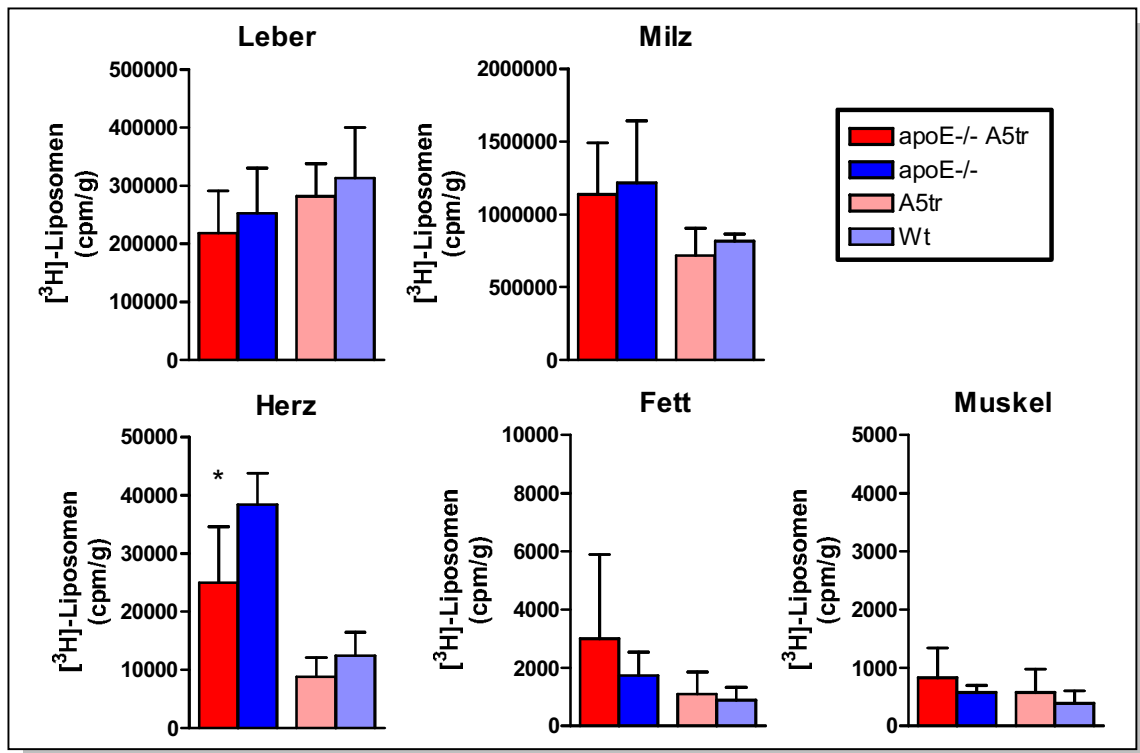


Abbildung 23: Organaufnahme der $[^3\text{H}]$ -markierten Mizellen.

Außer in der Leber fällt eine vermehrte Partikel-Aufnahme in die Organe der ApoE-KO-Mäuse auf. Jedoch ist die Aktivität in der Milz mehr als doppelt so groß im Vergleich zur Leber. Muskel und Fett zeigen die Tendenz zur vermehrten A5-abhängigen Aufnahme, Herz und Leber mit Tendenz zur verminderten Aufnahme sowohl in der ApoE-KO- als auch in der Wildtyp-Gruppe. * p < 0,05. Beachte Skalen-Unterschiede. apoE-/- ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, Wt Wildtyp.

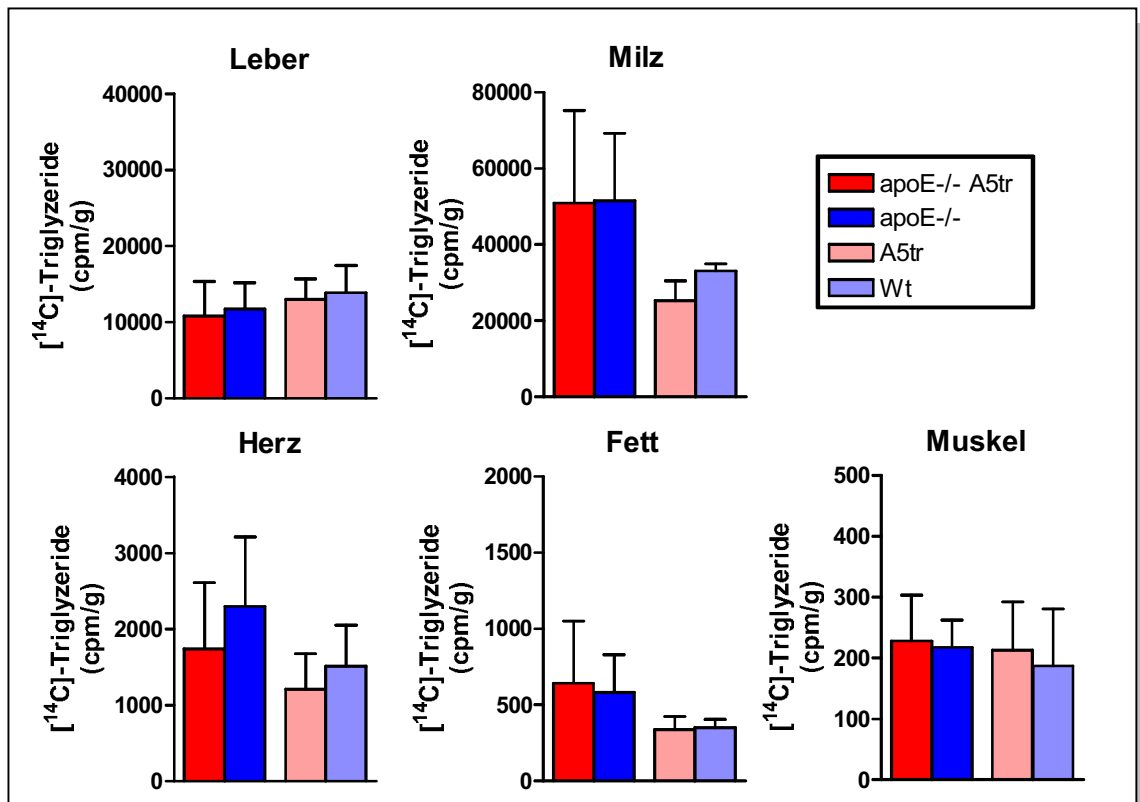


Abbildung 24: Organaufnahme der [¹⁴C]-markierten Triglyzeride.

Aufnahme des Hydrolyse-Markers ist 5fach stärker in die Milz im Vergleich zur Leber. Herz, Fett und Muskel zeigen geringe Aktivitäten. Insgesamt erkennt man eine Tendenz zur vermehrten Aufnahme in die ApoE-defizienten Mäuse. Kein eindeutiger A5-Transgen-Effekt beurteilbar. Beachte Skalen-Unterschiede. apoE^{-/-}-ApoE-Knockout, A5tr ApoA5-Transgen, Wt Wildtyp.

4 DISKUSSION

Mit dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob das triglyzeridsenkende Apolipoprotein A5 einen atheroprotektiven Effekt im Sinne der verlangsamten oder sogar fehlenden Plaque-Progression haben kann sowie mögliche ApoE-ApoA5-Interaktionen aufgedeckt werden. Dazu wurde als Modell die ApoE-KO-Maus verwendet. Um einen möglichst homogenen genetischen Hintergrund zu garantieren, musste allerdings der relativ atherosklerose-resistente FVB-Stamm der A5-transgenen Linie genutzt werden. Zur Charakterisierung dieser neuen FVB-EKO-A5tr-Linie wurden Lipidprofile mit Hilfe von Ultrazentrifugationen und FPLC-Läufen erstellt, metabolische Studien mit verschiedenen radioaktiven Markern durchgeführt sowie schließlich atherosklerotische Läsionen in zwei verschiedenen Gefäßarealen quantifiziert.

In den *in vivo*-Lipiddaten zeigen sich bei beiden Geschlechtern deutliche Triglyzeridsenkungen in allen Fraktionen durch ApoA5, aber auch Cholesterin-Verminderungen, insbesondere der atherogenen Partikel. Jedoch konnte kein Einfluss auf die HDL-Cholesterin-Werte nachgewiesen werden, nur der bekannte geschlechtsabhängige Unterschied wurde bestätigt [47]. In den Lipidprofilen von 10 und 22 Wochen alten Mäusen waren die Effekte ohne deutliche altersabhängige Abschwächung oder Verstärkung sichtbar, während sie in einer 16 Wochen alten Gruppe abgeschwächt erschienen. Am ehesten kann man also davon ausgehen, dass sich die Lipidunterschiede aufgrund von ApoA5 mit zunehmendem Alter wieder etwas angleichen.

In den ersten Mausmodellen 2001 konnte von Pennacchio gezeigt werden, dass ApoA5-transgene Mäuse zwei Drittel niedrigere Triglyzerid-Level und ApoA5KO-Mäuse 4fach erhöhte Plasma-Triglyzeride entwickeln [59]. Auch auf dem FVBE-Knockout-Hintergrund konnten wir eine mehr als 60%ige Erniedrigung der Triglyzerid-Werte nachweisen. Dieser Effekt scheint hier sogar noch stärker als auf dem Wildtyp-Hintergrund ausgeprägt zu sein. Bis zu 80%ige Triglyzerid- und Cholesterin-Senkungen in der VLDL-Fraktion deuten auf die Reduktion der für die ApoE-KO-Maus typischen atherogenen β -VLDL hin.

In anderen Studien mit einem adenoviralen ApoA5-exprimierenden Vektor wurden die Triglyzerid-Senkungen ebenfalls bestätigt. Jedoch fiel dabei zusätzlich eine Abnahme des Plasma-Cholesterins auf, die zum Großteil die HDL-Fraktion betraf [65]. Passend dazu fanden Grosskopf et al. eine 30%ige Zunahme des HDL-Cholesterins bei ApoA5-Knockout-Mäusen [77]. Bei der hyperlipidämischen ApoE-KO-Maus betrifft die Cholesterin-Senkung weniger die HDL- als die VLDL-Fraktion [117]. So konnten wir auch keine Beeinflussung der HDL-Spiegel durch das A5-Transgen feststellen.

Adenovirale Experimente bringen im Allgemeinen auch einige Probleme mit sich: Es kommt zu Lipidveränderungen allein aufgrund des Virus, die ApoA5-Konzentrationen werden übernormal angehoben, so dass sich darüber andere Auswirkungen erklären lassen.

Dennoch fanden sich bei uns mit hoher Signifikanz um 25 % erniedrigte Cholesterin-Werte bei den A5-transgenen Tieren, die ihren Großteil in der VLDL-Fraktion verloren. Dieser Effekt kann nicht allein über beschleunigte Hydrolyse erklärt werden, aber indirekt über schnellere Bereitstellung der Restpartikel für die Organaufnahme.

In zwei kürzlich erschienenen Studien wurden Interaktionen bei der hyperlipidämischen ApoE2-knockin-Maus untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine indirekte LPL-Stimulation über einen ApoC3-Knockout keine Lipidveränderungen bewirkte, während adenoviral appliziertes ApoA5 ähnlich starke Effekte wie überexprimierte LPL ausübte [118, 119].

Insgesamt wird also die Bedeutung des ApoA5 für Veränderungen im Lipidstatus trotz sehr niedriger Plasma-Konzentrationen deutlich.

Für die Untersuchung der Atherosklerose wurden zwei verschiedene Gefäßareale betrachtet, die Aortenwurzel und die BCA. In der Aortenwurzel konnten trotz relativ hoher Standardabweichungen ApoA5-abhängig reduzierte Läsions-Areale nachgewiesen werden. Im Mittel zeigten die Männchen um 40 % kleinere Läsionen im Vergleich zu den Weibchen. Bei den Weibchen fand sich eine signifikante Reduktion der Atherosklerose um 50 %, bei den Männchen um 42 %.

In der BCA wurden kaum Plaques bzw. sehr frühe Läsionen gefunden, die deutlich schwerer zu quantifizieren sind. So konnten teilweise gar keine Läsionen festgestellt werden, während in anderen Fällen schon einige beginnende Läsionen gesehen wurden. Dies erklärt sehr hohe Standardabweichungen in diesen Gruppen. Bei den Weibchen kann man einen leichten Trend der Atherosklerose-Reduktion durch ApoA5 erkennen, während sich bei den Männchen ein entgegengesetzter Trend andeutete. So muss man insgesamt sagen, dass die Daten aus der BCA-Quantifizierung unter Vorbehalt zu betrachten sind, da größere Gruppengrößen in höherem Alter notwendig wären, was jedoch in Anbetracht der deutlichen Ergebnisse bei den Aortenwurzeln nicht notwendig erschien.

Schon 1992, mit der Erschaffung der ApoE-KO-Maus, wurde von verschiedenen Gruppen die spontane Plaque-Formation in diesem Modell beschrieben [51, 53, 120]. Allerdings wurden hierfür stets Mäuse des C57BL6-Stammes genutzt. Erst später wurde klar, dass der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle für die Atherosklerose-Suszeptibilität spielt und dass gerade der FVB-Stamm sehr resistent in Bezug auf die Entstehung von Läsionen ist [47]. Dieser Effekt wurde auch bei uns deutlich mit sehr geringen Läsions-Arealen trotz ApoE-KO und dem höheren Alter von 22 Wochen, obwohl man sonst schon nach 16 Wochen ausgeprägte Läsionen sieht [121].

Zur Präparation stehen je nach Alter der Maus, Stamm sowie erwarteter Plaque-Größe verschiedene Techniken zur Verfügung. Eine gute Zusammenfassung dazu wurde von Meir und Leitersdorf kürzlich veröffentlicht [50]. Während sich im Aortensinus [115] frühe bis mittlere Stadien darstellen, werden für die enface-Technik [54, 122] ältere Mäuse benötigt.

Insgesamt neigt Atherosklerose zu großer Variabilität, die durch Nutzung von Diäten noch erhöht wird.

Eine neuere Methode ist die Präparation der BCA [114, 123], die besonders menschenähnliche Plaque-Konfigurationen zeigen soll und deren Läsionsgröße mit der des Aortensinus korreliert. Diese Assoziation konnte von uns weder bestätigt noch entkräftet werden, da die Läsionen in der BCA noch nicht ausgeprägt genug waren.

Reardon et al. stellten fest, dass an verschiedenen Gefäßstellen die Atherosklerose unterschiedlich stark ausgeprägt ist [124]. Diese Verteilung ist ebenfalls abhängig vom genetischen Hintergrund. Dazu führten Teupser et al. eine Studie an LDLR-defizienten Mäusen durch, in der sich die bis zu 78fach kleineren Läsionen in FVB-Mäusen im Vergleich zu C57BL6 darstellten und auch das unterschiedliche Verteilungsmuster deutlich wurde. Während bei den C57BL6 Plaques überwiegend im Aortenbogen auftreten, findet man bei FVB's eine Gleichverteilung über die gesamte Aorta [57]. Dies ist auch eine Erklärung für die sehr geringen Läsionen der mit normaler Kost gefütterten ApoE-KO-Mäuse.

Da bei dem FVB-Hintergrund insgesamt schon wenig Atherosklerose zu erwarten ist, müsste man sich ohne Diät besser die gesamte Aorta ansehen oder mit cholesterinreichem Futter nachhelfen. Außerdem stellt die Technik der BCA nur eine Alternative zur Präparation der Aortenwurzel dar, von der wir bereits signifikante Ergebnisse haben.

Zudem wurde über Korrelationen zwischen den Lipiden und den atherosklerotischen Läsionen die entscheidende Assoziation nachgewiesen. Sowohl bei den Triglyzeriden als auch beim Cholesterin waren erhöhte Werte mit größeren Läsionen verbunden. Der stärkste Zusammenhang fand sich bei den VLDL-Triglyzeriden, erst anschließend bei dem bekannten Risiko-Faktor des LDL-Cholesterins. Da die ApoA5-transgenen Tiere insgesamt niedrigere Lipidwerte hatten, zeigte sich für deren Gruppe auch signifikant weniger Atherosklerose. Damit wird deutlich, dass ApoA5 seinen atheroprotektiven Einfluss, zumindest zu einem Großteil, über Lipidveränderungen ausübt.

Kürzlich wurden Daten über den Einfluss des ApoA5-Transgens auf dem ApoE2-Knockin-Hintergrund veröffentlicht. In diesem hyperlipidämischen Mausmodell wurden mit Hilfe einer WTD atherosklerotische Plaques erzeugt. In den transgenen Mäusen entwickelten sich nur halb so große Läsionen, ein weiterer Beweis der Atheroprotektivität des ApoA5 [119]. Unsere Daten zeigen ebenfalls etwa eine Halbierung der Plaque-Größe in den transgenen Mäusen.

Beim Menschen lässt sich bisher keine allgemein gültige Aussage treffen, obwohl die Beweise für eine Assoziation zwischen genetischen Varianten des ApoA5 und dem Auftreten einer KHK zunehmen [125]. In vielen Untersuchungen wurde eine positive Korrelation, insbesondere für den SNP 3, gefunden [88, 98, 99, 105, 110, 111], jedoch wurden dabei selten genetische Varianten anderer Einflussfaktoren betrachtet. So konnte beispielsweise für den SNP 3 eine Assoziation mit Varianten des ApoC3 nicht sicher ausgeschlossen werden, das wiederum einen eigenen Effekt auf die atherosklerotischen Läsionen haben könnte.

Gegen eine sichere Korrelation sprechen auch mehrere Studien, die keinen Zusammenhang finden konnten [73, 89, 104]. Trotz der aktuell unsicheren Assoziation könnten A5-SNP's künftig in KHK-Risiko-Scores aufgenommen und die Therapie individualisiert werden, jedoch sind dafür noch mehr überzeugende Daten notwendig.

In verschiedenen Abbau- und Aufnahmestudien zeigte sich, dass ApoA5 das fehlende ApoE bei der Partikelaufnahme teilweise kompensieren kann, aber unabhängig davon die Hydrolyse stark beschleunigt.

Zunächst fiel durch den ApoE-KO-Hintergrund der deutlich verlangsamte TRL-Katabolismus auf. So zeigte sich bei den heterozygoten ApoE-KO-Mäusen, aber insbesondere bei den Wildtyp-Tieren, schon zu Beginn der Versuche nach 2 Minuten eine deutlich geringere Aktivität als bei den homozygoten ApoE-KO-Tieren. Dieser Effekt konnte jedoch teilweise durch verstärkte Hydrolyse mittels ApoA5 etwas angeglichen werden. Die Hydrolyse der A5-transgenen Tiere war deutlich beschleunigt mit scheinbar stärkerer Wirkung auf dem ApoE-KO-Hintergrund im Vergleich zum Wildtyp-Hintergrund. Bei den Aufnahme-Markierungen wurde ebenfalls ApoA5-bedingt eine schnellere Abnahme der Aktivität beobachtet. Nach dem ausgeprägten Lipolyse-Effekt zeigten sich dennoch Veränderungen in der Organaufnahme. Hierfür konnten allerdings hauptsächlich die Daten der Iod- und der Cholesterylether-Markierung verwendet werden, da die Triglyzeridmarkierung weiter metabolisiert wird und nicht in der Zelle verbleibt. Grundsätzlich war auch hier der Unterschied zwischen den Hintergründen mit 6fach höherer Aktivität in der Leber bei den Wildtypen offensichtlich. In zwei Versuchen konnte eine signifikant erhöhte Partikelaufnahme in die Leber der A5-transgenen Tiere auf dem ApoE-KO-Hintergrund festgestellt werden. Weiterhin zeigten sich in dieser Gruppe nur Tendenzen zur vermehrten Aufnahme in Muskel, Fett und Herz. Für genauere Aussagen waren die Standardabweichungen zu hoch bzw. die Gruppen zu klein.

Außerdem wurde durch einen anderen Versuchsansatz deutlich, dass künstlich hergestellte Lipid-Mizellen für *in vivo*-Experimente ungeeignet sind, da sie nicht den Unterschied zwischen ApoE-Knockout und Wildtyp widerspiegeln konnten. Dennoch war auch hier die Tendenz zum schnelleren Abbau bei den A5-transgenen Tieren zu erkennen. Bei der Auswertung der Organdaten wurde bei 5fach höhere Aktivität in der Milz im Vergleich zur Leber aber deutlich, dass die Partikel schnell dem Abbau ohne Aufnahme zugeführt wurden.

Andere Gruppen hingegen, die mit VLDL-like emulsion particles arbeiten, konnten bisher keine Gründe gegen die Nutzung finden [126-128]. So wurde auf diesem Weg auch ein schnellerer Metabolismus mittels ApoA5 mit erhöhter Partikelaufnahme in Leber, Fett und Herz festgestellt [75]. Allerdings zeigte sich dabei auch keine erhöhte Aktivität in der Milz, so dass sich keine sichere Aussage über die Relevanz dieser Partikel machen lässt.

Nachdem der starke ApoA5-Einfluss auf die Triglyzeride und zu einem kleineren Anteil auch auf die Cholesterin-Werte entdeckt war, vermuteten Van der Vliet et al. bereits einen Effekt auf den VLDL-Metabolismus über mögliche LPL-Aktivierung oder auch die Wirkung über veränderte ApoC3-Spiegel [65].

Verschiedene Ansätze konnten zumindest eine teilweise Unabhängigkeit der A5-Wirkung von ApoC3 nachweisen [67, 76, 81], so beeinflussen ApoA5 und ApoC3 als funktionelle Antagonisten unterschiedliche Stufen der TRL-Konversion.

Entscheidende Experimente zum Verständnis der Wirkungsweise von ApoA5 wurden in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe durchgeführt [78].

So wurden *in vivo* und *in vitro* unveränderte TRL-Produktionsraten bei beschleunigtem Katabolismus durch HSPG-gebundene LPL-vermittelte Hydrolyse nachgewiesen, ApoA5 als Stabilisator des endothelialen lipolytischen Systems manifestierend [75, 84]. In Bezug auf die LPL-Aktivität wurden meist keine Veränderungen detektiert [78, 83, 117], aber gerade bei verschiedenen A5-Mutationen konnten verringerte Aktivitäten nachgewiesen werden [129].

Indirekte Wirkungen wurden über die Stabilisierung des LPL-Dimers oder die Verbesserung der Substrat-Eigenschaften der TRL diskutiert. Aber auch die beschleunigte Restpartikel-Aufnahme, insbesondere in LPL-exprimierende Gewebe, muss als Mechanismus in Betracht gezogen werden [77, 83]. So konnte kürzlich die Interaktion von ApoA5 mit der LDLR-Familie nachgewiesen werden, die zu erhöhter Partikelaufnahme führt [87], sofern keine A5-Mutation vorliegt [129]. Aufgrund seiner hohen Lipidaffinität und geringer Elastizität wurde auch immer wieder eine Funktion im VLDL-Zusammenbau postuliert [60, 79, 80, 85], wengleich mehrfach unveränderte Produktionsraten bewiesen wurden. Zusammenfassend steht der beschleunigte TRL-Katabolismus mit verstärkter Hydrolyse, aber auch die Restpartikel-Aufnahme im Vordergrund. Aufgrund unveränderter LPL-Aktivität scheint ApoA5 seine Hauptwirkung indirekt über die HSPG's oder möglicherweise über veränderte TRL-Konformation auszuüben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Apolipoprotein A5 wurde im Jahr 2001 als ein bei der Leberregeneration hochreguliertes Protein und gleichzeitig durch vergleichende Sequenzanalysen zwischen Maus- und Menschen genom entdeckt. In verschiedenen Mausmodellen sowie in klinischen Studien wurde eine Assoziation von Apo5 mit Triglyzerid-Spiegeln nachgewiesen. ApoA5 scheint ein herausragender Regulator der Triglyzerid-Spiegel zu sein, indem es die plasmatische Hydrolyse durch LPL an den Proteoglykanen aktiviert. Mögliche Beeinflussung der hepatischen Aufnahme von Restpartikeln oder Interaktionen mit anderen Lipoproteinen sind unklar.

Um die Frage der Interaktion mit ApoE und den Einfluss auf Atherosklerose zu bearbeiten, wurden ApoE-defiziente-Mäuse, die zusätzlich zum murinen ApoA5 auch humanes ApoA5 exprimieren, verwendet.

Es wurden zunächst die Lipide mit Hilfe von Ultrazentrifugationen und FPLC's untersucht. Dabei wurde deutlich, dass die lipidsenkenden Eigenschaften von ApoA5 auf dem atherogenen Hintergrund der ApoE-KO-Maus noch ausgeprägter sind als auf einem Wildtyp-Hintergrund. Neben der Triglyzeridsenkung um mehr als 60 % in allen Fraktionen zeigten die A5-transgenen Mäuse auch verringerte Cholesterin-Werte, insbesondere der VLDL-Fraktion, während die HDL-Cholesterinwerte weitgehend unverändert blieben. Insgesamt zeigte sich also eine Verschiebung zu einem weniger atherogenen Profil.

Für die Untersuchung der atherosklerotischen Plaques wurden Mäuse im Alter von 22 Wochen sakrifiziert, die Arteria Brachiocephalica und das Herz herauspräpariert. Leider zeigten sich in unserem Modell zu geringe Läsionen in der BCA, so dass nur die Daten der Aortenwurzel verwendet werden konnten. Bei diesen zeigte sich aber eine deutliche signifikante Minderung des Plaque-Areals in beiden Geschlechtern, bei den Weibchen um 50 %, bei den Männchen um 42 %, auch wenn es sich erst um frühe Läsionen handelte.

In metabolischen Studien wurde die Wirkungsweise von ApoA5 weiter aufgeklärt. Auch bei ApoE-defizienten Tieren bestätigte sich die verstärkte Hydrolyse durch das A5-Transgen im Vergleich zum Wildtyp. In den Organuntersuchungen zeigte sich die Tendenz zur vermehrten Partikelaufnahme in LPL-exprimierende Gewebe, insbesondere der Leber.

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ApoA5 unabhängig von ApoE das Triglyzerid- und Cholesterinprofil erniedrigt und so antiatherogen wirkt. Eine potentielle Bedeutung in KHK-Risiko-Scores oder individualisierter Pharmakotherapie bei Menschen mit A5-Polymorphismen bleibt abzuwarten.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	ATP-binding cassette transporter
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
Apo	Apolipoprotein
BCA	Arteria brachiocephalica
CE	Cholesterylester
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
Chol	Cholesterin
CM	Chylomikronen
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonucleinacid
ECM	extrazelluläre Matrix
FFA	free fatty acids
FPLC	fast performance liquid chromatographie
gMZ	glatte Muskelzellen
HDL	High density lipoprotein
HLP	Hyperlipoproteinämie
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IDL	Intermediate density lipoprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LRP1	LDLR-related Protein-1
MTP	mikrosomales Transferprotein
PCR	Polymerase chain reaction
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
SNP	single nucleotide polymorphism (Punktmutation)
SR-BI	Scavenger Receptor-BI
Tg	Triglyzeride
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRL	triglyzeridreiche Lipoproteine
A5Tr	ApoA5-Transgen
UZ	Ultrazentrifugation
VLDL	Very low density lipoprotein
Wt	Wildtyp-Maus
WTD	Western-type-diet

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mahley, R.W., et al., *Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function*. J Lipid Res, 1984. **25**(12): p. 1277-94.
2. Alaupovic, P., D.M. Lee, and W.J. McConathy, *Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 1972. **260**(4): p. 689-707.
3. Zannis, V.I., et al., *Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 181-207.
4. Merkel, M., R.H. Eckel, and I.J. Goldberg, *Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation*. J Lipid Res, 2002. **43**(12): p. 1997-2006.
5. Beisiegel, U., W. Weber, and G. Bengtsson-Olivecrona, *Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8342-6.
6. Merkel, M., et al., *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, 2002. **277**(9): p. 7405-11.
7. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
8. Medh, J.D., et al., *Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro*. J Biol Chem, 1996. **271**(29): p. 17073-80.
9. Herz, J., et al., *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. Embo J, 1988. **7**(13): p. 4119-27.
10. Beisiegel, U., et al., *The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 162-4.
11. Rader, D.J. and A. Daugherty, *Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 904-13.
12. Altmann, S.W., et al., *Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption*. Science, 2004. **303**(5661): p. 1201-4.
13. Karpe, F., et al., *Removal of triacylglycerols from chylomicrons and VLDL by capillary beds: the basis of lipoprotein remnant formation*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 3): p. 472-6.
14. Heeren, J., W. Weber, and U. Beisiegel, *Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 3): p. 349-59.
15. Heeren, J., et al., *Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo*. J Mol Med, 2002. **80**(9): p. 576-84.
16. Heeren, J., U. Beisiegel, and T. Grewal, *Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 442-8.
17. Trigatti, B.L., M. Krieger, and A. Rigotti, *Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1732-8.
18. Brundert, M., et al., *Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 143-8.
19. Fredrickson, D.S. and R.S. Lees, *A System for Phenotyping Hyperlipoproteinemia*. Circulation, 1965. **31**: p. 321-7.
20. de Graaf, J., M.J. Veerkamp, and A.F. Stalenhoef, *Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids*. J R Soc Med, 2002. **95** Suppl 42: p. 46-53.

21. Feussner, G., A. Wagner, and R. Ziegler, *Relation of cardiovascular risk factors to atherosclerosis in type III hyperlipoproteinemia*. Hum Genet, 1993. **92**(2): p. 122-6.
22. Havel, R.J., *Familial dysbetalipoproteinemia. New aspects of pathogenesis and diagnosis*. Med Clin North Am, 1982. **66**(2): p. 441-54.
23. Yuan, G., K.Z. Al-Shali, and R.A. Hegele, *Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment*. Cmaj, 2007. **176**(8): p. 1113-20.
24. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.
25. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
26. Zeiher, A.M., et al., *Assessment of endothelial modulation of coronary vasomotor tone: insights into a fundamental functional disturbance in vascular biology of atherosclerosis*. Basic Res Cardiol, 1994. **89 Suppl 1**: p. 115-28.
27. Hansson, G.K., *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(16): p. 1685-95.
28. Stary, H.C., *The development of calcium deposits in atherosclerotic lesions and their persistence after lipid regression*. Am J Cardiol, 2001. **88**(2A): p. 16E-19E.
29. Gustafsson, M., et al., *Retention of low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of the mouse: evidence for a role of lipoprotein lipase*. Circ Res, 2007. **101**(8): p. 777-83.
30. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
31. Krieger, M., et al., *Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis. Structure, binding properties, and functions of macrophage scavenger receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(7): p. 4569-72.
32. Sherer, Y. and Y. Shoenfeld, *Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(2): p. 99-106.
33. Gotto, A.M., Jr. and E.A. Brinton, *Assessing low levels of high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor in coronary heart disease: a working group report and update*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(5): p. 717-24.
34. Willer, C.J., et al., *Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease*. Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 161-9.
35. Jacobson, T.A., M. Miller, and E.J. Schaefer, *Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction*. Clin Ther, 2007. **29**(5): p. 763-77.
36. Assmann, G., H. Schulte, and U. Seedorf, *Cardiovascular risk assessment in the metabolic syndrome: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study*. Int J Obes (Lond), 2008. **32 Suppl 2**: p. S11-6.
37. Hokanson, J.E. and M.A. Austin, *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, 1996. **3**(2): p. 213-9.
38. Patel, A., et al., *Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region*. Circulation, 2004. **110**(17): p. 2678-86.
39. Sarwar, N., et al., *Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies*. Circulation, 2007. **115**(4): p. 450-8.
40. Cullen, P., *Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor*. Am J Cardiol, 2000. **86**(9): p. 943-9.
41. McNamara, J.R., et al., *Remnant-like particle (RLP) cholesterol is an independent cardiovascular disease risk factor in women: results from the Framingham Heart Study*. Atherosclerosis, 2001. **154**(1): p. 229-36.
42. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Boren, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-44.
43. Nordestgaard, B.G., et al., *Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women*. Jama, 2007. **298**(3): p. 299-308.

44. Bansal, S., et al., *Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women*. *Jama*, 2007. **298**(3): p. 309-16.
45. Stein, O., J. Thiery, and Y. Stein, *Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis?* *Atherosclerosis*, 2002. **160**(1): p. 1-10.
46. Howard, G., et al., *Cigarette smoking and other risk factors for silent cerebral infarction in the general population*. *Stroke*, 1998. **29**(5): p. 913-7.
47. Dansky, H.M., et al., *Genetic background determines the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 1960-8.
48. Teupser, D., et al., *Atherosclerosis quantitative trait loci are sex- and lineage-dependent in an intercross of C57BL/6 and FVB/N low-density lipoprotein receptor-/- mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(1): p. 123-8.
49. Wouters, K., et al., *Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice*. *Clin Chem Lab Med*, 2005. **43**(5): p. 470-9.
50. Meir, K.S. and E. Leitersdorf, *Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(6): p. 1006-14.
51. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(1): p. 133-40.
52. Eichner, J.E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review*. *Am J Epidemiol*, 2002. **155**(6): p. 487-95.
53. Piedrahita, J.A., et al., *Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4471-5.
54. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. *Cell*, 1992. **71**(2): p. 343-53.
55. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, *Mouse models of experimental atherosclerosis*. *J Physiol Pharmacol*, 2004. **55**(3): p. 503-17.
56. Ohashi, R., et al., *Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models*. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. **14**(5): p. 187-90.
57. Teupser, D., A.D. Persky, and J.L. Breslow, *Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement)*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(10): p. 1907-13.
58. van der Vliet, H.N., et al., *Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 44512-20.
59. Pennacchio, L.A., et al., *An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing*. *Science*, 2001. **294**(5540): p. 169-73.
60. Beckstead, J.A., et al., *Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis*. *Biochemistry*, 2003. **42**(31): p. 9416-23.
61. O'Brien, P.J., et al., *The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins*. *Clin Chem*, 2005. **51**(2): p. 351-9.
62. Lai, C.Q., et al., *Fenofibrate effect on triglyceride and postprandial response of apolipoprotein A5 variants: the GOLDN study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(6): p. 1417-25.
63. Vu-Dac, N., et al., *Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 17982-5.
64. Pennacchio, L.A. and E.M. Rubin, *Apolipoprotein A5, a newly identified gene that affects plasma triglyceride levels in humans and mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(4): p. 529-34.
65. van der Vliet, H.N., et al., *Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **295**(5): p. 1156-9.
66. Rensen, P.C., K.W. van Dijk, and L.M. Havekes, *Apolipoprotein AV: low concentration, high impact*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(12): p. 2445-7.

67. Schaap, F.G., et al., *Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia*. J Lipid Res, 2006. **47**(10): p. 2333-9.
68. Zhao, S.P., et al., *Association of human serum apolipoprotein A5 with lipid profiles affected by gender*. Clin Chim Acta, 2007. **376**(1-2): p. 68-71.
69. Dallinga-Thie, G.M., et al., *Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes*. Diabetologia, 2006. **49**(7): p. 1505-11.
70. Alborn, W.E., M.J. Prince, and R.J. Konrad, *Relationship of apolipoprotein A5 and apolipoprotein C3 levels to serum triglycerides in patients with type 2 diabetes*. Clin Chim Acta, 2007. **378**(1-2): p. 154-8.
71. Henneman, P., et al., *Plasma apoAV levels are markedly elevated in severe hypertriglyceridemia and positively correlated with the APOA5 S19W polymorphism*. Atherosclerosis, 2007. **193**(1): p. 129-34.
72. Talmud, P.J., et al., *The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Northwick Park Heart Study II*. Diabetologia, 2006. **49**(10): p. 2337-40.
73. Vaessen, S.F., et al., *Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study*. J Lipid Res, 2006. **47**(9): p. 2064-70.
74. Nelbach, L., et al., *Effect of apolipoprotein A-V on plasma triglyceride, lipoprotein size, and composition in genetically engineered mice*. J Lipid Res, 2008. **49**(3): p. 572-80.
75. Schaap, F.G., et al., *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, 2004. **279**(27): p. 27941-7.
76. Chan, D.C., et al., *Apolipoproteins C-III and A-V as predictors of very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B-100 kinetics*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 590-6.
77. Grosskopf, I., et al., *Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2573-9.
78. Merkel, M., et al., *Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21553-60.
79. Weinberg, R.B., et al., *Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 34438-44.
80. Shu, X., et al., *Apolipoprotein A-V association with intracellular lipid droplets*. J Lipid Res, 2007. **48**(7): p. 1445-50.
81. Baroukh, N., et al., *Analysis of apolipoprotein A5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(7): p. 1297-302.
82. van Dijk, K.W., et al., *The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism?* Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 239-46.
83. Lookene, A., et al., *Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism*. J Biol Chem, 2005. **280**(27): p. 25383-7.
84. Fruchart-Najib, J., et al., *Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(2): p. 397-404.
85. Olofsson, S.O., *ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1097-9.
86. Merkel, M. and J. Heeren, *Give me A5 for lipoprotein hydrolysis!* J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2694-6.
87. Nilsson, S.K., et al., *Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family*. Biochemistry, 2007. **46**(12): p. 3896-904.
88. Hubacek, J.A., *Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(9): p. 897-902.

89. Dallongeville, J., et al., *Impact of APOA5/A4/C3 genetic polymorphisms on lipid variables and cardiovascular disease risk in French men.* Int J Cardiol, 2006. **106**(2): p. 152-6.
90. Lai, C.Q., L.D. Parnell, and J.M. Ordovas, *The APOA1/C3/A4/A5 gene cluster, lipid metabolism and cardiovascular disease risk.* Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(2): p. 153-66.
91. Evans, D., A. Buchwald, and F.U. Beil, *The single nucleotide polymorphism - 1131T>C in the apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia.* J Mol Med, 2003. **81**(10): p. 645-54.
92. Kao, J.T., et al., *A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(19): p. 2533-9.
93. Lai, C.Q., et al., *The APOA5 locus is a strong determinant of plasma triglyceride concentrations across ethnic groups in Singapore.* J Lipid Res, 2003. **44**(12): p. 2365-73.
94. Ribalba, J., et al., *Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia.* Clin Chem, 2002. **48**(9): p. 1597-600.
95. van der Vleuten, G.M., et al., *Haplotype analyses of the APOA5 gene in patients with familial combined hyperlipidemia.* Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(1): p. 81-8.
96. Niculescu, L.S., et al., *Apolipoprotein A-V gene polymorphisms in subjects with metabolic syndrome.* Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(9): p. 1133-9.
97. Pennacchio, L.A., et al., *Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(24): p. 3031-8.
98. Szalai, C., et al., *Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease.* Atherosclerosis, 2004. **173**(1): p. 109-14.
99. Lai, C.Q., et al., *Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study.* J Lipid Res, 2004. **45**(11): p. 2096-105.
100. Grallert, H., et al., *APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians.* J Lipid Res, 2007. **48**(12): p. 2614-21.
101. Maasz, A., et al., *Apolipoprotein A5 T-1131C variant confers risk for metabolic syndrome.* Pathol Oncol Res, 2007. **13**(3): p. 243-7.
102. Yamada, Y., et al., *Genetic risk for metabolic syndrome: examination of candidate gene polymorphisms related to lipid metabolism in Japanese people.* J Med Genet, 2008. **45**(1): p. 22-8.
103. Corella, D., et al., *APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study.* J Mol Med, 2007. **85**(2): p. 119-28.
104. Talmud, P.J., et al., *APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study.* J Lipid Res, 2004. **45**(4): p. 750-6.
105. Tang, Y., et al., *A genetic variant c.553G > T in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and altered triglyceride levels in a Chinese population.* Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 433-7.
106. Talmud, P.J., et al., *Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms.* J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28215-20.
107. Ahituv, N., et al., *In vivo characterization of human APOA5 haplotypes.* Genomics, 2007. **90**(6): p. 674-9.
108. Lai, C.Q., et al., *Dietary intake of n-6 fatty acids modulates effect of apolipoprotein A5 gene on plasma fasting triglycerides, remnant lipoprotein concentrations, and lipoprotein particle size: the Framingham Heart Study.* Circulation, 2006. **113**(17): p. 2062-70.
109. Olivier, M., et al., *Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11.* Genomics, 2004. **83**(5): p. 912-23.
110. Elosua, R., et al., *Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study.* J Lipid Res, 2006. **47**(5): p. 990-6.

111. Hsu, L.A., et al., *Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan*. *Atherosclerosis*, 2006. **185**(1): p. 143-9.
112. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. *J Clin Invest*, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
113. Rudel, L.L., C.A. Marzetta, and F.L. Johnson, *Separation and analysis of lipoproteins by gel filtration*. *Methods Enzymol*, 1986. **129**: p. 45-57.
114. Rosenfeld, M.E., et al., *Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(12): p. 2587-92.
115. Paigen, B., et al., *Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice*. *Atherosclerosis*, 1987. **68**(3): p. 231-40.
116. Dole, V.P., *A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose*. *J Clin Invest*, 1956. **35**(2): p. 150-4.
117. Huang, W., et al., *Overexpression of apolipoprotein AV in the liver reduces plasma triglyceride and cholesterol but not HDL in ApoE deficient mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **346**(1): p. 14-8.
118. Gerritsen, G., et al., *ApoE2-associated hypertriglyceridemia is ameliorated by increased levels of apoA-V but unaffected by apoC-III deficiency*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(5): p. 1048-55.
119. Mansouri, R.M., et al., *Atheroprotective Effect of Human Apolipoprotein A5 in a Mouse Model of Mixed Dyslipidemia*. *Circ Res*, 2008.
120. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. *Science*, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
121. Teupser, D., et al., *Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(51): p. 17795-800.
122. Tangirala, R.K., E.M. Rubin, and W. Palinski, *Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(11): p. 2320-8.
123. Bentzon, J.F., et al., *Red wine does not reduce mature atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2001. **103**(12): p. 1681-7.
124. Reardon, C.A., et al., *Genetic background selectively influences innominate artery atherosclerosis: immune system deficiency as a probe*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(8): p. 1449-54.
125. Tai, E.S. and J.M. Ordovas, *Clinical significance of apolipoprotein A5*. *Curr Opin Lipidol*, 2008. **19**(4): p. 349-54.
126. Rensen, P.C., et al., *Particle size determines the specificity of apolipoprotein E-containing triglyceride-rich emulsions for the LDL receptor versus hepatic remnant receptor in vivo*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(6): p. 1070-84.
127. Rensen, P.C. and T.J. van Berkel, *Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(25): p. 14791-9.
128. Rensen, P.C., et al., *Selective liver targeting of antivirals by recombinant chylomicrons--a new therapeutic approach to hepatitis B*. *Nat Med*, 1995. **1**(3): p. 221-5.
129. Dorfmeister, B., et al., *Effects of Six APOA5 Variants, Identified in Patients With Severe Hypertriglyceridemia, on In Vitro Lipoprotein Lipase Activity and Receptor Binding*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008.

8 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn PD Dr. med. Martin Merkel für die Aufgabenstellung, die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit sowie die Ermöglichung der Teilnahme an Kongressen und Workshops.

Frau Professor Dr. rer. physiol. Dr. h.c. U. Beisiegel bin ich dankbar für die Möglichkeit, verschiedene Geräte im Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des UKE, nutzen zu dürfen.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. med. D. Teupser der Universitätsklinik Leipzig für die Bereitstellung des ApoE-defizienten Mausmodells, für das Erlernen der Atherosklerose-Präparation sowie auch seinen Mitarbeitern, insbesondere Frau Franziska Jeromin und Frau Claudia Weise, für die technische Auswertung.

Herrn PD Dr. rer. nat. J. Heeren danke ich für die Herstellung der radioaktiven Substrate, die tatkräftige Unterstützung bei den metabolischen Studien sowie die hervorragende Betreuung.

Für die zuverlässige technische und mentale Unterstützung im täglichen Laboralltag danke ich Frau Sandra Ehret.

Außerdem danke ich Frau Dorothee Lasrich, Herrn Oliver Bruns, Herrn Alexander Bartelt sowie sämtlichen Beschäftigten und Doktoranden des Instituts für die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen.

Für Ihre Unterstützung in allen Feldern meines Lebens und engagierte Hilfe beim Korrekturlesen danke ich meinen Eltern Dieter und Andrea Naumann, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Anika Naumann
Geburtsdatum und /-ort	06.11.1983 in Staßfurt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

09/1989 – 07/1993	Grundschule Staßfurt Nord
09/1993 – 07/2003	Dr.-Frank-Gymnasium, Staßfurt, Abitur (Note 1,0)

Studium

10/2003 – 04/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
02/2009 – 01/2010	Praktisches Jahr:
1. Tertial:	Chirurgie, Kreisspital für das Freiamt Muri, Schweiz
2. Tertial:	Pädiatrie, Kinderkrankenhaus Altona, Hamburg
3. Tertial:	Innere Medizin, Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg
04/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)

Wissenschaftliche Ausbildung

10/2006 – 12/2008	Experimenteller Teil der Dissertation im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
01/2007 – 12/2008	Studentische Hilfskraft in der Molekularen Zellbiologie
12/2007	Posterpräsentation auf dem Lipidmeeting Leipzig „Apo A5 reduces atherosclerosis in apoE-deficient mice“
04/2008	Posterpräsentation auf dem EAS - Kongress in Istanbul „Apo A5 reduces atherosclerosis in apoE-deficient mice“
08/2008	Teilnahme an der EAS - Summer School

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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: