

Aus der Medizinischen Klinik III des Zentrums für Innere Medizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. R. A. K. Stahl

**Untersuchung der Interaktionen zwischen  
Apolipoprotein CIII und Apolipoprotein AV  
in vivo und in vitro**

*Dissertation*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Lydia Ewerlin

*Hamburg, 2011*

Angenommen von der  
medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.02.2012

Veröffentlicht mit der Genehmigung der  
medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss

- Vorsitzende/r: PD Dr. M. Merkel
2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Heeren
3. Gutachter/in: Prof. Dr. F. U. Beil

Meinen Eltern und meiner Großmutter gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis und Mauslinien .....	VI
Arbeitshypothese und Fragestellung .....	VII
1 Einleitung .....	8
1.1 Klinische Bedeutung von Fettstoffwechselstörungen .....	8
1.2 Apolipoproteine im Lipoproteinstoffwechsel .....	8
1.3 Lokalisation des ApoAV- und des ApoCIII-Gens .....	14
1.4 Klinische Bedeutung der Apolipoproteine AV und CIII .....	14
1.5 Ziel der Arbeit .....	16
2 Material und Methoden .....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Geräte .....	17
2.1.2 Chemikalien .....	17
2.1.3 Enzyme und Proteine .....	19
2.1.4 Oligonukleotide .....	19
2.1.5 Verbrauchsmaterial .....	19
2.1.6 Narkosemittel .....	20
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Versuchstiere, allgemeine Maßnahmen .....	21
2.2.2 Mauslinien .....	21
2.2.3 Kreuzungsstrategien .....	22
2.2.4 Genotypisierung der Mäuse .....	23
2.2.5 Blutentnahme bei Mäusen .....	26
2.2.6 Lipoproteinprofile .....	27
2.2.7 Gavage - Produktionsstudie .....	29
2.2.8 Turnover - Abbaustudie .....	30
2.2.9 HSPG - Assay .....	32
3 Ergebnisse .....	35
3.1 Genotypisierung und Mauskolonie .....	35
3.2 Lipoproteinprofile .....	36
3.3 Gavage - Produktionsstudie .....	38
3.4 Turnover - Abbaustudie .....	40
3.4.1 Abbau im Plasma .....	40
3.4.2 Abbau durch Organaufnahme .....	41
3.5 HSPG - Assay .....	43
3.5.1 ApoAVko VLDL mit und ohne rApoAV (Test) .....	43
3.5.2 ApoCIIIko VLDL mit und ohne rApoAV .....	45
3.5.3 ApoAVko VLDL mit und ohne ApoCIII .....	46
3.5.4 ApoAVko VLDL mit und ohne ApoAV- bzw. ApoCIII -Substitution .....	47
4 Diskussion .....	48
5 Zusammenfassung .....	54
6 Literaturverzeichnis .....	55

7	Lebenslauf .....	59
8	Danksagung .....	61
9	Eidesstattliche Versicherung .....	62

## Abkürzungsverzeichnis und Mauslinien

ApoAV	Apolipoprotein A5
ApoCIII	Apolipoprotein C3
ApoAVko	ApoAV knockout Maus
ApoAVtg	ApoAV transgene Maus
ApoCIIIko	ApoCIII knockout Maus
ApoCIIIko/AVtg	ApoCIII knockout und ApoAV transgene Maus
Aqua dest.	Aqua destillatum
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Chol	Cholesterin
cpm	Counts per minute: Zählimpulse pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
HDL	High-density Lipoprotein
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglycan
IDL	Intermediate density lipoprotein
KBr	Kaliumbromid
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
LDL	Low-density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Receptor Related Protein
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline: phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revolutions per minute: Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA-Puffer
TG	Triglyzeride
VLDL	Very low-density Lipoprotein
Wt	Wildtypmaus

## **Arbeitshypothese und Fragestellung**

ApoAV reduziert die Plasmatriglyzeride (Plasma-TG) in Mäusen. ApoCIII erhöht den TG-Spiegel. Ein funktioneller Antagonismus bei der TG-Regulation ist anzunehmen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktionen dieser Lipoproteine zu untersuchen. Es wird postuliert, dass ApoCIII und ApoAV unabhängig voneinander die TG-Hydrolyse beeinflussen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Bedeutung von Fettstoffwechselstörungen

Störungen des Fettstoffwechsels zählen zu den Hauptursachen für die Entstehung einer Arteriosklerose, bei der es zur krankhaften Veränderung der Arterien mit Verhärtung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung kommt. Diese arteriosklerotischen Gefäßveränderungen können zu Folgekrankheiten wie koronarer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und cerebrovaskulären Gefäßleiden führen, welche wiederum die häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in der Bundesrepublik Deutschland darstellen (*Bruckenberg 2004; Statistisches Bundesamt 2005*).

Neben Fettstoffwechselstörungen stellen Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Hypertonie die wichtigsten beeinflussbaren Risikofaktoren für die Entstehung einer Arteriosklerose dar. Als wichtige unbeeinflussbare Faktoren gelten familiäre Disposition, Lebensalter und ein männliches Geschlecht (*Grundy et al. 1998; Smith et al. 2000; Assmann et al. 2002*).

Bei den Störungen des Lipidmetabolismus sind neben erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Cholesterinwerten die Hypertriglyzeridämien als wichtige eigenständige Risikofaktoren der Arteriosklerose und der kardiovaskulären Erkrankungen anzusehen. Eine Metaanalyse zeigt, dass ein Anstieg der Triglyzeride im Blut um 1mmol/l (85mg/dl) das kardiovaskuläre Risiko bei Männern um 31 Prozent und bei Frauen um 76 Prozent erhöht (*Hokanson and Austin 1996*). Zudem scheinen die aus TG stammenden freien Fettsäuren eine Schlüsselposition in der Entstehung und Progression des Metabolischen Syndroms (Kombination aus Fettsucht, Diabetes mellitus, erhöhtem Blutdruck und Blutfetterhöhung) einzunehmen.

Die Ursachen einer Hypertriglyzeridämie sind vielfältig. Neben diversen exogenen Faktoren wie Alkoholkonsum, Medikamenteneinnahme und falscher Ernährungsweise, können auch endogene Faktoren eine Erhöhung der Neutralfette im Blut verursachen. Auf molekularer Ebene sind hier vor allem Veränderungen bzw. Polymorphismen von Apolipoproteinen, Transfer- bzw. Carrierproteinen, Rezeptorstrukturen oder Enzymen zu nennen. Insbesondere sind die Einflüsse von genetischen Variationen im Apolipoprotein-AI/CIII/AIV/AV-Lokus auf den Plasmatriglyzeridspiegel vielfach beschrieben worden (*Groenendijk et al. 2001; Talmud et al. 2002; Hubacek 2005*).

## 1.2 Apolipoproteine im Lipoproteinstoffwechsel

Apolare Lipide wie TG können aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit nicht frei im Blut zirkulieren. Sie sind daher auf Emulgatoren angewiesen, welche eine Lösung in polaren

Medien vermitteln. Freie, unveresterte Fettsäuren können zusammen mit Albumin transportiert werden. Die meisten anderen Fette, insbesondere TG und Cholesterin (Chol) werden im Verbund mit amphipathischen Phospholipiden und spezifischen Proteinen, den Apolipoproteinen transportiert. Diese können mit ihren hydrophoben und hydrophilen Molekülabschnitten die Funktion von Lösungsvermittlern für die apolaren Lipide übernehmen. Die großmolekularen, micellären Lipid-Protein-Komplexe werden als Lipoproteine bezeichnet. In diesen Transportproteinen sind die hydrophilen Anteile der Phospholipid- und Proteinmoleküle nach außen, zur Wasserphase hin ausgerichtet und von einer Hydrathülle umgeben. Die apolaren Lipide, wie z.B. TG und Cholesterinester werden in den hydrophoben Kern der Partikel eingelagert und in dieser Form in der Wasserphase getragen.

Aufgrund unterschiedlicher Dichte und elektrophoretischer Beweglichkeit können die Lipoproteine in fünf Hauptklassen eingeteilt werden. Man unterscheidet Chylomikronen, Very-low-density-Lipoproteins (VLDL), Intermediate-density-Lipoproteins (IDL), Low-density-Lipoproteins (LDL) und High-density-Lipoproteins (HDL). Die Charakteristika der Lipoproteine sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Eigenschaften	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Durchmesser (nm)	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
Dichte (g/ml)	< 0,93	0,93 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
Triglyzeridanteil (%)	84 – 89	50 – 65	30	7 – 10	3 – 5
Cholesterinanteil (%)	3 – 8	15 – 25	30	42 – 50	15 – 16
Phospholipidanteil (%)	7 – 9	15 – 20	22	15 – 20	22
Apolipoproteine	AI; AIV; AV, B48; CII, CIII, E	AI, AV, B100, CII, CIII, E,	B100, CIII, E	B100	AI, AIII, AIV, AV, CIII, E
Hauptfunktion	exogener Lipidtransport	endogener Lipidtransport	endogener Lipidtransport	Cholesterintransport	Reverser Cholesterintransport

**Tab. 1: Hauptfunktionen, Zusammensetzung, physikalische Eigenschaften und Apolipoproteine der fünf Lipoprotein-Hauptklassen**

Die Proteinkomponenten der Lipoproteine werden Apolipoproteine genannt und in fünf Haupttypen (A-E) und zum Teil in verschiedene Subtypen (z.B. ApoAI - ApoAV) unterteilt. Die meisten Apolipoproteine sind aus sich wiederholenden Helices aufgebaut. Genetisch interessant ist die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz, was auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung dieser Proteinfamilie schließen lässt. Die amphipathische Struktur der sich wiederholenden Helices gewährleistet eine feste Verankerung in der Hülle der Lipoproteine. Dort können sie am besten mit Rezeptoren und Enzymen des Lipoprotein-stoffwechsels zusammenwirken.

Diese Apolipoproteine spielen im Fettstoffwechsel eine bedeutende Rolle. Sie dienen als Enzymaktivatoren und als Rezeptoren oder Rezeptorliganden des Lipoprotein-stoffwechsels. Entsprechend weitreichend können sich Veränderungen ihrer Basensequenz (z.B. durch Punktmutationen) auswirken. Die Bildung erfolgt vor allem in der Leber und in der Darmmukosa. Die Charakteristika der wichtigsten Apolipoproteine sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

<i>Apolipoprotein</i>	<i>Funktionen im Stoffwechsel</i>	<i>assoziierte Lipoproteine</i>
<i>ApoAI</i>	Strukturprotein im HDL, LCAT-Aktivierung	Chylomikronen, HDL
<i>ApoAIV</i>	Funktionen im Triglyzeridstoffwechsel, LCAT-Aktivierung	Chylomikronen, HDL
<i>ApoAV</i>	Senkung des Plasmatriglyzeridspiegels, Aktivierung der plasmatischen Hydrolyse	Chylomikronen, VLDL, HDL
<i>ApoB48</i>	Strukturkomponente der Chylomikronen, LRP-Ligand	Chylomikronen
<i>ApoB100</i>	Strukturkomponente im VLDL, IDL und LDL, LDL-Rezeptor-Ligand	VLDL, IDL, LDL
<i>ApoCII</i>	Aktivator der LPL (Lipoproteinlipase)	Chylomikronen, VLDL, IDL, HDL
<i>ApoCIII</i>	Inhibitor der LPL und der Remnant-Aufnahme	Chylomikronen, VLDL, IDL, HDL
<i>ApoE</i>	Ligand bei der Bindung verschiedener Lipoproteine an den LDL-Rezeptor und an LRP	Chylomikronen(-remnants), VLDL, IDL, HDL

**Tab. 2: Charakteristika der wichtigsten Apolipoproteine**

Man kann den Lipidstoffwechsel in eine exogene und eine endogene Komponente unterteilen (*Abb. 1*).

Der exogene Weg beginnt postprandial im Dünndarm mit der Assoziation von revereesterten Triglyzeriden, Cholesterinestern und sonstigen Lipiden aus der Nahrung mit ApoB48, ApoAI, ApoAII, ApoAIV, Phospholipiden und anderen Proteinen. Es entstehen Chylomikronen, die über den Ductus thoracicus mit der Lymphe in den linken Venenwinkel und damit in den Blutkreislauf gelangen.

Im Plasma werden aus HDL-Partikeln die ApoC-Proteine und ApoAV auf die Chylomikronen übertragen. Die durch ApoCII aktivierte LPL hydrolysiert vor allem in den Muskel- und Fettgewebkapillaren die Triglyzeride der Chylomikronen. Die hierbei freigesetzten Fettsäuren werden dem peripheren Gewebe zur Verfügung gestellt. Nach weiteren Interaktionen vor allem mit HDL bleibt schließlich ein Cholesterinester- und ApoE-reicher Chylomikronenrest (Chylomikronen-Remnant) übrig.

Nach ausreichender Triglyzerid-Hydrolyse löst sich die LPL vom Endothel und gelangt zusammen mit den Chylomikronen-Remnants zur Leber. Hier wird sie durch eine ApoB, ApoE und LPL-getriggerte hepatische Aufnahme schnell aus der Zirkulation entfernt (*Beisiegel et al. 1991*). ApoE sowie LPL vermitteln zunächst die Bindung von Chylomikronenresten an Proteoglykane und schließlich ihre Aufnahme über den LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor-related-protein (LRP). In den Hepatozyten werden die Chylomikronen Remnants lysosomal abgebaut. Das ApoE und die LPL können wieder verwendet werden (*Heeren et al. 2001*).

Das ebenfalls durch die Nahrung aufgenommene Cholesterin wird der Leber zugeführt, wo es entweder für die Gallensäurebiosynthese verwandt, in Biomembranen eingebaut oder aber als Lipoprotein-gebundenes Cholesterin wieder zurück in den Blutkreislauf sezerniert wird. Alternativ dazu kann das von der Leber aufgenommene Cholesterin auch frei über die Galle ausgeschieden werden.

Der endogene Stoffwechselweg lässt sich in das HDL-System und das ApoB100 System unterteilen, zu welchem die VLDL-, IDL- und LDL-Partikel gehören.

Die in den Hepatozyten gebildeten VLDL enthalten sowohl Phospholipide, Cholesterin und Triglyzeride als auch ApoB100, welche endogen synthetisiert werden oder aus aufgenommenen Chylomikronenresten stammen. Im Plasma werden noch die Apolipoproteine CI, CIII und E von HDL-Partikeln auf die VLDL übertragen. Ob ApoAV bereits in den Hepatozyten oder erst zu einem späteren Zeitpunkt auf die VLDL übertragen wird, ist derzeit noch nicht geklärt.

Ebenso wie die Chylomikronen verlieren die VLDL ihre Triglyzeride durch die plasmatische Hydrolyse der endothelständigen LPL. Nach dem Triglyzeridverlust entstehen kleinere und dichtere VLDL, so genannte VLDL-Remnants. ApoE- und LPL-vermittelt werden diese über LDL- und LRP-Rezeptoren in die Leber aufgenommen und metabolisiert.

Ein Teil der VLDL-Remnants wird durch weitere Interaktionen, u.a. mit der LPL und der hepatischen Lipase, über die Zwischenstufe IDL zu LDL konvertiert. Hierbei verlieren sie ihren ApoE-Anteil und nehmen Cholesterinester aus HDL-Partikeln auf.

LDL enthalten ApoB100 als einziges Apolipoprotein und sind weitgehend frei von Triglyzeriden. Die Aufgabe der LDL ist die Versorgung der Körperzellen mit Cholesterin. Hierzu werden die LDL-Partikel mit ApoB100 als Rezeptorligand und ubiquitär vorkommenden LDL-Rezeptoren durch Endozytose in die Zellen aufgenommen. Nach

lysosomaler Degradation des LDL-Partikels gelangt das freie Cholesterin ins Cytoplasma und kann dort weiter verwendet werden.

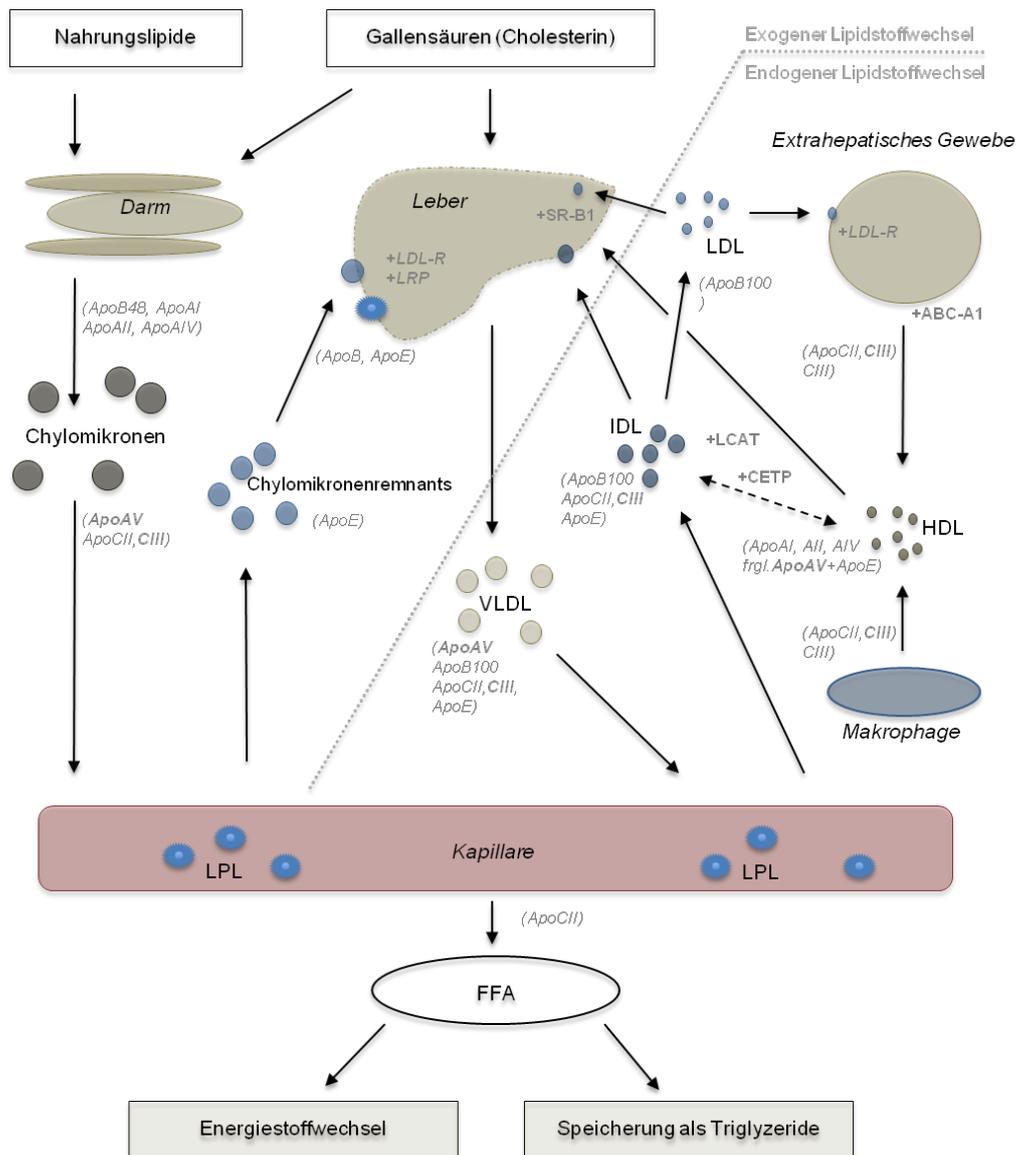
Die Cholesterinkonzentration im Cytoplasma reguliert u.a. die Expression der LDL-Rezeptoren und damit auch die Höhe des Cholesterin-Spiegels im Blut.

Die high-density Lipoproteine (HDL) nehmen eine Schlüsselposition bei dem reversen Cholesterintransport ein. Die HDL-Partikel werden durch Zusammenlagerung einzelner Phospholipid-Apolipoproteinkomplexe (ApoAI, -AII, -AIV, möglicherweise ApoAV und ApoE), sowie durch Interaktion mit dem Enzym LCAT (Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase) in der Leber und im Intestinum gebildet. ApoAI ist hier das essentielle, strukturbildende Apolipoprotein und scheint der wichtigste Co-Faktor der LCAT zu sein.

Der erste Schritt im reversen Cholesterintransport ist die Übertragung von Cholesterin aus peripheren Zellen - insbesondere Makrophagen - oder aus anderen Lipoproteinen zusammen mit ApoCII und -CIII auf HDL. Eine entscheidende Bedeutung für den Cholesterin-Efflux peripherer Zellen hat das membranständige Transportprotein ABC-A1. Aufgrund der Übertragung von Cholesterin auf ApoAI ist es besonders wichtig für die Bildung von HDL-Partikeln (*Bodzioch et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999*).

Nachdem Fettsäuren durch die LCAT vom Lecithin auf das Cholesterin übertragen wurden, gelangen die Cholesterinester-Moleküle in den lipophilen Kern der HDL. In der Leber angekommen, werden die Cholesterinester über einen so genannten Scavenger-Rezeptor SR-B1 selektiv abgegeben (*Rinninger et al. 1999*).

Eine vollständige Aufnahme der HDL-Partikel in die Leberzellen ist ebenfalls möglich. Dies geschieht über Lipoproteinrezeptoren (LDL-R und LRP) sowie eine Cholesterinester-Übertragung auf andere Lipoproteinklassen durch Interaktion mit dem Cholesterinester-Transferprotein (CETP). Nach neueren Erkenntnissen spielt der ABC-A1-Transporter eine entscheidende Rolle bei der Regulation des HDL-Plasmaspiegels und beeinflusst die selektive hepatische Aufnahme von HDL-Cholesterinestern (*McNeish et al. 2000; Ragozin et al. 2005; Singaraja et al. 2006*).

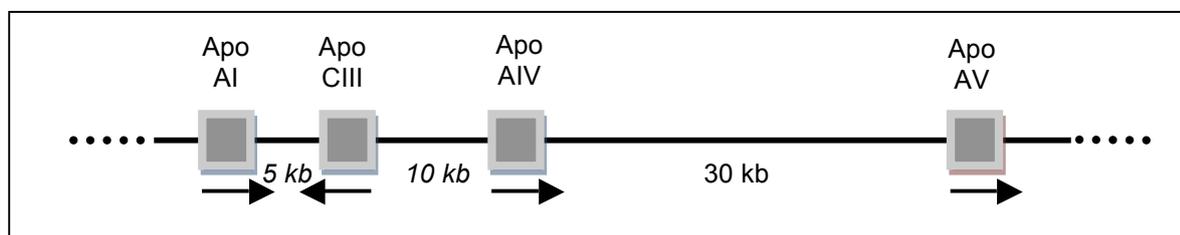


**Abb. 1: Stoffwechsel der Lipoproteine.** Endogener und exogener Stoffwechselweg beginnen jeweils mit der Produktion triglyzeridreicher Lipoproteine, den VLDL bzw. den Chylomikronen (CM). Nach Triglyzeridhydrolyse durch endothelständige LPL entstehen die cholesterinreicheren Lipoproteine LDL bzw. Chylomikronen-Remnants (CM-R). Beide werden durch rezeptorvermittelte Endozytose abgebaut. Der reverse Cholesterintransport dient der Rückführung von Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber, dem einzigen Organ, dass größere Mengen an Cholesterin ausscheiden kann. Am reversen Cholesterintransport sind HDL, Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT) und Cholesterinester-Transferproteine (CETP) beteiligt.

### 1.3 Lokalisation des ApoAV- und des ApoCIII-Gens

Das ApoAV-Gen befindet sich 27 kbp distal (3') von ApoAIV, also in unmittelbarer Nähe des ApoAI/CIII/AIV-Lokus auf Chromosom 11q23 und kann damit zu diesem Gencluster hinzugerechnet werden. Der starke Einfluss dieses Genlocus auf die mit dem Lipidstoffwechsel assoziierten Parameter bei Menschen und Mäusen ist bereits vielfach beschrieben worden (Groenendijk et al. 2001; Talmud et al. 2002).

ApoAI wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und dient dem reversen Cholesterintransport. Das ApoAIV befindet sich in HDL-Partikeln und beeinflusst als Aktivator der LCAT die Lipidabsorption. Von besonderer Bedeutung ist hierbei auch das ApoCIII, ein von Leber und Intestinum sezerniertes Polypeptid, welches Bestandteil der HDL, VLDL und Chylomikronen ist und die Lipoproteinlipase, die hepatische Lipase und die hepatische Aufnahme der Reste von triglyzeridreichen Partikeln hemmen kann (Krauss et al. 1973; Kinnunen and Ehnolm 1976; Wang et al. 1985; McConathy et al. 1992). Ein hoher ApoCIII Spiegel korreliert positiv mit Triglyzeridwerten im Plasma (Ito et al. 1990).



**Abb. 2: Schematischer Aufbau des Apolipoproteinclusters auf Chromosom 11q23.** Die Abbildung zeigt die Entfernung zwischen den Genen und die Transcriptionsrichtung.

### 1.4 Klinische Bedeutung der Apolipoproteine AV und CIII

Die Effekte von ApoAV und ApoCIII auf den TG-Metabolismus sind klinisch hoch relevant, da die Plasmatriglyzeridspiegel einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen (Ginsberger al. 2001) und Hypertriglyzeridämie stark mit dem metabolischen Syndrom assoziiert ist, welches durch Fettleibigkeit, Insulinresistenz und Hypertonie charakterisiert ist. Das metabolische Syndrom erhöht das Risiko für die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen (Reilly, Rader et al. 2003). Der auslösende Vorgang bei der Entwicklung eines metabolischen Syndroms ist die Entgleisung der energetischen Selbstregulation im Sinne einer veränderten Aufnahme von Fettsäuren und einer veränderten Glukose/Insulin-Sensitivität. Erhöhte Spiegel freier Fettsäuren im Plasma sind assoziiert mit dem Auftreten einer Insulinresistenz und gelten somit ebenfalls als eine der Hauptursachen für eine muskuläre Insulinresistenz (Lewis, Carpentier et al. 2002).

Das Apolipoprotein AV wurde im Jahr 2001 unabhängig durch vergleichende Sequenzanalysen (*Pennacchio et al. 2001*), als ein mit der frühen Phase der Leberregeneration assoziiertes Protein entdeckt (*van der Vliet et al. 2001*).

Es ist ein stark lipophiles Apolipoprotein, dass wie ApoCIII ebenfalls stark mit den Triglyzeridspiegeln im Plasma assoziiert ist, im Gegensatz hierzu jedoch mit niedrigen Triglyzeridwerten einhergeht. Das murine Genprodukt des ApoAV ist ein 368 Aminosäuren langes Protein mit signifikanter Homologie zu anderen Apolipoproteinen, wie zum Beispiel dem murinen ApoAIV (24% identisch, 49% gleichartig). Das entsprechende humane Protein besteht aus 366 Aminosäuren. Hier stimmt die Sequenz zu 71% mit dem murinen ApoAV überein (78% gleichartig) und weist auch zum humanen ApoAIV eine ausgeprägte Homologie auf (*Pennacchio et al. 2001*).

In Mausmodellen zeigte sich im Vergleich zu Wildtyptieren ein bei ApoAVtg Mäusen um zwei Drittel reduzierter TG-Spiegel. Bei homozygoten ApoAVko Mäusen hingegen war der TG-Wert dreifach erhöht. Auch bei einigen Menschen konnten Mutationen im ApoAV-Gen nachgewiesen werden, die stark mit veränderten TG-Spiegeln korrelierten (*Pennacchio, Olivier et al. 2001; Marcais, Verges et al. 2005*).

Es zeigte sich, dass bei Vorliegen von Punktmutationen dieser Region mit Beeinträchtigung von ApoAV und insbesondere im Falle von homozygoten Mutationen mit signifikant erhöhten TG-Spiegeln zu rechnen ist, welche wiederum mit dem Vorkommen von Myokardinfarkten assoziiert sind (*Hubacek, Skodova et al. 2004*). Derartige Polymorphismen korrelieren desweiteren mit der Entstehung von small dense LDL-Partikeln, durch die es bei Bindung an endotheliale Proteoglykane, zu einer proatheriogenen Wirkung kommt (*Austin, Talmud et al. 2004*).

Zur Abschätzung eines Gesamtartheroskleroserisikos könnte in diesem Zusammenhang die signifikante Assoziation von ApoAV-Variationen mit veränderten Triglyzeridspiegeln und somit auch mit dem Auftreten von Intimaverdickungen der Karotiden an Bedeutung gewinnen (*Elosua, Ordovas et al. 2006*). Kontrovers zu diskutieren bleibt über Daten, die bei Hypertriglyzeridämie neben einem erhöhten ApoCIII auch einen erhöhten ApoAV-Spiegel zeigten (*Schaap, Nierman et al. 2006*). Hier stellt sich die Frage, ob es sich in diesem Fall um einen Kompensationsmechanismus handelte, da der Wirkmechanismus von ApoAV vermutlich in einer beschleunigten Katabolisierung TG-reicher Lipoproteine durch LPL an Kapillarendothelien besteht (*Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Schaap 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005*).

ApoCIII führt stärker noch als Ernährungsgewohnheiten, durch eine gesteigerte Aufnahme von Fettsäuren in das Fettgewebe zu gesteigerter Anfälligkeit für Fettleibigkeit. Die zunehmende Fettleibigkeit und eine veränderte Fettsäurekonstellation bewirken die Entwicklung von sowohl peripherer als auch hepatischer Insulinresistenz. Durch den Einfluss, sowohl auf den Plasmatriglyzeridspiegel als auch auf die Insulinempfindlichkeit, besteht hier ein möglicher Angriffspunkt für die Behandlung von Fettleibigkeit, Insulinresistenz und kardiovaskulären Erkrankungen (*Duivenvoorden, Teusink et al. 2005*).

Diese Vielzahl an Zusammenhängen verdeutlicht die große klinische Relevanz von ApoAV und ApoCIII und bestätigt ihre Bedeutung in Bezug auf Störungen des Triglyzeridstoffwechsels und dessen Folgen.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Im Zusammenhang mit ApoAV gelangte auch das ApoCIII wieder ins Zentrum des Interesses. Zu klären galt es, ob ApoCIII, das durch eine Blockade der LPL hohe TG-Spiegel verursacht, durch das ApoAV in seiner Wirkung antagonisiert oder in seiner Synthese und Expression unterdrückt wird.

ApoAVtg Mäuse zeigten tatsächlich niedrigere Spiegel von ApoCIII-Protein als ApoAVko Mäuse. Der TG-Spiegel einer ApoAVtg Maus ist im Vergleich zu einer ApoCIIIko Maus jedoch nur halb so hoch, so dass hier der ApoAV-Effekt nicht ausschließlich auf die Modulation des ApoCIII zurückzuführen wäre (*Pennacchio, Olivier et al. 2001*). In Versuchen mit ApoCIII und -AV doppelt transgenen und doppelt knockout Mäusen zeigten beide Gruppen normale TG-Spiegel.

Läge den beiden Apolipoproteinen CIII und AV nun ein gemeinsamer Wirkmechanismus zugrunde, so wäre bei einem doppelt-ko Tier der Plasma-TG-Spiegel der ApoAVko Maus (+300%) oder der ApoCIIIko Maus (-30%) zu erwarten gewesen (*Baroukh, Bauge et al. 2004*).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Interaktion der beiden Apolipoproteine CIII und AV in vivo und in vitro aufzuklären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Betacounter Tri-carb, 1600 TR	Packard, Frankfurt
Biofuge fresco (Zentrifuge)	Heraeus
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gel-Elektrophoresekammer	Biorad, München
Hamiltonspritze	Carl Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Köln
Mikrotiterplattenlesegerät MRX 2	Dynex Technologies, Frankfurt a. M.
PCR-Thermocycler TP48	Biometra, Göttingen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima	Beckman, München
Videodokumentationsgerät für Agarose-Gele	Intas, Göttingen

#### 2.1.2 Chemikalien

In der Regel wurden Chemikalien höchsten Reinheitsgrades (pro analysi) verwendet. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen oder Merck, Darmstadt bezogen.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Cholesterol und Triglyzeride, Standardlösung für Assays	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie, Brilliantblau, R250	Merck, Darmstadt

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Karl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Heptan	Merck, Darmstadt
HSPG	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumbromid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
LPL	aus Kuhmilch aufgereinigt (Geschenk von G. Olivecrona, Schweden)
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T. Baker, Holland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Nefa C Kit	Wako Chemicals, Neuss
N-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
Palmitinsäure	Amersham, Arlington Heights, USA
Precipath L	Roche, Mannheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Solvable	Packard Instruments, Frankfurt
Szintillationsflüssigkeit, Ultima Gold	Packard, Holland
Trans-1,2-Diaminocyclohexan- NNN; Tetraessigsäure (CDTA)	Merck, Darmstadt
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Triton x-100	Sigma, Deisenhofen
Wasser	Wasser, mit einem BiDest der Firma Gössner, HH destilliert und autoklaviert.

### 2.1.3 Enzyme und Proteine

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

### 2.1.4 Oligonukleotide

Nucleotid	Hersteller
Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Roche, Mannheim
Primer A5Neo/1FW Primer A5Neo/2BW Primer hA5Tg/1FW Primer hA5Tg/2BW Primer mA5wt/1FW Primer mA5wt/2BW Primer mApoC3_1 Primer mApoC3_2	MWG Biotech AG, Ebersberg
Marker für 100 bp	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

### 2.1.5 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
heparinisierte Hämatokritkapillaren	Hirschmann, Eberstadt
Mikrotiterplatten, 96-well	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterstripes, 12-well	Nunc, Wiesbaden
PCR-Röhrchen	Corning, USA
phenolfeste Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
starkwandige Reagenzglasröhrchen	Francke, Hamburg
verschließbare Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugationsröhrchen	Beckman, München

### 2.1.6 Narkosemittel

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

### 2.1.7. Standard-Pufferlösungen

Puffer	Inhaltsstoffe
Phosphat Buffered Saline (PBS)	8g NaCl, 0,2g KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 Liter Aqua dest.
PBS-Tween (0,1%)	100ml PBS, 1g Tween in 1 Liter Aqua dest.
TBE-Puffer (10-fach konzentriert)	108g Trisbase, 55g Borsäure, 40ml 0,5M EDTA pH 8,0 in 1 Liter Aqua dest.
TE-Puffer	500µl 1M Tris-HCL pH 7,6 und 100µl 0,5M EDTA pH 8,0 in 50ml Aqua dest.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere, allgemeine Maßnahmen

Alle Tierversuche wurden von der Behörde für Umwelt und Gesundheit genehmigt bzw. bei dieser angezeigt. Es bestanden Genehmigungen nach §7 TierSchG (14/05 und 51/02) und §6 TierSchG (UKE-VTH-Aktenzeichen A65, A66). Organentnahmen hatten das interne Registrierzeichen Org 163 und Org 288 der Universität Hamburg.

Als Versuchstiere dienten ausschließlich Mäuse, die bezüglich aller üblichen Serologien – insbesondere des Maus-Hepatitis-Virus (MHV) – negativ waren. Die Unterbringung erfolgte in pathogenarmen Räumen der Versuchstierhaltung am UKE mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (normale Nager-Diät).

Alle verwendeten Mausstämme hatten einen weitgehend gemischten genetischen Hintergrund um Inzuchtstämme auszuschließen. Als Kontrollgruppe wurden bei allen Experimenten Geschwistertiere als Kontrollgruppe gewählt. Dies ist ein für metabolische Studien international anerkanntes Vorgehen. Um schrittweise einen weitgehend homogenen genetischen Hintergrund zu schaffen, wurden die Kreuzungsschritte jedoch möglichst mit einem Inzuchtstamm durchgeführt.

### 2.2.2 Mauslinien

#### 2.2.2.1 ApoAV knockout Mäuse

Bei den ApoAVko Mäusen wurden per Gen-Targeting drei Exons des ApoAV-Gens durch ein Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt. Durch Kreuzung heterozygoter Tiere entstanden sowohl Wildtyp-Mäuse als auch heterozygot oder homozygot ApoAV defiziente Tiere, welche phänotypisch normal erschienen (*Pennacchio, Olivier et al. 2001*). Die verschiedenen Genotypen entstanden entsprechend der Mendel'schen Verteilung (ApoAV -/- zu 25%, ApoAV +/- zu 50% und ApoAV +/+ zu 25%).

Die Tiere der ApoAV-defizienten Mauslinie wurden von L. A. Pennacchio, Berkeley, USA zur Verfügung gestellt und in die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf überführt.

#### 2.2.2.2 ApoCIII knockout Mäuse

Für die Arbeit mit ApoCIII-defizienten Mäusen erhielten wir heterozygote ApoCIIIko Mäuse der Linie B6.129-Apoc3tm1Unc/J (Stocknr.: 002057) des Jackson Laboratory in Maine

(USA). Eine Kreuzung zweier Tiere dieses Genotyps ergab entsprechend den Mendel'schen Regeln in 25% der Fälle Nachkommen eines für ApoCIII homozygot defizienten Genotyps (*Maeda N; Li H et al. 1994*).

### **2.2.2.3 ApoAV transgene Mäuse**

Die ApoAVtg Mäuse wurden vom Genome Science Department, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, USA bezogen. Dort wurde ein 26kbp großes Xho I Genfragment in das Mausgenom integriert, welches das humane ApoAV codiert und wie das endogene murine ApoAV-Gen ausschließlich in der Leber exprimiert wird (*Pennacchio et al 2001*).

Das Ergebnis waren hinsichtlich des Transgens heterozygote Mäuse. Im Vergleich mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe ist der Plasma-Triglyzeridspiegel von transgenen Mäusen um circa zwei Drittel erniedrigt.

### **2.2.2.4 ApoCIII knockout und ApoAV transgene Mäuse**

Die Mäuse der Linie ApoCIIIko/AVtg sind Ergebnis einer Kreuzung von Mäusen der Linie ApoCIIIko mit Mäusen der Linie ApoAVtg.

## **2.2.3 Kreuzungsstrategien**

Die homozygoten ApoAVko und die homozygoten ApoCIIIko Mäuse wurden jeweils untereinander verpaart, so dass die Nachkommen auch jeweils den entsprechenden homozygoten Genotyp trugen.

Um Tiere des Genotyps ApoCIIIko/AVtg zu erhalten, wurde jeweils ein homozygotes ApoCIIIko Tier mit einem heterozygoten Tier der Linie ApoAVtg verpaart. Die Nachkommen waren entsprechend den Mendelschen Regeln zu 100% heterozygote ApoCIIIko Tiere bei denen zu 50% das Transgen heterozygot vorhanden ist. Nach erneuter Verpaarung mit ApoCIIIko Tieren erhielt man so zum Teil homozygote ApoCIIIko Tiere mit ApoAV-Transgen. Da mit üblichen PCR's nicht zwischen einer Homo- und einer Heterozygotie bezüglich des AV-Transgens unterschieden werden kann, wurde ausschließlich mit heterozygoten Tieren gearbeitet.

## **2.2.4 Genotypisierung der Mäuse**

### **2.2.4.1 Prinzip**

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch PCR und anschließender Analyse der Produkte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Die erforderliche DNA wurde aus einer Schwanzspitzenbiopsie gewonnen.

### **2.2.4.2 Entnahme der Schwanzbiopsie**

Die Mäuse wurden mit Ether narkotisiert. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden mit einem Skalpell 5mm der Schwanzspitze entnommen. Die durch die Biopsie entstandene Wunde wurde mit Histoacryl-Gewebekleber versorgt.

### **2.2.4.3 Verdau der Schwanzbiopsie**

Um die DNA aus den Zellen zu lösen, wurden die Zellmembranen mit einem Lysis-Puffer zerstört und die Proteine durch das Enzym Proteinase K verdaut.

Der Lysis-Puffer wurde folgendermaßen hergestellt:

Für eine 2fache Konzentration wurde 480g Harnstoff in ca. 150 – 200ml Aqua dest. auf einer Heizplatte unter Rühren gelöst. Es wurden nacheinander 33ml 30%iges Sarkosyl, 200ml 1M Tris-HCL pH 8,0, 80ml 5M NaCl und 40ml 0,5M EDTA pH 8,0 hinzugefügt und anschließend auf 1000ml mit Wasser aufgefüllt. Die Endkonzentrationen des Puffers setzten sich wie folgt zusammen: Harnstoff 2M, Sarkosyl 0,25%, 0,05M Tris-HCL pH 8,0, NaCl 0,1M, EDTA 5mM. Die Schwanzspitze wurde in einer Mischung aus 400µl Lysis-Puffer und 40µl 14mg/ml Proteinase K über Nacht im Heizblock bei 56°C verdaut.

### **2.2.4.4 Extraktion genomischer DNA**

Phenol und Chloroform wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. 400µl des Unterstandes wurden dann in das Reaktionsgefäß mit der verdauten Schwanzspitze gegeben. Nach kurzem vortexen wurde diese Mischung 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde abgenommen, in 1ml Ethanol gegeben und kräftig geschüttelt. Hierbei fiel genomische DNA aus, welche mit einer Hämatokritkapillare in 200µl TE-Puffer überführt wurde. Die erhaltene DNA ist bei 4°C über mehrere Wochen stabil und kann so mit einer PCR weiter untersucht werden.

## 2.2.4.5 PCR

### 2.2.4.5.1 ApoAVko Nachweis

Der Nachweis des homozygot ausgeknockten ApoAV-Gens erfolgte durch zwei etablierte PCRs.

Mit einer PCR wurde ein Neo-Gen nachgewiesen, welches das ApoAV-Gen ersetzte.

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

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

Die beiden Primer amplifizieren bei Anwesenheit des Neo-Gens eine Bande von 545bp.

Das Reaktionsvolumen betrug 20µl. Es wurden 2µl 10x-Puffer, 2µl MgCl (25mM), je 0,8µl der Primer AVNeo/1FW und AVNeo/2BW (10pmol/µl), 1,6µl dNTP-Mix (2,5mM), 0,1µl Taq DNA Polymerase, 10,7µl H<sub>2</sub>O und 2µl der genomischen DNA aus der Schwanzspitze eingesetzt. Bei 95°C wurde die Probe für eine Minute denaturiert. Es folgten dann 30 Zyklen mit jeweils 30s bei 95°C, 30s bei 58°C und 40s bei 72°C.

Mit der anderen PCR wurde das AV-Wildtyp-Gen bestimmt.

Primer 1: mAVwt/1FW (5'-ACA GTT GGA GCA AAG GCG TGA-3')

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

Bei Anwesenheit des Wildtyp-Gens wird durch die Primer eine Bande von 516bp amplifiziert. Es wurden 2µl 10x-Puffer, 2µl MgCl (25mM), je 0,8µl der Primer mAVwt/1FW und mAVwt/2BW (10pmol/µl), 1,6µl dNTP-Mix (2,5mM), 0,1µl Taq DNA Polymerase, 10,7µl H<sub>2</sub>O und 2µl der genomischen DNA aus der Schwanzspitze eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug dementsprechend 20µl. Bei 95°C wurde die Probe für eine Minute denaturiert. Es folgten 35 Zyklen mit jeweils 30s bei 95°C, 30s bei 63°C und 40s bei 72°C.

Nach Vorliegen der PCR-Ergebnisse konnte festgestellt werden, ob es sich um einen homozygoten ApoAVko, einen heterozygoten ApoAVko oder einen Wt-Genotyp handelte.

### 2.2.4.5.2 ApoCIIIko Nachweis

Der Nachweis des homozygot ausgeknockten ApoCIII-Gens erfolgte ebenfalls durch zwei etablierte 2-Primer-PCRs.

Mit der ersten PCR wurde auch hier ein Neo-Gen nachgewiesen, welches das ApoCIII-Gen ersetzt (s. AVko Nachweis).

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

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

Durch die zweite PCR wurde das CIII-Wildtyp-Gen nachgewiesen

Primer 1: mApoCIII\_1 (5'-GGA CAA TCA CTT CAG ATC CCT GAA A-3')

Primer 2: mApoCIII\_2 (5'-ATC CAG CTT TAT TAG GGA CAG CAT G-3')

Durch diese 2-Primer-PCRs ließen sich hier durch entsprechende An- bzw. Abwesenheit der spezifischen elektrophoretischen Banden die homozygoten ApoCIIIko Mäuse identifizieren. Das Reaktionsvolumen betrug hier ebenfalls 20µl. Es wurden 2µl 10x-Puffer, 2µl MgCl (25mM), je 0,8µl der Primer mApoCIII\_1 und mApoCIII\_2 (10pmol/µl), 1,6µl dNTP-Mix (2,5mM), 0,1µl Taq DNA Polymerase, 10,7µl H<sub>2</sub>O und 2µl der genomischen DNA aus der Schwanzspitze eingesetzt. Bei 95°C wurde die Probe für eine Minute denaturiert. Es folgten dann 30 Zyklen mit jeweils 30s bei 95°C, 30s bei 62°C und 40s bei 72°C.

Aus den Ergebnissen beider PCRs konnte nun erkannt werden, ob es sich um einen homozygoten ApoCIIIko, einen heterozygoten ApoCIIIko oder einen Wt-Genotyp handelte.

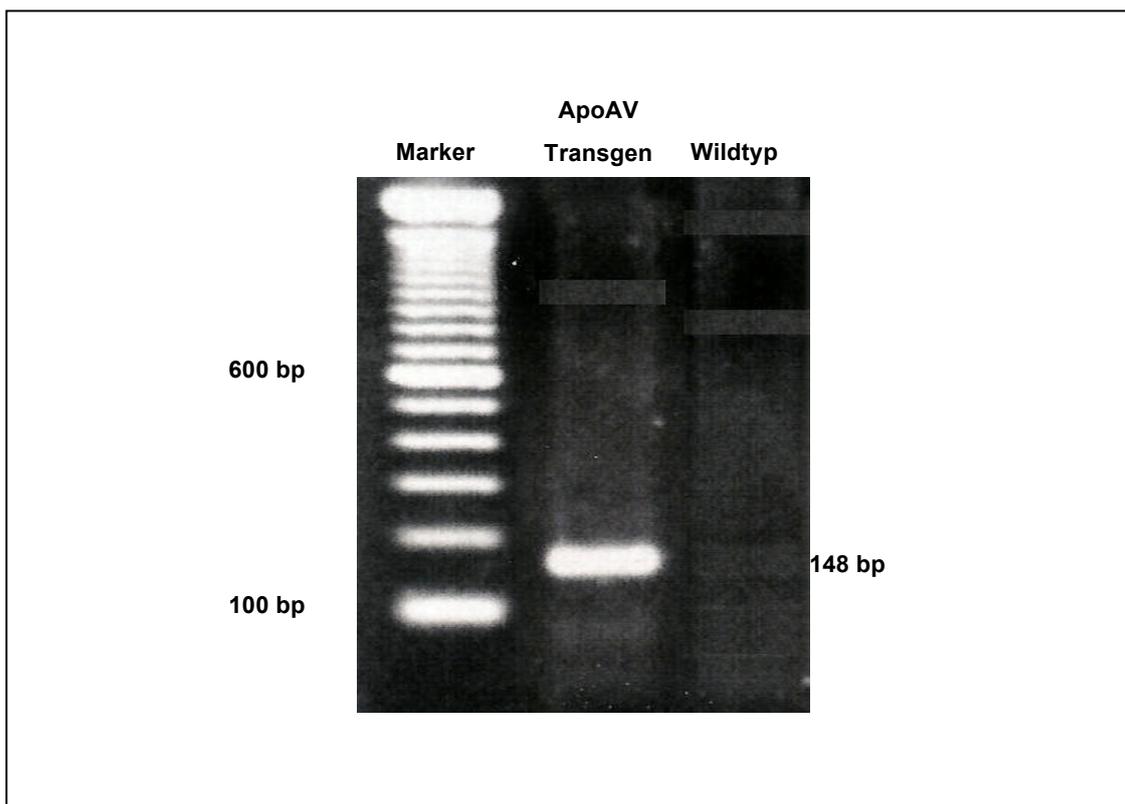
### 2.2.4.5.3 ApoAVtg Nachweis

Zur Bestimmung des ApoAV-Transgens diente eine bereits etablierte 2-Primer-PCR.

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

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

Die beiden Primer amplifizieren eine Bande von 148bp (=Basenpaaren) in Gegenwart des intakten ApoAV-Transgens. Bei einem Reaktionsvolumen von 25,5µl wurden 20,4µl PCR-Puffer, je 0,5µl der Primer hAVTg/1FW und hAVTg/2BW (10pmol/µl), 0,1µl Taq DNA Polymerase und 4µl genomische DNA aus der Schwanzspitze eingesetzt. Die Proben wurden 1min bei 95°C denaturiert, dann folgten 35 Zyklen a 30s bei 95°C, 30s bei 53°C und 40s bei 72°



**Abb. 3: PCR-Nachweis des ApoAV Transgens.** Als Marker dienten 100 bp DNA-Fragmente, wobei die 600 bp-Bande dicker als die Übrigen erscheint. Bei Vorliegen des Transgens wird eine Bande auf Höhe von 148 bp sichtbar

#### **2.2.4.6 Gelelektrophorese**

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde 2%iges Agarose-Gel verwendet. Zur Herstellung wurden 100ml TBE-Puffer mit 2g Agarose in der Mikrowelle bei 600 Watt 2 Minuten lang erhitzt, anschließend 5µl (10mg/ml) Ethidiumbromid hinzupipettiert und das Gemisch in eine Gelkammer mit einem 15- oder 20-zahnigen Kamm gegossen. Sobald das Gel abgekühlt und fest war, konnte der Kamm gezogen und das mit Taschen versehene Gel in die Elektrophoresekammer gelegt werden. Diese wurde dann soweit mit TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. In die erste Tasche wurden 10µl eines 100bp Markers zur Größenbestimmung der Banden gegeben, in die folgenden Taschen je 15µl der PCR-Proben pipettiert, die zuvor mit 3µl Bromphenolblau (BPB)-Puffer vermischt wurden, insgesamt also 18µl (für den BPB-Puffer löst man eine Spatelspitze BPB in Aqua dest. und verdünnt hiermit 87%-iges Glycerin auf 80%). Das Amplikon (= PCR-Produkt) wurde anschließend bei 110Volt eine Stunde lang aufgetrennt. Danach waren die Banden unter UV-Licht (254nm) durch Interkalation der DNA mit Ethidiumbromid sichtbar.

#### **2.2.5 Blutentnahme bei Mäusen**

Erwachsene Tiere wurden zur Blutentnahme mit Ether in eine Kurzzeitnarkose gelegt und das Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mittels heparinierter Hämatokritkapillare gewonnen. Bei einer Blutentnahme von mehr als 100µl wurden zu je 100µl Blut 2µl 0,5M EDTA (pH 7,5) zur Antikoagulation hinzugefügt. Nach der Blutentnahme wurde das Plasma durch zentrifugieren (10 Minuten bei 13000rpm) von den korpuskulären Bestandteilen des Blutes getrennt und abgenommen.

## 2.2.6 Lipoproteinprofile

### 2.2.6.1 Prinzip

Zur Bestimmung der Lipoproteinprofile einzelner Mäuse wurde eine Nüchternblutentnahme durchgeführt und 60µl des so erhaltenen Plasmas sequentiell in einer Dichte von 1,006g/ml und 1,062g/ml ultrazentrifugiert (*Havel et al. 1955*). Die erhaltenen Fraktionen VLDL, LDL und HDL wurden mit einem kommerziell erhältlichen enzymatischen Farbttest auf ihren Triglyzerid- und Cholesteringehalt untersucht.

### 2.2.6.2 Nüchternblutentnahme

Für die Nüchternblutentnahme wurde den Mäusen nach achtstündigem Fasten (von 8.00 Uhr bis 16.00 Uhr) Blut abgenommen. Diese Fastenperiode hat sich als sinnvoll erwiesen, da Mäuse fast ausschließlich in der Dunkelphase fressen. Insbesondere ein Fasten über Nacht erscheint unphysiologisch, da dies bei einer Versuchsdurchführung am nächsten Morgen eine fast 24-stündige Nahrungskarenz der Tiere bedeutete. Daher entspricht ein Fasten tagsüber bei Mäusen am ehesten einer Nüchternblutentnahme beim Menschen.

### 2.2.6.3 Lipoproteinzentrifugation

In einem Ultrazentrifugationsröhrchen wurden 60µl PBS vorgelegt und mittels Hamiltonspritze mit 60µl Plasma unterschichtet. In einem Swing-out-Rotor Typ SW41 wurde die Ultrazentrifugation 2,5h lang bei 42000rpm durchgeführt. Anschließend befand sich in den oberen 60µl die VLDL, in den unteren HDL, LDL und IDL.

Die untere Phase wurde mit der Hamiltonspritze in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und dort mit 60µl KBr (Dichte: 1,12g/ml) vermischt, um eine Dichte von 1,063g/ml zu erhalten. Anschließend erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation für mindestens 6h bei 42000rpm. Die 60µl mit der VLDL wurden zur weiteren Verwendung in ein verschließbares Reaktionsgefäß überführt. Die zweite Zentrifugation ergab eine Verteilung der HDL in den unteren 60µl, während sich LDL und IDL in den oberen 60µl befanden. Es wurde nun zuerst die untere, dann die obere Phase in je ein verschließbares Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit der VLDL bei 4°C aufbewahrt.

### 2.2.6.4 Triglyzerid- und Cholesterinbestimmung

Triglyzerid- und Cholesterinassays beruhen auf enzymatischen Farbttests, bei denen die photometrisch zu bestimmende Extinktion des entstehenden Farbstoffes proportional zur Triglyzerid- bzw. Cholesterinkonzentration ist. Mit einer Standardreihe ließ sich der genaue Gehalt an Triglyzeriden bzw. Cholesterin der Plasmaprobe bestimmen. Sowohl die Standard-

reihe als auch die Proben wurden im Dreifachansatz gemessen. Von der gewonnenen VLDL, LDL und HDL wurden je 5µl Plasma pro Ansatz verwendet. In einer Mikrotiterplatte wurden die Standards und die Proben mit je 200µl der Triglyzerid- oder Cholesterin-Reagentien (Standardlösungen für Assays) vermischt.

Der Cholesterinansatz wurde anschließend 5min bei 37°C inkubiert, der Triglyzeridansatz 30min bei Raumtemperatur. Anhand der Standardreihe konnte eine Eichkurve erstellt und so der Proportionalitätsfaktor errechnet werden. Durch anschließende Multiplikation dieses Faktors mit der Extinktion der Proben wurde der Triglyzerid- bzw. Cholesteringehalt errechnet.

## **2.2.7 Gavage - Produktionsstudie**

### **2.2.7.1 Prinzip**

Bei dem verwendeten Tiermodell sollten Unterschiede in der Produktion triglyzeridreicher Lipoproteine untersucht werden. Hierfür wurde ApoCIIIko und ApoCIIIko/AVtg Mäusen Olivenöl verabreicht und anschließend mehrfach Blut abgenommen und dessen Triglyzerid- und Cholesteringehalt bestimmt. Um einen möglichen Einfluss des Hormonstatus vernachlässigen zu können, wurden die Mausgruppen hinsichtlich der Geschlechtsverteilung aufeinander abgestimmt und im Hinblick auf die Altersstruktur angepasst, um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

### **2.2.7.2 Orale Fettbelastung**

Zu Beginn des Experimentes waren die Mäuse 6 Stunden nüchtern (07:00 – 13:00h). Um den postprandialen Anstieg der Triglyzeridparameter im Blutplasma nach oraler Fettbelastung zu untersuchen, wurden zunächst jeweils 100µl Olivenöl oral verabreicht und die Versuchstiere anschließend mit Ether narkotisiert.

### **2.2.7.3 Blutentnahme**

Unmittelbar nach oraler Fettzufuhr wurde zur Bestimmung des Ausgangswertes Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen und in heparinisierte Eppis überführt. Nach 60, 120 und 240 Minuten wurden diese Blutentnahmen wiederholt.

### **2.2.7.4 Bestimmung von Triglyzerid- und Cholesteringehalt**

Durch Zentrifugation des Blutes für 5min bei 7000rpm wurde Plasma gewonnen, dessen Triglyzerid- und Cholesteringehalt mit den im Rahmen der Lipoproteinprofile bereits beschriebenen Cholesterin- und Triglyzeridassays photometrisch bestimmt wurde.

## **2.2.8 Turnover - Abbaustudie**

### **2.2.8.1 Prinzip**

Bei der Abbaustudie wurde ApoAVtg Mäusen und ApoCIIIko/AVtg Mäusen radioaktiv markiertes VLDL von ApoAV-defizienten Mäusen intravenös appliziert. Anschließend wurden Blutentnahmen und Organentnahmen durchgeführt um durch Messung der Radioaktivität mögliche Unterschiede im Abbau nachweisen zu können.

Um auch hier einen möglichen Einfluss des Hormonstatus vernachlässigen zu können, wurden die Mausgruppen hinsichtlich der Geschlechtsverteilung aufeinander abgestimmt. Auch im Hinblick auf die Altersstruktur wurden die Mausgruppen angepasst, um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

### **2.2.8.2 Herstellung des VLDL-Substrates**

Zur Herstellung des radioaktiv markierten VLDL-Substrates wurden 500µCi an Albumin gebundene [1-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure (Amersham, Arlington Heights, USA) in die Schwanzvene von ApoAV-defizienten Mäusen injiziert. Nach 60 Minuten wurde eine Blutentnahme durchgeführt und anschließend durch Lipoproteinzentrifugation die VLDL-Fraktion der Plasmaproben isoliert.

### **2.2.8.3 Injektion des VLDL-Substrates**

Zu Beginn des Experiments waren die Mäuse (7 pro Gruppe) bereits 6 Stunden nüchtern als ihnen unter Barbiturat-Narkose die radioaktiven VLDL-Partikel in die Schwanzvene injiziert wurden.

### **2.2.8.4 Blutentnahme**

Blutentnahmen durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus folgten unter Narkose nach 1, 2, 5, 10 und 15 Minuten. Für eine Blutentnahme nach 20 Minuten wurden die Mäuse erneut mit 10µl/g/KG Ketanest narkotisiert und anschließend der Brust- und Bauchraum eröffnet. Zur Blutentnahme wurde der rechte Ventrikel punktiert.

### **2.2.8.5 Organentnahme**

Zur Untersuchung der spezifischen Organaufnahme der markierten VLDL-Fettsäuren wurden anschließend Leber, Muskelbiopsat und Fettgewebe entnommen und nach dem Wiegen in passende Counterröhrchen überführt.

### **2.2.8.6 Radioaktivitätsmessung**

Zur Messung der  $^3\text{H}$ -Counts wurden die Organe in 2ml Solvable (Packard Instruments, Frankfurt) aufgelöst. Die Plasmaproben und die gelösten Organe wurden anschließend jeweils in Betacounter-Röhrchen mit 10ml Szintillationsflüssigkeit überführt und zweifach für je 2 Minuten in einem Beta-Counter gemessen.

## 2.2.9 HSPG - Assay

Der HSPG-Assay ist ein *in vitro* Triglyzerid-Hydrolyseversuch mit an Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) gebundener Lipoproteinlipase (LPL). Die LPL ist *in vivo* an HSPG der extrazellulären Kapillarendothel-Matrix gebunden. In konventionellen LPL-Hydrolyseversuchen ist dies jedoch nicht berücksichtigt worden, da *in vitro* mit freier LPL gearbeitet wurde.

Von einer niederländischen Arbeitsgruppe ist ein Assay entwickelt worden, in dem die LPL an HSPG bindet. Hiermit war es möglich die Hydrolyse TG-reicher Lipoproteine *in vitro* unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen (*de Man et al. 1997*). Auf dieser Grundlage ist ein Versuchsaufbau entwickelt worden, der einerseits die Lipolyse *in vitro* durch an HSPG gebundene LPL durchführt, andererseits aber auch einen Vergleich zulässt indem zusätzlich aus dem gleichen Probenmaterial eine TG-Hydrolyse durch freie LPL durchgeführt wird.

### 2.2.9.1 Prinzip

Eine sterile 96-well Mikrotiterplatte für Zellkulturen wurde mit HSPG beschichtet um freie Bindungsstellen mit Fettsäure-freiem(FFA-free)-BSA zu blockieren. Die Lipoproteinlipase wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an die Proteoglykane gebunden. Zum Auslösen der Lipolyse wurden VLDL-Partikel zugegeben. Tritonzugabe beendete diesen Vorgang. Synonym wurde die TG-Hydrolyse parallel in den unbeschichteten Wells mit freier LPL durchgeführt. Anhand eines enzymatischen Farbtestes wurde schließlich die Konzentration der freien Fettsäuren bestimmt.

### 2.2.9.2 Lipoproteinlipase (LPL)

Die bovine Lipoproteinlipase wurde isoliert von Dr. G. Olivecrona, Umea, Schweden und freundlicherweise von PD Dr. Jörg Heeren aus dem Institut für Biochemie II und Molekulare Biologie (Direktorin Prof. Dr. Dr. Beisiegel) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Eingesetzt wurde die Lipoproteinlipase in einer Konzentration von 0,5µg/µl. In Aliquots à 12µl wurde sie bei -80°C gelagert. Für den HSPG-Assay wurde die LPL mit 0,1M Tris-(20%)-Glyzerol, pH 8,5, auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt.

### 2.2.9.3 Rekombinantes humanes Apo-AV

Das zur Herstellung des rekombinanten humanen ApoAV benötigte Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. Ryan, Oakland, USA zur Verfügung gestellt. Dr. Alexander Laatsch und Prof. Dr. Jörg Heeren (beide aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II – Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf; Direktorin Prof. Dr. Dr. Beisiegel) übernahmen dankenswerterweise die Proteinsynthese des

rekombinanten ApoAV sowie die Überführung in PBS und die Aliquotierung. In Aliquots à 400µl wurde das rekombinante Apo AV bei -20°C gelagert.

#### **2.2.9.4 Gewinnung des VLDL-Substrates**

Nach retrobulbärer Blutentnahme wurde durch kurze Zentrifugation Plasma aus dem Blut der verschiedenen Genotypen gewonnen. Um einen möglichen Einfluss des Hormonstatus vernachlässigen zu können, wurden zur Blutentnahme ausschließlich männliche Mäuse verwandt. Um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die zu vergleichenden Mausgruppen zusätzlich auch im Hinblick auf die Altersstruktur angepasst. Nach Genotypen getrennt wurde das Plasma schließlich gepoolt um individuelle Varianzen auszugleichen. Die VLDL-Fraktion wurde anschließend durch sequentielle Zentrifugation isoliert.

#### **2.2.9.5 Vorbereitung einer Mikrotiterplatte**

Eine sterile 96-well Mikrotiterplatte für Zellkulturgebrauch wurde im Voraus genau markiert und beschriftet. Die Wells wurden mit je 100µl einer HSPG-PBS(1x)-Lösung (0,005µg HSPG/1µl PBS (1x)) befüllt und über Nacht für 18h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Um überschüssige Proteoglykane zu entfernen, wurden die Wells dreifach mit je 250µl PBS (1x) ausgewaschen, anschließend mit je 250µl eines einprozentigen FFA-freien BSA-PBS (1x) befüllt und bei 37°C im Schüttelinkubator geblockt. Nach Entfernung der Blocklösung sind die entsprechenden Wells mit je 100µl der unterschiedlich konzentrierten LPL für eine Stunde im Kühlschrank bei 4°C inkubiert worden.

#### **2.2.9.6 Lipolyse**

Vor der Lipolyse wurden die Wells der Mikrotiterplatte dreifach mit je 250µl eines 0,1M Tris Puffers, pH 8,5, gewaschen. Zur Durchführung der TG-Hydrolyse wurden je 100µl VLDL in die Wells gegeben und die Platte bei 37°C in den Inkubator gestellt. Der Lipolyseprozess wurde nach 10 Minuten unter Eiskühlung durch Zugabe von 10µl einer zehnprozentigen Triton X-100 Lösung gestoppt.

#### **2.2.9.7 Bestimmung freier Fettsäuren (FFA)**

Zur Bestimmung des Gehaltes an freien Fettsäuren wurde ein konventionelles NEFA C-Kit auf 96-well Platten adaptiert. Es handelt sich hierbei um einen enzymatischen Farbttest dessen Extinktionsmaximum bei 550nm liegt. Aus der FFA-Standardlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 und 0,0625mmol/l hergestellt. Anschließend wurden unter Eiskühlung je 10µl der Proben, der Standard-

verdünnungsreihe und eines Leerwertes als Dreifachansatz auf eine neue Mikrotiterplatte pipettiert und nach Zugabe von je 100µl der Lösung A pro Well bei 37°C inkubiert. Nach 10 Minuten wurden in jedes Well zusätzlich 200µl von Lösung B gegeben und anschließend erneut für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Unmittelbar im Anschluss wurde im Mikrotiterplattenlesegerät die Konzentration an freien Fettsäuren bestimmt.

#### **2.2.9.8 Lipolyse durch freie LPL**

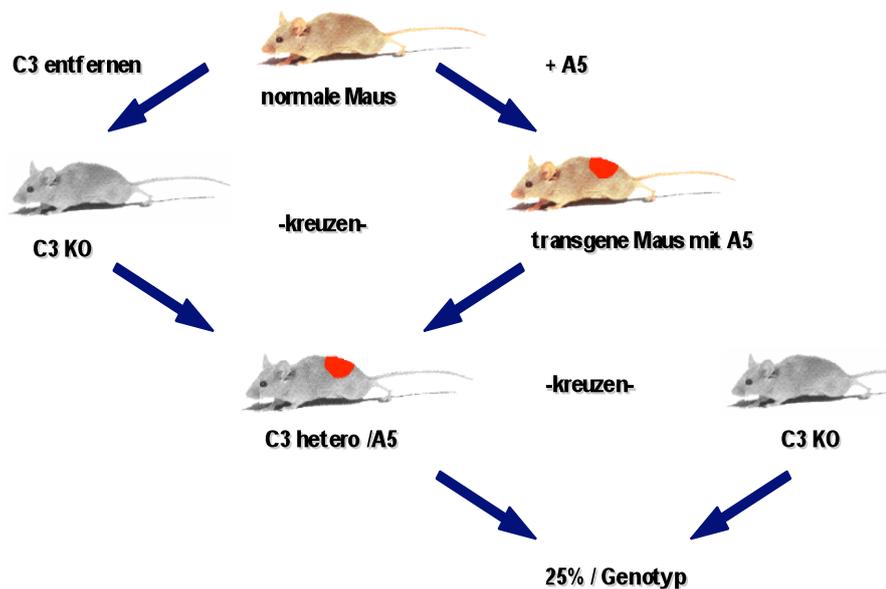
Parallel zum oben beschriebenen Hydrolyse-Assay mit HSPG-gebundener LPL wurde zum Vergleich ein entsprechender Assay mit gelöster LPL durchgeführt.

Auch hier wurde im Voraus eine Mikrotiterplatte für den Zellkulturgebrauch genau beschriftet und pro Well mit je 250µl eines einprozentigen FFA-freien BSA-PBS (1x) für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator geblockt. Anschließend wurden die Wells dreifach mit je 250µl eines 0,1M Tris Puffers, pH 8,5, gewaschen und mit je 100µl der jeweiligen Konzentration VLDL befüllt. Zur TG-Hydrolyse wurde auch hier für 10 Minuten bei 37°C inkubiert nachdem die LPL in einer auf das VLDL-Volumen bezogenen Menge hinzu gegeben wurde, so dass die Konzentration derjenigen im HSPG-Ansatz entsprach. Gestoppt wurde die Lipolyse unter Eiskühlung durch Zugabe von 10µl 10-prozentiger Triton X-100 Lösung. Die Bestimmung der freien Fettsäuren fand -wie oben beschrieben- ebenfalls mit dem NEFA C-Kit statt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Genotypisierung und Mauskolonie

Die aus Berkeley bezogenen ApoAVtg Mäuse waren ausschließlich hemizygot bezüglich des Transgens. Diese Tiere wurden mit heterozygoten ApoCIIIko Mäusen verpaart. Etwa die Hälfte der Nachkommen trug das ApoAV-Transgen und ebenfalls circa 50% der Tiere waren heterozygote ApoCIIIko Mäuse. Diejenigen heterozygoten ApoCIIIko Mäuse die außerdem das Transgen trugen, wurden erneut mit heterozygoten ApoCIIIko Mäusen verpaart. Als Resultat dieser Verpaarung entstanden so unter anderem Tiere, die sowohl homozygot für ApoCIIIko waren, als auch das ApoAV-Transgen trugen. Wie zu erwarten, entsprach das Resultat dieser Verpaarung hinsichtlich der Verteilung der Genotypen den Mendelschen Regeln.



**Abb. 4: Kreuzungsstrategie:** Exemplarische Verpaarung ApoAV-transgener Tiere mit ApoCIII(heterozygot)-defizienten Mäusen. Ziel: homozygote ApoCIIIko Mäuse mit ApoAV-Transgen.

### 3.2 Lipoproteinprofile

Zur Untersuchung der Interaktion von ApoCIII und ApoAV und deren Einfluss auf den TG- und den Cholesterinhaushalt wurden Lipoproteinprofile von Mäusen verschiedener Genotypen erstellt. Untersucht wurden heterozygote und homozygote CIIIko Mäuse mit und ohne das ApoAV-Transgen der Linie ApoCIIIko/AVtg. Plasmaproben wurden durch Zentrifugation in VLDL, LDL und HDL aufgetrennt und auf ihren Triglyzerid- und Cholesteringehalt untersucht.

Hierbei zeigte sich bei männlichen Tieren, die heterozygot ApoCIIIko waren und kein ApoAV-Transgen trugen, im Vergleich zu entsprechenden Tieren mit ApoAV-Transgen ein signifikant höherer Triglyzeridspiegel. Insbesondere zeigte sich dies in der VLDL-Fraktion. Auch in der LDL-Fraktion wurde ein signifikanter Effekt sichtbar, wobei sich dieser im Gesamtcholesterinspiegel jedoch nicht wiederfand.

Im Vergleich der homozygoten ApoCIIIko Männchen zu solchen, die zusätzlich das ApoAV-Gen besaßen, wurde ein signifikant höherer Cholesterinspiegel im Cholesterin der HDL-Fraktion, sowie im Gesamtcholesterinspiegel deutlich. TG, VLDL etc. waren nicht durch ApoAV beeinflusst.

Bei den Weibchen die das ApoCIII-Gen heterozygot trugen, im Vergleich zu entsprechenden Tieren mit ApoAV-Transgen, zeigte sich ein signifikant höherer Gesamttriglyzeridspiegel und ein signifikant höherer Triglyzeridspiegel der VLDL-Fraktion. Ein deutlich niedrigerer Spiegel fand sich jedoch bei den Tieren ohne Transgen in der HDL-Fraktion für Triglyzeride und in der LDL-Fraktion für Cholesterin. Im Gegensatz hierzu zeigten die Lipoproteinprofile der homozygoten ApoCIIIko Weibchen ausschließlich einen signifikant höheren Triglyzeridspiegel in der LDL-Fraktion.

Vergleicht man nun ApoCIII heterozygot defiziente Männchen, die das ApoAV-Transgen tragen, mit solchen die ebenfalls das ApoAV-Transgen tragen, jedoch homozygot defizient für ApoCIII sind, so zeigt sich ein deutlicher Effekt auf den Cholesterinhaushalt.

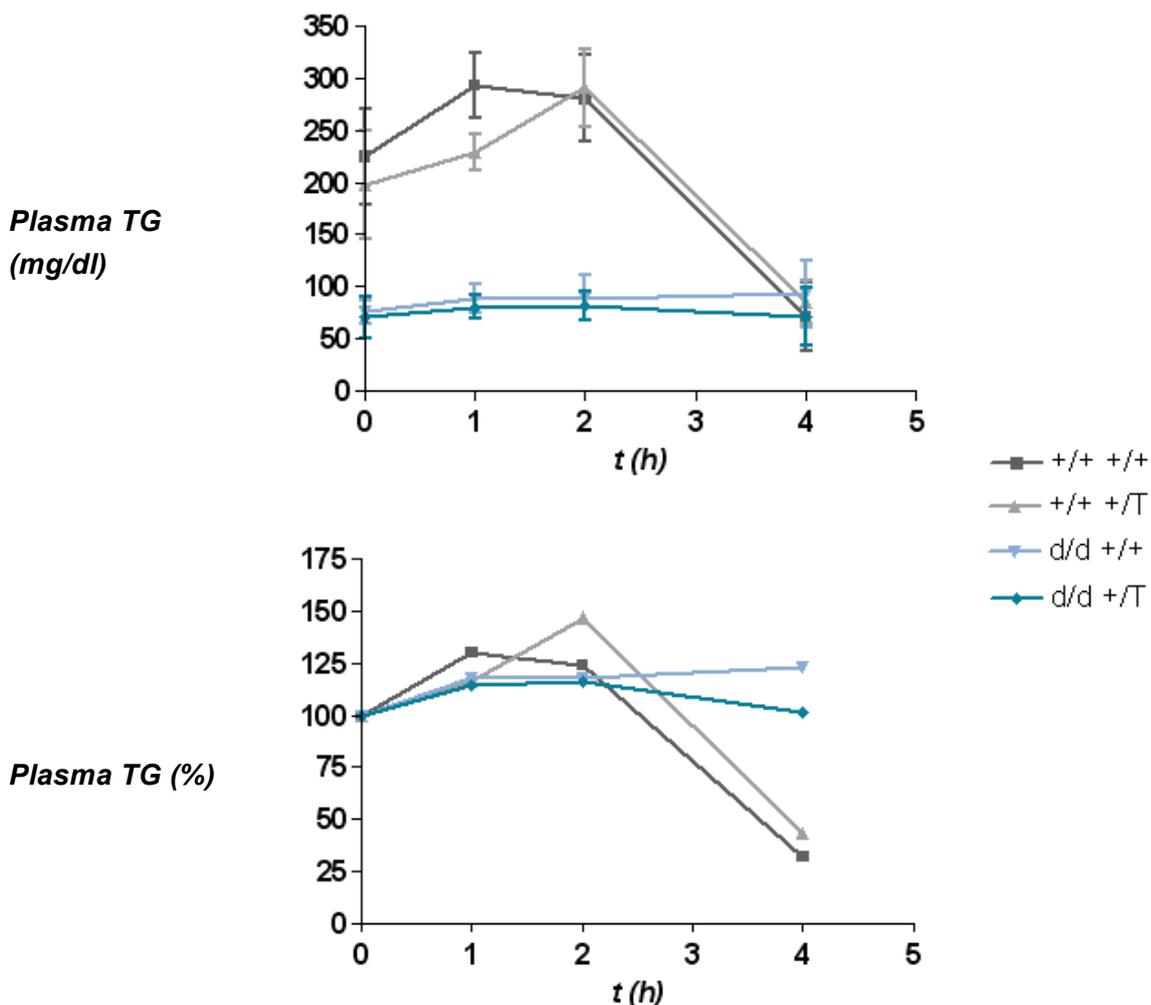
Sowohl im Gesamtcholesterinspiegel als auch in den Fraktionen der VLDL, LDL und HDL zeigen sich deutlich niedrigere Cholesterinspiegel bei homozygot ApoCIII defizienten Tieren. Bei homo- und heterozygot ApoCIII-defizienten Tieren im Vergleich, zeigte sich auch in Abwesenheit von ApoAV ein ApoCIII-Effekt durch signifikant erhöhte Cholesterin- (LDL-Fraktion) und TG-Spiegel (VLDL-Fraktion) bei den heterozygot ApoCIII-defizienten Tieren.

	<i>n</i>	<i>TG</i>	<i>Chol.</i>	<i>VLDL-TG</i>	<i>VLDL-Chol.</i>	<i>LDL-TG</i>	<i>LDL-Chol.</i>	<i>HDL-TG</i>	<i>HDL-Chol.</i>
<i>Männchen</i>									
<i>ApoC3+/-</i>	<b>8</b>	72±8.3	131±14	60±18	17±6.3	15±4.3	34±11	31±8.3	82±15
<i>ApoC3+/- ApoA5tr</i>	<b>10</b>	55±12	116±21	38±4.8	16±6.8	17±7.2	24±7.9	30±3.5	83±11
<i>P</i>		<0.01	<i>ns</i>	<0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<i>ApoC3-/-</i>	<b>10</b>	56±18	109±27	39±20	14±4.8	16±2	21±9	29±8.1	84±20
<i>ApoC3-/- ApoA5tr</i>	<b>8</b>	58±51	80±11	41±9.1	9.5±4.9	17±3.3	16±5	28±3.3	50±10
<i>P</i>		<i>ns</i>	<0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<0.01
<i>Weibchen</i>									
<i>ApoC3+/-</i>	<b>9</b>	63±6.0	85±16	34±5.6	3.1±2.5	16±2.7	18±4.8	8.6±2.1	42±12
<i>ApoC3+/- ApoA5tr</i>	<b>10</b>	53±8.8	94±24	28±5.8	5.2±3.9	14±2.1	23±3.7	12±2.2	42±8.8
<i>P</i>		<0.01	<i>ns</i>	<0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<0.05	<0.01	<i>ns</i>
<i>ApoC3-/-</i>	<b>10</b>	48±8.8	91±32	20±9.2	2.5±2.9	15±1.4	19±9.0	9.6±3.1	44±18
<i>ApoC3-/- ApoA5tr</i>	<b>10</b>	43±10	88±21	18±5.2	3.4±3.2	12±2.7	21±4.1	9.7±2.9	41±12
<i>P</i>		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

**Tab. 10: Lipoproteinprofile** der Mausgenotypen *ApoCIII +/-* (heterozygot *ApoCIII* defizient), *ApoCIII -/-* (homozygot *ApoCIII* defizient) mit und ohne transgene Expression von *ApoAV*. Das Plasma wurde mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt. Die Tabelle zeigt jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der Student t-Test (*P*) verwendet.

### 3.3 Gavage - Produktionsstudie

Um den Einfluss von ApoCIII und ApoAV auf die Triglyzeridkonzentration im Blutplasma nach oraler Fettbelastung zu untersuchen, wurde homozygoten ApoCIIIko (d/d) und ApoCIII-Wildtypieren (+/+), jeweils mit (+/T) und ohne ApoAV-Transgen (+/+) oral Olivenöl appliziert. Nach oraler Applikation (0, 60, 120, 180 und 240 Minuten) wurde Blut aus dem retroorbitalen Plexus entnommen. Nach Zentrifugation wurde der Lipidanteil aus dem gewonnenen Plasma extrahiert und im Anschluss der Triglyzerid-Gehalt der Proben bestimmt.



**Abb. 5: Plasmatriglyzeridkonzentration** im stündlichen Intervall nach oraler Fettbelastung in mg/dl und prozentual vom Ausgangswert. Besonders deutlich wird der ausgebliebene ApoCIII-Effekt im prozentual geringeren Anstieg der Plasmatriglyzeridkonzentration bei homozygot ApoCIII-defizienten Tieren. (Daten als Mittelwert +/- SD; \* p<0,05)

Bereits zum Applikationszeitpunkt unterschieden sich die ApoCIIIwt-Tiere mit hohen TG-Konzentrationen von 197,8mg/dl bis 225,5mg/dl deutlich von den ApoCIII-defizienten Tieren mit Ausgangswerten von 70,3mg/dl bis 75,6mg/dl. Auch im Verlauf wurde erkennbar, dass es bei den ApoCIIIwt-Tieren im Vergleich zu den ApoCIII-defizienten Tieren zu einem prozentual deutlich stärkeren Anstieg der TG-Konzentration kommt.

Besonders deutlich wurde ein ApoAV-Effekt im Vergleich von Wildtyp-Tieren mit Transgenen Tieren. Während sich bei Wildtyp-Tieren 1h nach oraler Fettbelastung ein um 30,3% gesteigerter TG-Spiegel zeigt, wurde bei Tieren mit ApoAV-Transgen nur eine Steigerung von 16,2% deutlich. Dies entspricht einer um 53,5% signifikant schwächeren Steigerung des Triglyzeridspiegels bei ApoAV-transgenen Mäusen.

Bei homozygot ApoCIII-defizienten Tieren hatten die für ApoAV transgenen Tiere nach 4h bereits wieder ihren Ausgangswert erreicht, wobei der TG-Spiegel der Tiere ohne ApoAV bei weiterhin steigender Tendenz um 23% erhöht war.

Hieraus ergibt sich für ApoAV ein zumindest teilweise von der ApoCIII-Anwesenheit unabhängiger Wirkmechanismus.

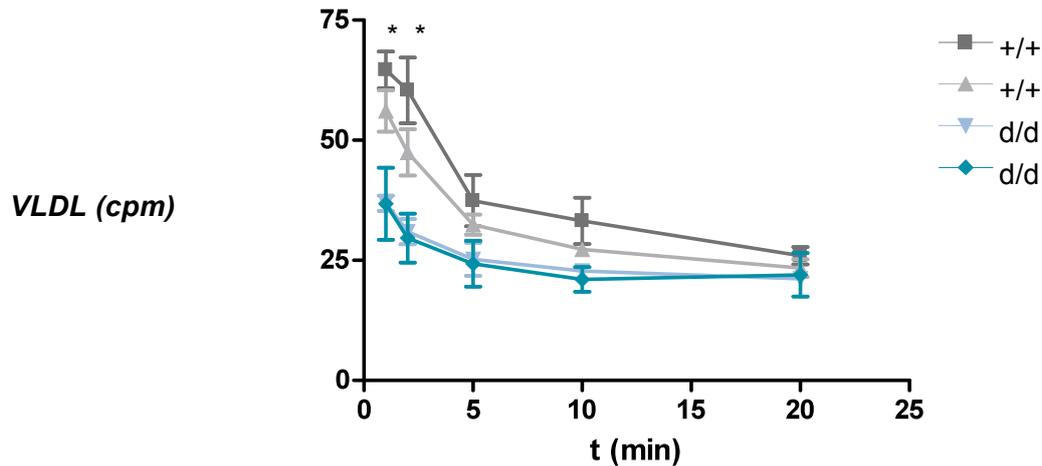
### 3.4 Turnover - Abbaustudie

Zur Untersuchung der Geschwindigkeit des VLDL-Abbaus erfolgte in vivo eine Markierung des Triglyzeridanteils indem 500 $\mu$ Ci an Albumin gebundene [1-<sup>3</sup>H] Palmitinsäure in Apo-AV defiziente Mäusen injiziert, nach 60 Minuten Blut entnommen und die VLDL-Fraktion isoliert wurde.

Nach Injektion der markierten VLDL in Wt- und ApoCIIIko-Tiere mit und ohne ApoAV-Transgen wurden im Verlauf mehrfach Blutentnahmen und Radioaktivitätsmessungen durchgeführt.

Zur Untersuchung der Organverteilung wurden den narkotisierten Mäusen im Anschluss Proben aus Leber, Muskel und Fettgewebe entnommen und auf ihre Radioaktivität untersucht.

#### 3.4.1 Abbau im Plasma



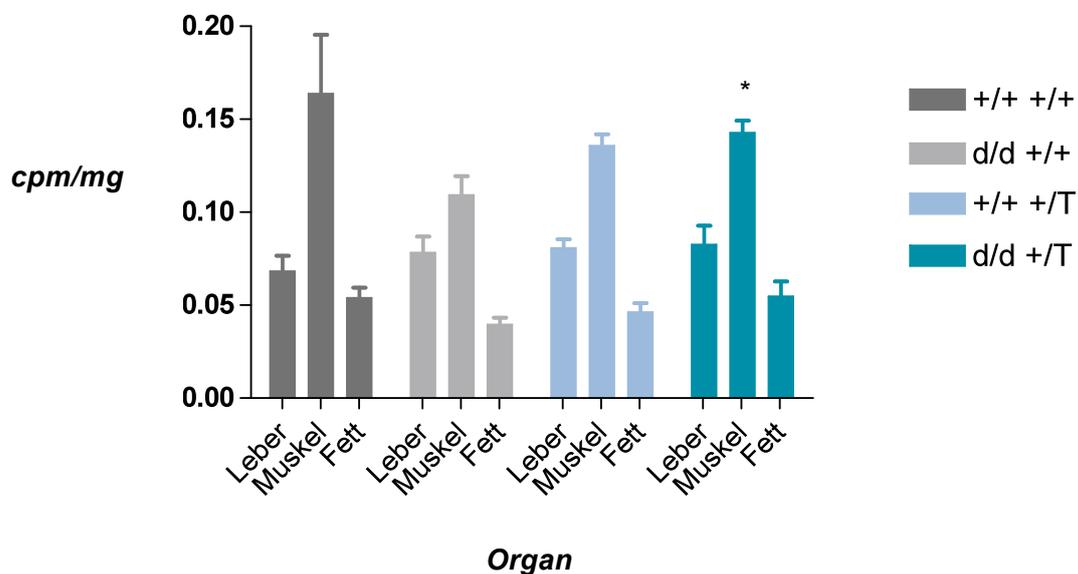
**Abb. 6: Radioaktivität im Plasma:** Nach Injektion von radioaktiv markierten VLDL zeigte sich ein deutlich schnellerer Abbau bei den CIIIko(d/d)-Tieren im Vergleich zu CIIIWt(+/-)-Tieren, welcher insbesondere frühzeitig im Intervall der ersten Minuten erkennbar wird. Ein signifikanter ApoAV(+/-)-Effekt wird hier insbesondere bei den CIIIWt-Tieren deutlich. (Daten als Mittelwert +/- SD; \*  $p < 0,05$ )

Bei den ApoCIIIWt-Tieren zeigten sich höhere Ausgangswerte, wobei der AV-Effekt durch insgesamt niedrigere Werte deutlich wurde.

Bei ApoCIIIko-Mäusen zeigten sich im Vergleich zu ApoCIIIWt-Tieren deutlich niedrigere Werte mit beschleunigtem Abbau der injizierten VLDL, wobei die An- bzw. Abwesenheit des ApoAV-Transgens hier keine Rolle spielte. Auch im alleinigen Bezug auf die ApoCIIIko-Tiere konnte kein eindeutiger Effekt des ApoAV-Transgens auf den VLDL-Abbau nachgewiesen werden, was möglicherweise durch die primär bereits deutlich niedrigeren Ausgangsspiegel zu begründen wäre.

Der im Sinne einer Beschleunigung erwartete ApoAV-Effekt, bestätigte sich bei den Wildtyp-Tieren durch einen signifikant rascheren Abbau der VLDL.

### 3.4.2 Abbau durch Organaufnahme



**Abb. 7: Verteilung der Radioaktivität auf Leber, Muskel und Fett bei Mäusen verschiedener Genotypen der CIIIko/AVtg-Linie nach Injektion radioaktiv markierten Glycerols in die Schwanzvene. Erkennbar wird bei ApoCIII-defizienten(d/d) Tieren eine signifikant gesteigerte Aufnahme in das Muskelgewebe wenn sie das ApoAV-Transgen(+/T) tragen. (Daten als Mittelwert +/- SD; \*  $p < 0,05$ )**

Deutlich wird eine Grundverteilung mit einem Hauptanteil im Muskel, gefolgt von einem mittleren Anteil in der Leber und dem kleinsten Anteil im Fettgewebe, welche bei allen Genotypen entsprechend zu finden ist.

Bei ApoCIIIko-Tieren zeigte sich im Vergleich zu Wt-Tieren der Muskelanteil um 34% und der Fettanteil um 28% deutlich erniedrigt, wobei die ApoCIIIko-Tiere im Vergleich zu Wt-Tieren einen um 15% höheren Leberanteil vorweisen. Insgesamt spricht dies jedoch für eine verzögerte Hydrolyse der VLDL-Partikel bei den ApoCIIIko-Mäusen.

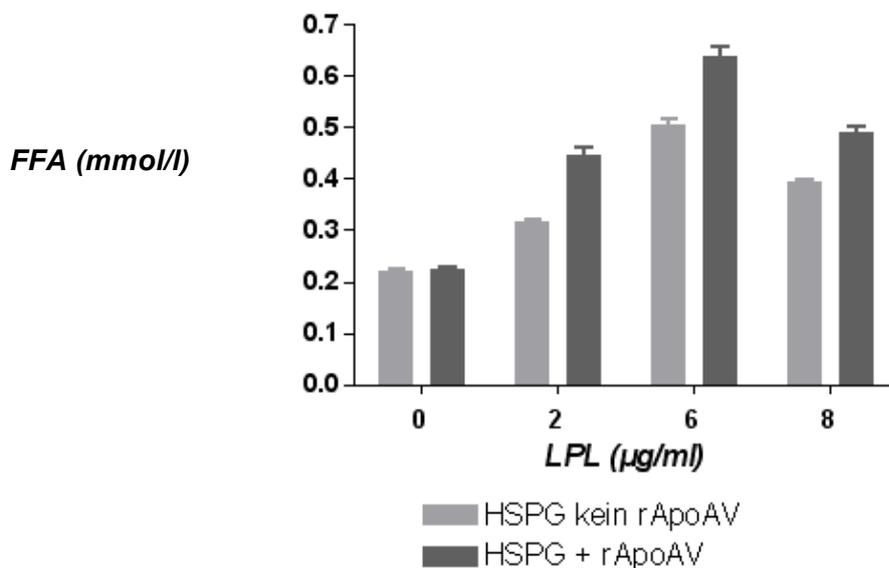
Vergleicht man nun ApoCIIIko-Mäuse mit solchen, die zusätzlich das ApoAV-Transgen tragen, so zeigt sich auch in Abwesenheit von ApoCIII ein deutlicher ApoAV-Effekt mit gesteigerter Hydrolyse. Am deutlichsten wird dies durch die signifikant erhöhte Muskelaufnahme, welche möglicherweise auf der hier einerseits ungehemmten und andererseits noch durch ApoAV beschleunigten Hydrolyse beruht.

### 3.5 HSPG - Assay

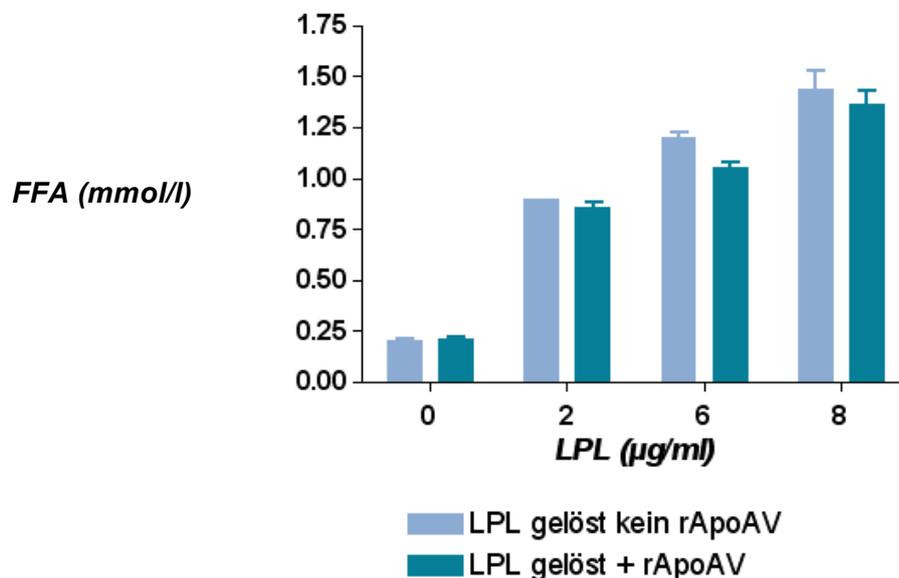
Für die Testreihe vor den geplanten Experimenten wurden ApoAVko-Tiere verwendet, um den bereits etablierten Assay zu erlernen. Durch Retrobulbärpunktion wurde Blut gewonnen, nach Genotypen entsprechend gepoolt und anschließend aus dem Plasma durch sequenzielle Ultrazentrifugation die VLDL-Fraktion isoliert. Unter Verwendung von LPL in Konzentrationen von 0, 2, 6 und 8 µg/ml wurde die Hydrolyse der VLDL-Partikel, wie im HSPG-Assay beschrieben, mit gebundener und gelöster Lipoproteinlipase untersucht.

Auch in den folgenden Experimenten mit ApoCIIIko-Mäusen und den ApoAVko-Tieren mit und ohne ApoAV- bzw. ApoCIII-Substitution wurde entsprechend verfahren. Auch hier wurde parallel immer die Hydrolyse mit gelöster LPL durchgeführt.

#### 3.5.1 ApoAVko VLDL mit und ohne rApoAV (Test)



**Abb. 8:** LPL-Hydrolyse mit an HSPG gebundener Lipoproteinlipase *in vitro* unter Verwendung von VLDL-Partikeln ApoAV-defizienter Mäuse mit und ohne Substitution von rekombinantem ApoAV. Entsprechend den Erwartungen zeigt sich unter Verwendung proteoglykangebundener LPL ein signifikanter ApoAV-Effekt. (Daten als Mittelwert +/- SD; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )



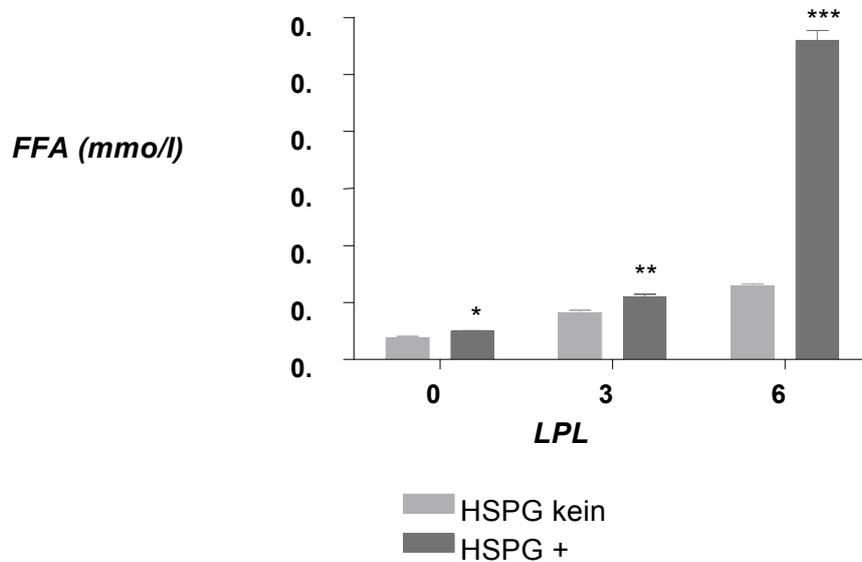
**Abb. 9: LPL-Hydrolyse mit gelöster Lipoproteinlipase in vitro unter Verwendung von VLDL-Partikeln ApoAV-defizienter Mäuse mit und ohne Substitution von rekombinantem ApoAV.** ApoAV bewirkt ohne Anwesenheit proteoglykangebundener LPL keine Beschleunigung der Hydrolyse. (Daten als Mittelwert +/- SD; \*  $p < 0,05$ )

Durch Verwendung von Lipoproteinpartikeln ApoAV-defizienter Mäuse konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten VLDL-Partikel entweder *kein* ApoAV oder nach Substitution das rekombinante ApoAV *im Überschuss* enthielten.

In Gegenwart von ApoAV zeigte sich eine signifikant effizientere Hydrolyse durch proteoglykangebundene LPL, wobei unter Verwendung gelöster LPL kein signifikanter Unterschied in der Hydrolyserate zu verzeichnen war.

Auf diese Weise konnten die Ergebnisse des bereits durchgeführten etablierten Assays bestätigt werden, so dass nun erweiternd auch VLDL-Partikel ApoAV- und ApoCIII-defizienter Mäuse unter Substitution von ApoCIII und/oder ApoAV untersucht werden konnten.

### 3.5.2 ApoCIIIko VLDL mit und ohne rApoAV



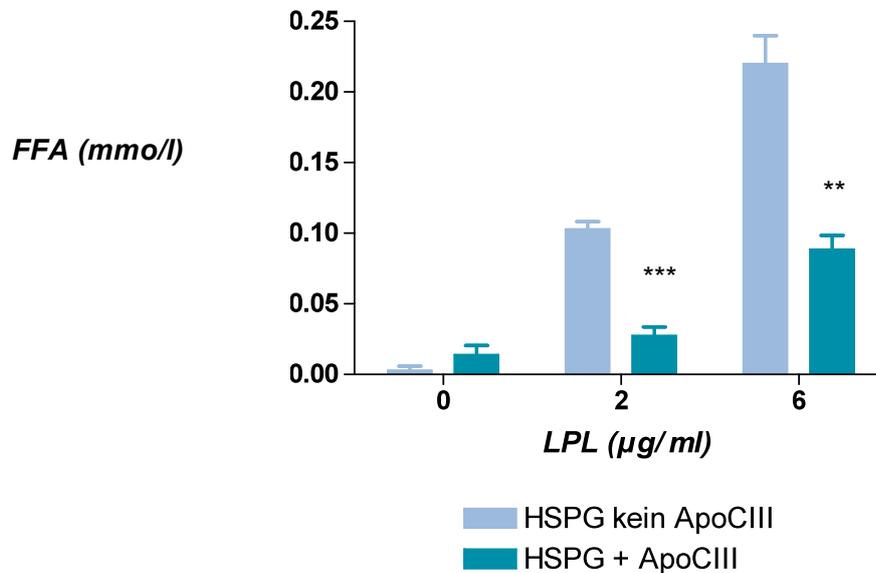
**Abb. 10: LPL-Hydrolyse mit an HSPG gebundener Lipoproteinlipase in vitro unter Verwendung von VLDL-Partikeln ApoCIII-defizienter Mäuse mit und ohne Substitution von rekombinantem ApoAV.** Auch in Abwesenheit von ApoCIII bewirkt ApoAV in Verbindung mit proteoglykangebundener LPL eine signifikant verstärkte Hydrolyse.

(Daten als Mittelwert +/- SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Auch ohne das Vorliegen von ApoCIII wird der Einfluss von ApoAV deutlich. Besonders bei einer LPL-Konzentration von 6 μg/ml zeigte sich in Gegenwart von ApoAV mit einer Steigerung um 337% die signifikant effizientere Hydrolyse.

Deutlich wird, dass der Wirkmechanismus von ApoAV in vitro nicht von einer ApoCIII-Anwesenheit abhängig ist.

### 3.5.3 ApoAVko VLDL mit und ohne ApoCIII

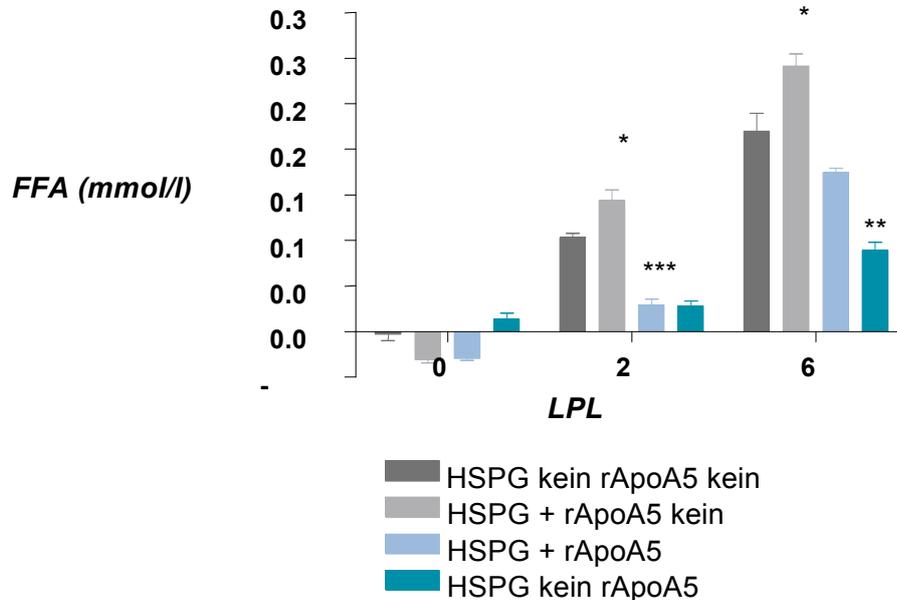


**Abb. 11: LPL-Hydrolyse mit an HSPG gebundener Lipoproteinlipase in vitro unter Verwendung von VLDL-Partikeln ApoAV-defizienter Mäuse mit und ohne Substitution von ApoCIII. Auch in Abwesenheit von ApoAV bewirkt ApoCIII in Verbindung mit proteoglykangebundener LPL eine signifikante Reduktion der Hydrolyse. (Daten als Mittelwert +/- SD; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )**

Auch ohne das Vorliegen von ApoAV wird der Einfluss von ApoCIII deutlich. Insbesondere bei einer LPL-Konzentration von 6 µg/ml zeigte sich die signifikante Verminderung der Hydrolyse um 59,9% in Gegenwart von ApoCIII.

Deutlich erkennbar ist somit ein in vitro von der ApoAV-Anwesenheit unabhängiger ApoCIII-Wirkmechanismus.

### 3.5.4 ApoAVko VLDL mit und ohne ApoAV- bzw. ApoCIII -Substitution



**Abb.12: LPL-Hydrolyse mit an HSPG gebundener Lipoproteinlipase in vitro unter Verwendung von VLDL-Partikeln ApoAV-defizienter Mäuse mit und ohne Substitution von rekombinatem ApoAV und ApoCIII.** Führt man isoliert ApoAV zu, kommt es zum signifikanten Anstieg der Hydrolyse. Fügt man isoliert ApoCIII zu, zeigt sich eine signifikant verminderte Hydrolyse. Auch bei Substitution von ApoAV und Apo CIII erfolgt eine leichte Hydrolyseminderung, da das verwendete Substrat von ApoAV defizienten Tieren stammt und somit bereits ApoCIII enthält.  
(Daten als Mittelwert +/- SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Um den Wirkmechanismus von ApoAV und ApoCIII in Bezug auf Ihre Abhängigkeit voneinander weiter zu klären, wurde VLDL von ApoAVko-Tieren verwandt und jeweils ohne Zusatz und nach Substitution von ApoAV und/oder ApoCIII untersucht.

Nach Substitution von ApoAV zeigte sich hier die Hydrolyse der VLDL-Partikel entsprechend des Testassays um 32% signifikant gesteigert, wobei in der Gegenwart von ApoCIII ohne ApoAV eine signifikante Verminderung der Hydrolyse um 59% deutlich wurde. Auch die Gegenwart beider Apolipoproteine bewirkte eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Verminderung, die mit 23% deutlich schwächer ausgeprägt war als in alleiniger Anwesenheit von ApoCIII. Auch in diesem Versuchsaufbau konnte bei ApoCIII und ApoAV ein voneinander unabhängiger Wirkmechanismus nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion der Apolipoproteine CIII und AV näher zu untersuchen.

Apolipoproteine sind Polypeptide, die auf Lipoproteinpartikeln im Plasma gefunden wurden und eine wichtige Rolle im Lipidtransport und Metabolismus spielen. Unterschiede in Struktur und Vorkommen dieser Moleküle ergaben starke Auswirkungen auf Lipidkonzentrationen im Plasma und die Suszeptibilität von Artherosclerose sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen. Neben ApoAV hat auch das benachbarte ApoCIII einen bemerkenswerten Einfluss auf die Plasmatriglyzeridkonzentration bei Menschen und Mäusen.

In vorangegangenen Studien zeigten sich wiederholt vergleichbare Spiegel der Plasmaproteine von transgenen Mäusen und im menschlichem Plasma. Somit kann angenommen werden, dass sich entsprechende Mausmodelle eignen, um Untersuchungen der menschlichen Apolipoproteine im Plasma unter möglichst physiologischen Bedingungen abzubilden (*Baroukh, Bauge et al 2004*).

In vorangegangenen Forschungsprojekten waren bereits Mauslinien etabliert worden, die ApoAV-defizient waren oder zusätzlich humanes ApoAV als Transgen trugen. Tiere mit homozygoter ApoAV-Defizienz zeigten einen erhöhten Plasma-Triglyzeridspiegel auf über 400%, wobei Tiere, die zusätzlich humanes ApoAV exprimierten, einen um zwei Drittel niedrigeren Plasma-TG-Spiegel besaßen als Wildtypiere (*Pennacchio, Olivier et al. 2001*). Aufgrund eines beschleunigten Abbaus von VLDL und Chylomikronen kam es bei transgenen Mäusen zu einem postprandial wesentlich schwächeren TG-Anstieg. In der intestinalen Triglyzeridabsorption und den VLDL-Produktionsraten zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mauslinien. Neben der ApoAV-Wirkung konnte ein zusätzlicher Einfluss anderer Faktoren auf die Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden (*Schaap, Rensen et al. 2004; Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004; Merkel, Loeffler et al. 2005*).

Besonders dem als LPL-Inhibitor bekannten Apolipoprotein CIII aus dem gleichen Gencluster fällt eine besondere Bedeutung zu. Bei ApoAV-defizienten Mäusen zeigte sich ein um 90% erhöhter ApoCIII-Spiegel, wobei sich dieser bei transgenen ApoAV-Mäusen um 40% vermindert darstellte (*Pennacchio, Olivier et al. 2001*). Untersuchungen an ApoAV und ApoCIII doppelt transgenen Tieren zeigten einen niedrigeren ApoCIII-Plasmaspiegel im Vergleich zu einfach ApoCIII-transgenen Tieren, was eine auf mRNA-Ebene identische Expression vermuten ließ (*Quelle Barouk*).

Um isoliert die ApoAV-Wirkung zu untersuchen, wurden ApoAV-defiziente VLDL-Partikel in vitro mit rekombinatem ApoAV angereichert und ApoAV-defizienten Mäusen injiziert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Steigerung des VLDL-Katabolismus durch ApoAV.

Durch eine zusätzliche Inhibition der LPL konnte die Abhängigkeit des ApoAV-Effektes von der Lipoproteinlipase nachgewiesen werden.

In vivo wurde in weiteren Untersuchungen mit LPL-defizienten Mäusen gearbeitet, die teilweise ApoAV als Transgen exprimierten.

Homozygot LPL-defiziente Tiere waren auch mit ApoAV-Transgen postpartal nur kurzzeitig überlebensfähig, wobei sich sowohl bei Wildtyp- als auch bei heterozygot LPL-defizienten Tieren ein durch ApoAV deutlich verminderter Triglyzeridspiegel zeigte (*Merkel, Loeffler et al. 2005*).

Nachdem zunächst eine Abhängigkeit des ApoAV-Effektes von der Lipoproteinlipase nachgewiesen wurde, galt es nun die Interaktion der zwei antagonistischen Mediatoren der Hydrolyse, ApoCIII und ApoAV näher zu untersuchen.

### *Lipoproteinprofile*

Um die molekularen Mechanismen von ApoCIII und ApoAV bezüglich Ihrer Interaktion bei der Regulierung des Triglyzeridhaushaltes näher zu untersuchen, wurden Lipoproteinprofile von hetero- oder homozygot ApoCIII-defizienten Mäusen mit und ohne ApoAV-Transgen erstellt. Durch Ultrazentrifugation wurden die Plasmaproben in VLDL, LDL und HDL aufgetrennt und auf ihren Triglyzerid- und Cholesteringehalt untersucht.

Wie erwartet zeigten sich bei homozygot ApoCIII defizienten Tieren deutlich niedrigere Triglyzerid- und Cholestrinspiegel als bei nur heterozygoten ApoCIIIko Tieren und ein signifikanter ApoAV-Effekt insbesondere auf den Triglyzeridspiegel und dessen VLDL-Fraktion bei den heterozygoten ApoCIIIko Tieren. Ein entsprechender ApoAV-Effekt bei homozygot ApoCIII defizienten Tieren konnte nicht nachgewiesen werden, wobei sich jedoch bei den männlichen Tieren eine gewisse Auswirkung auf die HDL-Fraktion des Triglyzeridspiegels zeigte, die bisher noch ungeklärt ist.

Bei den weiblichen Tieren zeigte sich auf den Triglyzeridspiegel und die VLDL-Fraktion ein entsprechender Effekt. Bei gleichem Genotyp weisen sie niedrigere Triglyzerid- und Cholesterinspiegel auf als männliche Tiere. Auch hier ist die Genese des HDL-Effektes, der sich bei den Weibchen mit einer Erhöhung der Triglyzeride in der HDL-Fraktion in Anwesenheit von ApoAV zeigt unklar.

Aus den oben genannten Ergebnissen lässt sich in vivo zunächst eine Abhängigkeit der ApoAV-Funktion von einer ApoCIII-Anwesenheit vermuten. Als mögliche Ursache müssen hier aber auch die von vornherein sehr niedrigen Triglyzeridspiegel der homozygoten ApoCIIIko-Tiere in Betracht gezogen werden, bei denen eine weitere Senkung durch ApoAV eventuell nicht möglich ist.

Bei männlichen Tieren bewirkte die Abwesenheit von ApoCIII eine Senkung des Cholesterinspiegel und insbesondere dessen HDL-Fraktion. Da sich hier jedoch weiterhin vergleichsweise hohe Werte zeigten, dient die Beobachtung eines signifikant erniedrigten

Cholesterinspiegels und dessen HDL-Fraktion ausschließlich bei homozygot ApoCIII defizienten Tieren mit ApoAV-Transgen ebenfalls als Stütze der oben genannten These.

Bereits bekannt war die Affinität von ApoAV bezüglich der triglyzeridreichen VLDL und HDL (O'Brien et al. 2005).

Zusätzlich wird jetzt deutlich, dass zumindest die Ausprägung des ApoAV-Effektes teilweise von einer ApoCIII-Anwesenheit abhängig ist.

#### *Gavage - Produktionsstudie*

Zur Untersuchung von Produktion und Abbau der Triglyzeride unter Einfluss von ApoAV und ApoCIII wurde zusätzlich die Verstoffwechselung von Triglyzeriden in vivo bei homozygoten ApoCIIIko und ApoCIII-Wildtyp-Tieren, jeweils mit und ohne ApoAV-Transgen untersucht.

Zur Produktionsanalyse wurden postprandiale Plasmaproben der verschiedenen Genotypen auf ihren Triglyzeridgehalt untersucht.

Entsprechend vorliegender Studien zeigte sich bei Tieren mit Wildtyp-Hintergrund mit normalem ApoCIII-Status bei transgener Expression des Apolipoproteins AV ein signifikant verminderter postprandialer Anstieg der plasmatischen Triglyzeridkonzentration. Erweiternd konnte festgestellt werden, dass dieser ApoAV-Effekt, wenn auch in weit geringerem Ausmaß, auch bei ApoCIII-defizienten Tieren deutlich wurde. Während er bei den Tieren mit Wildtyp-Hintergrund postprandial frühzeitig durch geminderten Triglyzeridanstieg erkennbar war, zeigte sich bei den ApoCIII defizienten Tieren ein klarer wenn auch nicht signifikanter ApoAV-Einfluss erst nach einem Zeitintervall von 3-4 Stunden.

Ursächlich käme hierfür bei den ApoCIII defizienten Tieren ein schon allein durch die Abwesenheit von ApoCIII überaus schneller Abbau der Triglyzeride in Frage, so dass kein ApoAV-Effekt mehr nachweisbar wäre. Um den verzögerten ApoAV-Effekt zu erklären ist auch eine bei ApoCIII-defizienten Tieren langsamere Chylomikronenproduktion denkbar, wodurch sich ein für ApoAV und ApoCIII unabhängiger Wirkmechanismus ergäbe.

Eine Beeinflussung des Abbaus von Chylomikronen wurde bereits in vorangegangenen Studien deutlich. Postprandial zeigte sich bei homozygoten ApoCIIIko-Mäusen ein wesentlich schnellerer Abbau von Chylomikronen (*Maeda, Li et al, 1994*), wobei dieser Effekt ebenfalls bei gleichzeitig ApoCIII und ApoE defizienten Mäusen deutlich wurde, was den positiven Effekt einer ApoCIII-Defizienz auf den Chylomikronenabbau als unabhängigen Mechanismus von ApoE zeigte (*Jong, Rensen et al. 2001*).

#### *Turnover - Abbaustudie*

Durch vorangegangene Untersuchungen war bekannt, dass ApoAV-defiziente Mäuse einen um 90% erhöhten und ApoAV-transgene Tiere einen um 40% verminderten ApoCIII-Plasmaspiegel aufweisen (Pennacchio et al. 2001). Um nun die Interaktion und die jeweils isolierte Wirkung der Apolipoproteine AV und CIII zu untersuchen, wurden Wildtyp- und ApoCIII-defiziente Mäuse mit und ohne transgene ApoAV-Expression verwendet.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit des VLDL-Abbaus wurden nach Injektion radioaktiv markierter Triglyzeride Blut- und Organentnahmen bei den Tieren durchgeführt und auf ihre radioaktive Restaktivität untersucht.

Neben dem erwarteten ApoAV-Effekt im Sinne eines beschleunigten VLDL-Abbaus in Gegenwart des ApoAV-Transgens bei ApoCIII-Wildtyp-Tieren zeigte sich bei ApoCIIIko-Mäusen kein ApoAV-Einfluss auf die plasmatische Elimination der injizierten VLDL.

Hieraus ließe sich schließen, dass entweder die Anwesenheit von ApoCIII für eine ApoAV-Wirkung notwendig wäre oder ein ApoAV-Effekt bei ApoCIIIko-Tieren so rasch abläuft, dass ein Nachweis mit der oben beschriebenen Methode nicht möglich ist.

Bei der Messung der Organaufnahmen zeigte sich eine gesteigerte Hydrolyse am deutlichsten bei ApoCIII-defizienten Tieren mit ApoAV-Transgen in Form signifikant erhöhter Anteile in Fettgewebe und Muskulatur. Primär wurde so bei ApoAV und ApoCIII ein Einfluss auf die Aufnahme von VLDL in Muskulatur und Fettgewebe deutlich.

Diese Daten lassen vermuten, dass ApoAV eine Beschleunigung und ApoCIII eine Verzögerung der plasmatischen Hydrolyse verursacht, wobei diese Wirkungen auf einer erhöhten bzw. verminderten Aufnahme der VLDL-Triglyzeride in bestimmte Organe beruhen.

In weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte einerseits belegt werden, dass die intestinale Triglyzeridabsorption, die Chylomikronenproduktion und die hepatische VLDL-Produktion nicht durch ApoAV beeinflusst werden (*Merkel et al. 2005*), der molekulare Mechanismus der durch ApoAV beschleunigten plasmatischen Hydrolyse jedoch auf einer Interaktion mit proteoglykangebundener Lipoproteinlipase beruht.

#### *HSPG - Assay*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es unter anderem, den Einfluss von ApoAV und ApoCIII unter möglichst physiologischen Bedingungen auf die LPL-vermittelte Triglyzeridhydrolyse zu untersuchen und so neue Erkenntnisse bezüglich des Wirkmechanismus und der Interaktion zu gewinnen.

Der Effekt auf den TG-Katabolismus wurde zu diesem Zweck im Lipolyseassay *in vitro* unter Verwendung proteoglykangebundener Lipoproteinlipase untersucht, was der natürlichen Situation der Triglyzeridhydrolyse am Gefäßendothel nachempfunden war. In einem *in vitro* Lipolyseassay konnte bereits der Einfluss von ApoAV auf den Triglyzeridkatabolismus unter physiologischen Bedingungen durch proteoglykangebundene LPL untersucht werden.

Auf Grundlage eines beschriebenen HSPG-LPL-Assays (*de Man, de Beer et al. 1997*) war durch unsere Arbeitsgruppe bereits ein entsprechender HSPG-Lipolyseassay etabliert worden. Hierbei zeigte sich bei mittleren LPL-Konzentrationen im proteoglykangebundenen LPL-Ansatz eine signifikant beschleunigte Hydrolyserate in Anwesenheit von rekombinantem

ApoAV während im konventionellen LPL-Assay mit gelöster LPL kein signifikanter Unterschied nachweisbar war (*Kluger*).

Um den Wirkmechanismus von ApoAV und ApoCIII in Bezug auf Ihre Abhängigkeit voneinander weiter zu klären, wurde zunächst die Hydrolyse mit VLDL ApoCIII-defizienter Mäuse ohne Zusatz und nach Substitution von rekombinatem ApoAV untersucht.

Insbesondere bei einer LPL-Konzentration von 6µg/ml zeigte sich eine signifikant effizientere Hydrolyse in Gegenwart von ApoAV mit einer um 337% gesteigerten Hydrolyse.

Allerdings zeigte sich bei Verwendung von ApoCIIIko-VLDL kein so ausgeprägter ApoAV-Effekt wie im Rahmen der Testreihe mit ApoAVko-VLDL. Dies ist vermutlich auf den bereits aufgrund der ApoCIII-Defizienz sehr niedrigen TG-Gehalt zurückzuführen, der auch eine Verwendung von einheitlich 1 mM-VLDL im Versuchsablauf nicht zuließ.

Bei Verwendung von VLDL ApoAV-defizienter Tiere zeigte sich nach ApoCIII-Substitution in Verbindung mit proteanglykangebundener LPL ein ApoCIII-Effekt im Sinne einer deutlich reduzierten Hydrolyse.

Im Anschluss wurde erneut VLDL von ApoAVko-Tieren verwandt und jeweils ohne Zusatz und nach Substitution von ApoAV und/oder ApoCIII untersucht.

Besonders deutlich wurde die Wirkung der Apolipoproteine auch hier bei einer LPL-Konzentration von 6µg/ml. Nach Substitution von ApoAV zeigte sich hier die Hydrolyse der VLDL-Partikel entsprechend des Testassays um 32% signifikant gesteigert.

In Gegenwart von ApoCIII ohne ApoAV wurde eine signifikante Verminderung der Hydrolyse um 59% deutlich. Auch die Gegenwart beider Apolipoproteine bewirkte eine Reduzierung, die jedoch mit 23% deutlich schwächer ausgeprägt war als in alleiniger Anwesenheit von ApoCIII.

Auch in diesem Versuchsaufbau konnte so bei ApoCIII und ApoAV ein voneinander unabhängiger Wirkmechanismus nachgewiesen werden.

Im konventionellen LPL-Assay zeigten die Hydrolyseraten keinen signifikanten Unterschied. Hydrolyseunterschiede aufgrund weiterer Apolipoproteine mit unterschiedlichen Apolipoproteinzusammensetzungen dürften auszuschließen sein, da sich die untersuchten Partikel durch gezielte Substitution, ausschließlich im ApoAV und/oder ApoCIII-Gehalt unterschieden.

Bei sehr hohen Mengen an rekombinatem ApoAV konnte durch freie LPL eine Lipolysesteigerung um 60% beobachtet werden, wobei es sich hierbei jedoch um humane VLDL-Proben handelte, die vor Substitution nicht ApoAV-defizient waren (*Fruchart-Najib, Bauge et al. 2004*). Da auch ein Einfluss von ApoAV auf die LPL-Hydrolyse apolipoproteinfreier, TG-reicher Emulsionen beschrieben wurde (*Schaap, Rensen et al. 2004*), kommt es möglicherweise bei sehr hohen Konzentrationen von ApoAV zu hydrophoben Wechselwirkungen, die zu einer Beschleunigung der Hydrolyse bzw. einer Stabilisierung der LPL führen. Jedoch handelt es sich in den genannten Ansätzen um

deutlich weniger physiologische Vorgänge, die zwar weitere Nebeneffekte von ApoAV darstellen, sich jedoch bei unphysiologisch hohen ApoAV-Konzentrationen bzw. in Abwesenheit von Apolipoproteinen nicht direkt auf den physiologischen Wirkmechanismus übertragen lassen.

Bei den dargestellten Ergebnissen wurde deutlich, dass ApoAV in der Lage ist, den LPL-vermittelten TG-Katabolismus zu beschleunigen während ApoCIII hier zu einer Verlangsamung führt. Wenn sich auch ein unabhängiger Wirkmechanismus zeigte, so wird bei gegensätzlicher Wirkung auf den TG-Katabolismus eine gegenseitige Beeinflussung deutlich. Da sich dieser Effekt bei Verwendung freier Lipoproteinlipase nicht zeigt, lässt sowohl bei ApoAV als auch bei ApoCIII eine Interaktion mit Proteoglykanen und LPL vermuten.

In-vivo-Experimente an ApoAV-defizienten Mäusen, die humane LPL als Transgen exprimierten, zeigten, dass eine ApoAV-Defizienz durch ausreichend hohe LPL-Konzentrationen vollständig ausgeglichen werden konnte und der Plasma-TG-Spiegel so zu normalisieren war (*Merkel, Loeffler et al. 2005*). Basierend auf derartigen Untersuchungen und den gewonnenen Ergebnissen wäre nun denkbar, dass die Effizienzsteigerung bei der Anlagerung TG-reicher Lipoproteine an HSPG-gebundene LPL auf einem verbesserten Transport der ApoAV-haltigen Partikel innerhalb der Proteoglykanschicht beruht.

In der vorliegenden Arbeit kann der Wirkmechanismus von ApoAV und ApoCIII bezüglich ihrer Abhängigkeit von proteoglykangebundener Lipoproteinlipase und ihrer Interaktion weiter aufgeklärt werden.

Zusammenfassend zeigte sich ein voneinander unabhängiger Wirkmechanismus der Apolipoproteine AV und CIII. Aufgrund zu geringer Triglyzeridspiegel oder dem Auftreten eines Plateaueffektes bei der Hydrolyse erwies sich zunächst in vivo kein ApoAV-Effekt in ApoCIII-Abwesenheit. Im Anschluss konnte jedoch durch die oben beschriebenen in vitro Untersuchungen die klare Unabhängigkeit der Mechanismen gezeigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Apolipoprotein CIII ist ein von Leber und Intestinum sezerniertes Polypeptid, das die LPL, die hepatische Lipase und die hepatische Aufnahme triglyzeridreicher Partikel hemmen kann und positiv mit Triglyzeridwerten im Plasma korreliert. Das Apolipoprotein AV ist ein mit der Leberregeneration assoziiertes Protein, das im Gegensatz zu ApoCIII mit niedrigen Triglyzeridwerten einhergeht indem es die Plasmaclearance von VLDL und Chylomikronen beschleunigt. Um die Interaktion von ApoCIII und ApoAV bei der Regulierung des TG-Haushaltes näher zu untersuchen, wurden Lipoproteinprofile von hetero- und homozygot ApoCIIIko-Mäusen mit und ohne ApoAV-Transgen erstellt. Zur Untersuchung von Interaktion und isolierter Wirkung der Apolipoproteine erfolgten darüber hinaus *in vivo* Studien mit Wildtyp- und ApoCIII-defizienten Mäusen mit und ohne transgene ApoAV-Expression sowie eine *in vitro* Untersuchung in An- und Abwesenheit von Heparansulfat-proteoglykanen, um möglichst physiologische Bedingungen zu gewährleisten. Deutlich wurde, dass ApoAV einem zumindest teilweise von ApoCIII unabhängigen Wirkmechanismus folgt und auch die Wirksamkeit von ApoCIII nicht auf einer ApoAV-Anwesenheit beruht. Neben den bekannten Effekten zeigte sich postprandial bei ApoCIIIko-Tieren der ApoAV-Effekt nur deutlich verzögert. Da beide Apolipoproteine gegensätzliche Auswirkungen auf den TG-Haushalt haben, kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung, was durch zum Teil gleiche Angriffspunkte in der Funktionsweise zu erklären wäre. Ursächlich kommt jedoch auch ein verzögerter Wirkungseffekt aufgrund der primär deutlich niedrigen Triglyzeridwerte bei ApoCIIIko-Tieren in Betracht. Neben einer beschleunigten plasmatischen Eliminierung von VLDL in Gegenwart des ApoAV-Transgens und einem deutlich langsameren Abbau in ApoCIII-Anwesenheit zeigte sich eine wesentlich schnellere Eliminierung der markierten VLDL-Partikel bei ApoCIII-defizienten Mäusen mit ApoAV-Transgen. Auch im Rahmen der VLDL-Organaufnahme bestätigte sich, dass ApoAV in der Lage ist, den LPL-vermittelten TG-Katabolismus zu beschleunigen während ApoCIII hier zu einer Verlangsamung führt. Da sich dieser Effekt unter Verwendung freier Lipoproteinlipase nicht zeigt, ergibt sich sowohl für ApoAV, als auch für ApoCIII eine Interaktion mit Proteoglykanen und LPL. Als Ursache käme sowohl eine höhere Affinität der Lipoproteinpartikel in Zusammenhang mit proteoglykangebundener LPL als auch eine veränderte Enzymkinetik in Frage.

Zusammenfassend zeigte sich ein voneinander unabhängiger Wirkmechanismus der Apolipoproteine AV und CIII. Aufgrund zu geringer Triglyzeridspiegel oder des Auftretens eines Plateaueffektes bei der Hydrolyse zeigte sich zunächst *in vivo* kein ApoAV-Effekt in ApoCIII-Abwesenheit. Im Anschluss konnte aber durch oben beschriebene *in vitro* Untersuchungen die klare Unabhängigkeit der Mechanismen gezeigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen weitere wichtige Details im Ablauf von Fettstoffwechselstörungen, die im engem Zusammenhang mit den Apolipoproteinen AV und CIII stehen. Als Ursache folgenschwerer Gefäßerkrankungen kann gerade die Berücksichtigung dieser Zusammenhänge einen weiterführenden Beitrag zur Entwicklung neuer prophylaktischer Ansätze und immer effizienterer Therapiemöglichkeiten leisten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Assmann, G., P. Cullen, et al. (2002). „ Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study.”  
*Circulation*. 105: 310-315.
- Austin, M. A., P. J. Talmud, et al. (2004). „Association of apolipoprotein A5 variants with LDL particle size and triglyceride in Japanese Americans.“  
*Biochim Biophys Acta* 1688: 1-9.
- Baroukh, N., E. Bauge, et al. (2004). “Analysis of apolipoprotein A5, C3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice.”  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24: 1297-1302
- Beisiegel, U., W. Weber, et al. (1991). “Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein.”  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 8342-8346.
- Bodzioch, M., E. Orso, et al. (1999). “The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease.”  
*Nat Genet*. 22: 347-351.
- Brooks-Wilson, A., M. Marcil, et al. (1999). “Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency.”  
*Nat Genet*. 22: 336-345.
- Bruckenberger, E. (2004). Herzbericht 2004, Transplantationschirurgie, Hannover.
- De Man, F. H., F. De Beer, et al. (1997). „Lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulfate proteoglycan-bound lipoproteinlipase.“  
*J Lipid Res* 38: 2465-2472.
- Duivenvoorden, I., B. Teusink, P.C. Rensen, et al. (2005). „Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice“  
*Diabetes* 54: 664-671.
- Elosua, R., J. M. Ordovas, et al. (2006). “Variants at the ApoA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study.”  
*J Lipid Res* 47: 990-996.
- Fruchart-Najib, J., E. Bauge, et al. (2004). “Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5.”  
*Biochem Biophys Res Commun*. 319: 397-404.
- Ginsberg, H. N. (2001). Hypertriglyceridemia: new insights and new approaches to pharmacologic therapy”  
*Am J Cardiol* 87: 1174-1180.

- Groenendijk, M., R. M. Cantor, et al. (2001). "The apoAI-CIII-AIV gene cluster." *Atherosclerosis*. 157: 1-11.
- Grundy, S. M., G. J. Balady, et al. (1998). "Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association." *Circulation*. 97: 1876-1887.
- Havel, R. J., H. A. Eder, et al. (1955). "The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum." *Journal of Clinical Investigation*. 34: 1345-1353.
- Heeren, J., T. Grewal, et al. (2001). "Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo." *J Biol Chem*. 276: 42333-42338.
- Hokanson, J. E., M. A. Austin. (1996). "Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies." *J Cardiovasc Risk*. 3: 213-219.
- Hubacek, J. A., Z. Skodova, et al. (2004). "The influence of ApoAV polymorphisms (T-1131>C and S19>W) on plasma triglycerides levels and risk of myocardial infarction." *Clin Genet* 65: 126-130
- Hubacek, J. A. (2005). "Apolipoprotein A5 and triglyceridemia. Focus on the effects of the common variants." *Clin Chem Lab Med*. 43: 897-902.
- Ito, Y., N. Azrolan, et al. (1990). "Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice." *Science*. 249: 790-793.
- Jong, M. C., P. C. Rensen, et al. (2001). "Apolipoprotein CIII deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoE knockout mice" *J Lipid Res* 42: 1578-1585
- Kinnunen, P. K., C. Ehnolm. (1976). "Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase." *FEBS Lett*. 65: 354-357.
- Krauss, R. M., P. N. Herbert, et al. (1973). "Further observations on the activation and inhibition of lipoprotein lipase by apolipoproteins." *Circ Res*. 33: 403-411.

- Lewis, G. F., A. Carpentier, et al. (2002). „Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes“  
*Endocr Rev* 23: 201-229.
- Marcais, C., B. Verges, et al. (2005). “Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment.”  
*J Clin Invest.* 115: 2862-2869.
- McConathy, W. J., J. C. Gesquiere, et al. (1992). “Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III.”  
*J Lipid Res.* 33: 995-1003.
- McNeish, J., R. J. Aiello, et al. (2000). “High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1.”  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 4245-4250.
- Maeda N; Li H; Lee D; Oliver P; Quarfordt SH; Osada J. (1994). Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia.  
*J Biol Chem* 269(38):23610-23616
- Merkel, M., B. Loeffler, et al. (2005). “Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase.”  
*J Biol Chem* 280: 21553-21560
- Pennacchio, L. A., M. Olivier, et al. (2001). “An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing.”  
*Science.* 294: 169-173.
- Ragozin, S., A. Niemeier, et al. (2005). “Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice.”  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25: 1433-1438.
- Reilly, M. P., D. J. Rader (2003). “The metabolic syndrome: more than the sum of its parts?”  
*Circulation* 108: 1546-1551
- Rinninger, F., N. Wang, et al. (1999). “Probucol enhances selective uptake of HDL-associated cholesteryl esters in vitro by a scavenger receptor B-I-dependent mechanism.”  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1325-1332.
- Schaap, F. G., M. C. Nierman, et al. (2006). “Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia.”  
*J Lipid Res* 47: 2333-2339

- Schaap, F. G., P. C. Rensen, et al. (2004). "ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis."  
*J Biol Chem.* 279: 27941-27947.
- Singaraja, R. R., B. Stahmer, et al. (2006). "Hepatic ATP-Binding Cassette Transporter A1 Is a Key Molecule in High-Density Lipoprotein Cholesteryl Ester Metabolism in Mice."  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
- Smith, S. C., Jr., E. Amsterdam, et al. (2000). "Prevention Conference V: Beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention: tests for silent and inducible ischemia: Writing Group II."  
*Circulation.* 101: E12-16.
- Statistisches Bundesamt. 2005. Todesursachen in Deutschland.  
Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.
- Talmud, P. J., E. Hawe, et al. (2002). "Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides."  
*Hum Mol Genet.* 11: 3039-3046.
- van der Vliet, H. N., M. G. Sammels, et al. (2001). "Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration."  
*J Biol Chem.* 276: 44512-44520.
- Wang, C. S., W. J. McConathy, et al. (1985). "Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III."  
*J Clin Invest.* 75: 384-390.

## **7 Lebenslauf**

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

- entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen -

## **8 Danksagung**

Während der Durchführung dieser Arbeit standen mir viele wichtige Menschen zur Seite, denen ich auf diesem Wege ganz herzlich danken möchte.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. R. Stahl als Direktor der III. Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit an der von ihm geleiteten Klinik durchführen zu können.

Ganz besonders danken möchte ich auf diesem Wege meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Martin Merkel für die Aufgabenstellung und vor allem für seine Betreuung und geduldige Unterstützung während und nach der Durchführung der Arbeit.

Desweiteren gilt mein Dank dem ehemaligen Graduiertenkolleg 336, ehemals geleitet von Herrn Prof. Dr. H.-J. Seitz für die Förderung als Stipendiatin.

Für die wertvolle wissenschaftliche Unterstützung möchte ich Herrn Prof. Dr. Jörg Heeren und Herrn Dr. Alexander Laatsch vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktorin: Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel) meinen Dank aussprechen.

Ebenfalls danke ich Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel für die Möglichkeit Geräte im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf nutzen zu dürfen.

Für die unermüdliche technische Unterstützung und Hilfe im Laboralltag danke ich darüber hinaus Fr. Britta Schwarzloh, Fr. Sandra Ehret und Fr. Dr. Britta Löffler.

Meinen Freunden Diana Temme, Christian Sandner und Felix Schaab möchte ich ganz herzlich für die engagierte Zusammenarbeit und die stets tatkräftige Unterstützung im Laboralltag danken. Herrn Dr. Malte Kluger gilt an dieser Stelle mein Dank für die hilfsbereite Einarbeitung in den umfangreichen HSPG-Assay.

Für die Unterstützung während meines Studiums und die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinen Eltern Dorothee Peitsch und Siegfried Ewerlin, meiner Großmutter Regina Ewerlin und zu guter letzt natürlich Christian Brokamp bedanken.

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Lydia Ewerlin, Hamburg 2011