

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
Molekulare Zellbiologie

Institutsdirektor (komm.): Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Die Rolle des Apolipoprotein A5 im postprandialen Lipidstoffwechsel

Dissertation

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

vorgelegt von:

Bülent Polat
aus Hamburg

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.05.2012**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. M. Merkel

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung	5
1.1 Lipoproteinstoffwechsel	5
1.2 Lipoproteine und Apolipoproteine	5
1.3 Exogener Lipidstoffwechsel	9
1.4 Endogener Lipidstoffwechsel	10
1.5 Reverser Cholesterintransport.....	11
1.6 Struktur und Funktion des ApoA-V	13
1.7 Insulinresistenz und Lipoproteinstoffwechsel.....	16
1.8 Fragestellung	19
2 Patienten, Material und Methoden	20
2.1 Patientengruppen.....	20
2.2 Material	23
2.2.1 Geräte	23
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.2.3 Antikörper und Proteine	23
2.2.4 Chemikalien	24
2.2.5 Herstellung einiger Reagenzien.....	24
2.2.5.1 HRP-Substratpuffer	24
2.2.5.2 0,2% H ₂ O ₂	25
2.2.5.3 0,3% Tetramethylbenzidin (TMB)	25
2.2.5.4 0,2 M Malonic Acid	25
2.3 Methodik	26
2.3.2 Methodik der FPLC.....	27
2.3.2.1 Auftrennung der Lipoproteine mittels FPLC.....	27
2.3.2.2 Prinzip des Enzymatischen Farbtestes (Cholesterin CHOD-PAP)	29
2.3.2.3 Prinzip des Enzymatischen Farbtestes (Triglyzeride GPO-PAP)	30
2.3.3 Methodik des ApoA5-ELISA	32
2.3.3.1 Coaten der Microtiter-Stripes mit 0,2 µg/Well AK	32
2.3.3.2 Blockieren	32
2.3.3.3 Auftragung der Proben, Standards und Kontrollen.....	32
2.3.3.4 Inkubation mit polyklonalem Anti-ApoA5	33
2.3.3.5 Inkubation mit GARPO (Goat-Anti-Rabbit-Peroxidase-Antikörper)	33
2.3.3.6 Entwicklung und photometrische Messung	34
2.4 Schematische Darstellung der vorliegenden Arbeit.....	35

3 Ergebnisse	36
3.1 Lipid- und Stoffwechselfparameter vor und nach OFTT	36
3.1.1 Plasma-Glukose-Messung.....	36
3.1.2 Plasma-Insulin-Messung	37
3.1.3 Plasma-Triglyzerid-Messung	38
3.1.4 Plasma-Cholesterin-Messung.....	39
3.1.5 Plasma-HDL-Cholesterin-Messung	40
3.2 Lipoproteinprofile vor und nach OFTT	41
3.2.1 Cholesterinprofile vor und nach OFTT.....	42
3.2.2 Triglyzeridprofile vor und nach OFTT	45
3.3 ApoA5-Konzentration der Lipoproteine.....	51
4 Diskussion	55
5 Zusammenfassung	61
6 Abkürzungsverzeichnis	62
7 Abbildungsverzeichnis	63
8 Literaturverzeichnis	64
9 Anhang	72
10 Danksagung	88
11 Lebenslauf	89
12 Eidesstattliche Erklärung	90

1 EINLEITUNG

1.1 LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Lipide gehören neben den Kohlenhydraten und den Proteinen zu den wichtigsten Energielieferanten des tierischen Organismus. Sie fungieren nicht nur als Energielieferant, sondern auch als Botenstoff (in Steroidhormonen oder als Bestandteil in Membranen und Gallensäuren) oder als Isolatoren (im Fettgewebe zur Wärmeisolation). Der Großteil der Lipide ist wasserunlöslich und benötigt daher spezielle Mechanismen, um im Blut transportiert werden zu können. Während kurzkettige Fettsäuren in der Blutbahn überwiegend an Albumin gebunden vorkommen, werden die meisten anderen Lipide in Form von Lipoproteinen transportiert. Diese enthalten insbesondere Fettsäuren in Form von Triglyzeriden (TG) oder Cholesterolestern (CE), welche die vorherrschende Transportform von Cholesterol sind, sowie Phospholipide (PL) und lipophile Vitamine (siehe Abbildung 1). Störungen des Lipoproteinstoffwechsels tragen u. a. zur Entstehung von Hyperlipidämien und Atherosklerose bei [Lusis et al 2004 (Part one); Lusis et al. 2004 (Part two); Hansson et al. 2005].

1.2 LIPOPROTEINE UND APOLIPOPROTEINE

Lipoproteine können als Mikroemulsionen aufgefasst werden (siehe Abbildung 1). Sie bestehen aus einem hydrophoben Lipidkern, der hauptsächlich TG und CE enthält, sowie einer amphiphatischen Oberfläche aus PL, deren polare Kopfgruppen die Wasserlöslichkeit vermitteln. Apolipoproteine sind in diese Oberfläche eingelagert. Sie haben zum einen eine strukturell stabilisierende Wirkung und vermitteln zum anderen Funktionalität dadurch, dass eine Interaktion mit Enzymen und/oder Membranrezeptoren ermöglicht wird [Mahley et al. 1984].

Lipoproteine werden nach Dichte und Mobilität in der Gelelektrophorese in mehrere Klassen unterteilt, die sich sowohl durch ihre Größe als auch durch ihre Lipid- und Apolipoprotein-zusammensetzung unterscheiden. Lipoproteine werden klassisch durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt, wobei ihre Dichte invers mit ihrer Größe, d. h. ihrem Lipidgehalt korreliert (Tabelle 1). Neben den High-, Low-, Very Low- und Intermediate-Density-Lipoproteins (HDL, LDL, VLDL und IDL), stellen die Chylomikronen (CM) einen wichtigen Teil des Lipoproteinstoffwechsels dar. Die chemische Zusammensetzung von Plasmalipoproteinen korreliert ebenfalls mit ihrer Dichte. So nimmt der TG-Gehalt mit zunehmender Dichte ab und der Cholesterolgehalt erreicht in der LDL-Fraktion ein Maximum (siehe Tabelle 1).

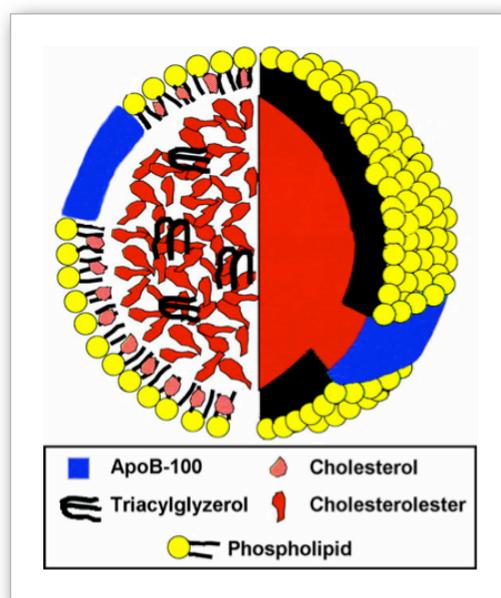


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Low-Density-Lipoprotein-Partikels

Lipoproteine der Low-Density-Lipoprotein-Fraktion sind ca. 22 nm im Durchmesser groß. Der Lipidkern besteht neben TG überwiegend aus CE (rot), wobei die Hülle aus freiem Cholesterin (beige) und PL (gelb) aufgebaut ist. In die Oberfläche ist ein Molekül ApoB100 (blau) eingelagert. (Abbildung modifiziert nach Segrest et al. 2001)

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Lipoprotein-Hauptklassen

Lipoprotein	Dichte	MG	Größe	Lipide (%)		
				TG	CHOL	PL
Chylomikronen	0,95	400 x 10 ⁶	75-1200	80-95	2-7	3-9
VLDL	0,95-1,006	10-80 x 10 ⁶	30-80	55-80	5-15	10-20
IDL	1,006-1,019	5-10 x 10 ⁶	25-35	20-50	20-40	15-25
LDL	1,019-1,063	2,3 x 10 ⁶	18-25	5-15	40-50	20-25
HDL	1.063-1.21	1,7-3,6 x 10 ⁶	5-12	5-10	15-25	20-30

Dichte (g/dl); MG (dalton); Größe (nm); Lipide (%). Tabelle modifiziert nach Ginsberg et al. 2004.

Die Proteinanteile der Lipoproteine werden Apolipoproteine genannt und in verschiedene Haupttypen (ApoA-E) unterteilt (Tabelle 2). Innerhalb der einzelnen Haupttypen werden die Apolipoproteine auch aufgeteilt, wie z.B. das ApoA-I bis A-V. Apolipoproteine lassen sich außerdem in austauschbare, wie ApoA-I, -II, -IV, -V, ApoC-I, -II, -III, und ApoE und nicht austauschbare wie die Apolipoproteine apoB₁₀₀ und apoB₄₈ einteilen.

Sinn der Apolipoproteine ist die Stabilisierung, die Funktion als Enzymaktivatoren oder als Rezeptorliganden. Apolipoproteine werden in der Darmmukosa und der Leber hergestellt. Das Molekulargewicht der Apolipoproteine schwankt zwischen 6.5 kDa und etwa 550 kDa. Die Klassen der wichtigsten Apolipoproteine lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: die erste Gruppe besteht aus ApoA, ApoC und ApoE, die relativ klein (ca. 5 bis 50 kDa) sind und viele amphipatische α -Helices enthalten, die auf genetischer Ebene aus Tandemwiederholungen von elf Codons bestehen [Mishra et al. 2006; Hatters et al. 2006]. Die Hypothese, dass sie aus einem Ursprungsgen hervorgegangen sind, liegt aufgrund dieser Ähnlichkeit nahe, insbesondere, da sie sich ihre Gene im Genom auf nur zwei Cluster verteilen: ApoC-I, -II, -IV, ApoE auf Chromosom 19q3.2-q3.3 und ApoA-I, -IV, -V, ApoC-III auf Chromosom 11q23-q24 [Zannis et al. 2001]. Diese Apolipoproteine können intravaskulär zwischen einzelnen Lipoproteinpartikeln ausgetauscht werden. Die ApoA-Proteine kommen vor allem in der HDL-Fraktion vor, die ApoC-Proteine sind vornehmlich in den triglyzeridreichen CM, VLDL, IDL sowie in sogenannten „Surface Remnants“ der HDL zu finden [Tam et al. 1981; Tam et al. 1983].

ApoE ist mit triglyzeridreichen Lipoproteinen, TRL und HDL assoziiert und wird unter normalen Bedingungen nicht auf LDL detektiert. ApoE wird primär in der Leber synthetisiert, jedoch auch in zahlreichen anderen Geweben und Zelltypen, unter anderem auch in Monozyten und Makrophagen und in Makroglia des zentralen Nervensystems [Hatters et al. 2006]. Im Gegensatz zu ApoA, -C und -E steht die zweite Gruppe mit ApoB₄₈ und ApoB₁₀₀. ApoB₁₀₀ hat ein Molekulargewicht von 550 kDa [Segrest et al. 2001]. ApoB₄₈ bildet das Proteingerüst für CM und ApoB₁₀₀ dasjenige für VLDL, IDL und LDL [Kane et al. 1983]. Beide Apolipoproteine werden vom gleichen Gen transkribiert. ApoB₄₈, das nur aus den N-terminalen 48 % von ApoB₁₀₀ besteht, entsteht durch RNA-editing ausschließlich in den Mukosazellen des Dünndarms [Powell et al. 1987]. Dabei wird durch die Desaminierung eines spezifischen Cytosylrestes zu einem Uracylrest durch das Enzym Cytosindesaminase (apoB editing complex 1, Apobec-1) aus Codon 2153 (CAA) ein Stopcodon (UAA) in die ApoB₁₀₀-mRNA eingefügt. ApoB besteht überwiegend aus großflächigen, amphiphatischen β -Faltblattstrukturen, die vermutlich der Grund für die feste Assoziation mit dem Lipidkern sind, so dass ApoB nicht zwischen den einzelnen Lipoproteinen ausgetauscht werden kann.

Die Eigenschaften und Funktion der Apolipoproteine sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Eigenschaften und Funktion der Apolipoproteine

Apolipoprotein	MG	Lipoprotein	Metabolische Funktion
ApoA-I	28,016	HDL, Chylomikron	Strukturelle Komponente des HDL, Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase-Aktivator (LCAT)
ApoA-II	17,414	HDL, Chylomikron	Unbekannt
ApoA-IV	46,465	HDL, Chylomikron	Unbenannt; möglicherweise erleichtert es den Transfer der Apolipop. zwischen HDL und Chylomikronen
ApoA-V	39,000	HDL	Assoziation mit niedrigeren TG-Werten
ApoB ₄₈	264,000	Chylomikronen	Notwendig zur Zusammensetzung und Sekretion der Chylomikronen im Dünndarm
ApoB ₁₀₀	514,000	VLDL, IDL, LDL	Notwendig für Zusammensetzung und Sezernierung von der Leber; Strukturprotein des VLDL, IDL und LDL; Ligand des LDL Rezeptors
ApoC-I	6,630	Chylo., VLDL, IDL, HDL	Möglicherweise Inhibierung der Aufnahme der VLDL und Chylo in die Leber
ApoC-II	8,900	Chylo., VLDL, IDL, HDL	Aktivierung der Lipoproteinlipase
ApoC-III	8,800	Chylo., VLDL, IDL, HDL	Inhibitor der Lipoproteinlipase und der Aufnahme der Chylomikronen und VLDL durch die Leber
ApoE	34,145	Chylo., VLDL, IDL, LDL	Ligand für Bindung einiger Lipoproteine an den LDL-Rezeptor, LRP und Proteoglykanen

Tabelle modifiziert nach Ginsberg et al. 2004.

Der Lipoproteinstoffwechsel lässt sich in drei Aufgabenfelder unterteilen, wobei der exogene, postprandiale Weg den Transport von Nahrungslipiden zu Muskel, Fettgewebe und Leber beschreibt. Den endogenen Weg nehmen Lipoproteine, die von der Leber sezerniert werden und Lipide zu extrahepatischen Geweben transportieren. Als reversen Cholesteroltransport bezeichnet man den Transport von Cholesterol aus peripheren Geweben zur Leber, wo das Cholesterol über die Galle in Form von Gallensäuren ausgeschieden werden kann.

1.3 EXOGENER LIPIDSTOFFWECHSEL

Die im Dünndarm (Enterozyten) gebildeten Chylomikronen haben die Funktion, die mit der Nahrung aufgenommenen Fette und fettlöslichen Vitamine im Blut zu transportieren. Bevor die Nahrungslipide transportfähig sind, werden sie zuerst im Magen von der Lipase in Triacylglyceride gespalten [Armand et al. 2007]. Im Duodenum angekommen und mit der Gallenflüssigkeit durch die Darmperistaltik durchmischt, beginnen die Lipide zu emulgieren. Erst in Form von Mizellen sind die Lipide der Pankreaslipase zugänglich. Die von der Pankreaslipase freigesetzten Monoacylglyceride und Fettsäuren können jetzt durch Diffusion oder auch aktive Transporter vom Enterozyten aufgenommen werden. Im Enterozyten findet eine Reveresterung der vorher gespaltenen Fettsäuren und Monoacylglyceride statt. Durch das MTP (Microsomal Triglyceride Transport Protein) werden die Monoacylglyceride und Fettsäuren in die nun entstehenden Chylomikronen transportiert und im Blut als transportfähiges Lipoprotein – bepackt unter anderem mit TG – bereitgestellt. Die Chylomikronen werden nun auch zusätzlich mit fettlöslichen Vitaminen, Cholesterylestern, Phospholipiden und Apolipoproteinen beladen. Nachdem der Chylomikron den Enterozyten durch Exozytose verlässt, gelangt er unter Umgehung der Leber über den ductus thoracicus in den linken Venenwinkel und somit in die Peripherie [Hussein et al., Kane, 1996].

Im Blut bekommen die Chylomikronen von den HDL die Apolipoproteine C-II, ApoE und ApoA-V und geben das ApoA-I und A-II ab. Hierbei stellt das ApoC-II zum Beispiel einen essentiellen Cofaktor für die endothelständige Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG)-gebundene Lipoproteinlipase dar [Oliverona und Bengtison-Oliverona, 1993]. Die TG werden durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert [Eisenberg et al., 1992] und in das Fett- oder Muskelgewebe aufgenommen. Im Herzmuskel und Skelettmuskel werden die entstandenen freien Fettsäuren der β -Oxidation zugeführt, während sie im Fettgewebe auch reverestert und gespeichert werden können. Nach Verbrauch des Chylomikronen-Kerns bleibt ein sogenannter Chylomikronen-Remnant übrig, der reich an Cholesterinester und ApoE ist. Das ApoE und die nun am Chylomikronen-Remnant befindliche LPL [Zambon et al. 1996] erhöhen die Affinität des Komplexes zum LDL-Rezeptor an der Leber und begünstigen damit dessen Aufnahme [Hultin, M. et al. 1998, Mahley, R.W. et al. 1999, Laatsch, A. et al. 2009]. Hier werden dann die verbliebenen TG und Cholesterinester zwischengelagert und können dann entweder abgebaut oder in VLDL oder LDL und in den endogenen Lipidstoffwechsel eingeschleust werden.

1.4 ENDOGENER LIPIDSTOFFWECHSEL

Kommt es im Körper zu einem Energieüberschuss, bildet die Leber (Abbildung 2) aus Triacylglyceriden VLDL, die im Hungerzustand dem Körper als Energiequelle bereitgestellt werden können. Hierbei werden für die VLDL-Bildung TG aus Chylomikronen-Remnants oder freie Fettsäuren verwendet.

Die Bildung der VLDL beginnt damit, dass ein ApoB₁₀₀ enthaltene Precursor Lipoprotein mit sehr geringer Dichte gebildet wird. Am endoplasmatischem Retikulum gebunden findet hier die Beladung des noch nicht reifen Lipoproteins durch das MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) mit TG, Phospholipiden und Cholesterolestern statt. Dabei kommt es zu einer Interaktion des MTP mit dem ApoB₁₀₀ [Olofsson et al. 1999]. Die VLDL werden in triglyzeridreiche VLDL₁ und triglyzeridarme VLDL₂ eingeteilt. Bei der Einteilung werden die Partikelgröße und die entsprechende Flotationsrate in der Ultrazentrifuge berücksichtigt [Packard und Shepard, 1979]. Da die VLDL-Sekretion sehr stark vom Energiezustand des Körpers abhängt, wird in der postprandialen Phase die VLDL-Sekretion durch Insulin gehemmt. Andersherum werden im Hungerzustand die vom Fettgewebe freigesetzten freien Fettsäuren zur VLDL-Bildung benutzt. Gelangen die VLDL in den Blutkreislauf, bekommen sie von den HDL das ApoE und ApoC-II. Hierbei aktiviert das ApoC-II die endothelständige Lipoproteinlipase [LaRosa et al. 1970]. Durch das ApoE wird nach der Lipolyse die ApoE-Rezeptor-vermittelte Aufnahme des verbrauchten VLDL, das dann als IDL vorliegt, vermittelt [Mahley et al. 1999, Arai et al. 1999]. Es erfolgt relativ schnell die Lipolyse durch die endothelständige Lipoproteinlipase [Olivecrona et al., 2009], so dass freie Fettsäuren an das Endothel abgegeben werden können. Analog zu den Chylomikronen entstehen nach Abgabe der TG an periphere Gewebe kleinere relativ Cholesterin- und ApoE-reiche Partikel zurück, die sogenannten IDL (intermediate density lipoprotein). Insgesamt hat ein Wechsel der Lipoprotein-Klasse stattgefunden. Es zeigen sich Veränderungen bezüglich der Lipid- und Proteinfraction. Werden die im Kreislauf befindlichen VLDL nicht durch die Lipolyse verbraucht, besteht die Möglichkeit diese über VLDL-Rezeptoren in die Leber aufzunehmen [Tacke et al. 2001]. Aus den IDL können nun in der Leber LDL hergestellt werden. Nach der ApoE-vermittelten Aufnahme des IDL kommt es zu einer LPL- und hepatischen Lipase vermittelten Hydrolyse der restlichen TG, einem Verlust des ApoE-Anteils und zur Cholesterin-Ester-Transfer-Protein (CETP)-vermittelten Cholesterin-Anreicherung [Paromov et al. 2003, Inazu et al. 1990] aus den HDL. Das LDL-Partikel ist von einem einzigen sehr großen ApoB₁₀₀-Molekül umwunden. Erst durch das ApoB₁₀₀ ist es dem LDL möglich, über den LDL-Rezeptor in hepatische und extrahepatische Gewebe zu gelangen und sein Cholesterin dort abzugeben [Flood et al. 2004; Brown und Goldstein, 1986].

Hierbei kann das Cholesterin zum einen als Induktor oder Repressor des Schlüsselenzyms der zellulären De-Novo-Synthese wirken und zum anderen die Expression des LDL-Rezeptors beeinflussen [Goedeke et al. 2011]. Beide Wege dienen dazu, hohe intrazelluläre Cholesterin-

spiegel zu vermeiden, weil diese zytotoxisch wirken können [Leake und Peters, 1982; Sevanian und Peterson, 1986; Brady et al. 1989]. LDL kann auch LDL-Rezeptor unabhängig über sogenannte Scavenger-Rezeptoren durch unspezifische Pinozytose aufgenommen werden. Der Weg des LDL über den „scavenger pathway“ unterliegt keiner Feedbackregulation und ist somit nicht sättigbar. Da vor allem Makrophagen und andere Zellen des Retikulo-histiozytären Systems Scavenger-Rezeptoren exprimieren, kommt es bei hohen LDL-Spiegeln letztendlich zur Entstehung von Schaumzellen. Diese spielen eine besondere Rolle bei der Arteriosklerose.

1.5 REVERSER CHOLESTERINTRANSPORT

Während das bisher beschriebene LDL eine Verteilungsfunktion für Cholesterin hat, handelt es sich bei dem HDL (High Density Lipoprotein) um ein Lipoprotein, das für den Transport des Cholesterins in die entgegengesetzte Richtung (von der Peripherie, vor allem aus lipidbeladenen Makrophagen zurück in die Leber) und zu steroidhormonproduzierenden Organen verantwortlich ist [Yancey et al. 2003; Lewis et al. 2005]. Nur die Leber ist in der Lage, Cholesterin auszuscheiden. Kann sie das nicht bewerkstelligen, können hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen zytotoxisch wirken [Leake und Peters, 1982; Sevanian und Peterson, 1986; Brady et al., 1989]. Neuere Untersuchungen zeigen nicht nur eine antiatherogene Wirkung des HDL, sondern schreiben diesem Lipoprotein auch antioxidative, antiinflammatorische und antithrombotische Wirkungen zu [Barter et al. 2004; Lewis et al. 2005].

Auch unter den HDL gibt es Unterschiede bezüglich der Größe, Dichte und des Apolipoprotein-gehaltes, so dass man sie in drei Untergruppen unterteilt: HDL₁, HDL₂ und HDL₃. Die Entstehung der HDL erfolgt entweder als lipidarme, naszierende HDL in den Hepatozyten [Castle et al. 1991; Forte et al. 1987; McCall et al. 1989; McCall et al. 1988; Thrift et al. 1986] und in der Mukosa des Dickdarms [Danieleson et al. 1993; Forester et al. 1983; Green et al. 1978] oder durch Dissoziation von Chylomikronen und VLDL [Musliner et al. 1991; Tam & Beckenbridge 1983; Schaefer et al. 1982]. Auch diese Lipoproteine (HDL) sind mit Apolipoproteinen ausgestattet: ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoE und ApoA-V. Die Neubildung eines HDL im Hepatozyten oder in der Mukosa des Darmes beginnt durch einen ATP-Binding-Cassette-Transporter A1 (ABCA1) abhängigen Mechanismus, bei dem das ApoA-I mit Cholesterin aus der Peripherie beladen wird und ein Prä-β-HDL zustande kommt. Hierbei wird das freie Cholesterin durch die am HDL befindliche Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase (LCAT) verestert und erst in dieser Form in das Zentrum des entstehenden HDL transportiert [Oram et al. 2003; Brewer et al. 2004]. Wenn die Zelle zu wenig Cholesterin enthalten sollte, kann über die Produktion einer microRNA33 die Transkription des ABCA1-Gens herunterreguliert und somit der Efflux reduziert werden [Murphy et al. 2011]. Eine wichtige Funktion übernimmt z.B. das ApoA-I: dieses Apolipoprotein wirkt als Kofaktor [Fielding und Fielding 1980; Phillips et al. 1998] bei der Veresterung des in der Peripherie gesammelten freien Cholesterins durch die Lecithin-Cholesterin-

Acyltransferase (LCAT). Zwischen den HDL₃ und der peripheren Zelle ist das Konzentrationsgefälle bezogen auf den Cholesteringehalt am größten. Deswegen sind die HDL₃ maßgeblich am Transport des peripheren Cholesterins beteiligt [Trigatti und Rigotti 2000], ohne dass es zur Endozytose des Lipoproteins kommt. Aufgrund der ständigen Veresterung des Cholesterins durch die LCAT, bleibt dieses Konzentrationsgefälle erhalten.

Nun gibt es mehrere mögliche Wege, die das in den HDL befindliche Cholesterin gehen kann: Einerseits kann der Lipoproteinkomplex als Ganzes ApoA-I bzw. ApoE-rezeptorvermittelt in Hepatozyten aufgenommen werden [Curtiss et al. 2000; Tall et al. 2000]. Andererseits gibt es noch die Möglichkeit lipidreiche HDL in lipidarme HDL umzuwandeln: dieses geschieht durch die Aktivität des Cholesterinester-Transferproteins (CETP) [Clay et al. 1992; Francone et al. 1996; Hennessy et al. 1993; Liang et al. 1994; Goldberg 2009], des Phospholipid-Transferaseproteins, der endothelialen Lipoproteinlipase und der hepatischen Lipase (HL). Die Depletion eines HDL durch die CETP kann als atherogener Vorgang gesehen werden. Die genetische Mutation des CETP zeigte in Untersuchungen hohe HDL-Werte [Brown et al. 1989]. Des Weiteren können hepatische und extrahepatische Zellen Cholesterinester über den Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 [Rinniger et al. 1994; Krieger et al. 1999] aufnehmen. Eine grobe Gesamtdarstellung des Lipoproteinstoffwechsels soll Abbildung 2 geben.

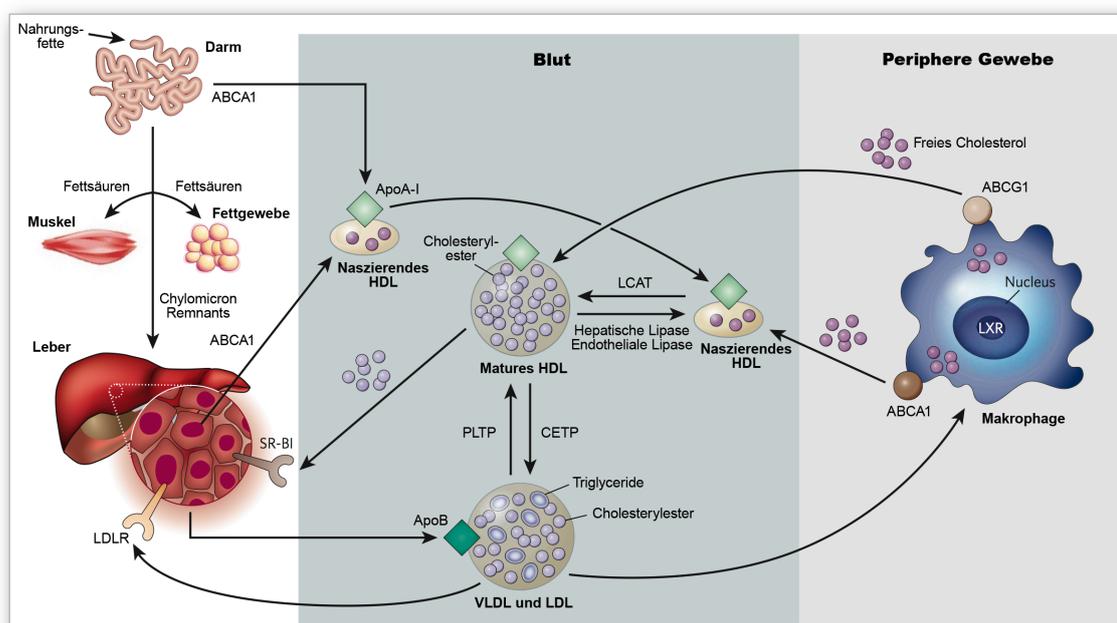


Abbildung 2: Lipoproteinstoffwechsel in grober Gesamtdarstellung

Die exogen aufgenommenen Nahrungs-fette werden im Darm in Chylomicronen verpackt. Diese werden von der endothelständigen Lipoproteinlipase hydrolysiert. Anschließend erfolgt die rezeptorvermittelte Aufnahme der CM-Remnants. In der Leber werden die ApoB-haltigen VLDL gebildet, aus denen nach der Hydrolyse LDL entstehen. Diese werden entweder über LDLR oder über Scavenger-Rezeptoren aufgenommen. Für den Rücktransport des Cholesterins aus der Peripherie sind die HDL zuständig. Aus einem von der Leber sezernierten ApoA-I-Molekül entsteht durch das ABCA1 ein HDL. Modifiziert nach Rader et al. 2008

1.6 STRUKTUR UND FUNKTION DES APOA-V

2001 entdeckten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen das Apolipoprotein A-V (ApoA-V). Zum einen wurde es durch vergleichende Sequenzanalysen [Pennacchio et al. 2001] identifiziert und zum anderen beobachtete man die Assoziation des ApoA5 mit der frühen Phase der Leberregeneration [van der Vliet et al. 2001].

Unmittelbar in der Nähe des Lokus ApoA-I/C-III/A-IV auf Chromosomen 11q23 befindet sich 27 kbp distal (3') des ApoA-IV das ApoA-V-Gen. Deswegen und auch wegen der Ähnlichkeit des ApoA-V mit dem ApoA-IV wird dieses Gen zu diesem Cluster gezählt. Beachtlich ist die enorm geringe Konzentration dieses Proteins im Plasma von 0,05-0,5 µg/ml (humanes Plasma) [Ishihara et al. 2005; O'Brien et al. 2005] und 1 µg/ml (tierisches Plasma) [van der Vliet et al. 2001; Baroukh et al. 2004; O'Brien et al. 2004]. In molarer Berechnung bedeutet dieses, dass die ApoA5-Konzentration um nahezu tausendfach niedriger ist als ApoB₁₀₀. Umgerechnet enthält jedes 24ste VLDL ein ApoA-V-Molekül [Merkel und Heeren 2005]. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass ApoA5 überwiegend mit den Lipoproteinen VLDL, HDL und Chylomikronen assoziiert ist [Pennacchio et al. 2002; O'Brien et al. 2004; Alborn et al. 2006]. Die Assoziation des ApoA5 mit dem HDL wird als eine Reservoirfunktion verstanden, so wie es bei anderen Apolipoproteinen auch der Fall ist. Nimmt die Konzentration triglyzeridreicher Lipoproteine nach einer fettreichen Mahlzeit zu, kann man eine zunehmende Translokation der ApoA5-Proteine auf die Chylomikronen und VLDL beobachten. Die bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen zeigen stark differierende Ergebnisse, so dass der Zusammenhang des ApoA-V im Lipidstoffwechsel nicht vollständig verstanden zu sein scheint. In humanem und Wild-Maus-Plasma konnte eine positive Korrelation zwischen dem ApoA-V und dem TG-Spiegel beobachtet werden [Alborn et al. 2007; Dallinga-Thie et al. 2006; Hennemann et al. 2007; Schaap et al. 2006; Talmund et al. 2006; Vaessen et al. 2006]. Allerdings zeigten transgene Mäuse mit dem menschlichen ApoA-V eine entgegengesetzte Korrelation. Transgene Mäuse, denen hingegen ihr eigenes ApoA5-Gen fehlte, zeigten wiederum eine positive Korrelation. Neben diesen Beobachtungen gibt es eine Reihe von Erkrankungen, bei denen man eine Korrelation zwischen ApoA-V-Mutationen und der Ursache der Erkrankungen wie z.B. KHK [Lai et al. 2004; Klos et al. 2005; Chen et al. 2009; Jang et al. 2009; Hsu et al. 2009; Sarver et al. 2010; Kim et al. 2011], metabolischem Syndrom [Grallert et al. 2007; Dorfmeister et al. 2008; Qiao et al. 2008; Hsu et al. 2008; Chien et al. 2009], Diabetes mellitus Typ-2 [Qiao et al. 2008], Fettleibigkeit [Corella et al. 2007], Arteriosklerose der Aorta [Laurila et al. 2009] und der Arteria Carotis [Elosua et al. 2006; Chien et al. 2009] vermutet. Es gibt verschiedene Faktoren, die die Bildung des ApoA5 entweder induzieren oder zu einer Repression führen. Insulin und das Schilddrüsenhormon führen zu einer Abnahme der Genexpression des ApoA5 [Nowak et al. 2005; Prieur et al. 2005]. Auch über die Beeinflussung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie das PPAR α [Vudac et al. 2003; Prieur et al. 2003], FXR [Prieur et al. 2003], ROR α [Genoux et al. 2005],

HNF4 α [Prieur et al. 2005], TR β [Prieur et al. 2005] wurde eine Veränderung der ApoA-V-Genexpression und eine konsekutive Erhöhung der mRNA festgestellt.

Das humane ApoA5 besteht aus 366 Aminosäuren (AS) und weist eine auffällige Homologie zum humanen ApoA4 auf [Pennacchio et al. 2001]. Als ausgereiftes Protein besteht das ApoA5 aus insgesamt 343 AS. Es ist ein 39 kDa schweres, als Monomer vorliegendes hydrophobes [Alborn et al. 2006] Protein mit amphiphatischer α -helikaler Sekundärstruktur, das ausschließlich von der Leber produziert und sezerniert wird. Die Gruppe von Sun et al. unterteilt das ApoA-V in sechs Regionen, die jeweils separate Bindungsregionen für verschiedene Enzyme oder Rezeptoren ergeben [Sun et al. 2006]. Die Interaktion mit Heparin und den Rezeptoren LRP1 und SorLa beispielsweise geschieht über eine 42 AS lange Region 186-227 [Nilsson et al. 2007]. Die Region, die Lipide bindet und die LPL-Aktivierung ermöglicht, wird von den AS 192-238 gebildet (siehe Abbildung 3). Das C-terminale Ende des Proteins ermöglicht die Bindung mit Lipiden und somit Löslichkeit in wässriger Lösung als Ganzes im Lipoprotein [Beckstead et al. 2007]. Hingegen das N-terminale Ende, gebildet von den AS 1-146, ermöglicht die Löslichkeit in der hydrophilen Lösung durch Bindung an Lipoproteine, wobei eine stärkere Bindung an das HDL beobachtet wurde [Wong-Mauldin et al 2009].

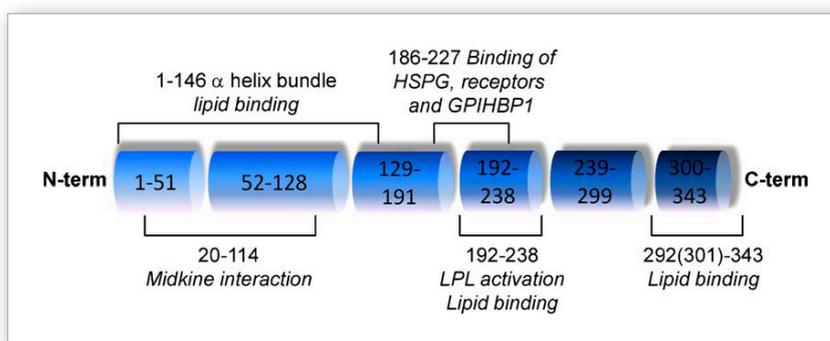


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Apolipoprotein A5 nach Nilsson et al.
Dargestellt ist das gesamte ApoA5-Lipoprotein mit seinen verschiedenen Bindungsstellen.

Bei der Frage wie das ApoA5 funktioniert, gibt es verschiedene Hypothesen, an Hand derer man den Einfluss dieses Apolipoproteins auf den Lipidstoffwechsel zu erklären versucht. Grundsätzlich kann man Mechanismen, die intrazellulär von extrazellulär stattfindenden, unterscheiden. 2004 zeigten Schaap et al., dass durch die Überproduktion vom ApoA5 eine Veränderung in der VLDL-Produktion der Leber resultiert. Hierbei geht aus den Untersuchungen hervor, dass sich nicht die Anzahl, sondern die Größe der VLDL veränderte. Andererseits gibt es Untersuchungen an ApoA5-transgenen und Knockout-Mäusen, die keine Auswirkung auf die

VLDL-Produktion zeigten [Fruchart-Najib et al. 2004; Merkel et al. 2005]. Der wahrscheinlich am ausführlichsten untersuchte Mechanismus unter denen, die extrazellulär stattfinden, ist die Hypothese, dass das ApoA5 als Aktivator der LPL fungiert. Die Untersuchungen von Merkel et al. (2005) und Merkel & Heeren (2005) zeigten, dass die Aktivität der LPL erhöht wird, indem das ApoA5 die Bindung des TG-reichen Lipoproteins (VLDL oder CM) an die endothelständige Lipoproteinlipase begünstigt. Auch die Gruppen von Fruchart-Najib et al. (2004) und von Schaap et al. (2004) konnten eine erhöhte Clearance der TG-reichen Lipoproteine nachweisen. Die Arbeitsgruppe von Lookene et al. (2005) konnte nachweisen, dass das ApoA5 an das Heparin bindet und somit wie oben auch schon beschrieben einen begünstigenden Effekt darstellt. Es gibt auch Untersuchungen, die eine positive Korrelation zwischen dem ApoA5 und dem Plasma-TG-Spiegel behaupten [Vaessen et al. 2009]. In einer weiteren Versuchsreihe fand man heraus, dass das ApoA5 und ApoC-III in entgegengesetzter Richtung, voneinander unabhängigen Lipidstoffwechsel beeinflussen [Aalto-Setälä et al. 1992; Baroukh et al. 2004; Schaap et al. 2006]. Hierzu wurden, wie aus den Untersuchungen von Baroukh et al. hervorgeht, Doppel-Knockout-Mäuse und zweifach transgene Mäuse generiert. Es zeigte sich, dass die Plasma-TG-Spiegel entsprechend der Wildtyp Kontrollgruppe verhielten, woraus man schließen konnte, dass das ApoA5 und ApoC-III wie oben beschrieben in entgegengesetzter Weise den Plasma TG-Spiegel beeinflussen.

Das ApoC-III ist ein von der Leber und dem Dünndarm sezerniertes Polypeptid und auch Bestandteil des HDL, VLDL, und der Chylomikronen [O'Brien et al. 2004; Alborn et al. 2006]. Bemerkenswert ist, dass das ApoA5 hierbei eine zweitausendfach niedrigere Konzentration zeigt als das ApoC-III oder ApoA-I [Merkel & Heeren 2005]. Der positiven Korrelation hoher Triglyzeridspiegel im Plasma mit hohen ApoC-III Werten [Ito et al. 1990] liegt die Hemmung der Lipoproteinlipase, der hepatischen Lipase und der Hemmung der Aufnahme der triglyzeridreichen Partikel zugrunde [Kinunen und Ehnolm 1976; Kraus et al. 1973; McConathy 1992].

Die Verhinderung der LDL-Rezeptor-vermittelten Aufnahme des TG-reichen Lipoproteins wird durch die Dislokation des ApoE vermittelt [Narayananaswami et al. 2004].

Insgesamt konnte eine positive Korrelation zwischen der LPL-Aktivität und dem TG-Spiegel bei gesunden und diabetischen Menschen und auch im Tierversuch gezeigt werden [Ginsberg et al. 1986; Marz et al. 1987; Ito et al. 1990; Shoulders et al. 1991; van der Ham et al. 2009]. Pennacchio et al. (2001) zeigten bei in vivo Analysen an humanem ApoA5-transgenen Mäusen einen Abfall der TG im Plasma um 66 %. Außerdem konnten sie bei apoA-V-Knockout-Mäusen einen vierfach höheren TG-Spiegel nachweisen. Ergänzend zu den Ergebnissen der Knock-out-Mäuse konnten Untersuchungen von Grosskopf et al. eine verminderte Aktivität der LPL nachweisen. Hierbei geht man davon aus, dass die TG-reichen Lipoproteine ohne das ApoA5 eine geringere Affinität zur LPL zeigen [Grosskopf et al. 2005]. In den Untersuchungen von Grosskopf et al. zeigten sich erhöhte TG-Spiegel mit niedrigeren LDL-Spiegeln. Ein Ergebnis – welches den Einfluss der TG-Spiegel durch die LPL vermittelte Hydrolyse unterstützt – ist, dass in

der Gruppe von Merkel et al. keine Veränderungen in der hepatischen Produktionsrate der VLDL und die unveränderte intestinale Lipidabsorption nachgewiesen werden konnte [Merkel et al. 2005].

1.7 INSULINRESISTENZ UND LIPOPROTEINSTOFFWECHSEL

Ein sich immer weiter ausbreitendes Problem unserer Zeit ist die Zunahme von Krankheiten, die auf bestimmte langfristige Lebensgewohnheiten zurückzuführen sind. So birgt ein ungesundes Essverhalten und mangelnde Bewegung ein hohes Risiko an Krankheiten wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Adipositas und Artherosklerose zu erkranken. Selbstverständlich gibt es unter diesen Erkrankungen auch stets einige, die durch eine genetische Disposition bedingt sind.

Der erste und grundlegende Mechanismus zur Entstehung eines Diabetes Typ-2 ist die Insulinresistenz. Hierbei handelt es sich um die verminderte Wirkung des Insulins, die aber für viele Vorgänge wie z. B. Glukosetransport oder Hemmung von Enzymen wie die hormonsensitive Lipoproteinlipase (LPL) des Fettgewebes verantwortlich und essentiell ist. Da durch die verminderte Wirkung des Insulins nicht genügend Glukose in die peripheren Gewebe, wie Muskelgewebe und Fettgewebe, aufgenommen werden kann, kommt es zu Folgeaktionen, die den Stoffwechsel in einen „circulus vitiosus“ einmünden lassen. Neuste Untersuchungen zeigen bei Insulinresistenten Patienten eine schädigende Wirkung des niedrigen HDL-Cholesterins auf die Funktion der β -Zellen des Pankreas [Bardini et al. 2011]. Aufgrund der hohen Blutglukosekonzentration wird weiter vermehrt Insulin ausgeschüttet. Die Folge ist eine Erhöhung der Insulinsekretion. Anfangs ist der Körper noch in der Lage, dieses Missverhältnis von Insulinsekretion und Insulinwirkung durch die erhöhte Insulinausschüttung zu kompensieren. Doch kommt es durch die dauerhaft bestehende Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und Hyperlipidämie zur Schädigung der Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas. Sind die β -Zellen soweit geschädigt, dass eine Kompensation der verminderten Wirkung nicht erreicht werden kann, spricht man von einem manifesten Typ-2-Diabetes. Die Insulinresistenz hat nicht nur Folgen auf den Glukosehaushalt, sondern auch auf den Lipidstoffwechsel. Typische Veränderungen bei Typ-2-Diabetikern zeigen sich im Profil ihres Fettstoffwechsels: Hypertriglyzeridämie, erhöhte VLDL, erniedrigte HDL und vermehrtes Auftreten der LDL [Hsieh et al. 2008]. Bei der Frage, wie es zu den Veränderungen des Lipoproteinstoffwechsels im Rahmen der Insulinresistenz kommt, gibt es verschiedene Mechanismen, deren Ausfall alle zu der Dyslipidämie beitragen. Durch die mangelnde Insulinwirkung kommt es bereits in kurzem präprandialem Hunger zu einer fastenähnlichen Situation. Da das Insulin nicht mehr am Fettgewebe wirken kann, wird hier auch nicht mehr die Freisetzung von Fettsäuren durch Hemmung u. a. der hormonsensitiven Lipase (HSL) unterdrückt [Duez et al. 2008]. Konsekutiv kommt es zu einer Erhöhung der Konzentration der freien Fettsäuren. Die freien Fettsäuren gelangen an Gewebe wie Leber und Darm, wo sie sti-

mulierend auf die Produktion triglyzeridreicher Lipoproteine wirken. Die Beobachtung, dass der Darm auch im Hungerzustand bei Typ-2-Diabetikern Chylomikronen bildet und somit zur Hyperlipidämie beiträgt, wirft auf dieses Organ in seiner Funktion bzw. Fähigkeit ein ganz neues Licht.

Nehmen wir Nahrung zu uns, kommt es physiologischerweise in der postprandialen Phase zur Bildung von Chylomikronen. Diese transportieren die verdauten, emulgierten und im Enterozyten wieder reesterter Triacylglyceride über den ductus cysticus in den linken Venenwinkel und Blutkreislauf. Auch in dieser Phase gibt es Auffälligkeiten bezüglich des Lipid-Profiles. Die Insulinresistenz ist mit hohen postprandialen VLDL und Chylomikronen-Konzentration zu sehen. Man vermutet, dass es durch die mangelnde Wirkung des Insulins zur Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe kommt, die ihrerseits die VLDL Produktion in der Leber anregen [Annuzzi et al. 2004]. Außerdem geht man davon aus, dass es durch das dauerhafte Überangebot von Nahrung bei Typ-2-Diabetikern, es zu einer insgesamt erhöhten Resorption von Triglyzeriden kommt und diese somit zur Hyperlipidämie beitragen [Duez et al. 2008]. Auf molekularer Ebene erkannten Laatsch et al. im Mausversuch, dass die Aufnahme von Chylomikronen-Remnants über das LDLR-related Protein 1 (LRP1) aufgrund der Insulinresistenz vermindert ist. Erst die vollständige Insulinwirkung ermöglicht die vermehrte Translokation des LRP1 in die hepatische Plasmamembran und somit die effiziente Aufnahme von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen [Laatsch et al. 2009]. Außerdem stellt sich in den Untersuchungen von Merkel et al. heraus, dass die Expression und Translokation der LPL durch das Insulin aktiviert wird [Merkel et al. 2002].

Das sogenannte MTP (Microsomal Triglyzeride Protein) ist essentiell für die VLDL-Produktion in der Leber und der Chylomikronen in der Darmmukosa. Die Aktivität des MTP-Promoters wird durch Insulin unterdrückt und durch Fett und Cholesterin erhöht. Wenn es nun im Rahmen einer Insulinresistenz zu einer verminderten Hemmung der Aktivität des MTP-Promoters kommt, kommt es konsekutiv zu einer Erhöhung des MTP und somit zu einer Lipidämie, die in einem Tierversuch an Mäusen festgestellt werden konnte [Phillips et al. 2001]. Untersuchungen an Zellkulturen und Nagern lassen vermuten, dass die ApoC-III Produktion durch die Insulinresistenz angeregt wird. Durch die Funktion des ApoC-III, nämlich die LPL zu hemmen, kommt es auch zu einer Erhöhung der VLDL [Cohn et al. 2004]. Einen weiteren Focus der Wissenschaft stellt die Herstellung und Sekretion des VLDL in der Leber dar. Noch bevor die Leber die VLDL sezerniert, besteht die Möglichkeit, posttranskriptional und posttranslational den VLDL-Bildungsprozess zu beenden. Hat die Leber jedoch zu viele Lipide, ist dieser Regulationsmechanismus auch gehemmt und trägt somit zur Hyperlipidämie bei [Davis et al. 1999; Oloffson et al. 2000; Fischer et al. 2002].

Das Zytokin TNF- α , gebildet zur frühen Abwehr und Entzündung, scheint bei der Entstehung der Dyslipidämie auch eine Rolle zu spielen. Im Tierversuch stellten Hsieh et al. fest, dass es

durch die Behandlung mit TNF- α zur herabgesetzten Phosphorylierung des Insulinrezeptors und IRS1 kommt. Andererseits kam es bei diesen Tieren zu einer Zunahme des p38, ERK1/2 der JNK, was wiederum bei der erhöhten Produktion des p38 zu einer Überproduktion von in der Darmmukosa gebildeten Triglyzeriden führt [Hsieh et al. 2008]. Auch von besonderer Bedeutung ist die Veränderung des HDL-Cholesterinspiegels. HDL, das normalerweise für den Transport des Cholesterins aus peripheren Geweben in die Leber zuständig ist, ist bei Insulinresistenten und Diabetikern typischerweise erniedrigt. Bei der Erklärung dieser Beobachtung, geben Wissenschaftler anhand von Untersuchungen dem Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP) eine besondere Rolle. Dieses Enzym, welches normalerweise die Funktion hat, veresterte Lipide konzentrationsmäßig anzugleichen, greift bei Menschen, die aufgrund ihrer Erkrankung eine Dyslipidämie haben, sehr zu ihrem Nachteil ein. Durch die dauerhafte Hypertriglyzeridämie (in Form von VLDL und Chylomikronen) kommt es dazu, dass vermehrt Triglyzeride an die HDL und Cholesterylester von den HDL an die VLDL- und Chylomikronen-Remnants transferiert werden [Alessandro et al. 2009; Tsompanidi et al. 2009; Goldberg J. Ira 2009; Gary et al. 2005]. Durch die Beladung der Remnants mit Cholesterinestern erlangen sie eine geringere Affinität zu ihrem Rezeptor, womit die Clearance dieser Partikel verzögert wird. Die mit Triglyzeriden beladenen HDL werden schneller eliminiert und können ihrer Funktion des reversen Cholesteroltransportes nicht mehr nachgehen. Untersuchungen zufolge sollen die mit Cholesterinestern beladenen VLDL-Remnants noch proatherogener sein als das gesunkene HDL [Van der Weij et al. 2009].

1.8 FRAGESTELLUNG

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Triglyzerid-Konzentration im Plasma ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der koronaren Herzkrankheit darstellt. Bei der Entstehung einer weiteren komplex-genetischen Erkrankung, dem metabolischen Syndrom, spielt die Hypertriglyzeridämie ebenfalls eine maßgebliche Rolle. Das metabolische Syndrom ist u. a. gekennzeichnet durch das Auftreten einer Insulinresistenz und einer gestörten Glukosetoleranz. Das erstmalig im Jahre 2001 über komparative Genomanalysen entdeckte Apolipoprotein A5 (ApoA5) konnte sowohl in Mausmodellen als auch beim Menschen als wichtiger Regulator für die Triglyzerid-Konzentration identifiziert werden.

Ziel der Arbeit war es, in einem Kollektiv von 40 gesunden Nachkommen von Patienten mit Typ-2-Diabetes mellitus den postprandialen Lipoproteinstoffwechsel zu charakterisieren und im Zusammenhang mit der ApoA5-Plasma-Konzentration zu korrelieren.

2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1 PATIENTENGRUPPEN

Frühe Veränderungen einer Insulinresistenz und deren Rolle im postprandialen Lipidstoffwechsel während der Insulinresistenz-Entwicklung sind bisher nicht genügend erforscht. Aus diesem Grunde untersuchten wir den Verlauf der Plasmalipide nach oralem Fetttoleranztest und oralem Glukosetoleranztest an gesunden Probanden mit unterschiedlichem Grad an Insulinsensitivität aus Nachkommen einer Typ-2-Diabetes-Kohorte.

Nachkommen an Typ-2-Diabetes erkrankter Menschen haben ein erhöhtes Risiko, eine Glukoseintoleranz, Diabetes oder andere metabolische Krankheiten zu entwickeln. Da man weiß, dass unter ihnen ein überdurchschnittlicher Anteil insulinresistenter Personen sind, eignen sich diese besonders zur genaueren Identifizierung neuer Zusammenhänge bezüglich metabolischer Erkrankungen. Unser Ziel war es, Zusammenhänge zwischen dem TG-Verlauf während eines OGTT, OFTT und der Insulinresistenz, sowie dem metabolischem Syndrom und Lipoprotein-stoffwechsel zu untersuchen.

92 scheinbar gesunde, nichtrauchende Nachkommen von einem oder zwei an Typ-2-Diabetes erkrankten Eltern wurden über Zeitungsanzeigen sowie einer Patienten-Datenbank rekrutiert. Diese Patienten wurden im Bethanien Krankenhaus Hamburg registriert. Die Ausschlusskriterien für die Teilnehmer waren wie folgt:

- 1) Diabetes mellitus
- 2) Krebserkrankungen
- 3) Nierenerkrankungen
- 4) Schlaganfall oder Herzinfarkt
- 5) Glukokortikoidbehandlug
- 6) Lipidsenkende oder antihypertensive Therapeutika
- 7) Schwangerschaft
- 8) jünger als 18 Jahre oder älter als 70 Jahre

Ein Proband wurde aufgrund eines TG-Spiegels von 400 mg/dl aus der Studie ausgeschlossen. Somit wurden in die Studie insgesamt 91 Patienten einbezogen. Das Studienprotokoll wurde von der lokalen Ethikkommission akzeptiert und alle Probanden gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung. Zur Zeit der Einschreibung unterzogen sie sich einigen medizinischen Untersuchungen, hierbei wurde auch der Blutdruck ermittelt. Der BMI wurde aus einem Verhältnis des Bauch- und Hüftumfang ermittelt. Blutproben wurden am Morgen nüchtern und zwei Stun-

den nach einer Einnahme von 75 g Glukose (300 ml Dextro O.G.-T., Roche Diagnostics) entnommen.

Eine Untergruppe der Studie wurde ein zweites Mal untersucht. Nach nächtlichem Fasten hatten sie die Wahl zwischen drei fettreichen Frühstücksmahlzeiten mit unterschiedlichen Proteinquellen (Käse mit Wurst oder Eiern) mit insgesamt 1.100 Kalorien – davon 12,2 bis 13,3 % Proteine, 39,6 bis 40,4 % Kohlenhydrate, 46,6 bis 47,9 % Fett. Blutproben wurden unmittelbar vor der Testmahlzeit, nach zwei und vier Stunden entnommen. Die dargestellten postprandialen Ergebnisse sind unabhängig von der Wahl der Mahlzeit. In die Auswertung dieser Arbeit sind die Daten von insgesamt 40 Probanden eingegangen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 44,275 Jahre (Streuung 19 bis 65). In der ersten Gruppe wurden elf Personen zusammengefasst, die aus drei Männern und acht Frauen bestand. Die Einschlusskriterien in diese Gruppe waren ein niedriger BMI sowie ein niedriger HOMA-Index. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe betrug 47,81 Jahre (Median 49; Streuung 23 bis 65). Die zweite Gruppe wurde aus neun Probanden gebildet. Hiervon waren vier Männer und fünf Frauen. Die Mitglieder dieser Gruppe hatten einen niedrigen BMI, aber einen hohen HOMA-Index. Das mittlere Alter betrug 41,1 Jahre (Median 43; Streuung 19 bis 59). In die dritte Gruppe wurden neun Probanden eingeschlossen, hiervon waren vier Männer und fünf Frauen. Alle Probanden dieser Gruppe hatten einen hohen BMI und niedrigen HOMA-Index. Das mittlere Alter lag bei 48,1 Jahren (Median 50; Streuung 32 bis 62). Die letzte Gruppe bestand aus elf Probanden, die aus fünf Männern und sechs Frauen bestand. Die Einschlusskriterium für diese Gruppe waren ein hoher BMI und ein hoher HOMA-Index. Das mittlere Alter dieser Gruppe betrug 40,18 Jahre (Median 38; Streuung 25 bis 62).

Basierend auf den Daten der ersten Studie wurden die Probanden entsprechend ihrer HOMA- und BM-Indizes aufgeteilt (Tabelle 3). Tabelle 4 zeigt die Berechnung des BMI und dessen klinische Bedeutung. Tabelle 5 zeigt entsprechend die Berechnung des HOMA-Index und dessen Interpretation.

Tabelle 3: Studiengruppeneinteilung der 40 Probanden nach BMI und HOMA-Index

Probanden (n=40)	BMI	HOMA-Index
Gruppe 1 3 Männer, 8 Frauen	Niedrig (18,3-22,4)	Niedrig (0,4-1,4)
Gruppe 2 4 Männer, 5 Frauen	Niedrig (20,7-25)	Hoch (0,2-2,4)
Gruppe 3 4 Männer, 5 Frauen	Hoch (25-28)	Niedrig (0,4-1,6)
Gruppe 4 5 Männer, 6 Frauen	Hoch (27-35)	Hoch (1,6-4,9)

Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen den tatsächlich gemessenen Indizes.

Tabelle 4: Body Mass Index (BMI) und dessen klinische Interpretation

BMI = $\frac{\text{Körpergewicht in kg}}{(\text{Körperlänge in m})^2}$	Kategorie
Normale Werte	Normalgewicht
Werte zwischen 25-30 kg/m ²	Übergewicht
Werte zwischen 30-35 kg/m ²	Adipositas Grad 1
Werte zwischen 35-40 kg/m ²	Adipositas Grad 2
Werte über 40 kg/m ²	Massives Übergewicht Grad 3

Der Body Mass Index (BMI) definiert das Verhältnis von Körpergewicht in kg zu Körperlänge in m².

Tabelle 5: Homeostasis Model Assessment (HOMA-Index) und dessen klinische Interpretation

HOMA-Index = Insulin (nüchtern, µU/ml) x Blutzucker (nüchtern, mg/dl) / 405 = Insulin (nüchtern, µU/ml) x Blutzucker (nüchtern, mmol/l) / 22,5	Klinische Interpretation
≤ 1	Normal
> 2	Hinweis auf Insulinresistenz
> 2,5	Insulinresistenz sehr wahrscheinlich
> 5,0	Durchschnittswert bei Typ-2-Diabetikern

2.2 MATERIAL

2.2.1 Geräte

Geräte
Zentrifuge („3200“ Eppendorf)
Abstellbank für Reagenzgläser
Kühlschrank
Inkubator (Binder)
Photometer
Multikanalpipette
Pipette
Vortexer („Reax 1 DR“ Heidolph)
Schüttelinkubator
Waage
FPLC-Maschine

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien
Eppendorf-Tubes
Microtiterplatten
Microtiterstrips (Immuno-modules, Maxisorp, NUNC 469940)
Rahmen (NUNC 460348)
Deckel (NUNC 263339)

2.2.3 Antikörper und Proteine

Antikörper und Proteine
monoklonale Antikörper KL.229 (Charge 12/04)
monoklonale Antikörper KL. 87 (Charge 12/04)
polyklonaler Anti ApoA5
GARPO (Goat Anti Rabbit-Peroxidase Antikörper)
rekombinantes ApoA5 (Charge 5/06)

2.2.4 Chemikalien

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

Chemikalien	Inhaltsstoffe
H ₂ O bidest	
Coating Puffer	50 mM NaHCO ₃ , pH 9,6 (frisch angesetzt) (0,21 g pro 50 ml)
Blocking Puffer	PBS mit 30 g/l BSA (frisch) (1,5 g BSA ad. 50 ml PBS)
Verdünnungspuffer (Proben und Antikörper)	PBS mit 5 g/l Chaps und 3 g/l BSA (frisch) (0,25 g Chaps + 0,15 g BSA ad. 50 ml PBS)
Waschpuffer	ready-to-use (1mal) 0,5 % NaCl + 0,02% Tween 20 Bei RT bis 6 Monate haltbar
2M H ₂ SO ₄	110 ml H ₂ SO ₄ (95-97% Merck 10073) 810 ml H ₂ O
Entwicklung (für photometrische Messung)	25 ml H ₂ O + 1ml Substratpuffer + 1ml H ₂ O ₂ + 1ml TMB
Cholesterin CHOD-PAP	Enzymatischer in vitro Test
Triglyzeride GPO-PAP	Enzymatischer in vitro Test

2.2.5 Herstellung einiger Reagenzien

2.2.5.1 HRP-Substratpuffer

Bevor der Versuch durchgeführt werden kann, ist es erforderlich, zwei Wochen vorher den HRP-Substrat Puffer anzusetzen.

Probanden (n=40)	Konzentration	500 ml
Malonic acid (Fluka 63290)	1,30 M	67,64 g
Na-Acetate (Merck 1.06268)	0.60 M	24,61 g
NaOH (Merck 1.06495)	1,11 M	22,20 g

Die Substanzen werden in 400 ml H₂O gelöst und auf 500 ml aufgefüllt. Zwei Wochen lang werden sie bei 4°C gelagert. Während dieser Zeit setzt sich ein Präzipitat ab. Der klare Überstand wird vorsichtig dekantiert und anschließend zentrifugiert (1.000 g, 15 min.) oder filtriert. Bei 4°C kann man das Ganze lagern. Der Aliquot ist bei Raumtemperatur mehr als 1 Jahr haltbar.

2.2.5.2 0,2% H₂O₂

Zur Herstellung von 0,2% H₂O₂ werden 1,67 ml H₂O₂ (30% Merk, 1.07209) mit 250 ml H₂O vermischt. Aufbewahrt wird diese Flüssigkeit in einer schwarzen Plastikflasche bei 4°C. Der Aliquot ist bei Raumtemperatur mehr als 6 Monate haltbar.

2.2.5.3 0,3% Tetramethylbenzidin (TMB)

Es werden 0,75 g TMB (Sigma, T-2885) mit 250 ml 0,2 M malonic acid (die Herstellung wird unten beschrieben) verrührt. Im Dunkeln bei Raumtemperatur unter Rühren lösen. Der komplette Lösungsvorgang dauert ca. 2-3 Stunden. Die Lösung wird bei 4°C im Dunkeln gelagert. Ein Aliquot ist in einer schwarzen Flasche bei Raumtemperatur mehr als ein halbes Jahr haltbar.

2.2.5.4 0,2 M Malonic Acid

2 Wochen vor Gebrauch ansetzen!

20,81 g Malonic Acid (Fluka 63290) werden in 1.000 ml H₂O gelöst. Auch hier wird nach zweiwöchiger Lagerung durch dekantieren geklärt. Die klare Lösung wird in einer Glasflasche gelagert und mehr als ein Jahr haltbar.

2.3 METHODIK

Im zweiten Abschnitt der Studie bekamen die Probanden im Bethanien Krankenhaus – nachdem sie für die Untersuchung ihr Einverständnis gaben und über den Zweck der Untersuchungen bereits vor dem 1. Teil der Studie aufgeklärt wurden – ein standardisiertes fettreiches Frühstück. Die Blutentnahmen erfolgten unmittelbar, 2 Stunden und 4 Stunden nach dem Frühstück. Nach der letzten Blutentnahme (nach 4 Stunden) erfolgte die Abholung der Blutproben und weitere Verarbeitung im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Die Blutproben wurden zentrifugiert, um so das Plasma und das darin befindliche ApoA5 und die Lipoproteine zu gewinnen. Bevor das Plasma zur weiteren Auftrennung zentrifugiert wurde, hat man die Glukose-, Insulin-, Triglyzerid-, Cholesterin- und HDL-Werte ermittelt (siehe unten).

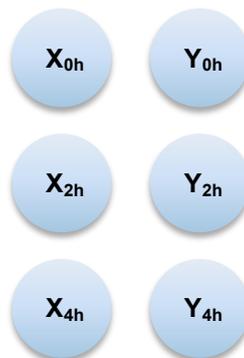
Anschließend wurden die einzelnen Plasmaproben in die FPLC-Maschine gegeben, welche die einzelnen Lipoproteinfraktionen nach ihrer Größe aufteilt. Ein Teil der so gewonnen Eluate wurde zur Bestimmung der Cholesterin- und Triglyzerid-Konzentration mittels enzymatischem Farbstest verwendet und der andere Teil zur Bestimmung der ApoA5-Konzentration mittels ELISA.

2.3.2 Methodik der FPLC

2.3.2.1 Auftrennung der Lipoproteine mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie)

Pro Tag wurden maximal zwei Probanden zur Blutentnahme bestellt. Ihnen wurde unmittelbar nach Gabe des standardisierten fettreichen Frühstücks sowie zwei und vier Stunden nach der Nahrungseinnahme Blut abgenommen. D. h. es standen pro Tag sechs Proben für die Untersuchung zur Verfügung. Zeitlich bedingt war es nicht möglich täglich mehr Probandenplasma zu untersuchen, da ein kompletter Durchlauf der drei Proben eines einzigen Probanden ca. acht Stunden in Anspruch nahm.

Beispielhafte Darstellung der an einem Tag ins Labor gebrachten Patientenproben (Proband X, Proband Y):



Zuerst wurden die sechs Plasmaproben fünf Minuten lang bei einer Geschwindigkeit von 13.000 rpm zentrifugiert. Die Temperatur in der Zentrifuge betrug 4°C. Hiernach wurden die Proben im Kühlschrank zwischengelagert. Die Probe, die in die FPLC-Maschine kam, wurde somit direkt aus dem Kühlschrank herausgenommen. Vor jedem Durchlauf wurde ein Reinigungsdurchlauf mit FPLC-Puffer durchgeführt. Um die Lipoproteine entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde die Gelfiltration nach der Methode von Rudel eingesetzt [Rudel et al. 1986]. Dazu wurde eine Fast protein liquid chromatography (FPLC)-Anlage (Amersham Biosence) mit einer Superose[®]-6-Säule verwendet, die einen für Plasmaproteine optimalen Trennbereich von 5-5.000 kDa besitzt. 200 µl des zuvor gepoolten Plasmas wurden auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min in FPLC-Puffer (10 mM Tris pH 8,0; 0,15 M NaCl und 10 mM EDTA) aufgetrennt. Das Probengemisch trennte sich durch die unterschiedliche Adhärenz der verschiedenen Komponenten an den Gelmolekülen. Das Eluat wurde in insgesamt 40 0,5-ml-Fractionen gesammelt und bei 4°C aufbewahrt. In den so gewonnenen Fractionen kann nun der Triglyzerid- bzw. Cholesteringehalt photometrisch bestimmt werden.

Von diesen 500 μ l Eluat wurden je 100 μ l für die Cholesterinmessung und je 100 μ l für die Triglyzeridmessung verwendet. Die restlichen 300 μ l pro Eppendorf-Tube wurden tiefgefroren und nach der Erstellung der FPLC-Profile für den ApoA5-ELISA verwendet.



Abbildung 4: Model einer FPLC-Anlage

2.3.2.2 Prinzip des Enzymatischen Farbtestes (Cholesterin CHOD-PAP)

Mit Cholesterinesterase und Cholesterinoxidase wird das Cholesterin enzymatisch bestimmt.



Die Cholesterinester wurden unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten.

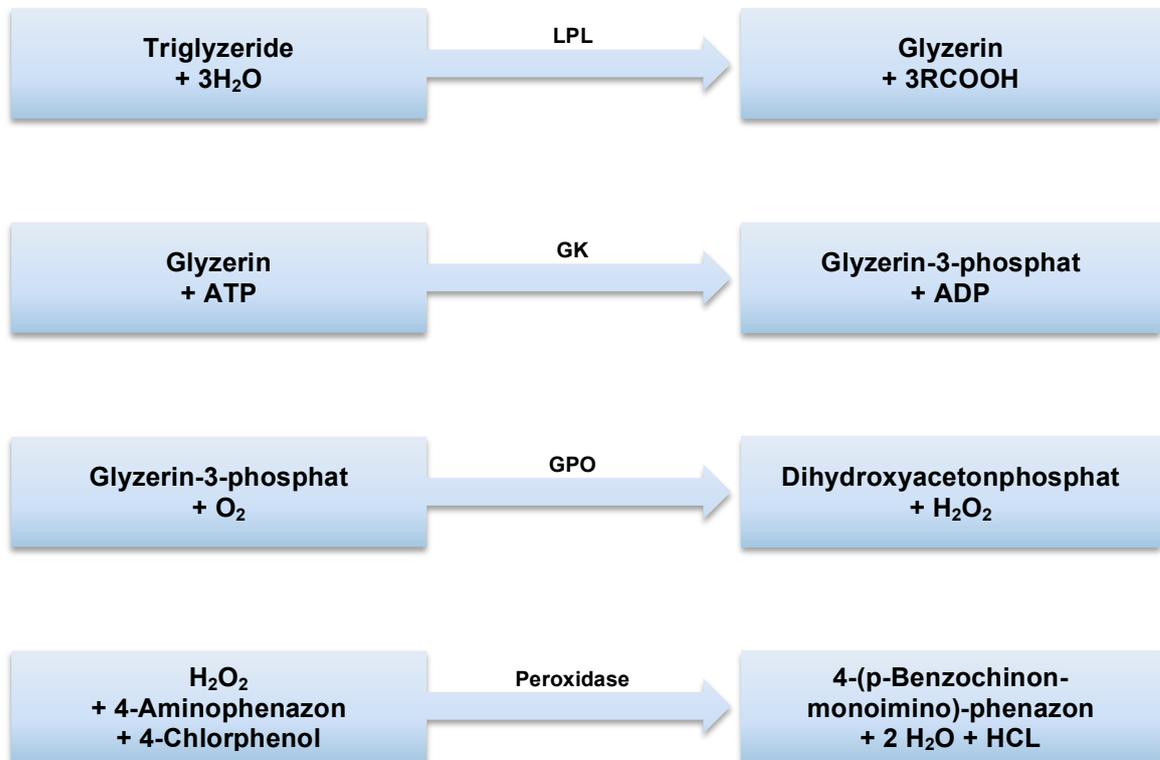


Das Cholesterin wird von Sauerstoff unter Mitwirkung von Cholesterinoxidase zu D4-Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt.



Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Proteinkonzentration und wird photometrisch gemessen.

2.3.2.3 Prinzip des Enzymatischen Farbtestes (Triglyzeride GPO-PAP)



Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlophenol einen roten Farbstoff. Auch hier ist die Farbintensität direkt proportional zur Proteinkonzentration und wird photometrisch gemessen.

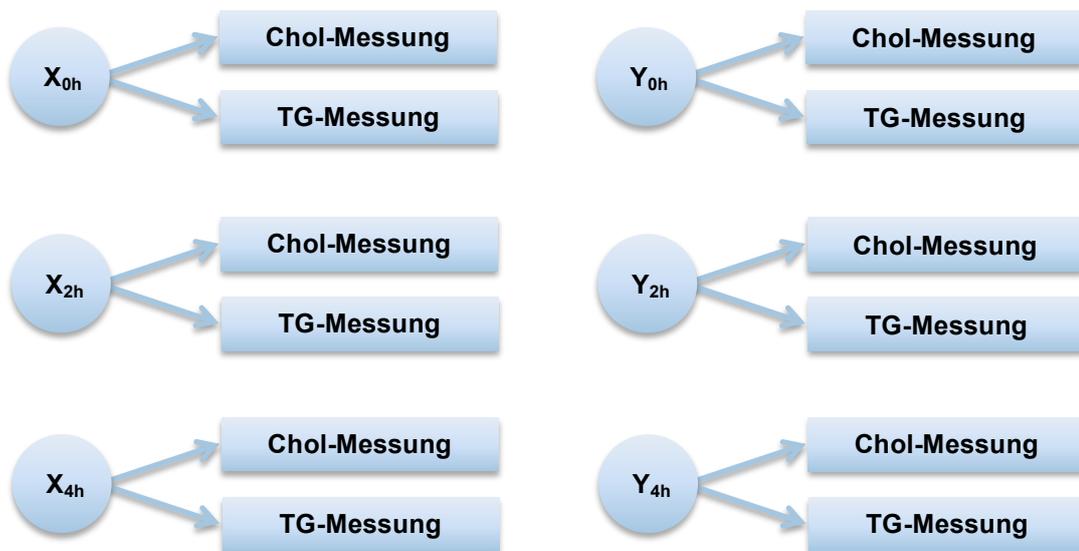


Abbildung 5: Schematische Darstellung der pro Proband durchgeführte Messungen
 Wie die Mikrotiterplatten kombiniert wurden, war nicht ausschlaggebend. Wichtig war, dass auf einer Platte entweder Chol- oder TG-Messungen durchgeführt wurden.

Wie man auf der Abbildung erkennen kann, werden für zwei Probanden insgesamt sechs Mikrotiterplatten pipettiert und photometrisch gemessen. Jede Platte wird für zehn Minuten bei 37°C in einen Inkubator hineingestellt. Danach kann bei einer Wellenlänge von 450 nm die photometrische Messung durchgeführt werden.

Die verbliebenen Reste in den Fraktionen (aus 2.3.2.1) wurden dann für den ApoA5 nötigen ELISA zu den Pools resuspendiert. Nach Möglichkeit sollten von jeder Fraktion eines Pools 200 µl genommen werden.

Nach folgendem Schema konnten dann die Lipoproteinprofile erstellt werden:

Tabelle 6: Entschlüsselung der Lipoproteine und ihre Fraktionen in der FPLC

Lipoproteine	Fraktion
Pool 1 (VLDL/Chylomikronen)	8, 9, 10
Pool 2 (LDL)	15, 16, 17, 18, 19
Pool 3 (HDL ₂)	23, 24, 25
Pool 4 (HDL ₃)	27, 28, 29, 30
Pool 5 (Albumin)	35, 36, 37

2.3.3 Methodik des ApoA5-ELISA

2.3.3.1 Coaten der Microtiter-Stripes mit 0,2 µg/Well AK

Im ersten Schritt werden die Böden der Microtiter-Stripes mit Antikörpern beschichtet. Hierzu wird erst einmal die dafür nötige Antikörper-Lösung hergestellt. Es werden 8 µl monoklonaler Antikörper KI. 229 der Charge 12/04 sowie 60 µl monoklonaler Antikörper KI.78 der Charge 12/04 in 36 ml NaHCO₃ Puffer gelöst. Nun werden 100 µl von der Antikörperlösung in jedes Well mit einer Multikanalpipette gegeben. Die Microtiter-Stripes mit den Antikörperlösungen werden bei 4°C über Nacht im Bakterienschüttler (Unitron Fa. Infors) gelassen. Am nächsten Tag kann die Platte vier Mal mit in jedem Well 300 µl Waschpuffer gereinigt werden.

2.3.3.2 Blockieren

Damit das Antigen (rApoA5) nicht auf dem Boden des Wells bindet und so falsche Resultate ermittelt werden, wird das Blocking-Puffer auf die Platte mit 300 µl pro Well gegeben und bei 37°C für mindestens 60 Minuten in den Schüttelinkubator gestellt (90 rpm). Anschließend wird die Platte lediglich ausgeschlagen.

2.3.3.3 Auftragung der Proben, Standards und Kontrollen

Zur Herstellung der Standardreihe werden 15 µl/ml rekombinantes ApoA5 (Charge 5/06) verwendet. 10 µl des Aliquots werden mit 90 µl Verdünnungspuffer (Resuspension 1) (1:10) resuspendiert. Hiervon werden 80 µl mit 920 µl Verdünnungspuffer resuspendiert (Resuspension 2).

Bevor es weitergeht werden acht Reagenzgläser (R₁₋₈) mit jeweils 400 µl Verdünnungspuffer aufgestellt. Im Folgenden sind die Inhalte der acht Reagenzgläser gezeigt:

R₁ = 120 µl (Resuspension 2) + 400 µl Verdünnungspuffer = Resuspension 3

R₂ = 60 µl (Resuspension 3) + 400 µl Verdünnungspuffer = Resuspension 4

R₃ = 30 µl (Resuspension 4) + 400 µl Verdünnungspuffer = Resuspension 5

R₄ = 15 µl (Resuspension 5) + 400 µl Verdünnungspuffer = Resuspension 6

R₅ = 7,5 µl (Resuspension 6) + 400 µl Verdünnungspuffer = Resuspension 7

R₆ = 3,75 µl (Resuspension 7) + 400 µl Verdünnungspuffer = Resuspension 8

R₇ = 0 µl (Resuspension 2) + 400 µl Verdünnungspuffer

R₈ = 0 µl (Resuspension 2) + 400 µl Verdünnungspuffer

Von den acht Reagenzgläsern werden der Reihe nach in jedes Well 100 µl in die ersten zwei Spalten der „Microtiterplatte“ gegeben (Doppelwerte).

In jedes Well werden nach dem 100 µl des humanen Plasmas gegeben. Zu beachten ist, dass auch hier wie bei der Standardreihe eine Probe in zwei Well gegeben wird, also Doppelwerte ermittelt werden. Die gesamte Platte wird nun in einen Schüttelinkubator (90 rpm) bei 37°C für mindestens 90 Minuten hineingestellt. Danach wird in jedes Well 300 µl Waschpuffer gegeben und die gesamte Mikrotiterplatte vier Mal gewaschen.

2.3.3.4 Inkubation mit polyklonalem Anti-ApoA5

Zur Inkubation mit polyklonalem Anti-ApoA5 werden 3 µl des Polyklonalem Antikörper in 15 ml Verdünnungspuffer resuspendiert (Endverdünnung 1:5.000). Hiervon werden in jedes Well 100 µl aufgetragen. Die Platte kann nun bei 37°C für eine Stunde in den Schüttelinkubator (90 rpm) gestellt werden.

An diesem Schritt des Versuches gelangen die Polyklonalen Antikörper an die Antigene (ApoA5), die ihrerseits schon an den ersten monoklonalen Antikörper gebunden sind. Nach einer Stunde im Schüttelinkubator werden wieder 300 µl Waschpuffer in jedes Well gegeben und die Mikrotiterplatte insgesamt drei Mal gewaschen.

2.3.3.5 Inkubation mit GARPO (Goat-Anti-Rabbit-Peroxidase-Antikörper)

Im nächsten Schritt werden die sekundären polyklonalen Antikörper mittels GARPO detektiert und gebunden. Die GARPO-Antikörper sind deswegen unerlässlich, weil sie das für die Farbreaktion nötige Enzym mitbringen und so die Extinktionsmessung erst ermöglichen.

Endverdünnung 1: 60.000

Vorverdünnung 1:100 (5 µl AK + 495 µl Verdünnungspuffer)

2. Verdünnung 1:600 (20 µl Vorverdünnung + 12 ml Verdünnungspuffer)

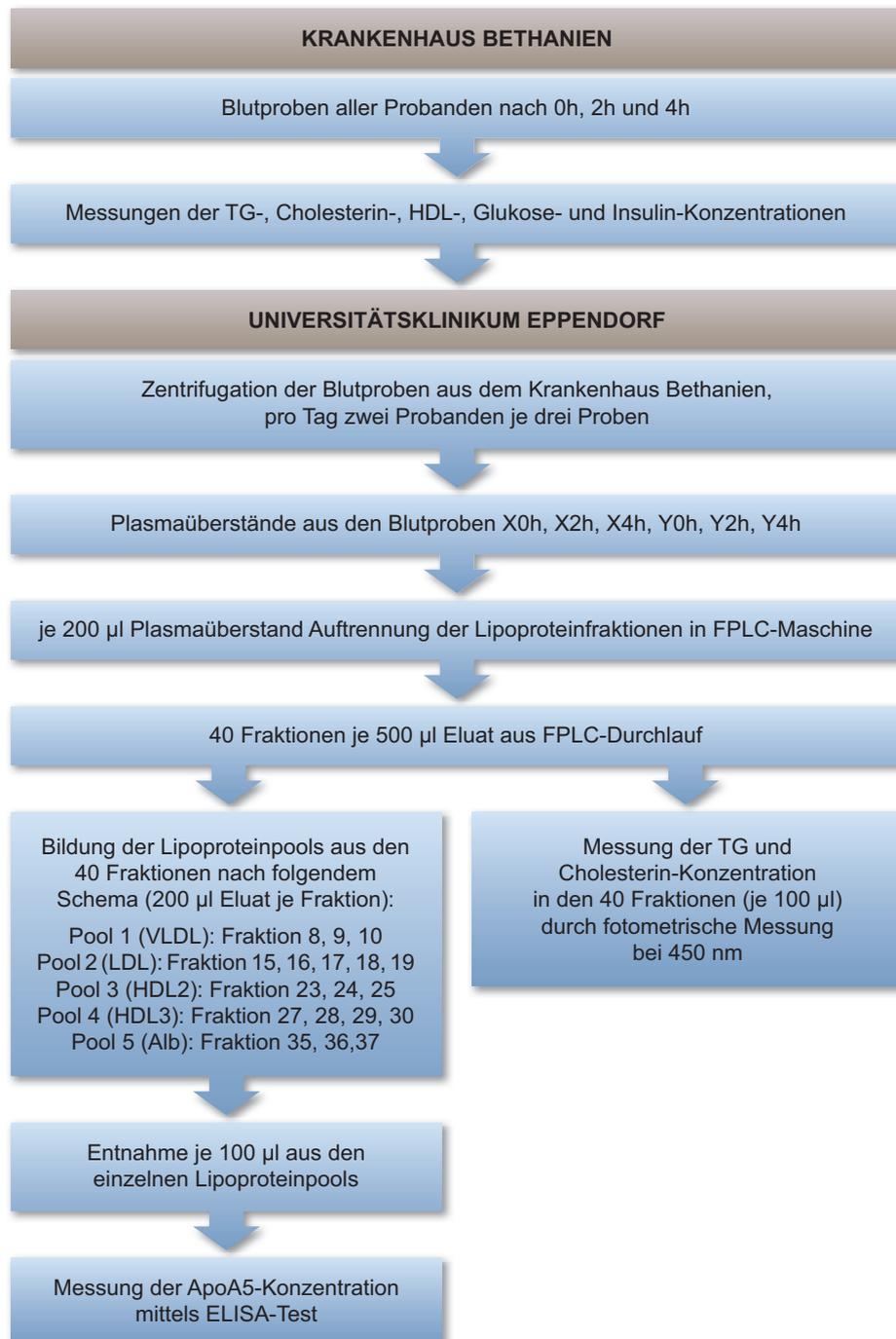
Je 100 µl werden pro Well der GARPO-Suspension aufgetragen und bei 37°C für 60 Minuten in den Schüttelinkubator (90 rpm) gestellt. Nach Ablauf der Zeit wird jedes Well mit 300 µl Waschpuffer insgesamt vier Mal gereinigt.

2.3.3.6 Entwicklung und photometrische Messung

Nach dem letzten Waschgang werden in jedes Well 250 μl Substratlösung gegeben. Die jetzt folgende zehnmünütige Inkubation findet lichtgeschützt bei Raumtemperatur unter einer Pappschachtel statt. Nach zehn Minuten, wenn es bereits zur Farbreaktion gekommen ist und sich ein blauer Farbstoff entwickelt hat, wird in jedes Well mit einer Multikanalpipette zügig die 2 M H_2SO_4 -Lösung gegeben. Durch die 2 M H_2SO_4 wird die Farbreaktion gestoppt. Nun kann bei 450 nm die Extinktion gemessen werden. Die Ergebnisse dieser Messungen werden im Kapitel 3.3 dargestellt.

2.4 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Im Folgenden ist der praktische Teil der vorliegenden Arbeit schematisch nach zeitlichem Ablauf (von oben nach unten) dargestellt.



3 ERGEBNISSE

3.1 LIPID- UND STOFFWECHSELPARAMETER VOR UND NACH OFTT

3.1.1 Plasma-Glukose-Messung

Das folgende Diagramm zeigt den Glukoseverlauf im Plasma der Probanden aller vier Gruppen unmittelbar nach dem fettreichen Frühstück, nach zwei Stunden und nach vier Stunden. Hierbei ist zu bemerken, dass eine Kurve in dem Diagramm den Mittelwert einer gesamten Probandengruppe, die jeweils aus neun bzw. elf Probanden besteht, darstellt. Wie oben gezeigt, sind es vier Gruppen, die nach den unterschiedlichen BMI und HOMA-Indizes aufgeteilt sind:

- 1) niedriger BMI, niedriger HOMA-Index (schwarz, 11 Probanden)
- 2) niedriger BMI, hoher HOMA-Index (blau, 9 Probanden)
- 3) hoher BMI, niedriger HOMA-Index (weiß, 9 Probanden)
- 4) hoher BMI, hoher HOMA-Index (rot, 11 Probanden)

Zu erkennen ist, dass bis auf eine leichte Erniedrigung des Glukosewertes in der Gruppe mit niedrigem BMI und hohem HOMA-Index (blau) ansonsten keine weiteren Auffälligkeiten vorliegen. Alle Werte befinden sich über die vier Stunden im Normbereich von 100 mg/dl.

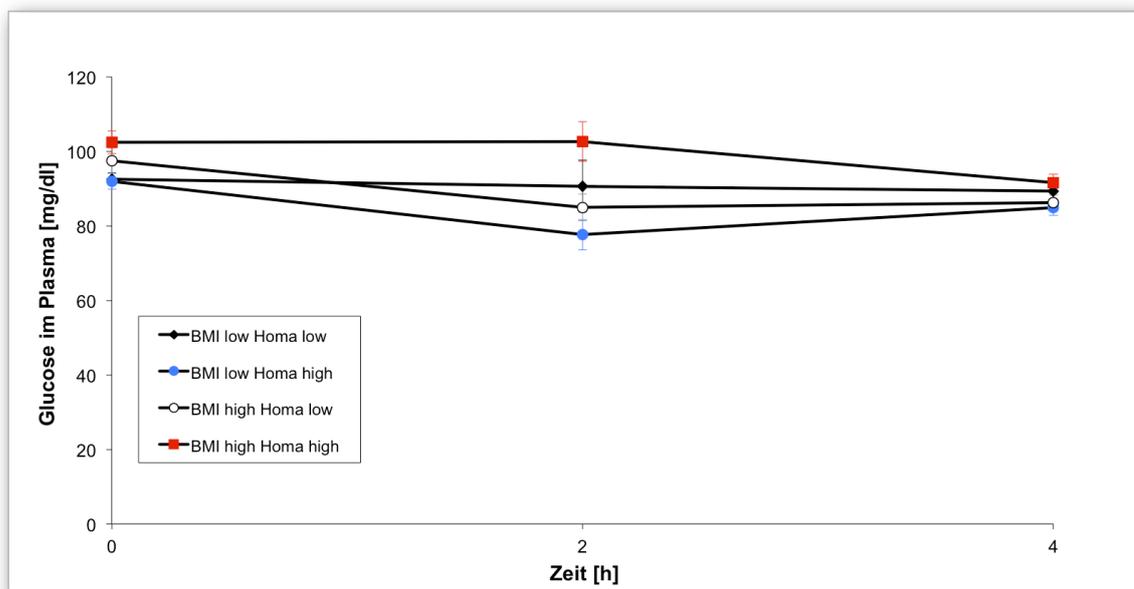


Abbildung 6: Messung der Glukose im Plasma

Alle vier Gruppen zeigen durchgehend normwertige Glukosewerte. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, 2 und 4 Stunden nach Gabe des fettreichen Frühstücks (n=40). Angegeben ist der Mittelwert der Proben +/- SEM (Standard Error of the Mean).

3.1.2 Plasma-Insulin-Messung

In dem nun folgenden Diagramm sehen wir den zum Glukoseverlauf von Abbildung 6 gehörenden Verlauf der Insulinkonzentration.

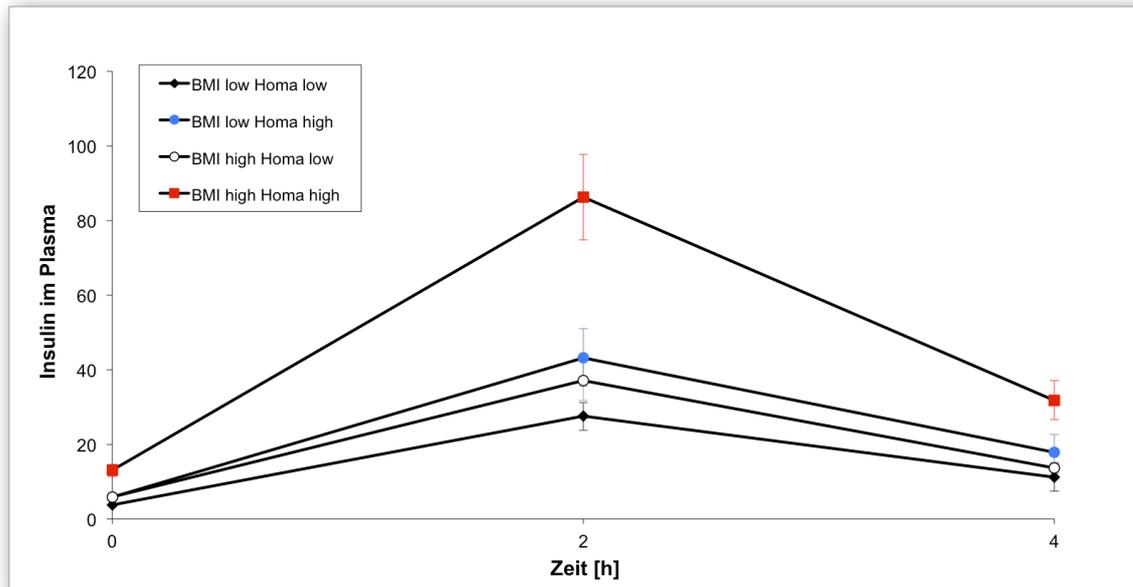


Abbildung 7: Insulinverlauf im Plasma

Gruppe 4 benötigt zur Senkung des Glukosespiegels in der zweiten Stunde doppelt so viel Insulin. Dieses kann als Zeichen einer Insulinresistenz gewertet werden. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, 2 und 4 Stunden nach Gabe des fettreichen Frühstücks (n=40). Angegeben ist der Mittelwert der Proben +/- SEM (Standard Error of the Mean).

Dargestellt ist die Insulinkonzentration im Plasma in $\mu\text{U/ml}$ in Abhängigkeit von der Zeit. Unmittelbar nach dem fettreichen Frühstück liegen die Insulinwerte aller Probanden im Normbereich – wobei man erkennen kann, dass der Anfangswert des Insulins in der Gruppe 4 (rot) höher ist als die Anfangswerte des Insulins in den restlichen Gruppen. Nach zwei Stunden kann man in allen Gruppen eine Erhöhung der Insulinkonzentration beobachten. Vor allem jetzt ist zu erkennen, dass die Gruppe 4 (rot) im Vergleich zu den anderen Gruppen einen doppelt so hohen Insulinwert von $86 \mu\text{U/ml}$ aufweist. Aufgrund des hohen BMI und HOMA-Index in der Gruppe 4 kann man davon ausgehen, dass die vergleichsweise hohe Insulinausschüttung ein Zeichen der Insulinresistenz ist. Da das Insulin seine Wirkung nicht voll erbringen kann, kommt es zu einem kompensatorischen Überschießen der Insulinsekretion. Nach vier Stunden sind die Werte der Gruppe 1, 2, und 3 auf Normwerte abgesunken, während die Insulinkonzentration in der vierten (rot) Gruppe noch einen Wert von $30 \mu\text{U/ml}$ hat. Auch dieser höhere Basalwert ist wahrscheinlich auf die (beginnende) Insulinresistenz zurückzuführen.

Zwar liegen die Gruppen 1, 2, und 3 im Normbereich, aber innerhalb dieser kann man zu jeder Zeit erkennen, dass Gruppe 1 (schwarz) die niedrigsten Werte hat. Dieses entspricht auch dem niedrigen BMI und HOMA-Index, weil das Insulin zu 100 % wirken kann. Da es durch die Insulinresistenz zu einer abgeschwächten Reaktion des Insulins auf das Fettgewebe und die Skelettmuskulatur kommt, kommt es im Fettgewebe zu einer verminderten Inhibition der hormonsensitiven Lipo-proteinlipase (HSL). Des Weiteren wird zur Induktion der Lipoproteinlipase (LPL) auch die Wirkung des Insulins benötigt. Beide Mechanismen verursachen eine postprandiale Hyperlipidämie, wie man im nächsten Diagramm erkennen kann.

3.1.3 Plasma-Triglyzerid-Messung

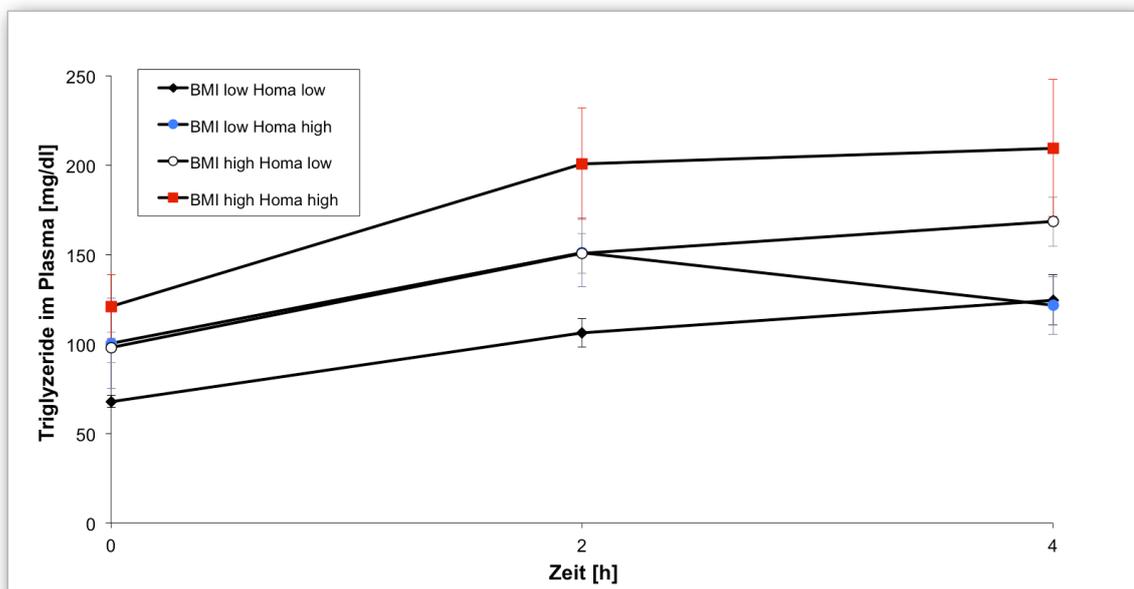


Abbildung 8: Messung der Triglyzerid-Konzentration im Plasma

Die Gruppe vier zeigt durchgehend hohe TG-Werte. Wahrscheinlich ist eine beginnende Insulinresistenz. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, 2 und 4 Stunden nach Gabe des fettreichen Frühstücks (n=40). Angegeben ist der Mittelwert der Proben +/- SEM (Standard Error of the Mean).

In dem vorliegenden Diagramm (Abbildung 8) sehen wir die Triglyzerid-Konzentration im Plasma – angegeben in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden. In der Gruppe 1 (schwarz) ist die TG-Konzentration zur Stunde null 67 mg/dl. Nach zwei Stunden nimmt die TG-Konzentration bis auf 106 mg/dl zu. Nach weiteren zwei Stunden kann man erkennen, dass sich die TG-Konzentration bei einem Wert von 124 mg/dl befindet.

Die TG-Konzentration der zweiten (blau) und dritten (weiß) Gruppe verhalten sich bis zur zweiten Stunde nach dem Frühstück relativ gleich. Beide Werte nehmen von einem Ausgangswert 100 mg/dl bis zu einem Wert von 150 mg/dl zu. In der vierten Stunde ist TG-Konzentration der zweiten Gruppe (blau) auf 121 mg/dl abgefallen. Da TG-Werte bis zu 150 mg/dl als normal gel-

ten, kann man davon ausgehen, dass in der ersten (schwarz) und der zweiten Gruppe (blau) die Messungen normwertig sind. In der dritten Gruppe (weiß) kommt es nach den zwei Stunden zu einem weiteren Anstieg der TG-Konzentration, der bis zu fast 170 mg/dl steigt. Bemerkenswerterweise kommt es in der zweiten Gruppe (blau) trotz der relativ hohen HOMA-Indizes zu einem Absinken des TG-Wertes. Die Ausgangskonzentration der vierten Gruppe (rot) ist im Vergleich zu allen anderen Ausgangswerten schon höher und liegt bei 120 mg/dl. Nach zwei Stunden liegt sie bei 200 mg/dl und in der vierten Stunde bei 209 mg/dl. Am deutlichsten ausgeprägt ist die Insulinresistenz in der vierten Gruppe (rot). Die durchgehend zu hohen TG-Werte kommen durch eine zu hohe Produktionsrate der VLDL bzw. durch einen verminderten Abbau TG-haltiger Remnants zustande.

3.1.4 Plasma-Cholesterin-Messung

In Abbildung 9 ist die Cholesterin-Konzentration im Plasma – angegeben in mg/dl, in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Auch diese Messungen wurden unmittelbar, nach zwei und nach vier Stunden nach fettreicher Frühstückseinnahme vorgenommen.

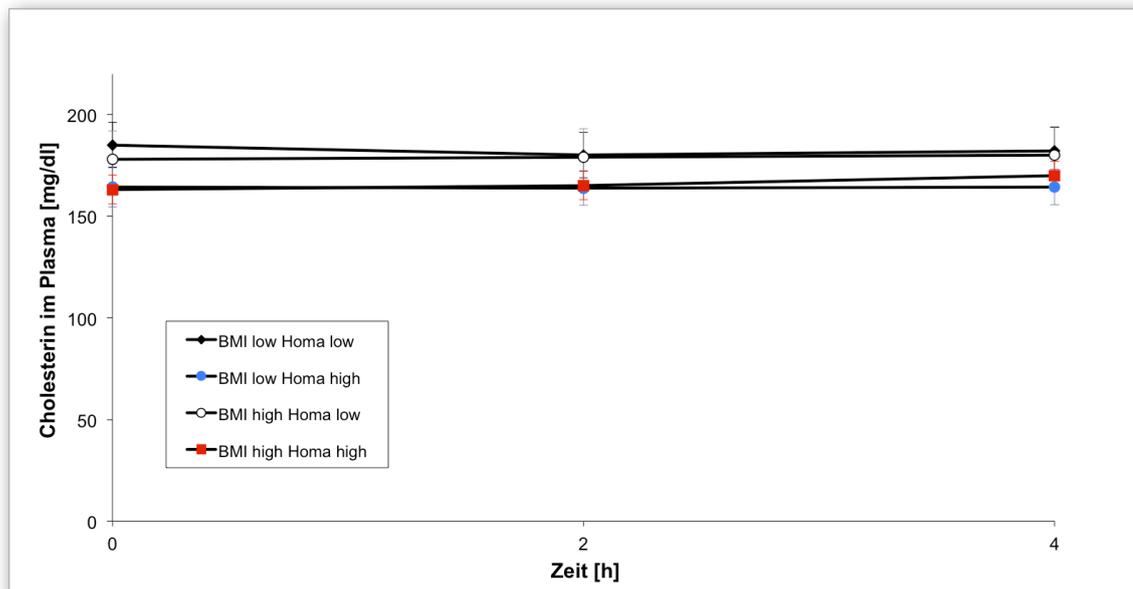


Abbildung 9: Cholesterin-Konzentration im Plasma

Die Cholesterinwerte sind in allen Gruppen durchgehend normwertig. Cholesterin wird exogen aufgenommen, aber auch endogen gebildet. Deswegen bleibt der Spiegel trotz Insulinresistenz konstant. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, 2 und 4 Stunden nach Gabe des fettreichen Frühstücks (n=40). Angegeben ist der Mittelwert der Proben +/- SEM (Standard Error of the Mean).

Die Cholesterin-Werte der ersten (schwarz) und dritten Gruppe (weiß) verlaufen ungefähr auf gleichem Niveau über die vier Stunden. Die Werte liegen konstant bei 180 mg/dl. Die Werte der

zweiten (blau) und vierten Gruppe (rot) verlaufen ähnlich. Sie befinden sich innerhalb der vier Stunden ebenfalls in einem konstanten Bereich von etwa 165 mg/dl bis 170 mg/dl. Insgesamt erkennt man, dass alle Werte der Cholesterinkonzentration im Normbereich von 200 mg/dl liegen. Es ist schwer, die einzelnen Diagramme in Bezug auf ihre BMI und HOMA-Indizes zu interpretieren, da Cholesterin nicht nur exogen durch Nahrung aufgenommen wird, sondern auch durch die Leber, Nebenniere, Darm etc. gebildet wird. So hat beispielsweise die Gruppe 1 mit niedrigem BMI und niedrigem HOMA-Index die höchsten Cholesterinwerte.

3.1.5 Plasma-HDL-Cholesterin-Messung

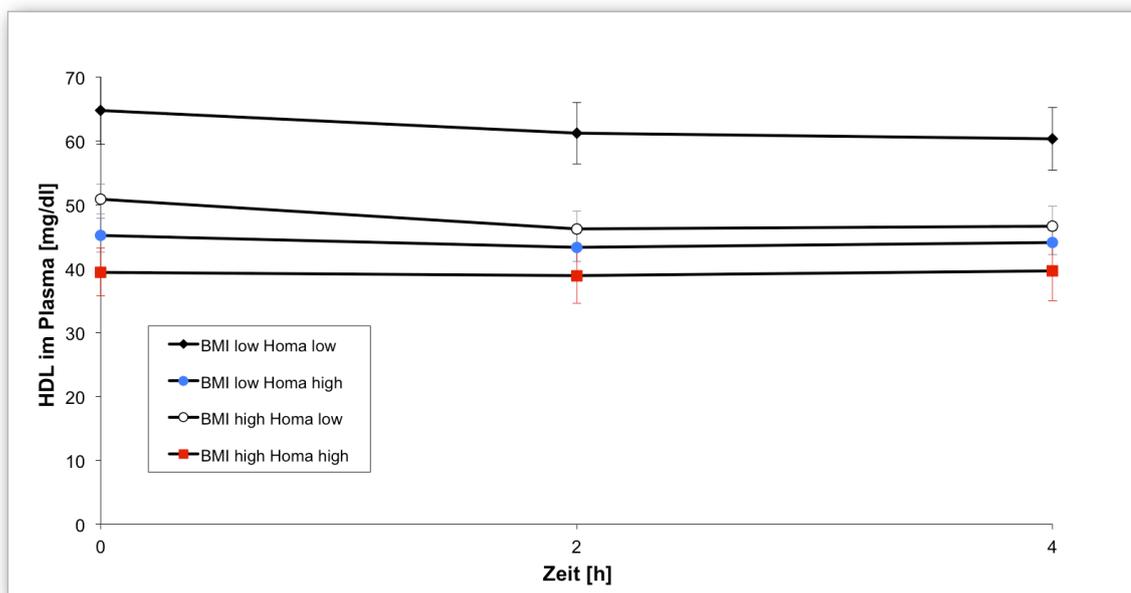


Abbildung 10: HDL-Konzentration im Plasma

Gruppe 4 zeigt niedrig normale Werte. Es ist davon auszugehen, dass eine Angleichung der TG und des HDL-Cholesterins durch das CETP stattfindet. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, 2 und 4 Stunden nach Gabe des fettreichen Frühstücks (n=40). Angegeben ist der Mittelwert der Proben +/- SEM (Standard Error of the Mean).

Dargestellt ist die Konzentration des High Density Lipoprotein (HDL) im Plasma in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit in Stunden – gemessen nach null, zwei und vier Stunden. Auffällig ist, dass die HDL-Konzentration der Gruppe 4 (rot) über die vier Stunden konstant an der Grenze des Normwertes von 40 mg/dl bleibt. Im Vergleich dazu hat die Gruppe 1 (schwarz) eine nahezu konstante HDL-Konzentration zwischen 60 und 65 mg/dl. Die Gruppen 3 und 4 verhalten sich zwischen den anderen Gruppen. Wenn man sich alle vier Kurven anschaut, kann man daraus schließen, dass zwischen dem BMI/HOMA-Index und der HDL-Konzentration eine Korrelation vorliegt [Vasilis et al. 2009]. So sind die unterschiedlichen HDL-Konzentrationen auch auf die unterschiedlichen postprandialen Hyperlipidämien zurückzuführen.

3.2 LIPOPROTEINPROFILE VOR UND NACH OFTT

In dem hier folgenden Teil der Arbeit wurden die einzelnen Lipoproteinfraktionen mittels FPLC aufgeteilt und mit Hilfe eines enzymatischen Farbtests und der darauffolgenden Extinktionsmessung die Triglyzeridkonzentration bzw. die Cholesterinkonzentration bestimmt. Folgende Fraktionen entsprechen den Lipoproteinen:

Tabelle 7: Entschlüsselung der Lipoproteine und ihre Fraktionen in der FPLC

Lipoproteine	Fraktion
Pool 1 (VLDL/Chylomikronen)	8, 9, 10
Pool 2 (LDL)	15, 16, 17, 18, 19
Pool 3 (HDL ₂)	23, 24, 25
Pool 4 (HDL ₃)	27, 28, 29, 30
Pool 5 (Albumin)	35, 36, 37

3.2.1 Cholesterinprofile vor und nach OFTT

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 11 bis 13) sind die Messungen der Cholesterinkonzentrationen der Lipoproteinprofile im Plasma nach Gabe des fettreichen Frühstücks in den Zeitintervallen 0h, 2h und 4h zu sehen. Dabei spiegeln die jeweiligen Kurven eine Probandengruppe wider. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung von Standardabweichungen bei den nachfolgenden FPLC-Profilen verzichtet (Abbildung 11 bis 20).

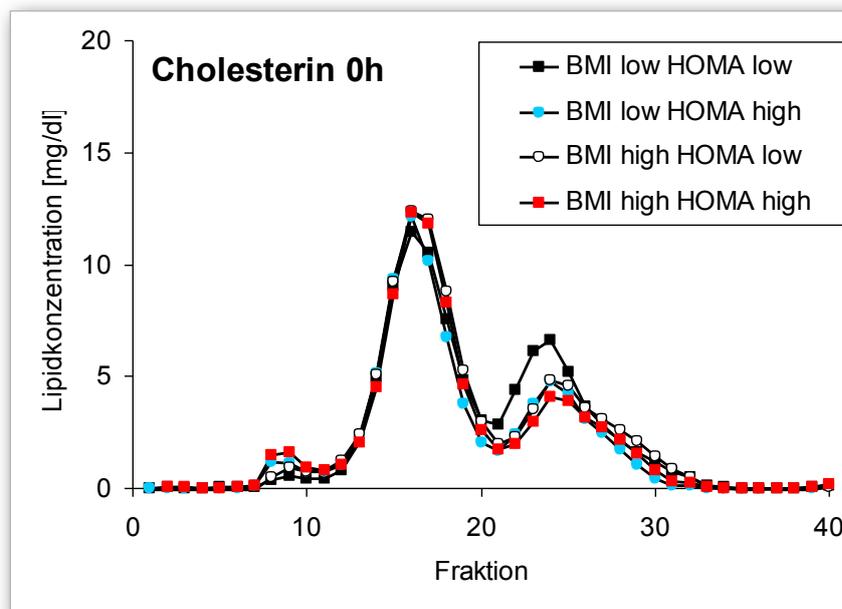


Abbildung 11: Mittelwerte der Cholesterin-Konzentration nach 0h

Auffällig ist eine leicht erhöhte Cholesterin-Konzentration in der HDL-Fraktion der Gruppe 1. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=40).

Dargestellt sind die Cholesterinkonzentrationen der verschiedenen Lipoproteine in mg/dl im Plasma, welches unmittelbar (0h) nach Gabe des fettreichen Frühstücks abgenommen wurde. Der besseren Übersichtlichkeit halber und der Möglichkeit des sofortigen Vergleiches wegen sind die Daten der einzelnen Gruppen jeweils in ihren jeweiligen Mittelwerten in einem Diagramm dargestellt. Betrachtet man das Diagramm der ersten Gruppe (schwarz) in Abbildung 11, stellt man fest, dass die Werte dieser Gruppe den Normwerten am nächsten sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Cholesterin-Konzentration in den Lipoproteinen VLDL und LDL unter den vier Diagrammen in der Gruppe 1 am niedrigsten sind. Im Gegensatz dazu hat die gleiche Gruppe in der HDL-Fraktion im Vergleich zu den anderen HDL-Fraktionen die höchsten Werte.

Die Gruppe 4 (rot) hingegen zeigt ein gegenteiliges Bild: hier sehen wir die höchsten Cholesterin-Konzentration im Vergleich zu den anderen Gruppen in der VLDL- und LDL-Fraktion und die

niedrigsten in der HDL-Fraktion. Bei den Gruppen 3 und 4 erkennt man, dass sich die Werte der VLDL- und LDL-Cholesterin-Konzentration eher wie die Werte der ersten Gruppe verhalten, jedoch bei der HDL-Fraktion eine eher niedrigere Cholesterin-Konzentration als in der ersten Gruppe beobachtet wird. Insgesamt betrachtet kann man diese Konstellation der Cholesterin-Konzentration in Bezug auf die Fraktionen und der Gruppeneinteilung erklären, wenn man den BMI/HOMA-Index hinzuzieht: Man kann hierbei erkennen, dass es aufgrund der Insulinresistenz und des BMI in der Gruppe 4 zu einer Abnahme des HDL-Cholesterins gekommen ist.

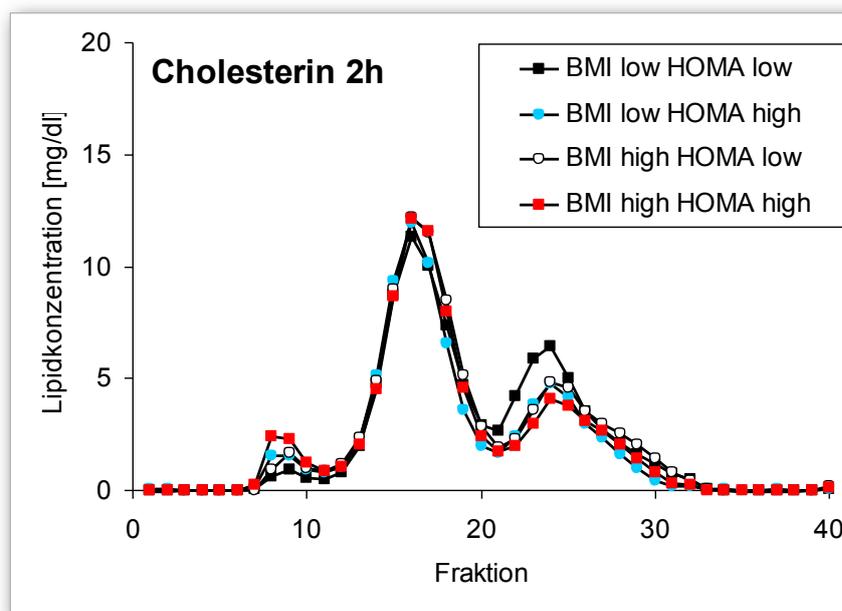


Abbildung 12: Mittelwerte der Cholesterin-Konzentration nach 2h

Die Cholesterin-Konzentration bleibt in allen Gruppen relativ konstant. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – zwei Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=40).

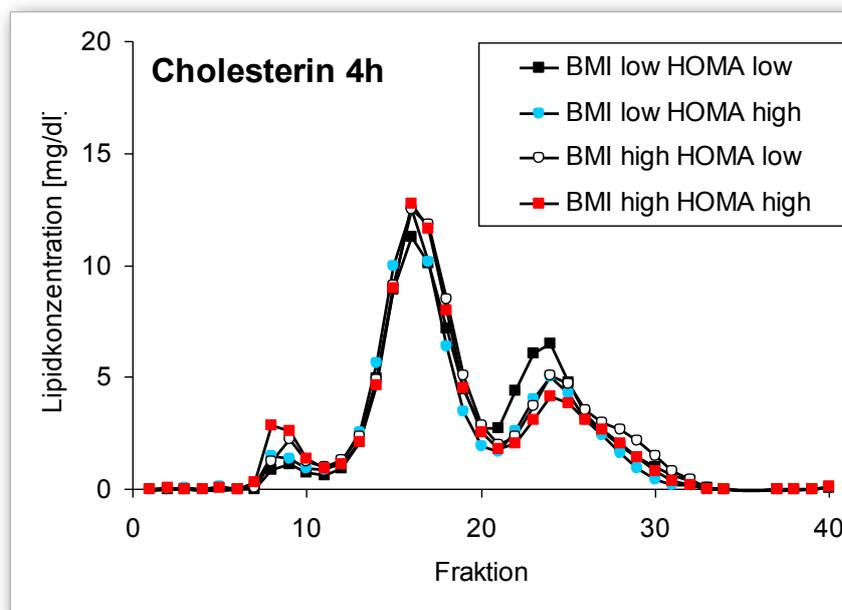


Abbildung 13: Mittelwerte der Cholesterin-Konzentration nach 4h

In Gruppe 4 ist ein leichter Anstieg der Cholesterin-Konzentration in der VLDL-Fraktion zu erkennen. Möglicherweise kommt es hier zu einem Lipidaustausch zwischen TG- und Chol-reichen Lipoproteinen durch die CETP. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – vier Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=40).

Wenn man sich die Cholesterin-Konzentrationen der HDL-Fraktion der ersten Gruppe über alle drei Diagramme (Abbildung 11 bis 13) anschaut, stellt man fest, dass diese Werte stets im Vergleich zu den anderen Gruppen höher sind. Insgesamt finden innerhalb der vier Stunden nach dem fettreichen Frühstück keine nennenswerten Entwicklungen in Bezug auf die Cholesterin-Konzentration in den einzelnen Lipoproteinfraktionen statt.

3.2.2 Triglyzeridprofile vor und nach OFTT

Die nächsten drei Diagramme (Abbildung 14-16) zeigen die Messung der Triglyzerid-Konzentration in mg/dl aller Gruppen in den einzelnen Lipoproteinfraktionen in null, zwei und vier Stunden. Im ersten Pool (VLDL/Chylomikronen) – der aus den Fraktionen 8, 9, 10 besteht – erkennt man, dass unmittelbar nach Einnahme des fettreichen Frühstücks (0h) die Triglyzerid-Konzentration in der ersten Gruppe (schwarz) ca. 3 mg/dl beträgt. In den Gruppen zwei (blau) und drei (weiß) betragen die Werte 7 und 8 mg/dl. Die Gruppe 4 hat mit 13 mg/dl die höchsten Werte.

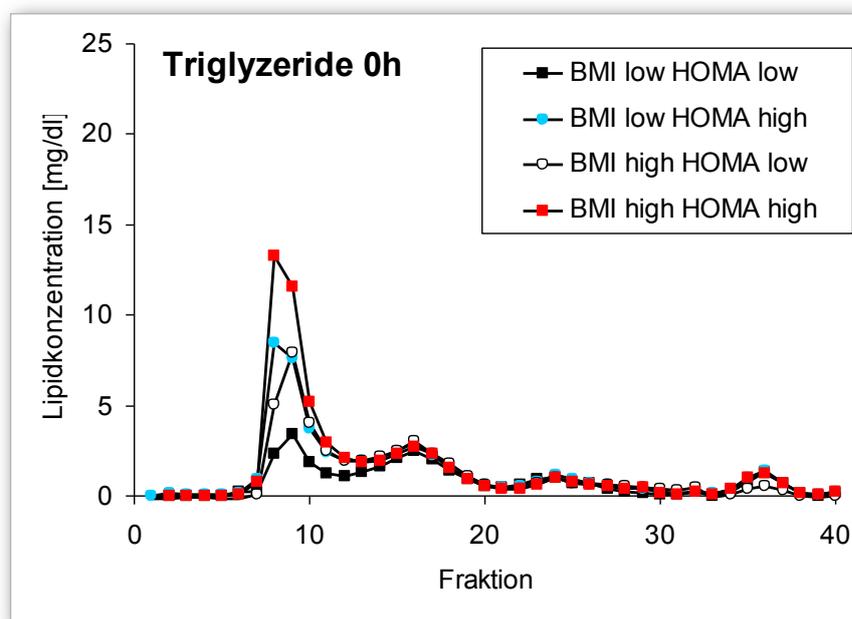


Abbildung 14: Mittelwerte der Triglyzerid-Konzentration nach 0h

Auffällig ist eine erhöhte präprandiale TG-Konzentration. Wahrscheinlich liegt hier eine im Rahmen der Insulinresistenz eine sich entwickelnde präprandiale Dyslipidämie vor. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=40).

Da diese Werte unmittelbar nach dem fettreichen Frühstück ermittelt wurden und somit auch noch gar keine Resorption und Verdauung der Nahrungsbestandteile stattgefunden haben kann, ist hier besonders auffällig, dass die Ausgangswerte der VLDL-Triglyzerid-Konzentration unterschiedlich sind. Wenn man die Abbildung 14 mit der Abbildung 15 unter dem Aspekt des zeitlichen Verlaufes vergleicht, erkennt man, dass die Triglyzerid-Konzentration in den VLDL bzw. den Chylomikronen zunimmt.

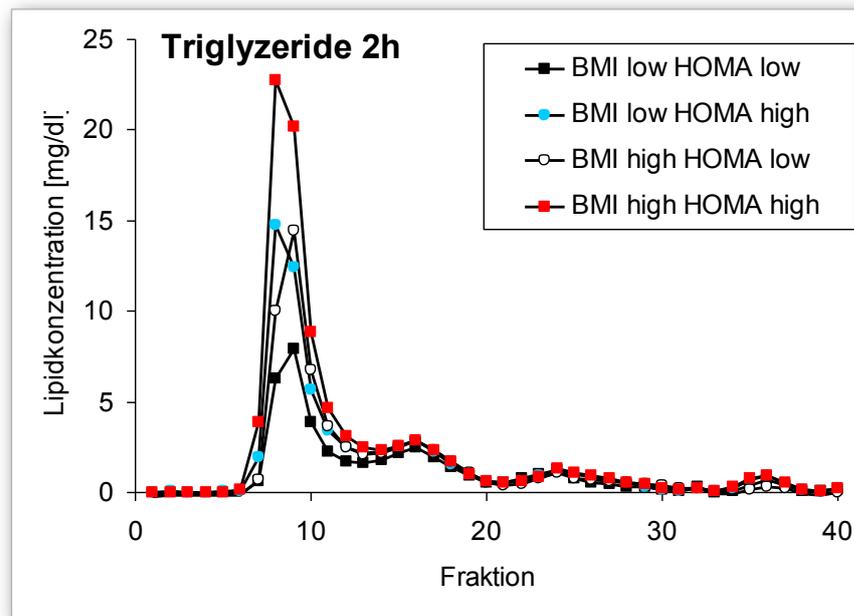


Abbildung 15: Mittelwerte der Triglyzerid-Konzentration nach 2h

Erwartungsgemäß kommt es in allen Gruppen nach der Resorption zu einem Anstieg der TG-Konzentration in der VLDL-Fraktion. Gruppe 4 hat nach wie vor die höchsten TG-Werte aller Gruppen. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – zwei Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=40).

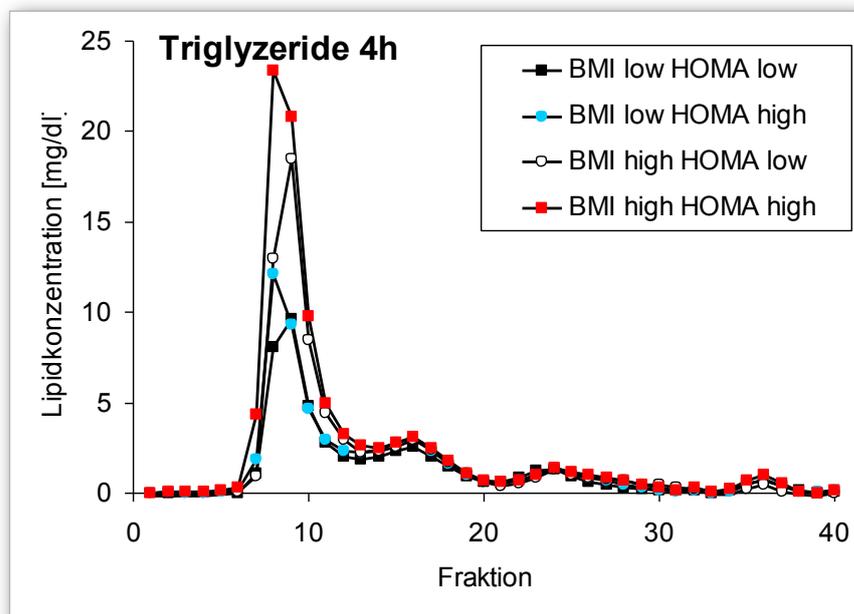


Abbildung 16: Mittelwerte der Triglyzerid-Konzentration nach 4h

In allen Gruppen ist eine Abnahme der TG-Konzentration zu verzeichnen. Dieses ist auf die funktionierende Hydrolyse zurückzuführen. Gruppe 4 zeigt auch nach vier Stunden noch erhöhte TG-Konzentrationen. Hier scheint die Hydrolyse verzögert zu sein. Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – vier Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=40).

So liegen die Werte nach zwei Stunden in der ersten Gruppe (schwarz) bei 7 mg/dl, der zweiten (blau) und dritten (weiß) Gruppe jeweils bei 14 mg/dl und die der vierten Gruppe (rot) bei 22 mg/dl. Bei Betrachtung der Messwerte aus der Abbildung 16 stellt man bei den Probanden aus Gruppe 1 und 2 einen Rückgang der Triglyzeridwerte nach vier Stunden in den VLDL/Chylomikronen auf 9 mg/dl und 12 mg/dl fest. Dieser Rückgang stellt die physiologische Clearance der resorbierten Triglyzeride dar. Sieht man sich die Messwerte der dritten (weiß) und vierten (rot) Gruppe an, kann man feststellen, dass sie weiterhin ansteigen, von 14 auf 18 mg/dl in der dritten und 22 auf 24 mg/dl in der vierten Gruppe. Vor allem die vierte Gruppe, in der die höchsten BMI- und HOMA-Index-Werte sind, demonstriert durchgehend die mit der Insulinresistenz verbundene Dyslipidämie.

Zur besseren Übersicht werden die Triglyzerid- und Cholesterinmesswerte in den Lipoproteinfraktionen gemeinsam für jede einzelne Gruppe wie folgt dargestellt (Abbildung 17 bis 20).

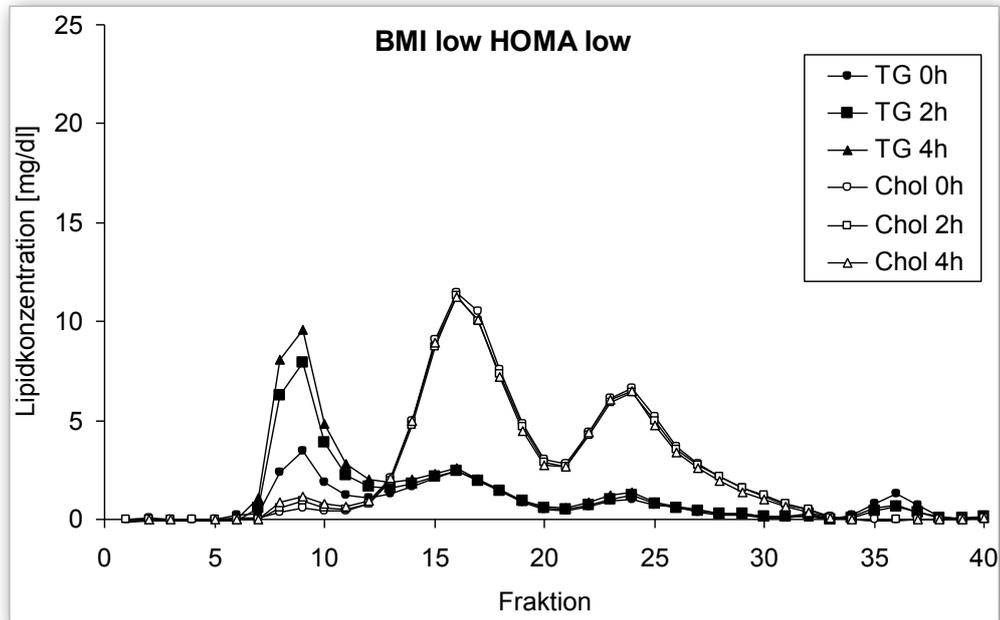


Abbildung 17: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 1

Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, zwei und vier Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=11).

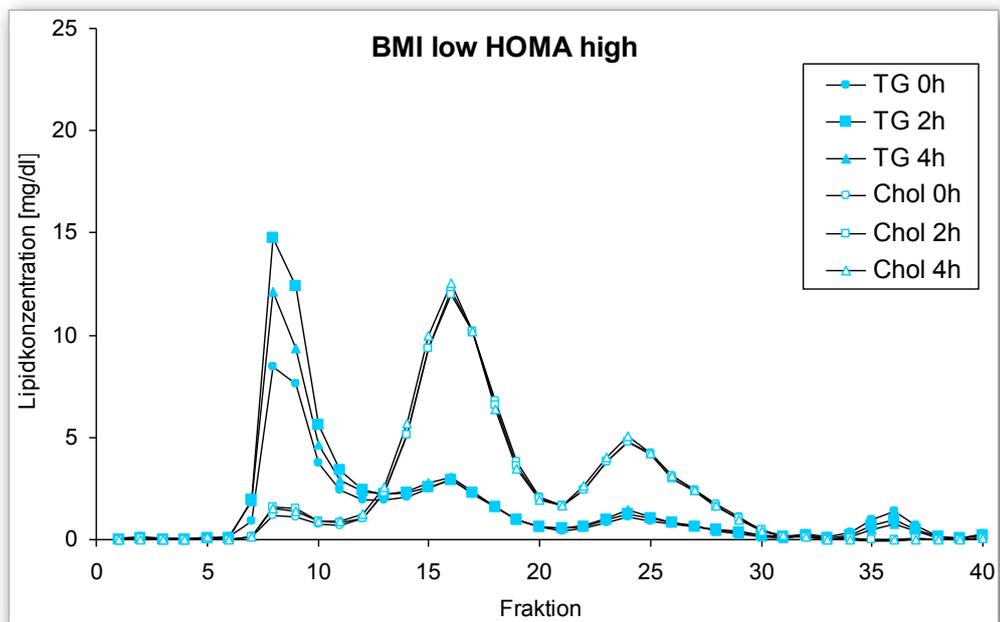


Abbildung 18: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 2

Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, zwei und vier Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=9).

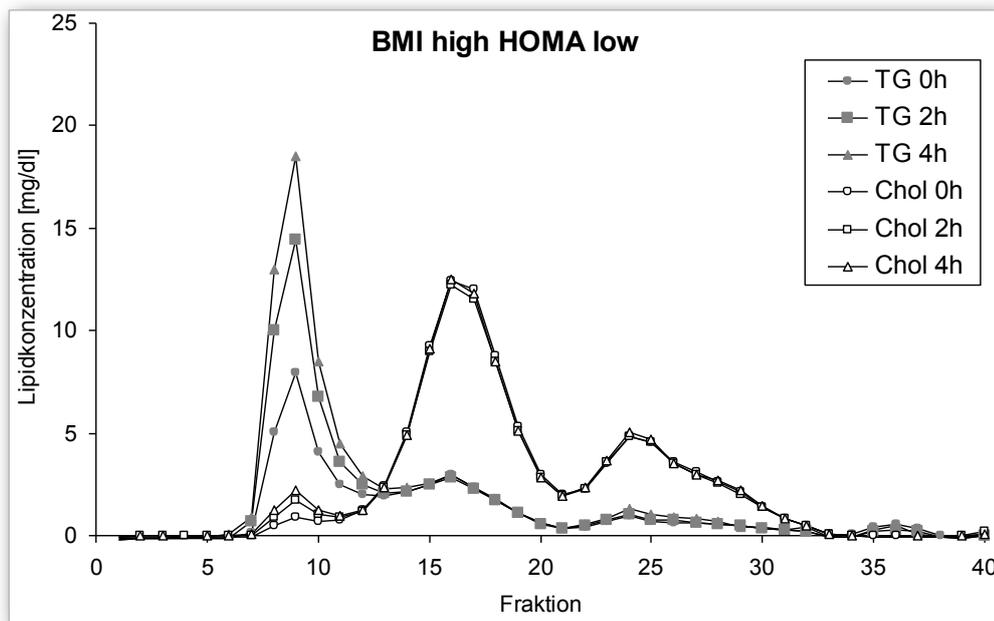


Abbildung 19: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 3
 Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, zwei und vier Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=9).

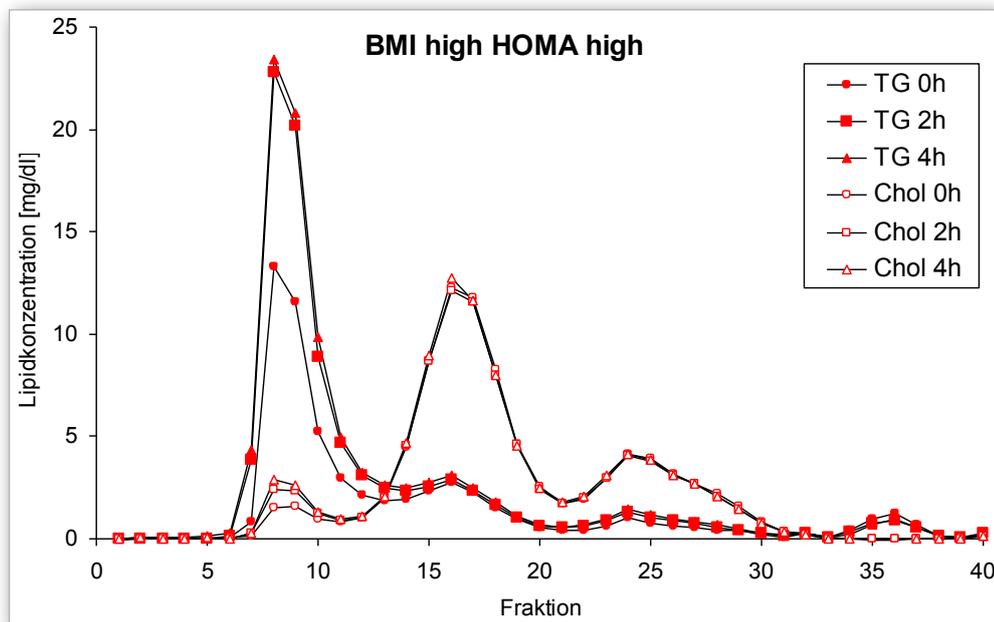


Abbildung 20: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 4
 Messung in mg/dl in Abhängigkeit von der Zeit – unmittelbar, zwei und vier Stunden nach Gabe eines fettreichen Frühstücks (n=11).

Zusammenfassend konnte mit diesen Daten gezeigt werden, dass bei geringem BMI und niedrigem HOMA-Index (Gruppe 1) ein normales Lipoproteinprofil vorliegt. Insbesondere in der Gruppe 4 (BMI hoch und HOMA-Index hoch) – tendenziell aber auch bereits in den Zwischengruppen 2 und 3 – war postprandial eine Erhöhung der Triglyzeride zu sehen. Diese war ausgeprägter als bei den gesunden Probanden der Gruppe 1. Des Weiteren konnte neben der Erhöhung der Triglyzeride eine Erniedrigung des HDL-Cholesterins festgestellt werden. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen TG-Stoffwechsel und HDL-Cholesterinstoffwechsel gibt.

3.3 APOA5-KONZENTRATION DER LIPOPROTEINE

Der jetzt folgende Abschnitt des Ergebnisteils gibt die gemessenen ApoA5-Konzentrationen in den Lipoproteinfraktionen wieder. Hierzu wurden aus jeder zu einem Pool zugehörigen Fraktion 200 µl Eluat entnommen und gemischt. Beispielsweise wurden für die Messung der ApoA5-Konzentration in den VLDL aus den Fraktionen 8, 9, 10 jeweils 200 µl Eluat entnommen und gemischt. Mittels ELISA wurde dann in den Lipoproteinen VLDL/Chylomikronen, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin die Apolipoprotein-A5-Konzentration ermittelt.

Die folgenden Abbildungen (Abbildung 21 bis 24) zeigen die ApoA5-Konzentrationen in den einzelnen Lipoproteinfraktionen der jeweiligen Probandengruppen:

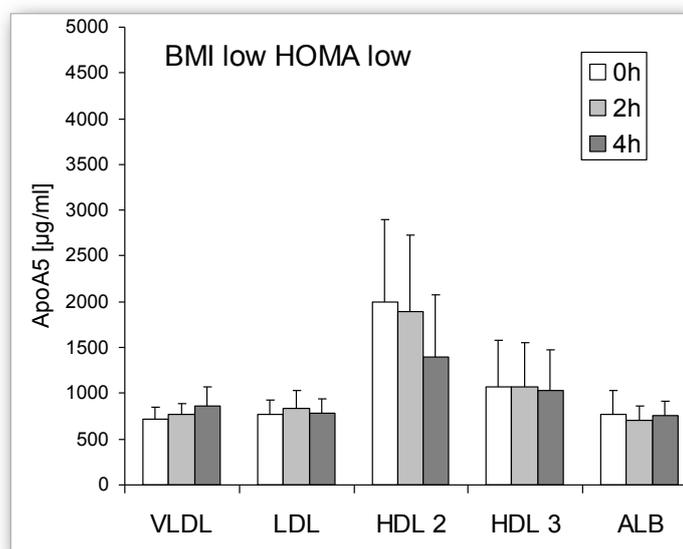


Abbildung 21: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 1 (BMI low HOMA low)

ApoA5-Konzentration in den einzelnen Lipoproteinfraktionen in µg/ml nach dem Frühstück, 2h und 4h danach. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Proben +/- SD (Standard Deviation).

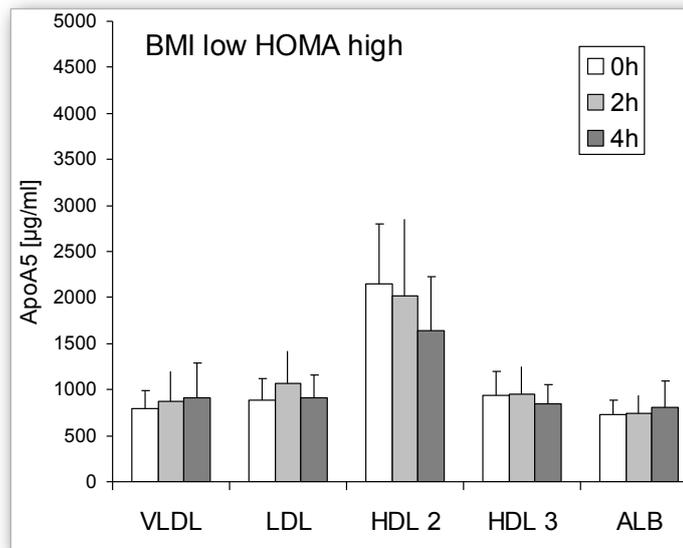


Abbildung 22: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 2 (BMI low HOMA high)

ApoA5-Konzentration in den einzelnen Lipoproteinfraktionen in µg/ml nach dem Frühstück, 2h und 4h danach. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Proben +/- SD (Standard Deviation).

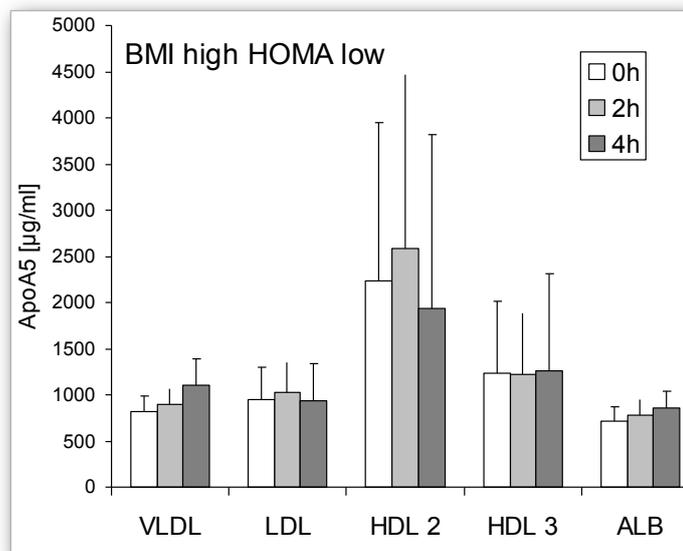


Abbildung 23: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 3 (BMI high HOMA low)

ApoA5-Konzentration in den einzelnen Lipoproteinfraktionen in µg/ml nach dem Frühstück, 2h und 4h danach. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Proben +/- SD (Standard Deviation).

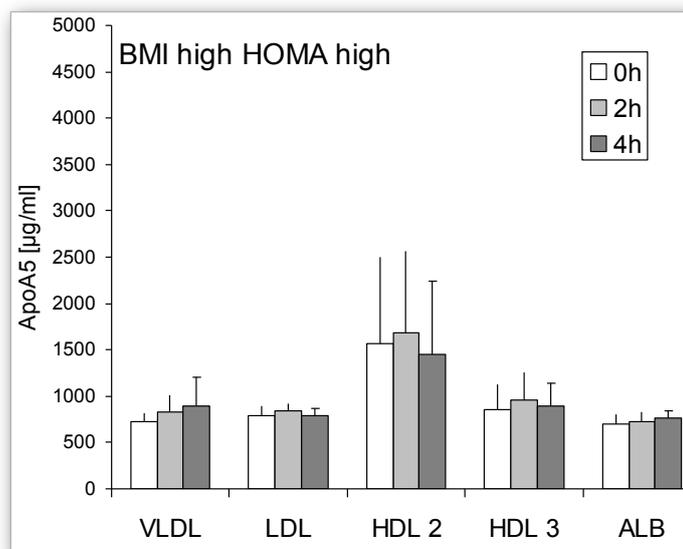


Abbildung 24: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 4 (BMI high HOMA high)

ApoA5-Konzentration in den einzelnen Lipoproteinfraktionen in µg/ml nach dem Frühstück, 2h und 4h danach. Angegeben ist jeweils der Mittelwert der Proben +/- SD (Standard Deviation).

Da das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit eine möglicherweise vorhandene Korrelation des ApoA5 und der Insulinresistenz nachzuweisen und die Rolle des ApoA5 im postprandialen Lipidstoffwechsel zu zeigen war, werden die vier Diagramme zusammen beschrieben und interpretiert.

Grundlegend kann man feststellen, dass in allen Lipoproteinen postprandial ApoA5-Konzentrationen gemessen wurden. Entgegen der gegenwärtigen Beobachtung in der aktuellen Literatur wurden in den LDL auch ApoA5-Konzentrationen gemessen. In der ersten Gruppe (Abbildung 21) kann man in den VLDL bzw. Chylomikronen eine Zunahme der ApoA5-Konzentration von 715 µg/ml unmittelbar nachdem Frühstück auf 856 µg/ml nach vier Stunden erkennen. In der gleichen Zeitspanne ist eine Abnahme der ApoA5-Konzentration in den HDL₂ von 1.995 µg/ml (0h) auf 1.400 µg/ml zu erkennen. Anhand der Messwerte kann man feststellen, dass die höchste Konzentration der ApoA5 sich in HDL befindet. Hier scheint eine Reservoir-Funktion vorzuliegen. Die gleichzeitige postprandiale Veränderung der ApoA5-Konzentration in den HDL und VLDL bzw. Chylomikronen lässt vermuten, dass es hier zu einer Umverteilung des ApoA5 kommt. Allerdings ist zu bemerken, dass es nicht in dem gleichen Umfang zu einer Änderung in den VLDL/Chylomikronen kommt wie in den HDL (Betragsdifferenz VLDL_{0h} – VLDL_{4h}: 141 µg/ml; HDL_{2(0h)} – HDL_{2(4h)}: 595 µg/ml, Gruppe 1).

In allen vier Diagrammen ist festzustellen, dass es postprandial zu einer Bewegung der ApoA5-Konzentrationen kommt. Die Beobachtung, dass es postprandial als Reaktion auf ein fettreiches Frühstück zu einer Umverteilung der ApoA5 kommt, bekräftigt die Aussagen der wissenschaftli-

chen Literatur darüber, dass das ApoA5 untereinander ausgetauscht wird und das HDL eine Art Reservoir bildet.

Die Hinzunahme des vierten Diagramms (Abbildung 24) ermöglicht es, den ganzen Sachverhalt unter dem Aspekt der Entwicklung einer Insulinresistenz (von gesunden, normolipidämischen bis insulinresistenten, hyperlipidämischen Probanden) zu betrachten. Auch in der Gruppe 4 kann man eine postprandiale Umverteilung der ApoA5 von den HDL₂ auf die VLDL/Chylomikronen erkennen. Wenn man alle ApoA5-Konzentrationen der HDL₂-Gruppen miteinander vergleicht, stellt man fest, dass in der Gruppe 4 zu jedem Zeitpunkt die Konzentrationen am niedrigsten sind: 0h = 1.568 µg/ml; 2h = 1.688 µg/ml; 1.452 µg/ml.

Zusammenfassend konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der ApoA5-Konzentration in den Lipoproteinklassen der verschiedenen Gruppen festgestellt werden.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, eine eventuell vorhandene Korrelation zwischen dem Apolipoprotein A5 und der Insulinresistenz nachzuweisen. Des Weiteren sollten hierbei auch die Lipoproteinprofile der einzelnen Gruppen charakterisiert werden.

Dazu wurde in der sogenannten Lilly-Studie 40 gesunden Probanden, die mindestens ein an Diabetes Typ-2 erkranktes Elternteil haben, ein fettreiches Frühstück gegeben. Nach Bestimmung der Blutfettwerte, des Insulins und der Glukose unmittelbar, zwei und vier Stunden nach dem Frühstück, wurden mittels Ultrazentrifugation und FPLC die einzelnen Lipoproteinfraktionen (VLDL/Chylomikronen, LDL, HDL2, HDL3 und Albumin) getrennt. Mittels ELISA-Test wurden dann die Apolipoprotein-A5-Konzentrationen in den einzelnen Lipoproteinfraktionen gemessen und mit der Insulinresistenz und den Lipoproteinprofilen korreliert. Keines der bisher bekannten Apolipoproteine weckte das Interesse der Wissenschaft wie das erst 2001 entdeckte Apolipoprotein A5 (ApoA5). Zwei voneinander unabhängige Forschergruppen [Pennacchio et al. 2001 & Van der Vliet et al. 2001] entdeckten im gleichen Jahr zu zwei verschiedenen Kontexten das ApoA5. Tierexperimentelle Studien an Mäusen mit humanem transgenem ApoA5 ergaben einen um zwei Drittel gesunkenen Triglyzeridspiegel als ihre Kontrollgruppen, während apoA5-Knockout-Mäuse einen vierfach höheren Triglyzeridspiegel zeigten [Pennacchio et al. 2001]. Mit in die kritische Beurteilung der Experimente sollte auch die Tatsache einbezogen werden, dass die ApoA5-Produktionsrate der transgenen Mäuse um ein Drittel höher gestiegen war als ihre Kontrollgruppen, und somit nicht den natürlichen Konzentrationen entsprachen. Die Beobachtungen an den transgenen und Knockout-Mäusen ließen die Vermutung zu, dass ein Teil der Dyslipidämien, wie z.B. die familiär kombinierte Hyperlipidämie [Eichenbaum-Voline et al. 2003; Van der Vleuten et al. 2006] im Menschen möglicherweise seinen Ursprung im defekten ApoA-V-Gen hat. So wurden schnell sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) identifiziert, aus denen defektes oder kein ApoA5 hervorging. Verschiedene Mutationen des Gens können heute mit den Hyperlipidämien im Rahmen verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden [Evans et al. 2003; Niculescu et al. 2006; Dorfmeister et al. 2008; Oliva et al. 2008; Kisfali et al. 2009]. Große Studien wie die Framingham- oder CARDIA-Studie beweisen einen Zusammenhang mit defektem ApoA5 und Erkrankungen wie Atherosklerose, metabolischem Syndrom oder KHK [Klos et al. 2004; Lai et al. 2004; Ordovas et al. 2006; Hsu et al. 2006; Chen et al. 2009; Jang et al. 2009; Chien et al. 2009]. Eine weitere Studie zeigte einen Zusammenhang des SNP S 19 W des ApoA5 und der Entstehung einer akuten Pankreatitis aufgrund einer akuten Hypertriglyzeridämie [Coca-Pietro et al. 2009]. Auf der anderen Seite gibt es aber auch Untersuchungen, die eine positive Korrelation zwischen den ApoA5-Konzentrationen und den Triglyzeriden nachweisen – vor allem in hypertriglyzeridämischen Patienten [Dallinga-Thie et al. 2006; Alborn et al. 2007; Hennemann et al. 2007; Schaap et al. 2006; Talmud et al. 2006; Vaessen et al. 2006]. Es muss betont werden, dass eine positive Korrelation den TG-senkenden Effekt nicht ausschließt. Da eine präprandiale Dyslipidämie bei

Diabetes-Typ-2-Kranken charakteristisch ist, ist es auch kausal, dass diese Patienten höhere ApoA5-Werte zeigen als Gesunde. Denkbar wäre, dass es tatsächlich keine positive Korrelation zwischen dem ApoA5 und Triglyzeridspiegel gibt. Wenn man sich die Ergebnisse in den Diagrammen unter 3.3 anschaut, kann man in der vorliegenden Arbeit keine positive Korrelation des ApoA5 mit den hohen Triglyzeridwerten erkennen. Vergleicht man die ApoA5-Konzentrationen über alle vier Diagramme hinweg, ist eine abnehmende Tendenz bezüglich der Konzentration des ApoA5 in Zusammenhang mit der Zunahme der Insulinresistenz zu erkennen. Bezogen auf die vorliegenden Daten unserer Probanden bedeutet dies möglicherweise, dass sie in ihrer Insulinresistenz oder ihren BMI nicht fortgeschritten genug waren. In der HDL₂-Fraktion der insulinresistentesten Gruppe in Abbildung 24 ist sogar eine niedrigere ApoA5-Konzentration zu erkennen als in den anderen drei Gruppen. Hier scheint es eine negative Korrelation zwischen der Insulinresistenz und ApoA5-Konzentration zu geben. Es ist durchaus denkbar, dass es aufgrund der erhöhten Insulinsekretion zu einer Repression des ApoA-V-Gens gekommen ist und deswegen die ApoA5-Konzentration der HDL Fraktion in der Gruppe 4 am niedrigsten ist [Nowak et al. 2005; Prieur et al. 2005]. Diese Aussage ist jedoch mit Vorsicht zu treffen, weil hier nicht eindeutig hervorgeht, ob die ApoA5-Bildungsrate abgenommen hat oder ob die ApoA5-Moleküle aufgrund der durch die CETP-vermittelten Lipidumverteilung [Chatterjee et al. 2011] an die HDL schlechter binden und deswegen zurück zirkulieren [Alessandro et al. 2009, Vasilis et al. 2009] und somit frühzeitig aus dem Blut verschwinden. Bekräftigt wäre diese Vermutung dadurch, dass keine kompensatorisch höhere ApoA5-Konzentration in den anderen Lipoproteinen dieser Arbeit gemessen werden konnte.

Wenn man sich die ApoA5-Konzentration der VLDL/Chylomikronen aller Gruppen anschaut, sieht man, dass es keine großen Unterschiede zu verzeichnen gibt. Gruppe 1: ApoA5_{VLDL} 0h: 715 µg/ml; 2h: 776 µg/ml; 4h: 856 µg/ml. Im Vergleich dazu Gruppe 4: ApoA5_{VLDL}: 0h: 726 µg/ml; 2h: 828 µg/ml; 4h: 900 µg/ml. Obwohl die Insulinresistenz zu einer Hyperlipidämie führt, haben wir in der ersten und vierten Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ApoA5-Konzentration in den VLDL/Chylomikronen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass es sich trotz geringer Insulinresistenz um gesunde Probanden handelt. Denkbar ist auch, dass die Insulinresistenz keinen Einfluss auf die ApoA5-Sekretion hat. Auch Dallinga-Thie et al. kamen 2006 im Rahmen einer Untersuchung zu dem Schluss, dass die Insulinresistenz keinen Einfluss auf die ApoA5-Konzentration hat.

Bei der Frage wie ein Apolipoprotein mit so geringer Konzentration (1 µg/ml in Nagern [van der Vliet et al 2001] und 0,1 bis 0,4 µg/L in humanem Plasma [Ishihara et al. 2005; O'Brien et al. 2005]) in der Lage ist, den Triglyzeridspiegel zu senken, gibt es verschiedene Theorien zur Funktion des ApoA5. Grundsätzlich werden intrazelluläre von extrazellulären Wirkmechanismen, die im Plasma stattfinden, unterschieden. Bei der Kreuzung humaner LPL-transgener Mäuse mit ApoA5-Knockout-Mäusen und der Kreuzung humaner ApoA5-transgener Mäuse mit lpl-defizienten Mäusen, stellten Merkel et al. fest, dass die Mäuse, die das humane LPL expri-

mierten, signifikant niedrigere Triglyzeridwerte hatten als die, die ein humanes ApoA5-Transgen hatten, aber keine Lipoproteinlipase exprimierten. Somit war eindeutig, dass die Senkung des Triglyzeridspiegels vor allem auf die Lipoproteinlipase zurückzuführen ist. In einem weiteren Versuch, in dem die LPL einerseits Proteoglykan-gebunden und andererseits frei vorlag, stellte sich heraus, dass ApoA5 die LPL-Aktivität in Proteoglykan-gebundenem Zustand signifikant erhöhte, während bei an Proteoglykan-ungebundenen LPL keine effektive Senkung der Triglyzeride zu verzeichnen war [Merkel et al. 2005]. Folglich konnte eine verbesserte Clearance der triglyzeridhaltigen Lipoproteine durch das ApoA5 – in Zusammenhang mit an Endothel-gebundenen Proteoglykanen – nachgewiesen werden [Merkel et al. 2005; Merkel & Heeren 2005; O'Brien et al.]. Außer einer effektiveren Clearance stellte man fest, dass es bei ApoA5-transgenen Mäusen auch zu einem Abfall des ApoC-III kam [Fruchart-Najib et al. 2004]. Hingegen zeigte sich bei apoA5-defizienten Mäusen ein leichter Anstieg des apoC-III. Möglicherweise scheint das Apolipoprotein A5 eine Gegenspielerfunktion zum Apolipoprotein C-III zu zeigen. Eine interessante Fragestellung wäre in diesem Zusammenhang, welchen Beitrag der ApoC-III-Abfall in der Triglyzerid-Senkung hat – zumal bekannt ist, dass die LPL von dem ApoC-III normalerweise gehemmt werden kann [Baroukh et al 2004]. Insgesamt ist es von besonderer Relevanz, welchen Einfluss das ApoA5 auf die Konzentration anderer Apolipoproteine hat.

Die Beobachtung, dass die von den HDL einer Gruppe (dieser Arbeit) abgegebenen ApoA5 nicht in gleichem Maße als Zunahme in den VLDL bzw. Chylomikronen zu messen ist, untermauert einerseits die Vermutung, dass das ApoA5-Apolipoprotein nach der Hydrolyse mit der LPL von der Leber internalisiert wird und somit im Plasma nicht mehr zu messen ist. Zudem behaupten Nilsson et al., dass das ApoA5 als Ligand für die Rezeptoren LRP1, Mosaic Typ 1 Rezeptor oder SorLa fungiert und somit vermehrt aus dem Gefäßsystem herausgenommen wird [Nilsson et al 2007]. Andererseits könnte es sein, dass ein Teil der nun vermehrt zirkulierenden ApoA5-Moleküle als Katalysator an der Leber wirken und damit den Lipidstoffwechsel anregen und im zirkulierenden Blut nicht nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant zu wissen, wieso in den Hepatozytenmembranen so hohe Konzentrationen von ApoA5 vorhanden sind. Es wäre denkbar, dass ApoA5 eine intrahepatische Funktion hat. Nicht nur die Hydrolyse der TG-haltigen Lipoproteine, sondern auch eine verminderte Produktion der VLDL wurde, bei Adenovirus-vermitteltem Gentransfer des murinen ApoA5, auf die Wirkung des ApoA5 zurückgeführt [Schaap et al. 2004; Weinberg et al. 2003]. Wobei hier erwähnt werden muss, dass es auch Untersuchungen gab, in denen die Produktionsrate der VLDL oder Chylomikronen nicht verändert waren [Merkel et al. 2005]. Becksteadt et al. vermuteten eine Reduktion der VLDL-Bildung, in dem das ApoA5 an Lipide gebunden sich an die Hepatozytenmembran bindet und auf diesem Wege die VLDL-Entstehung verhindert wird. Zum Anderen wiesen Shu et al. nach, dass eine Assoziation des ApoA5 mit den VLDL erst zustande kam, nachdem sie sezerniert wurden [Shu et al. 2007]. Einige der bisher durchgeführten Studien zeigen, dass nicht immer mit physiologischen Konzentrationen des ApoA5 gearbeitet wurde [Nelbach et al. 2007] oder ApoC-III-Konzentrationen erreicht wurden [Baroukh et al. 2004], die

nicht den physiologischen Konzentrationen entsprechen. Insbesondere da das ApoA5 ein Lipoprotein von sehr geringer Konzentration ist, wäre eine interessante Fragestellung, ob ähnliche Werte gemessen werden würden, wenn eine den Normwerten des Tieres entsprechende ApoA5-Konzentration eingesetzt worden wäre. Viele Untersuchungen zeigten Veränderungen in der Konzentration anderer Apolipoproteine bei hohen ApoA5-Konzentrationen. Es ist durchaus vorstellbar, dass in der vorliegenden Arbeit die verminderte ApoA5-Konzentration in der insulinresistenten Gruppe durch andere Apolipoprotein-Konzentrationen zustande gekommen ist. Wie bisher in der Literatur beschrieben, ist seit der Entdeckung des ApoA5 einiges erforscht worden: transgene Mauslinien wurden etabliert, eine Überproduktion des ApoA5 mittels Adenovirus wurde entwickelt, diverse SNPs wurden entdeckt und in Zusammenhang mit Erkrankungen gebracht. Was bisher jedoch noch nicht durchgeführt wurde, ist die Erforschung der Wirkung eines rekombinanten ApoA5 im menschlichen Organismus. Insbesondere Menschen, denen dieses Protein aufgrund eines Gendefektes fehlt, würde hiermit möglicherweise geholfen werden können. Als medikamentöse Zusatztherapie im Rahmen einer Herzinfarktprophylaxe oder pAVK wäre die Zugabe eines gentechnisch hergestellten ApoA5 zusätzlich zu den heute zugelassenen Medikamenten denkbar.

Mit der vorliegenden Arbeit lassen sich die in der Literatur bestehenden Fakten bezüglich des Lipoproteinprofils bzw. der Plasmafettwerte im Zuge der Entwicklung einer Insulinresistenz bestätigen: es kommt hierbei zu einer Hypertriglyzeridämie sowie zu einer Erniedrigung des HDL. In der Plasma-Triglyzeridmessung zeigte sich in Abbildung 8 (Seite 38) in der vierten Gruppe eine Hypertriglyzeridämie. Hier wird deutlich, dass es durch die mangelnde Insulinwirkung bei den insulinresistenten Probanden zur Freisetzung von freien Fettsäuren und somit zur Anregung zur Bildung von VLDL kommt [Zhang et al 2004; Annuzi et al. 2007 and 2004; Siri et al. 2001; Tagihibigbu et al 2000]. Auch kommt es zu einer gesteigerten De-novo Lipogenese [Diraison et al. 2003; Schwarz et al. 2003]. Eine Erleichterung der Bildung und Resorption der Chylomikronen wurde auch in Betracht gezogen, so dass es dauerhaft zu einer Erhöhung der triglyzeridhaltigen Lipoproteine kommt [Duez et al. 2008; Hsieh et al. 2008]. Die verminderte Translokation des LRP1 und somit auch verminderte Aufnahme von Remnants bei Insulinresistenten trägt zur postprandialen Hyperlipidämie auch bei [Laatsch et al. 2009].

Betrachtet man die Plasma-Cholesterinkonzentrationen, kann man grundsätzlich feststellen, dass alle Werte aller vier Gruppen den Normwerten entsprechen. Auffällig ist lediglich, dass die Probanden der Gruppe 1 tendenziell höhere Cholesterinwerte aufweisen als andere. Vermutlich ist das auf die effektivere Wirkung des Insulins zurückzuführen, da dieses die Cholesterin-Biosynthese über eine Dephosphorylierung, d.h. die Aktivierung der HMG-CoA-Reduktase, fördert – Glukagon hingegen hemmt diese durch eine Phosphorylierung. Die Inhibition durch das Glukagon wird durch eine Veränderung des cAMP-Spiegels in der Zelle bewirkt. Es sei an dieser Stelle bemerkt, dass der Cholesterin-Haushalt nicht durch eine einzige Mahlzeit so leicht zu beeinflussen ist. Dadurch erhalten wir lediglich unwesentlich schwankende Messwerte. Das

ist darauf zurückzuführen, dass das Enzym durch Nahrungscholesterin und Gallensäuren über ein negatives Feedback gehemmt wird. Kommt es beispielsweise zu einem Absinken der Cholesterinkonzentration, wird das sogenannte SREBP-1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein), das als Vorläufermolekül in die Membran des ER bzw. des Zellkerns eingelagert ist, abgespalten und induziert innerhalb von ein bis zwei Stunden die Transkription der HMG-CoA-Reduktase und somit die Bildung von Cholesterin.

Es geht aus den Diagrammen der Abbildung 11, 12 und 13 (Seite 42 bis 44) hervor, dass Gruppe 4 höhere Cholesterin-Konzentrationen in den TG-reichen Lipoproteinfraktionen (Chylomikronen/VLDL) aufweisen als Gruppe 1. Gleichzeitig zeigen sich in den gleichen Untersuchungen niedrigere Cholesterinkonzentrationen in der HDL-Fraktion in der Gruppe 4 als in der Gruppe 1. Dieses spiegelt exakt die bekannte präprandiale Dyslipidämie eines sich entwickelnden Diabetes mellitus [Mi et al. 2011]. Durch die ständig erhöhten Triglyzeride kommt es bei diesen Probanden (Gruppe 4, rot) zu einer Anreicherung von Triglyzeriden in den HDL und zu der Abgabe des HDL-Cholesterins an Remnants (VLDL, Chylomikron) [Rashid et al. 2003; Gery et al. 2005; Alessandro et al. 2009, Vasilis et al. 2009; Tsompanidi et al. 2009]. Besonders bei Menschen, deren triglyzeridhaltige Lipoprotein-Konzentration zu hoch ist, greift das Cholesteryl-Ester-Transfer-Protein (CETP) ein [Goldberg 2009; Salerno et al. 2009]. Offenbar kommt es hier zu einer Angleichung der Konzentrationen der veresterten Lipide innerhalb der Lipoproteine untereinander [Chatterjee et al. 2011]. Da aber adipöse, insulinresistente Menschen dauerhaft zu hohe Triglyzeride haben, wirkt sich dieser Mechanismus sehr stark zum Nachteil des eigentlich antiatherogen wirkenden reversen Cholesterinstoffwechsel. Es ist davon auszugehen, dass die Remnants, die nun vermehrt mit dem von den HDL stammenden Cholesterin beladen sind, eine geringere Affinität zu ihren Rezeptoren bilden und somit verzögert hydrolysiert werden. Des Weiteren stellten Salerno et al. auch fest, dass das Vorhandensein des CETP eine verminderte Expression des LPL mit sich brachte. Es ist somit denkbar, dass eine Induktion der CETP auch indirekt über eine Erniedrigung der LPL bewirkt. So kann man sehen, dass die Gruppe 1 (schwarz) wahrscheinlich durch die hohe HDL-Konzentration am besten vor Artherosklerose geschützt ist.

Auffällig ist, dass es zwischen dem HDL-Cholesterin und der ApoA5-Konzentration der einzelnen Gruppen eine positive Korrelation vorliegt. Es ist vorstellbar, dass es aufgrund der normwertigen TG-Werte der ersten Gruppe zu keinem Austausch der Lipide durch die CETP kommt – was die HDL-Partikel für die ApoA5-Moleküle zugänglicher macht. Dass es eine positive Korrelation zwischen dem HDL und dem ApoA5 gibt, zeigten auch die Untersuchungen von Abe et al aus dem Jahre 2009. Wenn man sich die ApoA5-Konzentrationen der vier Gruppen anschaut, kann man vor allem erkennen, dass es in der Konzentration des ApoA5 in den einzelnen Gruppen Unterschiede gibt. So wie sich der Verlauf von der ersten Gruppe bis zur vierten Gruppe darstellt, wäre es möglich, dass die ApoA5-Konzentration negativ mit der Insulinresistenz korreliert. Es ist aber auch möglich, dass hier aufgrund der niedrigeren ApoA5-

Konzentrationen in der vierten Probandengruppe die Aktivität der endothelständigen Lipoproteinlipase herabgesetzt ist. Um dieses zu bestätigen, wäre es sicherlich sinnvoll, die ApoA5-Konzentrationen bei Patienten zu messen, die einen manifesten Diabetes Typ-2 haben. Es wäre durchaus denkbar, dass das Apolipoprotein A5 zukünftig in der frühen Phase der Entwicklung eines Diabetes Typ-2 als Marker eine entscheidende Rolle spielt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

2001 entdeckten zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen das Apolipoprotein A-V (ApoA-V). Dabei identifizierte eine der beiden Gruppen das ApoA-V-Gen durch vergleichende Sequenzanalysen. Zeitgleich entdeckte die zweite Forschungsgruppe hohe Konzentrationen des ApoA5 in der frühen Phase der Leberregeneration. In Tierversuchen und klinischen Studien konnte eine Korrelation zwischen dem ApoA5 und dem Plasma-Triglyzerid-Spiegel (TG) nachgewiesen werden. Grundsätzlich gibt es in der aktuellen Literatur unterschiedliche Erklärungsmodelle zur Funktion des ApoA5. Einige Arbeitsgruppen postulieren, dass es eine intrazelluläre Aktivität des ApoA5 gibt und gehen davon aus, dass dadurch die VLDL-Synthese und -Sekretion beeinflusst wird. Andere Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass es sich um einen extrazellulären Mechanismus handelt, bei dem das ApoA5 bei der lipoproteinlipase-vermittelten Hydrolyse mitwirkt bzw. bei der rezeptorvermittelten Aufnahme des Lipoproteins als Ligand fungiert.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine gestörte Umverteilung von ApoA5 zwischen HDL und triglyzeridreichen Lipoproteinen möglicherweise bei der Entstehung der Hypertriglyzeridämie eine Rolle spielen könnte. Zu diesem Zweck wurden zunächst die Lipoproteinprofile klinisch gesunder Probanden charakterisiert, die mindestens ein an Diabetes Typ-2 erkranktes Elternteil haben. Mittels ELISA-Test konnte anschließend die ApoA5-Konzentrationen ermittelt werden. Die Probanden in den vier Gruppen wurden nach ihrem BMI und HOMA-Indizes aufgeteilt. Im Gegensatz zu den gesunden Probanden (Gruppe 1) zeigten die Lipoproteinprofile der insulinresistenten Gruppe mit hohem BMI und hohem HOMA-Index (Gruppe 4) die für einen Diabetes Typ-2 charakteristischen Veränderungen im Lipoproteinprofil. Es wurden in dieser Gruppe niedrige HDL-Cholesterin- und erhöhte postprandiale Triglyzeridwerte gemessen. Die ApoA5-Konzentrationen zeigten eine tendenziell negative Korrelation mit der von Gruppe 1 bis Gruppe 4 zunehmenden Insulinresistenz. Hierbei ist nicht eindeutig festzustellen, ob die Abnahme der ApoA5-Konzentration durch die mögliche Repression des ApoA-V-Gens bei Hyperinsulinämie bedingt ist oder ob das ApoA5 bei Insulinresistenten frühzeitig von der Leber internalisiert wird.

Sollten zukünftige Untersuchungen eine signifikante Korrelation der ApoA5-Konzentrationen mit der Insulinresistenz und damit zusammenhängenden Repression des ApoA-V bestätigen, wäre die Hinzunahme des ApoA5 als früher Marker bei einer entstehenden Insulinresistenz möglicherweise sinnvoll.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCA1	ATP-Binding-Cassette-Transporter-A1
Alb	Albumin
AK	Antikörper
ApoA-V	humanes Apolipoprotein A5 Gen
ApoA5	humanes Apolipoprotein A5
apo a5	Apolipoprotein a5 (von der Maus)
AS	Aminosäure
bidest	bidestilliert
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
Chol.	Cholesterin
CM	Chylomikron/-en
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FXR	Farnesoid X-Activated Receptor
GARPO	Goat Anti Rabbit Peroxidase
h	Stunden
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor 4 α
HOMA-Index	Homeostasis Model Assessment Index
HSL	Hormonsensitive Lipoproteinlipase
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykan
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IRS	Insulinrezeptor Substrat
kDa	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin Cholesterin Acetyl Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LRP1	LDL Receptor Related Protein1
MTP	Microsomal Transfer Protein
OFTT	Orales Fettoleranztest
OGTT	Orales Glukosetoleranztest
PBS	Phosphate Buffered Saline
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PL	Phospholipide
PPAR α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α
R	Reagenzglas
rApoA5	rekombinantes Apolipoprotein A5
ROR α	Retinoid Acid Receptor-Related Orphan Receptor α
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element Binding Protein
TG	Triglyzeride
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor - α
TR β	Thyroid Receptor β
TRL	Triglyzerid Rich Lipoprotein
UKE	Universitätsklinik Eppendorf
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
TMB	Tetramethylbenzidin

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Low-Density-Lipoprotein-Partikels	6
Abbildung 2: Lipoproteinstoffwechsel in grober Gesamtdarstellung	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Apolipoprotein A5 nach Nilsson et al.	14
Abbildung 4: Model einer FPLC-Anlage	28
Abbildung 5: Schematische Darstellung der pro Proband durchgeführte Messungen	31
Abbildung 6: Messung der Glukose im Plasma	36
Abbildung 7: Insulinverlauf im Plasma	37
Abbildung 8: Messung der Triglyzerid-Konzentration im Plasma	38
Abbildung 9: Cholesterin-Konzentration im Plasma	39
Abbildung 10: HDL-Konzentration im Plasma	40
Abbildung 11: Mittelwerte der Cholesterin-Konzentration nach 0h	42
Abbildung 12: Mittelwerte der Cholesterin-Konzentration nach 2h	43
Abbildung 13: Mittelwerte der Cholesterin-Konzentration nach 4h	44
Abbildung 14: Mittelwerte der Triglyzerid-Konzentration nach 0h	45
Abbildung 15: Mittelwerte der Triglyzerid-Konzentration nach 2h	46
Abbildung 16: Mittelwerte der Triglyzerid-Konzentration nach 4h	46
Abbildung 17: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 1	48
Abbildung 18: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 2	48
Abbildung 19: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 3	49
Abbildung 20: Lipid-Konzentration (TG und Chol.) in mg/dl der Gruppe 4	49
Abbildung 21: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 1	51
Abbildung 22: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 2	52
Abbildung 23: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 3	52
Abbildung 24: ApoA5-Konzentrationen der Gruppe 4	53
Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften der Lipoprotein-Hauptklassen	6
Tabelle 2: Eigenschaften und Funktion der Apolipoproteine	8
Tabelle 3: Studiengruppeneinteilung der 40 Probanden nach BMI und HOMA-Index	22
Tabelle 4: Body Mass Index (BMI) und dessen klinische Interpretation	22
Tabelle 5: Homeostasis Model Assessment (HOMA-Index) und dessen klinische Interpretation	22
Tabelle 6: Entschlüsselung der Lipoproteine und ihre Fraktionen in der FPLC	31
Tabelle 7: Entschlüsselung der Lipoproteine und ihre Fraktionen in der FPLC	41

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ALTO-SETALA, K.,** E. A. FISHER, X. CHEN, T. CHAJEK-SHAUL, T. HAYEK, R. ZECHNER, A. WALSH, R. RAMAKRISHNAN, H. N. GINSBERG AND J. L. BRESLOW; 1992. „Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased ApoCIII and reduced ApoE on the particles.“ *J Clin Invest.* 90:1889-1900.
- ABE, Y,** T. OKADA, K. YUKI, MITSUHIKO HARA, EMIKO SAITO, FUJIIHIKO IWATA, KENSUKE HARADA, AND HIDEO MUGISHIMA; 2009. Apolipoprotein A-V is a Potent Modulator of HDL and VLDL Components in Preadolescent Children *J Atheroscler Thromb*, 2009; 16:121-126.
- ALBORN, E A,** M. G. JOHNSON, P. KONRAD AND R; 2006. „Definitive N-Terminal Protein Sequence and Further Characterization of the Novel Apolipoprotein A5 in Human Serum.“ *Clinical Chemistry* 52: 514-517
- ANNUZZI, G.,** C. DE NATALE, C. IOVINE, L. PATTI, L. DI MARINO, S. COPPOLA, S. DEL PRATO, G. RICCARDI, A. A. RIVELLESE; (2004) „Insulin Resistance Is Independently Associates With Postprandial Alterations of Triglyceride-Rich Lipoprotein in Type 2 Diabetes Mellitus.“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24; 2397-2402
- ANNUZZI, G.,** GIACCO R., PATTI L., DI MARINO L., DE NATALE C., COSTABILE G., MARRA M., SANTANGELO C., MASSELA R., RIVELLESE A. A.; 2007. „Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independently of obesity and whole-body insulin resistance.“ *Nutrition Metabolism & Cardiovascular Disease* (2008) 18, 531-538
- ARAI, T.,** RINNINGER, F., VARBAN, L., FAIRCHILD-HUNTRESS, V., LIANG, C.P., CHEN, W., SEO, T., DECKELBAUM, R., HUSZAR, D., AND TALL, A.R.; 1999. Decreased selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters in apolipoprotein E knock-out mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12050-12055
- ARMAND, M.;** 2007. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:156-164
- BARDINI, G.,** DICEMBRINI, I., ROTELLA, C.M., GIANNINI, S.; 2011. Correlation between HDL cholesterol levels and beta-cell function in subjects with various degree of glucose tolerance. *Acta Diabetol DOI* 10.1007/s00592-011-0339-0
- BAROUKH, N.,** BAUGE E., AKIYAMA J., CHANG J., AFZAL V., FRUCHART J.-C., RUBIN E., FRUCHART-NAJIB J., PENNACCHIO L. A.; 2004; Analysis of Apolipoprotein A5, C3, and Plasma Triglyceride Concentrations in Genetically Engineered Mice *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol.* 2004;24;1297
- BARTER, P.J.,** NICHOLLS, S., RYE, K.A., ANANTHARAMAIAH, G.M., NAVAL, M. AND FOGELMAN, A. M.; 2004 Antiinflammatory properties of HDL. *Circ. Res.* 95, 764-772.
- BRADY, R. O.,** FILLING-KATZ, M.R., BARTON, N.W. UND PENTCHEV, P.G.; 1989. „Niemann Pick disease types C and D.“ *Neurol Clin* 7(1): 75-88.
- BRADY, L.,** BRZOZOWSKY, A.M., DEREWENDA, Z.S., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBERG, J.P., CHRISTIANSEN, L., HUGJE-JENSEN, B., NORSKOV, THIM, L. & MENGE, U.; 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343: 767-770
- BREWER, H. B.;** 2004. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 387-391.
- BECKSTEAD, J. A.,** ODA M. N., MARTIN D. D. O., FORTE T., BIELICKI J. K., BERGER T., LUTY R., KAY C. M., RYAN R. O.; 2003 „Structure-Function of Human Apolipoprotein A-V: A Regulator of Plasma Lipid Homeostasis.“ *Biochemistry* 2003, 42, 9416-9423
- BROWN, M.S. UND GOLDSTEIN, J.L.;** 1986. „A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.“ *Science* 232(4746): 34-47.
- BROWN, M. L.,** INAZU, A., HESLER, C. B., AGELLON, L. B., MANN, C., WHITLOCK, M. E., MARCEL, Y. L., MILNE, R. W., KOIZUMI, J. AND MABUCHI, H.; 1989 Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* 342, 448-451.
- CASTLE, C. K.,** PAPE, M. E., MAROTTI, K.R. & MELCHIOR, G.W.; 1991. Secretion of pre-beta migrating ApoA1 by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J. Lipid Res.* 32: 439-447

- CHATTERJEE, C., AND SPARKS, D.L.;** 2011. Hepatic Lipase, High Density Lipoproteins, and Hypertriglyceridemia. *The American Journal of Pathology*, Vol. 178, No. 4, April 2011 DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.050
- CHEN, S.N., CLINIGIROGLU, M., TODD, J., LOMBARDI, R., WILLERSON, J.T., GOTTO, A.M., JR., BALLANTYNE, C.M., AND MARIAN, A.J.;** 2009. Candidate genetic analysis of plasma high-density lipoprotein-cholesterol and severity of coronary atherosclerosis. *BMC Med Genet* 10:111.
- CHIEN, K.L., HSU, H.C., CHEN, Y.C., SU, T.C., LEE, Y.T., AND CHEN, M.F.** 2009. Association between sequence variant of c.553G>T in the apolipoprotein A5 gene and metabolic syndrome, insulin resistance, and carotid atherosclerosis. *Transl Res* 154:133-141.
- CHO, KYUNG-HYUN;** 2009. Biomedical implications of high-density lipoprotein: its composition, structure, functions, and clinical applications. School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea
- CLAY, M.A., NEWNHAM, H. H., FORTE, T.M. & BARTER, P. I.;** 1992. Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of ApoA-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1124: 52-58
- COHN JS, PATTERSON BW, UFFELMANN KD, DAVIGNON J, STEINER G.** Rate of production of plasmas and very-low-density lipoprotein (VLDL) Apolipoprotein C-III is strongly related to the concentration and level of VLDL triglyceride in male subjects with different body weights and levels of insulin sensitivity. *J.Clin Endocrinol Metab* 2004;89: 3949-3955
- COCA-PRIETO I., VALDIVIELSO P., OLIVECRONA G., ARIZA M. J., RIOJA J., FONT-UGALDE P., GARCIA-ARIAS, GOZALES SANTOS P.;** 2009. "Lipoprotein lipase activity and mass, apolipoprotein C-II mass and polymorphism of apolipoprotein E and A5 in subjects with prior acute hypertriglyceridaemic pancreatitis." *BMI Gastroenterology* 2009, doi: 10.1186/1471-230X-9-46
- CORELLA D., LAI C. Q., DEMISSIE S., CUPPLES L.A., MANNING A.K., TUCKER K. L., ORDOVAS J.M.;** 2007 "ApoA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study." *J Mol Med*(2007) 85: 119-128
- CURTISS, L. K.;** 2000. ApoE in atherosclerosis: a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*20: 1852-1853.
- DALLINGA-THIE G.M., VAN TOL A., HATTORI H., VAN-VARK DER ZEE L.C., JANSEN H., SIJBRANDS E.J.G.;** 2006 Plasma Apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes." *Diabetologia* DOI 10.1007/s 00125-066-0261-0
- DANIELSEN, E. M., HANSEN, G. D. & POULSEN, M.D.;** 1993. Apical secretion of Apolipoprotein from enterocytes. *J. Cell Biol.* 120: 1347-1356.
- DAVIS RA,** Cell and molecular biology of the assembly and secretion of Apolipoprotein B-containing lipoprotein by the liver. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1440:1-31.
- DE MAN F.H.A.F., DE BEER F., VAN DER LAARSE A., SMELT A.H.M., HAVEKES L.M.;** 1997 "Lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulfate proteoglycan-bound lipoprotein lipase." *J.Lipid.Res.* 1997.38:2465-2472
- DORFMEISTER B., ZENG W.W., DICHLBERGER A., NILSSON S.K., SCHAAP F.G., HUBACEK J.A., MERKEL M., COOPER J.A. LOOKENE A., PUTT W., WHITTALL R., LEE P.J., LINS L., DELSAUX N., NIJERMAN M., KUIVENHOVEN J.A., KASTELEIN J.J.P., VRABLIK M., OLIVECRONA G., SCHNEIDER W.J., HEEREN J., HUMPHRIES S. E., TALMUD P.J.;** 2008 "Effects of Six ApoA5 Variants, Identified in Patients With Severe Hypertriglyceridemia, on In Vitro Lipoprotein Lipase Activity and Receptor Binding." *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*2008;28;1866-1871
- DUEZ H., PAVLIC M., LEWIS G. F.;** 2008 "Mechanism of intestinal lipoprotein overproduction in insulin resistant humans." *Atherosclerosis Supplements* 9(2008) 33-38
- EICHENBAUM-VOLINE S., OLIVIER M., JONES E. L., NAOUMOVA R.P., JONES B., GAU B., PATEL H.N., SEED M., BETTERIDGE D. J., GALTON D. J., RUBIN E.M., SCOTT J., SHOULDERS C.C., PENNACCHIO L. A. ;** 2003 "Linkage and Association Between Distinct Variants of the APOA1/C3/A4/A5 Gene Cluster and Familial Combined Hyperlipidemia." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004. 24; 167-174
- EISENBERG S., SEHAYEK, E., OLIVECRONA, T. UND VLODAVSKY, I. (1992).** "Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix." *J Clin Invest* 90(5): 2013-21
- ELOSA R., ORDOVAS J. M., CUPPLES L. A., CUPPLES L. A., LAI C. Q., DEMISSIE S., FOX C. S., POLAK J. F., WOLF P. A., D'AGOSTINO R. B., O'DONNELL C. J. ;**2006 " Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. *J.Lipid.Res.*2006.47:990-996

- EHNHOLM; C.**, editor. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin. 315-369.
- EVANS D.**, BUCHWALD A., BEIL F.U.; 2003 "The single nucleotide polymorphism -1131T>C in the Apolipoprotein A5 (APOA5) gene is associated with elevated triglycerides in patients with hyperlipidemia." *J Mol Med* (2003) 81:645-654
- FIELDING, P.E.** UND **FIELDING, C.J.**; 1980. "A cholesteryl ester transfer complex in human plasma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(6): 3327-3330
- FISCHER EA**, GINSBERG HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of Apolipoprotein B-containing lipoprotein. *J Biol Chem.* 2002;277:17377-17380.
- FLOOD, C., GUSTAFSSON, M.**, PITAS, R.E., ARNABOLDI., WALZEM, R.L., AND BOREN, J.; 2004. Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:564-570
- FORESTER, G. P.**, TALL, A.R. BISGAIER, C. L. & GLICKMAN, R. M. ;1983. Rat intestine secretes spherical high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 258: 5938-5943
- FORTE, T.M.**, NICHOLS, A.V., SELMEK-HALSEY, J., CAYLOR, L. & SHORE, V.G.; 1987. Lipid-poor Apolipoprotein AI in Hep G2 cells: formation of lipid rich particles by incubation with dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 920: 185-194.
- FRANCONE, O.L.**, ROYER, L. & HAGHPASSAND, M.;1996. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human Apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J.Lipid Res.* 37: 1268-1277.
- FRUCHART-NAJIB J.**, BAUGÉ E., NICULESCU L.S., PHAM T., THOMAS B., ROMMENS C., MAJD Z., BREWER B., PENNACCHIO L.A., FRUCHART J.-C.; 2004 "Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein" *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319(2994) 397-404
- GARY F. LEWIS AND DANIEL J. RADER** *Circ. Res.* 2005;96:1221-1232
- GINSBERG, H.N.**, LE, N.A., GOLDBERG, I.J., GIBSON, J.C., RUBINSTEIN, A., WANG-IVERSON, P., NORUM, R. AND BROWN, W.V.; 1986. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoprotein CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest* 78:1287-1295.
- GINSBERG, H.N.**, YUAN-LI, Z., AND ANTONIO, H.-O. ;2005. Regulation of Plasma Triglycerides in Insulin Resistance and Diabetes. 2004. *Archives of Medical Research* 36 ,232-240.
- GENOUX A**, DEHONDT H, HELLEBOID-CHAPMAN, DUHEM C, HUM DW, MARTIN G, PENNACCHIO LA STEALS B, FRUCHART-NAJIB J, FRUCHART JC;2005: Transcriptional regulation of Apolipoprotein A5 gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*;25:1186-1192.
- GREEN, P. H.**, TALL, A. R. & GLICKMANN, R. M.; 1978. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J. Clin. Invest* 61: 528 534.
- GOEDEKE L.**, FERNANDEZ-HERNANDO C., Regulation of cholesterol homeostasis. 2011. *Cellular and molecular life sciences.*
- GOLDBERG I. J.** 2009. Cholesterol Ester Transfer Protein Inhibition: Understanding the problems. *J Cardivasc Pharmacol* Volume54, Number 1, July 2009
- GRALLERT H.**, SEDLMEIER E.-M., HUTH C., KOLZ M., HEID I. M., MEISINGER C., HERDER C., STRASSBOURGER K., GEHRINGER A., HAAK M., GIANI G., KRONENBERG F., WICHMANN H.-R., ADAMSKI J., PAULWEBER B., ILLIG T., RATHMANN W. (2007) „APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians.“ *J.Lipid Res.* 2007. 48: 2614-2621.
- GROSSKOPF, I.**, BAROUKH, N., LEE, S.J., KAMARI, Y., HARATS, D., RUBIN, E.M., PENNACCHIO, L.A. AND COOPER, A.D.; 2005. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein and removal of their remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2573-2579.
- HANSSON, G.K.** ;2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685-1695
- HATTERS, D.M.**, PETERS-LIBEU, C.A. & WEISGRABER, K.H.; 2006. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem. Sci.* 31, 445-454.

- HENNESSY, L. K.**, KUNITAKE, S.T. & KANE, J. P.; 1993. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins, with or without apolipoprotein A-II, as progenitors of pre-beta high-density lipoprotein particles. *Biochemistry* 32: 5759-5765.
- HSIEH J.**, HAYASHI A. A., WEBB J., ADELI K.; 2008. „Postprandial dyslipidemia in insulinresistance: Mechanism and role of intestinal insulin sensitivity.“ *Atherosclerosis Supplements* 9, 7-13
- HSU, L.A.**, KO, Y.L., CHANG, C.J., HU, C.F., WU, S., TENG, M.S., WANG, C.L., HO, W.J., KO, Y.S., HSU, T.S.; 2006. Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 185:143-149.
- HSU, L.A.**, KO, Y.L., CHANG, C.J., TENG, M.S., WU, S., HU, C.F.; 2008. Apolipoprotein A5 gene- 1131T/C polymorphism is associated with the risk of metabolic syndrome in ethnic Chinese in Taiwan. *Clin Chem Lab Med* 46: 1714-1719.
- HUSSAIN, M. M.**, KANCHA, R.K., ZHOU, Z., LUCHOONMUN, J., ZU, H. UND BAKILLAH, A.; 1996. „Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors.“ *Biochem Biophys Acta* 1300(3): 151-70
- INAZU, A.**, BROWN, M.L., HESLER, C.B., AGELLON, L.B., KOIZUMI, J., TAKATA, K., MARUHAMA, Y., MABUCHI, H., AND TALL, A.R. ;1990. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 323:1234-1238
- ITO, Y.**, AZROLAN, N., O'CONNELL, A., WALSH, A., BRESLOW, J.L.; 1990. Hypertriglyceridemia as a result of human ApoCIII gene expression in transgenic mice. *Science* 249:790-793.
- JAKEL H**, NOWAK M, MOITROT E, DEHONDT H, HUM DW, PENNACCHIO LA, FRUCHART-NAJIB J, FRUCHART J. C. 2004. The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c . *J Biol Chem* 279:45462-45469
- JANG, Y.**, PAIK, J.K., HYUN, Y.J., CHAE, J.S., KIM, J.Y., CHOI J.R., LEE, S.H., SHIN, D.J., ORDOVAS, J.M., AND LEE, J.H.;2009. The apolipoprotein A5 -1131T>C promoter polymorphism in Koreans: association with plasma APOA5 and serum triglyzeride concentrations, LDL particle size and coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 402:83-87
- KANE, J.P.**; 1983. Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity. *Annu. Rev. Physiol* 45, 637-650.
- KANE, J.P.**; 1996. Structure and Function of the Plasma Lipoproteins and their Receptors. *Atherosclerosis and Coronary Disease*. Fuster, V., Ross. and Topol, E.J. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers: 89-103
- KIM M. S.**, WANG Y., RODRIGUES B.; 2011. Lipoprotein lipase mediated fatty acid delivery and its impact in diabetic cardiomyopathy . *Molecular and Cellular Pharmacology*, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3 BBAMCB-57189; No. of pages: 9; 4C: 3, 5
- KISFALI P.**, MOHAS M., MAÁS A, POLGÁR N., HADARITS F., MARKO L., BRASNYÓ P., HORVATOVICH K., ORORSZALÁN T., BAGOSI Z., BUJTOR Z., GASZTONYI B., RINFEL J., WITTERMANN I., MELEGH B.; 2009 “Haplotype analysis of the Apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome.” *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* xx, 1-7
- KLOS K.L.E**, HAMON S., CLARK A. G., BOERWINKLE E., LIU K., SING C. F.;2005. “ApoA5 polymorphisms influence plasma triglyzerides in young, healthy African American and whites of the CARDIA Study. *J. Lipid Res.* 46: 564-570.
- KRIEGER, M.** ;1999. Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 523-558.
- LAATSCH A.**, MERKEL M., TALMUD P. J., GREWAL T., BEISIEGEL U., HEEREN J. ;2009. „Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1(LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance.“ *Atherosclerosis* 204:105-111
- LAI C.Q.**, DEMESSI S., CUPPLES L.A., ZHU Y., ADICONIS X., PARNELL L. D., CORELLA D., ORDOVAS J. M. 2004 “Influence of the APOA5 locus on plasma triglyzeride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study.” *J. Lipid Res.* 45:2096-2105
- LAI CQ**, DONNA KA, CORELLA D, STRAKA RJ, TSAI MY, PEACOCK JM, ADICONIS X, PARNELL LD, HIXON JD, PROVINCE MA, ORDOVAS JM,; 2007. Fenofibrate Effect on Triglyzeride and Postprandial Response of Apolipoprotein A5 Variants:The GOLDN Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;27;1417-1425
- LAROSA, J.C.**, LEVY, R.I., HERBERT, P., LUX, S.E., AND FREDERICKSON, D.S.; 1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 41:57-62

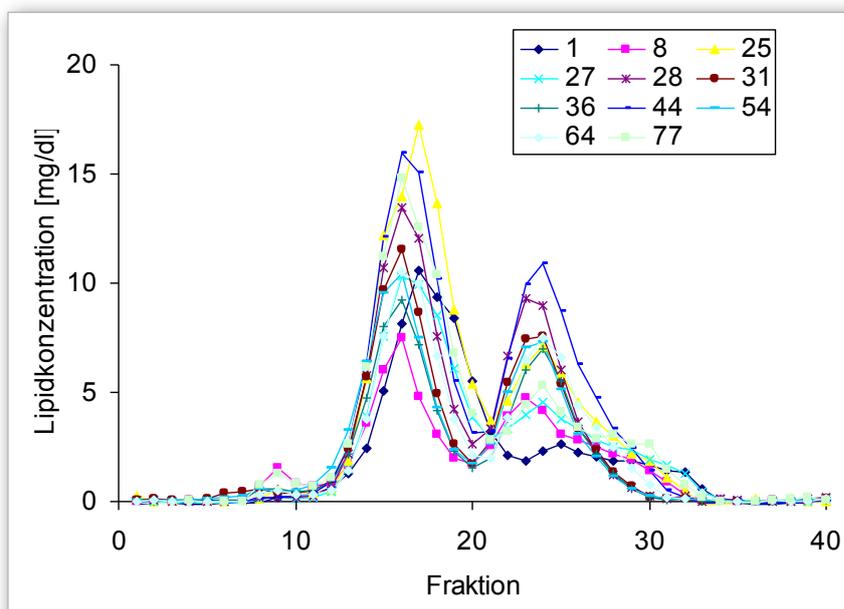
- LAURILA, P.P.**, NAUKKARINEN, J., KRISTIANSSON, K., RIPATTI, S., KAUTTU, T., SILANDER, K., SALMONAA, V., PEROLA, M., KARHUNEN, P.J.; 2009. Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 346-352.
- LEAKE, D.S.** UND PETERS, T.J.;1982. „Lipid accumulation in arterial smooth muscle cells in culture. Morphological and biochemical changes caused by low density lipoproteins and chloroquine.” *Atherosclerosis* 44(3):257-91
- LEWIS, G.F.**, AND RADER, D.J.; 2005. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 96:1221-1232.
- LIANG, H.Q.**, RYE, K. A. & BARTER, P.J.; 1994. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high-density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 35: 1187 – 1199.
- LIND U**, NILSSON T, MCPHEAT J, STROMSTEAD PE, BAMBERG K, BALENDRAN C, KANG D.; 2005. Identification of the human ApoAV gene as a novel RORalpha target gene *Biochem. Biophys Res Commun*;330:223-241.
- LOOKENE, A.**, BECKSTEAD, J.A., NILSSON, S., OLIVECRONA, G., AND RYAN, R.O.; 2005. Apolipoprotein A-V heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* 280:25383-25387.
- LUSIS,A.J.**, Fogelman,A.M. & Fonarow,G.C.; 2004. Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation* 110, 1868-1873.
- LUSIS,A.J.**, Fogelman,A.M. & Fonarow,G.C.; 2004. Genetic basis of atherosclerosis: part II: clinical implications. *Circulation* 110, 2066-2071.
- MADHU S.V.**, KANT S., SRIVASTANA S., KANT R., SHARMA S. B., BHADORIA D.P.; 2008. “Postprandial lipaemia in patients with impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and diabetes mellitus.” *Diabetes Research and clinical practice* 80, 380-385
- MAHLEY,R.W.**, INNERARITY,T.L., RALL,S.C., JR. & WEISGRABER,K.H. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25, 1277-1294.
- MAHLEY, R.W.**, AND JI, Z.S.; 1999. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein E. *J Lipid Res* 40:1-16.
- MARZ, W.**, SCHENK, G., AND GROSS, W.;1987. Apolipoprotein CII and CIII in serum quantified by zone immunoelectrophoresis. *Clin Chem* 33: 664-669.
- MCCALL, M. R.**, FORTE, T. M. & SHORE, V.G.; 1988. Heterogeneity of nascent high density lipoproteins secreted by the hepatoma-derived cell line, Hep G2. *J. Lipid Res.* 29: 1127-1137
- MC CALL, M. R.**, NICHOLS, A. V., BLANCHE, P. J., SHORE, V.G. & FORTE, T. M.;1989. Lecithin: cholesterol acyltransferase-induced transformation of HepG2 lipoproteins. *J.Lipid.* 30: 1579-1589
- MERKEL M.**, Loeffler B., Kluger M., Fabig N., Geppert G., Pennacchio L.A., Laatsch A., Heeren J. 2005 „Apolipoprotein AV Accelerates Plasma Hydrolysis of Triglyceridrich Lipoprotein by Interaction with Proteoglycan-bound Lipoprotein Lipase-“ *J.Biol.Chem.*, Vol.280, Issue 22, 21553-21560
- MERKEL M.**, HEEREN J.; 2005. “ Give me a five for lipoprotein hydrolysis!” *J.Clin Invest* 115: 2694-2696
- MERKEL M**, ECKEL RH, GOLDBERG IJ; 2002. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res*;43:1997–2006.
- MI, H. S.**, JI C. B., PARK, S. E., RHEE E. J., PARK C. Y., KI WON OH, SUNG WOO PARK, SUN WOO KIM, AND WON-YOUNG LEE.; 2011. Association of Lipid and Lipoprotein Profiles with Future Development of Type 2 Diabetes in Nondiabetic Korean Subjects: A 4-Year Retrospective, Longitudinal Study. *J Clin Endocrin Metabelle* First published ahead of print October 12, as doi:10.1210/jc.2011-1857
- MISHRA,V.K.** et al. 2006 Association of a model class A (apolipoprotein) amphipathic alpha helical peptide with lipid: high resolution NMR studies of peptide.lipid discoidal complexes. *J. Biol. Chem.* 281, 6511-6519.
- MURPHY A. J.**, WESTERTERP M., YVAN-CHARVET L., ALAN R.; 2011. Anti-atherogenic mechanisms of high density lipoprotein: Effects on myeloid cell. Tall Division of Molecular Medicine, Department of Medicine, Columbia University, New York, NY, USA, BBAMCB-57151; No. of pages: 9; 4C: 2, 3, 5
- MUSLINER, T. A.**, LONG, M.D., FORTE, T.M., NICHOLS, A. V., GONG, E. L., BLANCHE, P. J. & KRAUSS, R. M.; 1991. Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J. Lipid Res* 32: 917- 933.

- NARAYANASWAMI, V.**, MAIORANO, J.N., DHANASEKARAN, P., RYAN, R.O., PHILLIPPS, M.C., LUND-KATZ, S., AND DAVIDSON, W.S.; 2004. Helix orientation of the functional domains in apolipoprotein e in discoidal high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 279:14273-14279.
- NELBACH L.**, SHU X., KONRAD R. J., RYAN R. O., FORTE T.M.; 2008. "Effect of apolipoprotein A-V on plasma triglyceride, lipoprotein size, and composition in genetically engineered mice." *J.Lipid Res.* 49: 572-580
- NICULESCU L. S.**, FRUCHART-NAJIB J., SIMA A.; 2007. "Apolipoprotein A-V gene polymorphism in subjects with metabolic syndrome." *Clin Chem Lab Med*;45(9):1133-1139
- NILSSON, S.K.**, LOOKENE, A., BECKSTEDT, J.A., GLIEMANN, J., RYAN, A.O., AND OLIVECRONA, G; Apolipoprotein A-V Interaction with Members of Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family. 2007; *Biochemistry* 2007, 46, 3896-3904
- NOWAK M.**, HELLEBOID-CHAPMAN A, JAKEL H, MARTIN G, DURAN-SANDOVAL, STEALS B., RUBIN EM PENNACCHIO L. A., TASKINEN MR, FRUCHART-NAJIB J, FRUCHART JC.; 2005. Insulin-Mediated Down-Regulation of Apolipoprotein A5 Gene Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway: Role of Upstream Stimulatory Factor. *Mol Cell Biol*;25:1537-1548.
- O'BRIEN P.J.**, ALBORN W.E., SLOAN J.H., ULMER M., BOODHOO A., KNIERMAN D. M., SCHULTZE A. E., KINRAD R.J.; 2004. The Novel Apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL and Chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clinical Chemistry* 51:2 351-359 (2005)
- OLIVECRONA, T.** & BENGTTSSON-OLIVECRONA, G.; 1993. Lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Current Opinion in Lipidology* 4: 187-196
- OLIVECRONA, T.**, OLIVECRONA G.; 2009. The ins and outs of adipose tissue: Cellular lipid metabolism.
- OLOFSSON SO**, STILLEMARCK-BILLTON P, ASP L, Intracellular assembly of VLDL :two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 338-345.
- ORAM, J. F.**;2003. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 720-727.
- PACKARD, C.J.** UND SHEPARD, J.; 1997. "Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(12): 354-56.
- PAROMOV, V.M.**, AND MORTON, R.E.; 2003. Lipid transfer inhibitor protein defines the participation of high-density lipoprotein subfractions in lipid transfer mediated by cholesterol ester transfer protein (CETP). *J Biol Chem* 278:40859-40866.
- PENNACCHIO LA**, OLIVER M, HUBACEK JA, COHEN JC, COX D.R., FRUCHART, J-C, KRAUSS R M, RUBIN, E M; 2001. "An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing." *Science* 294(5540): 169-173.
- PENNACCHIO L.A.**, OLIVIER M., HUBACEK J.A., KRAUSS R. M., RUBIN E. M., COHEN J. C.; 2002. "Two independent Apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels." *Human Molecular Genetics*, 2002, Vol. 11, No 24 3031-3038
- PENNACCHIO L.A.**, RUBIN E.M.; 2002. "Apolipoprotein A5, a Newly Identified Gene That Affect Plasma Triglyceride Levels in Humans and Mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23;529-534
- PHILLIPS C.**, OWENS D., COLLINS P., TOMKIN G.H.; 2001. Microsomal triglyceride transfer protein: does insulin resistance play a role in regulation of chylomicron assembly? *Atherosclerosis* 160(2002) 355-360
- PHILLIPS, M.C.**, GILOTTE, K.L., HAYNES, M.P., JOHNSON, W.J., LUND-KATZ, S. UND ROTHBLAT, G.H.; 1998." Mechanism of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes." *Atherosclerosis* 137 Suppl: S13-7.
- POWELL, L.M.** et al. 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840
- PRIEUR X**, COSTE H, RODRIGUEZ JC; 2003. The human apolipoprotein A5 gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem* 2003;278:25468-25480.

- PRIEUR X**, HUBY T, COSTE H, SCHAAP FG, CHAPMAN MJ, RODRIGUEZ JC; 2005. Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5. *J Biol Chem.*; 280:27533-27543.
- PRUNET-DELOCHE V.**, SASSOLAS A., DALLINGA-THIE G. M., BERTHEZENE F., PONSIN G., MOULIN P.; 2004 "Alteration in lipoprotein lipase activity bound to triglyceride-rich lipoproteins in the postprandial state in type 2 diabetes." *J.lipid Res.* 2004.45: 859-865
- QIAO, Y.**, LIU, R., TIAN, H.M., LIU, Y., QIANG, O., AND LIU, B.W.; 2008. Association of apolipoprotein A5 gene - 1131T/C polymorphism with serum lipids and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban* 39:965-968, 999.
- RINNIGER, F.**, DEICHEN, J. T., JAECKLE, S., WINDLER, E. & GRETEN, H.; 1994. Selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl esters and high-density lipoprotein particle uptake by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis* 105: 145-157.
- SALERNO, A. G.**, PATRÍCIO P. R., BERTI, J. A. AND OLIVEIRA H. C. F.; 2009. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) increases postprandial triglyceridaemia and delays triacylglycerol plasma clearance in transgenic mice. Departamento Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), Campinas 13083-862, SP, Brazil, *Biochem. J.* (2009) 419, 629-634
- SARWAR N**, SANDHU MS, RICKETTS SL, ET AL. 2010. Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. *Lancet* 2010;375:1634-9.
- SCHAAP F.G.**, RENSEN P.C.N., VOSHOL P. J., VRINS C., VAN DER VLIET H., CHAMULEAUT R., HAVEKES L. M., GROEN A. K., VAN DIJK K. W.; 2004; Apo Reduces Triglycerides by Inhibiting Very Low Density Lipoprotein-Triglyceride (VLDL-TG) Production and Stimulating Lipoprotein-mediated VLDL-TG Hydrolysis *Journal of Biological Chemistry* Vol. 279, No27 Issue of July 2, pp.27941-27947
- SCHAAP F.G.**, NIERMAN M.C., BERBÉE J. F. P., HATTORI H., TALMUD P.J., VAESSEN S.F.C., RENSEN P.C.N., CHAMULEAU R.A.F.M., KUIVENHOVEN J.A., GROEN A. K.; 2006 " Evidence for complex relationship between ApoA-V and ApoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia." *J.Lipid.Res.* 2006 47:2333-2339
- SCHAEFER, E. J.**, WETZEL, M.G., BENGTSSON, G., SCOW, R.O., BREWER, H. B., JR. & OLIVECRONA, T.; 1982. Transfer of human lymph chylomicron constituents to other lipoprotein density fractions during in vitro lipolysis. *J. Lipid Res.* 23. 1259-1273.
- SHOULDERS, C.C.**, HARRY, P.J., LAGROST, L., WHITE, S.E., SHAH, N.F., NORTH, J.D., GILLIGAN, M., GAMBERT, P., AND BALL, M.J.; 1991. Variation at the ApoA1/ACIII/AIV gene complex is associated with elevated plasma levels of ApoCIII. *Atherosclerosis* 87:239-247.
- SHU X**, CHAN J, RYAN RO, FORTE TM.; 2007. Apolipoprotein A-V association with intracellular lipid droplets. *J Lipid Res* 2007;48:1445-50.
- SEGREST, J.P.**, JONES, M.K., DE LOOF, H. & DASHTI, N.; 2001. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 42, 1346-1367 .
- SEVANIAN, A.** UND PETERSON, A. R.; 1986. "The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products." *Food Chem Toxicol* 24(10-11): 1103-10.
- SUN, G.**, BI, N., LI, G., ZHU, X., ZENG, W., WU, G., XUE, H AND CHEN, B.; 2006. Identification of lipid binding and apolipoprotein lipase activation domains of human apoAV. *Chem Phys Lipids* 143:22-28.
- TACKEN, P. J.**, HOFKER, M.H., HAVEKES, L.M., AND VAN DIJK, K.W. 2001. Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 12:275-279.
- TALL, A.R.**, JIANG, X, LUO, Y. & SILVER, D.; 2000. George Lyman Duff memorial lecture lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1185-1188.
- TAM, S.P.**, DORY, L. & RUBINSTEIN, D.; 1981. Fate of apolipoproteins C-1, C-iii, and E during lipolysis of human very low density lipoproteins in vitro. *J. Lipid Res.* 22, 641-651.
- TAM, S.P.** & BRECKENRIDGE, W.C.; 1983 Apolipoprotein and lipid distribution between vesicles and HDL-like particles formed during lipolysis of human very low density lipoproteins by perfused rat heart. *J. Lipid Res.* 24, 1343-1357 (1983).
- THRIFT, R. N.**, FORTE, T. M., CAHOON, B. E. & SHORE, V. G.; 1986. Characterization of lipoproteins produced by the human liver cell line, Hep G2, under defined conditions. *J. Lipids.* 27: 236-250

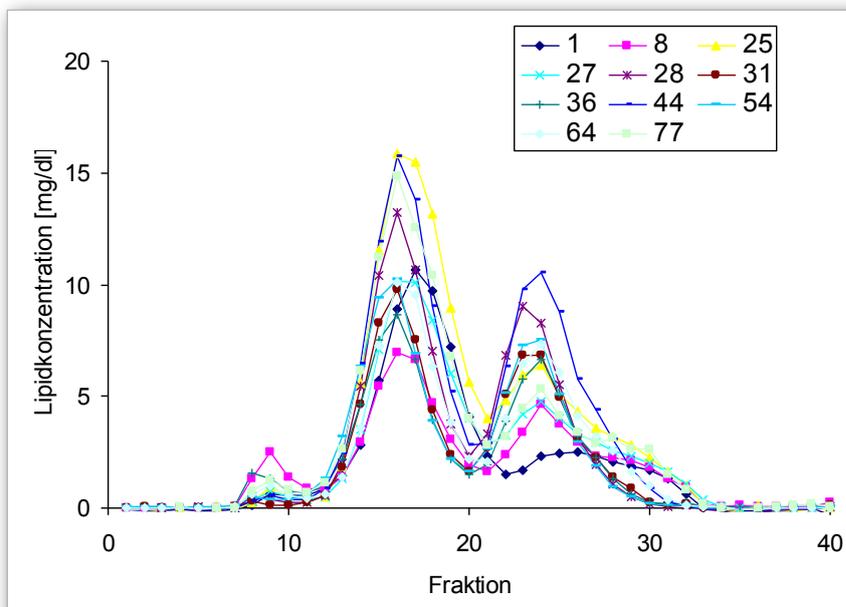
- TRIGATTI, B.** & RIGOTTI, A.; 2000. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) and high-density lipoprotein metabolism: recent lessons from genetically manipulated mice. *Int.J. Tissue React.* 22: 29-37.
- TSONPANIDI E. M.**, BRINKMEIER M. S., FOTIADOU E.H., GIAKOUMI S. M., KYPREOS K. E.; 2009. HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.05.034
- VAESSEN, S.F.**, DALLINGA-THIE, G.M., ROSS, C.J., SPLINT, L.J., CASTELLANI, L.W., RENSEN, P.C., HAYDEN, M.R., SCHAAP, F.G., AND KUIVENHOVEN, J.A. ; 2009. Plasma apolipoprotein AV levels in mice are positively associated with plasma triglyceride levels. *J Lipid Res* 50:880-884.
- VAN DER HAM, R.L.**, ALIZADEH DEHNAVI, R., BERBEE, J.F., PUTTER, H., DE ROOS, A., ROMIJN, J.A., RENSEN, P.C. AND TAMMSMA, J.T.; 2009. Plasma apolipoprotein CI and CIII levels are associated with increased plasma triglyceride levels and decreased fat mass in men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 32: 184-186.
- VAN DER VLEUTEN GM**, ISAACS A, ZENG W-W, AVEST E, TALMUD P J, DALLINGA-THIE G M, VAN DUJIN C M, STAHLLENHOEF A F H, DE GRAAF J ; 2007. "Haplotype analyses of the ApoA5 gene in patients with combined hyperlipidemia. *Biochim Biophys Acta* 1772(1): 81-88.
- VRIES-VAN DER WEIJ, ZADELAAR S.**, TOET K, HAVEKES L. M., KOOISTRA T, RENSEN P. C. N.; 2009. Human CETP aggravates atherosclerosis by increasing VLDL-Cholesterol than by decreasing HDL-Cholesterol in APOE3-Leiden mice. *Atherosclerosis*206, 153-158.
- VU-DAC N**, GERVOIS P, JAKEL H, NOWAK M, BAUGE E, DEHONDT H, STEALS B, PENNACCHIO LA, RUBIN EM, FRUCHART-NAJIB J, FRUCHART JC.; 2003. Apolipoprotein A5, a Crucial Determinant of Plasma Triglyceride Levels, Is Highly Responsive to Peroxisome-activated Receptor alpha Activators. *J Biol Chem* 2003; 278: 17982-17985.
- WEINBERG R. B.**, COOK V. R., BECKSTEAD J. A., MARTIN D. D. O., GALLAGHAR J. W., SHELNESS G. S., RYAN R. O.; 2003. "Structure and Interfacial Properties of Human Apolipoprotein A-V." *Journal of Biological Chemistry* Vol.276 No.36 Issue of September 5, pp. 34438-34444
- WONG-MULDIN, K.**, RAUSSENS, V., FORTE, T.M., AND RYAN, R.O.; 2009. Apolipoprotein A-V N-terminal domain lipid interaction properties in vitro explain the hypertriglyceridemic phenotype associated with natural truncation mutants. *J Biol Chem* 284:33369-33376
- YANCEY, P. G.**, BORTNICK, A. E., KELLNER-WEIBEL, G, DE LA LLERA-MOYA, M., PHILLIPS, M. C. AND ROTHBLAT, G. H.; 2003. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 712-719.
- ZAMBON, A.**, SCHMIDT, I., BEISIEGEL, U. UND BRUNZELL, J. D.; 1996. „Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins.“ *J Lipid Res* 37(11): 2394-404.
- ZANNIS,V.I.**, KAN,H.Y., KRITIS,A., ZANNI,E. & KARDASSIS,D.; 2001. Transcriptional regulation of the human apolipoprotein genes. *Front Biosci.* 6, D456-D504.

9 ANHANG

**Anhang Abbildung 1a: Gruppe 1, Cholesterinmessung 0h**

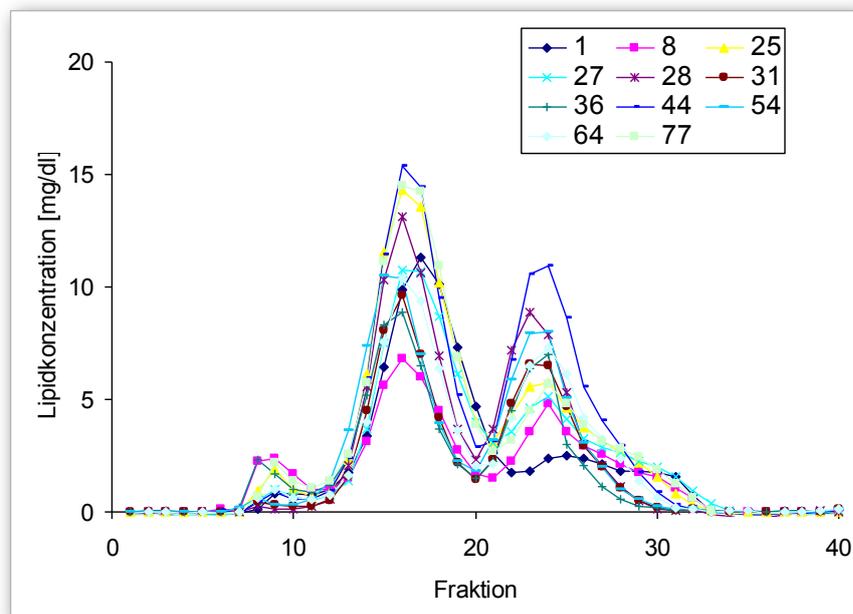
Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ Albumin in mg/dl unmittelbar nach fettreichem Frühstück (0h) in der Gruppe 1: BMI low, HOMA low. (n=11).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.

**Anhang Abbildung 1b: Gruppe 1, Cholesterinmessung 2h**

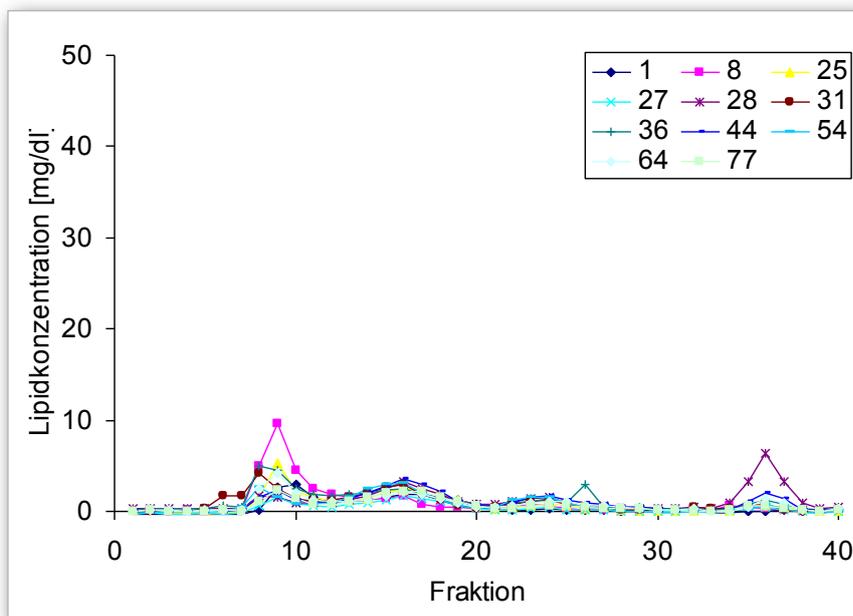
Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 1: BMI low, HOMA low. (n=11).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.

**Anhang Abbildung 1c: Gruppe 1, Cholesterinmessung 4h**

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 1: BMI low, HOMA low. (n=11).

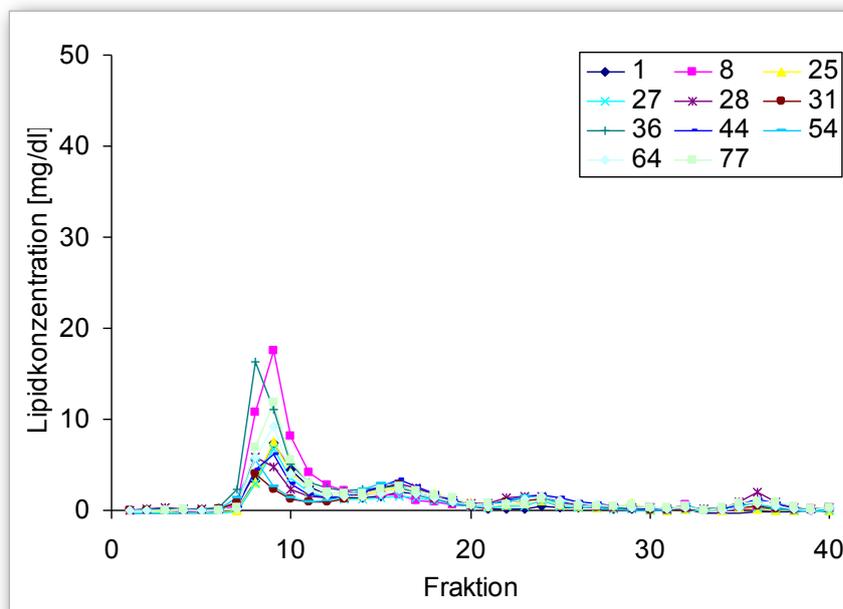
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 2a: Gruppe 1, Triglyzeridbestimmung (0h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl unmittelbar nach der Einnahme des fettreichen Frühstücks (0h). Gruppe 1: BMI low, HOMA high (n=11).

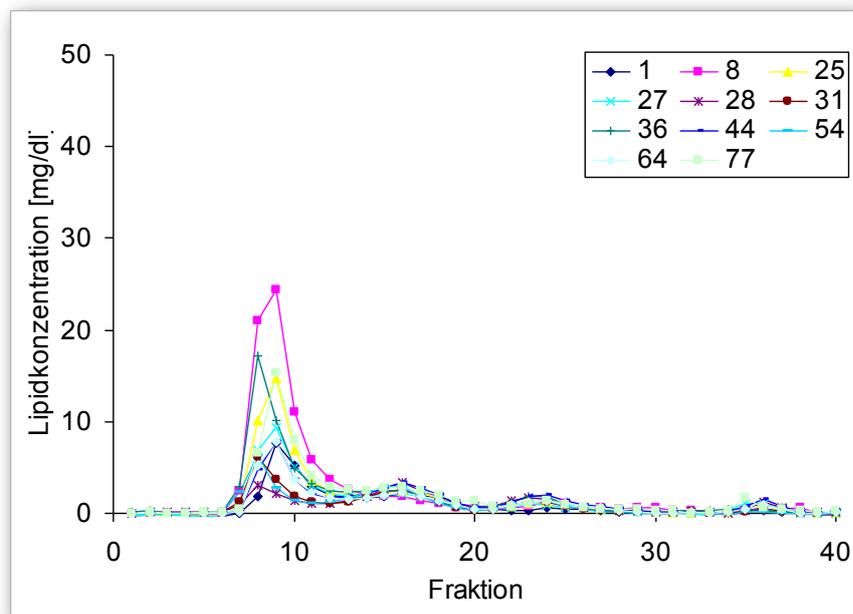
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37



Anhang Abbildung 2b: Gruppe 1, Triglyzeridbestimmung (2h)

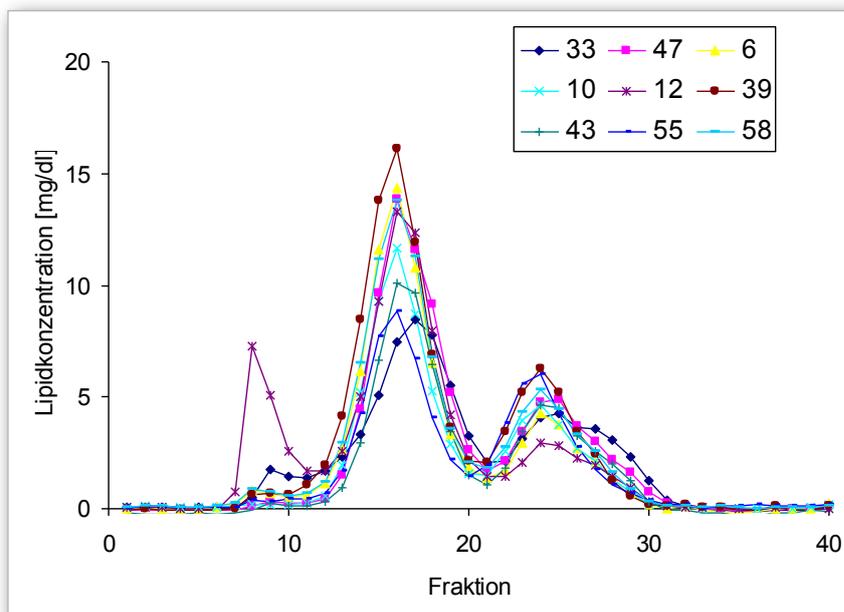
Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach fettreichem Frühstück. Gruppe 1: BMI low, HOMA low (n=11).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.

**Anhang Abbildung 2c: Gruppe 1, Triglyzeridbestimmung (4h)**

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach fettreichem Frühstück. Gruppe 1: BMI low, HOMA low (n=11).

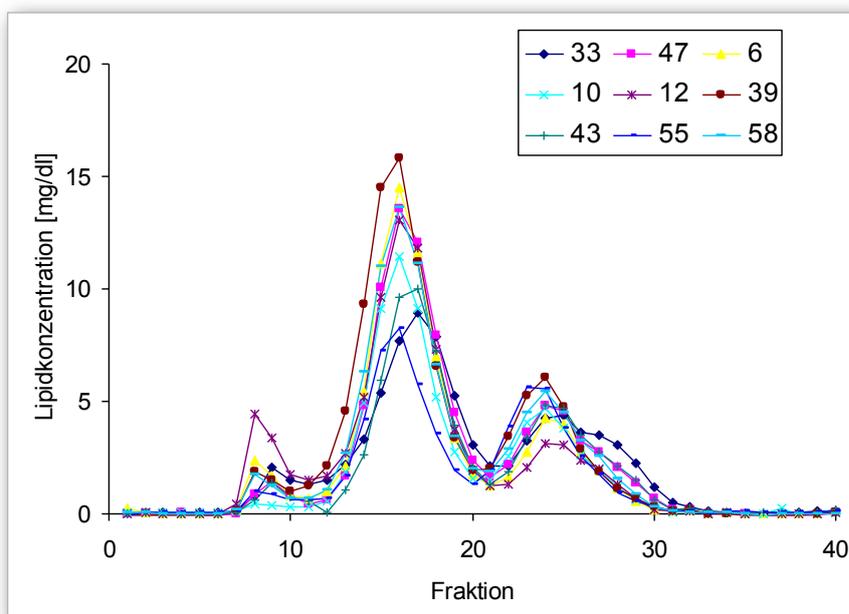
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 3a: Gruppe 2, Cholesterinmessung (0h)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 0h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 2: BMI low, HOMA high (n=9).

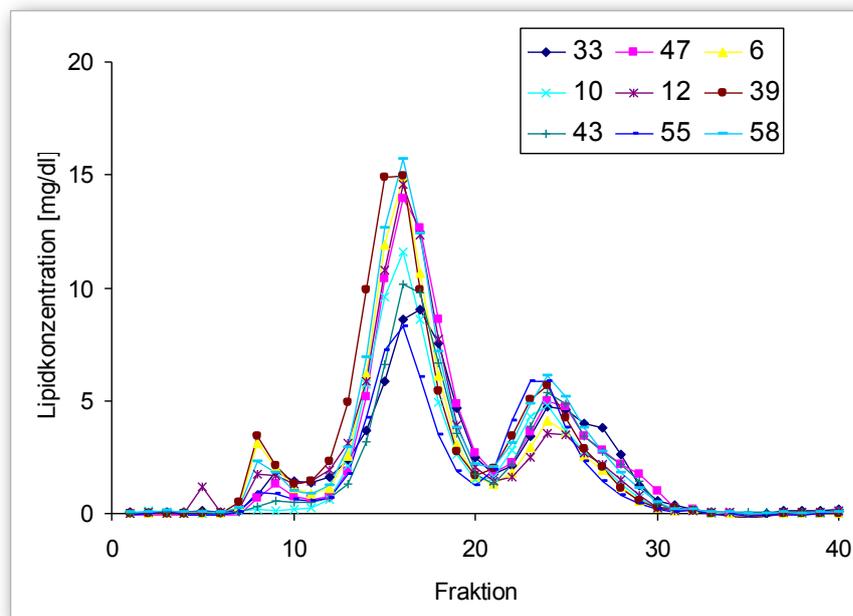
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 3b: Gruppe 2: Cholesterinmessung (2h)

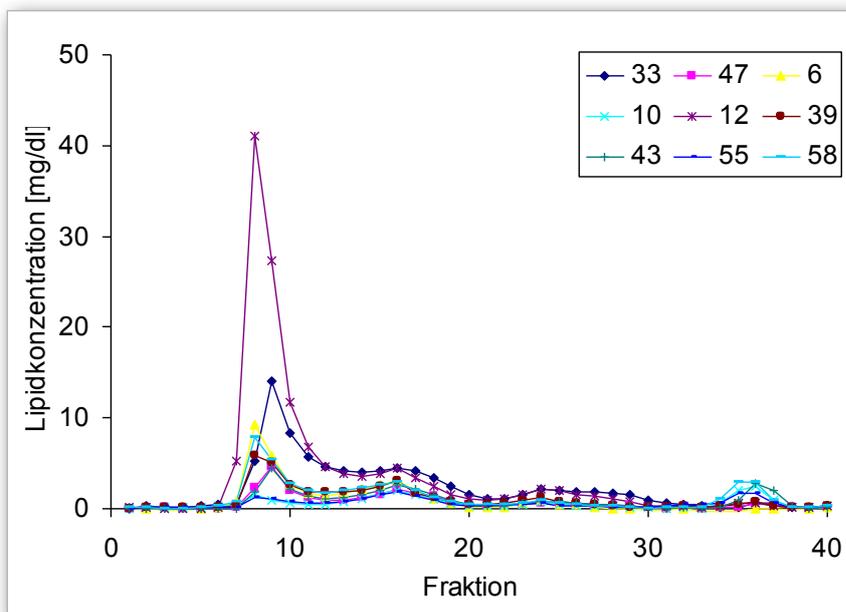
Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 2: BMI low, HOMA high (n=9).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.

**Anhang Abbildung 3c: Gruppe 2, Cholesterinmessung (4h)**

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 2: BMI low, HOMA high (n=9).

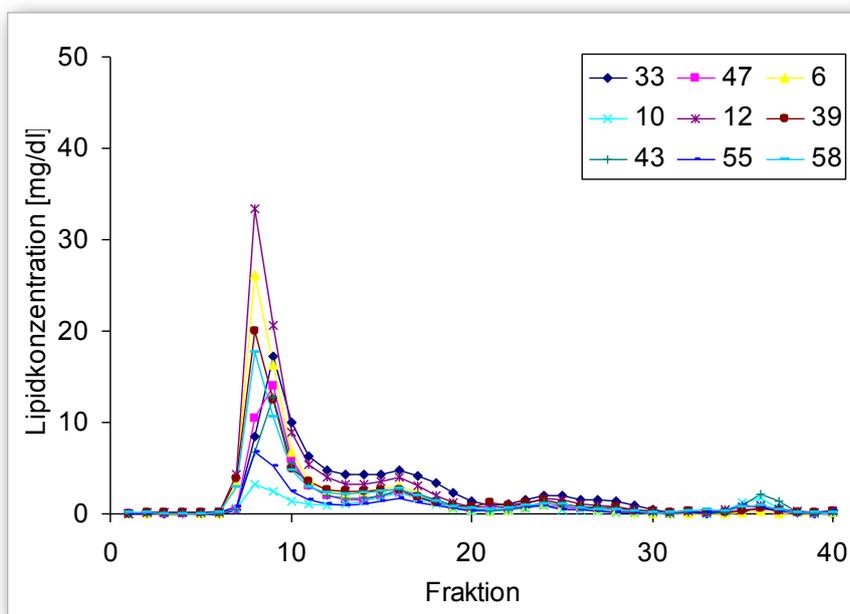
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 4a: Gruppe 2, Triglyzeridbestimmung (0h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl unmittelbar nach Gabe des fettreichen Frühstückes in der Gruppe 2: BMI low, HOMA high (n=9).

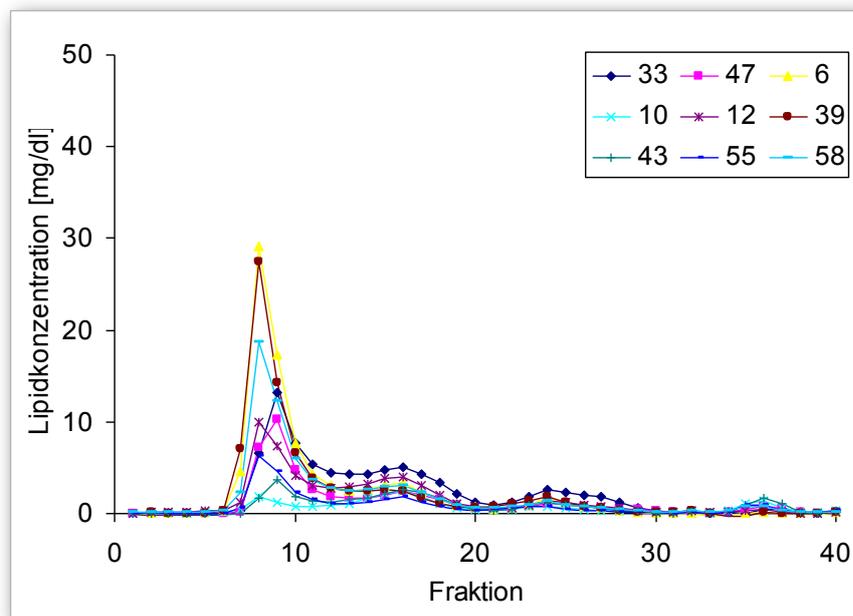
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 4b: Gruppe 2, Triglyzeridbestimmung (2h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstückes in der Gruppe 2: BMI low, HOMA high (n=9).

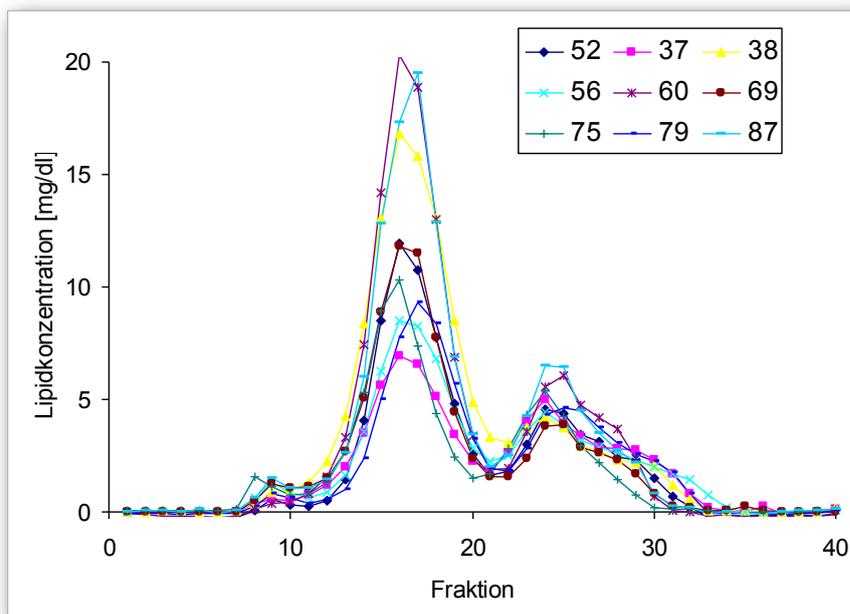
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37



Anhang Abbildung 4c: Gruppe 2, Triglyzeridbestimmung (4h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 2: BMI low, HOMA high (n=9).

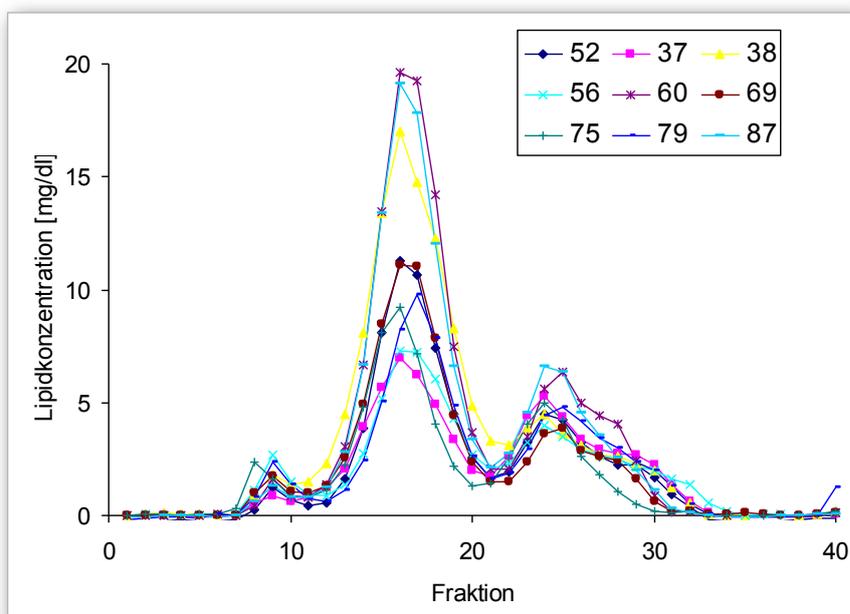
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 5a: Gruppe 3, Cholesterinbestimmung (0h)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl unmittelbar nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 3: BMI high, HOMA low (n=9).

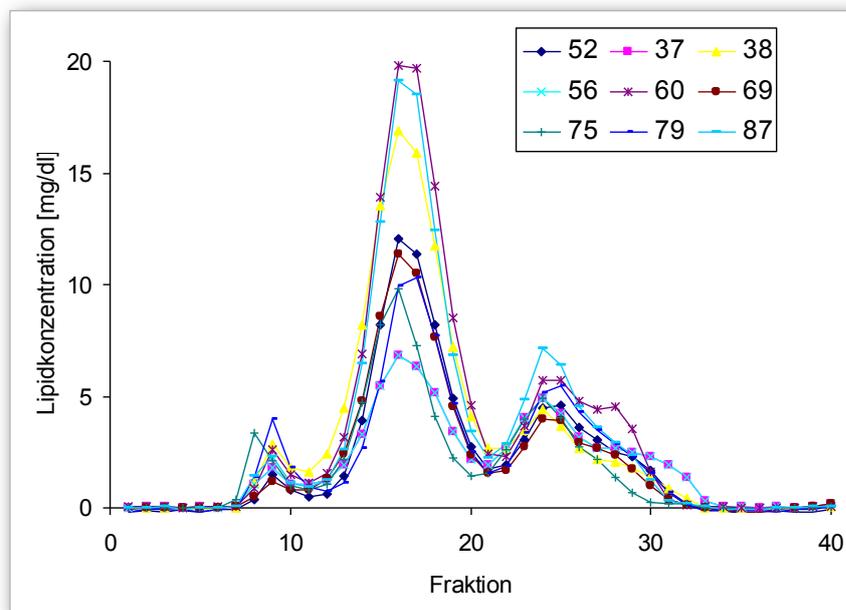
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 5b: Gruppe 3, Cholesterinbestimmung (2h)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 3: BMI high, HOMA low (n=9).

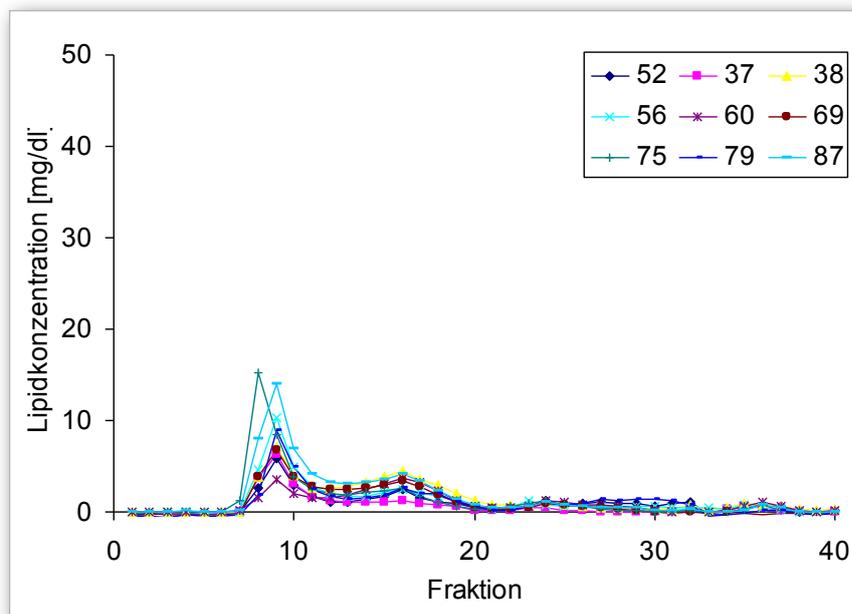
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 5c: Gruppe 3, Cholesterinbestimmung (4h)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 3: BMI high, HOMA low (n=9).

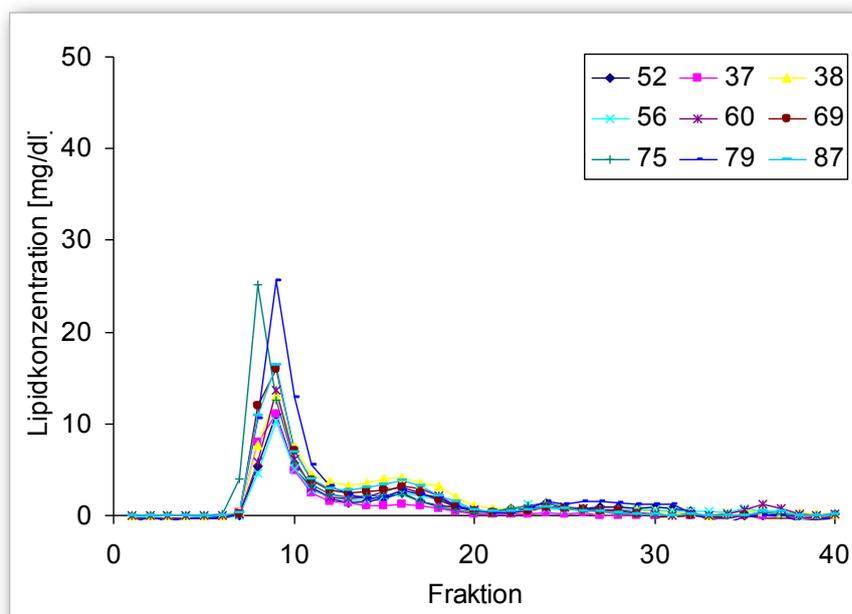
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 6a: Gruppe 3, Triglyceridkonzentration (0h)

Messung der Triglyceridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 0h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 3: BMI high, HOMA low (n=9).

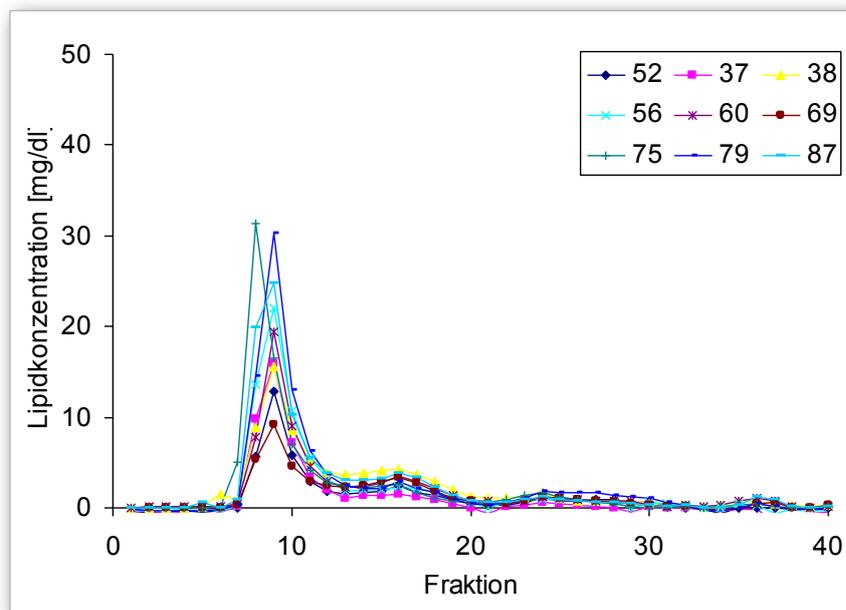
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 6b: Gruppe 3, Triglyceridkonzentration (2h)

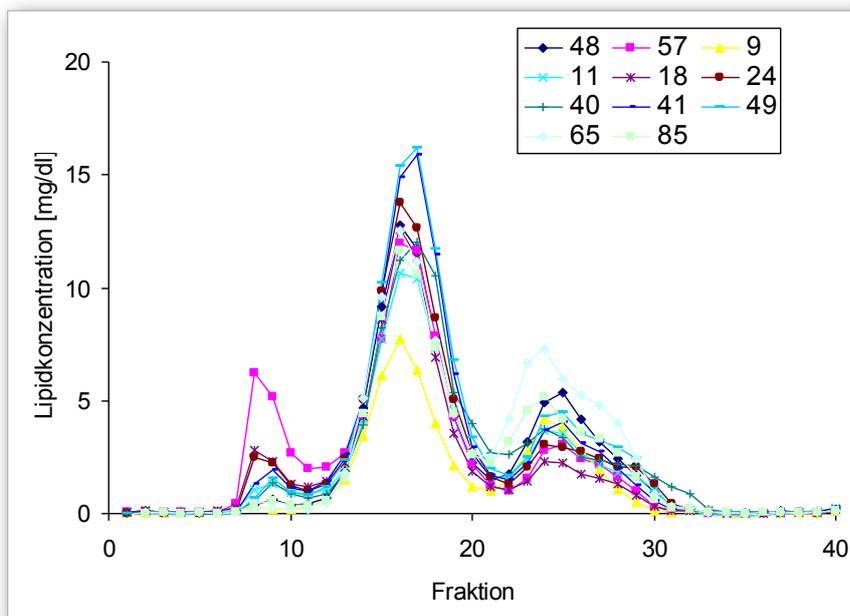
Messung der Triglyceridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 3: BMI high, HOMA low (n=9).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.

**Anhang Abbildung 6c: Gruppe 3, Triglyzeridbestimmung (4h)**

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 3: BMI high, HOMA low (n=9).

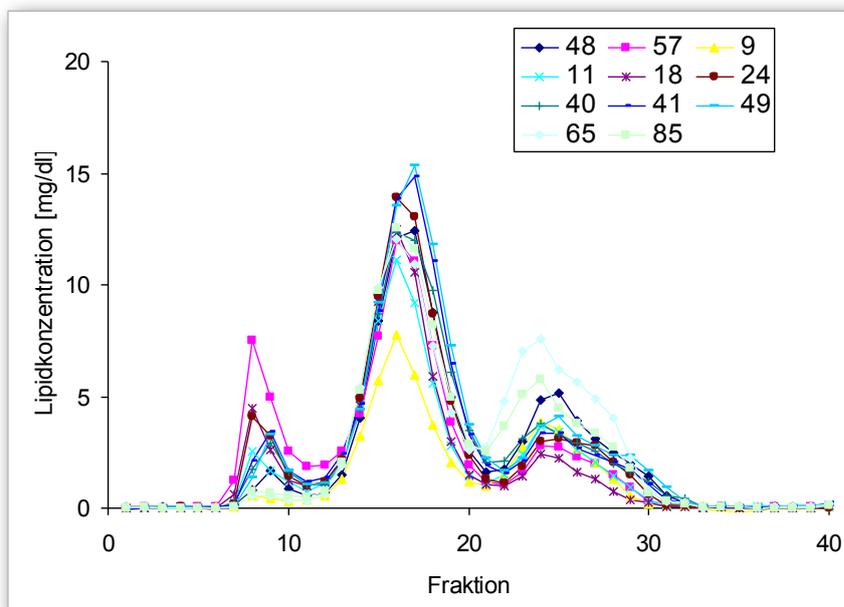
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 7a: Gruppe 4, Cholesterinbestimmung (0)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl unmittelbar nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 4: BMI high, HOMA high (n=9).

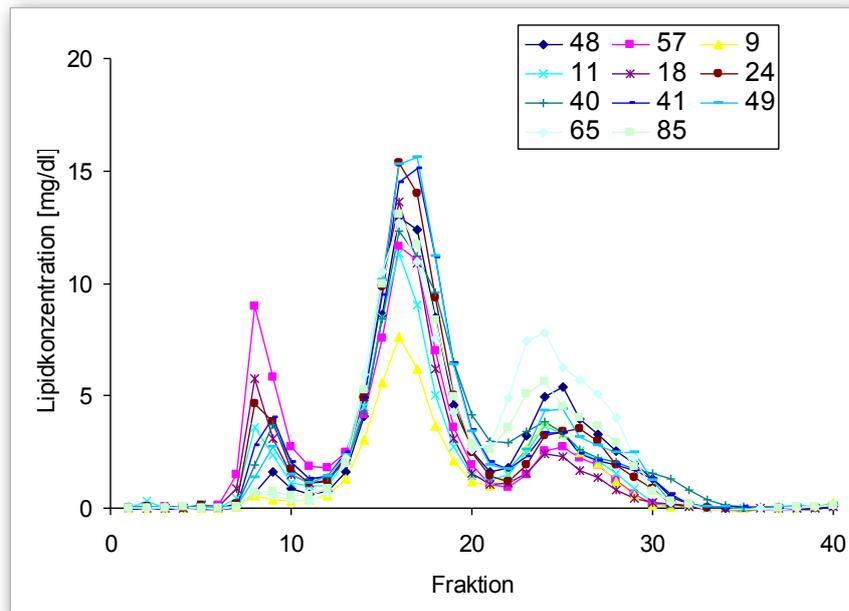
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 7b: Gruppe 4, Cholesterinbestimmung (2h)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 4: BMI high, HOMA high (n=9).

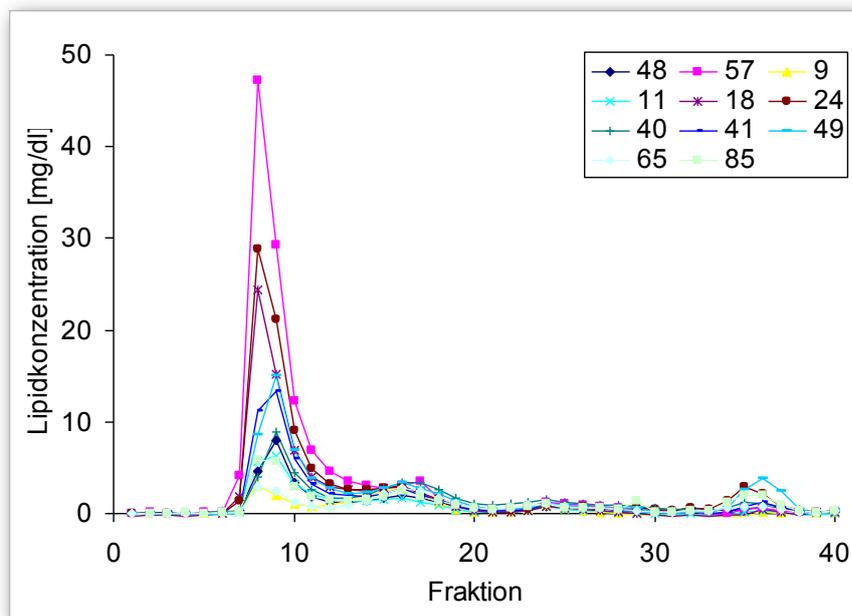
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 7c: Gruppe 4, Cholesterinbestimmung (4h)

Messung der Cholesterinkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 4: BMI high, HOMA high (n=9).

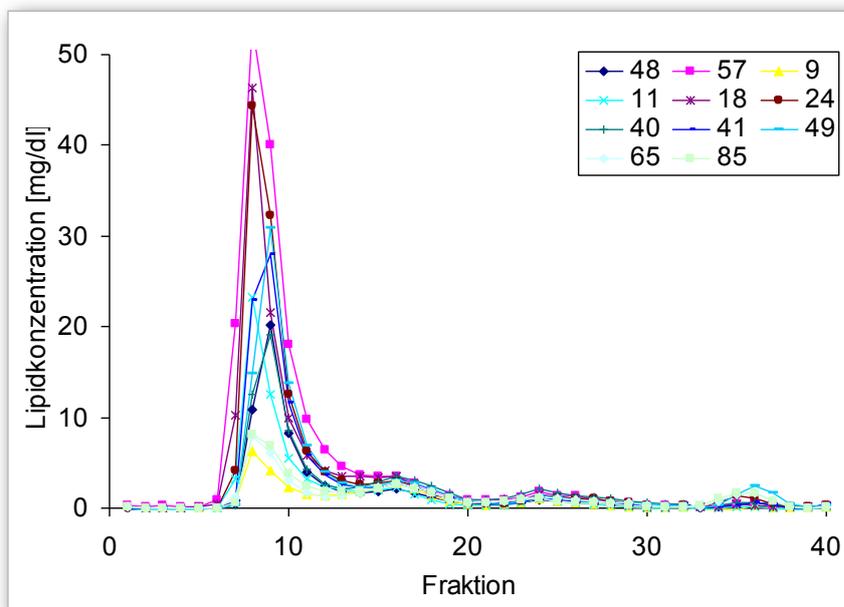
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 8a: Gruppe 4, Triglyzeridbestimmung (0h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 0h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 4: BMI high, HOMA high (n=9).

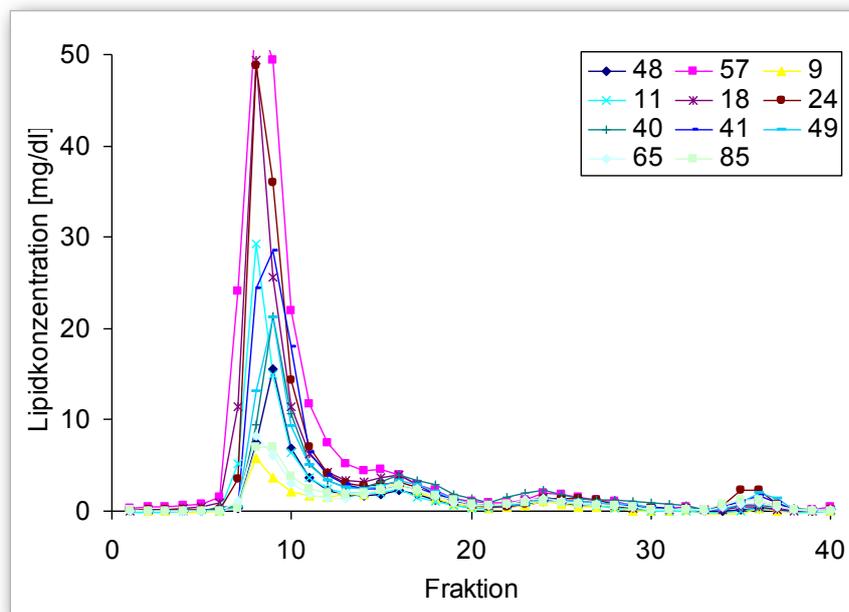
Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 8b: Gruppe 4, Triglyzeridbestimmung (2h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 2h nach Gabe des fettreichen Frühstücks in der Gruppe 4: BMI high, HOMA high (n=9).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.



Anhang Abbildung 8c: Gruppe 4, Triglyzeridbestimmung (4h)

Messung der Triglyzeridkonzentration in den Lipoproteinen VLDL, LDL, HDL₂, HDL₃ und Albumin in mg/dl 4h nach Gabe des fettreichen Frühstück in der Gruppe 4: BMI high, HOMA high (n=9).

Legende: VLDL: Fraktion 8, 9, 10; LDL: Fraktion 15, 16, 17, 18, 19; HDL₂: Fraktion 23, 24, 25; HDL₃: Fraktion 27, 28, 29, 30; Albumin: Fraktion 35, 36, 37.

10 DANKSAGUNG

Frau Professor Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel, ehemalige Direktorin des Medizinischen Instituts der Biochemie und Molekularbiologie II des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, danke ich für die Möglichkeit, an dem von ihr damals geleiteten Instituts die vorliegende Arbeit anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Jörg Heeren für die Aufgabenstellung und für die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit.

Für die zuverlässige technische Unterstützung und angenehme Atmosphäre im Labor danke ich Sandra Ehret.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Ronja Müller und Doris Arndt für die tolle Unterstützung bedanken.

Für Ihre mentale Unterstützung und engagierte Hilfe danke ich meinen Eltern Bedriye und Enver Polat sowie meinem Freund Nikolaos Chotos.

11 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist aus datenschutzrechtlichen Gründen herausgenommen.

12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

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



Unterschrift: