

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin, III. Medizinische Klinik

Direktor: Prof. Dr. med. R. Stahl

Vergleich von Micellen und VLDL im Hydrolyseversuch durch Lipoproteinlipase *in vitro*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Felix Schaab
aus Plettenberg

Hamburg, 2012

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.10.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	Herr PD Dr. M. Merkel
Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:	Herr Prof. Dr. J. Heeren
Prüfungsausschuss, dritter Gutachter:	Herr Prof. Dr. F.-U. Beil

für Judit, Johanna und Jasmin

Inhaltsverzeichnis

Mausliniennomenklatur	1
Arbeitshypothese	2
1 Einleitung	3
1.1 Bedeutung des Lipidstoffwechsels für den menschlichen Körper	3
1.2 Lipoproteine	5
1.3 Lipoproteinstoffwechsel	6
1.4 Micellen und deren physikalische Eigenschaften	8
1.4.1 Liposomen	9
1.4.2 Micellen als LPL-Substrat	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Geräte	11
2.1.2 Chemikalien	12
2.1.3 Enzyme und Proteine	12
2.1.4 Lipide und Fette zur Micellenherstellung	13
2.1.5 Oligonukleotide und PCR-Zubehör	13
2.1.6 Verbrauchsmaterialien	13
2.1.7 Puffer und weitere Standardlösungen	14
2.2 Methodik	15
2.2.1 Sterilisation	15
2.2.2 Versuchstierhaltung	15
2.2.3 Genehmigung der Tierversuche	15
2.3 Mauslinien	16
2.3.1 ApoA5-defiziente Mauslinie („ApoA5ko“)	16
2.3.2 Mauslinie mit Defizienz des Apolipoproteins C3 sowie Apolipoproteins A5 („ApoA5ko-ApoC3ko“)	16

2.4	Genotypisierung der Mäuse	17
2.4.1	Prinzip	17
2.4.2	Schwanzbiopsie	17
2.4.3	Verdau und DNA-Extraktion	17
2.4.4	PCR und Gelelektrophorese	17
2.4.5	PCR-Protokolle	18
2.5	Auftrennung der Lipoproteinfraktionen von Mausplasma	22
2.5.1	Blutabnahme und Zentrifugation	22
2.5.2	Lipoproteinfraktion-Auftrennung	22
2.5.3	Analyse der Lipoproteinfraktionen	23
2.5.4	Bestimmung der Triglyzerid-Konzentration	23
2.5.5	Bestimmung der Cholesterin-Konzentration	23
2.6	Micellenherstellung	24
2.6.1	Vorbereitung des Fettgemisches	24
2.6.2	Ultraschallaufbereitung und Ultrazentrifugation	24
2.7	LPL-Extraktion	25
2.7.1	LPL-Aufbereitung aus Kuhmilch	25
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.8	Hydrolyse von Triglyzeriden durch an Heparansulfat-Proteoglykane ge- bundene Lipoproteinlipase	27
2.8.1	Prinzip	27
2.8.2	Präparation von muriner VLDL	28
2.8.3	Vorbereitung des Assays	28
2.8.4	Vorbereitung des Kontrollexperiments mit gelöster LPL	28
2.8.5	Vorplanung des Hydrolyseversuchs	30
2.8.6	Durchführung der Hydrolyse	30
2.8.7	Messung der Konzentration freier Fettsäuren	31
2.8.8	Kontrollexperiment mit Heparinase-Inkubation	31
2.8.9	Statistische Auswertung der Messergebnisse	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Vorversuch zur Reetablierung: Hydrolyse von muriner VLDL des Ge- notyps ApoA5-knockout (ApoA5 -/-) durch HSPG-gebundene oder frei gelöste LPL in vitro	33
3.1.1	Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung	33
3.1.2	Erste Ergebnisse nach Hydrolyse von VLDL unter ApoA5-Einfluss	33

3.2	Zwischenversuch zur Reetablierung des HSPG-Assays mit verschiedenen Albuminen - Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL durch HSPG-gebundene LPL in vitro	34
3.2.1	Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung	34
3.2.2	Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL durch LPL unter Verwendung verschiedener Albumine	35
3.3	Hydrolyse muriner VLDL des Genotyps ApoA5ko (A5 -/-) unter Zugabe von rekombinantem Apolipoprotein C3 durch HSPG-gebundene und gelöste LPL	36
3.3.1	Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung	36
3.3.2	Einfluss von ApoC3 auf die Hydrolyse von ApoA5-depletierter VLDL	37
3.4	Hydrolyse muriner VLDL des Genotyps ApoA5ko/ApoC3ko (A5 -/-, C3 -/-) sowie von Micellen durch HSPG-gebundene und gelöste LPL unter Zugabe von rekombinantem Apolipoprotein C3	38
3.4.1	Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung Substrat: ApoA5ko-ApoC3ko-VLDL	38
3.4.2	Effekt von ApoC3 auf die Hydrolyse von ApoA5- und ApoC3-depletierter VLDL	39
3.4.3	Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung Substrat: Micellen	39
3.4.4	Einfluss von ApoC3 auf die Hydrolyse von Micellen	39
3.4.5	Vergleich der Hydrolyse von Micellen und VLDL unter Modulation von rApoC3	40
3.5	Hydrolyse muriner VLDL des Genotyps ApoA5-knockout (ApoA5 -/-) sowie von Micellen durch HSPG-gebundene und gelöste LPL unter Modulation von rekombinantem ApoA5	42
3.5.1	Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung	42
3.5.2	Einfluss von ApoA5 auf die Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL	42
3.5.3	Einfluss von rApoA5 auf die Hydrolyse von Micellen	43
3.5.4	Vergleich der Hydrolyse von Micellen und VLDL unter Modulation von rApoA5	44
4	Diskussion	47
5	Zusammenfassung	50
6	Abkürzungsverzeichnis	51
7	Literaturverzeichnis	52

Danksagung	55
Lebenslauf	56
Eidesstattliche Erklärung	57

Mauslinienabkürzungen

Tabelle 0.1: „A5ko“-Mauslinie

Bezeichnung	Genotyp
A5 +/+	bezeichnet eine Wildtypmaus bzgl. des A5-Genlokus
A5 +/-	heterozygote Defizienz auf dem A5-Genlokus
A5 -/-	homozygote A5-Defizienz

Tabelle 0.2: „C3ko“-Mauslinie

Bezeichnung	Genotyp
C3 +/+	bezeichnet eine Wildtypmaus bzgl. des C3-Genlokus
C3 +/-	heterozygote Defizienz auf dem C3-Genlokus
C3 -/-	homozygote C3-Defizienz

Tabelle 0.3: „A5ko-C3ko“-Mauslinie

Bezeichnung	Genotyp
A5 +/+ C3 +/+	bezeichnet eine Wildtypmaus bzgl. des C3- und des A5-Genlokus
A5 -/- C3 -/-	homozygote C3- und A5-Defizienz

Arbeitshypothese

Micellen und VLDL sind gängige Substrate für die *in-vitro* Analyse der Hydrolyse von Fetten. Unter Modulation der Apolipoproteine A5 und C3 sind Micellen und VLDL in qualitativer und quantitativer Hinsicht unterschiedlich im *in-vitro*-Hydrolyseversuch durch Lipoproteinlipase.

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Lipidstoffwechsels für den menschlichen Körper

Im menschlichen Körper nimmt der Lipidstoffwechsel eine zentrale Stellung ein. Lipide sind als energiedichtestes der vom Menschen verwerteten Nahrungsbestandteile und als Speichersubstrat von wichtiger Bedeutung für den zellulären Energiehaushalt, als auch unverzichtbar für anabole Stoffwechselprozesse und essentiell für die Hormonsynthese.

Pathophysiologisch stehen Entgleisungen des Fettstoffwechsel im Zusammenhang mit der Entstehung von Arteriosklerose und den hiermit assoziierten Krankheiten der koronaren Herzkrankheit, zerebraler Perfusionsstörungen und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Die Folgekrankheiten der Arteriosklerose stellen in den Industrienationen die häufigste Todesursache dar, in Deutschland im Jahr 2010 beispielsweise die drei häufigsten: Chronisch ischämische Herzkrankheit, Akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, 2010).

Die Arteriosklerose ist eine entzündliche, ubiquitär vorkommende Erkrankung des Endothels. Durch Dysfunktionen der Endothelmembran entstehen zunächst Verdickungen der Intimaschicht (Sklerosen), gefolgt von Lipideinlagerungen, Makrophageneinwanderung und Hypertrophie der glatten Muskulatur. Während die Pathogenese der Arteriosklerose bereits detailliert beobachtet und beschrieben wurde existiert noch keine zufriedenstellende Erklärung der Ätiologie.

Im häufigsten Fall sind die unter der Arteriosklerose beobachteten Störungen des Fettmetabolismus Folge eines metabolischen Syndroms. Selten jedoch können primäre Störungen eine Arteriosklerose verursachen, ohne die üblichen Begleiterkrankungen und -syndrome des metabolischen Syndroms zu zeigen. Der Übergang zwischen metabolischen Syndrom begünstigenden und Arteriosklerose auslösenden Faktoren ist dabei fließend. Bei beiden Krankheiten konnten Diabetes mellitus, Hypertonie, Nikotinabusus und Fettstoffwechselstörungen als maßgebliche Risikofaktoren identifiziert werden (Grundy et al., 1998). Störungen des Fettstoffwechsels selbst können exogene Ursachen (Über-, Fehl- oder Mangelernährung, regelmässiger Alkoholkonsum, Medikamenteneinnahme) als auch endogene Ursachen haben.

Die endogenen Störungen des Fettstoffwechsels sind meist Folge molekulargenetischer

Funktionsstörungen im Bereich der Apolipoproteine, Enzyme, Rezeptoren und der Trägerproteine. In der Human Gene Mutations Database waren im 4. Quartal 2011 insgesamt 134 Mutationen der LPL mit klinischen Syndromen assoziiert, davon die meisten (91) unspezifisch mit der LPL-Defizienz, und immerhin 19 direkt mit der Hypertriglyzeridämie Typ I (Human Gene Mutations Database, 2011). Die Aufgabe der LPL ist die Abspaltung von Fettsäuren aus Triacylglycerolen (TG) durch Hydrolyse. Sie ist an die Proteoglykane der Zellmembran gebunden und das geschwindigkeitsbestimmende Element bei der Triglyzeridspaltung aus Chylomikronen und Lipoproteinen sehr geringer Dichte (Olivecrona and Olivecrona, 1995). Daher spielt sie im Fettstoffwechsel eine zentrale Rolle. Durch ihre Funktion senkt sie den Plasmaspiegel der TG und stellt freie Fettsäuren (FFA) für den zellulären Stoffwechsel parat, die durch spezifische Fettsäure-Transporter in Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden (Goldberg et al., 2009). In klinischen Studien konnten einzelne Mutationen mit der koronaren Herzkrankheit, der familiären kombinierten Hypercholesterinämie und der Chylomikronämie eindeutig assoziiert werden (Johansen and Hegele, 2011; Breier et al., 1985).

Mutationen können ebenso in Apolipoproteinen auftreten und durch die fehlerhafte Interaktion mit fettspaltenden Enzymen wie der bereits erwähnten LPL zu Fettstoffwechselstörungen führen. So wurden am Menschen signifikante Änderungen der TG-Plasmakonzentrationen bei Mutationen der Apolipoproteine A5 (ApoA5) und C3 (ApoC3) beschrieben (Kluger et al., 2008; Henneman et al., 2008). Zahlreiche klinische Studien zeigen außerdem ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle, koronare Herzkrankheit und weitere Ausprägungen des metabolischen Syndroms in Patienten mit Mutationen im ApoA5- oder ApoC3-Gen (Johansen and Hegele, 2011; Járomi et al., 2010; Caterina et al., 2010; Maasz et al., 2008). Diese Verknüpfung erscheint logisch, da erhöhte Plasma-TG-Spiegel als Risikofaktor bei der Entstehung der Arteriosklerose identifiziert wurden.

Tabelle 1.1: Klassen der Lipoproteine und deren Kenndaten

Klasse	Chylo- mikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte ($\frac{g}{cm^3}$)	< 0,95	0,95 - 1,006	1,006 - 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,210
Größe (nm)	< 1000	50	30	21	8 - 12
Proteinanteil (%)	1,5 - 2,5	5 - 10	15- 20	20 - 25	20 - 35
Phospholipidanteil (%)	7 - 9	15 - 20	22	15 - 20	20 - 35
TG-Anteil (%)	84 - 89	50 - 65	22	7 - 10	3 - 5
freies CHOL (%)	1 - 3	5 - 10	8	7 - 10	3 - 4
CHOL-Ester (%)	3 - 5	10 - 15	30	35 - 40	12
Apolipoproteine	A1, A2, B48, C1, C2, C3, E	A5, B100, C1, C2, C3, E	B100, C3, E	B100	A1, A2, A5, C1, C2, C3, D, E

HDL $\hat{=}$ High Density Lipoprotein, **VLDL** $\hat{=}$ Very Low Density Lipoprotein, **LDL** $\hat{=}$ Low Density Lipoprotein, **IDL** $\hat{=}$ Intermediate Density Lipoprotein

Apolipoprotein A5 wird als potentestes Modulationsprotein der Hydrolysegeschwindigkeit angesehen, wobei dies *in vivo* an der Abnahme von Plasma-TG-Konzentrationen festgemacht wurde. Demgegenüber ist Apolipoprotein C3 ein potenter Antagonist mit nachgewiesener Hemmung der Hydrolyseaktivität der LPL. Beide Apolipoproteine scheinen ihre Wirkung unabhängig voneinander zu entfalten und beeinflussen sich nicht gegenseitig (Baroukh et al., 2004).

1.2 Lipoproteine

Lipide sind aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften nur schlecht im Blutplasma löslich. Während freie Fettsäuren im Blutplasma an Albumin gebunden sind, werden komplexere Fette in wässriger Umgebung mithilfe von Proteinen transportiert, die die Fette netzartig umgeben. Dadurch versehen sie den Lipidkern mit einer amphiphilen Hüllschicht. Die hydrophile Außenseite dieser Schicht verleiht dem Lipoprotein seine Löslichkeit in wässrigen Medien. Zudem ordnen sich im Lipidkern die unpolaren Gruppen (vor allem TG und Cholesterol-Ester) im Zentrum und die amphiphileren Substanzen (Phospholipide und Cholesterol) im Hüllbereich an, was die Löslichkeit positiv beeinflusst.

Tabelle 1.2: Apolipoproteine und ihre Funktionen

Apolipoprotein	Lipoproteinklasse	Funktion
A 1	HDL	Aktivator der LCAT, Ligand des ApoA1-Rezeptors
A 2	HDL	Strukturbildner
A 4	HDL	Triglyzeridstoffwechsel, LCAT-Aktivator
A 5	HDL, VLDL	Triglyzeridsenkung durch Aktivierung der LPL
B 48	Chylomikronen	Strukturkomponente, Interaktion mit LDL- und LRP-Rezeptor
B 100	VLDL, IDL, LDL	Strukturprotein von VLDL, IDL und LDL; Interaktion mit LDL-Rezeptor
C 1	HDL, VLDL	Hemmung der hepatischen Aufnahme von remnants
C 2	HDL, VLDL, IDL	Cofaktor zur Aktivierung der LPL
C 3	HDL, IDL, VLDL, Chylomikronen	Inhibitor von LPL und HL, evtl. Hemmung der hepatischen Aufnahme von Chylomikronen und VLDL-remnants
D	HDL	Aktivator der LCAT, Strukturprotein
E	Chylomikronen, Chylomikronenremnants, HDL, VLDL, IDL	Ligand bei der Bindung an den LDL- und den LRP-Rezeptor, möglicherweise auch an einen eigenen HL-Rezeptor; 3 Formen

In der Fachliteratur hat sich für diese Aggregate die Bezeichnung Lipoproteine durchgesetzt. Die durch Nebenvalenzen an die Lipide gebundenen Proteine bezeichnet man als Apolipoproteine. Lipoproteine werden entsprechend ihres Flottierens in der Ultrazentrifugation bei spezifischen Basismedien in 5 Dichteklassen eingeteilt (Havel et al., 1955).

Eine Übersicht über die Lipoproteinklassen und deren physikalische Eigenschaften liefert Tabelle 1.1 auf Seite 4.

Neben ihrer Struktureigenschaft regulieren Apolipoproteine außerdem den eigentlichen Fettstoffwechsel, indem sie sowohl die Aufnahme der Lipoprotein-Partikel durch spezifische Rezeptoren vermitteln als auch die Funktion der beteiligten Enzyme regulieren. Eine Übersicht über die bislang beschriebenen Apolipoproteine und ihre Funktion gibt Tabelle 1.2 auf Seite 5.

1.3 Lipoproteinstoffwechsel

Nach der Nahrungsaufnahme von Fetten werden diese im Lumen des Darms durch die Pankreaslipase enzymatisch in freie Fettsäuren und Monoacylglycerole aufgespalten, welche dann von den Enterozyten resorbiert werden. In denselben Zellen erfolgt dann die Resynthese von Triglyceriden und anderen Lipiden. Diese werden mit einer Hüllschicht aus Phospholipiden und Apo-B48 sowie weiteren Proteinen versehen und ergeben so die Chylomikronen. Nach der Exozytose in Lymphbahnen und deren Weiterleitung über den *ductus thoracicus* bis in die *vena cava superior* verteilen sich die Partikel im großen Kreislauf.

Im Blutplasma erfahren die Lipoproteine und Chylomikronen untereinander einen stetigen nichtenzymatischen Austausch von Apolipoproteinen. So aktiviert das unter anderem von HDL auf die Chylomikronen übertragene Apo-C2 das Enzym LPL, welches die Fette aus den Chylomikronen erneut hydrolysiert. Die nun freigesetzten Fettsäuren werden entweder von Muskel- oder Fettgewebe aufgenommen oder über das Plasma-Albumin zur Leber transportiert. Im Verlauf ihrer Verkleinerung nehmen die Chylomikronen Apo-E sowie die endothelständige LPL auf und geben Apo-A1, Apo-A4 und Apo-C1 bis 3 an die HDL ab. Es entstehen Chylomikronreste, sogenannte *remnants*, die in der Leber Apo-E-vermittelt über LDL-Rezeptoren und LDL-verwandte Rezeptoren (LRP) per Endozytose aufgenommen werden (Beisiegel and Heeren, 1997). Nach dem lysosomalen Abbau kumulieren in den Hepatozyten freie Fettsäuren und Cholesterolester, die als Bausteine für die weitere Lipoproteinsynthese verwandt werden, ebenso wie Apo-E und LPL, welche in anderen Partikeln sezerniert werden können (Heeren et al., 2003). Das oben genannte HDL nimmt nach Synthetisierung in der Leber und Abgabe in die Blutbahn Cholesterin auf verschiedenen Wegen auf. Im Austausch mit den anderen Lipoproteinklassen gibt es im Gegenzug Triglyceride ab. Cholesterin wird wiederum auf die LDL-Klasse übertragen, welche in der Leber oder auch peripher aufgenommen wird. Zusammenfassend dient dieser Metabolismus dem Transfer von mit der Nahrung aufgenommenen freien Fettsäuren an das Fett- und Muskelgewebe und der Verteilung von Cholesterin im gesamten Körper zur weiteren Verwertung.

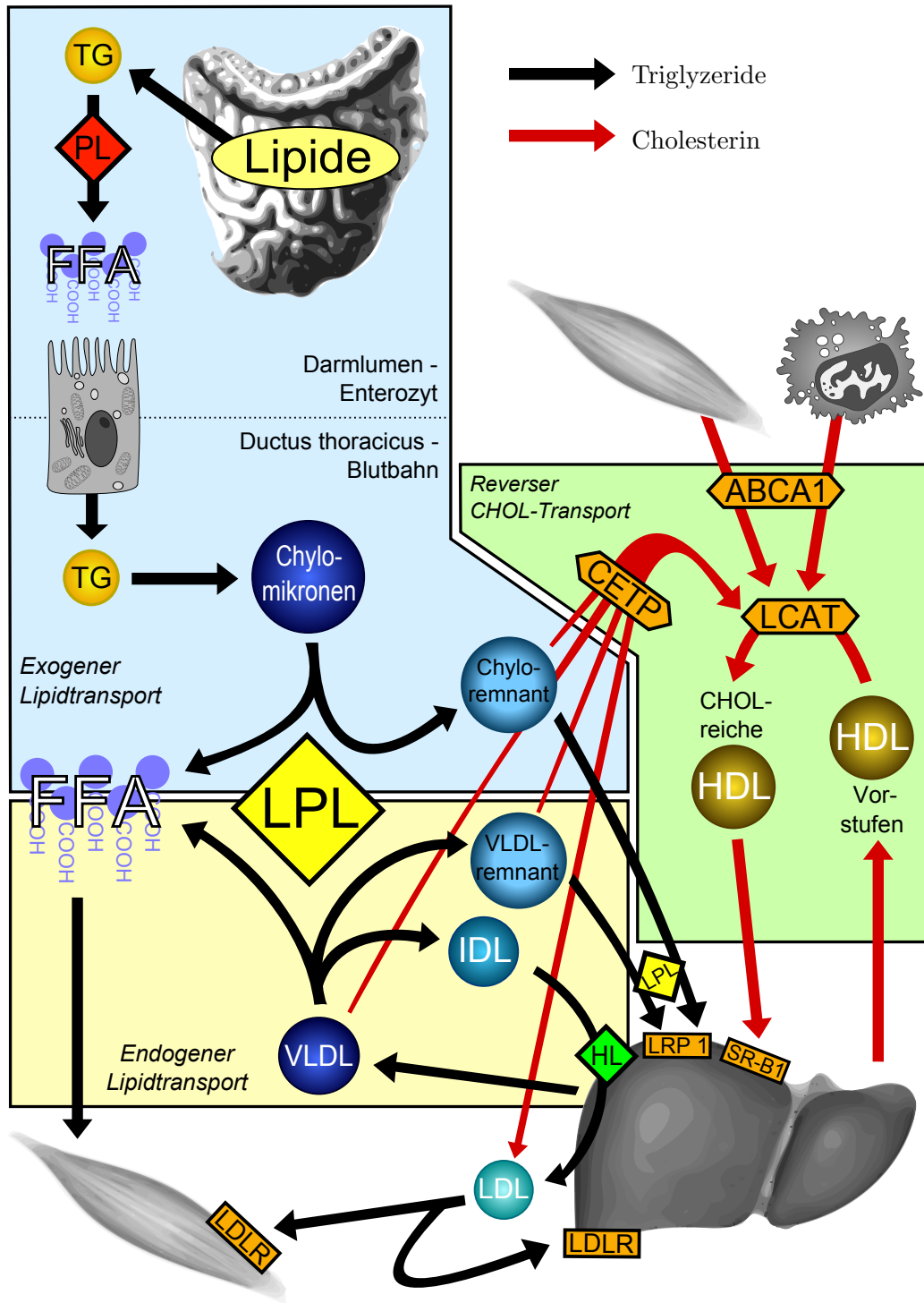


Abbildung 1.1: Auszugsweise und schematische Darstellung des Lipidstoffwechsels; Abkürzungen: CHOL $\hat{=}$ Cholesterin; TG $\hat{=}$ Triglyzeride; LPL $\hat{=}$ Lipo-proteinlipase; HL $\hat{=}$ Hepatische Lipase; LDLR $\hat{=}$ LDL-Rezeptor; VLDL, IDL, LDL und HDL siehe Tabelle 1.1

1.4 Micellen und deren physikalische Eigenschaften

Micellen sind ein physikalisches Modell zur Beschreibung vom Verhalten von amphiphilen Substanzen in Dispersionsmedien ¹. Bestandteile von Micellen sind amphiphile Substanzen, die also ein hydrophiles und ein lipophiles Ende ausweisen. In Dispersionsmedien, wie beispielsweise Wasser, lagern sich diese Moleküle selbstaggregierend zusammen. Dabei kehren sich die hydrophilen Enden der Fettsäuren nach außen, während die lipophilen Enden zum Zentrum der Micelle hin gerichtet sind (siehe Abbildung 1.2).

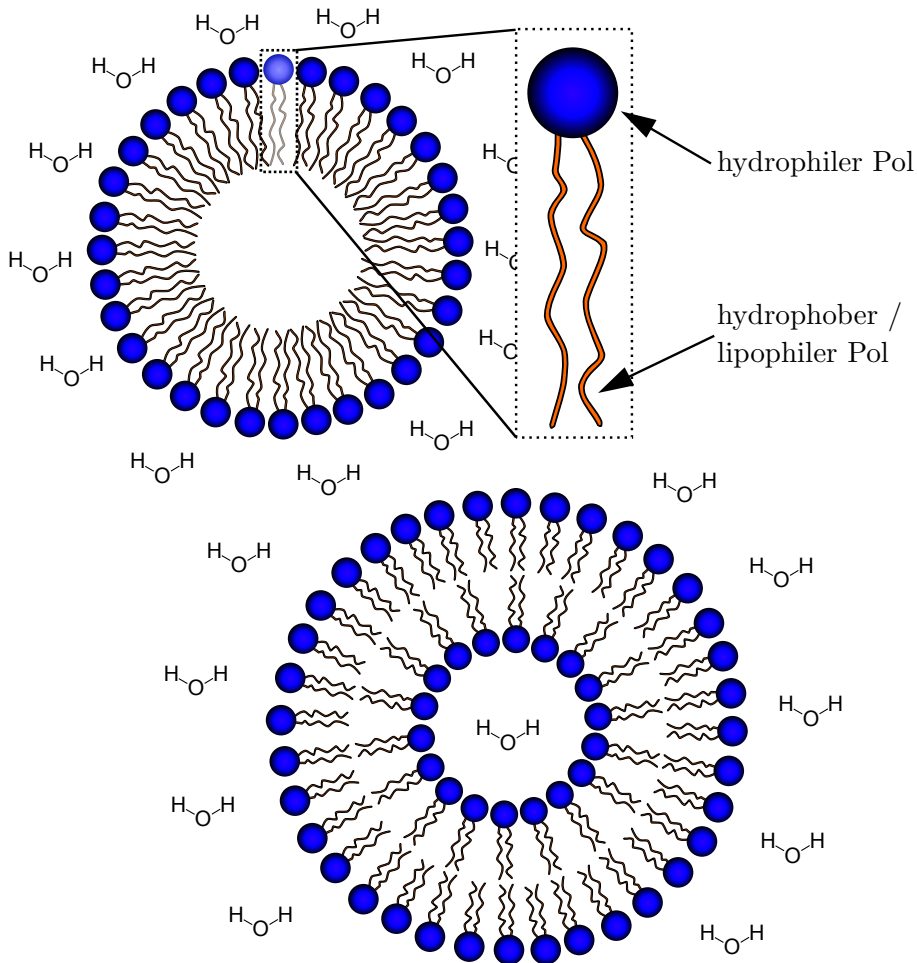


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer Micelle (oben) und eines Liposoms (unten) in wässrigem Medium mit Detaildarstellung eines amphiphilen Moleküls

¹Als *Dispersion* bezeichnet man ein Medium, welches aus mindestens zwei nicht mischbaren oder nicht ineinander löslichen Substanzen besteht. Häufiges Beispiel ist die Kombination aus Öl und Wasser. Die Substanzen sind durch physikalische Methoden mischbar (*Emulsion*), lassen sich aber spontan (Sedimentation) oder unter äußerem Einfluß (Zentrifugation, Filtration etc.) wieder trennen.

Voraussetzung dafür ist, daß eine bestimmte Konzentration der amphiphilen Substanz im Lösungsmedium überschritten ist, die „kritische Micellenkonzentration“, welche abhängig vom Lösungsmedium und der Lipidzusammensetzung ist. Auf der Micellenoberfläche entsteht eine Oberflächenspannung, welche sich gleichmäßig verteilt. Die relative Oberflächenspannung der kugelförmigen Micelle wird umso geringer, je größer deren Durchmesser ist. Dies ist darin begründet, dass das mathematische Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bei größerem Durchmesser kleiner wird, und somit auch das Energie/Volumen-Verhältnis. Da physikalische Körper stets Zustände niedriger potentieller Energie anstreben, nehmen Micellen eine Kugelform mit möglichst großem Durchmesser an. Daraus folgt, daß zur Verkleinerung von Micellen (also Vergrößerung der Gesamtoberfläche) von außen Energie zugeführt werden muß, was entweder durch Schütteln oder kontrolliert durch Ultraschallwellen erfolgen kann. Dadurch erzeugt man aus der zweiphasigen Dispersion eine Emulsion. Läßt man dagegen eine Micellenlösung lange Zeit in einem Schwerkraftfeld konstant ausgerichtet stehen, so aggregieren die Micellen zu immer größeren Einheiten und letztendlich bis zu einer eigenen öligen Phase zurück („Sedimentation“).

1.4.1 Liposomen

Liposomen sind charakterisiert durch eine Doppelmembran amphiphiler Moleküle, im Gegensatz zur Einfachmembran der Micellen. Die Fähigkeit eine Doppelmembran zu bilden setzt voraus, daß die molekularen Kräfte innerhalb der Lipidphase ausreichend sind um das Liposom zu stabilisieren. Die nötige Oberflächenspannung wird dabei meistens durch Phospholipide gewährleistet. Liposomen sind also stabile Aggregate, die ohne Energiezufuhr nicht zu einer eigenen Phase reaggregieren. Sie können auch aus mehreren konzentrischen Doppelmembranen bestehen, von denen nur die äußerste Kontakt zum Lösungsmedium hat. Insbesondere im angloamerikanischen Raum werden Liposomen auch „Bicellen“ („bicells“) genannt, in Anlehnung an die bilaminäre Struktur. Klinisch angewandt werden Liposomen als Träger für Medikamente, deren Wirkungsort intrazellulär liegt. Durch Verschmelzung mit einer Zellmembran wird der enthaltene Wirkstoff nach intrazellulär geschleust. Genutzt wird dies im Rahmen des „Targeted Drug Delivery“. Im Jahr 2008 waren in den USA 11 Medikamente zugelassen, die den liposomalen Transportweg nutzen (Zhang et al., 2008), vornehmlich in der Infektiologie und Onkologie. Die zusätzliche Maskierung mit Apolipoproteinen begünstigt bzw. ermöglicht es zudem, das Liposom per Endozytose nach intrazellulär zu schleusen (Kopecka et al., 2011).

1.4.2 Micellen als LPL-Substrat

Micellen werden *in vitro* als alternatives Substrat der LPL eingesetzt. Ihre Vorteile liegen in der einfacheren Herstellung im Vergleich zu VLDL oder Chylomikronen, welche zunächst aus Blutplasma bzw. Lymphflüssigkeit gewonnen werden müssen. Dieser Prozess ist ungleich material- und zeitaufwändiger und außerdem quantitativ limitiert, da für einen einzelnen VLDL-Genotyp viel Plasma, und somit im Fall des murinen Modells zahlreiche Einzelblutproben vorliegen müssen. Durch den in Abschnitt 2.6 dargestellten Herstellungsprozess werden beide physikalischen Aggregate - Liposomen und Micellen - in unbekanntem Verhältnis erzeugt. Micellen besitzen hiernach einen Durchmesser von 4 bis 100 nm und Liposomen einen Durchmesser von 20 bis 100 nm. Insofern sind Liposomen größenähnlicher zu den TG-haltigeren VLDL- und IDL-Partikeln, während Micellen eher LDL- und HDL-Partikeln ähneln (siehe Tabelle 1.2). Erst die Trennung in der Ultrazentrifugation, in Anlehnung an das Vorgehen zur Auftrennung der Lipoproteinfraktionen (Havel et al., 1955), isoliert die für einen Vergleich zur VLDL heranziehbare Größenklasse der Micellen. Die zum Lösungsmedium zeigende Membranschicht sollte daher die Eigenschaften bestimmen, welche das Verhalten in der Hydrolyse durch die LPL ausmachen. Der Einfachheit halber wird im Folgenden von „Micellen“ gesprochen, wenn von der soeben beschriebenen Micellen-Liposomen-Lösung die Rede ist, auch wenn dies *vor* der Durchführung der Ultrazentrifugation streng genommen physikalisch nicht korrekt ist.

Um das Verhalten von künstlichen Lipidpartikeln während der Lipolyse möglichst nahe an der Realität zu halten, müssen diesen Apolipoproteine übertragen werden (Rensen et al., 1997a,b). Die Isolierung bzw. Herstellung und Übertragung dieser Apolipoproteine auf die Micellen ist bei der Aufwändigkeitsbetrachtung mit einzubeziehen. Ob die nicht natürliche Zusammensetzung durch fehlende Proteine oder Stoffe in oder auf der Membran der Micellen eine signifikante Änderung des Verhaltens in der Hydrolyse bedeutet, soll Thema dieser Dissertation sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav LVSA 50/70	Zirbus Technology, Bad Grund
Feinwaage LA620P	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad München
Netzgerät Powersupply Power Ease 500	Invitrogen, Frankfurt a.M.
UV-Videokammer für Agarosegele	Itas, Stuttgart
Spritze (Hamilton)	Carl Roth, Karlsruhe
Heizblock Thermoshaker TS1	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Kendro, Hanau
Mikrotiterplatten-Lesegerät MRX-2	Dynex Technologie, Frankfurt a.M.
Software Dynex Revelation Version 4.21	Dynex Technologie, Frankfurt a.M.
Software SPSS Statistics 17.0.0	IBM Corporation, Somers (NY), USA
Mikrotiterplatten-Lesegerät Anthos Multiread 400	Biochrom ltd., Cambridge, UK
Excel-Tabellenkalkulationssoftware	Microsoft Corp., Redmond (WA), USA
PCR-Thermozykler TP 48	Biometra, Göttingen
Rüttler Certomat TC2	B.Braun Biotech, Melsungen
Schüttelinkubator TH15/KS15	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Ultrazentrifuge Model L7-55	Beckman and Coulter, München
Rotor SW 40 (swing out)	Beckman and Coulter, München
Rotor 42 Ti (solid)	Beckman and Coulter, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen Frankfurt a.M.
Glyzerol	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Heparan Sulfat Proteoglykan, bovin (HSPG)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Natrumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Kaliumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen
NEFA C-Kit für freie Fettsäuren	Wako Chemicals, Neuss
Phenol	Invitrogen, Frankfurt a.M.
Precipath Standardlösung für Lipidassays (CHOL und TG)	Roche-Hitachi, Mannheim
Cholesterin (CHOL)-Reaktionslösung	Roche-Hitachi, Mannheim
Triglyzeride (TG)-Reaktionslösung	Roche-Hitachi, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
J's buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.3 Enzyme und Proteine

Enzym/Protein	Hersteller
Proteinase K	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen Carlsbad, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck

2.1.4 Lipide und Fette zur Micellenherstellung

Substanz	Hersteller
Triolein	Sigma, Deisenhofen
Egg Yolk Phosphatidylcholine	Sigma, Deisenhofen
Lysophosphatidylcholine	Sigma, Deisenhofen
Cholesterin Oleat	Sigma, Deisenhofen
Cholesterin	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Oligonukleotide und PCR-Zubehör

Oligonukleotide	Hersteller
Desoxyadenosintrisphosphat (dATP)	Roche, Mannheim
Desoxycytidintrisphosphat (dCTP)	
Desoxyguanosintrisphosphat (dGTP)	
Desoxythymidintrisphosphat (dTTP)	
100bp-PCR-Marker (1 µg/µl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Primer A5Neo/1FW	MWG Biotech, Ebersberg
Primer A5Neo/2BW	
Primer HygroFW	
Primer HygroBW	
Primer mA5WT/1FW	
Primer mA5WT/2BW	

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Falcon Tubes 15 ml, 25 ml und 50 ml	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Hämatokritkapillaren	Hirschmann, Eberstadt
Mikrotiterplatten	Nunc, Wiesbaden
Mikrotiterplatten Maxi Sorp	Nunc, Wiesbaden
PCR-Stripes (Strip 8 x 2 ml und Cap)	Simport, Canada
Phenolfeste Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl und 1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäß Safe Loc 0,5 / 1,5 / 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifugations-Röhrchen	Beckmann & Coulter, München

2.1.7 Puffer und weitere Standardlösungen

Phosphate Buffered Saline

8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,44 g Na₂HPO₄ + 0,24 g KH₂PO₄ in 1 l Wasser.

Tris-EDTA-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,6 und 1 mM EDTA pH 8,0 in 50 ml Wasser.

Lysispuffer für Schwanzspitzenverdau

Für 1000 ml Lysis-Puffer in zweifacher Konzentration wurden 480 g Harnstoff in 200 ml erhitztem Wasser vollständig gelöst. Dieser Lösung wurden 200 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 80 ml 5 M NaCl, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 33 ml 30-prozentigen Sarkosyls zugefügt und ad 1000 ml mit Wasser aufgefüllt. Nach der Verdünnung auf einfache Konzentration ergeben sich folgende Konzentrationen in der Pufferlösung: Harnstoff 1 M Tris-HCl 0,025 M NaCl 0,05 M EDTA 2,5 mM und Sarkosyl 0,25 %.

Bromphenolblau-PCR-Ladepuffer für Gelelektrophorese

500 µl von 10%-igem Bromphenolblau werden in 6 ml Glycerol pipettiert und mit Wasser ad 20 ml aufgefüllt.

Puffer für die LPL-Extraktion

Puffer 1 für LPL-Extraktion

0,4 M NaCl in 10 mM Tris pH 7,4

Puffer 2 für LPL-Extraktion

0,75 M NaCl in 10 mM Tris pH 7,4

Puffer 3 für LPL-Extraktion und -elution

1,5 M NaCl in 10 mM Tris pH 7,4

Puffer für den HSPG-Hydrolyse-Assay

0,1 M Trispuffer pH 8,5

12,114 g Tris-Base werden ad 1000 ml Wasser aufgefüllt und vollständig gelöst. Unter pH-metrischer Kontrolle und kontinuierlichem Rühren wird mit NaOH oder HCl der pH-Wert auf 8,5 titriert.

0,1 M Tris-20%-Glyzerol-Puffer pH 8,5

100 ml Glyzerol werden in 400 ml des oben genannten 0,1 M Trispuffers (pH 8,5) gelöst. Unter pH-metrischer Kontrolle und kontinuierlichem Rühren wird erneut mit NaOH oder HCl der pH-Wert auf 8,5 titriert.

0,1 M Tris-1%-BSA-Puffer pH 8,5

1 g FFA-free BSA werden in 100 ml des oben genannten 0,1 M Trispuffers pH 8,5 vollständig aufgelöst.

2.2 Methodik

2.2.1 Sterilisation

Geräte und Substanten, welche der Hitze des Autoklaven standhalten, wurden für 30 Minuten bei 121°C und 2 Bar Umgebungsdruck dampfsterilisiert. Substanzen, für die dieses Verfahren nicht in Frage kam, wurden durch einen 0,2 µm-Filter gereinigt. Wasser wurde zunächst doppelt destilliert und ebenfalls im Autoklaven sterilisiert. Wenn in dieser Arbeit von Wasser im laborchemischen Sinne gesprochen wird, ist damit mit vorstehender Prozedur aufbereitetes, destilliertes Wasser gemeint.

2.2.2 Versuchstierhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden in noxenarmen Tierhaltungen des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gehalten. Voraussetzung für die Eignung zum Laborversuch war die negative Testung auf übliche Serologien (SPF $\hat{=}$ „specific pathogen free“), insbesondere des Maushepatitisvirus (MHV). Um die pathogenarme Einschleusung zu gewährleisten wurden die Mauslinien per Embryonentransfer in die Tierhaltung verbracht.

Alle Mäuse hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Das Futtermaterial wurde auf Basis der „Chow-Diet“ zusammengestellt, der in Tierhaltungen standardisierten Nagetierdiät mit einem Nahrungsfettanteil von 4%. Die einzelnen Mauslinien basieren auf einem homogenen genetischen Maustyp (FVB-Maustyp). Bei der Verpaarung wurde darauf geachtet, daß alle für die Untersuchung nötigen Genotypen mit der nach den mendelschen Regeln höchstmöglichen Wahrscheinlichkeit auftraten. Eine Trennung der Tiere nach Geno-Subtyp wurde bei den Tieren einer Mauslinie nicht durchgeführt.

2.2.3 Genehmigung der Tierversuche

Für die Tierversuche bestanden Genehmigungen nach §7 TierSchG (20/1999, 51/2002, 14/2005) und §6 TierSchG (UKE-VTH Aktenzeichen A65 und A66). Blutentnahmen

der Tiere hatten das interne Registrierungszeichen Org 163 und 288 der Universität Hamburg. Bei der Durchführung der Tierexperimente wurde sich an den Richtlinien der Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) orientiert.

2.3 Mauslinien

2.3.1 ApoA5-defiziente Mauslinie („ApoA5ko“)

Bei dieser Mauslinie wurden per Gen-Targeting drei Exons des ApoA5-Gens durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt und so heterozygote ApoA5-defiziente Mäuse geschaffen. Die Tiere dieser Mauslinie wurden für unser Labor von L.A. Pennacchio (Genome Science Department, Lawrence Berkely National Laboratory, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt und wie bereits beschrieben in die Versuchstierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf eingeschleust.

Durch konsekutive Kreuzung dieser Tiere entstanden entsprechend der Mendel'schen Regel folgende weitere Genotypen: ApoA5 $-/-$ und ApoA5 $+/+$ zu je 25% sowie weitere heterozygote Tiere ($-/+$) zu 50%. Für die nachfolgenden Versuche wurden nur homozygote Knockout-Mäuse (ApoA5 $-/-$) verwendet, für die weitere Kreuzung die heterozygoten Tiere oder eine Paarung aus einem heterozygoten und einem homozygoten Knockout-Tier. Aus letzterem Verpaarungsschema sollten schließlich 50% heterozygote und 50% homozygote Tiere bezüglich der ApoA5-Defizienz entstehen. Zweck war die Gewinnung der VLDL-Lipoprotein-Fraktion aus dem Serum ApoA5-depletierter Mäuse für den in Kapitel 2.8 beschriebenen Assay.

2.3.2 Mauslinie mit Defizienz des Apolipoproteins C3 sowie Apolipoproteins A5 („ApoA5ko-ApoC3ko“)

Diese Mauslinie ist eine Kreuzung zwischen ApoA5-defizienten und ApoC3-knockout-Mäusen. Im ersten Fall wurde wie bereits in Abschnitt 2.3.1 beschrieben ApoA5 durch Gen-Targeting durch das Neomycin-Resistenz-Gen ersetzt. Zusätzlich wurde an einer separaten Mauslinie durch identische Methoden das Gen des Apolipoproteins C3 durch das Hygromycin-Resistenzgen am Genlokus des murinen Chromosoms 9 ersetzt. So ergab sich die Mauslinie „ApoC3ko“ mit dem Genotyp ApoC3 $-/-$. Durch Verpaarung beider Linien wurden Mäuse ausgewählt, die sowohl homozygot bzgl. der Defizienz für ApoA5 als auch der für ApoC3 waren (ApoA5 $-/-$, ApoC3 $-/-$). Dies geschah in 100% der Fälle bei Verpaarung der individuellen Apolipoprotein-Mauslinien, sofern die verpaarten Tiere bereits homozygot defizient waren. In dieser Arbeit wurde die VLDL-Fraktion von Blutseren der Mäuse dieser Mauslinie eingesetzt.

2.4 Genotypisierung der Mäuse

2.4.1 Prinzip

Zellen aus der Schwanzspitzenbiopsie einer Maus wurden zunächst in Lysispuffer desintegriert und der Proteinanteil mittels des Enzyms Proteinase K abgebaut. Nach ihrer Reinigung wurde die DNA mittels PCR amplifiziert und anschließend per Gelelektrophorese analysiert.

2.4.2 Schwanzbiopsie

Vor der Entnahme wurden die 4-6 Wochen alten Jungmäuse in einen abdeckbaren Glasbehälter mit ethergetränkten Zellstoffballen überführt. Die Tiefe der Narkose wurde anhand der Atemfrequenz und der Atemzugtiefe festgemacht. War die Atmung der Mäuse bradypnoeisch und tief entnahm man das Tier aus dem Gefäß und entfernte mit einem Skalpell etwa 5mm der Schwanzspitze. Um die Identifikation der Mäuse zu gewährleisten wurden die Mäuse in diesem Zustand per Ohrlochzange markiert. Der Wundverschluß erfolgte mit Histoacryl-Gewebekleber. Die Schwanzspitze wurde sofort luftdicht verschlossen bei -20°C gelagert.

2.4.3 Verdau und DNA-Extraktion

Jede Schwanzspitze wurde in einem Eppendorf-Gefäß (2ml Kapazität) mit 400 µl Lysispuffer und 50 µl Proteinase-K (10 mg/ml) für 18 Stunden bei 45°C im Schüttelinkubator verdaut. Im Anschluß erfolgte das Herunterkühlen auf 4°C und die Zugabe von 400 µl chloroformgesättigtem Phenol in das Reaktionsgefäß. Dieses wurde daraufhin 30 Sekunden gevortext und 5 Minuten bei 13.000 RPM in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand von etwa 400 µl wurde mit der Pipette in ein zweites Gefäß übertragen und die darin gelöste DNA mit 1ml Ethanol ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 RPM für 5 Minuten sammelte sich die ausgefällte DNA als weiß-gräuliches Pellet auf dem Boden des Gefäßes und konnte von dort mit einer Pipettenspitze oder Hämatokritkapillare in 200 µl TE-Puffer überführt werden, wo sie sich erneut löste und dann bei 4°C gelagert wurde.

2.4.4 PCR und Gelelektrophorese

Die in TE-Puffer gelöste DNA wurde mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend per Elektrophorese dargestellt. Dieser Vorgang wurde je Probe wiederholt, um die Fehlerwahrscheinlichkeit zu verringern. Das Prinzip der Vervielfältigung eines Genproduktes mittels der PCR wird im Folgenden als bekannt vor-

ausgesetzt - die PCR-Protokolle unterscheiden sich jedoch in Abhängigkeit von dem untersuchten Gen und werden separat besprochen.

Um das für die Elektrophorese benötigte 1,5% Agarose-Gel zu erhalten mischte man pro Gelplatte 100ml TBE-Puffer mit 1,5 g Agarose in einem Becherglas und erhitzte es unter Aufsicht auf einer Heizplatte bis die Agarose im Puffer vollständig gelöst war. Anschließend wurden 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt und durch Schwenken möglichst gleichmäßig verteilt. In die mit 20- oder 15-zähligen Kämmen präparierten Gelkammern wurde das Gel dann blasenfrei eingegossen. Nach der Abkühlung und Aushärtung, üblicherweise nach etwa 30 Minuten, konnte man die Kämmen ziehen und das fertige Gel auf dem Trägerschlitten in die mit TE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführen. Dabei war darauf zu achten, daß die Oberkante des waagrecht ausgerichteten Gels so knapp wie möglich aber komplett mit Puffer bedeckt war. In jede Kammreihe wurden die ersten drei Taschen zunächst mit einem 100bp-Marker, einer Positivprobe des jeweiligen PCR-Produktes und TBE-Puffer als Negativprobe befüllt. Alle Proben, PCR-Produkte und Testmarker wurden vor dem Befüllen mit 3µl Bromphenolblau-Ladepuffer vermischt. Die Auftrennung erfolgte durch eine 45-minütige Elektrophorese bei 16 V (Maximalstrom bei 100 mA und Maximalleistung bei 19 W). Die PCR-Produkte und Marker verteilten sich innerhalb des Gels entlang der Stromrichtung je nach ihrer Gesamtladung und ihrem Gewicht. Die Banden der gewanderten Proben wurden anschließend über die Fluoreszenz des im Gel enthaltenen Ethidiumbromides unter UV-Licht sichtbar gemacht und per csc-Kamera digital festgehalten.

2.4.5 PCR-Protokolle

ApoA5-Wildtyp-PCR (ApoA5 wt)

Um den ApoA5-Wildtyp im Mausgenom nachzuweisen wurde eine bereits etablierte 2-Primer-PCR verwendet. Bei Vorhandensein eines intakten ApoA5-Wildtyp-Gens amplifizierten diese Primer eine Sequenz, die in der Elektrophorese als Bande bei 516bp abzulesen war.

Folgende Sequenzen wurden angewandt:

1. Primer („mA5WT/1FW“): 5'-ACA GTT GGA GCA AAG GCG TGA T-3'
2. Primer („mA5WT/2BW“): 5'-CTT GCT CGA AGC TGC CTT TCA G-3'

Je Test-DNA wurden folgende Anteile in ein Aliquot pipettiert(Reaktionsvolumen 26,5 µl):

- 20 µl J's PCR-Puffer

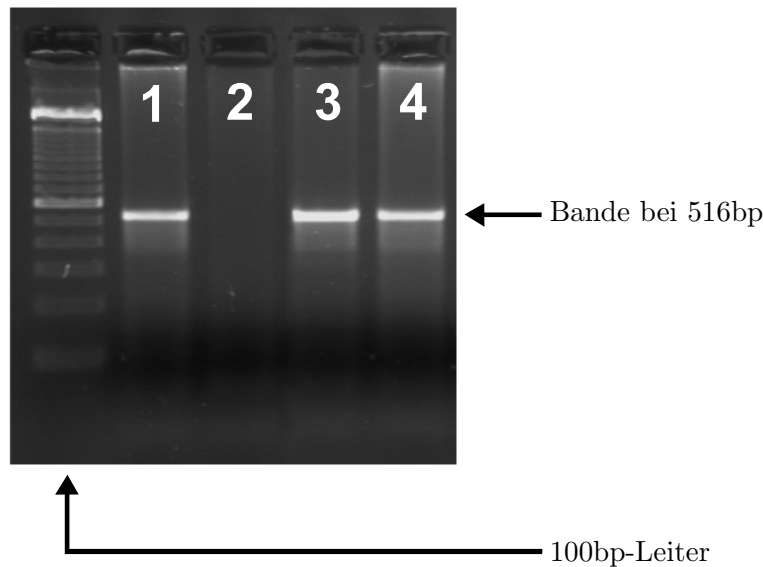


Abbildung 2.1: Beispielbild einer ApoA5-Wildtyp-PCR. Es wurde eine 100bp-Leiter mit Betonung der 600bp-Bande verwendet, das Produkt ist als Bande bei 516bp in den Wells 1, 3 und 4 zu erkennen

- je 1 μ l beider Primer
- 0,5 μ l Taq-DNA-Polymerase
- 4 μ l der in TE-Puffer gelösten DNA

Die Proben wurden bei 95°C zunächst für eine Minute denaturiert und im folgenden in 35 Zyklen (1 Minute bei 95°C - 1 Minute bei 53°C - 3 Minuten bei 72°C) amplifiziert. Danach erfolgte die Kühlung auf 4°C, bis die Proben in den Kühlschrank / das Elektrophoresegel überführt wurden. Als Positivkontrolle dienten 4 μ l der DNA einer in vorherigen PCR's positiv bestimmten Maus und als Negativkontrolle 4 μ l TE-Puffer.

PCR zum Nachweis des Neomycin-Resistenz-Gens

Das Neomycin-Resistenz-Gen als Äquivalent eines ApoA5-knockouts wurde am ApoA5-Lokus ebenfalls durch eine bereits etablierte 2-Primer-PCR nachgewiesen. Das PCR-Produkt zeigte sich, bei vorhandenem intaktem Neomycin-Resistenz-Gen, als Bande die bei 545bp abzulesen war.

1. Primer („A5Neo/1FW“): 5'-CTT TTT GTC AG ACC GAC CTG-3'
2. Primer („A5Neo/2BW“): 5'-AAT ATC ACG GGT AGC CAA CGC-3'

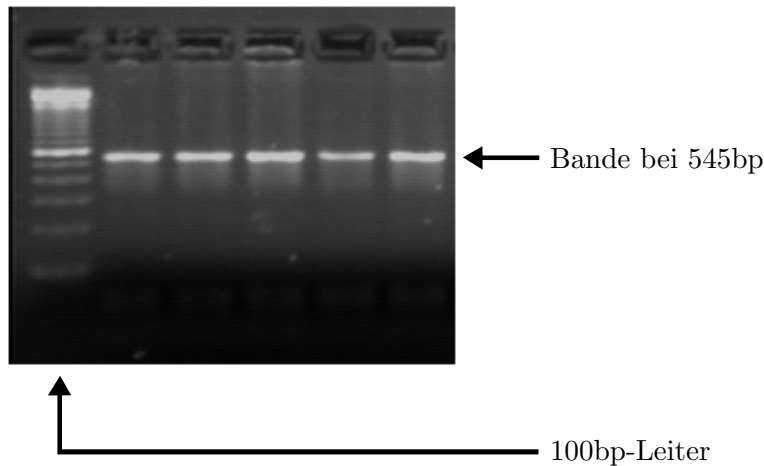


Abbildung 2.2: Beispiel einer Neomycin-PCR mit einer 100bp-Leiter, deren 600bp-Bande betont ist. Das Produkt läßt sich bei 545bp in allen abgebildeten Wells ablesen

Je Test-DNA wurden folgende Anteile in ein Aliquot pipettiert (Reaktionsvolumen 24,7 µl):

- 20 µl J's PCR-Puffer
- je 0,1 µl beider Primer
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase
- 4 µl der in TE-Puffer gelösten DNA

Die Proben wurden bei 95°C zunächst für eine Minute denaturiert und im folgenden in 35 Zyklen (1 Minute bei 95°C - 1 Minute bei 53°C - 3 Minuten bei 72°C) amplifiziert. Danach erfolgte die Kühlung auf 4°C, bis die Proben in den Kühlschrank bzw. das Elektrophoresegel überführt wurden. Als Positivkontrolle dienten 4 µl der DNA einer in vorherigen PCR's positiv bestimmten Maus und als Negativkontrolle 4 µl TE-Puffer.

PCR zur Bestimmung des Hygromycin-Resistenzgens

Das Hygromycin-Resistenzgen dient hier als Äquivalent für den ApoC3-Knockout und wird an dem ApoC3-Genlokus durch eine etablierte 2-Primer-PCR nachgewiesen. Das Genprodukt läßt sich bei vorhandenem intakten Hygromycin-Resistenzgen durch eine Bande bei 378bp nachweisen.

Folgende Primer wurden verwendet:

1. Primer („HygroFW“): 5'-AGA CCT GCC TGA AAC CGA ACT-3'

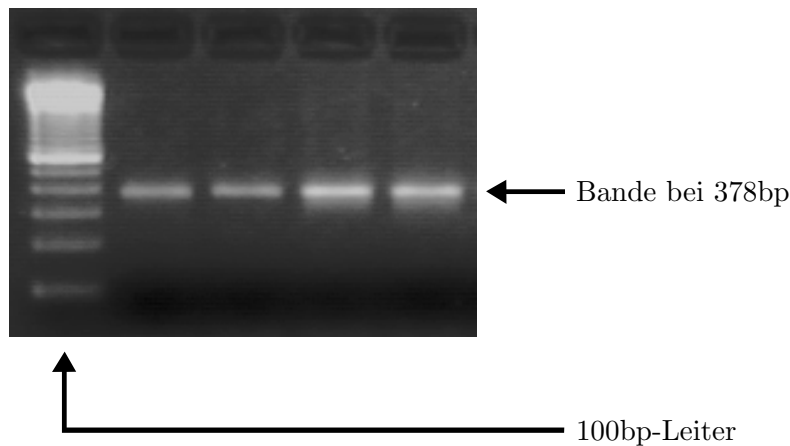


Abbildung 2.3: Beispiel einer Hygromycin-Resistenzgen-PCR mit einer 100bp-Leiter, deren 600bp-Bande zusätzlich betont ist. Gut zu erkennen sind die amplifizierten Genprodukte, die sich als Bande bei 378bp darstellen.

2. Primer („HygroBW“): 5'-CAG TCA ATG ACC GCT GTT ATG-3'

Je Test-DNA wurden folgende Anteile in ein Aliquot pipettiert (Reaktionsvolumen 20 µl):

- 2 µl 10x PCR-Puffer
- 2 µl MgCl 25mM
- je 0,8 µl beider Primer
- 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase
- 1,6 µl dNTP-Mix 2,5mM
- 10,7 µl Wasser
- 2 µl der in TE-Puffer gelösten DNA

Die Proben wurden bei 95°C zunächst für eine Minute denaturiert und im folgenden in 35 Zyklen (1 Minute bei 95°C - 1 Minute bei 68°C - 1 Minute bei 72°C) amplifiziert. Danach erfolgte die Kühlung auf 4°C, bis die Proben in den Kühlschrank bzw. das Elektrophoresegel überführt wurden. Als Positivkontrolle dienten 4 µl der DNA einer in vorherigen PCR's positiv bestimmten Maus und als Negativkontrolle 4 µl TE-Puffer.

2.5 Auftrennung der Lipoproteinfraktionen von Mausplasma

Um die Lipoproteine gemäß ihrer Dichte aufzutrennen wurden Mausplasmen sequentiell in Basismedien der Dichte 1,006 g/ml und 1,063 g/ml ultrazentrifugiert (Havel et al., 1955). Die aufgetrennten Lösungen wurden jeweils auf ihren Cholesterin- und Triglyceridanteil hin getestet. Aus den Ergebnissen wurde der jeweilige Genotyp der Maus verifiziert und so die Basis für die Weiterverwendung in nachfolgenden Untersuchungen gelegt.

2.5.1 Blutabnahme und Zentrifugation

Analog zu der im Abschnitt 2.4.2 vorgestellten Narkose wurden die Tiere betäubt. Den Mäusen wurde im narkotisierten Zustand mittels einer Hämatokritkapillare Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus abgenommen. Das Blut wurde direkt in ein Eppendorf-Gefäß überführt, das mit 4 µl EDTA (0,5 M, pH 7,5) präpariert war. Maximal wurden 200 µl abgenommen, was minimal 2 µl EDTA pro 100 µl Mausblut entspricht und so eine ausreichende Antikoagulation gewährleistete. Bei 4°C wurde das Blut dann für 10 Minuten bei 13.000 RPM abzentrifugiert und mittels einer Pipette das Plasma vom korpuskulärem Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, welches wiederum bei 4°C gelagert wurde.

2.5.2 Lipoproteinfraktion-Auftrennung

Die Lipoproteine schwimmen nur auf oder sinken auf den Boden eines Gefäßes wenn ein Dichteunterschied zum Basismedium besteht, in dem sie sich befinden. Gemäß der Definition von Havel et al ist dies im ersten Schritt 1,006 g/ml. Diese Dichte erreicht man, indem man das Blutplasma mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:1 mit einer Hamilton-Spritze unterlegt. Nachfolgend wurde das so präparierte Plasma 2,5 Stunden bei 42.000 RPM ultrazentrifugiert. Am Ende dieses Schrittes konnte die obere Hälfte des Zentrifugats abpipettiert und als VLDL-haltige Fraktion gelagert werden, die untere Hälfte enthielt die restlichen Lipoprotein-Fraktionen, die nun weiter aufgetrennt werden konnten. In einem zweiten Zentrifugationsgefäß wurde dieses Gemisch mit KBr der Dichte 1,12 g/ml, ebenfalls im Verhältnis 1:1, gemischt. Zusammen mit dem Basismedium von 1,006 g/ml ergab dies eine Dichte von 1,063 g/ml. Anschließend erfolgte eine zweite Ultrazentrifugation im selben Rotor bei 42.000 RPM für 12 Stunden. Auch hier wurde die obere Hälfte vorsichtig abgenommen und als LDL/IDL-Fraktion in ein neues Gefäß überführt. Der Unterstand entsprach der HDL-Fraktion.

Die Auswahl der Ultrazentrifuge und des Rotors wurde von der Probenanzahl und -menge abhängig gemacht. Bei gepoolten Plasmaproben wie man sie für die Herstellung

großer Mengen von VLDL benötigte, wurde ein swing out Rotor (Typ SW 40) eingesetzt, der Röhren bis zu einer Kapazität von 20 ml aufnahm. Bei kleineren Proben oder Einzelbestimmungen wurde ein Festwinkel-Rotor benutzt (Typ Lp 42Ti).

2.5.3 Analyse der Lipoproteinfraktionen

Jede Lipoproteinfraktion konnte nun auf ihren Gehalt an TG und CHOL hin untersucht werden. Diese Werte waren für die weitere Verwendung der Lipoproteine als Substrat essentiell, aber auch ein Indiz für die gelungene Verarbeitung des Mäuseblutes.

Beide Bestimmungen beruhen auf kommerziell erhältlichen, enzymatischen Farbttests, die in Mikrotiterplatten durchgeführt und dann computergestützt ausgelesen wurden. Die Extinktion des Markers ist hierbei proportional zu der Konzentration der Testsubstanz. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde die Standardlösung Precipath L in verschiedenen Verdünnungen verwendet.

2.5.4 Bestimmung der Triglyzerid-Konzentration

Als Leerwert wurde Wasser verwendet, die Standardreihe wurde durch die Verdünnung der Precipath L-Lösung auf TG-Werte von 50, 100 und 250 mg/ml erstellt. Alle Proben wurden mit 5 µl im Dreifachansatz auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Jedes Well wurde dann mit 200 µl der TG-Testlösung befüllt und die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionen wurden anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 505 nm ausgelesen. Aus den Standard-Werten berechnete die Software des Plattenlesegeräts die lineare Proportionalitätskonstante und mit dem Leerwert zusammen letztendlich die Eichfunktion. Alternativ erfolgte eine per Tabellenkalkulation durchgeführte lineare Regressionsanalyse nach manueller Datenübertragung, die eine identische Funktion ergab. Auf Basis dieser linearen Funktion berechneten beide Softwares die Konzentrationen der Testplasmen aus deren Extinktionen.

2.5.5 Bestimmung der Cholesterin-Konzentration

Analog zu der TG-Bestimmung wurde zunächst die Precipath L-Standardlösung auf drei Stufen verdünnt (55,07 mg/ml und 110,14 mg/ml und 275,35 mg/ml) und ebenfalls mit Wasser als Leerwert und den Proben im Dreifachansatz zu je 5 µl auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden je Well 200 µl der CHOL-Testlösung gegeben und die Platte für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Auch hier erfolgte im Anschluss die photometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 505 nm. Nach der Berechnung der linearen Proportionalitätskonstante und der Standardgleichung gab die Software die zurückgerechneten CHOL-Konzentrationen direkt aus. Alternativ erfolgte auch hier die Berechnung manuell per Tabellenkalkulation.

2.6 Micellenherstellung

Für die Micellenherstellung wurde sich zunächst an einer Publikation von Rensen et al. (1997a) orientiert, die wiederum auf Redgrave and Maranhao (1985) aufbaut. Zunächst wurde ein Grundgemisch aus definierten Anteilen verschiedener Fette in einer Ethanol-lösung angefertigt. Die teils öligen, teils fettigen Bestandteile wurden durch den Alkohol in gemeinsame Lösung gebracht und vermischt. Ethanol wurde durch Verdampfen eliminiert und das zurückbleibende homogene Lipid-Gemisch mit Wasser vermengt. Hierbei setzte sich sofort eine ölige Phase ab. Durch Applikation von Energie in Form von Ultraschallwellen bildete sich eine homogene Emulsion mit Liposomen und Micellen.

Diese Lösung wurde fortan wie Blutplasma behandelt, also per angepasster Ultrazentrifugation die VLDL-isodense Fraktion der Lipidaggregate abgetrennt, und der TG-Anteil bestimmt. Zurück blieben bei diesem Vorgehen Micellen mit einer bestimmten Minimalgröße. Die übrigen Bestandteile sedimentierten durch die Ultrazentrifugation in eine Ölphase zurück.

2.6.1 Vorbereitung des Fettgemisches

Für die Herstellung von 250 mg Lipidfraktion wurden zunächst 175 mg Triolein vorgelegt. Zugegeben wurden dann folgende Bestandteile:

- 567,5 µl Egg Yolk Lysophosphatidylcholine (100 mg/ml)
- 575 µl Lysophosphatidylcholine (10 mg pro 1 ml Ethanol)
- 500 µl Cholesterin Oleat (15 mg pro 1 ml Chloroform)
- 500 µl Cholesterin

Die Substanzen wurden gründlich durchmischt. Im Wasserbad erhitze man das Gemisch auf eine Zieltemperatur von 60°C und ließ die flüchtigen Bestandteile (Ethanol und Chloroform) bei langsamer Rotationsbewegung des Gefäßes verdampfen.

2.6.2 Ultraschallaufbereitung und Ultrazentrifugation

Dem fertigen Lipidgemisch wurden 4 µl Micellen-Puffer, vorgewärmt auf 60°C, zugegeben. Mittels Ultraschall (Einstellung: 20% Amplitude für 30 Sekunden, 4 Durchläufe) brachte man die beiden Phasen in Emulsion. Die Aufteilung in kurze Durchläufe je 30 Sekunden diente der intermittierenden Kühlung. Anschließend wurde 1 ml Sucrose als Stabilisator zugegeben.

Wie schon im Falle echten Blutplasmas mußte die Micellen-Liposomen-Lösung zunächst ultrazentrifugiert werden, um den instabilen Anteil der Lipid-Aggregate aus der Emulsion zu eliminieren. Dabei wurde analog zu Abschnitt 2.5.2 mit 1xPBS überschichtet und bei 20.000 RPM für 22 Minuten zentrifugiert (Umgebungstemperatur 20°C). Im Gegensatz zu VLDL setzt sich zunächst eine rahmige obere Phase ab, die entfernt werden muß. Danach wurde die obere Hälfte des Zentrifugats als fertige Micellenlösung aliquotiert und bei 4°C gelagert. Desweiteren wurde die CHOL- und TG-Konzentration entsprechend Abschnitt 2.5.3 bestimmt. Die weitere Verwendung des fertigen Micellensubstrats erfolgte innerhalb von maximal 5 Tagen.

2.7 LPL-Extraktion

Für die Realisierung von aussagekräftigen Hydrolyse-Experimenten mußte zunächst ein Weg zur effizienteren Extraktion von LPL geschaffen werden, um die nötigen Mengen zur Verfügung zu stellen.

2.7.1 LPL-Aufbereitung aus Kuhmilch

Als LPL-Quelle wurde frische Kuhmilch, vor allem aufgrund der niedrigen Anschaffungskosten als auch der ubiquitären Verfügbarkeit, ausgewählt. Diese wurde direkt von frisch gemolkenen Milch-Kühen vom Bauernhof bezogen und ohne Verzögerung zur Weiterverarbeitung ins Labor verbracht.

2 Gramm Heparin-Sepharose wurden zunächst in Wasser eingeweicht. Die so eingeweichte Sepharose ergab etwa 8 ml Sepharosegel, welches bei 800g für 5 Minuten abzentrifugiert und danach 3 mal mit 20 ml Puffer 1 gewaschen wurde.

Die frische Kuhmilch wurde zunächst per Titration auf einen NaCl-Salzgehalt von 0,4M gebracht. Dann erfolgte die Herunterkühlung auf 4°C und die Zentrifugation bei 2500g für 30 Minuten. Die überstehende Rahm-Phase wurde abgenommen und die im oberen Abschnitt vorbereitete Sepharose in die restliche, rahmfreie Milch überführt und 6 Stunden bei unveränderten 4°C durch Rollen in Bewegung gehalten.

Hiernach erfolgte die Trennung von Milch und Sepharose durch erneutes Zentrifugieren bei 800g für 5 Minuten, gefolgt von 3 Waschschritten zunächst mit 25 ml Puffer 1 und dann 3 Waschschritten mit 25 ml Puffer 2. Mit 20 ml des Puffers 3 wurde die LPL letztendlich aus der Sepharose in 1 ml -Fraktionen eluiert.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung des Proteinanteils im Lösungsmittel durch das vorgefertigte Kit „Micro BCA Protein“. Der Proteinanteil stellt sich in diesem

proportional zum Anstieg der Extinktion dar und wird photometrisch ausgelesen. Zur Vorbereitung mußte unmittelbar vor dem Einsatz ein frisches Protein-Reagenz aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und einem Teil BCA-Reagenz B des o.g. Kits angesetzt werden.

Auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden im Dreifachansatz zunächst 10 µl des Leerwertes (Puffer 3) sowie je 10 µl aus mit Albumin-Protein-Standardlösung und Protein 3 hergestellten Eichlösungen in 5 Konzentrationen zwischen 0,05 und 2 g/ml aufpipettiert. Ebenso wurden je 10 µl der Proben im Dreifachansatz aufgebracht. Die Wells wurden alle mit je 200 µl Protein-Reagenz bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend auf dem Plattenlesegerät die Extinktion bei 540 nm gemessen.

Aus dem Leerwert und den 5 Eichlösungen errechnete die Software automatisch die Funktion der Eichgeraden und gab die rückgerechneten Werte der angesetzten Proben als absolute Konzentrationen zurück.

2.8 Hydrolyse von Triglyceriden durch an Heparansulfat-Proteoglykane gebundene Lipoproteinlipase

In vitro werden Hydrolyseversuche gewöhnlich mit gelöster Lipoproteinlipase (LPL) durchgeführt. Dies entspricht jedoch nicht dem physiologischen Vorgang, bei dem LPL durch Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) an das Endothel gebunden ist. Um im Versuch die *in vivo*-Bedingungen so gut wie möglich nachzuempfinden wurde in unserem Labor ein bereits erfolgreich adaptierter Assay (Kluger et al., 2008) einer niederländischen Arbeitsgruppe (de Man et al., 1997) reetabliert. Ziel war es, diesen Assay unter Auswahl verschiedener Substrate (VLDL oder Micellen) qualitativ zu vergleichen und gleichzeitig durch die Einbeziehung des Versuchsaufbaus mit frei gelöster und somit nicht gebundener LPL weiter zu differenzieren. Der Einfachheit halber wird der gesamte Versuchsaufbau und -ablauf nachfolgend mit „HSPG-Assay“ betitelt.

Die Erfahrungen in der Reetablierung des HSPG-Assays werden als Vorversuche nicht weiter einzeln erläutert, es wird ausschließlich das letztendliche Setting des Versuchsaufbaus beschrieben, welches für die spätere Anwendung zum Einsatz kam.

2.8.1 Prinzip

Das Grundprinzip des HSPG-Assays ist in der Grafik 2.4 schematisch dargestellt. Eine 96-Well-Spezialtiterplatte wird mit Heparansulfat-Proteoglykanen beschichtet, die restlichen freien Bindungsstellen der Platte sowie alle Bindungsstellen des HSPG werden durch Fettsäure-freies bovines Serumalbumin (FFA-free BSA) geblockt. Lipoproteinlipase wird an die künstliche Extrazellulärstruktur gebunden, indem BSA vom HSPG verdrängt wird. Durch Zugabe von Substraten wie VLDL oder Micellen wird die Hydrolysereaktion gestartet und durch die Zugabe von Triton gestoppt. Die Aktivität der Hydrolyse wird durch die Konzentrationsmessung der freien Fettsäuren im Reaktionsgemisch bestimmt.

Verglichen wurde die Aktivität von HSPG-gebundener LPL mit frei gelöster LPL, und zwar im Einsatz von VLDL oder Micellen als Substrat der Reaktion. Ggf. wurden die Substrate mit Apolipoproteinen vorinkubiert, um einen Modulationseffekt in der LPL-Aktivität nachzuweisen.

2.8.2 Präparation von muriner VLDL

Analog zum Kapitel 2.5.1 wurde mehreren Mäusen gleichem Genotypus Blutplasma entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Tiere in etwa derselben Altersklasse entstammen und männlich waren. Letzteres diente dem Ausschluß von hormonbedingter Beeinflussung des Assay-Ablaufs und -Ergebnisses. Die Anzahl der Blutentnahmen richtete sich vor allem nach dem Phänotypus: das Blutplasma ApoA5-defizienter Mäuse weist beispielsweise eine stark erhöhte TG-Konzentration auf, weshalb eine vergleichsweise niedrige Probenanzahl erforderlich war, um VLDL mit genügend hoher TG-Konzentration zu extrahieren. Hier musste auf Erfahrungswerte zurückgegriffen werden, um eine adäquate sowie ausreichende Anzahl von Blutproben zu planen. Die Einzelproben wurden nach Plasmaextraktion gepoolt. Entsprechend dem in 2.5.2 beschriebenen Vorgehen wurde das gesammelte Plasma in seine Lipoproteinfraktionen aufgetrennt. Als Substrat kam die VLDL-Fraktion im HSPG-Assay zum Einsatz. Deren Cholesterin- und TG-Konzentrationen wurden wie beschrieben (Abschnitt 2.5.3) bestimmt.

2.8.3 Vorbereitung des Assays

Eine sterile 96-well-Mikrotiterplatte des Typs „Maxi-Sorp“ wurde entsprechend des geplanten Assay-Settings markiert und beschriftet. Die Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, im Dreifachansatz geplant, ebenso die späteren Leerwerte. Soweit nicht anders beschrieben wurde bei 4°C gearbeitet.

Zunächst inkubierte man die entsprechenden Wells der Platte mit jeweils 100 µl einer Lösung von 0,005 µg/µl HSPG in 1x-PBS-Puffer. Dies entspricht einer absoluten Menge von 0,5 µg HSPG pro Well. Die Inkubation wurde für 18 Stunden bei leichter Schüttelbewegung (60 RPM) vorgenommen.

Es folgten 3 Waschschrte mit 1x-PBS-Puffer, um nicht-gebundene HSPG-Reste zu entfernen. Danach wurden alle Wells mit je 100 µl 1x-PBS-1%BSA (Fettsäurefrei, „FFA-free“) für eine Stunde bei 37°C blockiert. Nach dem vollständigen Auswaschen der Blocklösung erfolgte im letzten Vorbereitungsschritt die Inkubation mit LPL, gelöst in Tris-Glycerol, diesmal für eine Stunde unbewegt und erneut bei 4°C. Bei der Planung der LPL-Konzentrationen erwiesen sich in Vorversuchen Werte zwischen 0,01 µg/µl und 10 µg/µl als ein sinnvoller Bereich. In dieser Arbeit wurden Konzentrationen in Stufen von 0, 1 und 4 – 6 µg/ml verwendet.

2.8.4 Vorbereitung des Kontrollexperiments mit gelöster LPL

Parallel zum Experiment mit HSPG-gebundener LPL erfolgte stets die Kontrolle mit frei gelöster LPL. Diese wurde erst unmittelbar vor Beginn der Hydrolyse, also der Einbringung des Substrats, zugegeben.

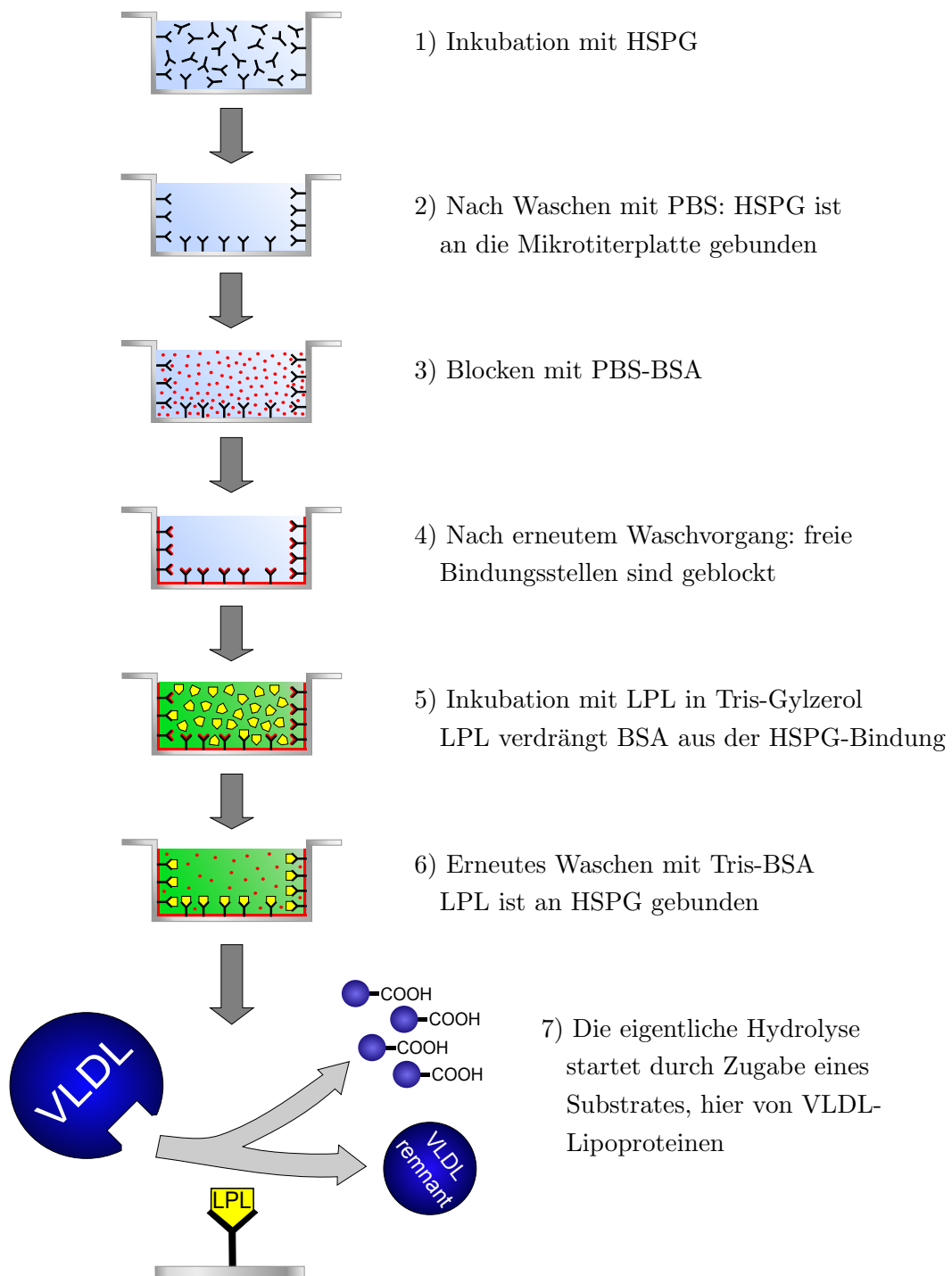


Abbildung 2.4: Schema des HSPG-Assays: die LPL ist an HSPG gebunden und VLDL wird als Substrat eingesetzt

Die Präparation einer 96-Loch-Mikrotiterplatte erfolgte analog zu Kapitel 2.8.3 mit folgenden Ausnahmen: im ersten Inkubationsschritt wurde mit purem 1xPBS, ohne darin gelöste HSPG, gearbeitet. Die Blockung erfolgte identisch, der nachfolgende Inkubationsschritt jedoch ohne die darin gelöste LPL, also mit 100 µl Tris-Glycerol. Die LPL wurde statt der Bindung durch Vorinkubation unmittelbar zu Beginn der geplanten Hydrolyse direkt in das Reaktionsgefäß pipettiert, die Mikrotiter-Platte solange auf Eis gelagert. Dabei mußte zügig gearbeitet werden, um eine möglichst identische Verweilzeit der bereits aktiven LPL in allen Wells zu erreichen, auch wenn deren enzymatische Aktivität bei nahezu 0°C als sehr gering veranschlagt wurde.

2.8.5 Vorplanung des Hydrolyseversuchs

Die Hydrolyse von Triglyceriden startet durch Zugabe von TG-haltigen Substraten in die vorbereiteten Wells. Entsprechend der Assay-Planung wurden außerdem Zusätze wie rekombinante Apolipoproteine berücksichtigt. In Wells, in denen die LPL gelöst aktiv werden sollte, wurde diese Mengendifferenz ebenfalls ausgeglichen.

Um die zugegebene Menge an TG gleich zu halten wurde die in Kapitel 2.5.4 festgestellte TG-Konzentration des Substrates als Ausgangswert genommen. Die Zielkonzentration im Well sollte idealerweise 1 mM betragen, pro Well wurden 100 µl Reaktionsgemisch veranschlagt. Erreicht wurde die Einhaltung dieser Vorgabe durch Zugabe von 1x-PBS-Puffer. Im Fall von gelöster LPL war außerdem zu berücksichtigen, dass diese in 5 µl 1x-PBS-Puffer separat zugegeben wurde und die TG-Konzentration im Substrat entsprechend höher zu kalkulieren war, um den Verdünnungseffekt auszugleichen. Die rekombinanten Apolipoproteine - zum Einsatz kamen Apo C3 (rApoC3) und Apo A5 (rApoA5) - waren in 0,1M-Tris-BSA-Puffer gelöst. Hier wurden bei verschiedenen Konzentrationsstufen die Mengendifferenzen daher mit 0,1M-Tris-BSA-Puffer ausgeglichen, um den Anteil dieses Puffers in allen Wells gleich zu halten.

Folgende Konzentrationsbereiche der variablen Assay-Zusätze hatten sich in Vorversuchen als sinnvoll erwiesen:

- LPL: 0 bis 6 µg/ml
- rApoC3: 0 bis 400 µg/ml
- rApoA5: 0 bis 4 µg/ml

2.8.6 Durchführung der Hydrolyse

Durch die Zugabe der ggf. vorinkubierten VLDL oder Micellen startete die eigentliche Hydrolyse (siehe letzter Schritt in Übersicht 2.4), die LPL setzte fortan Triglyzeride

in freie Fettsäuren um. Die Mikrotiterplatten wurden hierzu für 10 Minuten in den Schüttelinkubator bei leichter Bewegung mit 100 RPM bei 37°C überführt.

Nach Ablauf der 10 Minuten erfolgte die Umlagerung der Mikrotiterplatten auf Eis und das Stoppen der Hydrolyse-Reaktion durch die Zugabe von 10 µl einer 10%-igen Triton X-100-Lösung je Well. Die Verteilung des Tritons wurde durch ein 1-minütiges Rüttelprogramm im verwendeten Lesegerät für Mikrotiterplatten (Dynex MRX-2) sichergestellt. Durch die kontrollierte Rüttelbewegung sollte ein versehentliches Durchmischen der Proben durch Spritzer verhindert werden.

2.8.7 Messung der Konzentration freier Fettsäuren

Sowohl die gestoppten Reaktionsgemische als auch die vorinkubierten Substrate wurden jeweils im Dreifachansatz auf deren Konzentration freier Fettsäuren hin gemessen. Als Basis diente das Nefa-C Kit (Waco Chemicals). Der Test basiert auf einem enzymatischen Farbstest, dessen Extinktionsmaximum bei 550nm liegt. Als Bezugswerte diente neben einem Leerwert ein beiliegender Standard, der auf FFA-Konzentrationen von 1,0 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 und 0,0625 mmol/l verdünnt wurde. Proben, Standards und Leerwerte wurden im Dreifachansatz gemessen, ebenso die eingesetzten Substratgemische vor Hydrolyse. Je Ansatz wurden 10 µl der Standards bzw. Proben pipettiert, dazu 100 µl der im Kit enthaltenen Lösung A mit anschließender Inkubation für 10 Minuten bei 37°C. Dann wurden 200 µl der Lösung B addiert und erneut für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Gemessen wurde aus technischen Gründen bei 540 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät. Allen Extinktionswerten wurde der Leerwert subtrahiert. Aus den Standards wurde mittels linearer Regressionsanalyse eine Eichfunktion erstellt, aus der schließlich die Probenwerte in mmol/l berechnet wurden. Dies erfolgte entweder automatisch durch die Software des Lesegerätes oder manuell per Tabellenkalkulation.

2.8.8 Kontrollexperiment mit Heparinase-Inkubation

Durch Waschschritte ist ein Verbleib relevanter Mengen gelöster LPL nach der Inkubation mit HSPG ausgeschlossen. Voraussetzung für die LPL-Aktivität ist also, daß das Enzym an Proteoglykane gebunden ist, damit es so den Waschschritten widerstehen und das schließlich angebotene Substrat spalten kann. Um sicherzustellen, daß die gemessene Freisetzung von Fettsäuren tatsächlich durch HSPG-gebundene LPL verursacht wird, wurde ein Kontrollexperiment mittels Heparin-Lyase und Heparin-Eliminase durchgeführt (Heparinase I und III). Diese zersetzen die Heparansulfatproteoglykane und bringen so die daran gebundene LPL erneut in Lösung, woraus sie durch Waschschritte entfernt wird. Wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben wurden Mikrotiterplatten mit HSPG und nachfolgend mit LPL inkubiert. Anschließend wurden je Well 100 µl eines

Gemisches aus 2,4 U/ml Heparinase I und Heparinase III in 1xPBS-Puffer pipettiert und bei 37°C für 20 Minuten gelagert. Danach wurde der Hydrolyseversuch wie in Kapitel 2.8.6 beschrieben durchgeführt. Zu erwarten wäre eine vollständige Aufhebung der LPL-Aktivität ohne Nachweis von freien Fettsäuren. Sofern dies nicht explizit erwähnt wird ist immer von einem positivem Ergebnis beim Kontrollexperiment auszugehen, womit die ausschließliche Bindung der LPL an HSPG belegt wurde.

2.8.9 Statistische Auswertung der Messergebnisse

Die gewonnenen Messwerte wurden mittels der Software „SPSS Statistics“ ausgewertet. Als Analysefunktion wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse unter Berücksichtigung der Wechselwirkungen und mit schrittweiser Elimination der nicht-signifikanten Werte herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde allgemein bei 0,05 festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuch zur Reetablierung: Hydrolyse von muriner VLDL des Genotyps ApoA5-knockout (ApoA5 -/-) durch HSPG-gebundene oder frei gelöste LPL in vitro

3.1.1 Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung

Zur erneuten Etablierung des Assays und des Nachweises reproduzierbarer und konsistenter Ergebnisse wurde oben genannte Konfiguration, welche sich eng an Kluger et al. (2008) orientierte, angewandt. Dabei erwarteten wir aufgrund der vorhandenen Erfahrungswerte eine signifikante Zunahme der Hydrolyse-Aktivität sowohl unter steigender LPL-Konzentration als auch unter steigender Mengenzugabe von Apolipoprotein A5.

Untersucht wurde das Serum von Mäusen des Genotyps ApoA5-knockout homozygot (ApoA5 -/-). Nach Entnahme und Zentrifugation wurden die Seren gepoolt und nachfolgend die VLDL-Fraktion durch sequentielle Ultrazentrifugation extrahiert. Aus dieser VLDL-Fraktion wurde der TG-Gehalt bestimmt und auf eine Konzentration von 1mM gebracht. Der eigentliche HSPG-Assay erfolgte unter Zugabe von LPL in 2 Konzentrationsstufen (3 µg/µl und 6 µg/µl) sowie jeweils Zugabe von rekombinantem Apolipoprotein A5 in zwei Mischverhältnissen (Verhältnis mit VLDL 1:50 und 1:10). Dabei war die LPL entweder an HSPG durch Vorinkubation gebunden oder wurde frei gelöst zugegeben.

3.1.2 Erste Ergebnisse nach Hydrolyse von VLDL unter ApoA5-Einfluss

Die Ergebnisse, grafisch dargestellt in Abbildung 3.1 auf Seite 34, zeigten mehrere Probleme: zum einen eine hohe Grundkonzentration an freien Fettsäuren im Probenansatz (zu sehen in allen drei Werten, die ohne LPL-Zugabe zustande kamen). Nach Testung der eingesetzten Komponenten des Assays stellte sich das Albumin als Quelle für freie Fettsäuren heraus. Desweiteren war im Vergleich zu den erwarteten Werten bei HSPG-gebundener LPL nur ein schwacher Anstieg der Konzentration freier Fettsäuren unter Steigerung der LPL-Konzentration zu sehen (zwischen +2,68% und +12,8%). Der Einfluß auf die Hydrolyserate nach Zugabe von ApoA5 war garnicht zu beobachten (der

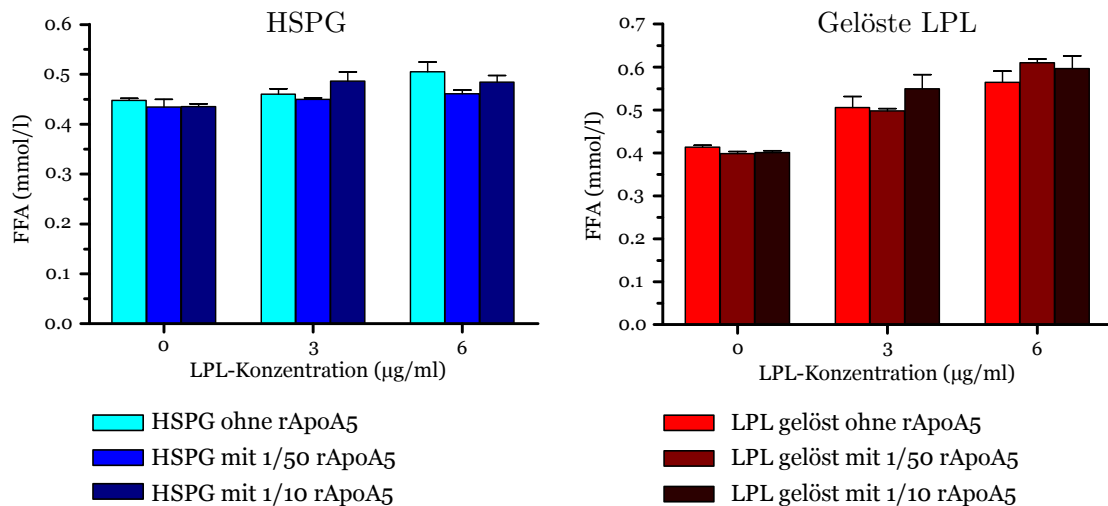


Abbildung 3.1: Hydrolyse von ApoA5-knockout-VLDL unter Zugabe von rekombinantem ApoA5 in unbekannter Lösungskonzentration, *links* HSPG-gebundene LPL, *rechts* frei gelöste LPL; Mittelwerte \pm Standardabweichung

Effekt variierte zwischen -8,77% und +5,72%). Im Falle frei gelöster LPL war der Anstieg der Hydrolyserate deutlicher (durchschnittlich 28,1% bei Anstieg der Konzentration von 0 auf 3 µg/ml und 46,1% bei Anstieg von 0 auf 6 µg/ml), jedoch blieb auch hier ein eindeutiger Effekt durch die Zugabe von rekombinantem ApoA5 aus (die Modulation der Freisetzung von freien Fettsäuren schwankte inkonsistent zwischen -3,6% und +8,77%). Statistisch konnte in keinem Fall eine signifikante Modulation nachgewiesen werden. Die in Vorpublikationen nachgewiesenen ApoA5- und LPL-Effekte waren nicht nachweisbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse mußten zunächst die möglichen Fehlerquellen in weiteren Vorversuchen eliminiert werden, bevor mit der Anwendung des Assays begonnen werden konnte.

3.2 Zwischenversuch zur Reetablierung des HSPG-Assays mit verschiedenen Albuminen - Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL durch HSPG-gebundene LPL in vitro

3.2.1 Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung

Da zwei in der Originalpublikation verwendete essentielle Bestandteile des Assays (Zellkultur-Mikrotiterplatten unbekannten Typus und Sigma FFA-free BSA) nicht mehr verfügbar waren, erfolgte eine Testung auf Nunc Maxisorp Mikrotiterplatten zum Ver-

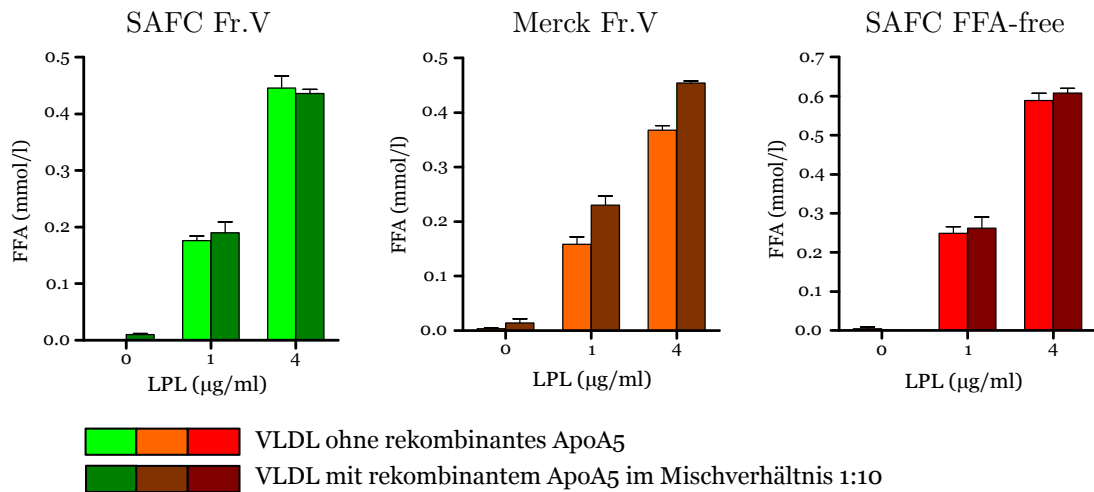


Abbildung 3.2: Hydrolyse von VLDL mit und ohne Zugabe von rekombinantem ApoA5, Bindung der LPL durch Heparansulfat-Proteoglykan; *grün*: SAFC Fraction V BSA; *orange*: Merck Fraction V BSA; *rot*: SAFC FFA-free BSA; Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung

gleich dreier Fettsäure-freier boviner Serumalbumine. Die Versuchskonfiguration bestand aus HSPG-gebundener LPL, welche ApoA5-knockout-VLDL (ApoA5 $-/-$) unter Zugabe von rekombinantem ApoA5 in einem Mischverhältnis zur VLDL von 1 zu 10 hydrolysierte. Die vorgeschalteten Einzelversuche, die diesem Assay als Grundlage dienten, werden hier nicht einzeln erläutert.

3.2.2 Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL durch LPL unter Verwendung verschiedener Albumine

Die im ersten Versuch nachgewiesene hohe Grundkonzentration von freien Fettsäuren war in keiner der analysierten Proben mehr nachweisbar (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 35). Desweiteren war nun in allen drei BSA-Konfigurationen ein steilerer Anstieg der FFA-Konzentration bei zunehmenden LPL-Konzentrationen nach der Lipolyse zu beobachten (Anstiege absolut nun zwischen 0,364 und 0,617 mmol/l bei insgesamt niedrigerer Maximal-LPL-Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ im Vergleich zu den Konzentrationen in Abschnitt 3.1.2). Die Quantität der LPL-Aktivität ähnelte zudem den Erfahrungswerten bisheriger HSPG-Assays (zwischen 0,368 und 0,608 mmol/l freigesetzter FFA bei 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ LPL) und den in Publikationen berichteten Werten. Der Effekt von LPL auf die Hydrolyse war in allen drei BSA-Fällen hochsignifikant ($p < 0,001$). Eine signifikante Änderung der Hydrolyserate nach Zugabe von rekombinantem ApoA5 war allerdings nur bei der Benutzung von Merck Fraction V – BSA zu beobachten (+39,4% beim Schritt von 0 auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und +7,18% beim Schritt zu einer LPL-Konzentration von 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $p < 0,001$). Bei der Anwendung von SAFC FFA-free BSA und SAFC

Fraction V – BSA dagegen konnte kein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden, bei der Steigerung der LPL-Konzentration von 1 auf 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fiel die Menge freigesetzter Fettsäuren im Falle des Fraction V-BSA sogar um 8,7%. Dieser Abfall ist zwar statistisch signifikant, jedoch inhaltlich zu verwerfen. Zusammenfassend zeigt sich nur unter der Verwendung von Merck Fraction V - BSA der erwartete ApoA5-Exzitationseffekt, weshalb diese BSA-Sorte fortan Verwendung fand.

3.3 Hydrolyse muriner VLDL des Genotyps ApoA5ko (A5 -/-) unter Zugabe von rekombinantem Apolipoprotein C3 durch HSPG-gebundene und gelöste LPL

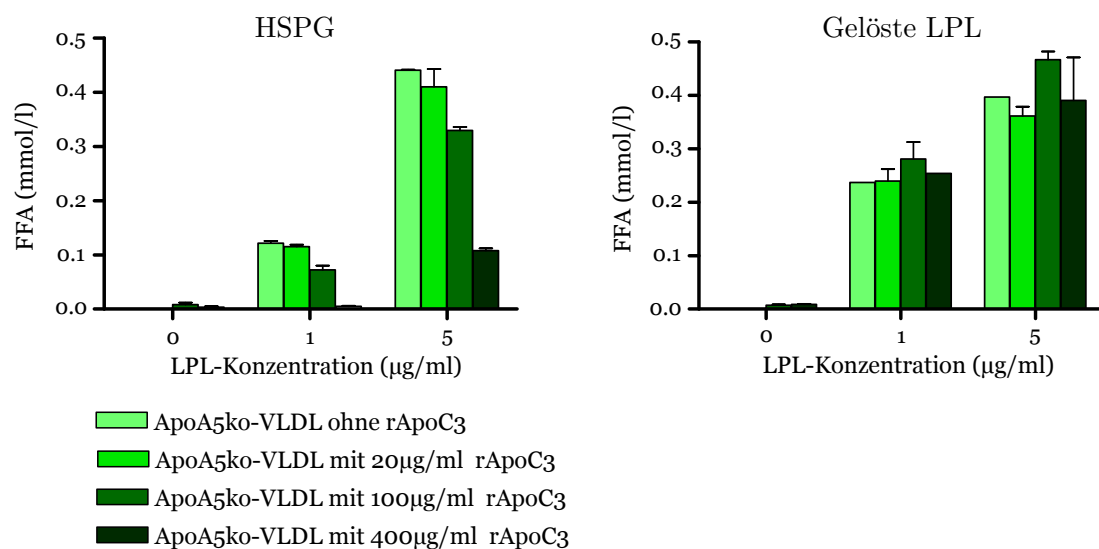


Abbildung 3.3: Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL mit und ohne Zugabe von rekombinantem ApoC3, *links* HSPG-gebundene LPL, *rechts* frei gelöste LPL; Mittelwerte \pm Standardabweichung

3.3.1 Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung

Die in den Kapiteln 3.1.2 und 3.2.2 und den entsprechenden Vorversuchen gewonnenen Erfahrungen führten schließlich zur Erstellung des in Kapitel 2 geschilderten Versuchsaufbaus. Die gewählten LPL-Konzentrationen bewegten sich in den Bereichen, in denen maximale Steigungen beobachtet wurden, in LPL-Sättigungsbereichen (oberhalb 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden keine Daten erhoben.

Blutproben wurden gewonnen, die Seren abzentrifugiert, gepoolt und anschließend per sequentieller Ultrazentrifugation deren VLDL-Fraktion isoliert. Von dieser bestimmte

man die TG-Konzentration – die Zielkonzentration im Reaktionsgemisch wurde auf 1 mM normiert. Unter Zugabe von rekombinantem ApoC3 zwischen 20 und 400 $\mu\text{g/ml}$ (Zielkonzentration im jeweiligen Well der Mikrotiterplatte) wurde der oben geschilderte HSPG-Assay schließlich durchgeführt.

3.3.2 Einfluss von ApoC3 auf die Hydrolyse von ApoA5-depletierter VLDL

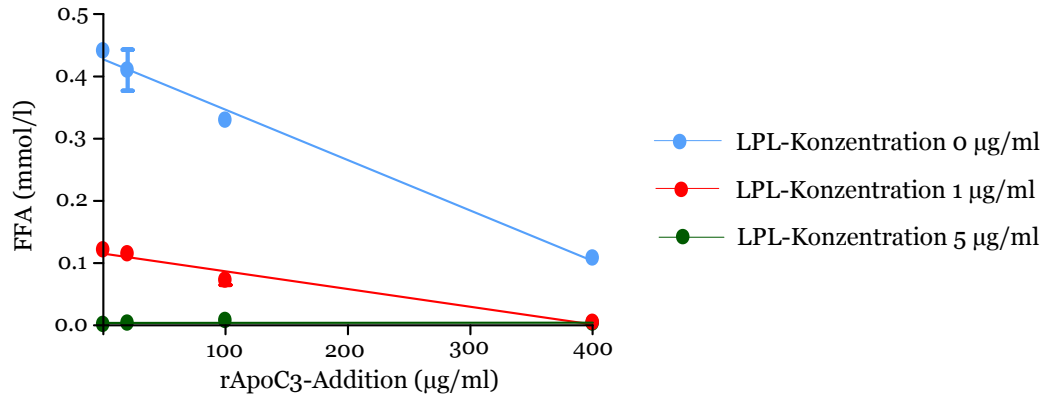


Abbildung 3.4: Inhibition der Hydrolyse von HSPG-gebundenen ApoA5ko-VLDL-Partikeln durch rApoC3, dargestellt in Abhängigkeit von der Menge zugegebenen rApoC3's. Zusätzlich überlagerte Darstellung jeweils einer linearen Regressionsanalyse der Aktivitätsabnahme für jede LPL-Konzentration; Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung

Sowohl im Fall gelöster als auch bei proteoglykan-gebundener LPL zeigten sich hochsignifikante Reaktionen auf die Zugabe von LPL in beiden Konzentrationen (jeweils $p < 0,001$). Statistisch signifikante Reaktion auf die Zugabe von rApoC3 zeigten sich jedoch ausschließlich im Fall der HSPG-gebundenen LPL und auch hier nur bei hoher LPL-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$. Im Fall der niedrigeren LPL-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ ist die Inhibition durch rApoC3 nur in hohen Konzentrationsbereichen (Schritte auf 100 $\mu\text{g/ml}$ und 400 $\mu\text{g/ml}$) als signifikant zu bewerten ($p < 0,01$), darunter lässt sich zwar ein Trend interpretieren, der jedoch statistisch nicht belegbar ist (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 36). Absolut stiegen die Werte jedoch auch hier. Betrachtet man erneut die höhere LPL-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ so zeigt sich bei Zugabe von rApoC3 ein leicht asymptotischer bis nahezu linearer Aktivitätsverlauf (24,5% Restaktivität der LPL bei 400 $\mu\text{g/ml}$ rApoC3-Konzentration). In jedem Fall beobachtete man ein Streben der Aktivität gegen 0, je mehr rApoC3 zugesetzt wurde, was in einer linearen Regressionsanalyse (Abbildung 3.4 auf Seite 37) deutlich wird. Wahrscheinlich ist hier kein linearer Kurvenverlauf anzunehmen sondern eine typische Regressionskurve im Sinne des Modells der Enzyminhibition. Der Trend des Strebens gegen Null wird allerdings

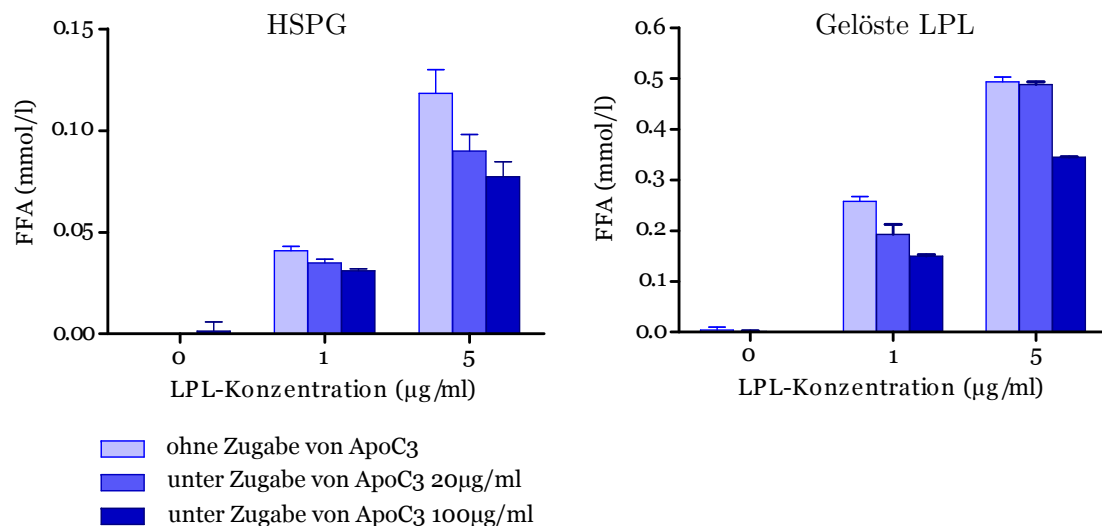


Abbildung 3.5: Effekt von rApoC3 auf die Hydrolyse von ApoA5- und ApoC3-depletierter VLDL, *links* HSPG-gebundene LPL, *rechts* frei gelöste LPL; Mittelwerte \pm Standardabweichung

aus der Grafik deutlich.

Dagegen schwankten die Werte der freigesetzten FFA durch gelöste LPL ohne eindeutige Tendenz und in keiner der getesteten LPL-Konzentrationen. Somit ließ sich keine signifikante Aktivitätsmodulation der gelösten LPL unter Einfluss von rApoC3 nachweisen.

3.4 Hydrolyse muriner VLDL des Genotyps ApoA5ko/ApoC3ko (A5 -/-, C3 -/-) sowie von Micellen durch HSPG-gebundene und gelöste LPL unter Zugabe von rekombinantem Apolipoprotein C3

3.4.1 Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung

Substrat: ApoA5ko-ApoC3ko-VLDL

Die Gewinnung von VLDL erfolgte auf demselben Weg wie bislang beschrieben, ebenso die Assay-Durchführung. LPL-Konzentrationen wurden bei 0, 1 und 5 µg/ml gewählt, die Addition von rApoC3 in den Konzentrationsstufen 0, 20 und 100 µg/ml, welches eine ausreichende Beurteilung eines ApoC3-Effektes gewährleisten sollte. Im Unterschied zum vorherigen Versuch wurde nunmehr auch ApoC3-depletierte ApoA5-ko-VLDL verwendet in der Absicht, den Inhibitionseffekt durch rApoC3 deutlicher darstellen zu können.

3.4.2 Effekt von ApoC3 auf die Hydrolyse von ApoA5- und ApoC3-depletierter VLDL

Betrachtet man zunächst die Reaktion bei HSPG-gebundener LPL in Abhängigkeit von der LPL-Konzentration und von rekombinantem ApoC3 sowie beiden Faktoren kombiniert, so zeigen sich nur teilweise signifikante Unterschiede. Allerdings inhibierte jede ApoC3-Erhöhung den absoluten Reaktions-Output, die LPL-Zugabe erhöhte ihn. Der ApoC3-Inhibitionseffekt bei niedriger LPL-Konzentration (1 µg/ml) war hierbei statistisch nicht signifikant, der FFA-Output lag durchschnittlich bei $0,035 \pm 0,005$ mmol/l. Auch bei hoher LPL-Konzentration von 5 µg/ml wurden die beobachteten Inhibitionseffekte nur teilweise signifikant (Schritte zwischen 0 und 20 µg/ml sowie zwischen 0 und 100 µg/ml, ($p < 0,01$); absolut freigesetzte FFA: $0,095 \pm 0,023$ mmol/l). Kummulativ analysiert war die gegenseitige Abhängigkeit von LPL- und ApoC3-Addition signifikant ($p < 0,05$).

Frei zugesetzte LPL zeigte bei gegenseitiger Abhängigkeit der variablen Zusätze durchweg hochsignifikante Effekte bei LPL-Konzentrationserhöhung (von 0 auf 1 µg/ml LPL: freigesetzte FFA $0,200 \pm 0,051$ mmol/l, $p < 0,001$; von 1 auf 5 µg/ml LPL: freigesetzte FFA $0,442 \pm 0,737$ mmol/l, $p < 0,001$). Unter denselben Voraussetzungen war auch die rApoC3-Addition weitestgehend hochsignifikant ($p < 0,01$), hiervon ausgenommen ist der Schritt von 0 auf 20 µg/ml bei einer niedrigen LPL-Konzentration von 1 µg/ml, der die Signifikanzgrenze knapp verfehlt. Die kummulative Signifikanz bei gegenseitiger Abhängigkeit von LPL und ApoC3-Zusatz war bei frei gelöster LPL sehr hoch ($p < 0,001$).

3.4.3 Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung

Substrat: Micellen

Die eigentliche Reetablierung des HSPG-Assays diente der Testung von Micellen als LPL-Substrat, welche in nachfolgendem Versuch unter Modulation mit rekombinantem ApoC3 erfolgte. Die Ergebnisse sollten qualitative Vergleiche mit den Ergebnissen der vorherigen Versuche ermöglichen. Micellen wurden wie in 2.6 beschrieben hergestellt und ab der Ultrazentrifugation genau wie VLDL behandelt, d.h. TG-Bestimmung und Einsetzung als Substrat in den Assay bei einer TG-Ausgangskonzentration von 1 mmol/l.

3.4.4 Einfluss von ApoC3 auf die Hydrolyse von Micellen

Bei gelöster LPL sowie bei proteoglykangebundener LPL zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Das Vorhandensein von ApoC3 in geringerer Konzentration (20 µg/ml) hemmt die Freisetzung freier Fettsäuren nur gering, signifikant nur im Fall gelöster LPL bei niedriger

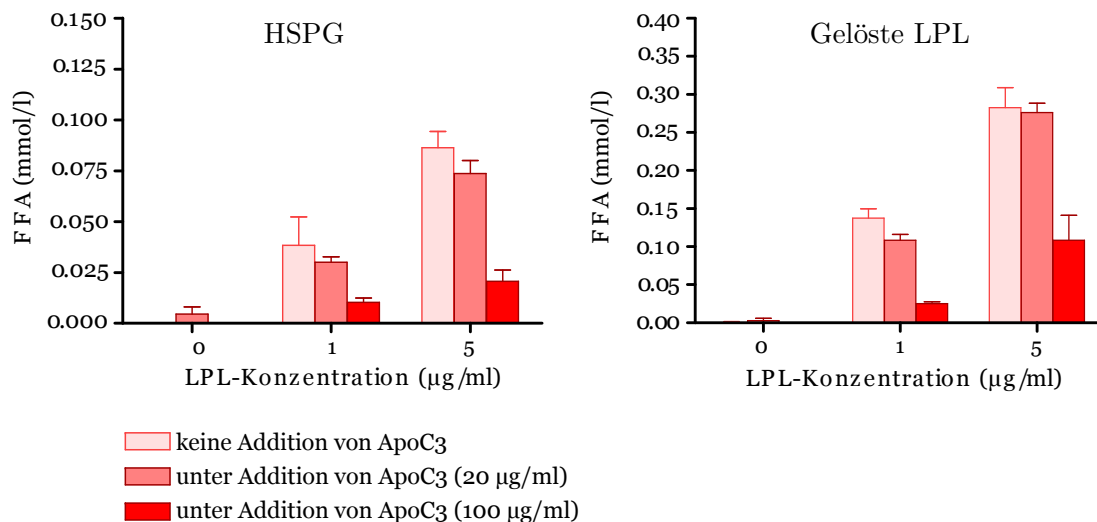


Abbildung 3.6: Effekt von rApoC3 auf die Hydrolyse von Micellen, *links* HSPG-gebundene LPL, *rechts* frei gelöste LPL; Mittelwerte \pm Standardabweichung

Konzentration von 1 µg/ml (ohne ApoC3: $0,138 \pm 0,012$ mmol/l, mit ApoC3 20 µg/ml: $0,109 \pm 0,008$ mmol/l). Werden grössere ApoC3-Mengen zugesetzt so wird die Inhibition durchgehend signifikant sowohl bei gelöster wie auch bei proteoglykangebundener LPL (Restaktivitäten 18,2 bis 38,5%, p in allen Fällen $< 0,01$). So lagen nach der Hydrolyse bei gelöster LPL durchschnittlich $0,090 \pm 0,051$ mmol/l FFA (bei 1 µg/ml LPL) bzw. $0,222 \pm 0,088$ mmol/l FFA (bei 5 µg/ml LPL) vor, bei HSPG-Bindung der LPL waren es $0,026 \pm 0,014$ mmol/l FFA (bei 1 µg/ml LPL) bzw. $0,060 \pm 0,031$ mmol/l FFA (bei 5 µg/ml LPL).

3.4.5 Vergleich der Hydrolyse von Micellen und VLDL unter Modulation von rApoC3

Im folgenden werden die Substrate VLDL und Micellen getrennt nach der benutzten LPL-Bindungsart untersucht. Es fällt auf, daß in beiden Bindungsfällen bei dreifacher multifaktorieller Analyse (LPL-Konzentration, ApoC3-Addition und Wahl des Substrates) kein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat besteht. Betrachtet man die zugehörigen Diagramme 3.5 und 3.6 so ist dies nachvollziehbar: alle vier Diagramme zeigen einen ApoC3-Inhibitionseffekt, einen dosisabhängigen LPL-Effekt sowie eine in beiden Fällen um etwa den Faktor 3 unterschiedliche FFA-Freisetzungsrate beim Vergleich HSPG-gebundener und gelöster LPL. Genauere qualitative Differenzierungen sind mit statistischen Mitteln in diesem Fall nicht möglich.

Betrachtet man die Bindungsart „HSPG-gebunden“ der LPL isoliert, so zeigt sich

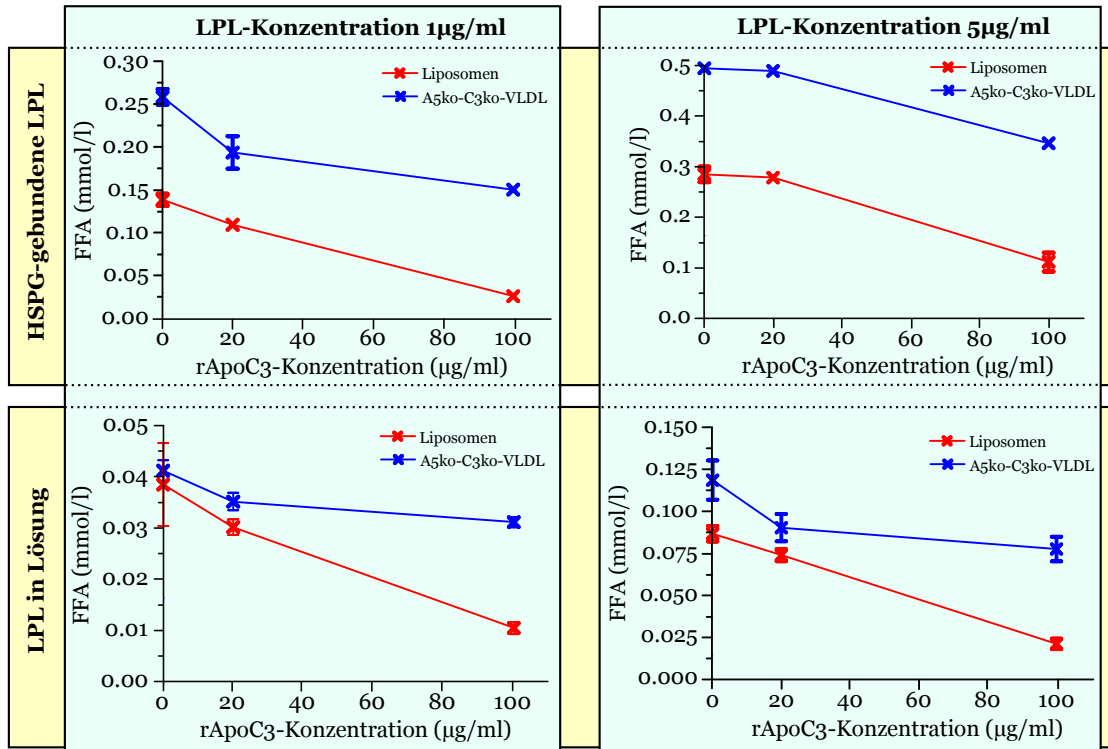


Abbildung 3.7: Effekt von rApoA5 auf die Hydrolyse von VLDL und Micellen, gruppiert nach eingesetzter LPL-Menge (1 und 5 µg/ml, linke und rechte Spalte) und LPL-Bindungsart (HSPG-Bindung oben, LPL in Lösung unten); Mittelwerte \pm Standardabweichung

zunächst ein hochsignifikanter Einfluss durch die Substratwahl ($p < 0,001$), was sich aus den in Abschnitten 3.4.2 und 3.4.4 unterschiedlichen Mittelwerten der FFA-Konzentrationen ableitet. Ebenso ist der Einfluß der gegenseitigen Abhängigkeit von Substratwahl und der LPL-Konzentration signifikant ($p < 0,01$), was sich ebenfalls aus den o.g. Daten ableiten läßt. Nur grenzwertig signifikant ist dagegen die gemeinsame Abhängigkeit von ApoC3-Addition und Substratwahl ($p < 0,05$). Geht man hier in die Tiefe und analysiert die paarweisen Interaktionen von ApoC3 und Substratwahl, so zeigen sich nur in Fällen maximaler ApoC3-Zugabe (100 µg/ml) signifikante Unterschiede (bei 1 µg/ml LPL: $p < 0,01$; bei 5 µg/ml LPL: $p < 0,001$). Gestützt wird diese Analyse, wenn man die relative Inhibition durch 100 µg/ml ApoC3 zu dem Status ohne ApoC3-Zugabe vergleicht (bei 5 µg/ml LPL): im Falle von Micellen betrug die Restaktivität 23,9%, bei VLDL betrug sie 65,3%. Lag die LPL gelöst vor so zeigte die Substratwahl bei Abhängigkeit von ApoC3 ebenfalls keine eindeutige Signifikanz ($p < 0,01$), während die kombinierte Abhängigkeit von LPL hochsignifikant ist ($p < 0,001$). In der Paaranalyse von ApoC3 und Substratwahl zeigte sich, ebenfalls vergleichbar, eine Signifikanz nur für

Wechsel zwischen hohen ApoC3-Konzentrationen (0 auf 100 µg/ml ApoC3: bei Micellen und VLDL jeweils $p < 0,001$; 20 auf 100 µg/ml ApoC3: Micellen und VLDL $p=0,000$). Die Restaktivitäten beim Sprung auf 100 µg/ml ApoC3 in hoher LPL-Konzentration (5 µg/ml) betrugen bei Micellen 38,5% und bei VLDL 69,9%.

3.5 Hydrolyse muriner VLDL des Genotyps ApoA5-knockout (ApoA5 -/-) sowie von Micellen durch HSPG-gebundene und gelöste LPL unter Modulation von rekombinantem ApoA5

3.5.1 Versuchsplanung, -konfiguration und -durchführung

Um einen akzidentiellen Modulationseffekt durch individuelle Interaktion von Apolipoprotein C3 oder einem durch Verunreinigung beigemischten Protein mit Micellen bzw. VLDL auszuschließen, wurden die Versuche in ähnlichem Setting wie im vorangegangenen Abschnitt 3.4 wiederholt. Diesmal wurde statt ApoC3 das Apolipoprotein A5 (ApoA5), ebenfalls rekombinant, der Reaktionsmischung beigefügt. Substrate wurden ApoA5-frei gehalten, hierzu wurde VLDL von Mäusen der Linie ApoA5-ko verwendet, außerdem eine Micellen-Lösung wie in 2.6 beschrieben. Zu erwarten ist in diesem Fall nicht eine Inhibition sondern die Exzitation der LPL-Aktivität durch ApoA5 und somit eine steigende Konzentration freier Fettsäuren nach Hydrolyse unter dem Einfluß steigender ApoA5-Konzentrationen. Zunächst erfolgte auch hier die Gewinnung von Mäuseblut aus retroorbitalen Venenplexus der o.g. Mauslinie samt der anschließenden Verarbeitung bis hin zur Gewinnung der VLDL-Fraktion. Parallel wurden Micellen hergestellt. Anschließend wurden die TG-Konzentrationen beider Substrate als Berechnungsgrundlage für die Reaktionsgemische gemessen. Der HSPG-Assay erfolgte getrennt für beide Substrate mit Heparansulfat-Proteoglykan-gebundener sowie gelöster LPL.

3.5.2 Einfluss von ApoA5 auf die Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL

Die Ergebnisse sind in Grafik 3.8 dargestellt. In der LPL-Bindung durch HSPG zeigte sich eine gut nachvollziehbare Exzitation, die sowohl nach getrennter Faktoranalyse als auch bei multifaktorieller Analyse (LPL-Konzentration mit rApoA5-Anstieg) hochsignifikant ist ($p < 0,001$). Beim Schritt von 0 auf 10 µg/ml ApoA5 bei einer LPL-Konzentration von 1 µg/ml stieg die Hydrolyserate von $0,081 \pm 0,006$ mmol/l auf $0,206 \pm 0,015$ mmol/l FFA, bei 5 µg/ml LPL von $0,265 \pm 0,006$ mmol/l auf $0,473 \pm 0,030$ mmol/l FFA, ein deutlicher Zuwachs von 154 bzw. 78 %. Im Fall gelöster LPL war die Exzitation in Abhängigkeit von LPL- oder rApoA5-Steigerung jeweils hochsi-

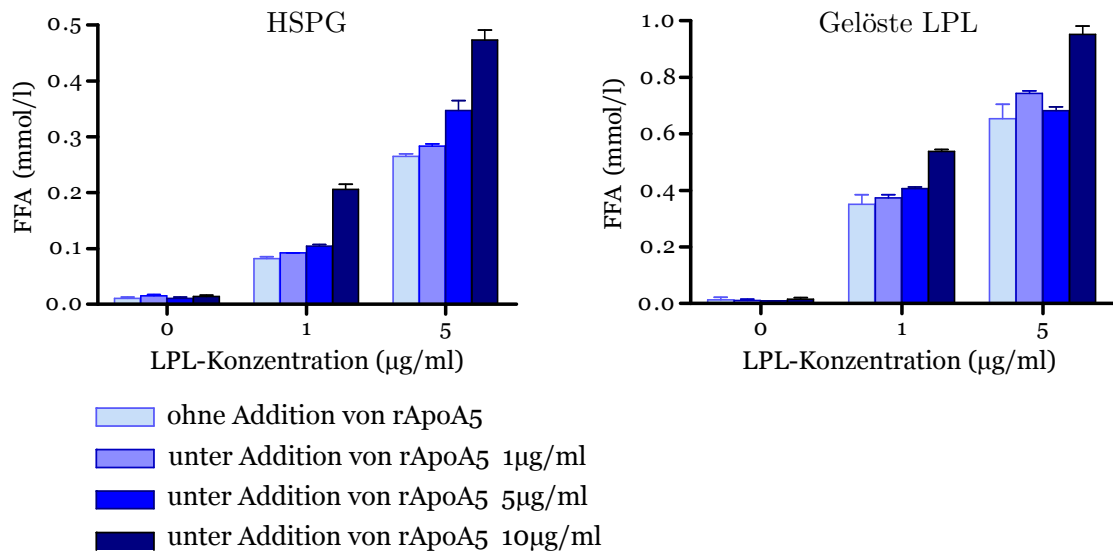


Abbildung 3.8: Effekt von rApoA5 auf die Hydrolyse von ApoA5ko-VLDL, *links* HSPG-gebundene LPL, *rechts* frei gelöste LPL; Mittelwerte \pm Standardabweichung

gnifikant ($p < 0,001$), in der gegenseitigen Abhängigkeitsbetrachtung jedoch zeigte sich erst der Sprung von 5 auf 10 µg/ml rApoA5 als hochsignifikant ($p < 0,001$ in beiden LPL-Konzentrationen). In der entsprechenden Grafik ist die fehlende Abhängigkeit und die mangelnde Signifikanz durch einen Ausreisser bei 5 µg/ml LPL in Kombination mit 1 µg/ml ApoA5 zu erklären. Der absolute Anstieg der Hydrolyseaktivität beim Schritt von 0 auf 10 µg/ml ApoA5 lag prozentual in ähnlichen Bereichen wie bei HSPG-gebundener LPL (bei 1 µg/ml LPL stieg die Hydrolyserate von $0,351 \pm 0,058$ mmol/l auf $0,538 \pm 0,011$ mmol/l FFA, bei 5 µg/ml LPL von $0,654 \pm 0,088$ mmol/l auf $0,952 \pm 0,051$ mmol/l FFA, ein Zuwachs von 53 bzw. 45 %).

3.5.3 Einfluss von rApoA5 auf die Hydrolyse von Micellen

Unter der Verwendung von Micellen als LPL-Substrat zeigten sich in beiden LPL-Bindungsarten durchweg hochsignifikante Aktivitätsteigerungen, sowohl durch LPL-Erhöhung als auch ApoA5-Zugabe ($p < 0,001$ für alle Settings). Die gegenseitige Abhängigkeitsbetrachtung zeigte ebenfalls eine hohe Signifikanz in allen Kombinationen ($p < 0,001$). Im Graphen wird dies durch absolute Steigerungen in allen oben genannten Fällen deutlich, bei gleichzeitig geringer Streubreite der gewonnenen Daten. Auffällig ist eine von 0 abweichende FFA-Konzentration in den Settings ohne LPL-Zugabe, allerdings ohne Betonung in einem bestimmten Fall. Dies deutet auf Reste freier Fettsäuren im Substrat-Ansatz hin.

Die Hydrolyseaktivität stieg beim Schritt von 0 auf 10 µg/ml ApoA5 unter HSPG-

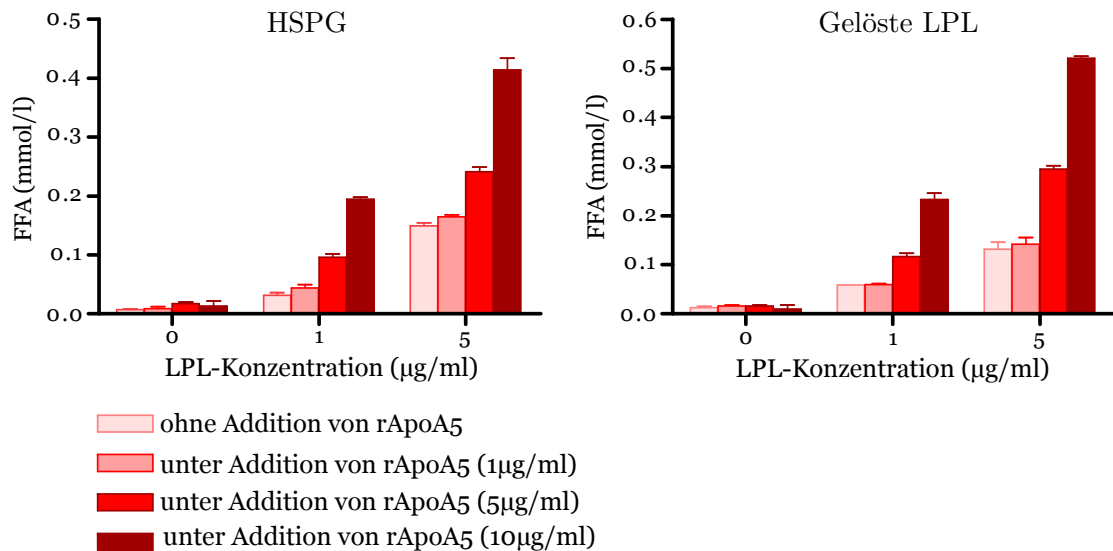


Abbildung 3.9: Effekt von rApoA5 auf die Hydrolyse von Micellen, *links* HSPG-gebundene LPL, *rechts* frei gelöste LPL; Mittelwerte \pm Standardabweichung

Bindung der LPL um mehr als das Fünffache (525 %) bei 1 µg/ml LPL-Konzentration (von $0,031 \pm 0,007$ mmol/l auf $0,194 \pm 0,006$ mmol/l FFA), um 177 % bei 5 µg/ml LPL (von $0,149 \pm 0,009$ mmol/l auf $0,413 \pm 0,035$ mmol/l FFA). Dieselben Settings im Fall gelöst vorliegender LPL ergaben eine Hydrolyse-Exzitation um 198 % bei 1 µg/ml LPL (von $0,078 \pm 0,034$ mmol/l auf $0,233 \pm 0,021$ mmol/l FFA) und um 189 % bei 5 µg/ml LPL (von $0,188 \pm 0,098$ mmol/l auf $0,520 \pm 0,007$ mmol/l FFA).

3.5.4 Vergleich der Hydrolyse von Micellen und VLDL unter Modulation von rApoA5

Wie bereits in Abschnitt 3.4.5 werden die Substratvergleiche für beide LPL-Bindungsarten getrennt betrachtet. Die an Heparansulfatproteoglykan gebundene LPL zeigte in der dreifachen multifaktoriellen Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen Micellen und VLDL. In zweifachen Abhängigkeiten ergab sich jedoch ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied bei der Kombination „Substratwahl und ApoA5-Konzentration“. Geht man hier in Einzelanalysen so ergibt sich außer dem Konzentrationssprung von ApoA5 von 0 auf 1 µg/ml, welcher nicht signifikant ist, für alle Konzentrationen ein hochsignifikanter Effekt beim Substratwechsel. Dies spiegelt sich in den oberen beiden Graphen der Abbildung 3.10 wider: die Grundaktivität ohne ApoA5-Zugabe liegt bei VLDL deutlich höher ($0,081 \pm 0,006$ mmol/l FFA bei 1 µg/ml LPL und $0,265 \pm 0,007$ mmol/l FFA bei 5 µg/ml LPL) als bei Micellen ($0,031 \pm 0,007$ mmol/l FFA bei 1 µg/ml LPL und $0,149 \pm 0,009$ mmol/l FFA bei 5 µg/ml LPL) bei jedoch vergleichbaren Mengen freigesetz-

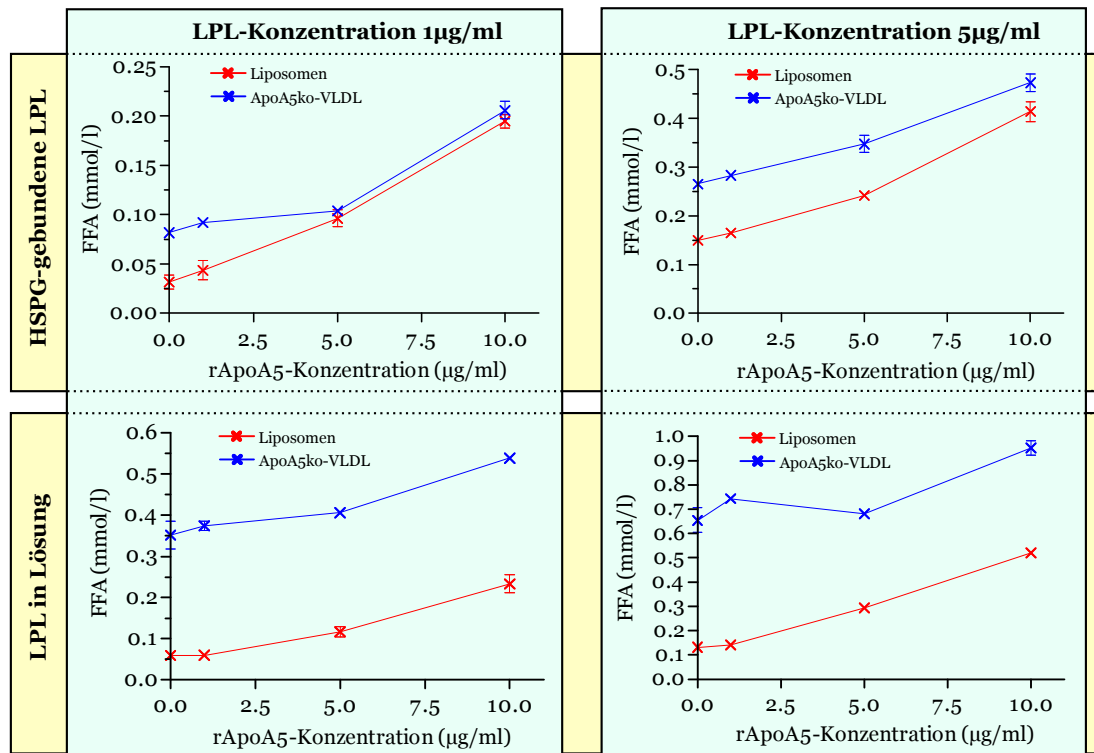


Abbildung 3.10: Effekt von rApoA5 auf die Hydrolyse von VLDL und Micellen, gruppiert nach eingesetzter LPL-Menge (1 und 5 µg/ml, linke und rechte Spalte) und LPL-Bindungsart (HSPG-Bindung oben, LPL in Lösung unten); Mittelwerte \pm Standardabweichung

ter FFA unter höchster ApoA5-Konzentration (10 µg/ml). Somit lag bei Micellen ein größerer Aktivitätszuwachs vor als bei VLDL. In derselben Analyse ergibt sich für einen Substratwechsel bei höchster ApoA5-Konzentration und in beiden LPL-Konzentrationen ein nur grenzwertig signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), was sich durch die weitestgehend angeglichenen Mengen freigesetzter FFA erklärt.

Im Fall gelöster LPL (Abbildung 3.10, untere Reihe) sind ähnliche Beobachtungen festzustellen: die Graphen zeigen, wenn auch auf anderem quantitativen Niveau und mit unterschiedlichen Steigungen, in beiden Substratfällen eine Exzitation sowohl unter Zugabe von ApoA5 als auch unter vermehrter LPL-Zugabe. Es liegt ohne ApoA5 eine erhöhte Grundaktivität bei VLDL-Substrat vor, der Unterschied betrug hier bis zu 350% (1 µg/ml LPL ohne rApoA5; Micellen: $0,078 \pm 0,034$ mmol/l FFA; VLDL: $0,351 \pm 0,058$ mmol/l FFA). Dieser Unterschied relativiert sich - vergleichbar mit HSPG-gebundener LPL - durch erhöhte Aktivitätszunahme bei LPL- und ApoA5-Erhöhung. Allerdings liegt diesmal auch ein deutlicher Unterschied bei maximaler ApoA5- und LPL-Konzentration vor (Micellen: $0,520 \pm 0,007$ mmol/l FFA; VLDL: $0,952 \pm 0,051$ mmol/l

FFA). Die dreifach multifaktorielle Varianzanalyse ist signifikant ($p < 0,05$), ebenso die zweifache Abhängigkeit von Substratwahl und ApoA5-Konzentration ($p < 0,05$). Zu betonen ist hierbei ein Ausreißer in der Hydrolyse von VLDL bei 5 µg/ml LPL und 1 µg/ml ApoA5, weshalb diese Signifikanzen kritisch betrachtet werden sollten. Ignoriert man diesen Ausreißer, so kann man beobachten, dass der Kurvenverlauf bei beiden Substraten nahezu parallel ist.

Zusammenfassend ist bei beiden Substraten unter gleichen Voraussetzungen derselbe Effekt zu beobachten bei gleichzeitig deutlichen Unterschieden in der Größenordnung, hier v.a. in der größeren Grundaktivität ohne ApoA5-Addition. Dies erklärt sich aller Wahrscheinlichkeit nach durch die weiteren, in VLDL-Partikeln vorhandenen Co-Faktoren wie Apolipoprotein C2.

4 Diskussion

Die Verwendung von Micellen-Liposomen-Lösungen als Lipase-Substrat wurde zum ersten Mal von Redgrave and Maranhao zur Untersuchung des Fettstoffwechsels am Rattenmodell angewandt (Redgrave and Maranhao, 1985), damals *in vivo* zur Klärung, ob künstliche Lipidkonglomerate verstoffwechselt werden würden. In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten wurden künstliche Lipid-Gemische als Substrat für fettverwertende Enzyme genutzt (Rensen et al., 1997a; Lookene et al., 2005). Die in der vorliegenden Arbeit verwandten Lipidkonglomerate (Micellen) entsprechen aufgrund ihrer Größe und Dichte am ehesten den VLDL-Partikeln (Flottieren in der Ultrazentrifugation, Größe 20-100 nm). Dies erleichtert insofern die Diskussion der Ergebnisse, als sowohl die Größe des Substrates wie auch dessen Lipidgehalt (also das Verhältnis von Triglyceriden - hier Triolein - sowie von Cholesterin und Phosphatidylcholin) mit VLDL-Partikeln vergleichbar sind.

Dass Micellen bei entsprechender Präparation und Aufbereitung *in vivo* am Lipid-Stoffwechsel teilnehmen können wurde bereits nachgewiesen (siehe oben). Im Rahmen des in der Einleitung erwähnten „Targeted Drug Delivery“ wurde ebenso die Möglichkeit aufgezeigt, dass Micellen durch Apolipoproteine die eigene Endozytose medieren können (Kopecka et al., 2011). Die generelle Annahme, daß die Addition von Apolipoproteinen an künstliche Lipidstrukturen wie Liposomen oder Micellen denselben Effekt auf den Zielrezeptor ausüben kann wie ein komplexes Lipoprotein, welches das gleiche Apolipoprotein inkorporiert, erscheint auf diesem Hintergrund plausibel, wurde jedoch nie verglichen. Es gibt allerdings zahlreiche Unterschiede, die auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nachfolgend separat diskutiert werden.

Ein Faktor, der in der vorliegenden Untersuchung nicht berücksichtigt wurde, ist die substratabhängige Hydrolysegeschwindigkeit. Diese könnte teilweise die beschriebenen Unterschiede erklären, indem man konstatiert, daß das Stoppen der Lipolyse durch Triton zu unterschiedlichen *relativen* Zeitpunkten des Reaktionsfortschritts erfolgte - abhängig vom Substrat. Insofern ist ein quantitativer Vergleich nur eingeschränkt möglich. Für diese Hypothese spräche das Fehlen eines regulierenden Antagonisten in den Micellen sowie deren unterschiedliche Lipidverteilung auf der Partikeloberfläche, zum einen aufgrund fehlender strukturgebender Membranproteine, zum anderen aufgrund anderer Lipidzusammensetzung. Dies könnte eine verzögerte oder verbesserte Substrat-

verfügbarkeit für die LPL nach sich ziehen und die unterschiedlichen Grundaktivitäten in den in Kapiteln 3.4 und 3.5 beschriebenen Versuchen erklären.

Der überwiegend am Enzym LPL wirkende Inhibitions-Effekt der TG-Clearance durch ApoC3 wurde bereits mehrfach beschrieben und nachgewiesen (Jong et al., 2001). Maeda et al. wiesen bereits früher nach, daß die genetische Deletion des ApoC3-Gens in der Maus unbeabsichtigt zu einer verminderten Expression von ApoA1 und ApoA4 führt (Maeda et al., 1994). Dies wie auch die Kenntnisse über humane Defizienz bzgl. des ApoA1-C3-A4-Clusters mit vergesellschafteter Risikosteigerung für koronare Herzkrankheit veranlasste Mezdour et al. zur Entwicklung eines neuen Mausmodells, welches neben ApoC3 auch vollständige Defizienz bzgl. ApoA1 und ApoA4 zeigt (Mezdour et al., 2006). Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, hätte jedoch das oben angesprochene Problem aus einer weiteren Perspektive zeigen können. Der Entdeckung von ApoA5 im oben genannten Cluster müßte im Mausmodell dann allerdings ebenso berücksichtigt werden. Grund für diese Ausführungen sind, daß auch bei VLDL-Partikeln, extrahiert aus murinem Blutplasma, durch die genetische Manipulation von einer Ungenauigkeit der Apolipoprotein-Interaktion auszugehen ist.

Ein weiterer Aspekt betrifft den Vergleich der Hydrolyse durch gelöste LPL in den Abbildungen 3.3 auf Seite 36 und 3.5 auf Seite 38 (jeweils rechter Graph in der Abbildung): es fällt auf, daß bei Verwendung von ApoA5-ko-VLDL kein Effekt unter der Addition von rekombinantem ApoC3 zu beobachten ist - die Höhe freigesetzter FFA blieb weitestgehend konstant. Dagegen ist der ApoC3-Inhibitions-Effekt im zweiten Versuch deutlich auszumachen und statistisch signifikant - der Unterschied lag hier in der Verwendung von VLDL, welche aus Plasma eines anderen Mausmodells entstammte in dem eine zusätzliche Deletion des ApoC3-Gens vorlag. In diesem Fall traf das rekombinante ApoC3 auf ein ApoC3-freies Lipoprotein, während im ersten Fall bereits ApoC3 im Rahmen der natürlichen Lipoproteinzusammensetzung vorlag. Hier ist anzunehmen, dass Sättigungsbereiche eher erreicht wurden und daher kein zusätzlicher Inhibitionseffekt ohne Zugabe erheblicher Mengen rApoC3's erreicht worden wären.

In jedem der oben genannten Fälle blieb allerdings die komplexere Interaktion weiterer Apolipoproteine mit dem eingesetzten Modulations-Apolipoprotein unberücksichtigt. In der oben genannten Anwendung von Micellen durch Redgrave and Maranhao *in vivo* ist während des Verweilens der Partikel in der Blutbahn von einer Apolipoprotein-Übertragung von anderen Lipoproteinklassen, insbesondere von HDL, auf die Micellen auszugehen, was ApoA5 annehmbar mit einschließt (O'Brien et al., 2005). In den Assays der vorliegenden Arbeit fehlen in den Micellen wiederum bis auf die Additive ApoC3 und ApoA5 alle weiteren Apolipoproteine, und zwar auch im finalen Hydrolyseschritt. Andererseits ist genau dies beabsichtigt, da die aufwändige Lipoprotein-Isolierung durch den Ersatz von Micellen vermieden werden soll. Letztendlich ist die komplexe Interaktion

der Apolipoproteine mit den beteiligten Stoffen der Schlüsselfaktor, der die beobachteten Unterschiede im Hydrolyse-Versuch erklären könnte.

Es bleibt zusammenfassend festzustellen, dass die statistische Analyse keinen eindeutigen, multifaktoriell abhängigen Unterschied in der Verwendung von Micellen oder VLDL aufzeigte. Dies bedeutet, dass ein Modulationseffekt von rApoA5 oder rApoC3 auf LPL verschiedener Konzentrationen sowohl bei VLDL-Partikeln als auch bei Micellen beobachtet wurde. Insofern ist davon auszugehen, daß Micellen im Hydrolyseversuch durch LPL als adäquater Ersatz für VLDL dienen können.

Die auf Seite 2 formulierte Hypothese lautete, dass es einen signifikanten Unterschied in der Verwendung von Micellen oder VLDL als Substrat der LPL in der durch Apolipoproteine modulierten Hydrolyse gebe. Diese Hypothese ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse abzulehnen. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit können VLDL und Micellen *in vitro* äquivalent eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

Micellen sind stabile Lipidaggregate in wässriger Lösung mit ähnlicher Lipidzusammensetzung und Größe wie VLDL-Partikel. Während VLDL-Partikel mit großem Zeit- und Materialaufwand isoliert werden müssen, sind Micellen kostengünstiger und schneller herzustellen. Insbesondere ist die Herstellung von Micellen nicht von einer Versuchstierhaltung abhängig. VLDL wie auch Micellen sind potentielle Substrate des Enzyms LPL, welches das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Hydrolyse von Triacylglycerolen ist (Olivecrona and Olivecrona, 1995). In der *in vitro* Hydrolyse durch HSPG-gebundene LPL wurde bislang VLDL als Substrat eingesetzt (de Man et al., 1997; Kluger et al., 2008). Zur Modulation der Hydrolysegeschwindigkeit können beiden Substraten Apolipoproteine zugesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Modulationseffekte der rekombinanten Apolipoproteine A5 und C3 auf die Aktivität der LPL beobachtet. Grund für die Auswahl von ApoA5 war dessen bekannter, potenter Exzitationseffekt auf die Hydrolysegeschwindigkeit. ApoC3 wurde wegen dessen gut dokumentierter antagonistischer Wirkung zu ApoA5 als zweites Modulationsagens eingesetzt, zudem scheint es keine Wechselwirkung der beiden Apolipoproteine zu geben (Baroukh et al., 2004). Bei beiden Apolipoproteinen wurde angenommen, dass die getesteten Substrate qualitative Unterschiede in der Reaktion auf die Apolipoproteinzugabe zeigen würden.

Die Resultate zeigten, dass beide Substrate teils signifikant unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeiten der LPL ausmachen. Jedoch waren die qualitativen Effekte der Modulation bei beiden Substraten nicht signifikant verschieden. Sowohl der erhöhte Umsatz von TG in freie Fettsäuren unter ApoA5-Einfluss wie auch die Hemmung der Fettsäure-Freisetzung unter Zugabe von ApoC3 wurde bei beiden Substraten in signifikantem Ausmaß beobachtet. Somit konnte auf Grundlage dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Micellen als adäquater Ersatz von VLDL in der *in vitro* Hydrolyse durch HSPG-gebundene LPL dienen können.

6 Abkürzungsverzeichnis

APO	Apolipoprotein
BP	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CHOL	Cholesterol
DNA	Desoxyribonucleinacid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
FFA	Free fatty acid $\hat{=}$ freie Fettsäuren
HDL	High Density Lipoprotein
HSPG	Heparan Sulfat Proteoglykan
IDL	Intermediate density lipoprotein
Kb	Kilobasen
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acetyl-Transferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
NaCl	Natriumchlorid
NEFA	Non-esterified fatty acids
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleinacid
RPM	Rounds per minute
TE	Tris-EDTA
TG	Triglyzeride
VLDL	Very Low density lipoprotein
Wasser	doppelt destilliertes und autoklaviertes Wasser

7 Literaturverzeichnis

- Baroukh, N., Bauge, E., Akiyama, J., Chang, J., Afzal, V., Fruchart, J.-C., Rubin, E. M., Fruchart-Najib, J., and Pennacchio, L. A. (2004). Analysis of apolipoprotein a5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(7):1297–1302.
- Beisiegel, U. and Heeren, J. (1997). Lipoprotein lipase (ec 3.1.1.34) targeting of lipoproteins to receptors. *Proc Nutr Soc*, 56(2):731–737.
- Breier, C., Mühlberger, V., Herold, M., Drexel, H., Lisch, H. J., Knapp, E., and Braunsteiner, H. (1985). [extent of coronary sclerosis in relation to lipoprotein lipase activity and plasma triglyceride levels]. *Schweiz Med Wochenschr*, 115(37):1263–1267.
- Caterina, R. D., Talmud, P. J., Merlini, P. A., Foco, L., Pastorino, R., Altshuler, D., Mauri, F., Peyvandi, F., Lina, D., Kathiresan, S., Bernardinelli, L., Ardissino, D., and on behalf of the Gruppo Italiano Aterosclerosi (2010). Strong association of the apoa5-1131t>c gene variant and early-onset acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*.
- de Man, F. H., de Beer, F., van der Laarse, A., Smelt, A. H., and Havekes, L. M. (1997). Lipolysis of very low density lipoproteins by heparan sulfate proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Lipid Res*, 38(12):2465–2472.
- Goldberg, I. J., Eckel, R. H., and Abumrad, N. A. (2009). Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and cd36-mediated pathways. *J Lipid Res*, 50 Suppl:S86–S90.
- Grundy, S. M., Balady, G. J., Criqui, M. H., Fletcher, G., Greenland, P., Hiratzka, L. F., Houston-Miller, N., Kris-Etherton, P., Krumholz, H. M., LaRosa, J., Ockene, I. S., Pearson, T. A., Reed, J., Washington, R., and Smith, S. C. J. (1998). Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction. American Heart Association. *Circulation*, 97(18):1876–87.
- Havel, R. J., Eder, H. A., and Bragdon, J. H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, 34(9):1345–1353.

- Heeren, J., Grewal, T., Laatsch, A., Rottke, D., Rinninger, F., Enrich, C., and Beisiegel, U. (2003). Recycling of apoprotein e is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem*, 278(16):14370–14378.
- Henneman, P., Schaap, F., Rensen, P., van Dijk, K., and Smelt, A. (2008). Estrogen induced hypertriglyceridemia in an apolipoprotein AV deficient patient. *J Intern Med*, 263:107–108.
- Human Gene Mutations Database (2011). Lpl gene mutations. [Online im Internet] URL: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=LPL> [Stand: 15.3.2012, 17:00].
- Johansen, C. T. and Hegele, R. A. (2011). Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr Opin Lipidol*, 22(4):247–253.
- Jong, M. C., Rensen, P. C., Dahlmans, V. E., van der Boom, H., van Berkel, T. J., and Havekes, L. M. (2001). Apolipoprotein c-iii deficiency accelerates triglyceride hydrolysis by lipoprotein lipase in wild-type and apoe knockout mice. *J Lipid Res*, 42(10):1578–1585.
- Járomi, L., Csöngéi, V., Polgár, N., Szolnoki, Z., Maász, A., Horvatovich, K., Faragó, B., Sipeky, C., Sáfrány, E., Magyar, L., Kisfali, P., Mohás, M., Janicsek, I., Lakner, L., and Melegh, B. (2010). Functional variants of glucokinase regulatory protein and apolipoprotein a5 genes in ischemic stroke. *J Mol Neurosci*, 41(1):121–128.
- Kluger, M., Heeren, J., and Merkel, M. (2008). Apoprotein a-v: An important regulator of triglyceride metabolism. *J Inherit Metab Dis*.
- Kopecka, J., Campia, I., Olivero, P., Pescarmona, G., Ghigo, D., Bosia, A., and Riganti, C. (2011). A ldl-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells. *J Control Release*, 149(2):196–205.
- 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(27):25383–25387.
- Maasz, A., Kisfali, P., Jaromi, L., Horvatovich, K., Szolnoki, Z., Csongéi, V., Safrány, E., Sipeky, C., Hadarits, F., and Melegh, B. (2008). Apolipoprotein a5 gene ivs3+g476a allelic variant confers susceptibility for development of ischemic stroke. *Circ J*, 72(7):1065–1070.
- Maeda, N., Li, H., Lee, D., Oliver, P., Quarfordt, S. H., and Osada, J. (1994). Targeted disruption of the apolipoprotein c-iii gene in mice results in hypotriglyceridemia

- and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J Biol Chem*, 269(38):23610–23616.
- Mezdour, H., Larigauderie, G., Castro, G., Torpier, G., Fruchart, J., Nowak, M., Fruchart, J.-C., Rouis, M., and Maeda, N. (2006). Characterization of a new mouse model for human apolipoprotein a-i/c-iii/a-iv deficiency. *J Lipid Res*, 47(5):912–920.
- O’Brien, P. J., Alborn, W. E., Sloan, J. H., Ulmer, M., Boodhoo, A., Knierman, M. D., Schultze, A. E., and Konrad, R. J. (2005). The novel apolipoprotein a5 is present in human serum, is associated with vldl, hdl, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem*, 51(2):351–359.
- Olivecrona, G. and Olivecrona, T. (1995). Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 6(5):291–305.
- Redgrave, T. G. and Maranhao, R. C. (1985). Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. *Biochim Biophys Acta*, 835(1):104–112.
- Rensen, P. C., Herijgers, N., Netscher, M. H., Meskers, S. C., van Eck, M., and van Berkel, T. J. (1997a). Particle size determines the specificity of apolipoprotein e-containing triglyceride-rich emulsions for the ldl receptor versus hepatic remnant receptor in vivo. *J Lipid Res*, 38(6):1070–1084.
- Rensen, P. C., Schiffelers, R. M., Versluis, A. J., Bijsterbosch, M. K., Kuijk-Meuwissen, M. E. V., and Berkel, T. J. V. (1997b). Human recombinant apolipoprotein e-enriched liposomes can mimic low-density lipoproteins as carriers for the site-specific delivery of antitumor agents. *Mol Pharmacol*, 52(3):445–455.
- Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2010). Todesursachen in Deutschland. *Fachserie 12*, Reihe 4 [abgerufen Online im Internet] URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html> [Stand: 13.3.2012, 8:50].
- Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., and Farokhzad, O. C. (2008). Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther*, 83(5):761–769.

Danksagung

Mein erster Dank gilt denjenigen, die mir auch in schwierigen Zeiten ermöglicht haben an dieser Dissertation zu arbeiten, allen voran meine geliebte Frau Judit.

Meinem Betreuer PD Dr. Martin Merkel gilt fachlich wie auch persönlich großer Dank, angefangen mit der Konzeption der Aufgabenstellung, als auch für seine über die gesamte Zeit herzliche, kompetente und geduldige Betreuung. In diesem Zuge danke ich auch Herrn Prof. Dr. med. Rolf Stahl für die Möglichkeit, diese Forschungsarbeit an der von ihm geleiteten III. Medizinischen Klinik des Uniklinikums Hamburg Eppendorf durchzuführen.

Dank geht auch an Prof. Dr. Jörg Heeren für konstruktive fachliche Diskussionen zusammen mit meinem Betreuer und wertvolle wissenschaftliche Hinweise. Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel möchte ich für die Möglichkeit der Mitbenutzung des Labors des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie danken.

Große Hilfe erhielten wir Promoventen von Britta Schwarzloh der AG „Signaltransduktion“ und ihren MTLA-Kolleginnen im CIM Hamburg, die uns bei labortechnischen Fragen stets hilfsbereit zur Seite standen. Ganz besonders möchte ich auch Sandra Ehret danken, die nicht selten maßgeblichen Anteil an der Lösung labortechnischer Probleme hatte, vor allem bei der Isolierung der bovinen LPL. Speziellen Dank richte ich auch an Dr. Oliver Bruns, der mir bei der ultraschallgestützten Herstellung von Micellen eine große Hilfe war. Donald E. Knuth und Leslie Lamport danke ich für die Entwicklung und kostenfreie Weitergabe der Softwares \TeX und \LaTeX , mit denen die Schriftform dieser Arbeit erstellt wurde.

Danke auch an das Institut für Biometrie und Medizininformatik, und hier insbesondere Frau Lena Herich, für die Hilfe bei der statistischen Datenanalyse.

Meinen Eltern Dr. Antje und Dr. Klaus-Peter Schaab und erneut auch meinem Betreuer PD Dr. Martin Merkel gilt jeweils großer Dank für konstruktives Korrekturlesen der Schriftform meiner Arbeit.

Und nicht zuletzt herzlichen Dank an Christian Sandner für die gründliche und geduldige Einarbeitung in die Laborumgebung samt guter Begleitmusik, sowie meinen Laborkollegen Lydia Ewerlin, Diana Temme, Anika Naumann und Henrike Müller für eine überaus angenehme und freundschaftliche Laborgemeinschaft.

Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

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 übernommenen 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.