

Untersuchung der Interaktion von Apolipoprotein A5 mit Lipoprotein-Rezeptoren

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften des Departments Chemie der
Universität Hamburg vorgelegt von

Karoline Brügelmann

aus Bocholt

Hamburg, 2012

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde extern in der Zeit von Oktober 2008 bis Februar 2012 am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Heeren angefertigt. Herr Prof. Dr. Horst Weller betreute diese Arbeit am Department Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Horst Weller

Physikalische Chemie, Universität Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie,

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Datum der Disputation: 28.09.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Lipoproteine	7
1.2. Lipoproteinstoffwechsel	9
1.2.1. Exogener Weg	10
1.2.2. Endogener Weg.....	11
1.3. Rezeptoren im Lipoproteinstoffwechsel	14
1.4. Identifizierung und Struktur des ApoA5.....	18
1.5. Funktion von ApoA5 im extrazellulären Lipoprotein-Stoffwechsel	22
1.6. Funktion des ApoA5 in der Leber.....	24
1.7. ApoA5 und die Entstehung von metabolischen Krankheiten	25
2. Ziel der Arbeit	28
3. Material und Methoden	29
3.1. Verbrauchsmaterial & Geräte	29
3.2. Pufferlösungen.....	32
3.3. Nahrung und Mauslinien	36
3.4. Methoden.....	37
3.4.1. Genotypisierung	37
3.a. ApoA5-Transgen PCR.....	38
3.b. LDL-Rezeptor PCR	39
3.c. LRP1flox PCR	39
3.d. cre-Rekombinase PCR	40
3.4.2. Blutabnahme und Erstellung des Lipoproteinprofils.....	41
3.4.3. Triglyzerid- und Cholesteroll-Bestimmung.....	42
3.4.4. ApoA5-ELISA.....	43
3.4.5. Lowry-Proteinbestimmung.....	43
3.4.6. Organentnahme	44
3.4.7. RNA-Isolierung.....	44
3.4.8. cDNA Umschreibung und quantitative real-time PCR	44
3.4.9. Isolierung von Lipoproteinen aus murinem Plasma.....	45
3.4.10. Orale Fett-Toleranztest.....	46
3.4.11. Herstellung von 3H-Palmitinsäure gebundenem BSA	46

3.4.12. TRL-Produktionsstudien	46
3.4.13. Lipidextraktion	46
3.4.14. TRL-Abbaustudien	47
3.4.15. Herstellung von ApoA5-Ko-freien HDL.....	47
3.4.16. Herstellung von radioaktiv markierten TRL	47
3.4.17. Isolation und Kultur von primären murinen Hepatozyten	48
3.4.18. Stimulations- und Sekretionsstudien in vitro.....	49
3.4.19. VLDL-Aufnahme in vitro	49
4. Ergebnisse.....	51
4.1. Darstellung der Mausekreuzung und der Mausmodelle	51
4.2. Charakterisierung des LDLR-defizienten und ApoA5-transgenen Mausmodells	55
4.2.1. Erstellung von Lipoproteinprofilen aus murinem Plasma.....	55
4.2.2. m-RNA-Expressionsanalyse	56
4.2.3. in vivo Studien	59
4.3. Charakterisierung des Mausmodells mit gefloxtem LRP1-Gen, cre-Transgen und ApoA5-Transgen	62
4.3.1. Erstellung von Lipoproteinprofilen aus murinem Plasma.....	62
4.3.2. in vivo Studien	64
4.3.3. in vitro Studien.....	70
4.4. Charakterisierung des Mausmodells mit LDLR-Knockout, gefloxtem LRP1- Gen und ApoA5-Transgen	74
4.4.1. Erstellung von Lipoproteinprofilen aus murinem Plasma.....	74
4.4.2. in vivo Studien	77
4.4.3. in vitro Studien.....	83
5. Diskussion	85
5.1. Funktion von ApoA5 im extrazellulären Bereich	86
5.1.1. Rolle des LDLR für die Funktion von ApoA5.....	86
5.1.2. Rolle des hepatischen LRP1 für die Funktion von ApoA5	87
6. Zusammenfassung	101
7. Summary	103
8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise.....	105
9. Literatur	118

10. Anhang	127
10.1. Abkürzungsverzeichnis	127
10.2. Abbildungsverzeichnis	130
10.3. Danksagung	132
10.4. Eidesstattliche Erklärung	133
10.5. Curriculum Vitae	134

1. Einleitung

1.1. Lipoproteine

Triglyzeride, Cholesterol und Phospholipide liefern, neben Kohlenhydraten und Proteinen, die benötigte Energie für den Menschen und dienen als Ausgangsmaterial für viele Stoffwechselfvorgänge.

Lipide sind schlecht löslich in polaren organischen Lösungsmitteln, hingegen gut löslich in unpolaren Lösungsmitteln. Während kürzere Fettsäuren im Blut an Albumin gebunden transportiert werden können, werden die komplexen Lipide in Form von Triglyzeriden im hydrophoben Kern von sphärischen Kugeln, den Lipoproteinen, transportiert. Der Kern der Lipoproteine besteht neben Triglyzeriden aus Cholesterolestern und lipophilen Vitaminen. Die hydrophile Hülle besteht aus Phospholipiden, Cholesterol und Apolipoproteinen. Die Apolipoproteine stabilisieren die Struktur und vermitteln als Liganden die Bindung an Lipoprotein-Rezeptoren. Der grundlegende Aufbau eines Partikels ist in Abb. 1 dargestellt.

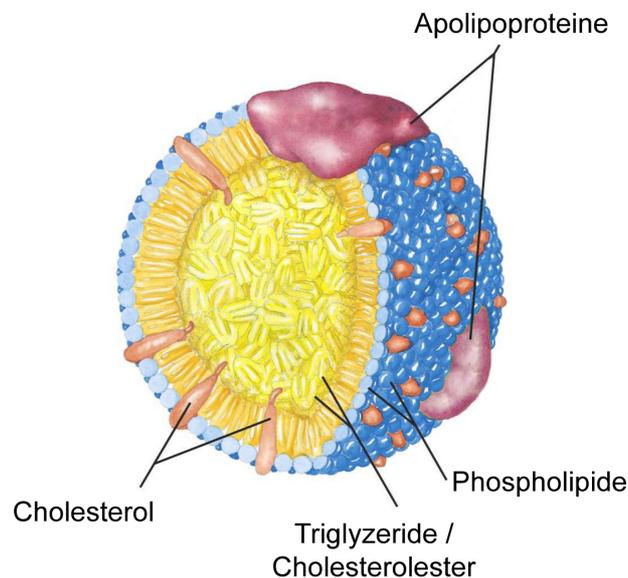


Abb. 1: Aufbau eines Lipoproteins

Lipoproteine sind Mizellen, bestehend aus einer hydrophilen Oberfläche aus Phospholipiden, Cholesterol und Apolipoproteinen. Der hydrophobe Kern setzt sich aus Triglyzeriden und Cholesterolestern zusammen (Abb. adaptiert aus dem Internet: <http://www.bioguo.org/CADgene/picture/LipoProtein.jpg>).

1. Einleitung

Generell werden die Lipoproteine nach ihrer Dichte, Größe, Lipidzusammensetzung und dem Gehalt an Apolipoproteinen in 5 Klassen eingeteilt (Eisenberg and Levy, 1975) (Tabelle 1): Chylomikronen (CM), *very-low-density lipoproteins* (VLDL), *intermediate-density lipoproteins* (IDL), *low-density lipoproteins* (LDL) und *high-density lipoproteins* (HDL).

	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte [g/ml]	~ 0,93	0,93 - 1,006	1,006 - 1,019	1,019 - 1,063	1,063 - 1,21
Durchmesser [nm]	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Cholesterol [%]	4	22	29	45	30
Triglyzeride [%]	85	50	31	10	8
Phospholipide [%]	9	18	22	20	29
Protein [%]	2	10	10	25	33
Apolipoprotein	B48, A1, A5, C2, C3, E	B100, A5, C2, C3, E	B100, E	B100	A1, A2, A4, A5, E

Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften und Zusammensetzung humaner Lipoproteine. Adaptiert nach Havel und Kane 2001.

Die Dichte der Lipoproteine nimmt mit zunehmender Größe ab, ebenso der Triglyzerid-Gehalt, der sein Minimum in der HDL-Fraktion erreicht. Der Cholesterol-Gehalt erreicht in der LDL-Fraktion sein Maximum. Grundsätzlich lassen sich die Lipoproteine in zwei Klassen einteilen, den triglyzeridreichen (TRL) und den cholesterolreichen Lipoproteinen. Zu den TRL gehören CM und VLDL, zu den cholesterolreichen LDL und HDL. Weiterhin sind an den Lipoproteinen noch strukturgebende Apolipoproteine gebunden, wobei in dieser Arbeit nicht auf deren

1. Einleitung

verschiedene Funktionen eingegangen wird. Generell existieren austauschbare und nicht-austauschbare Apolipoproteine. Die austauschbaren, z.B. ApoA5, können zwischen den einzelnen Lipoproteinklassen transferiert werden. Die nicht-austauschbaren, zu denen ApoB100 und die verkürzte Form ApoB48 gehören, bleiben in der Zirkulation mit dem selben Lipoprotein assoziiert und werden mit diesem aus der Zirkulation entfernt. Das nicht-austauschbare ApoB48 findet man unter anderem auf triglyzeridreichen CM und das nicht-austauschbare ApoB100 auf VLDL bzw. LDL. Das austauschbare Apolipoprotein A1 (ApoA1) ist bei HDL das strukturgebende Apolipoprotein (Mahley et al., 1984; Schaefer et al., 1978; Alaupovic et al., 1972; O'Brien et al., 2005). Apolipoproteine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und nach Lipidbeladung mit naszierenden Lipoproteinen als metabolische Einheit aus der Zelle sekretiert.

1.2. Lipoproteinstoffwechsel

Lipoproteine werden als Energielieferant, Energiespeicher und zur Weiterverarbeitung zwischen verschiedenen Organen über die Blutbahn transportiert. Dabei unterscheidet man zwischen drei Transportsystemen.

Im exogenen Weg werden aufgenommene Nahrungslipide an die Organe weitergegeben und im endogenen Weg werden die von der Leber synthetisierten Lipoproteine zu extrahepatischen Geweben transportiert. Im reversen Cholesteroltransport wird das Cholesterol peripherer Gewebe zur Leber transportiert, um ausgeschieden oder weiterverarbeitet zu werden. Der reverse Cholesteroltransport verbindet den exogenen und den endogenen Weg miteinander. Auf den reversen Cholesteroltransport wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen.

1.2.1 Exogener Weg

Nach der Nahrungsaufnahme (postprandial) werden die Triglyzeride durch die pankreatische Lipase in Monoglyzeride, freie Fettsäuren sowie freies Glycerol gespalten und von den Darmzellen resorbiert. Dort werden Monoglyzeride und freie Fettsäuren erneut zu Triglyzeriden revereestert. Die hydrophoben Lipide werden anschließend mit Cholesterol, Phospholipiden und Apolipoproteinen, hauptsächlich ApoB48, zu CM verpackt. Unter Umgehung der Leber gelangen die CM anschließend in die Blutbahn. Dort werden hauptsächlich durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL), gebunden an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG), die Triglyzeride gespalten (Hussain et al., 1991). Ebenso zeigen neuere Studien, dass LPL auch gebunden an *glycosylphosphatidyl-inositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1* (GPIHBP1) vorliegt (Beigneux et al., 2007; Weinstein et al., 2008; Beigneux et al., 2009). In Studien wurden Interaktionen zwischen ApoA5 sowohl mit HSPG (Lookene et al., 2005) als auch mit GPIHBP1 dargestellt (Gin et al., 2007; Gin et al., 2008). Die LPL-Aktivität wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, u.a. durch ApoC2, ApoC3 und ApoA5. Weiterhin gelten *Angiopoietin-like proteins* (ANGPTL), nämlich ANGPTL3 und ANGPTL4 als bedeutende LPL-Modulatoren (Lichtenstein and Kersten, 2010; Mattijssen and Kersten, 2011). Die bei der Hydrolyse entstehenden freien Fettsäuren werden von den peripheren Geweben, vor allem Muskel- und Fettgewebe, zur Energiegewinnung bzw. Energiespeicherung aufgenommen. Während der Spaltung findet gleichzeitig ein Austausch von ApoE, ApoA5 und Phospholipiden mit HDL statt. Die entstehenden CM *remnants* (CR), an denen auch noch LPL assoziiert ist, können dann das fenestrierte Endothel passieren und gelangen in den Disse-Raum, in dem sie dann durch HSPG zunächst an die Zelloberfläche gebunden, dann vermittelt durch Interaktionen zwischen ApoE und LPL mit Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie in die Leber aufgenommen werden (Mahley et al., 1989; Beisiegel et al., 1989). Die *remnant*-Aufnahme über LRP1 verläuft in einem insulinabhängigen Mechanismus, d.h. LRP1 wird postprandial von endosomalen Kompartimenten an die Zellmembran befördert, wodurch die LRP1-vermittelte Entfernung von *remnants*

1. Einleitung

beschleunigt wird (Laatsch et al., 2009b). In vitro Studien weisen eine Interaktion zwischen ApoA5 mit LRP1 auf, weshalb eine Funktion von ApoA5 bei der Internalisierung der Partikel angenommen wird und in der vorliegenden Arbeit geklärt werden sollte. Weiterhin zeigten Mac Arthur et al., dass HSPG auch die Aufnahme von *remnants* in die Leber vermitteln (MacArthur et al., 2007).

Während der Endozytose werden die CR abgebaut und es kommt zum HDL-induzierten Recycling von ApoE und LPL. ApoB48 wird lysosomal abgebaut, die Lipide des Partikelkerns werden nach Hydrolyse von der Zelle metabolisiert oder nach erneuter Veresterung in Lipiddroplets gespeichert (Laatsch et al., 2012; Swift et al., 2001; Heeren et al., 2003; Heeren and Beisiegel, 2001; Heeren et al., 2001; Rensen et al., 2000; Heeren et al., 1999).

1.2.2 Endogener Weg

Während der Nahrungskarenz werden von der Leber Triglyzeride als Energiequelle für den Organismus synthetisiert. Diese werden, als VLDL verpackt, an die peripheren Organe verteilt. In der postprandialen Phase wird diese Synthese durch Insulin inhibiert. Die VLDL-Synthese ist ein aus zwei wichtigen Schritten bestehender Prozess: Im ersten Schritt wird ApoB an den Ribosomen synthetisiert und an das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Im zweiten Schritt wird der am rauen ER gebundene lipidarme ApoB-Partikel unter Zuhilfenahme des mikrosomalen Triglyzeridtransferproteins (MTP) mit Triglyzeriden und Cholesterolestern komplexiert und endet in sekretionsfähigen, reifen VLDL. Jene reifen VLDL werden in den Disse-Raum sezerniert (Shelness and Sellers, 2001; Hussain et al., 2003). VLDL erfahren eine ähnliche Verstoffwechslung wie die CM. Im Gegensatz zu den CM enthalten diese als Strukturprotein nicht ApoB48, sondern ApoB100. Mittels der Hydrolyse durch LPL entstehen immer kleinere und dichtere Partikel, die so genannten VLDL-*remnants*. Einige dieser VLDL-*remnants* werden durch Bindung von ApoE und LPL in die Leber aufgenommen. Der Großteil der IDL wird jedoch weiter hydrolysiert und schließlich zu cholesterolreichen LDL

1. Einleitung

umgewandelt. Diese können über Tage im Plasma verbleiben, wobei es auch zu einer Anreicherung mit verestertem Cholesterol aus HDL kommen kann. Die Wiederaufnahme der LDL in die Leber erfolgt über eine Interaktion zwischen ApoB100 und dem LDL-Rezeptor, welcher auch noch in vielen anderen Geweben vorhanden ist. Diese rezeptorvermittelte Aufnahme der LDL dient zur Versorgung der Zellen mit Cholesterol, welches dort ein essentieller Membranbestandteil und eine Ausgangssubstanz für die Steroidsynthese ist. Überschüssiges Cholesterol kann von den extrahepatischen Geweben in Form von HDL wieder zur Leber zurücktransportiert werden (reverser Cholesteroltransport). Die Leber ist das einzige Organ, welches überschüssiges Cholesterol über die Galle in Form von Gallensäure ausscheiden kann (von Eckardstein et al., 2001). Diese Ausscheidung ist sehr wichtig, da ein Überschuss mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, vor allem Atherosklerose, verbunden ist.

CM besitzen mit 5-10 min eine kurze Bluthalbwertszeit im Vergleich zu VLDL mit 3-4 Stunden und HDL mit 5-6 Tagen. Wie bereits erwähnt gehören die CM und VLDL zu den triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL), bei deren Verstoffwechslung die Leber eine zentrale Rolle einnimmt. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde auch eine äußerst bedeutende Funktion bei der Entfernung von TRL *remnants* durch aktiviertes braunes Fettgewebe aufgezeigt (Bartelt et al., 2011). In der folgenden Abbildung sind exogener und endogener Weg in einem vereinfachten Überblick zusammengestellt:

1. Einleitung

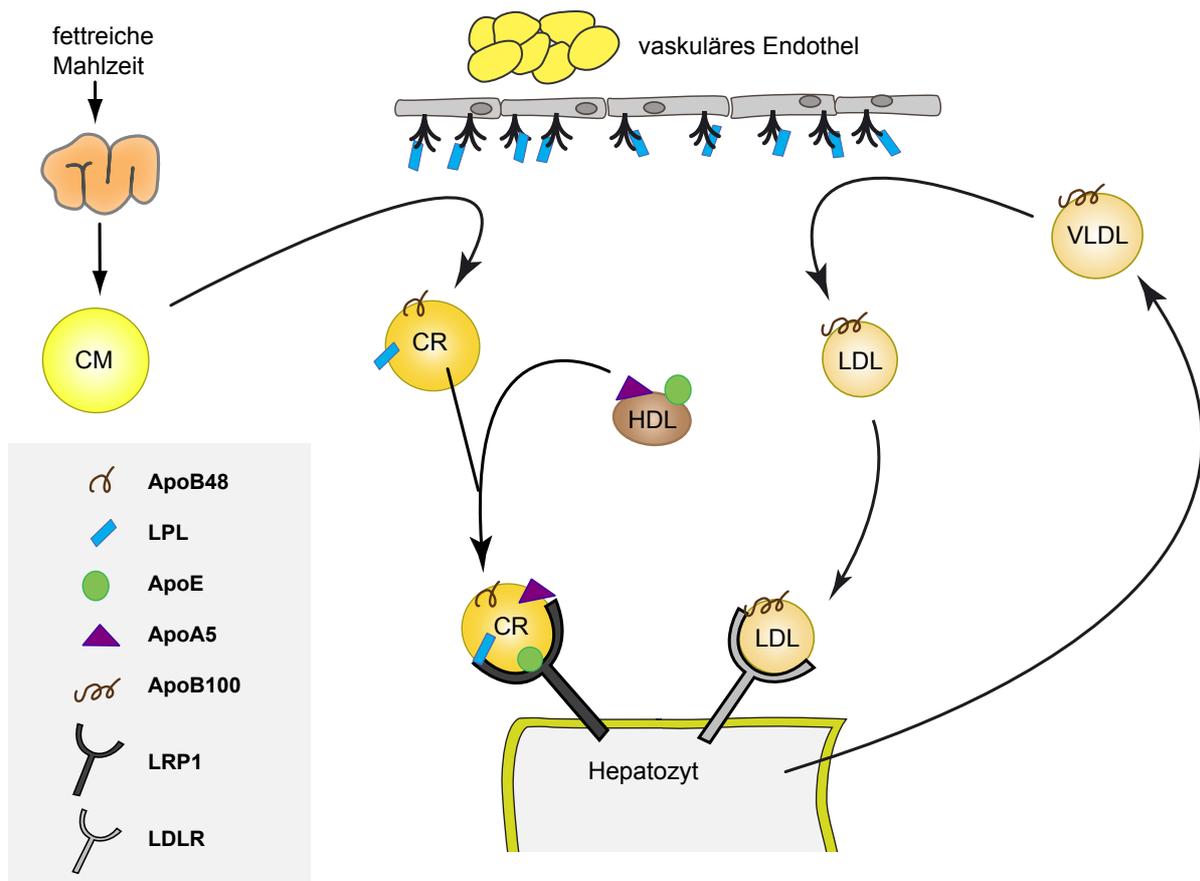


Abb. 2: Überblick über den exogenen und endogenen Lipoprotein-Stoffwechsel

Erläuterungen werden im Text gegeben. (Abkürzungen: CM = *chylomicron*; CR = *CM remnant*; LPL = *Lipoproteinlipase*; HDL = *high-density lipoprotein*; LDL = *low-density lipoprotein*; VLDL = *very-low-density lipoprotein*; ApoE = *Apolipoprotein E*; ApoA5 = *Apolipoprotein A5*; ApoB48 = *Apolipoprotein B-48*; ApoB100 = *Apolipoprotein B-100*; LDLR = *low-density lipoprotein receptor*; LRP1 = *LDLR-related protein 1*).

1.3. Rezeptoren im Lipoprotein-Stoffwechsel

Die im Magen-Darm-Trakt synthetisierten CM und die von der Leber hergestellten VLDL werden größtenteils durch Interaktionen mit Lipoprotein-Rezeptoren in die Leber endozytiert.

Die wichtige Rezeptorfamilie ist nach dem LDLR benannt, dessen Rolle in der Cholesterolemie von Goldstein und Brown 1985 aufgeklärt wurde. Der LDLR ist abundant im Körper exprimiert. Mutationen dieses Rezeptors führen sowohl im Menschen als auch im Tier zur Hypercholesterolemie und vorzeitiger Atherosklerose (Brown and Goldstein, 1986a). Dagegen ist die Entfernung von ApoB48/ApoE enthaltenden Lipoproteinen, wie z.B. *chylomicron remnants* (CR), nicht beeinflusst, so dass die Beteiligung anderer Rezeptoren in Betracht gezogen wurde. Es wurde gezeigt (Herz et al., 1988), dass die Aufnahme von *remnants* in die Leber über ApoE vermittelt wird, und weiterhin, dass LRP1 mit ApoE interagiert (Beisiegel et al., 1989), nicht jedoch mit ApoB100 oder ApoB48. Die physiologische Bedeutung von LRP1 mit konventionellen Knockout-Methoden zu untersuchen ist unmöglich, da diese nicht kompatibel mit der Embryonalentwicklung sind und LRP1-defiziente Embryos sterben.

Willnow et al. überexprimierten adenoviral das molekulare Chaperon, *receptor associated protein*, RAP (Willnow et al., 1994). Im endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert RAP vorübergehend mit neu synthetisierten LRP1. Durch diese Bindung wird verhindert, dass Liganden innerhalb des ER an LRP1 binden und LRP1 agglomeriert. Diese adenovirale Überexpression von RAP in LDLR-defizienten Mäusen führt zu einem zehnfachen Anstieg des Cholesterolemie- und Triglycerid-Spiegels im Vergleich zu Mäusen, die nur RAP überexprimieren. Rohlfmann et al. nutzten induzierbare gewebespezifische Genknockout-Strategien, um leberspezifisch LRP1 in ausgewachsenen Tieren zu deletieren, und bestätigten die Ergebnisse von Willnow et al.. Ein leberspezifischer LRP1-Knockout auf einem LDLR-defizienten Hintergrund führt zu einer merklichen Akkumulation cholesterolemie- und triglyceridreicher Partikel im Vergleich zum LDLR-Knockout (Rohlfmann et al.,

1. Einleitung

1998). Erstaunlicherweise führt der alleinige leberspezifische Funktionsverlust von LRP1 nicht zur Akkumulation von ApoE enthaltenden *remnants*. In solchen Mäusen wird der LDLR kompensatorisch hochreguliert und kann einen leberspezifischen LRP1-Defekt vollständig ausgleichen. Diese Hochregulation des LDLR veranschaulicht gleichzeitig indirekt, dass LRP1 eine Rolle im Lipoprotein-Stoffwechsel einnimmt. Neben dem LDLR erscheint nach heutigen Erkenntnissen LRP1 als der für die Lipoproteinaufnahme wichtigste Rezeptor dieser Proteinfamilie (Beisiegel et al., 1989; Herz and Strickland, 2001), vor allem im exogenen Stoffwechsel (Laatsch et al., 2009b) zu sein. Zusätzlich lassen neuere Erkenntnisse darauf schließen, dass HSPG auch eine Rolle als Lipoprotein-Rezeptor einnehmen (MacArthur et al., 2007; Bishop et al., 2008b; Stanford et al., 2009b; Foley and Esko, 2010; Deng et al., 2011; Deng et al., 2012). HSPG sind am vaskulären Endothel gebunden, hauptsächlich im kapillaren Endstromgebiet des Herz-, Fett- und Muskelgewebes. U.a. spalten sie die Triglyzeride von CM und VLDL und kontrollieren die Aufnahme von Fettsäuren in die Gewebe. Mac Arthur et al. zeigten durch eine Deletion von HSPG in vivo den ersten genetischen Beweis, dass diese die Entfernung von triglyzeridreichen Lipoproteinen vermitteln und sogar in einer LDLR-Knockout-Situation bei der Entfernung cholesterolreicher Partikel behilflich sind (MacArthur et al., 2007).

Zur LDL-Rezeptor Familie gehören folgende sieben eng verwandte Typ-1-Transmembran-Rezeptoren: der LDL-Rezeptor, der VLDL-Rezeptor (VLDLR), der ApoE Rezeptor 2 (ApoER2/LRP8), der *multiple epidermal growth factor-like domain 7* (MEGF7), das *LDLR-related protein 1* (LRP1), LRP1B und Megalin (LRP2/Glykoprotein 330). Die meisten Mitglieder weisen charakteristische Domänen auf. Am aminoterminalen Teil befindet sich die extrazelluläre Ligandenbindungs-Domäne, die aus den sogenannten LDLR *Class A repeats* bestehen. Diese *Class A repeats* bestehen aus mindestens 40 Aminosäuren und aus Clustern negativ geladener Aminosäurenresten, die an der Bindung der Liganden beteiligt sind. Daran grenzt die *epidermal growth factor* (EGF)-Vorläufer-Homologie-Domäne an, die für die pH-abhängige Dissoziation von Lipoprotein und Rezeptor im Endosom

1. Einleitung

relevant ist (Jeon and Blacklow, 2005). Die Transmembran-Domäne gewährleistet den Halt in der Plasmamembran. Darauf folgt die cytosolische, auch intrazellulär genannte, Domäne (Lillis et al., 2008), die Rezeptor-abhängig spezifische Motive aufweisen, die für die Endozytose und Signalfunktion eine Rolle spielen. Gordts et al. zeigten durch Inaktivierung eines spezifischen Motivs von LRP1 in LDLR-defizienten Tieren, dass dieses entscheidend ist für die Entfernung atherogener, cholesterolreicher *remnant*-Partikel aus der Zirkulation und anderer Moleküle, die zur Entstehung von Atherosklerose beitragen (Gordts et al., 2009).

Der LDLR ist für die Aufnahme von Lipoproteinen wichtig, die ApoE aufweisen, wie die triglyzeridreichen CR, oder für solche die ApoB100 aufweisen, wie die cholesterolreichen LDL. Der LDLR spielt nur innerhalb des Lipoprotein-Stoffwechsels eine essentielle Rolle, wohingegen LRP1 weitere Funktionen einnimmt, u.a. in der Neuroentwicklung und als Signalüberträger, beispielsweise beim Wnt-Signalweg (Terrand et al., 2009).

LRP1 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) ist einer der größten Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie und besteht aus zwei Untereinheiten, einer 515kDa α - und einer 85kDa β -Untereinheit. Die extrazelluläre 515kDa Untereinheit enthält die N-terminale Ligandenbindungs-Domäne. Die kleinere 85kDa C-terminale Einheit enthält die extrazelluläre, die Transmembran-Domäne und die cytosolische Domäne. Die extrazelluläre Domäne von LRP1 ist wesentlich komplexer aufgebaut als die vom LDL-Rezeptor und besteht nicht nur aus einem, sondern aus vier Clustern (Cluster I-IV) von Ligandenbindungs-Domänen. Diese Cluster variieren noch in ihrer Anzahl an LDLR *class A repeats* (Cluster I hat 2, Cluster II hat 8, Cluster III hat 10, und Cluster IV hat 11 repeats). Somit besitzt LRP1 mehrere Interaktionsstellen. Damit ist auch die große Anzahl an Liganden (mehr als 30) begründet. Nilsson et al. zeigten eine Interaktion zwischen ApoA5 und LRP1, welche durch RAP und Heparin zerstört werden kann (Nilsson et al., 2007). Dieses legt die Vermutung nahe, dass ApoA5 mit den vermeintlichen Heparin-Bindungsdomänen, spezifisch mit den *LA repeats* von LRP1 interagiert. In der folgenden Abb. 3 sind der LDLR und das LRP1 dargestellt.

1. Einleitung

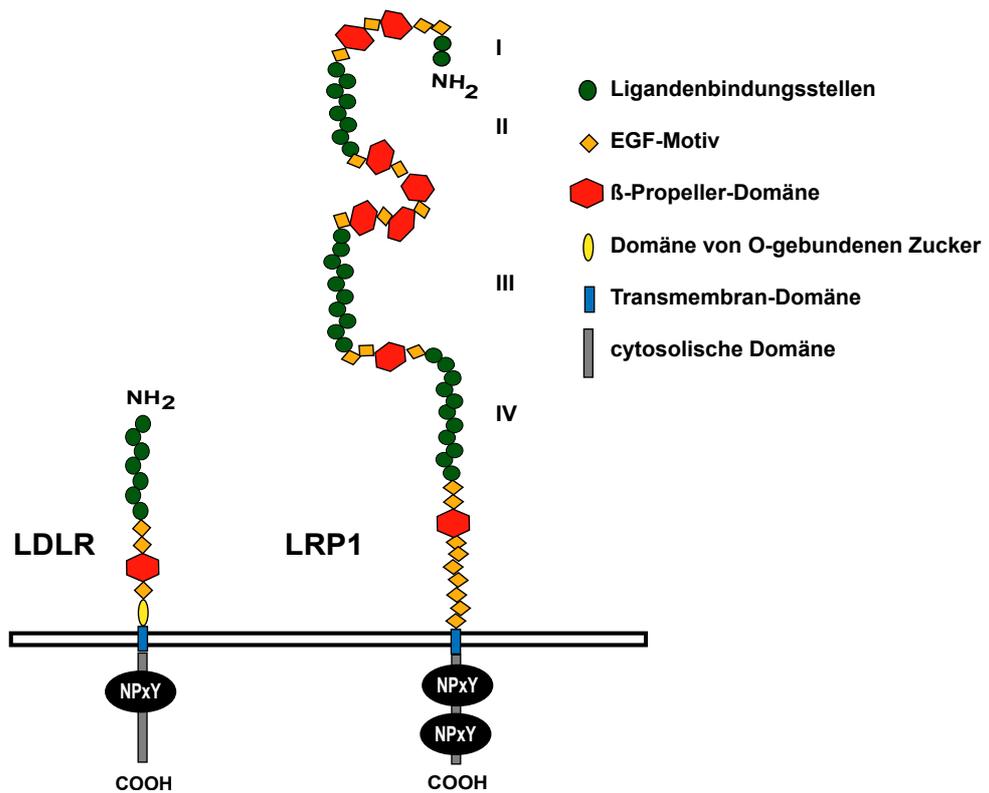


Abb. 3: Ausgewählte Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels

Hier sind zwei wichtige Vertreter der LDL-Rezeptorfamilie dargestellt. Sie alle verbindet ein ähnlicher Aufbau aus wenigen, sich wiederholenden Strukturmotiven, die verschiedene Funktionen erfüllen. Sie stammen alle von einem gemeinsamen Vorläuferprotein ab. (Abkürzungen: LDLR = *low-density lipoprotein receptor*; LRP1 = *LDL receptor-related protein 1*; EGF = *epidermal growth factor*). Diese Abbildung stammt von Lillis et al. und wurde verändert (Lillis et al., 2008).

1.4. Identifizierung und Struktur des ApoA5

Durch vergleichende Sequenzanalysen zwischen Maus und Mensch wurde ein neues Mitglied des ApoA1/C3/A4-Genclusters auf dem Chromosom 11q23, das ApoA5-Gen identifiziert (Pennacchio et al., 2001). Dieses hat einen beeindruckenden Einfluss auf den Triglyzerid-Stoffwechsel. Gleichzeitig entdeckten van der Vliet et al., dass 6 Stunden nach partieller Rattenhepatektomie ein Protein auf mRNA-Ebene und im Plasma auf das dreifache hochreguliert wurde. Dafür wurde zunächst der Name RAP3, *regeneration-associated-protein*, eingeführt (van der Vliet et al., 2001).

Das humane ApoA5-Gen besteht aus vier Exons und drei Introns, hat eine molekulare Masse von 39kDa und codiert ein Protein aus 366 Aminosäuren mit einem 19 Aminosäuren langen N-terminalen Signalpeptid (Alborn et al., 2006; Weinberg et al., 2003), welches ApoA5 zum ER dirigiert. Das murine Genprodukt besteht aus 368 Aminosäuren und ähnelt zu 71 % dem humanen ApoA5. Das Protein gehört zu den austauschbaren Apolipoproteinen und weist strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen dieser Art auf, mit größter Ähnlichkeit zum murinen ApoA4 (Pennacchio et al., 2001). Im N-terminalen Bereich (1-146) liegt ein gefaltetes Helix-Bündel mit hoher Lipidaffinität vor, welches im Gegensatz zum restlichen ApoA5-Gen wasserlöslich ist, wodurch vermutlich der Transfer zwischen Lipoproteinen ermöglicht wird. Innerhalb diesen Bereichs werden bevorzugt kleinere HDL als größere VLDL gebunden (Wong et al., 2008; Wong-Mauldin et al., 2009;). Der Bereich von 186 bis 227 enthält die Rezeptor-Bindungsstellen (Lookene et al., 2005; Nilsson et al., 2007). In diesem Bereich gibt es keine negativ geladenen Reste, sondern arginin- und lysinreiche Sequenzen, welche die Bindung an negativ geladenen Seitenketten von Rezeptoren der LDL-Rezeptor Familie, Heparin/HSPG und GPIHBP1, vermitteln (Lookene et al., 2005; Nilsson et al., 2007; Gin et al., 2007). Mit Hilfen von Komplet-Fragment Deletionsmutanten stellte sich heraus, dass der Bereich von 192 bis 238 essentiell für die LPL-Aktivierung und Lipidbindung ist (Sun et al., 2006). Weiterhin wird das ApoA5-Gen in 6 Bereiche unterteilt, die in der folgenden Abbildung zusammengestellt sind.

1. Einleitung

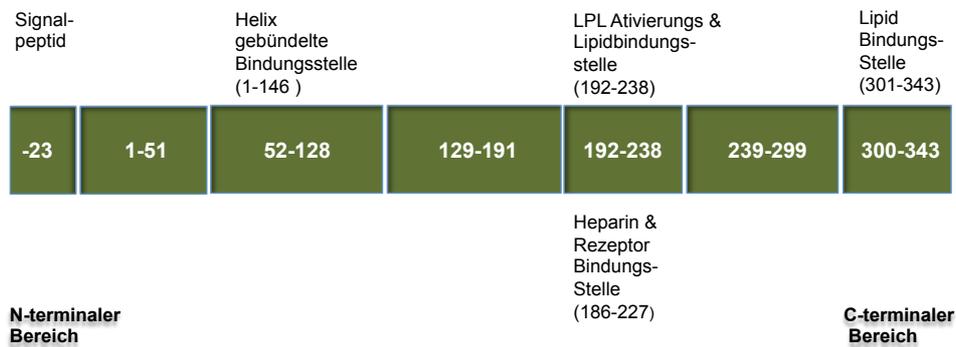


Abb. 4: Struktureller Aufbau von ApoA5

Die Abbildung stammt von Sun et al. und wurde adaptiert (Sun et al., 2006).

Die C-terminale Region bindet mit hoher Affinität Lipide, wie u.a. auch bei ApoA1, und ist dadurch einigermaßen gut wasserlöslich (Beckstead et al., 2007). Das Protein wird in der Leber exprimiert (van der Vliet et al., 2001). Guardiola et al. zeigten weiterhin, dass ApoA5 im Darm, hauptsächlich im Duodenum und Colon, exprimiert wird (Guardiola et al., 2011). Die Leberexpression ist jedoch im Menschen ungefähr 32000-fach höher und in Mäusen 1000-fach höher als die Darmexpression. Mehrere Transkriptionsfaktoren regulieren die ApoA5-Genexpression. Eine Hochregulation der Expression wurde u.a. nachgewiesen für: *peroxisome proliferator-activated receptor α* (PPAR α), *hepatocyte nuclear factor-4 α* (HNF-4 α), *retinoid acid receptor-related orphan receptor α* (ROR α) und *thyroid receptor β* (TR β). PPAR α ist durch den Einsatz von Fibraten aktivierbar, wodurch deutlich der Plasmatriglyzerid-Spiegel gesenkt wird (Kersten and Wahli, 2000; Staels et al., 1995). Daher werden Fibrate häufig in der klinischen Therapie im Falle der Hypertriglyzeridämie eingesetzt. Diese beeinflussen die Expression von im Lipidstoffwechsel beteiligten Genen (Isseman et al., 1993). So wird beispielsweise die Genexpression von LPL hoch- und die von ApoC3 runterreguliert (Schoonjans et al., 1996; Staels et al., 1995). Dementsprechend zeigten Studien mit Fibraten sowohl an humanen als auch an murinen Hepatozyten, dass diese die ApoA5-mRNA stark induzieren (Vu-Dac et al., 2003; Jakel et al., 2004; Prieur et al., 2005b; Prieur et al.,

1. Einleitung

2005a). In weiteren Studien ist auch eine Hochregulation der ApoA5 Darm-Expression durch den Einsatz von PPAR α -Agonisten gezeigt worden (Guardiola et al., 2011). Dagegen reguliert der *liver X receptor ligand* (LXR) die ApoA5-Expression durch eine Aktivierung von SREBP-1c runter. Ein negativer Effekt wurde auch für Insulin und Glucose über *upstream stimulatory factor* (USF1/2) gezeigt (Nowak et al., 2005).

Das ApoA5-Protein liegt als Monomer im Plasma vor, dessen Konzentrationen im Menschen von 24 bis 406 $\mu\text{g/L}$ reichen (O'Brien et al., 2005; Alborn et al., 2006). Verglichen mit anderen Apolipoproteinen, beispielsweise mit ApoA1 und ApoC3, sind diese 50- bzw. 6-fach niedriger. Auf ein ApoA5-Molekül kommen ungefähr 24 VLDL-Partikel (Merkel and Heeren, 2005). ApoA5 ist über einen breiten pH-Bereich (3,5 bis 9) unlöslich, daher liegt dieses extrazellulär gebunden an Lipoproteinen vor, intrazellulär gebunden an der Leberzellmembran (Beckstead et al., 2003) vor. Eine Studie deutet auch auf eine Assoziation zwischen ApoA5 und Lipidtropfen hin (Shu et al., 2007). Im Plasma ist ApoA5 mit HDL, VLDL und CM assoziiert (Alborn et al., 2006; O'Brien et al., 2005), nicht aber mit LDL und IDL. Auf welche Art und Weise ApoA5 ins Plasma sezerniert wird, ist nicht genau geklärt. Es wird angenommen, dass ApoA5 an HDL assoziiert ins Plasma sezerniert wird und dann, wie ApoE, auf TRL transferiert wird. Nach der TRL-Hydrolyse werden folgende zwei Möglichkeiten diskutiert: ApoA5 wird mit *remnants* als Rezeptorligand aufgenommen oder ApoA5 wird erneut auf HDL transferiert, welches als ApoA5-Pool dient. Beide Varianten sind eine Erklärung für die niedrigen ApoA5-Konzentrationen im Plasma.

Die Ergebnisse von Pennacchio et al. in ApoA5-defizienten oder ApoA5-transgenen Tiermodellen lassen darauf schließen, dass ApoA5 einen großen Einfluss auf den Plasmatriglyzerid-Spiegel hat. ApoA5-defiziente Mäuse weisen vierfach höhere Plasmatriglyzerid-Spiegel auf, ApoA5-transgene Mäuse zwei Drittel niedrigere (Pennacchio et al., 2001). Der genaue Mechanismus für den triglyzeridsenkenden Effekt des ApoA5 ist bis heute noch nicht geklärt. Zunächst wurde einer möglichen Interaktion von ApoC3 und ApoA5 nachgegangen. Diese beeinflussen den

1. Einleitung

Triglyzerid-Spiegel entgegengesetzt, weshalb die Hypothese entstand, ApoA5 könnte ApoC3 beeinflussen. Durch Experimente mit Doppel-Ko und Doppel-transgenen Mäusen wurde diese Hypothese jedoch ausgeschlossen (Baroukh et al., 2004). In vitro und in vivo Daten sprechen dafür, dass ApoA5 eine intrazelluläre und extrazelluläre Funktion besitzt. Extrazellulär beschleunigt ApoA5 die LPL-vermittelte Hydrolyse von triglyzeridreichen Partikeln und/oder ApoA5 beschleunigt als Ligand die Rezeptor-vermittelte Endozytose über Lipoprotein-Rezeptoren oder HSPG. Intrazellulär ist ApoA5 an der VLDL-Synthese und/oder -Sekretion beteiligt. Für den Einfluss von ApoA5 auf den extrazellulären Lipidstoffwechsel gibt es viele überzeugende Studien, wohingegen eine intrazelluläre Funktion eher spekulativ ist. Auf die beiden Funktionen wird in den folgenden Kapiteln eingegangen. Die folgende Abb. 5 fasst die Funktionen von ApoA5 zusammen:

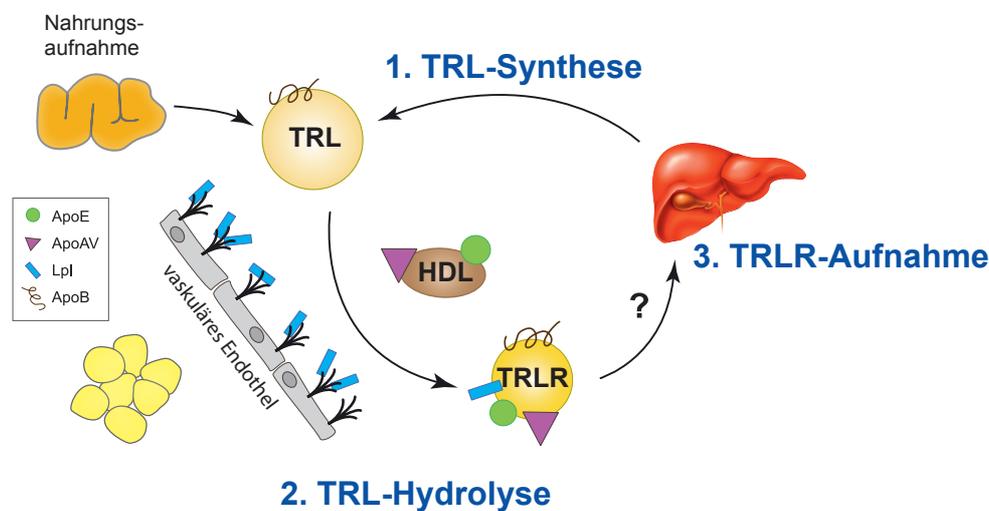


Abb. 5: Überblick über die möglichen Funktionen von ApoA5 im Lipoproteinstoffwechsel

Ein Einfluss von ApoA5 auf die Synthese von TRL (1.) wurde in mehreren Studien ausgeschlossen. Offen ist die Frage, ob ApoA5 die beschleunigte Hydrolyse von Triglyzeriden aus TRL nur durch eine indirekte Aktivierung von LPL (2.) und die damit verbundene schnelle Gewebeaufnahme verursacht, oder ob ApoA5 letzten Endes auch die Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber fördert (3.). (Abkürzungen: TRL= *triglyceride-rich lipoprotein*; TRLR = *triglyceride-rich lipoprotein remnant*; HDL = *high-density lipoprotein*; ApoE = Apolipoprotein E; ApoA5 = Apolipoprotein A5; ApoB = Apolipoprotein B; LPL = Lipoproteinlipase).

1.5. Funktion von ApoA5 im extrazellulären Lipoprotein-Stoffwechsel

In einem Mausmodell mit adenoviralen, überexprimierten ApoA5 bestätigten van der Vliet et al. die triglyzeridsenkende Funktion von ApoA5 (van der Vliet et al., 2002). Die meisten in vivo Studien zeigen eine Interaktion von ApoA5 mit LPL, wodurch letztere aktiviert wird, die Hydrolyse von VLDL und CM in die entsprechenden *remnants* beschleunigt wird und diese anschließend effizienter in die Leber aufgenommen werden (Schaap et al., 2004; Fruchart-Najib et al., 2004; Merkel et al., 2005; Lookene et al., 2005).

Einige Studien wiesen auf eine zunehmende Hydrolyse von VLDL durch freie, nicht an HSPG gebundene LPL, in Anwesenheit nicht-physiologischer Konzentrationen von rekombinantem ApoA5 (600 µg/ml) (Fruchart-Najib et al., 2004; Schaap et al., 2004). In einer weiteren Studie konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden (Lookene et al., 2005). Gleichzeitig fanden sie aber eine Interaktion zwischen ApoA5 und HSPG (AS-Reste 186-227). Merkel et al. zeigten mittels in vitro *assays*, dass ApoA5 nur dann LPL optimal aktivieren kann, wenn diese an HSPG am Endothel gebunden ist (Merkel et al., 2005). Eine Begründung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sein, dass bei unphysiologischen, hohen Konzentrationen ApoA5 unspezifisch hydrophobe Verbindungen eingeht, welche die Hydrolyse erhöhen oder die funktionelle LPL stabilisieren. Weiterhin wurde postuliert, dass ApoA5 am Endothel eine *bridging*-Funktion zwischen TRL und Proteoglykan-gebundener LPL einnimmt, wodurch der lipolytische Komplex stabilisiert und die Hydrolyse beschleunigt wird. Neben der Bindung zwischen ApoA5 und HSPG interagiert ApoA5 auch mit GPIHBP1 (Beigneux et al., 2007), welche auch als LPL-Anker fungieren.

Die VLDL-Produktion sowie die CM-Produktion sind in ApoA5-transgenen Mäusen nicht verlangsamt. Jedoch ist die Verstoffwechslung von VLDL beschleunigt und der postprandiale Triglyzerid-Anstieg verringert (Merkel and Heeren, 2005). In ApoA5-defizienten Mäusen hingegen ist die Hydrolyse von TRL (aus ApoA5-

1. Einleitung

defizienten Tieren isoliert) verlangsamt, da ApoA5-knockout VLDL schlechtere Substrate für LPL darstellen. Weiterhin stellen diese *remnants* schlechtere Rezeptor-Liganden dar (Grosskopf et al., 2005). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine ApoA5-Defizienz und der damit einhergehende erhöhte Triglyzerid-Spiegel durch LPL-Überexpression ausgeglichen werden kann, nicht jedoch umgekehrt (Merkel et al., 2005). Durch die hohen Konzentrationen des Proteins an der Leberzellmembran und durch die Interaktion sowohl mit Heparin (Lookene et al., 2005) als auch mit GPIHBP1 (Beigneux et al., 2007), kann vermutet werden, dass ApoA5 ein Ligand für Lipoprotein-Rezeptoren darstellt und an der Lipoprotein-Aufnahme beteiligt ist. Shu et al. zeigten in ApoA5-Ko-Mäusen, dass die Hypertriglyzeridämie durch die Injektion von rekombinanten ApoA5-enthaltenen HDL-Partikeln reversibel ist. Interessanterweise ist diese aber nicht reversibel in ApoA5-Ko-Mäusen mit zusätzlichem GPIHBP1-Knockout (Shu et al., 2010b).

In anderen Studien wurden mögliche Interaktionen von ApoA5 mit Mitgliedern der LDL-Rezeptor Familie untersucht (Nilsson et al., 2007). Demnach interagiert ApoA5 mit LRP1, LDL-Rezeptor und SorLa. Die Rezeptor-Bindungsstellen überlappen teilweise mit denen für HSPG, und die Bindung ist Calcium-abhängig. Diese Calcium-Abhängigkeit ist für Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie allgemein bekannt. Die Bindung zwischen ApoA5 und LRP1 kann durch RAP und Heparin zerstört werden, was die Vermutung nahe legt, dass ApoA5 mit den vermeintlichen Heparin-Bindungsdomänen, spezifisch mit den *LA repeats* von LRP1 und SorLa, interagiert. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Dichlberger et al. auch im Huhn die Rezeptorbindungseigenschaft von ApoA5 zeigen, nämlich zu dem zur LDL-Rezeptor Familie gehörenden LR8 (Dichlberger et al., 2007). Dieser gehört zur LDL-Rezeptor-Familie und ist zum menschlichen VLDL-Rezeptor homolog.

Es bleibt zu klären, ob ApoA5 die erhöhte Spaltung von Triglyzeriden aus TRL nur durch eine indirekte Aktivierung von LPL und die damit verbundene schnelle Gewebeaufnahme verursacht, oder ob ApoA5 letzten Endes auch die Aufnahme von Lipoproteinen in die Leber fördert (s. Abb. 6).

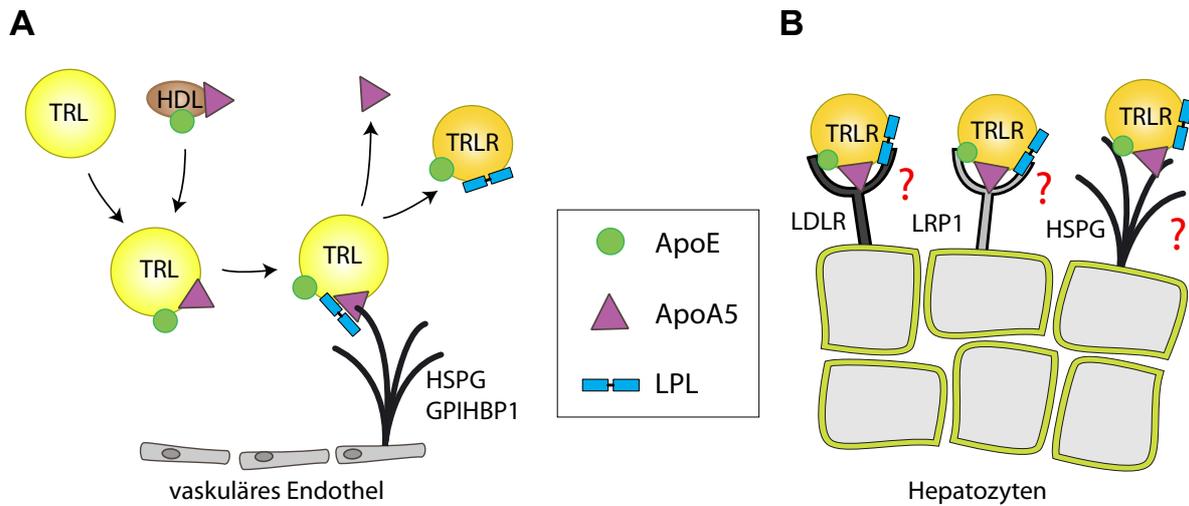


Abb. 6: Extrazelluläre Mechanismen von ApoA5

Ein beschleunigter TRL-Stoffwechsel durch ApoA5 ist in zahlreichen Studien belegt worden (**A**). Ob ApoA5 auch die *remnant*-Aufnahme über Lipoprotein-Rezeptoren vermittelt bleibt zu klären (**B**). (Abkürzungen: TRL= *triglyceride-rich lipoprotein*; TRLR= *triglyceride-rich lipoprotein remnant*; HDL = *high-density lipoprotein*; ApoE = Apolipoprotein E; ApoA5= Apolipoprotein A5; LDLR = *low-density lipoprotein receptor*; LRP1 = *LDL receptor-related protein 1*; HSPG= Heparansulfat-Proteoglykan; GPIHBP1 = *Glycosylphosphatidylinositol anchored high-density lipoprotein binding 1*).

1.6. Funktion des ApoA5 in der Leber

Trotz kontroverser Studien wird ebenfalls eine intrazelluläre Funktion von ApoA5 postuliert. ApoA5 wird kaum ins Plasma sekretiert, am ER verbleibend könnte die Hauptaufgabe von ApoA5 darin bestehen, die ApoB100-Lipidierung zu modifizieren. Gestützt wird die Hypothese einer hemmenden Rolle im VLDL-Zusammenbau durch die geringe Löslichkeit (pH-Wert: 3,5 bis 9), die starke Hydrophobizität, die vielen α -helikalen Strukturen, die hohe Affinität, die geringe Elastizität und die langsame Bindungskinetik an hydrophoben Grenzschichten (Weinberg et al., 2003; Olofsson, 2005). Neben dem ApoA5-Einfluss auf die Plasma-Hydrolyse von TRL zeigten Schaap et al. in ihrer Studie mit adenoviralen-überexprimierten ApoA5 weiterhin eine Inhibition der intrahepatischen Lipidierung

1. Einleitung

von ApoB100 bei unbeeinflusster Partikelanzahl (Schaap et al., 2004). In Studien mit ApoA5-transgenen und mit ApoA5-knockout Mäusen wurde gezeigt, dass ApoA5 keinen Einfluss auf die VLDL-Sekretion in Mäusen hat.

Shu et al. zeigten 2007 in Immunfluoreszenzen, dass ApoA5 nicht mit ApoB kolokalisiert, weshalb ein Effekt auf die ApoB-Lipidierung auszuschließen ist. Dieses wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie bestätigt (Blade et al., 2011). Es wurde jedoch eine Assoziation zwischen ApoA5 und intrazellulären Lipidtropfen sowohl in vitro (Shu et al., 2007) als auch in vivo (Shu et al., 2010a) gezeigt. Diese Lipidtropfen stellen einen Speicher für Lipide dar, insbesondere für Triglyzeride, die für die VLDL-Synthese benutzt werden. ApoA5 könnte die Anhäufung von intrazellulären Triglyzeriden und/oder die Lipidtropfen-Bildung erleichtern. Gleichzeitig können die Lipidtropfen auch ein Speicher für das hydrophobe ApoA5 sein, um durch diese Assoziation einen ApoA5-Abbau zu verhindern. Interessanterweise ist der Gehalt an Triglyzeriden in der Leber von ApoA5-transgenen Mäusen höher als der von ApoA5-defizienten Mäusen (Shu et al., 2010a).

1.7. ApoA5 und die Entstehung von metabolischen Krankheiten

Kardiovaskuläre Krankheiten sind eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Erhöhte Triglyzeridwerte stellen dabei einen unabhängigen Risikofaktor dar (Hokanson and Austin, 1996; Hokanson, 2002; Malloy and Kane, 2001; Breslow, 2000).

Für das ApoA1/C3/A4 Gencluster ist bereits ein Zusammenhang mit Hyperlipidämie, besonders für Hypertriglyzeridämie ($Tg > 1000 \text{ mg/dl}$) und Atherosklerose bekannt (Ordovas et al., 1991; Groenendijk et al., 2001; Mar et al., 2004). Neben diesen genetischen Faktoren spielen aber auch Umweltfaktoren wie Alter, Ernährung, Konsum von Tabak und Alkohol, körperliche Inaktivität, u.ä. eine Rolle. Bis heute sind verschiedene Punktmutationen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) im ApoA5-Gen beschrieben und es wurden verschiedene Haplotypen, Kombinationen von Punktmutationen, des ApoA5-Gens definiert (Pennacchio et al.,

1. Einleitung

2002; Talmud et al., 2002; Olivier et al., 2004; Wang et al., 2004). Deren pathologische Auswirkungen auf das Lipidprofil wurde in verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht. Es besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Polymorphismen des ApoA5-Gens und den Plasmalipidspiegeln sowohl in gesunden als auch in dyslipidämischen Menschen (Aouizerat et al., 2003; Baum et al., 2003; Eichenbaum-Voline et al., 2004; Hubacek et al., 2004; Kao et al., 2003; Choi et al., 2007; Schaap et al., 2006; Pennacchio et al., 2001; Endo et al., 2002; Ribalta et al., 2002; Horinek et al., 2003; Brito et al., 2011; Pisciotta et al., 2011). Damit nimmt ApoA5 auch im Menschen eine entscheidende Rolle in der Regulation des Triglyzerid-Stoffwechsel ein, wobei letzterer auch mit der Genese der Atherosklerose verbunden ist. Homozygote Individuen mit Mutationen, die zur ApoA5-Defizienz führen, zeigen eine ernste Form der Hypertriglyzeridämie (z.B. p.Q97X, p.Q139X and p.Q148X) ähnlich zu Patienten mit einer LPL-Defizienz (Priore Oliva et al., 2005; Marcais et al., 2005; Priore Oliva et al., 2006). In einigen epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen bestimmten Varianten des ApoA5-Gens und einem erhöhten Herzinfarkt-Risiko gezeigt (Yuan et al., 2011; Laurila et al., 2010; Hsu et al., 2006; Tang et al., 2006; Lai et al., 2004; Szalai et al., 2004; Talmud et al., 2004). Andere Studien konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Park et al., 2010; Dallongeville et al., 2006; Vaessen et al., 2006). Viele Gene des Lipidstoffwechsels zeigen bedeutende Gen-Diät-Interaktionen (Corella and Ordovas, 2005), was auch für das ApoA5-Gen in mehreren Studien gefunden wurde (Elosua et al., 2006; Kim et al., 2006). In der Framingham Heart Studie wurde ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von mehrfach ungesättigten Fetten und dem Plasmalipidspiegel in verschiedenen Trägern von ApoA5-Mutationen untersucht. Die Träger einer bestimmten ApoA5-Variante (-1131T→C SNP) zeigten im Vergleich zu den nicht-Trägern dieser Variante höhere Plasmatriglyzerid-Spiegel (Lai et al., 2006). Des Weiteren wurde in der Framingham Heart Studie das Zusammenspiel von ApoA5-Mutationen während einer Hochfettdiät und dem Körpergewicht untersucht (Corella et al., 2007). Bei den homozygoten Trägern der ApoA5-Variante -1131T→C SNP wurde verglichen mit

1. Einleitung

nicht-Trägern ein erhöhter Anstieg des Body-Mass-Index (BMI) während einer Hochfettdiät nachgewiesen. In einer weiteren Studie stellte sich heraus, dass übergewichtige, hyperlipämische Träger des -1131T→C SNP während einer dreimonatigen Fettrestriktion bessere Ergebnisse zeigten als die Kontrollpersonen (Aberle et al., 2005). Durch die Hochregulation der ApoA5-Genexpression durch PPAR α -Agonisten wird vermutet, dass ApoA5 bei der Triglyzerid-senkenden Wirkung von Fibraten mitwirkt. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Träger von bestimmten Mutationen im ApoA5-Gen, u.a. Träger des -1131T>C ApoA5 SNP, deutlich besser auf eine Fibrattherapie ansprachen als Wildtypträger (Cardona et al., 2009; Lai et al., 2007).

Die genetischen Varianten im ApoA5-Locus könnten als Indikator für HTG eine wichtige klinische Bedeutung einnehmen und durch Veränderung von ApoA5 möglicherweise zur Reduzierung dieses Risikofaktors von koronaren Herzkrankheiten (KHK) beitragen. Im Gegensatz dazu stellen die ApoA5-Plasmakonzentrationen eine weniger wichtige klinische Bedeutung für die Erkennung von Diabetes oder von KHK dar, da diese, wie Plasmatriglyzerid-Spiegel sehr variabel sind. Interessanterweise weisen die Plasmakonzentrationen und Plasmatriglyzerid-Spiegel im Menschen und Mäusen wider erwarten eine positive Korrelation von Plasma-ApoA5 und Triglyzerid-Spiegeln auf (Zhao et al., 2007; Henneman et al., 2007; Kahri et al., 2007; Dallinga-Thie et al., 2006; Pruneta-Deloche et al., 2005; Talmud et al., 2006; Vaessen et al., 2009), wohingegen in ApoA5-transgenen Mäusen eine negative Korrelation besteht (Nelbach et al., 2008). ApoA5-transgene Mäuse mit einer gleichzeitigen Defizienz des murinen ApoA5-Gens zeigen wiederum eine positive Korrelation. Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass ApoA5 auch beim Menschen eine wichtige Funktion bei der Tg-Konzentration im Plasma hat. Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch bislang nicht geklärt. Insbesondere die Rolle von ApoA5 in der Leber für den Stoffwechsel der TRL war zu Beginn dieser Promotionsarbeit unklar.

2. Ziel der Arbeit

Bei der Entwicklung der Atherosklerose spielen Veränderungen im Lipoprotein-Stoffwechsel eine essentielle Rolle. Unter anderem gelten erhöhte Triglyzeridwerte (Hypertriglyzeridämie) als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheiten. Das Apolipoprotein A5 (ApoA5) konnte sowohl im Menschen als auch in Mausmodellen als entscheidender Regulator für die Triglyzerid-Spiegel im Plasma identifiziert werden. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass ApoA5 die Hydrolyse von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) beschleunigt, indem es die Lipoproteinlipase (LPL) stimuliert. Daneben bindet ApoA5 spezifisch an die Ligandenbindungs-Domäne von LDLR-Familienmitgliedern. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass ApoA5, wie das Apolipoprotein E (ApoE), die Aufnahme von atherogenen triglyzeridreichen *remnants* in die Leber beschleunigen könnte.

Ziel dieser Arbeit ist es den Mechanismus des Triglyzerid-senkenden Effekts von ApoA5 weiter aufzuklären und mögliche Interaktionen zwischen ApoA5 und den hepatischen Lipoprotein-Rezeptoren, *low-density lipoprotein receptor* (LDLR) und *LDLR-related protein 1* (LRP1), *in vivo* zu untersuchen.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung sollen drei genetisch veränderte Mausmodelle untersucht werden. Es sollen Mäuse, die neben dem murinen das humane ApoA5-Gen exprimieren, gekreuzt werden mit Mäusen auf einem LDLR-defizienten, einem leberspezifischen LRP1-defizienten, sowie auf einem LDLR/LRP1-defizienten Hintergrund. Mittels FPLC-Läufen und Dichtegradienten-Ultrazentrifugation sollen die Lipidprofile dieser Mausmodelle charakterisiert werden. Außerdem sollen metabolische Abbau- und Aufnahmestudien mit radioaktiv-markierten Lipoproteinen Aufschluss über die Bedeutung des jeweiligen Lipoprotein-Rezeptors für ApoA5 geben. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollen Studien mit primären Hepatozyten aus den verschiedenen Mausmodellen Antworten bezüglich der ApoA5-Sekretion und -Aufnahme geben.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Geräte, Lösungen und die Methoden aufgelistet. Alle nicht näher angegebenen biochemischen Reagenzien stammen von der Firma Sigma-Aldrich (USA).

3.1. Verbrauchsmaterial & Geräte

Verbrauchsmaterialien

β-Counter-Röhrchen	Perkin Elmer
Collagen-beschichteten 12-well Platten	Nunc
Heparinisierte Hämatokritkapillaren	Hirschmann
Mikrotiterplatten (96well-Format)	Nunc
Microvette CB-300 Kalium-EDTA	Sarstedt
Maxisorp-Immuno Moduls Mikrotiterstreifen mit Rahmen	Nunc
PCR-Tubes	Corning Inc.
Petrischalen	Nunc
Spritzen	BD discardit II
Starkwandige Reagenzgläser	Francke
Verschließbare Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zentrifugationsröhrchen	Beckmann

Geräte

ABI Prism, 7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Ätka FPLC-Apparatur	GE Healthcare
Betacounter Wallac 1409	Perkin Elmer
Biotrak Plate Reader und Software Biochrom Data Capture	GE Healthcare

3. Material und Methoden

CASY Cell Counter + Analyser System Model TT	Schärfe System
CO ₂ -Brutschrank	Binder
Elektrophoresekammer	Biorad
Konfokales Mikroskop, LSM 510 Meta	Zeiss
Hamiltonspritze	Kloehn Co, Inc.
Mikrotiterplattenlesegerät Biotrak II	Amersham Biosciences
Nanodrop	Peqlab
Operationsbesteck	Aesculap
Superose-6-Säule	Pharmacia LKB
sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus
T3 Thermocycler	Biometra
Tissue Lyser	Quiagen
Videodokumentationsgerät für Agarosegel	Intas

Kits

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
NucleoSpin RNA II	Macherey und Nagel

Sonstiges

GARPO (Peroxidase gekoppelte Ziege anti Kanninchen IgG); Verdünnung 1:60000	Jackson Immuno Research
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 10 mg/ml	Gräub
Rompun 2 %	Bayer Vital

3. Material und Methoden

TaqMan-Sonden

hApoA5: Assay ID Hs00364830_m1, Context Sequenz: CGCGAGCCCGCGACCCTGAAAGACA

mApoa5: Assay ID Mm00475480_m1, Context Sequenz: GAAGCTGGCACAGGAGAACCTGAAA

mApoc3: Assay ID Mm00445670_m1, Context Sequenz: TGTGGTGGCCAGGGGCTGGATGGAC

mApoe: Assay ID Mm00437573_m1, Context Sequenz: CACACAAGAACTGACGGCACTGATG

mFasn: Assay ID Mm00662319_m1, Context Sequenz: GTGGATGGAGGTATCAACCCAGCCT

mGlut4: Assay ID Mm00436615_m1, Context Sequenz: TCTGCTGCTGCTGGAACGGGTCCA

mLrp1: Assay ID Mm00464608_m1, Context Sequenz: TCACCTGCTTGGCGAACCCATCCTA

mLpl: Assay ID Mm00434764_m1, Context Sequenz ATCCATGGATGGACGGTAACGGGAA

mSrebp1: Assay ID Mm00550338_m1, Context Sequenz: CGACATCGAAGACATGCTCCAGCTC

mSrebp2: Assay ID Mm01306292_m1, Context Sequenz: GGACATCGACGAGATGCTACAGTTT

Alle Sonden stammen von der Firma Applied Biosystems.

3.2. Pufferlösungen

Dichtelösungen (1,006; 1063; 1,019; 1,21 g/cm³)

10 mM EDTA

0,9 % NaCl

10 mM Tris

pH= 8,6 sowie KBr für die Einstellung der entsprechenden Dichte

Entwicklungslösung für ELISA

25 ml H₂O

1 ml Substratpuffer

1 ml H₂O₂ 0,2 %

1 ml TMB 0,3 %

0,3 % Tetramethylbenzidin (TMB)

0,75 g TMB

in 250 ml 0,2 M Malonsäure im Dunkeln lösen

0,2 M Malonsäure

20,81 g Malonsäure in 1 L H₂O;

Nach 2-Wochen die Lösung vorsichtig vom Präzipitat abdekantieren.

3. Material und Methoden

FPLC-Puffer

1 mM Tris-HCl

10 mM NaCl

1 mM EDTA pH = 8,0

in 1 L Aqua dest.

Lowry-Proteinbestimmung

Lösung A (2 % Na₂CO₃, 0,02 % NaK-Tartrat in 0,1 M NaOH)

Lösung B (0,5 % CuSO₄, 5 % SDS in dest. H₂O)

Lösung C (Lösung A zu B in Verhältnis 49:1)

Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, Verdünnung 1:2 mit H₂O

Narkoselösung

2,3 ml Rompun 2 %

1 ml Ketanest 10 mg/ml

6,7 ml NaCl-Lösung 0,9 %

Phosphate buffered Saline (PBS)

8 g/L NaCl

0,2 g/L KCl

0,24 g/L KH₂PO₄

1,44 g/L Na₂HPO₄ * 2H₂O

3. Material und Methoden

Perfusionspuffer

100 ml Stockperfusionspuffer

2,1 g/L NaHCO₃

0,745 g/L EDTA

2,970 g/L Glucose

0,846 g/L Lactat

0,022 g/L Pyruvat

Phosphatase- und Protease-Inhibitor Zellysepuffer

50 mM HEPES

100 mM NaCl

50 mM NaF

2 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

2 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic)

5 mM β -Glycerophosphat

1 mM Na₃VO₄ (Natriumvanadat)

1 % Triton

Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 1Tablette/10ml

3. Material und Methoden

Substratpuffer für ELISA

1,3 M Malonsäure

0,6 M Natrium-Acetat

1,11 M NaOH

Nach 2-Wochen die Lösung vorsichtig vom Präzipitat abdekantieren

Stockperfusionspuffer (10×) pH =7,4

81,1 g/L NaCl

3,73 g/L KCL

1,63 g/L MgCl₂* 6 H₂O

2,85 g/L Na₂HPO₄

0,543 g/L KH₂PO₄

TBE-Puffer (10*) pH = 8,0

108 g/L Trisbase

55 g/L Borsäure

40 ml/L 0,5 M EDTA

Waschpuffer für ELISA

PBS

0,02 % Tween20

3.3. Nahrung und Mauslinien

Für alle durchgeführten Tierexperimente bestand die Genehmigung des Tierschutzkomitees des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) und der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg. Die Mäuse wurden in spezifisch pathogenfreien Räumen der Versuchstierhaltung des UKE unter 12h-Tag/Nacht-Zyklus Bedingungen gehalten. Die Tiere wurden mit dem Standardfutter V1536-000 ssniff R7M-H Extrudat gefüttert.

Für diese Studie wurden ApoA5-transgene (A5Tr, +/T) und Wildtyp-Mäuse (A5Wt, +/+) von Genome Sciences Department, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, USA bezogen. Zur Untersuchung der möglichen Interaktion zwischen ApoA5 und Lipoprotein-Rezeptoren wurden oben genannte Tiere mit Mäusen mit einer LDLR-Defizienz und mit Mäusen mit einer konditionalen LRP1-Defizienz in der Leber gekreuzt. Wegen der kompensatorischen Hochregulation des LDLR in Abwesenheit des hepatischen LRP1 wurden die ApoA5-transgenen Mäuse mit Tieren gekreuzt, die einen semi-konditionalen Doppel-Knockout des LDLR und einen zusätzlichen Funktionsverlust von leberspezifischen LRP1 aufweisen. Die leberspezifischen LRP1-Knockout Mäuse wurden mit Hilfe des cre/loxP Systems regeneriert, wofür zwei genetisch veränderte Mauslinien benötigt wurden, nämlich eine homozygot gefloxtete Maus und eine gewebespezifische cre-transgene Maus. Generell wird bei dem konditionalen Knockout mittels des cre/loxP Systems mit Hilfe der cre-Rekombinase (*cyclisation recombination*) des Bakteriophagen P1 die Rekombination zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Erkennungssequenzen katalysiert. Innerhalb dieser Sequenzen liegt dann das sogenannte gefloxtete DNA-Fragment, in diesem Fall LRP1, welches durch die cre-Rekombinase in Form eines zirkulären Produktes herausgeschnitten werden soll. Diese gefloxtete Maus unterscheidet sich phänotypisch nicht vom Wildtyp. Zur Herstellung einer gewebespezifischen cre-Maus wird ein cre-Transgen ins Mausgenom integriert, welches unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors, z.B. Albumin, steht. Damit wird die cre-Rekombinase selektiv in spezifischen Zelltypen exprimiert. Durch Kreuzung dieser zwei Mauslinien entstehen Mäuse mit einer cre/loxP

3. Material und Methoden

vermittelten leberspezifischen LRP1-Deletion. Das Prinzip des cre/loxP-Systems ist in der Abb. 7 dargestellt. Für diese Studie wurden diese Mäuse zusätzlich noch mit ApoA5-transgenen Mäusen gekreuzt. Entsprechend der Mendelschen Regeln trugen ungefähr 50% das ApoA5-Transgen und die anderen 50% das ApoA5-Wildtyp Genom. Von diesen jeweiligen 50% zeigten noch 25% einen leberspezifischen LRP1-Knockout, die anderen 25% trugen das zwar geflochte, aber funktionsfähige LRP1-Gen.

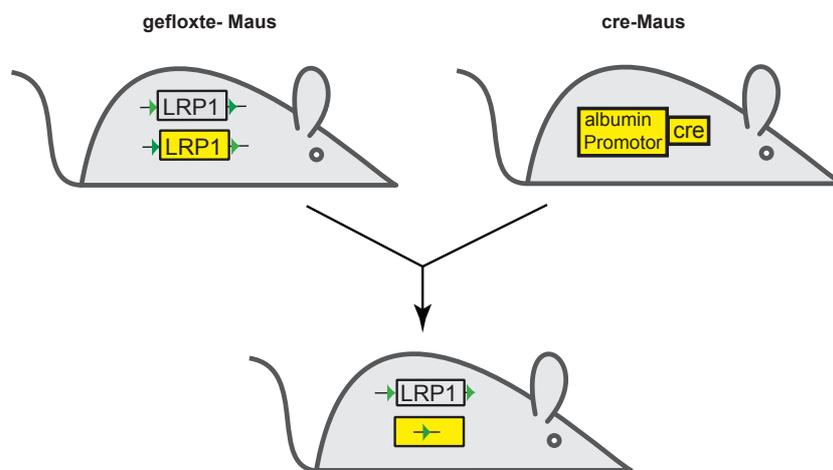


Abb. 7: Prinzip des cre/loxP-Systems

Zur gewebespezifischen LRP1-Deletion wird eine geflochte Maus (grünes Dreieck = LoxP-Sequenzen, gelbes Viereck = Exon) mit einer gewebespezifischen cre-Maus verpaart. Die Expression von der cre-Rekombinase ist durch einen gewebespezifischen Promotor gesteuert und das Exon wird nur in den Promotor-aktiven Zellen (gelb) herausgeschnitten.

3.4. Methoden

3.4.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde die DNA aus einer ca. 0,5cm großen Schwanzbiopsie in DirectPCR® Lysis Reagent-Tail (Viagen) und 10µl Proteinase K (Roche Diagnostics) isoliert. Nach 4h bei 55°C war das Gewebe lysiert und die Reaktion wurde durch eine anschließende 45-minütigen Inkubation bei 86°C gestoppt.

3. Material und Methoden

Die DNA konnte nun auf die je nach Mauslinien spezifischen Basenfragmenten mit einer Polymerasenkettenreaktion (PCR) untersucht werden. Dafür wurde eine Reaktionslösung bestehend aus 10×PCR-Puffer (Roche), Aqua ad injectabilia (Braun), DMSO, MgCl₂, dNTPs (Invitrogen Life Technologies), Primern (MWG Biotech AG), Taq-Polymerase (Invitrogen Life Technologies) und DNA-Probe (s. Tabelle 2) angesetzt.

Reagenzien	ApoA5Tr	LDLR	LRP1flox	cre
Wasser	18,5 µl	10,5 µl	7,6 µl	17,5 µl
10×PCR-Puffer Green	2,5 µl	2,5 µl	1,3 µl	2,5 µl
DMSO	1 µl	1 µl	-	1 µl
25 mM MgCl ₂	0,5 µl	1 µl	0,5 µl	0,5 µl
10 pmol dNTPs	0,5 µl	1 µl	0,5 µl	0,5 µl
10 µM je Primer	0,5 µl	2 µl	0,5 µl	2 µl
5 U/µl Taq-Polymerase	0,03 µl	0,03 µl	0,1 µl	0,03 µl
DNA	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl

Tabelle 2: PCR-Reaktionsansätze

Von den PCR-Produkten wurden 12 µl und ein 100bp Marker der Firma Invitrogen Life Technologies, in einem Ethidiumbromid-enthaltenen 1,5%igen Agarosegel (Lonza) bei einer Spannung von 100V 60min aufgetrennt und die entsprechenden Banden auf einem UV-Tisch (Intas) detektiert (s. Abb. 8).

a) ApoA5-Transgen PCR

Zur Bestimmung des ApoA5-Transgens wurde eine 2-Primer-PCR nach unten stehendem Protokoll durchgeführt. Für das entsprechende Gen wurden zunächst folgende Primersequenzen konzipiert (MWG Biotech AG):

3. Material und Methoden

ApoA5Tr1 5'-CCC GCT GCA GTC CCC AGA AT-3'

ApoA5Tr2 5'-CAG GGT CGA GGG CTC TTG TCC T-3'

Die Proben wurden zunächst 3 min bei 95°C denaturiert und dann folgten 35 Zyklen a 25sec Denaturierung bei 95°C, 40sec Annealing bei 55°C, 20sec Elongation bei 72°C. Die Primer amplifizierten bei 526bp eine Bande, die dem ApoA5 Wildtyp-Allel (+/+), und bei 614bp die dem transgenen Allel (+/T) entsprach.

b) LDL-Rezeptor PCR

Zur Bestimmung des LDL-Rezeptor-Knockouts wurde eine 4-Primer-PCR verwendet. Für das entsprechende Gen wurden zunächst die unten stehenden Primersequenzen konzipiert (MWG Biotech AG):

LR46 5'-ACC CCA AGA CGT GCT CCC AGG ATG-3'

LR59 5'-CGC AGT GCT CCT CAT CTG ACT TGT-3'

LR60 5'-CGC AGT GCT CCT CAT CTG ACT TGT-3'

LR61 5'-GAG CGG CGA TAC CGT AAA GCA CGA -3'

Das PCR-Protokoll bestand aus einer initialen Denaturierung von 5min bei 95°C. Dann folgten 40 Zyklen, bestehend aus 30sec bei 95°C, 60sec bei 62°C und 30sec bei 72°C. Durch die Primer entstand bei einem LDLR-Wildtyp-Allel ein Fragment von einer Größe von 383bp und für das Ko-Allel eines von 200bp.

c) LRP1flox PCR

Zur Bestimmung des geflochten LRP1-Gens wurde eine 2-Primer-PCR verwendet. Für das entsprechende Gen wurden zunächst die unten stehenden Primersequenzen konzipiert (MWG Biotech AG):

LRP1 5'- CAT ACC CTC TTC AAA CCC CTT CCT G-3'

LRP2 5'- GCA AGC TCT CCT GCT CAG ACC TGG A-3'

3. Material und Methoden

Als erstes wurden die Proben 1 min bei 95°C denaturiert, danach schlossen sich 35 Zyklen an a 30s bei 95°C, 30s bei 65°C und 40s bei 72°C.

Durch die Primer entstand beim LRP1-Wildtyps (+/+) ein 290bp großes Fragment und in Gegenwart des geflochten LRP1-Gens (d/d) ein 350bp großes Fragment.

d) cre-Rekombinase PCR

Zur Bestimmung des cre-Rekombinase-Transgens wurde eine 2-Primer-PCR verwendet. Für das entsprechende Gen wurden zunächst die unten stehenden Primersequenzen konzipiert (MWG Biotech AG):

creAlb-for 5'- GCA CTG ATT TCG ACC AGG TT-3'

creAlb-rev 5' - CCC GGC AAA ACA GGT AGT TA - 3'

Das PCR-Protokoll bestand aus einer initialen Denaturierung von 3 min bei 95°C. Dann folgten 32 Zyklen, bestehend aus 30sec bei 95°C, 30sec bei 58°C und 30sec bei 72°C.

Die Primer amplifizierten eine Bande von 300bp in Gegenwart des cre-Transgens (cre+).

3. Material und Methoden

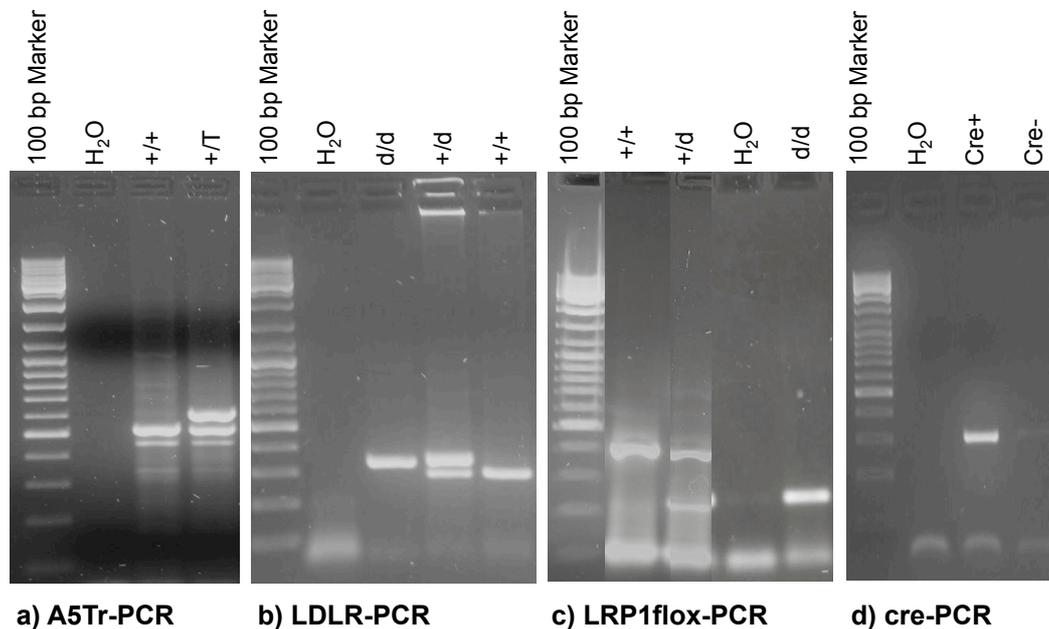


Abb. 8: Videodokumentation von PCR-Produkten in Agarose-Gelen

12 µl von PCR-Produkte wurden in einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt. **a)** Die A5Tr-Primer amplifizierten eine Bande, die bei 526 bp dem ApoA5 Wildtyp-Allel (+/+), und bei 614 bp dem transgenen Allel (+/T) entspricht. **b)** Durch die spezifischen Primer für das LDLR-Gen entstand bei einem LDLR-Wildtyp-Allel ein Fragment mit einer Größe von 383 bp und für das Ko-Allel eines von 200 bp. **c)** Bei der LRP1-flox PCR entstanden als mögliche Produkte ein 290 bp großes Fragment für den LRP1-Wildtyp (+/+) und ein 350 bp großes Fragment in Gegenwart des geflochten LRP1-Gens (d/d). **d)** Bei der PCR für das cre-Rekombinase-Gen amplifizierten die Primer eine Bande von 300 bp in Gegenwart des cre-Transgens (cre+).

3.4.2 Blutabnahme und Erstellung des Lipoproteinprofils

Die Tiere wurden 4 h vor der Blutabnahme gefastet. Bei Blutabnahmen von mehr als 100 µl Blut wurden zur Antikoagulation 2 µl 0,5 M EDTA pH = 8,0 dazu pipettiert. Das Plasma wurde mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 10000 rpm von den korpuskulären Bestandteilen getrennt und abgenommen. Lipoproteine sind entsprechend ihrer Größe durch *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) (Ätka FPLC-Apparatur, GE Healthcare) auftrennbar. Es wurden 300 µl Plasma, 1:2 verdünnt in PBS, einer Gelfiltration mit einer Superose-6-Säule (Pharmacia LKB) unterzogen und zu je 500 µl fraktioniert. In den so erhaltenen FPLC-Fractionen

3. Material und Methoden

erfolgte die Bestimmung der Lipidparameter (Cholesterol, Triglyzeride), um ein Lipidprofil zu erstellen. Weiterhin wurde die ApoA5-Konzentration mittels ELISA (s. Abschnitt 3.5.) bestimmt.

Alternativ zur FPLC wurde das Lipoproteinprofil mit Hilfe einer sequentiellen Ultrazentrifugation in einer Ultrazentrifuge der Firma Beckmann erstellt. Dafür wurden 60 µl PBS in einem Zentrifugationsröhrchen (Beckmann Coulter) vorgelegt und 60 µl Plasma mit einer Hamilton-Spritze unterschichtet. Dann erfolgte eine Zentrifugation mit dem für die Ultrazentrifugationsröhrchen passenden Rotor LP 42T1 für 2,5 h bei 38000 rpm. Nach diesem Schritt befand sich die VLDL-Fraktion in den oberen 60 µl und wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Der Rest wurde nun mit 60 µl einer Dichtelösung der Dichte 1,12 g/ml in ein neues Zentrifugationsröhrchen (Beckmann Coulter) überführt. Dann erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 38000 rpm bei 4 °C für 6 h und anschließend ergab sich im Zentrifugationsröhrchen folgendes Bild: In den oberen 60 µl befanden sich die LDL- und IDL-Fraktion, in den unteren 60 µl die HDL-Fraktion. Zuerst wurde mit einer Hamilton-Spritze die untere, dann die obere Phase abgenommen und anschließend der Triglyzerid- und Cholesterolgehalt (s. Abschnitt 3.4.3) in den einzelnen Fraktionen bestimmt.

3.4.3 Triglyzerid- und Cholesterol-Bestimmung

Die Bestimmung von Cholesterol und Triglyzeriden im Plasma wurde mit kommerziellen Kits (Roche) durchgeführt. Bei diesem enzymatischen Test werden die im Plasma vorhandenen Cholesterolester zu Cholesterol und freien Fettsäuren hydrolysiert, die Triglyzeride zu Glycerin und freien Fettsäuren. Auf diese Reaktion folgen weitere, die zur Entstehung eines Farbstoffs führen, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm messbar und proportional zur vorhanden Cholesterol- bzw. Triglyzeridkonzentration ist.

3. Material und Methoden

Für die Mauslinien wurden vorher folgende Verdünnungen in PBS angesetzt:

	Tg	Chol
LDLRKo A5Tr	1:30	1:60
LRP1flox A5Tr	1:20	1:40
LDLRKo/LRP1flox A5Tr	1:40	1:80

Tabelle 3: Verdünnungen von Plasmen von gefasteten Mäusen.

Von den Verdünnungen und der jeweiligen Standardreihe wurden 100 µl in eine Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 200 µl Cholesterin- bzw. Triglyzeridreagenz versetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C die Extinktion gemessen.

3.4.4 ApoA5-ELISA

Die Konzentration des Apolipoprotein A5 wurde mit einem im Labor Beisiegel entwickelten ELISA gemessen. Dabei wurden 100 µl Plasmen oder Zellkulturüberstände, welche vorher entsprechend in Chaps/BSA-PBS-Puffer verdünnt werden mussten, in die Maxisorp-Streifen pipettiert und für 1,5h bei 37°C an diese gebunden. Nach viermaligem Waschen mit dem Wasch-Puffer (s. Abschnitt 3.2.) erfolgte für 1h eine Inkubation mit 100 µl des polyklonalem α -ApoA5-Antiköpers (1:5000 in Chaps/BSA-PBS-Puffer). Nach erneutem viermaligen Waschen erfolgte dann die Inkubation bei 37°C für 1h mit 100 µl des Sekundär-Antiköpers (GARPO, Jackson Immuno Research), an dem gleichzeitig eine Peroxidase gekoppelt war. Anschließend wurde nach vier Waschschritten 450 µl einer Entwicklungslösung (s. Abschnitt 3.2.) dazugegeben, deren Farbumschlag wurde nach einer 20-minütigen Inkubation mit 50 µl 2M Schwefelsäure gestoppt und dann bei 450 nm detektiert.

3.4.5 Lowry-Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry et al. durchgeführt. Dabei wurden 10 µl der Probe 1:5 in 0,1N NaOH verdünnt. Nach Zugabe von 500 µl Lösung C, bestehend aus Lösung A und B im Verhältnis 50:1, und gründlichem

3. Material und Methoden

Mischen, erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. Nach Zugabe von 50 µl Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Merck) und einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln entsteht durch aromatische Aminosäurereste (v.a. Tryptophan und Tyrosin) und dem Kupfer-Protein-Komplex eine Reduzierung und resultierend daraus eine blaue Färbung. Die Absorption wird bei 760 nm im Mikrotiterplatten-Spektralphotometer gemessen. Als Standardreihe dient eine BSA-Verdünnungsreihe (0-2 mg/ml; Merck).

3.4.6 Organentnahme

Nach einer 4-stündigen Fastenperiode wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Rompun/Ketanest-Injektion (s. Narkoselösung im Abschnitt 3.2.) betäubt. Nach Erreichen der nötigen Narkosetiefe wurden Brust- und Bauchraum geöffnet. Die Blutabnahme erfolgte aus dem rechten Ventrikel. Anschließend wurde der rechte Vorhof angeschnitten und das Kreislaufsystem mit 10 ml PBS/Heparin (10 U/ml) perfundiert. Dann wurden Leber, Niere, Milz, Muskel, Herz, epididymales, subkutanes und braunes Fettgewebe entommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.4.7 RNA-Isolierung

RNA von den gefrorenen Organproben wurde mit Hilfe von Trizol, TissueLyser und RNeasy system extrahiert. Dann erfolgte die weitere Isolierung der RNA mittels des NucleoSpin RNAII Machery Nagel Herstellerprotokolls. DNA-Verunreinigungen wurden auf der Säule durch eine DNase-Behandlung (RNase-Free DNase set; Qiagen) entfernt. Die RNA wurde in 40 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration mit dem Nanodrop mittels einer photometrischen Messung bestimmt.

3.4.8 cDNA Umschreibung und quantitative real-time PCR

Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurden 1 µg RNA in 50 µl Reaktionsvolumen mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) umgeschrieben. Dabei wurde durch die Verwendung von Oligo(dT)-

3. Material und Methoden

Primern, welche an die Poly(A)-Schwänze der mRNA binden, nur die messenger-RNA in cDNA umgeschrieben. Zur Bestimmung der Expressionshöhe bestimmter Gene wurde die cDNA in der *Quantitative real-time PCR* unter Verwendung des TaqMan Universal PCR Master Mix eingesetzt. Weiterhin wurden für alle Gene Genspezifische Primer, *Assays-on-Demand primer/proben* (Applied Biosystems), nach Herstellerangabe benutzt. Unter Verwendung der Expression eines *housekeeping*-Gens, in diesem Fall Tata-box binding protein (TBP), wurde die relative Expression mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) berechnet.

3.4.9 Isolierung von Lipoproteinen aus murinem Plasma

Lipoproteine lassen sich durch Zugabe von spezifischen Dichtelösungen (s. Abschnitt 3.2.) und Ultrazentrifugation entsprechend ihrer Dichte auftrennen. In ein Zentrifugenröhrchen passend für einen SW40-Rotor (Beckmann) wurden 3,5ml Plasma und 9ml Dichtelösung der Dichte 1,21 g/ml gegeben und über Nacht mit 18000rpm bei 4°C in einer Beckmann UZ zentrifugiert. Die flotierenden Plasma-Lipoproteine wurden abgenommen, resuspendiert und unter einen Dichtegradienten geschichtet. Dafür wurden wieder in ein Zentrifugenröhrchen passend für einen SW40-Rotor jeweils 3,5ml einer Dichtelösung der Dichte 1,019 g/ml und 1,063 g/ml unter 1ml Dichtelösung der Dichte 1,006 g/ml geschichtet. Dieser Gradient wurde im Anschluss mit 2ml Plasma-Lipoproteinen unterschichtet und für 20h bei 32000rpm zentrifugiert. Nach diesem Schritt ergab sich im Zentrifugationsröhrchen folgendes Bild: Die weißliche Bande der VLDL-Fraktion befand sich oben im Gradienten und wurde mit einer Kanüle abgenommen. Die LDL- und HDL-Fraktionen wurden, da diese farblos waren, mit einem Gradientenpeak in 24 0,5ml Fraktionen aufgetrennt. In diesen Fraktionen wurden dann Triglyzeride, Cholesterol und die Proteinkonzentration gemessen und die Fraktionen, welche HDL entsprachen, zusammengefügt.

3.4.10 Oraler Fett-Toleranztest

Nach einer 4-stündigen Fastenperiode wurde den Tieren ein ca. 2mm langes Schwanzstück abgeschnitten, vorsichtig mehrere Blutstropfen herausgedrückt und mit einer Microvette CB-300 Kalium-EDTA von Sarstedt aufgenommen. Anschließend wurden die Mäuse mit 200 µl Olivenöl gavagiert. Nach 30, 60, 120 und 240 min erfolgten weitere Blutabnahmen durch vorsichtiges Herausmassieren von Blutstropfen aus dem Schwanz. Im Plasma wurden die Lipide (s. 3.4.3) und die ApoA5-Konzentration mittels ELISA (s. 3.4.4) bestimmt.

3.4.11 Herstellung von ³H-Palmitinsäure gebundenem BSA

2 ml ³H-Palmitinsäure (Amersham) wurden im Glasröhrchen unter Stickstoff-Strom abgedampft. Es wurden 1600 µl PBS und 400 µl 0,5 mM Fettsäure-freie BSA/DMEM Lösung (33 mg/ml) dazu pipettiert und kräftig gevortext. Dann wurde mit ca. 30 µl 0,1 N NaOH bis zur Rosafärbung neutralisiert, anschließend 2 ml PBS dazu gegeben und für 2 h bei 37°C geschüttelt. Diese Lösung wurden in der folgenden TRL-Produktionsstudie (s. 3.4.12) eingesetzt.

3.4.12 TRL-Produktionsstudien

Zur Untersuchung der TRL-Produktion wurde 50 µl 10 %-ige Tyloxapol-Lösung, welche die LPL-vermittelte Hydrolyse blockiert, und anschließend 200 µl ³H-Palmitinsäure/BSA-Lösung (s. Abschnitt 3.4.11) in die Schwanzvene injiziert. 30 und 60 min nach der Injektion erfolgten Blutabnahmen aus dem Schwanz und nach 120 min wurden die Tiere ausgeblutet. Wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, wurde Plasma gewonnen und anschließend die Radioaktivität (1:250 in Aquasafe Zinsser Szintillationsflüssigkeit), sowie die Triglyzeride (s. Abschnitt 3.4.3) bestimmt.

3.4.13 Lipidextraktion

Zur Messung der Radioaktivität im Plasma wurden die Lipide nach der Methode von Dole extrahiert (DOLE, 1956). Dafür wurde eine Extraktionslösung aus 78 % Isopropanol, 20 % Heptan und 2 % 1 M Schwefelsäure hergestellt. In einem

3. Material und Methoden

Reagenzglas wurde die Extraktionslösung (1000 μ l) zum Plasma (10 μ l) gegeben und 30 sec bei höchster Stufe gevortext. Anschließend wurde erst Heptan (400 μ l), dann Wasser (600 μ l) hinzupipettiert, gevortext und die Proben für 10 min stehen gelassen. Es entstanden zwei Phasen, wobei sich in der oberen Phase die gelösten Lipide befanden. Von dieser wurden 300 μ l zum Counten abgenommen.

3.4.14 TRL-Abbaustudien

Für die Abbaustudien wurden freundlicherweise ^3H -Retinol- und ^{14}C -Ölsäure-markierte Ratten-CM von S. Nilsson zur Verfügung gestellt. Die Partikel wurden vor dem Tierexperiment über eine PD10-Säule (GE Healthcare) in PBS umgepuffert. Es erfolgte eine Schwanzinjektion. Nach 0,5 min, 1 min, 2 min, 5 min und 15 min wurde den Tieren mit heparinisierten Hämatokritkapillaren retroorbital Blut entnommen. Nach 30 min wurden die narkotisierten Tiere entblutet, perfundiert, die Organe entnommen und eingewogen. Dann wurden die Organe 1:10 w/w in Solvable (Perkin Elmer) für 1 h bei 60°C gelöst und die Radioaktivität 1:25 in Aquasafe (Zinsser) Szintillationsflüssigkeit gecountet.

3.4.15 Herstellung von ApoA5-Ko-freien HDL

ApoA5-defiziente Tiere wurden ausgeblutet und anschließend Plasma gewonnen (s. Abschnitt 3.4.2). Das Plasma wurde, wie in Abschnitt 3.4.9 beschrieben, in die einzelnen Lipoprotein-Fraktionen getrennt, und mittels eines Gradientenpeaks in 24 0,5ml Fraktionen abgenommen. Nach der Bestimmung des Cholesterolgehalts der jeweiligen Fraktionen wurden die HDL entsprechenden Fraktionen vereint und über eine PD10-Säule (GE Healthcare) in PBS umgepuffert.

3.4.16 Herstellung von radioaktiv markierten TRL

Es wurden je 10 μ l ^{14}C -Triolein (Amersham), von welchem vorher das Lösungsmittel Toluol abgedampft wurde, in 200 μ l Olivenöl aufgenommen. Wildtyp-Tiere wurden mit diesem radioaktiv-markierten Olivenöl gavagiert und das Blut nach 2h entnommen. Das Plasma wurde einem 4-stündigen Ultrazentrifugationsschritt (s.

3. Material und Methoden

Abschnitt 3.4.9) bei 38000rpm unterzogen und die TRL-Fraktion mit einer Kanüle abgenommen. 100 µl ³H-Cholesteroleylether, in Toluol gelöst, wurden unter Stickstoff abgedampft, in 100 µl 2 % BSA/PBS aufgenommen, 1 min gevortext und anzentrifugiert. Es wurden 1 ml von der TRL-Fraktion, 100 µl 10 mM EDTA-Lösung (pH = 8.0) und 50 µl Cholesterinester-Transferprotein (CETP) dazugegeben und gut durchmischt. Unter sehr leichtem Schütteln wurde die Lösung bei 30 °C ü.N. inkubiert, währenddessen Cholesterinoleat in die VLDL inkorporiert. Anschließend erfolgte erneut die 4-stündige Zentrifugation bei 38000rpm. Die radioaktiv markierten Partikel wurden über eine PD10-Säule (GE Healthcare) in PBS umgepuffert und die Proteinkonzentration (s. Abschnitt 3.4.5) bestimmt. Diese hergestellten Partikel wurden in Abschnitt 3.4.17 verwendet.

3.4.17 Isolation und Kultur von primären murinen Hepatozyten

Für die Isolation von primären Hepatozyten wurden Mäuse im Alter von 8-11 Wochen verwendet. Die Isolation erfolgte nach einem Protokoll von Braun et al.. Die narkotisierte Maus wurde am Bauchraum geöffnet, über die Pfortader erfolgte eine ca. 45-minütige Perfusion mit einem Perfusions-Puffer, bestehend aus verschiedenen Salzen (s. Abschnitt 3.2.) und EDTA. Anschließend wurde die Leber herausgenommen. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten unter einer sterilen Werkbank, mit sterilem Plastik- und Glasmaterial durchgeführt. Die Leber wurde innerhalb von 5 min in 50 ml *Plating*-Medium, bestehend aus D-MEM + GlutaMAX™ (High Glucose) Medium (GIBCO), dem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (GIBCO) zugesetzt wurden, zerkleinert und über einen Filter der Porengröße 70 µm (Nunc) filtriert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 28g für 4 min, der flotierende grobe Zellkuchen, bestehend aus groben Leberstücken und nicht anwachsenden Leberzellaggregaten, wurde abgesaugt und das Pellet in 8 ml *Plating*-Medium aufgenommen. Daraufhin erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt mit einem Percoll-Dichtegradienten um erstens die parenchymalen von den nicht-parenchymalen Zellen, sowie zweitens die vitalen von den nicht-vitalen Zellen zu trennen. Dieser Gradient bestand aus 13,9 ml Percoll und 2,1 ml Stock-Puffer.

3. Material und Methoden

Anschließend folgte ein 6-minütiger Zentrifugationsschritt bei 855 g. Nach diesem Schritt ergab sich folgendes Bild: Ein flotierender Zellkuchen, bestehend aus den nicht-parenchymalen und toten Zellen, sowie einem festen Pellet, bestehend aus den parenchymalen Zellen. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 10 ml *Plating*-Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und in der gewünschten Zellzahl auf sterilen Collagen-beschichteten 12-well Platten (Nunc) ausgesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 %. Nach 4h wurde zu WilliamsE-Medium (GIBCO), welches mit 2 % LPDS, 5 % Penicillin/Streptomycin supplimentiert war, gewechselt und wie in Abschnitt 3.4.18 und 3.4.19 beschrieben fortgefahren.

3.4.18 Stimations- und Sekretionsstudien in vitro

4h nach Aussetzen der isolierten primären Hepatozyten wurden in das Zellkulturmedium verschiedene Konzentrationen ApoA5-Ko freie HDL (s. Abschnitt 3.4.15) gegeben und nach mehreren Zeitpunkten (60, 120 min) 100 µl vom Zellüberstand abgenommen. Nach 4h wurde das Medium komplett abgenommen und bei 3000rpm 5min zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1ml PBS/Heparin (100Units/ml PBS), einmal mit PBS gewaschen und in Zelllysispuffer, welcher Phosphatase- und Protease-Inhibitor (s. Abschnitt 3.2.) enthielt, aufgenommen. Diese wurden dann 15min bei RT geschüttelt, mit einem Zellschaber abgelöst und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde bei 4°C und 14000rpm 15min zentrifugiert. In den Überständen und Zelllysaten wurden die ApoA5-Konzentrationen mittels ELISA (s. Abschnitt 3.4.4) gemessen.

3.4.19 VLDL-Aufnahme in vitro

3h nach Aussetzen der primären Hepatozyten wurden zur Messung der Aufnahme der radioaktiv markierten Partikel (s. Abschnitt 3.4.16) diese direkt zum Medium gegeben und es folgte eine 20- und 60-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen auf Eis dreimal 5min mit 1ml PBS-Heparin (100Units/ml PBS)

3. Material und Methoden

und einmal mit 1 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Collagenase Lösung (10 mg/ml) und 250 µl Trypsin 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl FCS gestoppt. Die Zellen wurden bei 2500 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen, mit 500 µl PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und zum Schluss in 500 µl 0,1 N NaOH lysiert. Die lysierten Zellen wurden nun in ein Beta-Röhrchen mit 5 ml Aquasafe (Zinsser) Szintillationsflüssigkeit überführt und die Zerfälle pro Minute bestimmt. Um die spezifische Aktivität (cpm/mg) zu bestimmen, wurde die Proteinkonzentration von 10 µl Zelllysat gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Darstellung der Mauskreuzung und der Mausmodelle

Um eine mögliche Interaktion zwischen ApoA5 und LDLR zu untersuchen, wurde eine homozygote LDLR-defiziente Maus mit einer heterozygoten ApoA5-transgenen Maus verpaart, so dass man einen LDLR-heterozygoten Wurf erhielt, der dann nach den Mendelschen Regeln zur Hälfte aus ApoA5-Transgen und zur anderen aus ApoA5-Wildtyp Nachkommen bestand. Diese Nachkommen wurden nun erneut miteinander gekreuzt, um homozygote LDLR-defiziente-Mäuse ($LDLR^{-/-}$) mit heterozygotem ApoA5-Transgen zu erhalten. Hierbei entstanden ungefähr 50 % ApoA5-Transgen und 50 % ApoA5-Wildtyp Mäuse, von denen jeweils ein Drittel homozygote LDLR-defiziente, heterozygote LDLR-defiziente und LDLR-Wildtyp Tiere waren. Eine Übersicht der Kreuzungsschritte zeigt die folgende Abbildung 9:

4. Ergebnisse

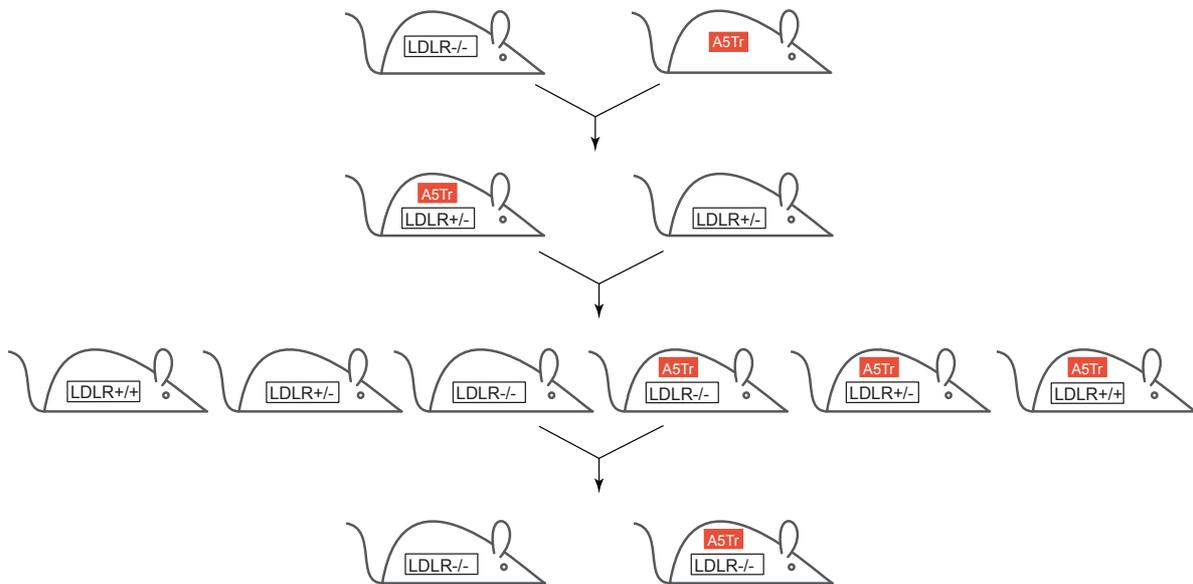


Abb. 9: Ergebnisse der Mauskreuzung

Im ersten Schritt entstehen LDLR-heterozygote Nachfahren mit und ohne ApoA5-Transgen, im nächsten Schritt ist das Ziel durch Verpaarung der heterozygoten Tiere bei gleichzeitiger ApoA5-Transgen-Heterozygotie homozygote LDLR-defiziente Mäuse zu erhalten. Als nächstes werden homozygote LDLR^{-/-} mit homozygoten LDLR^{-/-}A5Tr-Mäusen verpaart. So entstehen letztlich LDLR-defiziente Mäuse mit und ohne ApoA5-Transgen. LDLR^{-/-} = homozygoter LDLR-Knockout, LDLR^{+/-} = heterozygoter LDLR-Knockout, LDLR^{+/+} = Wildtyp; A5Tr = humanes ApoA5-Gen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde nun einer möglichen Interaktion von ApoA5 und LRP1 nachgegangen. Da ein Knockout von LRP1 letal ist, wurde LRP1 gewebespezifisch mit dem cre/loxP System in der Leber inaktiviert. Dafür wurden die Tiere so miteinander verkreuzt, dass letztlich Tiere mit homozygotem geflochtenem LRP1-Gen, heterozygotem cre-Transgen und heterozygotem ApoA5-Transgen erhalten wurden. Es wurden vier verschiedene Genotypen analysiert, die jeweils aus Gruppen von 5-8 männlichen Mäusen bestanden. Diese Genotypen sind in der folgenden Abb. 10 gezeigt:

4. Ergebnisse

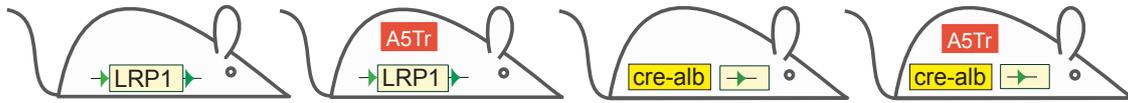


Abb. 10: Die verschiedenen Genotypen der Mausekreuzung

Es wurden LRP1-gefloxt Wildtypen mit LRP1-gefloxt ApoA5-transgenen Tieren verglichen. Des Weiteren Tiere bei denen das gefloxt (grüne Dreiecke) LRP1 Gen (gelbe Rechtecke) durch das Cre-Transgen unter der Kontrolle des albumin Promotors (cre-alb) herausgeschnitten wurde, mit und ohne humanem ApoA5-Gen (A5Tr).

Ein leberspezifischer LRP1-Mangel führt zu einer kompensatorischen Hochregulation des LDLR, weshalb zur Untersuchung einer Interaktion zwischen ApoA5 und Lipoprotein-stoffwechsel-Rezeptoren, noch ein drittes Mausmodell generiert wurde: LDLR-defiziente Tiere mit einem konditionalen Knockout von LRP1 in der Leber. Dafür wurden LDLR^{-/-}A5Tr Mäuse mit LRP1^{flox}/crealb/A5Wt Mäusen verkreuzt, und so lange verpaart, dass das gefloxt LRP1-Gen sowie der LDLR-Knockout homozygot, das humane ApoA5-Gen und das cre-Recombinase Transgen heterozygot vererbt wurden.

Um den Einfluss von ApoA5 in den jeweiligen Mausmodellen zu studieren, wurde das Plasma von 4h gefasteten männlichen Mäusen bezüglich des Lipoproteinprofils charakterisiert. Zur Erstellung des Lipoproteinprofils der verschiedenen Mausmodelle wurden die Plasmaproben mit Hilfe der sequentiellen Ultrazentrifugation getrennt und in den einzelnen Lipoproteinklassen der Triglyzerid- und Cholesterolgehalt gemessen. Dabei fallen merkliche Unterschiede in den Lipidwerten, insbesondere der Triglyzeride auf (s. Tabelle 4):

4. Ergebnisse

Genotyp	n	Chol (mg/dl)	Tg (mg/dl)	VLDL-Chol (mg/dl)	VLDL-Tg (mg/dl)	LDL-Chol (mg/dl)	LDL-Tg (mg/dl)	HDL-Chol (mg/dl)	HDL-Tg (mg/dl)
LDLR ^{-/-} A5Wt	13	360 ± 19	282 ± 21	65 ± 4	224 ± 18	175 ± 8	66 ± 3	148 ± 3	28 ± 2
LDLR ^{-/-} A5Tr	10	342 ± 24	206 ± 22	55 ± 3	166 ± 18	179 ± 21	75 ± 3	147 ± 6	30 ± 2
<i>P</i>		n.s.	*	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LRP1 ^{+/+} A5Wt	9	137 ± 8	145 ± 16	26 ± 2	107 ± 10	23 ± 2	21 ± 2	77 ± 3	21 ± 1
LRP1 ^{+/+} A5Tr	10	121 ± 9	110 ± 9	20 ± 2	73 ± 7	18 ± 1	21 ± 1	79 ± 4	22 ± 1
<i>P</i>		n.s.	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Alb-LRP1 ^{-/-} A5Wt	8	123 ± 14	127 ± 8	25 ± 4	110 ± 10	19 ± 2	23 ± 3	78 ± 4	25 ± 2
Alb-LRP1 ^{-/-} A5Tr	7	100 ± 6	142 ± 11	19 ± 1	108 ± 6	16 ± 1	21 ± 1	66 ± 5	22 ± 1
<i>P</i>		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>P</i> LRP1 ^{+/+} vs alb-LRP1 ^{-/-}		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>P</i> A5Tr vs A5Wt		n.s.	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LDLR ^{-/-} LRP1 ^{+/+} A5Wt	7	275 ± 10	234 ± 29	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LDLR ^{-/-} LRP1 ^{+/+} A5Tr	8	231 ± 13	159 ± 12	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>P</i>		n.s.	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
LDLR ^{-/-} Alb-LRP1 ^{-/-} A5Wt	7	466 ± 32	415 ± 42	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LDLR ^{-/-} Alb-LRP1 ^{-/-} A5Tr	8	477 ± 59	386 ± 34	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>P</i>		n.s.	n.s.						
<i>P</i> LDLR ^{-/-} LRP1 ^{+/+} vs LDLR ^{-/-} alb-LRP1 ^{-/-}		***	**						
<i>P</i> LDLR ^{-/-} LRP1 ^{+/+} A5Tr vs LDLR ^{-/-} alb-LRP1 ^{-/-} A5Tr		***	***						

Tabelle 4: Plasmalipoprotein-Spiegel

Plasma von männlichen Mäusen wurde nach einer Fastendauer von 4h mittels sequentieller Ultrazentrifugation getrennt. Chol = Cholesterol, Tg = Triglyzeride, n.s. = nicht signifikant; n.b. = nicht bestimmt. Die Maus-Genotypen sind folgendermaßen: A5Wt = ApoA5 Wildtyp, A5Tr = humanes ApoA5-Gen, LDLR^{-/-} = homozygoter *low density lipoprotein receptor* Knockout; LRP1^{+/+} = LRP1-Wildtyp, alb-LRP1^{-/-} = induzierte Inaktivierung von leberspezifischem LRP1 durch *site specific recombination* mit dem cre-loxp System, unter der Kontrolle des Albumin-Promoters. Alle Werte sind Mittelwerte ± S.E.M. Student t-test wurde zur Berechnung der statistischen Signifikanzen benutzt (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

Die Werte der Plasma-Tg sind in den LDLR^{-/-}A5Tr Mäusen signifikant um 27 % reduziert im Vergleich zu LDLR^{-/-}A5Wt Tieren, wobei diese Reduzierung im Gehalt der VLDL-Tg zu finden ist (LDLR^{-/-}A5Wt 224 ± 18 mg/dl, LDLR^{-/-}A5Tr 166 ± 18 mg/dl). Im LRP1^{+/+}A5Tr Mausmodell sind ebenfalls die VLDL-Tg um ein

4. Ergebnisse

Drittel geringer als beim LRP1^{+/+}A5Wt. Weiterhin sind die Cholesterol-Spiegel der VLDL- und der LDL-Fraktion leicht verringert. Im Gegensatz dazu weist der alb-LRP1^{-/-}A5Wt Genotyp keine Verminderung der Plasma-Tg auf, folglich auch keine der VLDL-Tg. Die Chol-Werte im Plasma zeigen eine Tendenz zu niedrigeren Spiegeln in den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Tieren, welche die HDL-Fraktion widerspiegeln, im Vergleich zu LRP1^{+/+}A5Tr Tieren. Zwischen den zwei Gruppen LRP1^{+/+}A5Wt und alb-LRP1^{-/-}A5Wt sind bezüglich der Tg- und Chol-Werte keine nennenswerten Veränderungen zu finden. Wie zu erwarten treten beim LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr Mausmodell auch signifikant niedrigere Plasma-Tg-Werte auf als beim LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Wt Modell; die Tg-Werte sind ungefähr um ein Drittel reduziert bei den LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr Tieren, zudem weisen sie leicht verminderte Plasma-Chol-Werte auf. Im Falle des Doppel-Knockouts von LDLR und LRP1 in der Leber weisen sowohl die ApoA5-Wildtyp als auch die ApoA5-transgenen Tiere deutlich erhöhte Chol- und Tg-Spiegel im Plasma auf. Jedoch zeigen die LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-}A5Tr Mäuse, wie auch schon die Tiere mit alleiniger Deletion von LRP1 in der Leber, keine ApoA5-vermittelte Tg-Reduzierung mehr.

In den nun folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der verschiedenen Mausmodelle nacheinander vorgestellt.

4.2. Charakterisierung des LDLR-defizienten und ApoA5-transgenen Mausmodells

4.2.1 Erstellung von Lipoproteinprofilen aus murinem Plasma

Aufgrund der unterschiedlichen Größe und Dichte lassen sich die einzelnen Lipoproteinklassen mittels einer Gelfiltrationschromatographie (*Fast Performance Liquid Chromatography*, FPLC) auftrennen. Eine Probe wird unter Druck durch eine Säule aus Dextran und Agarose gepumpt, dabei können kleinere Partikel in die Gel-Matrix interkalieren und werden erst später von der Säule als Größere eluiert. TRL, mit einem Durchmesser von 30-70 nm, werden als erstes von der Säule eluiert, dann die LDL (Durchmesser 15-25 nm) und als letztes HDL mit einem Durchmesser von

4. Ergebnisse

5-12 nm. Durch eine anschließende Cholesterol- und Triglyzeridbestimmung, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, wird ersichtlich, dass HDL cholesterolreiche und triglyzeridarme Partikel sind, wohingegen TRL-Partikel cholesterolarm und triglyzeridreich sind. Im FPLC-Profil von LDLR-defizienten Tieren (Abb. 11) sind keine wesentlichen Unterschiede in cholesterolreichen LDL- und HDL-Partikeln in ApoA5-transgenen Tieren im Vergleich zu ApoA5-Wildtyp Tieren zu finden. Dagegen ist die triglyzeridreiche VLDL-Fraktion merklich in den ApoA5-transgenen Mäusen reduziert, obwohl bei jenen der LDLR ausgeknocked ist.

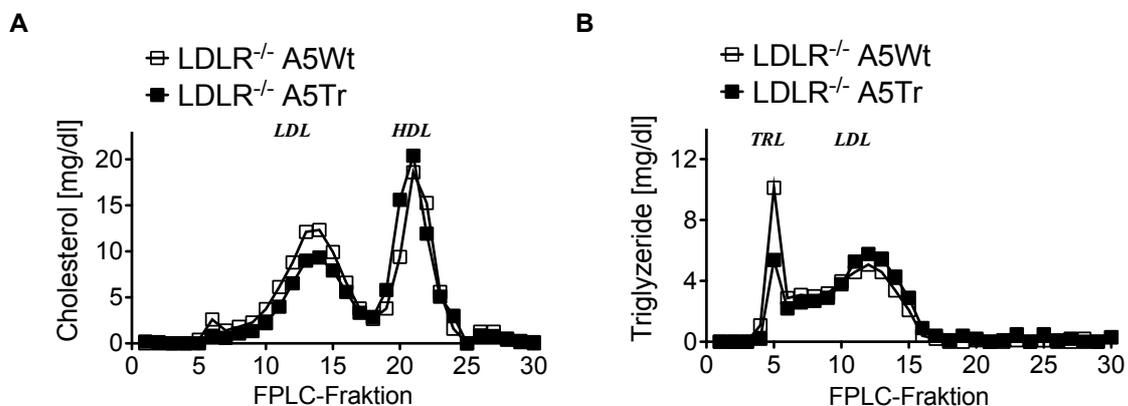


Abb. 11: FPLC-Profil der Plasmen von ApoA5 Wildtyp und ApoA5-transgenen Mäusen mit einer LDLR-Defizienz

Die Graphen stellen den Konzentrationsverlauf (y-Achse) an Cholesterol (**A**) und Triglyzeriden (**B**) über die einzelnen Fraktionen (x-Achse) dar. Mit zunehmender Fraktionszahl wird die Partikelgröße kleiner. Durch das ApoA5-Transgen werden die Triglyzeride der VLDL-Fraktion deutlich gesenkt im Vergleich zum ApoA5-Wildtyp.

4.2.2 m-RNA-Expressionsanalyse

Um zu untersuchen, ob das ApoA5-Transgen die Expression von Genen des Lipoproteinstoffwechsels (wie ApoE), des Glucosestoffwechsels (wie den insulinabhängigen Glukosetransporter 4, Glut4), der Lipolyse (wie LPL), der Lipogenese (wie die Fettsäuresynthese, Fasn) oder Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsel, (wie LRP1 oder GPIHPB1) beeinflusst, wurden Leber-, Muskel-, Milzgewebe, subcutanes, epididymales und braunes Fettgewebe im Alter von 16 Wochen entnommen, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der Taqman-Technologie auf die Expression dieser Gene hin untersucht (Abb. 12). In der Leber sind keine

4. Ergebnisse

bedeutenden Unterschiede in den untersuchten Genen zwischen dem ApoA5-Transgen und dem ApoA5-Wildtyp zu erkennen, ebenso nicht in Muskel, Herz, subcutanem Fett und braunem Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT). Beim epididymalen Fettgewebe werden bezüglich ApoE, LRP1 und LPL keine Unterschiede gemessen, jedoch aber bei Fasn und Glut4. Fasn, welches während der Lipogenese die Umwandlung von Kohlenhydraten in Fettsäuren katalysiert, ist in den ApoA5-transgenen Tieren signifikant verringert. Des Weiteren wird der durch Insulin induzierte Glut4, welcher selektiv die Aufnahme von Glucose vermittelt, auf RNA-Ebene niedriger in den ApoA5-transgenen Tieren exprimiert. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse aber keinen wesentlichen Unterschied in der Expression der Gene zwischen den zwei zu vergleichenden Gruppen bzw. keine relevanten Ergebnisse zur Beantwortung im Rahmen der in dieser Arbeit gestellten Frage, so dass ein Einfluss von ApoA5 auf Ebene der RNA-Expression in den anderen Mausmodellen nicht weiter untersucht wurde.

4. Ergebnisse

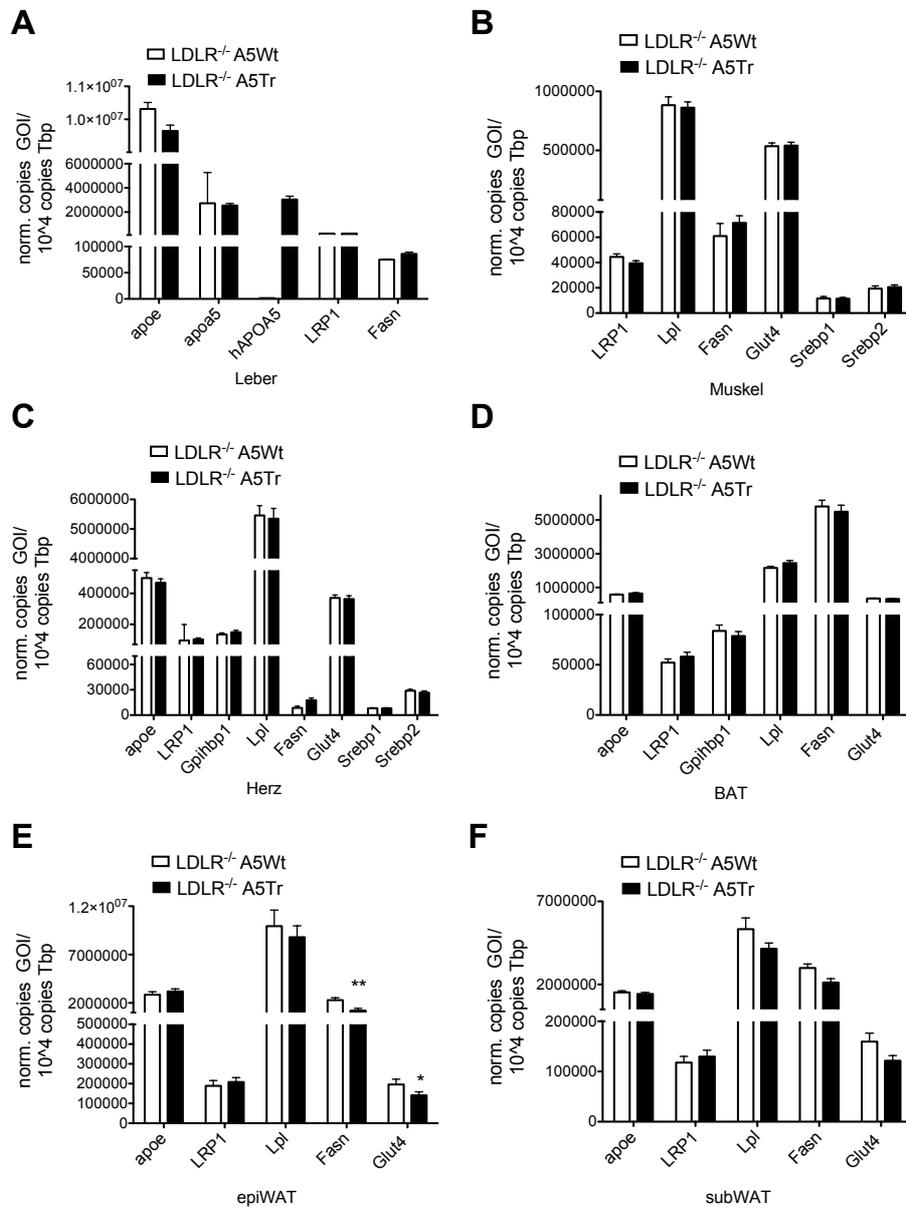


Abb. 12: mRNA-Expressionsanalyse von Lipoprotein-Rezeptoren, Genen des Lipoprotein- und Kohlenhydratstoffwechsels von Organen der LDLR-defizienten Tiere ohne ApoA5-Transgen (A5Wt) und mit ApoA5-Transgen (A5Tr)

Es wurde den Mäusen (n=5) Leber, Muskel, Herz, weißes und braunes Fettgewebe entnommen, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Taqman-Analyse die Expression der oben genannten Marker des Lipoprotein- und Glucosestoffwechsels, sowie der Lipoprotein- und Glucosestoffwechsel-Rezeptoren bestimmt. subWAT = subcutanes *white adipose tissue*, epiWAT = epididymalen *white adipose tissue*, BAT = *brown adipose tissue*, LPL = Lipoproteinlipase; LRP1 = LDLR-related protein 1, GPI-HBP1 = *Glycosylphosphatidylinositol anchored high-density lipoprotein binding 1*; ApoA5 = Apolipoprotein A5, ApoE = Apolipoprotein E, Glut 4 = Glucose-Transporter 4, Fasn = Fettsäuresynthase. (n ≥ 5; LDLR^{-/-}A5Wt vs. LDLR^{-/-}A5Tr P < 0,05: *, P < 0,01: **).

4.2.3 in vivo Studien

Um den Einfluss von ApoA5 auf die Konzentrationen von Triglyzeriden in Chylomikronen nach oraler Fettbelastung zu studieren, wurde in Versuchen Olivenöl oral verabreicht und anschließend nach 60, 120, 180 und 240 min Blut entnommen, zentrifugiert und der Tg- und Chol-Gehalt bestimmt. Hierbei treten keine Veränderung der Cholesterolverte zwischen den zwei Gruppen (Abb. 13A) auf. Der postprandiale Tg-Anstieg ist in den Mäusen, die das humane ApoA5-Gen exprimieren, deutlich niedriger als in Mäusen ohne das ApoA5-Transgen (Abb. 13B). Die gemessenen Konzentrationen der Triglyzeride von LDLR^{-/-}A5Tr Tieren steigen von 159±7mg/dl auf 273±22mg/dl, beim LDLR^{-/-}A5Wt Genotyp dagegen von 274±24mg/dl auf 381±87mg/dl. Damit liegen die Tg-Werte merklich tiefer bei LDLR^{-/-}A5Tr Tieren.

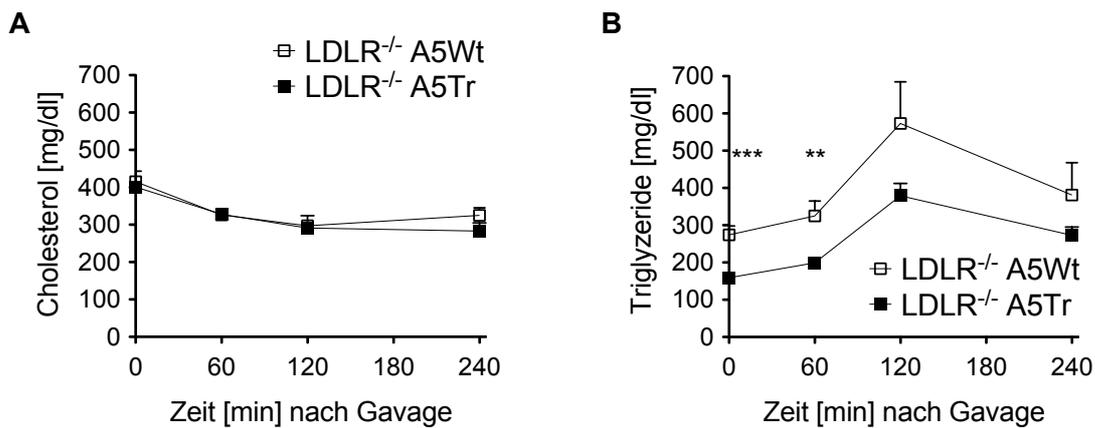


Abb. 13: Postprandialer Triglyzerid-Spiegel in LDLR-defizienten Mäusen mit und ohne ApoA5 16-20 Wochen alte Mäuse zeigen nach einer oralen Applikation von Olivenöl einen wesentlich langsameren postprandialen Anstieg der Triglyzerid-Konzentrationen im Plasma bei ApoA5-transgenen Mäusen im Vergleich zu ApoA5-Wildtyp-Mäusen (B). Beim Cholesterol-Profil sind keine Unterschiede zu erkennen(A) ($n \geq 5$; LDLR^{-/-}A5Wt vs. LDLR^{-/-}A5Tr $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***).

Der verminderte Tg-Anstieg in den ApoA5-transgenen Tieren könnte durch eine verminderte intestinale Triglyzeridresorption oder -sekretion, eine unterschiedliche CM-Zusammensetzung, durch eine veränderte LPL-Aktivität oder eine schnellere Endozytose postprandialer Lipoproteine bedingt sein. In vorherigen Studien mit anderen Mausmodellen wurde bereits eine unterschiedliche LPL-Aktivität und

4. Ergebnisse

intestinale CM-Produktion ausgeschlossen, so dass diesen Möglichkeiten nicht weiter nachgegangen wurde. Um eine schnellere Hydrolyse und Aufnahme von Lipoproteinen zu untersuchen, wurden radioaktiv markierte Lipoprotein-Partikel intravenös injiziert, um deren Turnover und deren Organverteilung zu studieren (Abb. 14). Die aus Ratten isolierten Partikel hatten als Tg-Label ^{14}C -markierte Ölsäure.

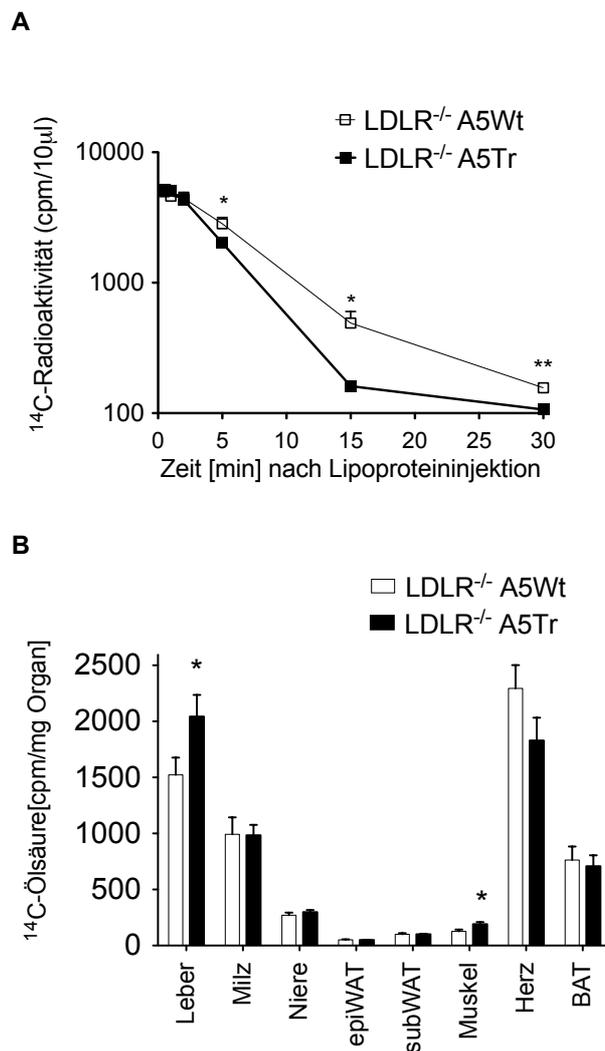


Abb. 14: Organverteilung und Plasma-Turnover von Ratten-CM in LDLR-defizienten-Mäusen
 Ratten-CM, markiert mit ^{14}C -Ölsäure, wurden in die Schwanzvene von Mäusen im Alter von 15-16 Wochen, injiziert, anschließend die Plasmaradioaktivität (A) und die Organaufnahme (B) gemessen. Die Leber- und Muskelaufnahme ist deutlich erhöht in A5Tr-Mäusen verglichen mit A5Wt-Mäusen. (n \geq 6; LDLR^{-/-}A5Wt vs. LDLR^{-/-}A5Tr $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **; Abkürzungen: subWAT = subcutanes *white adipose tissue*, epiWAT = epididymales *white adipose tissue*, BAT = *brown adipose tissue*).

4. Ergebnisse

Die Radioaktivität im Plasma nimmt über die Versuchsdauer bedeutend schneller in LDLR^{-/-}A5Tr Tieren ab im Vergleich zu LDLR^{-/-}A5Wt Tieren (Abb. 14A). Am Ende des Versuchs ist immer noch signifikant mehr Radioaktivität im Plasma der Tiere ohne das ApoA5-Transgen messbar. Damit einhergehend ist die gemessene ¹⁴C-Radioaktivität in den Organen zwischen den zwei Gruppen unterschiedlich. Die Organverteilung (Abb. 14B) der markierten CM-Triglyzeride zeigt bei ApoA5-transgenen Tieren eine signifikant erhöhte Aufnahme in Leber (+25 %) und Muskel (+35 %) im Vergleich zum ApoA5-Wildtyp. Dagegen eine verminderte (-20 %) Aufnahme ins Herz, die jedoch wegen der hohen Standardabweichung nicht signifikant ist. In Milz, Niere, weißem und braunem Fettgewebe ist kein ApoA5-Transgen-Effekt zu erkennen.

Aus diesen Daten ist zu schließen, dass der LDLR nicht für die ApoA5 vermittelte Tg-Reduzierung relevant ist und die Abnahme und die Aufnahme von TRL in die Leber auf einem LDLR-defizienten Hintergrund in den ApoA5-transgenen Mäusen schneller verläuft als in ApoA5Wildtypen.

Zusammenfassend ist ersichtlich, dass der ApoA5-triglyzeridsenkende Effekt trotz eines Funktionsverlustes vom LDLR zu finden ist. Diese ApoA5-transgenen Tiere zeichnen sich sowohl durch einen schnelleren Turnover nach einer oralen Fettverabreichung als auch nach einer intravenösen TRL-Injektion aus. Des Weiteren ist die TRL-Aufnahme in die Leber auch bei LDLR-Defizienz in den ApoA5-transgenen Tieren im Vergleich zum ApoA5-Wildtyp gesteigert.

4.3. Charakterisierung des Mausmodells mit gefloxtem LRP1-Gen, cre-Transgen und ApoA5-Transgen

Zur Studie des Einflusses des Lipoprotein-Rezeptors LRP1 und möglichen Interaktionen zwischen ApoA5 und LRP1 wurden Mäuse mit leberspezifischer LRP1-Defizienz, durch das cre/loxP-System, untersucht.

4.3.1 Erstellung von Lipoproteinprofilen aus murinem Plasma

Es wurde das Blutplasma von männlichen, gefasteten Mäusen gepoolt und das Lipoproteinprofil nach FPLC-Läufen durch Messung der Cholesterol- und Triglyzerid-Spiegel erstellt. Die Cholesterol-Spiegel in der HDL-Fraktion verhalten sich sehr ähnlich, unabhängig von ApoA5-Transgen und leberspezifischen LRP1-Knockout (Abb. 15).

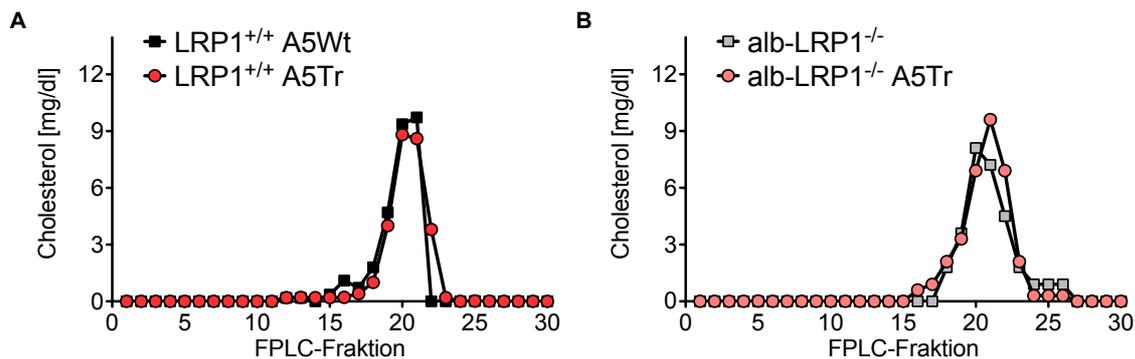


Abb. 15: FPLC-Lauf von Plasmen gefasteter Mäuse

Die Graphen stellen den Konzentrationsverlauf an freiem Cholesterol und Cholesterolestern (y-Achse) über die einzelnen Fraktionen des FPLC-Laufs (x-Achse) dar, wobei mit zunehmender Fraktionszahl die Partikel kleiner werden. A: FPLC-Profil von LRP1-Wildtyp Mäusen ohne und mit ApoA5-Transgen. Man sieht keine Unterschiede zwischen dem ApoA5-Wildtyp (A5Wt) und dem ApoA5-Transgen (A5Tr). B: FPLC-Lauf von Mäusen mit leberspezifischen Funktionsverlust von LRP1 in A5Wt- und ApoA5Tr-Mäusen. Auch in dieser Situation sieht man keinen wesentlichen Unterschied des Cholesterol-Gehalts im Plasma. Im Vergleich zur LRP1-Wildtyp-Situation sind die Partikel leicht größer.

4. Ergebnisse

Auffallend sind dagegen die Veränderungen im Triglyzerid-Profil (Abb. 16).

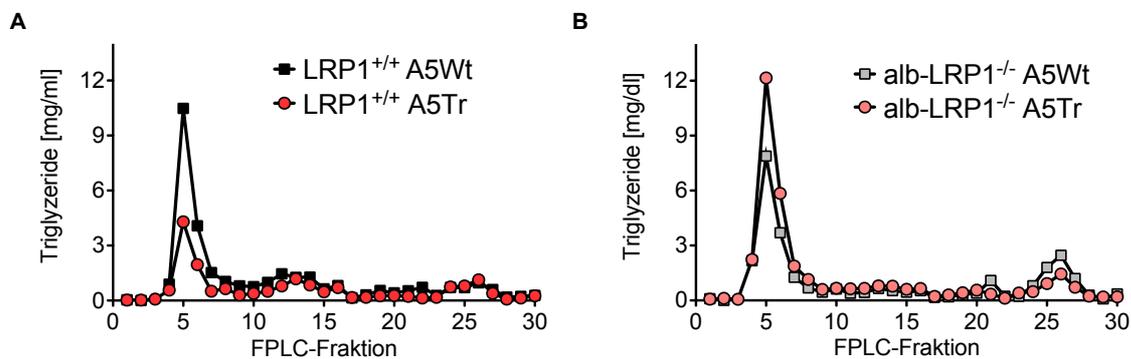


Abb. 16: FPLC-Profil von Plasmen gefasteter Mäuse

Die Graphen stellen den Konzentrationsverlauf an freien Triglyzeriden (y-Achse) über die einzelnen Fraktionen des FPLC-Laufs (x-Achse) dar. A: Man erkennt, dass der Triglyzerid-Gehalt in der VLDL-Fraktion in ApoA5-transgenen Mäusen wesentlich niedriger ist im Vergleich zum ApoA5-Wildtyp. B: Diese Tg-Verringerung durch das ApoA5-Transgen ist in leberspezifischen LRP1-Knockout Tieren nicht mehr zu finden.

Man sieht, dass die Plasmen von gefasteten Mäusen einen 2,5-fach geringeren Anstieg der VLDL-Triglyzeride in ApoA5-transgenen Tieren (4,3 mg/dl) im Vergleich zu ApoA5-Wildtypen (10,5 mg/dl) aufweisen (Abb. 16A). Dieser triglyzeridsenkende ApoA5-Effekt ist in leberspezifischen LRP1-defizienten Tieren nicht mehr vorhanden (Abb. 16B). Die Werte sind sogar noch etwas höher beim alb-LRP1^{-/-}A5Tr (12,2 mg/dl) als beim alb-LRP1^{-/-} Mausmodell (7,9 mg/dl). Beim Vergleich der zwei Genotypen ohne das ApoA5-Transgen, fällt auf, dass ein leberspezifischer LRP1-Knockout nicht zu erhöhten Plasma-Tg führt, sondern eher noch zu verringerten. Dieses entspricht den aus der Literatur bekannten Studien und ist mit der kompensatorischen Hochregulation des LDLR, wenn LRP1 in der Leber nicht exprimiert wird, begründbar.

4.3.2 in vivo Studien

Um einen möglichen Unterschied in der postprandialen Lipidentfernung zu analysieren, wurde Olivenöl oral verabreicht und für die Tg-Bestimmung nach 30, 60, 120 und 240min Blut entnommen (Abb. 17). Die Werte der LRP1^{+/+}A5Wt Mäuse reichen von einem Anfangswert 135±16 mg/dl zu dem Endwert 315±55 mg/dl, die von LRP1^{+/+} A5Tr Tieren von 88±8mg/dl auf 170±58mg/dl (Abb. 17A). Die von dem alb-LRP1^{-/-}A5Wt Modell von 174±26mg/dl auf 272±48mg/dl und vom alb-LRP1^{-/-}A5Tr von 132±32mg/dl auf 326±76mg/dl (Abb. 17B). Damit ist die postprandiale Lipidentfernung in den Tieren mit ApoA5-Transgen beschleunigt, im Vergleich dazu in den alb-LRP1^{-/-}A5Tr sehr verlangsamt und es ist kein Unterschied zwischen ApoA5-Wildtyp und ApoA5-transgenen Tieren mehr vorhanden. Jenes könnte durch eine verlangsamte Entfernung von *remnants* aus der Zirkulation erklärbar sein. Zur weiteren Analyse wurden deshalb die ApoA5-Konzentrationen mittels ELISA gemessen (Abb. 17C). Diese sind in den alb-LRRP1^{-/-}A5Tr Tieren zu Beginn um das 1,9-fache, zum Versuchsende sogar 3-fach höher, als in den LRP1^{+/+}A5Tr Mäusen.

4. Ergebnisse

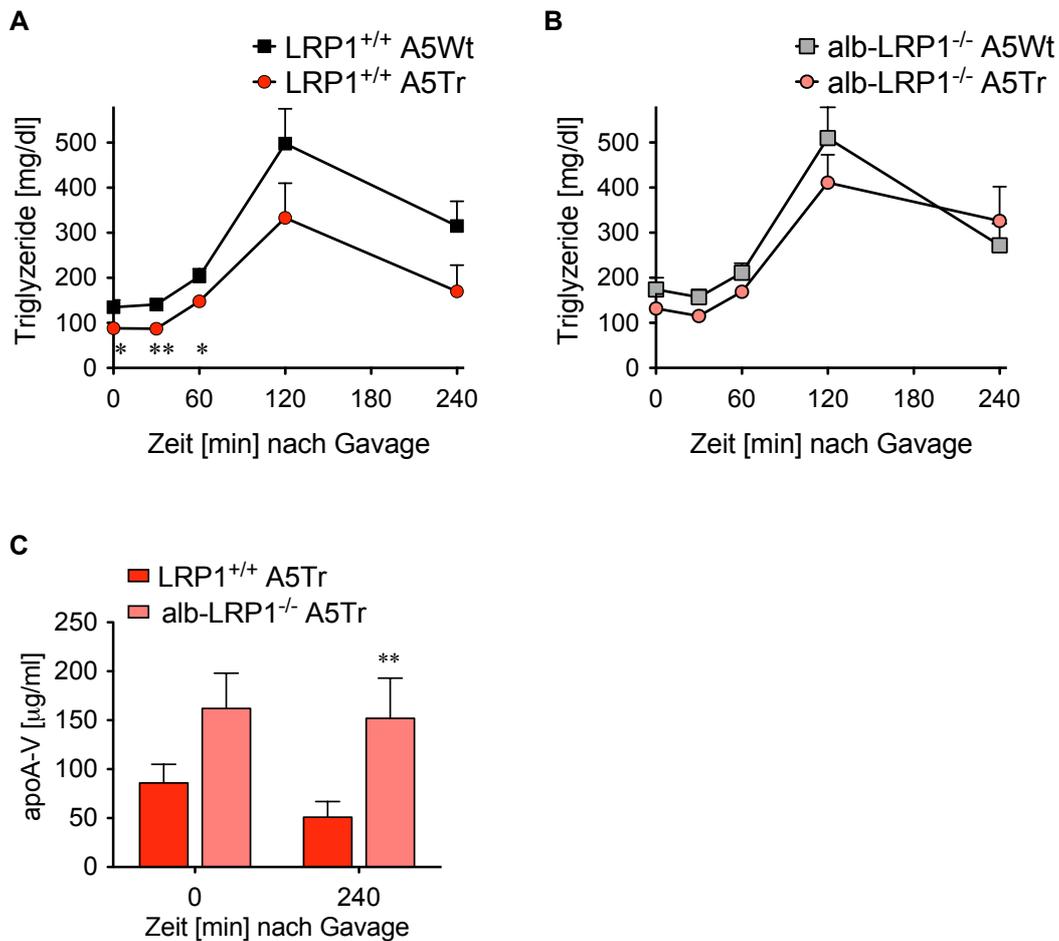


Abb. 17: Postprandialer Triglyzerid-Spiegel in LRP1-Wildtyp und LRP1-Knockout Tieren mit und ohne ApoA5

16-20 Wochen alten Mäusen wurde 200 µl Olivenöl oral verabreicht. Im Verlauf des Versuchs klären die ApoA5-transgenen Tiere die Triglyzeride schneller aus dem Blut als die ApoA5-Wildtypen (A). In den leberspezifischen LRP1-defizienten Mäusen ist kein Unterschied in der Triglyzeridentfernung aus dem Blut zwischen den Mäusen ohne und mit dem ApoA5-Transgen erkennbar. C: Die ApoA5-Konzentrationen im Plasma sind in gefasteten Mäusen, wenn LRP1 leberspezifisch ausgeknockt ist, höher als bei LRP1-Wildtyp Mäusen. Nach einer Experimentdauer von 4 h ist diese Differenz noch ausgeprägter. (n ≥ 4; LRP1^{+/+}A5Wt vs. alb-LRP1^{-/-}A5Tr $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **).

Um auszuschließen, dass der nicht vorhandene triglyzeridsenkende ApoA5-Effekt in den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Tieren aus einer unterschiedlichen VLDL-Produktion bedingt durch die LRP1-Defizienz resultiert, wurde die Produktion in ApoA5-transgenen Tieren mit und ohne Expression von LRP1 in der Leber untersucht.

4. Ergebnisse

Dafür werden radioaktiv markierte Fettsäuren, gebunden an BSA, und anschließend das Detergens Tyloxapol, zur Blockierung sämtlicher hydrolytischen Prozesse, intravenös injiziert (Abb. 18).

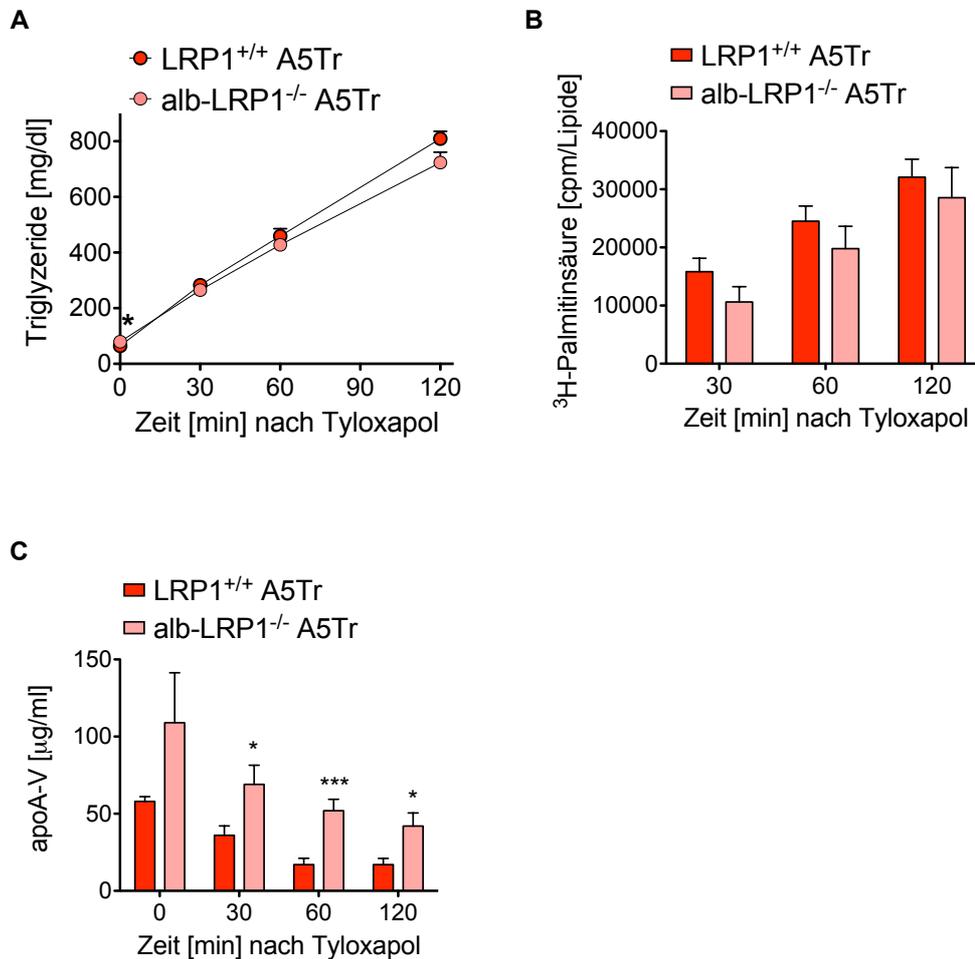


Abb. 18: VLDL-Produktion nach Injektion von Tyloxapol

Mäusen wurde 2 min nach Injektion von Tyloxapol, welches die Hydrolyse blockiert, ³H-Palmitinsäure injiziert. Es ist erkennbar, dass die Triglyzeride und die Radioaktivität in den Lipiden im Verlauf des Tests fast identisch ansteigen, unabhängig von der Expression von LRP1 in der Leber, weshalb es keinen Hinweis auf eine verminderte VLDL-Produktion gibt. C: Es ist ersichtlich, dass die ApoA5-Konzentrationen im Plasma stetig in beiden Genotypen abnehmen. (n ≥ 6; LRP1^{+/+}A5Tr vs. alb-LRP1^{-/-}A5Tr *P* < 0,05: * , *P* < 0,01: ** , *P* < 0,001:***).

Durch eine Inhibierung der plasmatischen Abbauprozesse steigen die Triglyzeridkonzentrationen (durch hepatische und intestinale Produktion triglyzeridreicher Partikel) (Abb. 18A) und die gemessenen Radioaktivitäten im

4. Ergebnisse

Blutplasma der zwei zu vergleichenden Gruppen an. Die gemessene Radioaktivität in den extrahierten Lipiden zeigt über 2 Stunden jedoch keinen wesentlichen Unterschied beim Einbau der radioaktiv markierten Palmitinsäure in neu synthetisierte VLDL-Partikel zwischen dem LRP1^{+/+}A5Tr Mausmodell und dem alb-LRP1^{-/-}A5Tr Modell (Abb. 18B). Interessanterweise zeigen die Mäuse mit der leberspezifischen LRP1-Defizienz sogar eher eine leicht verminderte VLDL-Produktion, was nicht im Einklang mit der zuvor gestellten Arbeitshypothese ist. Daher ist auszuschließen, dass der nicht vorhandene ApoA5-Effekt bei Deletion von LRP1 in der Leber durch eine gesteigerte hepatische VLDL-Produktion entsteht. Auffallend ist, dass die Mäuse mit leberspezifischen Funktionsverlust von LRP1 im gefasteten Zustand, und im Verlauf des Experiments höhere ApoA5-Konzentrationen aufweisen als LRP1-Wildtyp Mäuse (Abb. 18C). Obwohl die Hydrolyse blockiert ist, somit keine *remnants* oder freien Fettsäuren entstehen, die von den Organen aufgenommen werden können, sinken die ApoA5-Konzentrationen während der Versuchsdauer bei beiden Genotypen. Bei der LRP1^{+/+}A5Tr Gruppe von einem Ausgangswert von 58±3,1 µg/ml auf einen Endwert von 17±4 µg/ml, bei der alb-LRP1^{-/-}A5Tr Gruppe von 109±32 µg/ml auf 42±8,5 µg/ml.

4. Ergebnisse

Zur Untersuchung des Abbaus von TRL wurden Chylomikronen mit einer Doppelmarkierung verwendet: ^3H -Retinolpalmitat als Kernmarkierung und ^{14}C -Ölsäure als Tg-Markierung. Diese doppelmarkierten CM wurden aus Ratten isoliert (Abb. 19).

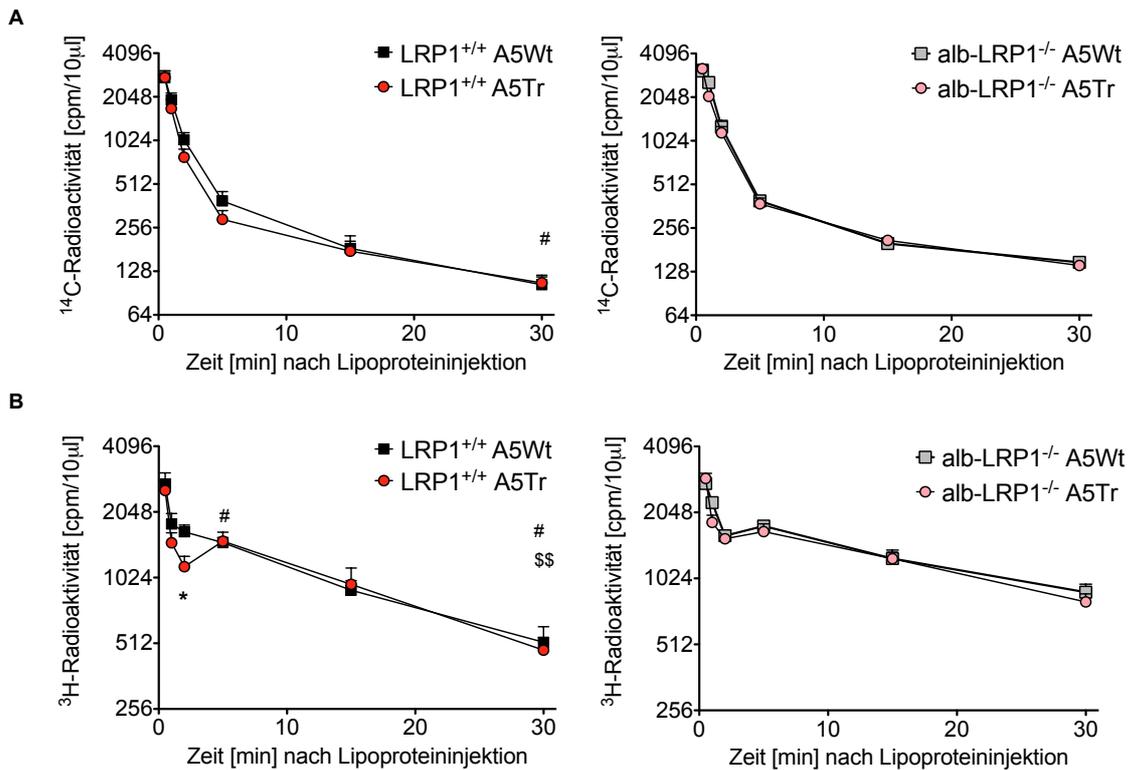


Abb. 19: Turnover von doppelmarkierten radioaktiven Partikeln aus Ratten

Nach intravenöser TRL-Injektion zeigt sich ein anfänglich schnellerer Abbau in den A5Tr Mäusen verglichen mit A5Wildtyp. Am Ende des Versuchs ist kein Unterschied in der Radioaktivität im Blut ersichtlich. In der LRP1^{-/-} Situation ist kein Unterschied zwischen den ApoA5-transgenen Tieren und ApoA5-Wildtypen vorhanden. Eine leberspezifische LRP1-Defizienz resultiert in einem deutlich langsameren Abbau der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität und es ist kein ApoA5-Transgen Effekt zu erkennen ($n \geq 6$; LRP1^{+/+}A5Wt vs. LRP1^{+/+}A5Tr $P < 0,05$; *; LRP1^{+/+}A5Wt vs. alb-LRP1^{-/-}A5Wt, $P < 0,05$; #; ; LRP1^{+/+}A5Tr vs. alb-LRP1^{-/-}A5Tr, $P < 0,05$; \$\$).

Die ^{14}C -Radioaktivität im Plasma nimmt bei der LRP1^{+/+}A5Tr Gruppe minimal schneller ab als bei der LRP1^{+/+}A5Wt Gruppe, aber am Ende ist kein Unterschied mehr zu erkennen. Dagegen zeigen die LRP1^{+/+}A5Tr Tiere bei der ^3H -Kernmarkierung innerhalb der ersten Minuten einen bedeutend schnelleren Turnover, welcher aber im weiteren Verlauf und schließlich am Versuchsende

4. Ergebnisse

aufgehoben ist. Bei den zwei anderen Genotypen, also alb-LRP1^{-/-}A5Wt und alb-LRP1^{-/-}A5Tr, verlaufen die Turnover beider Label identisch. Auffällig sind nur am Versuchsende die hohen Plasmaradioaktivitäten, besonders von der ³H-Kernmarkierung, bei den leberspezifischen LRP1-defizienten Tieren im Vergleich zu LRP1^{+/+} Mäusen (Abb. 19B). Obwohl die ³H- und die ¹⁴C-Plasmaradioaktivität nicht deutlich zwischen den LRP1-Wildtyp Tieren ohne und mit dem ApoA5-Transgen differieren, ist die Radioaktivität in den Organen unterschiedlich verteilt (Abb. 20).

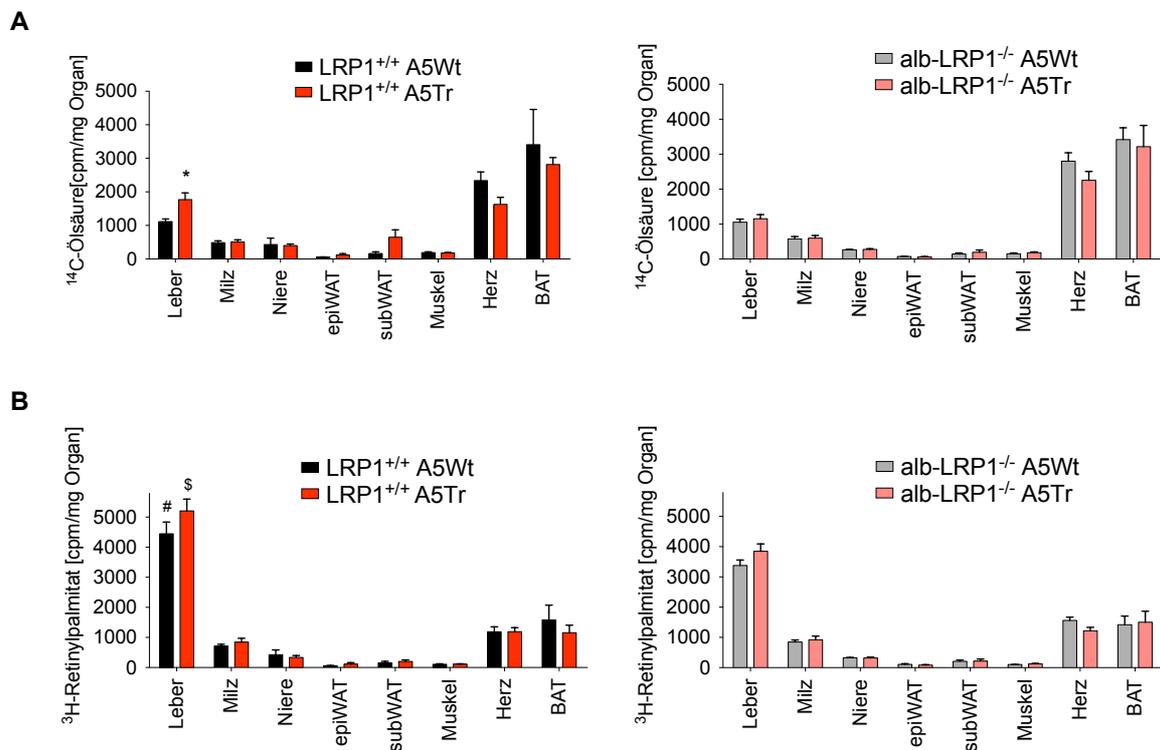


Abb. 20: Organverteilung in LRP1-Wildtyp und leberspezifischen LRP1-defizienten Tieren

Es wurden Ratten-CM, mit ³H-markiertem Retinylpalmitat und ¹⁴C-markierter Ölsäure, in die Schwanzvene injiziert und die Organaufnahme nach 30 min gemessen. A: Während die ¹⁴C-Fettsäure-Aufnahme in die Leber in A5Tr-Mäusen signifikant erhöht ist, ist die Herz- und BAT-Aufnahme im Vergleich zu A5Wt-Tieren verringert. B: Des Weiteren zeigen die alb-LRP1^{-/-}A5Wt Mäuse und die alb-LRP1^{-/-}A5Tr Mäuse keinen Unterschied in der Leberaufnahme. Bei der Partikelaufnahme ist bei LRP1^{+/+}A5Tr Tieren eine leichte Tendenz zur erhöhten Aufnahme in Leber und Milz zu erkennen. Bei der Partikelaufnahme von LRP1-defizienten Tieren mit und ohne ApoA5-Transgen ist kein Unterschied in der Organverteilung ersichtlich, jedoch ist eine deutlich geringere Leberaufnahme vorhanden (n ≥ 6; LRP1^{+/+}A5Wt vs. LRP1^{+/+}A5Tr *P* < 0,05; *, LRP1^{+/+}A5Wt vs. alb-LRP1^{-/-}A5Wt, *P* < 0,05; #, LRP1^{+/+}A5Tr vs. alb-LRP1^{-/-}A5Tr, *P* < 0,05; \$).

4. Ergebnisse

Bei der Messung der Organaufnahme von ^{14}C -markierten CM zeigt sich eine signifikant erhöhte Leberaufnahme (+37 %) durch das ApoA5-Transgen, weiterhin noch ins epiWAT (+55 %) und subWAT (+75 %). Dafür ist die Aufnahme der ^{14}C -Radioaktivität im Herz (+30 %), sowie im BAT, in den Tieren ohne das ApoA5-Transgen erhöht. Die Organverteilung der ^{14}C -Triglyzeridmarkierung weist beim Fehlen von LRP1 in der Leber keine Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen ApoA5-Gen auf. Gegenüber der Expression von LRP1 in der Leber ist lediglich die Herzaufnahme in beiden Genotypen gesteigert. Bei der Aufnahme der ^3H -Kernmarkierung zeigen LRP1^{+/+}A5Tr Tiere eine vermehrte Aufnahme in die Leber (+15 %), ins epiWAT (+47 %) und subWAT (+25 %), dagegen eine verminderte ins BAT (-37 %), wobei bei letztgenanntem die Standardabweichung hoch ist. Die leberspezifische LRP1-Deletion führt sowohl in ApoA5-Wildtyp als auch in ApoA5-transgenen Mäusen zu einer deutlichen Reduzierung der Aufnahme von TRL-Partikeln in die Leber. Es scheint, dass die Hydrolyse in den ApoA5-transgenen Tieren erhöht ist und die entstehenden Fettsäuren und die entstehenden *remnants* schneller in die Organe aufgenommen werden können. Ein leberspezifischer Funktionsverlust von LRP1 in der Leber führt unabhängig vom ApoA5-Transgen, zu einer deutlich verminderten Partikel Aufnahme.

4.3.3 in vitro Studien

Um die Befunde der Turnoverstudien und der unterschiedlichen ApoA5-Konzentrationen aus den in vivo Studien, weiterzuführen und aufzuklären, wurden primäre Hepatozyten aus Lebern von LRP1^{+/+}A5Tr und alb-LRP1^{-/-}A5Tr-Mäusen nach folgender Methode isoliert (Abb. 21).

4. Ergebnisse

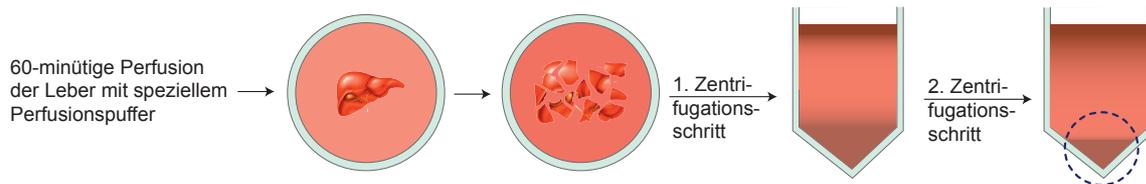


Abb. 21: Präparation von primären murinen Hepatozyten

Die Leber wurde über die Pfortader mit einem Perfusionspuffer ca. 60 min lang perfundiert, dann entnommen, zerkleinert und die Hepatozyten mittels zweier Zentrifugationsschritte von nicht-parenchymalen und toten Zellen getrennt.

3h nach Aussetzen der Zellen auf collagenbeschichteten Platten wurden verschiedene Konzentrationen von radioaktiv markierten VLDL-Partikeln zum Medium gegeben und die Partikelaufnahme nach 20 min in den Zellen gemessen (Abb. 22).

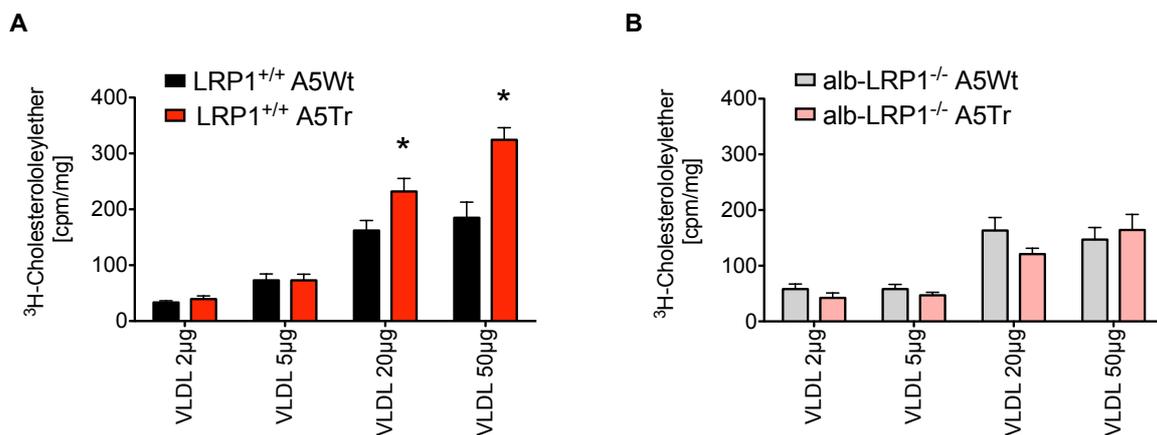


Abb. 22: Partikelaufnahme in primären murinen Hepatozyten

Bei der *in vitro* Aufnahme von ³H-Cholesteroleylether markierten TRL ist ein ApoA5-transgener Effekt bei zunehmender Partikel-Konzentration erkennbar. Diese durch das ApoA5-Transgen verursachte erhöhte Aufnahme ist in alb-LRP1^{-/-} Zellen nicht vorhanden (LRP1^{+/+}A5Wt vs. LRP1^{+/+}A5Tr *P* < 0,05: *).

Hepatozyten von LRP1^{+/+}A5Tr Mäusen nehmen bei Partikel-Konzentrationen von 20 µg und 50 µg diese vermehrt auf als Hepatozyten von LRP1^{+/+}A5Wt Mäusen (Abb. 22A). Demgegenüber ist diese vermehrte Aufnahme in Hepatozyten von alb-LRP1^{-/-}A5Tr gegenüber LRP1^{+/+}A5Wt nicht zu sehen (Abb. 20B). Eine Erklärung für die nicht gesteigerte ApoA5-bedingte Leberaufnahme bei geringen Konzentrationen könnte sein, dass die Inkubationszeit von 20 min für die niedrigen VLDL-

4. Ergebnisse

Konzentrationen zu lang war. Möglicherweise könnte der Effekt einer vermehrten Leberaufnahme durch das ApoA5-Transgen bei einer kürzeren Inkubationszeit feststellbar sein.

Die *in vitro* Daten bestätigen die Ergebnisse der CM-Aufnahmestudien *in vivo*.

Um die Bedeutung von LRP1 und eine mögliche Interaktion zwischen LRP1 und ApoA5 zu analysieren, wurden *in vitro* Studien, u.a. Stimulationsstudien mit verschiedenen Substraten, durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich in Vorversuchen, dass durch Stimulation mit HDL, isoliert sowohl von ApoA5-defizienten Tieren als auch von A5Wt-Tieren, ApoA5 vermehrt in den Zellkulturüberstand ausgeschüttet wird. Darauf basierend wurde nun der Einfluss von LRP1 auf die ApoA5-Sekretion überprüft (Abb. 23).

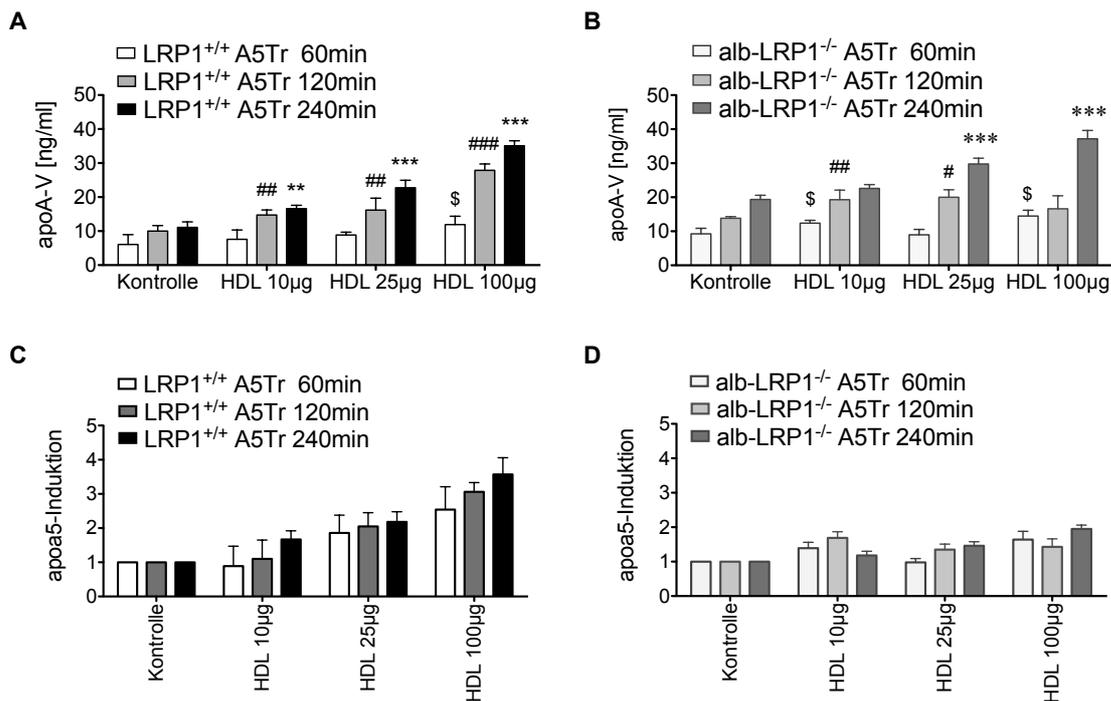


Abb. 23: ApoA5-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach HDL-Stimulation

Nach Stimulation von primären murinen Hepatozyten von LRP1^{+/+}A5Tr-Mäusen und alb-LRP1^{-/-}A5Tr mit ApoA5-freien HDL, ist ersichtlich, dass HDL die Sekretion von ApoA5 in den Zellkulturüberstand stimuliert und dieses ein Konzentration- und Zeitabhängiger Effekt ist. Diese Stimulation der Sekretion ist unabhängig von der Anwesenheit von LRP1 in der Leber, jedoch wird diese in Mäusen mit leberspezifischer Defizienz wesentlich geringer induziert (ApoA5-Konzentration 60 min vs. Kontrolle 60 min: $P < 0,01$ \$; ApoA5-Konzentration 120 min vs. Kontrolle 120 min: $P < 0,05$ #, $P < 0,01$ ##, $P < 0,001$ ###; ApoA5-Konzentration 240 min vs. Kontrolle 240 min: $P < 0,01$ **, $P < 0,001$ ***).

4. Ergebnisse

Dabei zeigte sich in der Kontrolle, dass mit fortschreitender Versuchsdauer die ApoA5-Konzentrationen zunehmen, wobei die der alb-LRP1^{-/-}A5Tr Hepatozyten höher sind als die der LRP1^{+/+}A5Tr Hepatozyten. Dieses entspricht den Plasmadaten.

Des Weiteren scheint ApoA5 durch Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von ApoA5^{-/-}-HDL vermehrt in den Zellkulturüberstand sezerniert zu werden. Diese Sekretion ist unabhängig von der Anwesenheit von LRP1 (Abb. 23A, B). Auffällig ist jedoch, dass die Induktion durch HDL, gemessen an der Kontrolle, in den LRP1^{+/+}A5Tr Zellen höher ist als in den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Zellen (Abb. 23C, D). Diese Stimulation durch HDL zeigt, dass HDL die Ausschüttung von ApoA5 stimuliert, wahrscheinlich als ApoA5-Pool dient und mehrere ApoA5 aufnehmen kann. Der Mechanismus dieser Sekretion ist nicht geklärt. Dass HDL direkt mit ApoA5 an der Plasmamembran verschmilzt ist aufgrund der hohen Hydrophobizität von ApoA5 anzunehmen. Die grundsätzlich höheren Konzentrationen von ApoA5 im Überstand in den alb-LRP1^{-/-}-Tieren könnten bewirken, dass die Ausschüttung von ApoA5 durch HDL Konzentrationsabhängig ist und je mehr ApoA5 im Überstand ist, desto weniger ApoA5 wird noch zusätzlich sekretiert. Die absoluten und die relativen ApoA5-Werte ohne, d.h. in der Kontrolle, und mit den verschiedenen HDL-Konzentrationen sind nach 60 min relativ identisch zwischen den LRP1^{+/+}A5Tr und den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Hepatozyten. Nach 120 min und vor allem nach 240 min sind die ApoA5-Werte in den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Zellen in der Kontrolle höher als im Vergleich zu den LRP1^{+/+}. Jedoch sind die absoluten Werte der *wells* die mit HDL stimuliert werden zwischen den beiden Gruppen gleich. Deswegen wird, relativ gesehen, die ApoA5-Sekretion in den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Hepatozyten weniger induziert als in den LRP1^{+/+}A5Tr-Zellen. Bei beiden ist aber unabhängig von LRP1 ein Sekretionseffekt vorhanden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass generell das gefloخته LRP1-Gen in dem Mausmodell nicht den ApoA5-triglyzeridsenkenden Effekt beeinflusst. Die ApoA5-transgenen Tiere weisen reduzierte präprandiale Tg-Level, beschleunigte postprandiale Tg-Verringerung, einen schnelleren Turnover von radioaktiv

4. Ergebnisse

markierten TRL und eine erhöhte Leberaufnahme auf. Erstaunlicherweise zeigen die Tiere bei denen das gefloxtete LRP1-Gen durch die cre-Rekombinase deletiert ist, keine reduzierten Plasma-Tg-Spiegel im Vergleich zwischen ApoA5-Transgen und ApoA5-Wildtyp. Die alb-LRP1^{-/-}A5Tr Tiere zeichnen sich sowohl durch eine langsamere Tg-Senkung nach einer oralen Fettverabreichung, als auch durch eine verringerte Radioaktivitätsabnahme nach einer intravenösen TRL-Injektion aus als das LRP1^{+/+}A5Tr Mausmodell. Des Weiteren ist die TRL-Aufnahme in die Leber bei LRP1-Knockout der ApoA5-transgenen im Vergleich zu ApoA5-Wildtyp Tieren nicht vermehrt. Weiterhin ist aus den in vivo Daten zu schließen, dass unabhängig vom A5-Transgen die leberspezifisch LRP1-defizienten Mäuse einen deutlich verlangsamten TRL-Turnover zeigen und damit einhergehend eine merklich geringere Leberaufnahme.

4.4. Charakterisierung des Mausmodells mit LDLR-Knockout, gefloxtem LRP1-Gen und ApoA5-Transgen

Im nun folgenden Teil werden die Ergebnisse des Mausmodells mit semikonditionalen Doppelknockout von LRP1 in der Leber und vom LDLR dargestellt.

4.4.1 Erstellung von Lipoproteinprofilen aus murinem Plasma

Um den Einfluss der beiden Rezeptoren zu untersuchen wurden mittels FPLC die Lipoproteinprofile aus Plasmen gefasteter männlicher Mäuse, im Alter zwischen 14-16 Wochen, charakterisiert (Abb. 24).

4. Ergebnisse

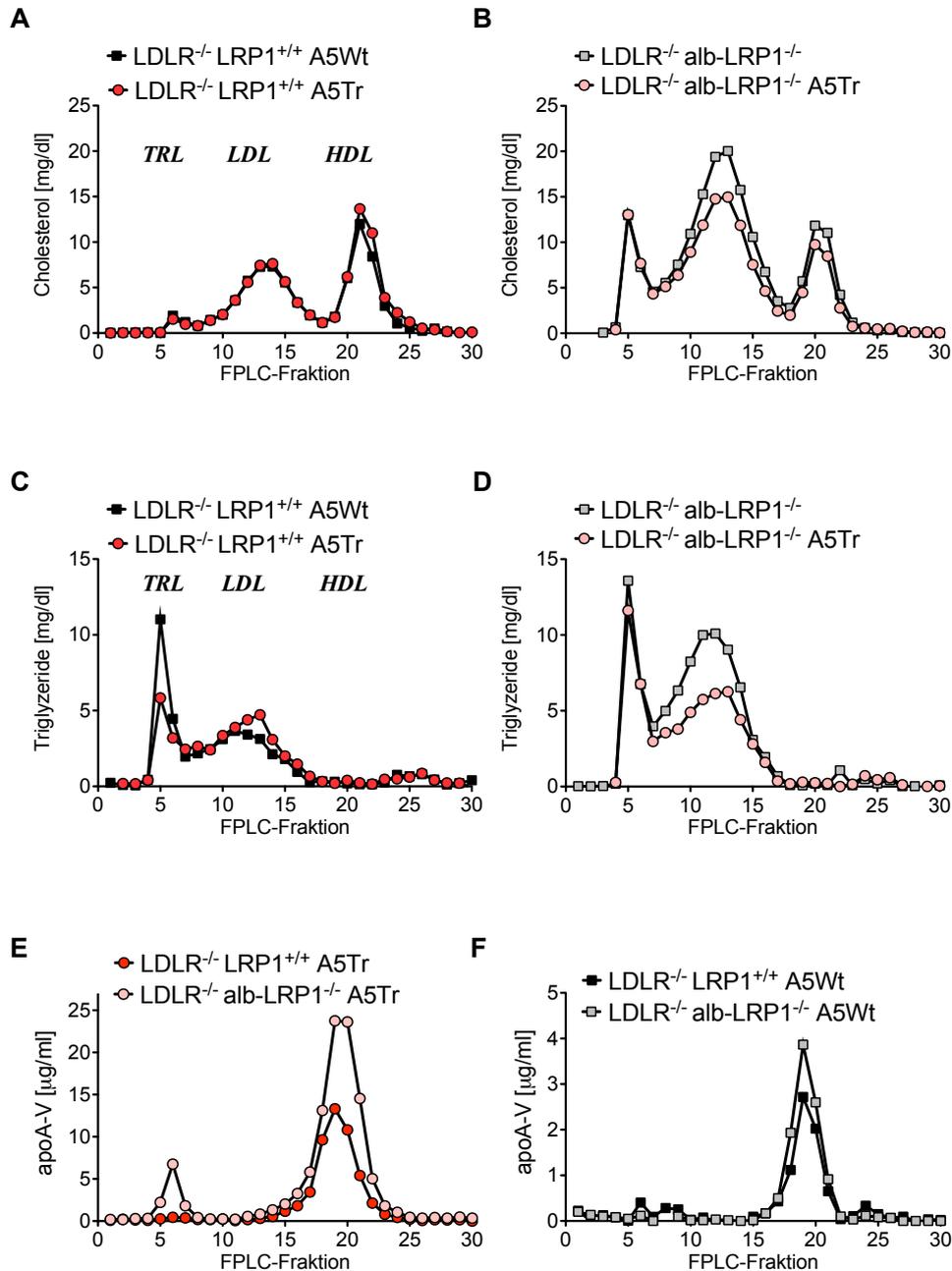


Abb. 24: FPLC der Plasmen von Mäusen mit einem semikonditionalen Doppelknockout des LDLR und des leberspezifischen LRP1

A, B: Im Cholesterol-Profil der LDLR-defizienten Mäuse ist kein ApoA5-transgener Effekt ersichtlich. Aber beim LDLR-Knockout mit gleichzeitiger Deletion von LRP1 in der Leber ist eine Chol-Reduzierung vorhanden. C, D: Auffallend ist die Tg-Verringerung der VLDL-Fraktion in den LDLR-defizienten Tieren mit dem ApoA5-Transgen. D: Diese Tg-Abnahme ist in den LDLR- und LRP1-defizienten Tieren nicht zu sehen, aber die A5Tr-Mäuse weisen reduzierte Tg-Spiegel in der *remnant*-Fraktion auf. E,F: ApoA5-Konzentrationen in der Doppel-Knockout Situation sind viel höher als nur bei alleiniger LDLR-Defizienz.

4. Ergebnisse

In dem Cholesterolprofil von Mäusen auf dem LDLR-defizienten Hintergrund ist kein Unterschied zwischen den Tieren mit dem ApoA5-Wildtyp und dem ApoA5-Transgen zu erkennen, während man in der Doppelknockout-Situation, d.h. LDLR- und leberspezifischer LRP1-Knockout, einen verminderten Cholesterolgehalt in der LDL-Fraktion in den ApoA5-transgenen Tieren hat (Abb. 24A). Beim Vergleich der LDLR^{-/-}LRP1^{+/+} mit den LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-} Mäusen, unabhängig vom ApoA5-Transgen, ist ein deutlicher Anstieg im VLDL- sowie im LDL-Cholesterolgehalt erkennbar, wenn LRP1 in der Leber nicht mehr exprimiert wird (Abb. 24B). Im Triglyzerid-Profil sind die Tg-Werte in der VLDL-Fraktion durch das ApoA5-Transgen deutlich vermindert im Vergleich zu Mäusen mit dem murinen ApoA5-Gen (A5Wt) (Abb. 24C). Im Falle des LDLR- und des leberspezifischen LRP1-Knockout ist der ApoA5-reduzierende Tg-Effekt in der VLDL-Fraktion nicht mehr vorhanden. Jedoch sind die Tg-Spiegel in der LDL-Fraktion in ApoA5-transgenen Tieren reduziert (Abb. 24D). Generell steigen die Tg-Werte, wie auch die Chol-Werte, in der Doppelknockout-Situation im Vergleich um das ungefähr zweifache an. Diese Veränderungen in der LDL-Fraktion in der Doppelknockout-Situation werden, wie bereits durch Rohlman et al. gezeigt, nicht durch eine Akkumulation von echten LDL-Partikeln, sondern vielmehr durch kleine CR und VLDL-Remnants bewirkt (Abb. 24B, D).

Die ApoA5-Plasmakonzentrationen sind in LDLR^{-/-}albLRP1^{-/-}A5Tr Mäusen in der VLDL- und HDL-Fraktion deutlich erhöht im Vergleich zur LRP1^{+/+}-Situation. Die A5Wt Tiere zeigen ebenso eine ApoA5-Erhöhung in der Abwesenheit von LRP1 in der Leber (Abb. 24E, F). Als Ursache der erhöhten ApoA5-Plasmakonzentrationen entstanden zwei Thesen: ApoA5 interagiert mit leberpsezifischen LRP1 und vermittelt dadurch die *remnant*-Aufnahme. Eine andere Alternative ist, dass ApoA5 an LRP1 an der Plasmamembran gebunden vorliegt und ein Funktionsverlust von LRP1 in der Leber führt zu erhöhtem ApoA5-Gehalt.

4.4.2 in vivo Studien

Eine mögliche Erklärung für die TRL-Zunahme in den LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-} Tieren könnte durch eine unterschiedliche Produktion in der Leber entstehen. Wie bereits bei den leberspezifischen LRP1-defizienten Mäusen wurde die Produktion in einem Versuch studiert, bei dem ³H-markierte Palmitinsäure injiziert und anschließend durch Tyloxapol die plasmatische Hydrolyse inhibiert wurde. Deshalb werden die eingebauten radioaktiv markierten Fettsäuren in neu synthetisierten VLDL-Partikeln nicht abgebaut und geben damit Rückschluss auf die hepatische Produktion. Es wurden der Chol- und Tg-Gehalt in Plasmen von den zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommenen Blutproben gemessen, sowie nach Extraktion der Lipide nach Dole die Radioaktivität bestimmt. Weiterhin wurden die Konzentrationen von ApoA5 im Plasma gemessen (Abb. 25).

4. Ergebnisse

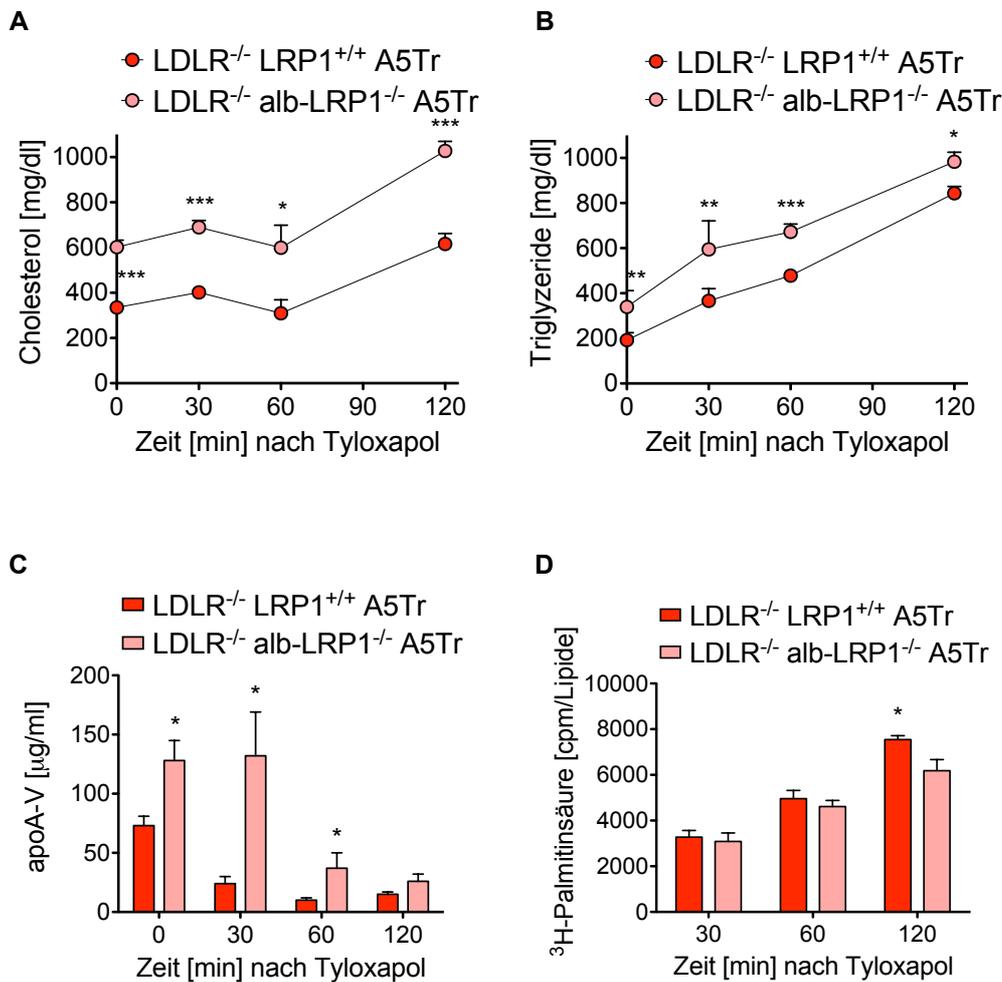


Abb. 25: Produktionsstudie nach Injektion des LPL-Inhibitors, Tyloxapol.

Es kommt im Verlauf des Versuchs zu einer Akkumulation von Cholesterol (A) und Triglyzeriden (B), wobei die Tiere mit dem Doppelknockout generell höhere Cholesterol- und Triglyzerid-Spiegel aufweisen. Dagegen ist der Einbau der Radioaktivität in neu synthetisierten VLDL-Partikeln nach 2 h in den Doppelknockout-ApoA5-transgenen Mäusen etwas niedriger als bei den LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr Mäusen. C: Die ApoA5-Konzentrationen sind in den LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-}A5Tr Tieren höher als in den LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr Mäusen. D: Die Radioaktivität der Lipide ist nach 2 h in den Tieren mit dem Funktionsverlust von leberspezifischen LRP1 geringer ($n \geq 6$; LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr vs. LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-}A5Tr $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$:***).

Ausgehend von signifikant höheren basalen Tg- und Chol-Leveln in der Doppelknockout-Situation im Vergleich zum LDLR-Knockout nehmen die Cholesterol (Abb. 25A)- und Triglyzerid-Werte (Abb. 25B) in beiden Genotypen stetig zu. Interessanterweise ist die gemessene Radioaktivität von den Lipiden in den Doppel-Knockout Tieren sogar etwas niedriger, nach 120 min sogar signifikant.

4. Ergebnisse

Daher scheinen in den LDLR-defizienten Mäusen mit gleichzeitigem leberspezifischen LRP1-Knockout weniger VLDL-Partikel gebildet zu werden. Damit ist auch in den Doppelknockout-Tieren die VLDL-Produktion nicht gesteigert. Dieses kann deshalb nicht der Grund für die nicht mehr vorhandene Reduzierung der Tg durch das ApoA5-Transgen sein. Die ApoA5-Konzentrationen in der alb-LRP1^{-/-}-Gruppe sind im präpandialen Zustand ungefähr 2,5-fach höher als bei der LRP1^{+/+}-Gruppe. Wie auch schon bei dem zuvor beschriebenen Mausmodell, nehmen die ApoA5-Konzentrationen nach 30, 60 sowie 120 min kontinuierlich ab, in der LRP1^{+/+}-Situation von einem Ausgangswert von 73±8 ng/ml auf einen Endwert von 15±2 µg/ml, und bei der alb-LRP1^{-/-}-Situation von 128 ± 17 ng/ml auf 26 ± 6 ng/ml.

In diesem Mausmodell wurde auch der Turnover und die Organaufnahme von radioaktiv markierten TRL studiert. Die radioaktiv markierten Partikel wurden erneut von S.Nilsson hergestellt. Diese trugen als Kernmarkierung ³H-Retinolpalmitat und als Triglyzeridmarkierung ¹⁴C-Ölsäure (Abb. 26).

4. Ergebnisse

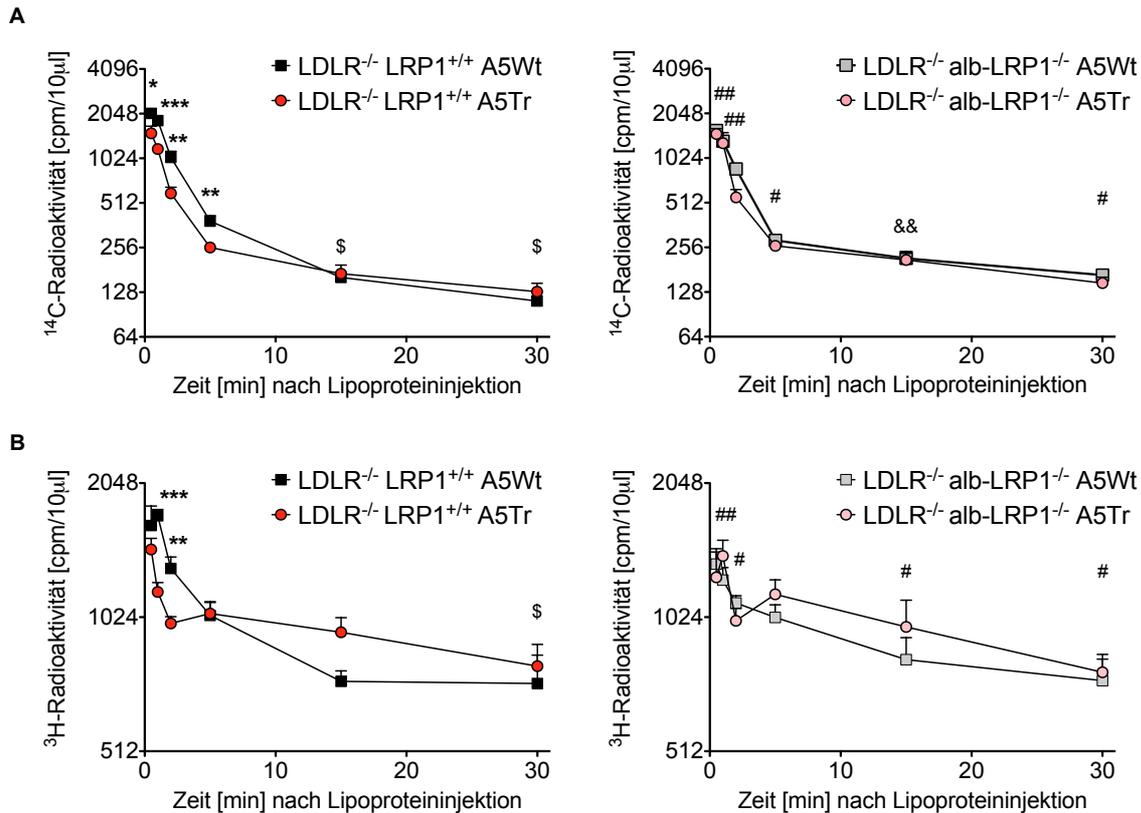


Abb. 26: Turnover von radioaktiv markierten CM aus Ratten

A: Beim ^{14}C -Label ist eine ApoA5 beschleunigte Aufnahme innerhalb der ersten Minuten ersichtlich, jedoch nicht mehr bei leberspezifischen LRP1-Knockout. Die ^{14}C -Radioaktivität im Plasma ist bei den ApoA5-Wildtyp Tieren mit LDLR- und leberspezifischer LRP1-Deletion deutlich erhöht im Vergleich zu den Mäusen mit alleiniger LDLR-Deletion. Ebenso im Falle des ApoA5-Transgens. ($n \geq 6$; LDLR^{-/-} LRP1^{+/+} A5Wt vs. LDLR^{-/-} LRP1^{+/+} A5Tr $P < 0,05$: *, $P < 0,01$: **, $P < 0,001$: ***; LDLR^{-/-} LRP1^{+/+} vs. LDLR^{-/-} alb-LRP1^{-/-} $P < 0,01$ # $P < 0,01$: ##; LDLR^{-/-} LRP1^{+/+} vs. LDLR^{-/-} alb-LRP1^{-/-} A5Tr $P < 0,05$: \$; LDLR^{-/-} alb-LRP1^{-/-} vs. LDLR^{-/-} alb-LRP1^{-/-} A5Tr $P < 0,01$: &&).

In den LDLR^{-/-} LRP1^{+/+} Tieren ist innerhalb der ersten 5 min ein signifikanter ApoA5-Transgen Effekt erkennbar, beim ^3H -Kernlabel nur innerhalb der ersten 2 min. Dann ist bis zum Versuchsende, also nach 30 min, keine beschleunigte Abnahme der Radioaktivität im Plasma mehr durch das ApoA5-Transgen vorhanden. Wie erwartet sind in der Doppelknockout-Situation keinerlei Unterschiede in der Radioaktivitäts-Abnahme zwischen ApoA5-Wildtyp und ApoA5-Transgen messbar. In den Doppelknockout-Tieren ist am Ende des Versuchs sowohl beim ApoA5-Wildtyp als auch beim ApoA5-Transgen eine signifikant höhere ^{14}C -Radioaktivität, sowie ^3H -Radioaktivität im Plasma als bei der entsprechenden LDLR^{-/-} LRP1^{+/+}

4. Ergebnisse

Gruppe messbar. Wider Erwarten ist die gemessene Radioaktivität in den untersuchten Organen von LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Wt und LDLR^{-/-}alb-LRP1^{+/+}A5Tr Mäusen nicht unterschiedlich (Abb. 27).

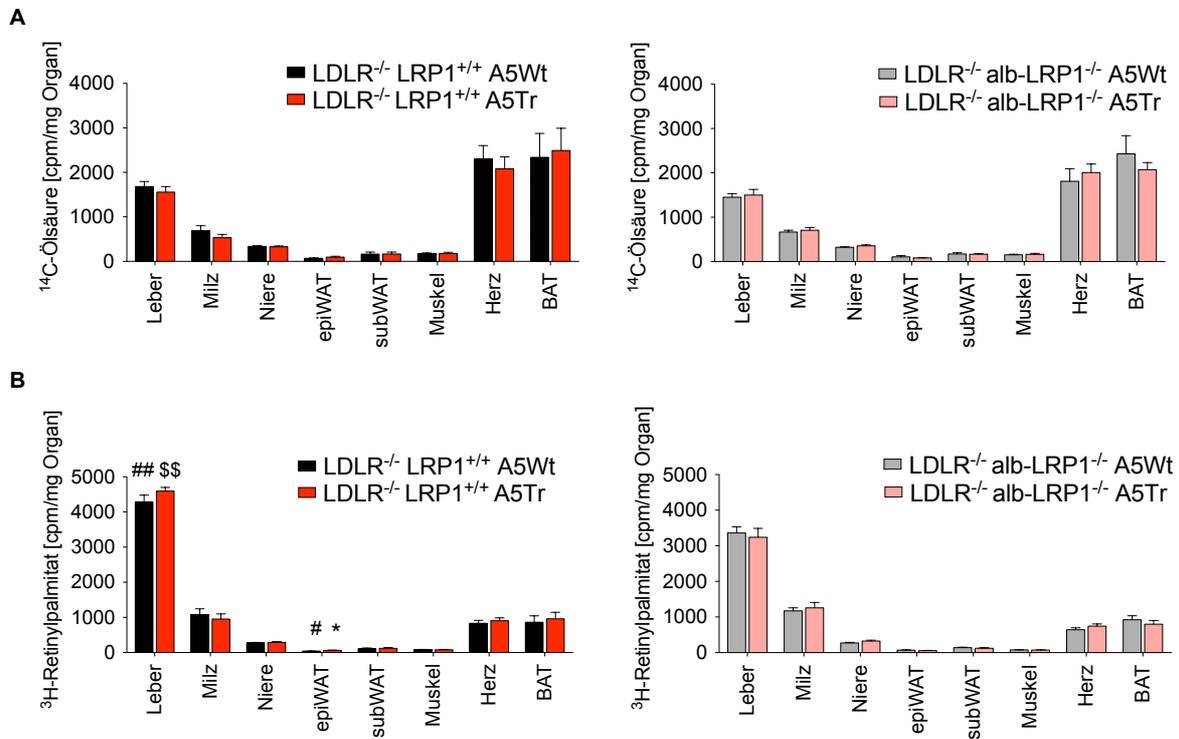


Abb. 27: Organverteilung in LDLR- und LRP1- defizienten Tieren

Sowohl beim Kern- als auch beim Tg-Label ist keine ApoA5-abhängige erhöhte Organaufnahme vorhanden, auch kein LRP1-abhängiger ApoA5-Effekt. Jedoch ist eine LRP1-abhängige signifikant erhöhte Leberaufnahme ersichtlic. ($n \geq 6$; LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Wt vs. LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr $P < 0,05$; *; LDLR^{-/-}LRP1^{+/+} vs. LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-} $P < 0,01$ # $P < 0,01$; ##; LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr vs. LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-}A5Tr $P < 0,05$; \$, $P < 0,01$; \$\$).

Bei der Organverteilung ist erkennbar, dass ApoA5 im Vergleich zur LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Wt Kontrollgruppe weder die ¹⁴C-Aufnahme in die Leber noch in ein anderes der untersuchten Organe beschleunigt. Bei der ³H-Markierung ist nur lediglich eine signifikante erhöhte Aufnahme ins epididymale Fettgewebe, einem LPL-exprimierenden Organ, bei den LDLR^{+/+}LRP1^{+/+}A5Tr Tieren messbar. Aus diesen Daten ist zu schließen, dass nach einer Versuchsdauer von 30 min keine Unterschiede in der Organverteilung erkennbar sind. Weiterhin ist den Daten zu entnehmen, dass LRP1 in der Leber bei Abwesenheit des LDLR nicht für eine

4. Ergebnisse

ApoA5-vermittelte erhöhte Aufnahme relevant ist. Die Folge einer leberspezifischen LRP1-Defizienz auf einem LDLR-defizienten Hintergrund führt jedoch sowohl in ApoA5-Wildtyp als auch in ApoA5-transgenen Tieren zu einer merklich verminderten Leberaufnahme. Diese Organverteilung spiegelt auch die erhöhte ³H-Radioaktivität nach 30 min im Plasma wieder (Abb. 27B).

4.4.3 in vitro Studien

In Versuchen mit primären Hepatozyten sollte nun die Funktion von leberspezifischen LRP1 für ApoA5 weiter aufgeklärt werden. Die primären Hepatozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ApoA5-defizienten HDL-Partikeln stimuliert und es wurden die ApoA5-Konzentrationen im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Diese Stimulationen zeigen, dass HDL die Sekretion von ApoA5 induziert.

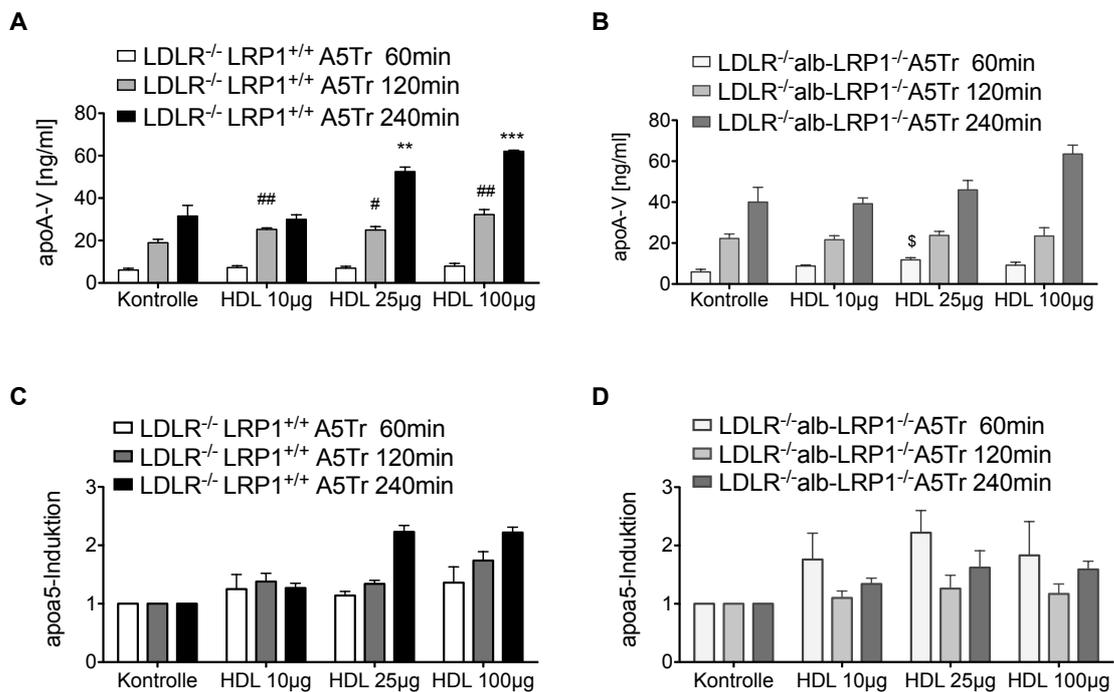


Abb. 28: HDL stimuliert die ApoA5-Sekretion in den Zellkulturüberstand

Mit zunehmender HDL-Konzentration und Versuchsdauer steigt die Sekretion von ApoA5 in den Zellkulturüberstand (A) bei Anwesenheit von hepatischen LRP1 und (B) in Abwesenheit von hepatischen LRP1 (ApoA5-Konzentration 60 min vs. Kontrolle 60 min: $P < 0,01$ \$; ApoA5-Konzentration 120 min vs. Kontrolle 120 min: $P < 0,05$ #, $P < 0,01$ ##; ApoA5-Konzentration 240 min vs. Kontrolle 240 min: $P < 0,01$: **, $P < 0,001$:***).

Durch Zugabe von ApoA5-defizienten HDL wird ApoA5 in den Zellkulturüberstand sekretiert. So nimmt die Sekretion mit zunehmender Zeit und steigender HDL-Menge zu. HDL-Partikel induzieren unabhängig von LRP1 in der Leber die ApoA5-Ausschüttung in den Zellkulturüberstand (Abb. 28B). Aus diesem

4. Ergebnisse

Experiment ist zu schließen, dass die Abwesenheit von LRP1 in der Leber nicht die ApoA5-Sekretion beeinträchtigt. Anschließend wurde untersucht, ob in LRP1-defizienten Hepatozyten die Aufnahme von radioaktiv markierten TRL unterschiedlich ist (Abb. 29). Dafür wurden von allen vier verschiedenen Genotypen Leberzellen isoliert, und nach 3h wurden zu den adherenten Zellen verschiedene Konzentrationen ^3H -Cholesteroleylether markierten TRL gegeben und die Aufnahme nach 20min in den Zellen gemessen. Erstaunlicherweise zeigt sich, dass nach der Entfernung des LDLR in den ApoA5-transgenen Zellen im Vergleich zu den Zellen von ApoA5-Wildtyp nicht vermehrt Partikel aufgenommen werden (Abb. 29A). Gleichzeitig nehmen die Hepatozyten, isoliert aus Doppelknockout-Mäusen, weniger Partikel auf und es existiert auch bei diesen beiden Genotypen kein ApoA5-Effekt (Abb. 29 B).

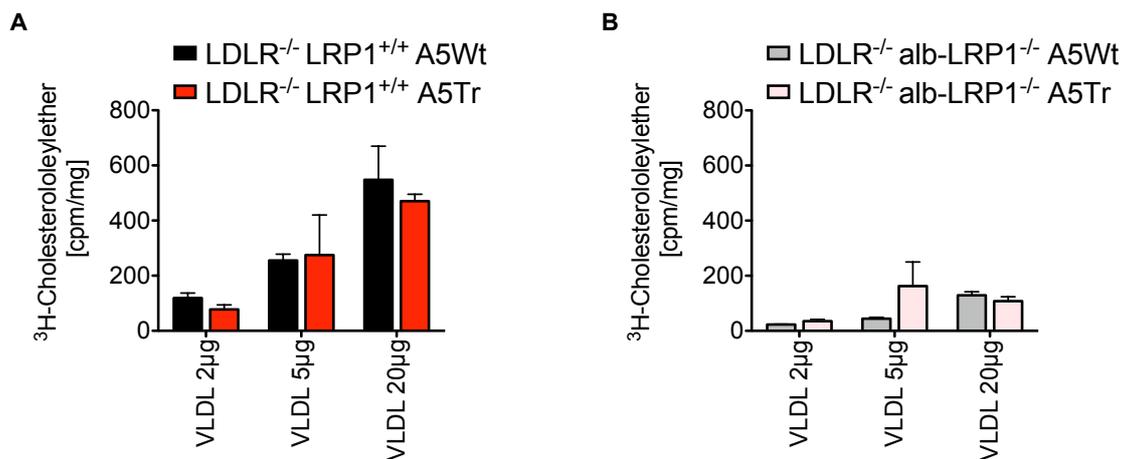


Abb. 29: Partikelaufnahme in primären murinen Hepatozyten von semikonditionalen Doppelknockout-Tieren

Es ist weder eine vermehrte Partikelaufnahme in den ApoA5-transgenen Tieren im Vergleich zur ApoA5-Wildtyp Gruppe, noch innerhalb den LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-} LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-}A5Tr erkennbar. Die Partikelaufnahme ist auf einem LDLR^{-/-}alb-LRP1^{-/-}-Hintergrund niedriger, vor allem bei höheren Konzentrationen.

Diese Ergebnisse entsprechen den in vivo Studien zur Organaufnahme.

5. Diskussion

TRL und ihre *remnants* stellen, unabhängig vom Gesamt-Cholesterolspiegel, LDL- oder HDL-Cholesterol, Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen dar (Havel, 1994; Havel, 2010; Havel, 2000).

Das 2001 entdeckte ApoA5-Gen zeigt eine starke Beeinflussung der Plasma-Triglyzerid-Spiegel. ApoA5-defiziente Mäuse zeigen um 40 % erhöhte Tg-Spiegel, dagegen zeigen Mäuse, die neben dem murinen ApoA5 das humane ApoA5-Transgen exprimieren, um 30 % reduzierte. Der Mechanismus dieser triglyzerid-senkenden Eigenschaft ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Viele Studien zeigen, dass ApoA5 LPL aktiviert. In vivo und in vitro Studien zeigten bei einer unveränderten CM-Produktion einen beschleunigten Katabolismus der TRL-Hydrolyse durch an HSPG gebundene LPL, währenddessen ApoA5 den lipolytischen Komplex stabilisiert und eine verbrückende Funktion zwischen LPL und TRL einnimmt (Fruchart-Najib et al., 2004; Merkel et al., 2005; Schaap et al., 2004). Demgegenüber gibt es auch Thesen die weitere Funktionen oder auch einen zusätzlichen Mechanismus von ApoA5 zeigen. In Zellkulturexperimenten zeigt ApoA5 eine spezifische Affinität für die Ligandenbindungs-Domäne von Lipoproteinstoffwechsel-Rezeptoren, LDLR und LRP1. Deshalb besteht die Vermutung, dass ApoA5 die Endozytose von *remnants* in die Leber vermittelt.

Diese Arbeit soll Aufschluss über mögliche Interaktionen zwischen ApoA5 und Mitgliedern der LDLR-Familie in vivo geben.

5.1. Funktion von ApoA5 im extrazellulären Bereich

5.1.1 Rolle des LDLR für die Funktion von ApoA5

Die zu erwartende Senkung der Plasmatriglyzerid-Spiegel durch das ApoA5-Transgen ist in dem Mausmodell mit LDLR-defizientem Hintergrund vorhanden (Abb. 11B). Ein Unterschied im Cholesterolprofil ist zwischen den beiden Genotypen nicht zu erkennen (Abb. 11A). In Studien mit einem adenoviralen ApoA5-exprimierenden Vektor wurden zusätzlich zu reduzierten Tg-Werten auch verringerte Chol-Spiegel, vor allem in der HDL-Fraktion, festgestellt (van der Vliet et al., 2002). Diese Diskrepanz könnte allein durch die Benutzung von adenoviral behandelten Mäusen entstehen, da durch den Adenovirus unphysiologisch hohe Spiegel von ApoA5 entstehen.

In vielen anderen Arbeiten konnte nach einer oralen Fettbelastung gezeigt werden, dass der Anstieg der Plasmatriglyzerid-Spiegel durch das ApoA5-Transgen deutlich vermindert ist (Schaap et al., 2004; Fruchart-Najib et al., 2004). Daher wurde untersucht, ob ein Fehlen des LDLR diesen verminderten Anstieg beeinträchtigen kann (Abb. 13). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der plasmatische Triglyzerid-Anstieg durch das ApoA5-Transgen signifikant vermindert ist, trotz eines LDLR-defizienten Hintergrunds (Abb. 13B). Dieser verminderte Tg-Anstieg könnte aus einer gesteigerten Verstoffwechslung von TRL durch eine beschleunigte Hydrolyse oder mittels einer erhöhten *remnant*-Aufnahme entstehen, möglicherweise auch durch eine Kombination beider Prozesse.

Um Aufschluss über unterschiedliche TRL-Abbau- und Aufnahmeraten sowie der TRL-Verteilung in Organe zu erhalten, wurden Studien mit radioaktiv markierten TRL durchgeführt. Bei der Hydrolyse zeigen ApoA5-transgene Tiere eine deutliche Beschleunigung (Abb. 14A) und eine erhöhte Aufnahme des Triglyzeridlabels in die Leber im Vergleich zu ApoA5-Wildtyp Mäusen (Abb. 14B). Die erhöhte Aufnahme in die Organe könnte durch die Aufnahme von CR, noch reich an Tg, entstehen, oder auch durch die Aufnahme von Fettsäuren, die bei der Hydrolyse von CM entstehen. Die Aufnahme im Muskelgewebe, einem LPL-exprimierenden Organ, war ebenso

erhöht, nicht dagegen in anderen LPL-exprimierenden Organen, wie bspw. Fettgewebe oder Herz (Abb. 14B). ApoA5 erhöht die Leberaufnahme von TRL-*remnants*, bedingt durch eine beschleunigte Hydrolyse und/oder vermehrte *remnant*-Aufnahme in die Leber, möglicherweise durch Interaktionen zwischen Lipoprotein-Stoffwechsel-Rezeptoren und ApoA5. Die Schlussfolgerung aus den in der Arbeit durchgeführten Experimenten ist, dass der LDLR dafür nicht relevant zu sein scheint.

5.1.2 Rolle des hepatischen LRP1 für die Funktion von ApoA5

In vitro konnte eine Bindung zwischen ApoA5 und Lipoprotein-Rezeptoren, u.a. an LRP1, festgestellt werden (Nilsson et al., 2007). Diese Bindung konnte durch RAP, einem Liganden für Lipoprotein-Rezeptoren, unterbunden und durch Heparin beeinträchtigt werden. Daher soll die physiologische Bedeutung von LRP1 für ApoA5 untersucht werden. Da eine Deletion von LRP1 nicht mit der Embryonalentwicklung kompatibel ist, wird LRP1 in der Leber konditional durch das cre-loxP System zerstört (Rohlmann et al., 1998). In den Cholesterolprofilen von gefasteten Mäusen ist erneut kein Effekt des ApoA5-Transgens auf die HDL-Spiegel zu erkennen (Abb. 15). Diese Daten entsprechen den Ergebnissen der Studie von Rohlman et al.. Weiterhin ist ersichtlich, dass ein leberspezifischer LRP1-Knockout nicht die HDL-Spiegel beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Basford et al. eine Verringerung der HDL-Cholesterol-Spiegel gezeigt, wenn LRP1 leberspezifisch deletiert ist (Basford et al., 2011). Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die unterschiedlichen Hintergründe der Mauslinien zurückzuführen. Die Triglyzerid-Spiegel in der VLDL-Fraktion sind deutlich durch das ApoA5-Transgen verringert im Gegensatz zum ApoA5-Wildtyp (Abb. 16). Erstaunlicherweise ist diese Tg-Verringerung beim Fehlen von LRP1 in der Leber nicht ersichtlich. Obwohl in anderen Studien gezeigt wurde, dass der LDLR eine leberspezifische LRP1-Defizienz durch eine Hochregulation ausgleichen kann, scheint dieses nicht im Falle einer möglichen Interaktion für ApoA5 mit LRP1 zu gelten. Dagegen tendieren die Tg-Werte von den ApoA5-Wildtyp Mäusen beim Fehlen von LRP1 in der Leber nicht zu

5. Diskussion

veränderten Lipidwerten im Plasma. Erst bei einem zusätzlichen LDLR-defizienten Hintergrund wird eine Funktion von LRP1 für die *remnant*-Aufnahme ersichtlich (Rohlmann et al., 1998; Gordts et al., 2009). Mäuse auf einem LDLR-defizienten Hintergrund mit gleichzeitiger leberspezifischer LRP1-Deletion wiesen eine deutlich vermehrte Akkumulation von *remnants* im Vergleich zu LDLR-defizienten Mäusen auf. Die Plasmadaten der hier verwendeten Mauslinie, mit einem semikonditionalen leberspezifischen LRP1-Knockout auf einem LDLR-defizienten Hintergrund, deuten auf entsprechende Ergebnisse (Abb. 24). Generell führt ein Knockout von LDLR und leberspezifischem LRP1 zu einer deutlichen Akkumulation von TRL *remnants*. Ein alleiniger Knockout von LRP1 in der Leber führt nicht zu Erhöhung des Tg-Gehalts im Plasmaspiegel (Abb. 24A), da wie von Rohlmann et al. gezeigt, der LDLR kompensatorisch hochreguliert wird. Weiterhin scheint LRP1 eine bedeutende Rolle bei der Entfernung postprandialer Lipoproteine zu spielen (Laatsch et al., 2009a), wohingegen andere Daten nur die präprandiale Situation aufzeigen. Im Falle eines gleichzeitigen Knockouts von LDLR und LRP1 in der Leber werden die Triglyzerid- und Cholesterolspiegel in der LDL-Fraktion durch eine Akkumulation von TRL-*remnants* deutlich angehoben (Abb. 24B). Dieses ist eine Bestätigung für die Relevanz von LRP1, neben dem LDLR, für die Entfernung von TRL-*remnants*. Bezüglich des ApoA5-Transgens ist der Tg-Gehalt in der VLDL-Fraktion im Vergleich zum ApoA5-Wildtyp reduziert. Weiterhin werden durch das ApoA5-Transgen die Chol-Spiegel leicht gesenkt, wobei dieses aber erneut nicht die HDL-, sondern die LDL-Fraktion betrifft (Abb. 24A). In beiden Mauslinien ist in den leberspezifischen LRP1-defizienten Tieren kein ApoA5-Effekt bezüglich der VLDL-Tg zu erkennen, jedoch werden TRL-*remnants* durch das ApoA5-Transgen vermindert (Abb. 24B). Was könnte der Grund für diese Tg-Verringerung sein? Bedingt durch die Interaktion zwischen ApoA5 mit LPL, HSPG und GPIHBP1 wird postuliert, dass ApoA5 am vaskulären Endothel eine verbrückende Funktion zwischen TRL und HSPG- oder GPIHBP1-gebundener LPL einnimmt, wodurch der lipolytische Komplex stabilisiert und die Hydrolyse beschleunigt wird (Lookene et al., 2005; Sun et al., 2006; Gin et al., 2007; Gin et al., 2008; Gin et al., 2011). Weiterhin sollen HSPG eine Funktion als

5. Diskussion

Rezeptoren bei der *remnant*-Aufnahme einnehmen, wahrscheinlicher ist jedoch, dass diese nach Eintreten von *remnants* in den Disse-Raum die erste Bindung an die Zelloberfläche vermitteln und anschließend die *remnants* über LDLR und LRP1 internalisiert werden. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten semikonditionalen Doppelknockout-Mausmodells, könnten HSPG vermutlich eine Rolle als Lipoprotein-Rezeptoren spielen. Damit wäre eine Verringerung der akkumulierten *remnants* durch das ApoA5-Transgen erklärbar. Die Auswirkung eines Doppelknockouts von LDLR und LRP1 in der Leber in Bezug auf den Lipoproteinstoffwechsel sind noch recht unklar und Aufschluss darüber sollten metabolische Studien in diesen Tieren geben. In beiden Mausmodellen existiert keine Tg-Verringerung durch das ApoA5-Transgen, daher wurde untersucht, ob die VLDL-Produktion in diesen Tieren unterschiedlich ist. In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass durch das ApoA5-Transgen weder die VLDL- noch die CM-Produktion beeinflusst wird. Es wurde in ApoA5-transgenen Tieren sogar eher eine leicht erhöhte VLDL-Produktion festgestellt, was mit einer gesteigerten TRL-Aufnahme bedingt durch die beschleunigte Hydrolyse durch das ApoA5-Transgen erklärbar ist (Merkel et al., 2005). Daher wurde in dieser Arbeit nicht der Einfluss des ApoA5-Transgens auf die VLDL-Produktion untersucht, sondern nur eine mögliche Auswirkung des LRP1 und des Doppelknockouts in Tieren, die das humane ApoA5-Gen exprimieren (Abb. 18, Abb. 25). Die VLDL-Produktion der verschiedenen Genotypen ist nicht erhöht in den leberspezifischen LRP1-defizienten Mäusen und tendiert zur reduzierten VLDL-Synthese in den leberspezifischen LRP1-defizienten Gruppe. Diese leicht verringerte VLDL-Synthese wurde auch in einer anderen Studie in einem Mausmodell, mit einem Funktionsverlust von LRP1 durch die Inaktivierung des distalen NPxY-Motivs in der intrazellulären Domäne von LRP1, gefunden (Gordts et al., 2009). Da eher eine gesteigerte VLDL-Produktion im Falle des LRP1-Knockouts die hohen Tg-Werte erklärt hätte, scheint dieses nicht der Grund für den fehlenden ApoA5-Transgen Effekt zu sein. Interessanterweise sind die ApoA5-Konzentrationen in der LRP1Ko-Situation deutlich höher als in der LRP1Wt-Situation; nach der Injektion von Tyloxapol nehmen die Konzentrationen

5. Diskussion

konstant ab (Abb. 18C, Abb. 25C). Es wird angenommen, dass ApoA5 mit HDL assoziiert im Plasma vorliegt und dann in der postprandialen Phase von HDL auf VLDL transferiert wird (Merkel et al., 2005; Shu et al., 2007). Möglicherweise könnten die abnehmenden ApoA5-Konzentrationen im Plasma mit folgender Theorie erklärbar sein: ApoA5 wird bei fehlender Lipolyse nicht von HDL auf TRL transferiert. Deshalb könnte ApoA5 gemeinsam mit HDL oder selektiv z.B. über SR-B1 in die Leber aufgenommen werden. Eine andere Begründung für die abnehmenden ApoA5-Konzentrationen ist, dass das Detergenz Triton die Plasmamembran angreift, permeabilisiert und die sinkenden ApoA5-Spiegel nur ein unspezifischer Effekt hiervon sind. Allerdings ist für dieses Szenario die Rolle von LRP1 unklar.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob das Fehlen von LRP1 in der Leber den bereits in anderen Studien gezeigten verminderten postprandialen Tg-Anstieg, vermittelt durch das ApoA5-Transgen, beeinträchtigt (Fruchart-Najib et al., 2004; Merkel et al., 2005). Tiere mit dem ApoA5-Transgen zeigten wie erwartet einen verminderten Anstieg der Triglyzeride im Plasma im Vergleich zu den ApoA5-Wildtyp Mäusen (Abb. 17). Dieser verringerte Anstieg ist mit einer beschleunigten Hydrolyse und/oder einer beschleunigten *remnant*-Aufnahme vereinbar. Laatsch et al. zeigten, dass unter postprandialen Bedingungen Insulin eine LRP1-Translokation von intrazellulären Endosomen zur Plasmamembran von Hepatozyten induziert (Laatsch et al., 2009a). Unter diesen Bedingungen kann dann die vermehrte LRP1-abhängige Endozytose von CR stattfinden. Demzufolge könnte die beschleunigte Abnahme der Tg-Spiegel mit einer erhöhten Leberaufnahme begründet sein. Die ApoA5-Wildtyp Tiere zeigen jedoch keine Unterschiede im Tg-Verlauf zwischen Expression und Nicht-Expression von LRP1 in der Leber. Dieses wiederum deutet darauf hin, dass beim leberspezifischen Fehlen von LRP1 der LDLR kompensatorisch hochreguliert wird (Rohlmann et al., 1998). Weiterhin könnten postprandial zusätzliche Rezeptoren, wie z.B. HSPG, eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich aber feststellen, dass mögliche andere Rezeptoren postprandial nicht die Bedeutung von LRP1 für ApoA5 kompensieren können.

5. Diskussion

Interessanterweise zeigen die leberspezifischen LRP1-defizienten Tiere im gefasteten Zustand höhere ApoA5-Konzentrationen als LRP1-Wildtyp Mäuse (Abb. 17B, Abb. 18C), ebenso die leberspezifischen LRP1-defizienten Mäuse auf einem LDLR-defizienten Hintergrund (Abb. 24C). Bei gleichbleibendem HDL-Chol-Gehalt nimmt der ApoA5-Gehalt in der HDL-Fraktion zu, weshalb, wie beim ApoE, pro HDL-Partikel mehrere ApoA5 assoziiert sein können. Als Ursache dieser Konzentrationszunahme von ApoA5 im Plasma beim Fehlen von LRP1 in der Leber wurden folgende Theorien aufgestellt. ApoA5 vermittelt wie ApoE die Aufnahme von *remnants* in die Leber und wird nach der Endozytose entweder lysosomal abgebaut, wie in einer Studie gezeigt (Nilsson et al., 2008), möglicherweise aber auch resekretiert. Beim Fehlen von LRP1 können die *remnants* nicht mehr oder nur teilweise in die Leber aufgenommen werden. Mit höheren Tg-Spiegeln gehen auch höhere ApoA5-Konzentrationen einher. Möglicherweise wird das nicht-endozytierte ApoA5 dann wieder von *remnants* auf HDL transferiert (Abb. 30). Ebenso ist es denkbar, dass LRP1 für die Sekretion von ApoA5 entscheidend ist. Durch die hohen Konzentrationen des Proteins an der Leberzellmembran (Weinberg et al., 2003; Beckstead et al., 2003), wäre es vorstellbar, dass neben einem ApoA5-Plasma-Pool ApoA5 auch an der Plasmamembran an LRP1 gebunden vorliegen könnte. Eine Zerstörung von LRP1 in der Leber resultierte dann in erhöhten ApoA5-Konzentrationen im Plasma. Durch den erhöhten ApoA5-Gehalt im Plasma wäre wiederum die TRL-Hydrolyse beschleunigt, deren *remnants* aber nicht aufgenommen werden können (Abb. 31). Diese zwei Theorien sind in den folgenden Abbildungen dargestellt:

5. Diskussion

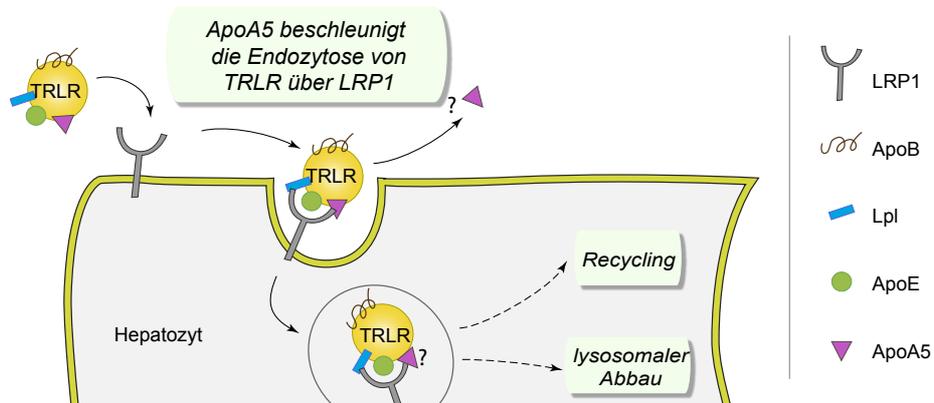


Abb. 30: Interaktion zwischen ApoA5 und LRP1

ApoA5 vermittelt die Endozytose von TRL-remnants über LRP1. Intrazellulär könnte ApoA5 entweder abgebaut oder recycelt werden.

Alternativ wäre auch das folgende Modell mit den generierten Daten vorstellbar:

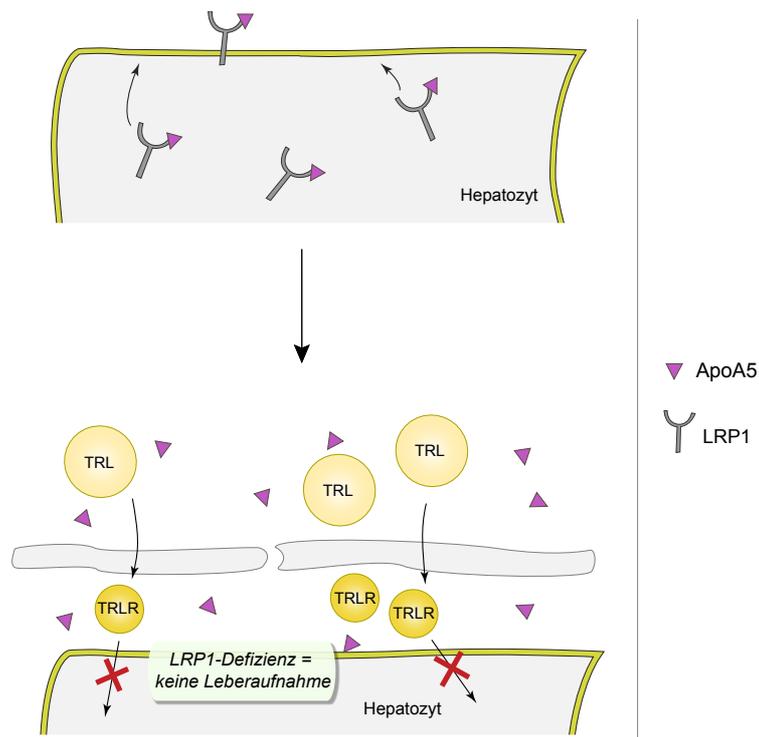


Abb. 31: LRP1 ist wichtig für die ApoA5-Sekretion

ApoA5 ist in Hepatozyten an LRP1 gebunden und vermittelt dort die Endozytose von remnants. Im leberspezifischen LRP1-defizienten Mausmodell nehmen die ApoA5 Konzentrationen im Plasma und der Tg-Gehalt durch die akkumulierten remnants zu.

5. Diskussion

Mittels Stimulationsstudien sollte die Bedeutung von LRP1 für ApoA5 weiter aufgeklärt werden. ApoA5 weist eine sehr starke Bindung zu HDL und zu VLDL (bevorzugt zum ersteren) auf (Wong-Mauldin et al., 2009), weshalb in dieser Arbeit der Effekt von HDL-Inkubationen auf die ApoA5-Sekretion untersucht wurde. Diese HDL-Studien mit primären Hepatozyten der verschiedenen Genotypen deuten darauf hin, dass die ApoA5-Sekretion durch HDL-Inkubationen induziert wird (Abb. 23, Abb. 28). Diese durch HDL induzierte Sekretion ist für verschiedene Apolipoproteine inklusive ApoE beschrieben worden (Heeren et al., 2006). 60 % vom aufgenommenen ApoE werden teilweise zur Zellmembran zurück dirigiert und dort resekretiert. Zunächst gelangen die aufgenommenen TRL-remnants in periphere Sortierungs-Endosomen, danach gelangt der Großteil von ApoE in Recycling-Endosomen und wird vermutlich anschließend von dort aus wieder resekretiert. Diese Resekretion wird in Hepatozyten durch HDL-Partikel oder lipidarmes ApoA1 stimuliert (Rensen et al., 2000; Heeren et al., 1999; Heeren et al., 2001; Heeren et al., 2003; Swift et al., 2001; Laatsch et al., 2012).

Ob ApoA5 eine ähnliche intrazelluläre Prozessierung erfährt wie ApoE oder lysosomal abgebaut wird, könnte in einem radiochemischen Zellkultur-Experiment, dem sogenannten *Pulse Chase*, geklärt werden, bei welchem die Zellen kurzzeitig mit radioaktiv markiertem und anschließend mit unmarkiertem ApoA5 inkubiert werden.

Weiterhin ist die Frage offen, wie ApoA5 ins Plasma sekretiert wird. Verschmilzt ApoA5 mit den HDL-Partikeln direkt an der Plasmamembran, oder erst im Plasma, wobei letzteres wegen der Hydrophobizität von ApoA5 (Weinberg et al., 2003) wohl eher unwahrscheinlich ist. Interessant wäre, ob HDL-Konzentrationen mit ApoA5-Konzentrationen korrelieren, wie z.B. im Falle der Tangier-Krankheit, die zu einer geringen HDL-Bildung führt. Die Daten zeigen weiterhin, dass unabhängig von der Expression von LRP1 in der Leber die ApoA5-Sekretion in den Zellkulturüberstand durch HDL-Partikel induziert wird. Relativ gesehen wird die ApoA5-Ausschüttung bei Hepatozyten vom leberspezifischen LRP1-Knockout Genotyp im geringeren Maße stimuliert (Abb. 23 C, D; Abb. 28C, D). In einer Studie mit ApoA5-defizienten

5. Diskussion

Mäusen wurde durch Injektion von rekombinantem ApoA5 deutlich, dass die beschleunigte Tg-Spaltung mittels ApoA5 ein sättigbarer Prozess ist (Shu et al., 2010b). Vermutlich wird bei den alb-LRP1-defizienten Hepatozyten weniger ApoA5 sekretiert, da der Gehalt im Überstand ohne HDL-Inkubation bereits höher ist als bei den Hepatozyten von LRP1-Wildtyp Mäusen, und der Zellkulturüberstand an ApoA5 gesättigt ist. Zudem ist es denkbar, dass auch ein ApoA5-Transfer von dem bereits im Überstand an HDL assoziierten ApoA5 auf die ApoA5-defizienten HDL stattfindet, ebenso wie ein Transfer von HDL-assoziierten ApoA5 auf ApoA5-defiziente VLDL gezeigt wurde (Nelbach et al., 2008). Dieser Vorgang könnte eventuell schneller ablaufen als eine weitere ApoA5-Sekretion. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die ApoA5-Sekretion durch HDL-Partikel unabhängig von LRP1 induziert wird. Damit ist es eher unwahrscheinlich, dass ApoA5 mit LRP1 sekretiert wird, da man in diesem Fall nicht einen ApoA5-Anstieg erwarten würde.

In einer von Grosskopf et al. durchgeführten Studie mit ApoA5-defizienten Mäusen wiesen diese Tiere eine verminderte *remnant*-Entfernung aus dem Plasma und eine verringerte *remnant*-Aufnahme in perfusierten Lebern auf (Grosskopf et al., 2005). Deshalb sollten metabolische Studien einen weiteren Einblick in die physiologische Bedeutung von LRP1 für ApoA5 liefern.

Die Verteilung der ³H-Radioaktivität in den Organen von ApoA5-transgenen Tieren und ApoA5-Wildtypen ist quasi identisch. Wenn LRP1 leberspezifisch ausgeknockt ist, scheint die Leberaufnahme sowohl bei ApoA5-Wildtyp als auch bei ApoA5-transgenen Mäusen merklich reduziert zu sein (Abb. 20). Obwohl, wie bereits aus anderen Studien bekannt, der LDLR im Falle eines Funktionsverlusts von LRP1 in der Leber hochreguliert wird, kann dieses nicht eine vermehrte Leberaufnahme von ApoA5-haltigen CR bewirken. Daher ist das indirekt ein Beweis dafür, dass LRP1 in der Leber unter anderem auch für die Aufnahme von CR bedeutend ist. Weiterhin ist diesen Daten zu entnehmen, dass bei Expression von LRP1 ApoA5-transgene Tiere vermehrt Fettsäuren und Partikel in die Leber aufnehmen (Abb. 20). Diese erhöhte Leberaufnahme entspricht den Ergebnissen von Turnover-Versuchen von Mäusen mit und ohne adenoviral-überexprimiertem ApoA5 (Schaap et al., 2004).

5. Diskussion

Gegensätzlich dazu findet man in LPL-exprimierenden Organen nur eine leichte Tendenz zu erhöhter Radioaktivitätsaufnahme durch das ApoA5-Transgen. Dieses ist vermutlich mit der Verwendung unterschiedlicher Partikel zu begründen.

Die erhöhte Leber-Aufnahme ist mit den zwei oben erwähnten Hypothesen erklärbar. Erstens: ApoA5 interagiert mit hepatischen LRP1 und beschleunigt dadurch die Aufnahme, es wird mit TRL endozytiert und möglicherweise wie ApoE recycelt. Zweitens: ApoA5 ist an der Leberzellmembran an LRP1 gebunden. Im Falle der Deletion von LRP1 in der Leber steigt dadurch die ApoA5-Konzentration im Plasma, wodurch die Hydrolyse beschleunigt wird, aber die entstehenden *remnants* nicht mehr aufgenommen werden können, bzw. dieses verlangsamt erfolgt, da LRP1 fehlt. Eine vermehrte Aufnahme von Radioaktivität am Versuchsende in die Organe wäre bei einer beschleunigten Hydrolyse nicht unbedingt zu erwarten, aber es müsste sich während des Versuchs wenigstens bei einer der beiden Markierungen eine erhöhte Abnahme der Plasma-Radioaktivität erkennen lassen. Weder die ¹⁴C-Triglyzeridmarkierung (Abb. 19A) noch die ³H-Kernmarkierung (Abb. 19B) sind während des Versuchs bei den alb-LRP1^{-/-}A5Tr Tieren verringert im Vergleich zu alb-LRP1^{-/-}A5Wt Mäusen. Beide zeichnen sich lediglich durch einen langsameren Turnover gegenüber LRP1^{+/+}A5Wt und LRP1^{+/+}A5Tr Tieren aus (Abb. 19). Somit sprechen diese Ergebnisse ebenso wie die in vitro Studien tendenziell dafür, dass ApoA5 die Bindung von TRL-*remnants* an LRP1 vermittelt und diese hierdurch beschleunigt entfernt werden. Den Daten ist weiterhin zu entnehmen, dass ApoA5 für die Aufnahme von TRL-*remnants* ins braune Fettgewebe unbedeutend ist. Dieses entspricht der kürzlich veröffentlichten Studie von Bartelt et al., in welcher die durch ein Fehlen von ApoA5 entstehende Hypertriglyzeridämie mittels der Aktivierung des braunen Fettgewebes nahezu komplett aufhebbar ist (Bartelt et al., 2011).

Aufgrund mehrerer Studien wird ebenso angenommen, dass ApoA5 intrazellulär eine wichtige Funktion besitzt, indem dieses die Tg-Anreicherung in Lipidtropfen erleichtert oder den VLDL-*assembly* beeinflusst (Schaap et al., 2004; Shu et al., 2007; Shu et al., 2010a). Lebern von ApoA5-transgenen Mäusen enthalten höhere Tg-

5. Diskussion

Konzentrationen im Vergleich zu ApoA5-Wildtyp Mäusen (Shu et al., 2010a). Die Autoren schlossen daraus, dass ApoA5 möglicherweise die Tg-Anreicherung erleichtert. Andererseits könnte ein höherer Tg-Gehalt in der Leber durch eine vermehrte *remnant*-Aufnahme, bedingt durch eine beschleunigte Hydrolyse aber auch schnelle *remnant*-Aufnahme an sich, entstehen. Wenn man nun die Ergebnisse unserer Turnover-Daten betrachtet, resultieren höhere Leber-Tg-Konzentrationen in ApoA5-transgenen Tieren vermutlich aus einer beschleunigten *remnant*-Aufnahme. Weiterhin spricht gegen eine bevorzugte intrazelluläre ApoA5-Funktion, dass in vivo der Großteil des ApoA5-Gehalts im Plasma höher ist als intrazellulär, gegensätzlich zu in vitro Daten (Shu et al., 2010a).

Widersprüchlich sind die Daten der Abbau- und Aufnahmestudien der LDLR-defizienten Mäuse mit konditionalem Knockout von LRP1 in der Leber durch das cre/loxP-System (Abb. 26, Abb. 27). Nach einem ausgeprägten Lipolyse-Effekt innerhalb der ersten Minuten durch das ApoA5-Transgen in der LRP1Wt-Situation zeigt sich vor allem in Leber keine erhöhte Aufnahme, ebenso nicht in LPL-exprimierende Organe wie Muskel- oder Fettgewebe. Obwohl die Plasmadaten einen ApoA5-Transgen Effekt bezüglich der VLDL-Tg in gefasteten LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5TR Tieren aufweisen (Abb. 24), welcher durch den Funktionsverlust vom leberspezifischen LRP1 nicht mehr vorhanden ist, scheint in metabolischen Studien kein Unterschied zwischen dem ApoA5-Transgen und dem ApoA5-Wildtyp zu sein. Dieses ist widersprüchlich zu den Ergebnissen der anderen Mauslinien, vor allem zu den Daten der Mauslinie mit dem LDLR-defizienten Hintergrund mit und ohne ApoA5-Transgen. Diese zeigen, dass trotz des Verlustes vom LDLR ApoA5-transgene Mäuse reduzierte Plasma-Tg besitzen (Abb. 11), sowie über eine beschleunigte TRL-Hydrolyse und TRL-Aufnahme (Abb. 14) im Vergleich zu ApoA5-Wildtyp verfügen. Eine Begründung könnte sein, dass die Mausstämme andere Hintergründe aufweisen. Bei den LDLR-defizienten Mäusen mit und ohne das ApoA5-Transgen handelt es sich um den reinen weißen FVB-Stamm. Die Mauslinie mit dem semikonditionalen Doppelknockout vom LDLR mit hepatischem LRP1-Knockout mit und ohne ApoA5-Transgen hat einen Mix-Background aus

5. Diskussion

C57BL/6J Mäusen und FVB-Tieren. Da innerhalb der Mauslinien genetisch große Unterschiede existieren, wäre es denkbar, dass die anfänglich sehr ausgeprägte, beschleunigte Hydrolyse durch das ApoA5-Transgen und eine damit verbundene erhöhte TRL-Aufnahme bzw. unterschiedliche Organverteilung bei einer kürzeren Experimentdauer zu finden gewesen wären. Zudem waren diese Tiere älter als die FVB-Mäuse.

Aus diesen metabolischen Studien ist aber ebenso ersichtlich, dass LRP1 in der Leber wichtig für die Aufnahme von *remnants* ist. Für diese Aufnahme sind folgende drei Rezeptoren bedeutend: LDL, LRP1 und HSPG, wobei die Wirkungsweise der einzelnen Rezeptoren unterschiedlich ist. Nach der Endozytose zirkuliert der LDLR in einem Clathrin-abhängigen Prozess im 5-10 min-Takt zwischen den endosomalen Kompartimenten und der Zellmembran (Brown et al., 1981; Brown et al., 1983; Brown and Goldstein, 1986b; Goldstein and Brown, 1990), währenddessen Syndekan-1 in einem Clathrin-unabhängigen Prozess (Fuki et al., 2000; Wilsie et al., 2006) in einem 20-60 min-Takt zirkuliert. LRP1 wird dagegen erst in der postprandialen Phase vom endosomalen System vermehrt an die Zellmembran befördert (Laatsch et al., 2009). Demzufolge sind die in dieser Arbeit, sowie in der Studie von Rohlman et al. (1998), gefundenen nicht erhöhten Plasma-Tg-Spiegel bei Fehlen von leberspezifischen LRP1 in der präprandialen Phase, zum Teil damit erklärbar, dass LRP1 postprandial eine bedeutendere Funktion als Lipoprotein-Rezeptor einnimmt als präprandial. Ein zusätzlicher Aspekt ist, dass die Bedeutung von LRP1 in der Leber durch die Interaktion zwischen ApoE und LRP1 (Beisiegel et al., 1989), sowie für die CR-Entfernung gezeigt wurde, wobei aber der LDLR die Funktion von LRP1 maskiert (Willnow et al., 1994). Unsere Studien sowie jene von Rohlman et al. zeigen, dass sich die präprandialen und postprandialen Tg-Spiegel nach oraler Fettbelastung nicht unterscheiden, solange nicht auch der LDLR ausgeknockt ist, da dieser durch eine Hochregulation einen Funktionsverlust des leberspezifischen LRP1 ausgleichen kann (Rohlmann et al., 1998). Für die triglyzeridsenkende Funktion des ApoA5-Transgens ist jedoch das Vorhandensein von LRP1 auch in der präprandialen Phase entscheidend.

5. Diskussion

Mehrere *in vivo* Studien zeigten, dass eine Deletion von HSPG in der Leber zu einer deutlichen Akkumulation von CR im Plasma führt (MacArthur et al., 2007; Stanford et al., 2009b; Stanford et al., 2010; Bishop et al., 2010; Deng et al., 2012). Da diese im Gegensatz zum LRP1 auch bei Expression vom LDLR vorhanden ist, schlossen daraus die Autoren, dass LRP1 in der Leber für die CR-Aufnahme nur eine unwesentliche Rolle spielt, zumindest bei Expression vom LDLR. Unsere metabolischen Studien deuten bei annähernd identischen Hydrolyseraten in den zwei zu vergleichenden Gruppen während des Versuchs, am Versuchsende erstaunlicherweise auf eine deutlich erhöhte Radioaktivität im Plasma der alb-LRP1^{-/-} Tieren (Abb. 17) hin. Dementsprechend ist die Aufnahme von radioaktiv markierten CR in die Leber bei einem Funktionsverlust von LRP1 merklich reduziert (Abb. 18). Bei den zwei radioaktiven Markierungen handelt es sich um eine Kernmarkierung und um eine Tg-Markierung. Die Ab- und Aufnahmerate der Tg-Markierung ist nicht verschieden zwischen LRP1^{+/+} und alb-LRP1^{-/-} Tieren, in der LRP1^{+/+} Situation ist jedoch die Aufnahme von der Partikelmarkierung erhöht. Dieses ist auch in semikonditionalen Doppel-Knockout Tieren vom LDLR und leberspezifischen LRP1 zu erkennen (Abb. 25). Es stellt sich die Frage, wie unsere Ergebnisse mit denen der anderen Studien zusammenpassen, welche LRP1 in der Leber eine unbedeutende Rolle als Lipoprotein-Rezeptor zuweisen. Grundsätzlich geht man nach Eintreten von *remnants* in den Disse-Raum von folgenden Prozessierungsschritten aus (Mahley and Huang, 2007; MacArthur et al., 2007; Bishop et al., 2008a; Stanford et al., 2009a; Foley and Esko, 2010; Deng et al., 2012; Nilsson et al., 2011).

1. Zunächst binden *remnants* in einem schnellen Prozess, vermittelt durch ApoE, LPL und möglicherweise auch durch ApoA5, an leberspezifische stark sulfatierte HSPG.
2. Dort werden sie durch HL und eventuell durch LPL weiter lipolytisch prozessiert.
3. Nun folgt in einem langsam verlaufenden Schritt die Aufnahme in die Leber über den LDLR, einem LRP1-HSPG-Komplex, oder direkt mittels HSPG, bei denen Syndekan-1 entscheidend ist.

5. Diskussion

Welche Auswirkungen könnte ein leberspezifischer LRP1-Knockout auf den zweiten Schritt, der weiteren lipolytischen Prozessierung haben? Unabhängig vom leberspezifischen LRP1-Knockout sollten die Partikel weiter lipolysiert werden, wobei die entstehenden Fettsäuren aufgenommen werden können. Möglicherweise verbleiben die *remnants* im Falle des LRP1-Knockouts länger an den HSPG gebunden. Im Falle der leberspezifischen Expression von LRP1 würde dieser Lipolyseschritt kürzer andauern als bei LRP1-defizienten Tieren, da die Partikel, welche auch noch Tg enthalten, in die Leber aufgenommen werden können. Deshalb sieht man vermutlich im ^{14}C -Ölsäure Label keinen Unterschied, bei der ^3H -Kernmarkierung aber eine erhöhte Aufnahme sowohl bei LRP1^{+/+} (Abb. 18) als auch bei LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}-Tieren (Abb. 26). Bei den Tieren, die noch das humane ApoA5-Transgen exprimieren, also LRP1^{+/+}A5Tr und LDLR^{-/-}LRP1^{+/+}A5Tr ist ebenfalls eine vermehrte Leberaufnahme von TRL vorhanden (Abb. 20, Abb. 27). Außerdem muss bei dem Hydrolyselabel beachtet werden, dass die Leber zum Ende des Versuchs vermutlich neue VLDL-Partikel synthetisiert und sekretiert, welche dann die revereesterten radioaktiv-markierten Fettsäuren enthalten. Weiterhin konnte in den anderen oben genannten HSPG-Deletions-Studien (Stanford et al., 2009a; Deng et al., 2012; Deng et al., 2011) nicht ausgeschlossen werden, dass die gefundene *remnant*-Akkumulation und verlangsamte TRL-Entfernung von HSPG-defizienten Mäusen nicht durch einen nicht mehr stattfindenden *hand-off* Mechanismus zwischen HSPG und LRP1 (und der darauf folgenden Endozytose) vermittelt werden kann (Stanford et al., 2009a).

Die in dieser Arbeit durchgeführten metabolischen Studien mit aus Ratten isolierten radioaktiv markierten CM, lassen darauf schließen, dass LRP1, nicht nur im Falle eines LDLR-Knockouts, bedeutend für die CR-Aufnahme ist. Dementsprechend weist eine Studie mit einer spezifischen LRP1-Deletion im Fettgewebe auf eine wichtige Rolle von LRP1 im TRL-Stoffwechsel und bei der TRL-Entfernung hin (Hofmann et al., 2007). Ausgehend von dem von Merkel et al. vorgeschlagenen Modell, einer verbrückenden und stabilisierenden ApoA5-Funktion beim hydrolytischen Komplex zwischen LPL, gebunden an HSPG, und TRL am vaskulären Endothel (Merkel and Heeren, 2005), kann auch folgendes angenommen

5. Diskussion

werden: Im Disse-Raum vermittelt u.a. ApoA5 die Bindung von TRL-*remnants* an HSPG und beschleunigt zudem deren weitere Lipolyse durch LPL und HL. Anschließend vermittelt ApoA5 die Partikel-Aufnahme über einen LRP1/HSPG-Komplex in die Leber.

Gegenwärtig umstritten ist die Funktion von LRP1 und HSPG, wobei die Aufklärung der *remnant*-Aufnahme durch die überlappende Funktion der zwei Lipoproteinrezeptoren (LRP1 und LDLR) und HSPG erschwert wird, beispielsweise durch die kompensatorische Hochregulation vom LDLR in einer leberspezifischen LRP1-Knockout-Situation (Rohlmann et al., 1998). Weiterhin wird die Aufklärung durch die Tatsache beeinträchtigt, dass LRP1 und HSPG in vielen anderen Prozessen eine wichtige Funktion einnehmen und ein Knockout dieser nicht mit der Embryonalentwicklung kompatibel ist (May and Herz, 2003; Willnow et al., 2007; Bishop et al., 2007). Einen weiteren Einblick über die Funktionen der einzelnen Rezeptoren innerhalb der TRL-Stoffwechsels sollte an dieser Stelle ein Mausmodell mit semi-konditionalem Dreifachknockout von leberspezifischen LRP1, HSPG und LDLR mit humanem ApoA5-Transgen, sowie den entsprechenden Kontrollen geben.

6. Zusammenfassung

Apolipoprotein A5 (ApoA5) wurde 2001 sowohl durch vergleichende Sequenzanalysen zwischen Mensch und Maus als auch als assoziiertes Protein bei der frühen Phase der Leberregeneration entdeckt. Es gilt als einer der wichtigsten Regulatoren der Plasmatriglyzerid-Spiegel, welche als unabhängige Risikofaktoren von koronaren Herzkrankheiten (KHK) gelten. Der Mechanismus dieser Triglyzerid-Beeinflussung ist bis jetzt noch nicht im Detail aufgeklärt. Neben einer beschleunigten Verstoffwechslung von triglyzeridreichen Lipoproteinen, den CM und den VLDL, mittels erhöhter Hydrolyse durch Stimulation der Lipoproteinlipase (LPL), wurde postuliert, dass auch die *remnant*-Aufnahme in die Leber beeinflusst wird. Eine interessante Eigenschaft dieses Apolipoproteins ist nämlich dessen hohe Bindungsaffinität an die Ligandenbindungs-Domäne von Mitgliedern der LDLR-Familie. In der vorliegenden Arbeit wurde die physiologische Bedeutung einer möglichen Interaktion zwischen ApoA5 und zwei wichtigen Vertretern der LDLR-Familie, nämlich LDLR und LRP1, mit Hilfe gentechnisch veränderter Mausmodelle analysiert. Es wurden drei unterschiedliche Mausmodelle untersucht: ein LDLR-defizientes, eines mit konditionalem Knockout von LRP1 in der Leber, sowie eines mit konditionalem Knockout von LRP1 in der Leber auf einem LDLR-defizienten Hintergrund. Diese Mausmodelle exprimierten zusätzlich zum murinen ApoA5 auch humanes ApoA5. Es wurden die Plasmalipide aller Mausmodelle mit Hilfe von Dichtegradienten-Ultrazentrifugationen und FPLC's untersucht. Die lipidsenkende Eigenschaft von ApoA5 ist durch eine Deletion vom LDLR nicht verändert, jedoch ist diese bei einer leberspezifischen LRP1-Defizienz aufgehoben.

Ferner konnte gezeigt werden, dass leberspezifisches LRP1 eine bedeutende Rolle für ApoA5 spielt. Bei gleichbleibender VLDL-Produktion führt eine Deletion von LRP1 in der Leber zu einem Verlust der lipidsenkenden Funktion von ApoA5 im Plasma, zu einem erhöhten postprandialen Tg-Anstieg, einer verringerten Abnahme von radioaktiv-markierten CM, sowie zu einer reduzierten *remnant*-Aufnahme in die

6. Zusammenfassung

Leber im Vergleich zu den entsprechenden ApoA5-Transgen Mäusen mit Expression von LRP1 in der Leber. Diese vermehrte Leberaufnahme von TRL durch das ApoA5-Transgen konnte in primären Hepatozyten bestätigt werden.

Mit dieser Arbeit wurden somit neue Erkenntnisse im Bereich des Lipidstoffwechsel gewonnen, u.a. wurde die Funktion von LRP1 als Rezeptor für postprandiale Lipoproteine verfestigt. Neben der bereits bekannten Beschleunigung der Hydrolyse, vermittelt ApoA5 durch Interaktion mit LRP1 aber nicht mit LDLR die Aufnahme von atherogenen triglyzeridreichen Partikeln. Diese neubeschriebene Funktion von ApoA5 ist von hoher klinischer Relevanz, da somit die vorhandene Assoziation von ApoA5 mit kardiovaskulären Erkrankungen erklärt werden kann.

Interessant bleibt die Frage, wie ApoA5 intrazellulär prozessiert wird und ob ApoA5 wie ApoE gegebenenfalls in Abhängigkeit von HDL zur Biogenese von antiatherogenen HDL-*Precursors* beiträgt.

7. Summary

Apolipoprotein AV (apoAV) was identified by comparative genome sequencing between human and mouse, and as a liver regeneration protein in the early phase. Presumably, the atheroprotective effect of apoAV in mice results in decreased plasma triglyceride (TG) levels. It is not yet known whether this effect reflects a faster plasmatic TG hydrolysis or an apoAV mediated faster hepatic lipoprotein uptake or both. In vitro studies suggested that apoAV may also mediate hepatic lipoprotein uptake by members of the LDL receptor family.

Therefore, this study investigated apoAV interactions with the two main lipoprotein receptor members, LDLR and LRP1, in different mouse models. The TG-lowering effect of apoAV was investigated in mice expressing the murine ApoA5 gene as well as the human ApoA5 transgene (hApoA5Tr). Therefore three different genetical modified mouse models were analysed. One with LDL receptor deficiency (LDLR^{-/-}) and a second model with conditional knockout of hepatic LRP1 (alb-LRP1^{-/-}) by site-specific recombination using the albumin-promoter-driven Cre-loxP system and respective littermate wild-type controls (hepatic LRP1^{+/+}). If LRP1 is conditionally knocked out in the liver, the LDL receptor is compensatory upregulated. Therefore, the apoAV effect was further studied in a third mouse model with conditional knockout of LRP1 in the liver on a LDLR-deficient background.

Plasma lipid levels were analyzed of all three genotypes with at least 6 animals per genotype. ApoAV decreased plasma TG levels independently of the LDL receptor expression. Surprisingly, hApoA5 transgenic mice lacking hepatic LRP1 abrogate the TG lowering effect of apoAV. Furthermore, liver-specific LRP1 plays a very important role for apoAV. Although the VLDL production is not different in the absence of LRP1 in the liver, next to an abolished TG-lowering effect, the TG-response after an oral fat load was also delayed in alb-LRP1^{-/-} mice.

7. Summary

Generally, chylomicron remnant uptake into the liver was decreased in hepatic LRP1-deficient mice as well as in double deficient animals compared to LRP1 wild-type. Accordingly, hApoA5 expression results in an increased Cr uptake compared to wild-type animals, in contrast to the animals lacking LRP1 in the liver. These findings were confirmed in experiments with primary hepatocytes of mice with indicated genotypes.

In summary, it can be said that this thesis creates new insights in lipid metabolism. The role of LRP1 as a lipoprotein receptor of postprandial remnants was confirmed. Interestingly, next to the known acceleration of the hydrolysis by apoAV, these findings clearly favor a role for apoAV in receptor mediated endocytosis of TG-rich remnant lipoproteins via interaction with hepatic LRP1. However, the LDLR is not important for decreases in triglyceride levels by apoAV.

ApoAV has been implicated in the development of cardiovascular diseases. Therefore, the newly discovered function of apoAV could be an explanation for this. Still open questions remain in the intracellular process of apoAV and if it plays an essential role in the biogenesis of atherogenic HDL-precursors like apoE.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

Chemikalien	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Albumin Fraktion V	-	-	-
Borsäure	GHS08 (Xn)	360A	201-308+313
Chloroform	GHS07 (Xi) GHS08 (Xn)	302-315-351-373	302+352-314
Collagenase clostridium histolyticum	GHS07 (Xi), GHS08 (Xn)	315-319-334-335	261-305+351+338-342+311
EDTA	GHS07 (Xi)	319	305+351+338
EGTA	-	-	-
Glucose	-	-	-
Heparin	-	-	-
Heptan	GHS02 (O) GHS07 (Xi) GHS08 (Xn) GHS09 (N)	225-304-315-336-410	210-273-301+310-331-302+ 352-403+235
Kaliumbromid	GHS07 (Xi)	315-319-335	261-305+351+338
Ketamin	GHS07 (Xi)	302-315-319-335	261-305+351+338
Lactat	-	-	-
Malonsäure	GHS07 (Xi)	302-319	260-262-305+351+338

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

Methanol	GHS02 (F), GHS06 (T), GHS08 (Xi)	225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
Natriumacetat	-	-	-
Natriumchlorid	-	-	-
Natriumkalium- tartrat	-	-	-
Natriumhydroxid	GHS05 (C)	314-290	280-301+330+331-309+310- 305+351+338
Natriumdihydro- genphosphat	-	-	-
Rompun	GHS06 (T)	301	301+310
Salpetersäure 65%	GHS03 (O); GHS05 (C)	272-314	260,280,301+330+331, 305+351+338
Salzsäure	GHS05 (C), GHS07 (Xn)	314-335	260-301+330+331-303+361 +353-305+351+338-405-501
Solvable	GHS05 (C)	314	26
Tetramethylbenzid in	-	-	-
Toluol	GHS03 (O) GHS07 (Xn) GHS08 (Xi)	225-361d-304-373-315- 336	210-301+310-331-302+352
Trizol	GHS05 (C), GHS06 (T), GHS08 (Xn)	330-301-311-314-341-3 73-412	301+330+331-301+310-304 +340-305+351+338-303+36 1+353-309+311-403+233-28 0-284-271-260-264-273

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

Tyloxapol	-	-	-
Trypsin	-	-	-
Tween20	-	-	-
Wasserstoffperoxid > 70%	GHS03 (O9) GHS05 (C) GHS08 (Xn)	271-332-302-314	220-261-280-305+351+338- 310

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

H200-Reihe: Physikalische Gefahren [Bearbeiten]

- H200 Instabil, explosiv.
- H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
- H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
- H220 Extrem entzündbares Gas.
- H221 Entzündbares Gas.
- H222 Extrem entzündbares Aerosol.
- H223 Entzündbares Aerosol.
- H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
- H242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder –Verletzungen verursachen.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H300-Reihe: Gesundheitsgefahren [Bearbeiten]

- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360A Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360B Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360C Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H360F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H361A Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H361d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H300+H310 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- H300+H310+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H300+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.
- H301+H311 Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H301+H331 Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.
- H302+H312 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.
- H302+H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
- H302+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.
- H310+H330 Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H311+H331 Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.
- H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.

H400-Reihe: Umweltgefahren [Bearbeiten]

- H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
- H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
- H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
- H420 Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

P100-Reihe: Allgemeines

- P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
- P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
- P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.

P200-Reihe: Prävention [Bearbeiten]

- P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
- P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
- P220 Von Kleidung / .../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
- P221 Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.
- P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.
- P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
- P230 Feucht halten mit
- P231 Unter inertem Gas handhaben.
- P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
- P233 Behälter dicht verschlossen halten.
- P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- P235 Kühl halten.
- P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
- P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung /... verwenden.
- P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
- P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
- P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.
- P250 Nicht schleifen / stoßen /.../ reiben.
- P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
- P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
- P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
- P263 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
- P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
- P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- P282 Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
- P283 Schwer entflammbare / flammhemmende Kleidung tragen.
- P284 Atemschutz tragen.
- P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
- P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.
- P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P300-Reihe: Reaktion [Bearbeiten]

- P301 Bei Verschlucken:
- P302 Bei Berührung mit der Haut:
- P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):
- P304 Bei Einatmen:
- P305 Bei Kontakt mit den Augen:
- P306 Bei kontaminierter Kleidung:
- P307 Bei Exposition:
- P308 Bei Exposition oder falls betroffen:
- P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:
- P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).
- P330 Mund ausspülen.
- P331 Kein Erbrechen herbeiführen.
- P332 Bei Hautreizung:
- P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:
- P334 In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.
- P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.
- P337 Bei anhaltender Augenreizung:
- P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
- P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P342 Bei Symptomen der Atemwege:
- P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.
- P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.
- P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.
- P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.
- P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.
- P370 Bei Brand:
- P371 Bei Großbrand und großen Mengen:
- P372 Explosionsgefahr bei Brand.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.
- P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.
- P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.
- P378 ... zum Löschen verwenden.
- P380 Umgebung räumen.
- P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.
- P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.
- P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301 + P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
- P302 + P334 Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.
- P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
- P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
- P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
- P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P304 + P341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
- P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
- P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.
- P307 + P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat Einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P309 + P311 Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen /nassen Verband anlegen.
- P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
- P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.
- P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.
- P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.
- P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P400-Reihe: Aufbewahrung [Bearbeiten]

- P401 ... aufbewahren.
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.
- P406 In korrosionsbeständigem / ... Behälter mit korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.
- P411 Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ... aufbewahren.
- P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.

8. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.
- P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.
- P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren
- P402 + P404 In einem geschlossenen Behälter an einem trockenen Ort aufbewahren.
- P403 + P233 Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem gut belüfteten Ort aufbewahren.
- P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.
- P411 + P235 Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.

9. Literatur

- Aberle, J., Evans, D., Beil, F. U. & Seedorf, U. A polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with weight loss after short-term diet. *Clin Genet* **68**, 152-154 (2005).
- Alaupovic, P., Lee, D. M. & McConathy, W. J. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* **260**, 689-707 (1972).
- Alborn, W. E., Johnson, M. G., Prince, M. J. & Konrad, R. J. Definitive N-terminal protein sequence and further characterization of the novel apolipoprotein A5 in human serum. *Clin Chem* **52**, 514-517 (2006).
- Aouizerat, B. E. et al. Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids. *J Lipid Res* **44**, 1167-1173 (2003).
- Baroukh, N. et al. Analysis of apolipoprotein A5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1297-1302 (2004).
- Bartelt, A. et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **17**, 200-205 (2011).
- Basford, J. E. et al. Hepatic deficiency of low density lipoprotein receptor-related protein-1 reduces high density lipoprotein secretion and plasma levels in mice. *J Biol Chem* **286**, 13079-13087 (2011).
- Baum, L., Tomlinson, B. & Thomas, G. N. APOA5-1131T>C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men. *Clin Genet* **63**, 377-379 (2003).
- Beckstead, J. A. et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. *Biochemistry* **42**, 9416-9423 (2003).
- Beckstead, J. A. et al. The C terminus of apolipoprotein A-V modulates lipid-binding activity. *J Biol Chem* **282**, 15484-15489 (2007).
- Beigneux, A. P. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* **5**, 279-291 (2007).
- Beigneux, A. P. et al. Chylomicronemia with a mutant GPIHBP1 (Q115P) that cannot bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 956-962 (2009).
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J. & Stanley, K. K. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164 (1989).
- Bishop, J. R. et al. Deletion of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan type XVIII collagen causes hypertriglyceridemia in mice and humans. *PLoS One* **5**, e13919 (2010).
- Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030-1037 (2007).
- Bishop, J. R., Stanford, K. I. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* **19**, 307-313 (2008a).
- Bishop, J. R., Stanford, K. I. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* **19**, 307-313 (2008b).
- Blade, A. M., Fabritius, M. A., Hou, L., Weinberg, R. B. & Shelness, G. S. Biogenesis

9. Literatur

- of apolipoprotein A-V and its impact on VLDL triglyceride secretion. *J Lipid Res* **52**, 237-244 (2011).
- Breslow, J. L. Genetics of lipoprotein abnormalities associated with coronary artery disease susceptibility. *Annu Rev Genet* **34**, 233-254 (2000).
- Brito, D. D. et al. Apolipoprotein A5-1131T>C polymorphism, but not APOE genotypes, increases susceptibility for dyslipidemia in children and adolescents. *Mol Biol Rep* **38**, 4381-4388 (2011).
- Brown, M. S., Anderson, R. G. & Goldstein, J. L. Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* **32**, 663-667 (1983).
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986a).
- Brown, M. S. & Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986b).
- Brown, M. S., Kovanen, P. T. & Goldstein, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* **212**, 628-635 (1981).
- Cardona, F. et al. The -1131T>C SNP of the APOA5 gene modulates response to fenofibrate treatment in patients with the metabolic syndrome: a postprandial study. *Atherosclerosis* **206**, 148-152 (2009).
- Choi, J. R. et al. DNA polymorphisms and haplotypes of apolipoprotein A5's attribution to the plasma triglyceride levels in Koreans. *Yonsei Med J* **48**, 609-618 (2007).
- Corella, D. et al. APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. *J Mol Med (Berl)* **85**, 119-128 (2007).
- Corella, D. & Ordovas, J. M. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS THAT INFLUENCE LIPID METABOLISM: Interaction with Dietary Factors. *Annu Rev Nutr* **25**, 341-390 (2005).
- Dallinga-Thie, G. M. et al. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. *Diabetologia* **49**, 1505-1511 (2006).
- Dallongeville, J. et al. Impact of APOA5/A4/C3 genetic polymorphisms on lipid variables and cardiovascular disease risk in French men. *Int J Cardiol* **106**, 152-156 (2006).
- Deng, Y. et al. Shedding of syndecan-1 from human hepatocytes alters VLDL clearance. *Hepatology* (2011).
- Deng, Y. et al. Shedding of syndecan-1 from human hepatocytes alters very low density lipoprotein clearance. *Hepatology* **55**, 277-286 (2012).
- Dichlberger, A., Cogburn, L. A., Nimpf, J. & Schneider, W. J. Avian apolipoprotein A-V binds to LDL receptor gene family members. *J Lipid Res* **48**, 1451-1456 (2007).
- DOLE, V. P. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest* **35**, 150-154 (1956).
- Eichenbaum-Voline, S. et al. Linkage and association between distinct variants of the APOA1/C3/A4/A5 gene cluster and familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 167-174 (2004).
- Eisenberg, S. & Levy, R. I. Lipoprotein metabolism. *Adv Lipid Res* **13**, 1-89 (1975).

9. Literatur

- Elosua, R. et al. Variants at the APOA5 locus, association with carotid atherosclerosis, and modification by obesity: the Framingham Study. *J Lipid Res* **47**, 990-996 (2006).
- Endo, K. et al. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. *Hum Genet* **111**, 570-572 (2002).
- Foley, E. M. & Esko, J. D. Hepatic heparan sulfate proteoglycans and endocytic clearance of triglyceride-rich lipoproteins. *Prog Mol Biol Transl Sci* **93**, 213-233 (2010).
- Fruchart-Najib, J. et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 397-404 (2004).
- Fuki, I. V., Meyer, M. E. & Williams, K. J. Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts. *Biochem J* **351 Pt 3**, 607-612 (2000).
- Gin, P. et al. Normal binding of lipoprotein lipase, chylomicrons, and apo-AV to GPIHBP1 containing a G56R amino acid substitution. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 1464-1468 (2007).
- Gin, P. et al. Binding preferences for GPIHBP1, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein of capillary endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 176-182 (2011).
- Gin, P. et al. The acidic domain of GPIHBP1 is important for the binding of lipoprotein lipase and chylomicrons. *J Biol Chem* **283**, 29554-29562 (2008).
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425-430 (1990).
- Gordts, P. L. et al. Inactivation of the LRP1 intracellular NPxYxxL motif in LDLR-deficient mice enhances postprandial dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1258-1264 (2009).
- Groenendijk, M., Cantor, R. M., de Bruin, T. W. & Dallinga-Thie, G. M. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. *Atherosclerosis* **157**, 1-11 (2001).
- Grosskopf, I. et al. Apolipoprotein A-V deficiency results in marked hypertriglyceridemia attributable to decreased lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins and removal of their remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2573-2579 (2005).
- Guardiola, M. et al. APOA5 gene expression in the human intestinal tissue and its response to in vitro exposure to fatty acid and fibrate. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* (2011).
- Havel, R. McCollum Award Lecture, 1993: triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis--new perspectives. *Am J Clin Nutr* **59**, 795-796 (1994).
- Havel, R. J. Remnant lipoproteins as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol* **11**, 615-620 (2000).
- Havel, R. J. Triglyceride-rich lipoproteins and plasma lipid transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 9-19 (2010).
- Heeren, J. & Beisiegel, U. Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **12**, 255-260 (2001).
- Heeren, J., Beisiegel, U. & Grewal, T. Apolipoprotein E recycling: implications for

9. Literatur

- dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 442-448 (2006).
- Heeren, J., Grewal, T., Jackle, S. & Beisiegel, U. Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo. *J Biol Chem* **276**, 42333-42338 (2001).
- Heeren, J. et al. Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. *J Biol Chem* **278**, 14370-14378 (2003).
- Heeren, J., Weber, W. & Beisiegel, U. Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation. *J Cell Sci* **112**, 349-359 (1999).
- Henneman, P. et al. Plasma apoAV levels are markedly elevated in severe hypertriglyceridemia and positively correlated with the APOA5 S19W polymorphism. *Atherosclerosis* **193**, 129-134 (2007).
- Herz, J. et al. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J* **7**, 4119-4127 (1988).
- Herz, J. & Strickland, D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-784 (2001).
- Hofmann, S. M. et al. Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice. *J Clin Invest* **117**, 3271-3282 (2007).
- Hokanson, J. E. Hypertriglyceridemia and risk of coronary heart disease. *Curr Cardiol Rep* **4**, 488-493 (2002).
- Hokanson, J. E. & Austin, M. A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* **3**, 213-219 (1996).
- Horinek, A. et al. T-1131-->C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals. *Atherosclerosis* **167**, 369-370 (2003).
- Hsu, L. A. et al. Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* **185**, 143-149 (2006).
- Hubacek, J. A. et al. New variants in the apolipoprotein AV gene in individuals with extreme triglyceride levels. *Physiol Res* **53**, 225-228 (2004).
- Hussain, M. M. et al. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* **266**, 13936-13940 (1991).
- Hussain, M. M., Shi, J. & Dreizen, P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res* **44**, 22-32 (2003).
- Issemann, I., Prince, R. A., Tugwood, J. D. & Green, S. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J Mol Endocrinol* **11**, 37-47 (1993).
- Jakel, H. et al. The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c. *J Biol Chem* **279**, 45462-45469 (2004).
- Jeon, H. & Blacklow, S. C. Structure and physiologic function of the low-density

9. Literatur

- lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* **74**, 535-562 (2005).
- Kahri, J. et al. The increase of apolipoprotein A-V during postprandial lipemia parallels the response of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes: no relationship between apoA-V and postheparin plasma lipolytic activity. *Diabetes Care* **30**, 2083-2085 (2007).
- Kao, J. T., Wen, H. C., Chien, K. L., Hsu, H. C. & Lin, S. W. A novel genetic variant in the apolipoprotein A5 gene is associated with hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet* **12**, 2533-2539 (2003).
- Kersten, S. & Wahli, W. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *EXS* **89**, 141-151 (2000).
- Kim, J. Y. et al. Comparison of low-fat meal and high-fat meal on postprandial lipemic response in non-obese men according to the -1131T>C polymorphism of the apolipoprotein A5 (APOA5) gene (randomized cross-over design). *J Am Coll Nutr* **25**, 340-347 (2006).
- Laatsch, A. et al. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* **204**, 105-111 (2009a).
- Laatsch, A. et al. Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis* **204**, 105-111 (2009b).
- Laatsch, A. et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E. *PLoS One* **7**, e29385 (2012).
- Lai, C. Q. et al. Fenofibrate effect on triglyceride and postprandial response of apolipoprotein A5 variants: the GOLDN study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1417-1425 (2007).
- Lai, C. Q. et al. Dietary intake of n-6 fatty acids modulates effect of apolipoprotein A5 gene on plasma fasting triglycerides, remnant lipoprotein concentrations, and lipoprotein particle size: the Framingham Heart Study. *Circulation* **113**, 2062-2070 (2006).
- Lai, C. Q. et al. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. *J Lipid Res* **45**, 2096-2105 (2004).
- Laurila, P. P. et al. Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 346-352 (2010).
- Lichtenstein, L. & Kersten, S. Modulation of plasma TG lipolysis by Angiopoietin-like proteins and GPIHBP1. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 415-420 (2010).
- Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. & Strickland, D. K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* **88**, 887-918 (2008).
- Lookene, A., Beckstead, J. A., Nilsson, S., Olivecrona, G. & Ryan, R. O. Apolipoprotein A-V-heparin interactions: implications for plasma lipoprotein metabolism. *J Biol Chem* **280**, 25383-25387 (2005).
- MacArthur, J. M. et al. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of

9. Literatur

- triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *J Clin Invest* **117**, 153-164 (2007).
- Mahley, R. W. & Huang, Y. Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing. *J Clin Invest* **117**, 94-98 (2007).
- Mahley, R. W., Innerarity, T. L., Rall, S. C. J. & Weisgraber, K. H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* **25**, 1277-1294 (1984).
- Malloy, M. J. & Kane, J. P. A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins. *Adv Intern Med* **47**, 111-136 (2001).
- Mar, R. et al. Association of the APOLIPOPROTEIN A1/C3/A4/A5 gene cluster with triglyceride levels and LDL particle size in familial combined hyperlipidemia. *Circ Res* **94**, 993-999 (2004).
- Marcais, C. et al. ApoA5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. *J Clin Invest* **115**, 2862-2869 (2005).
- Mattijssen, F. & Kersten, S. Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochim Biophys Acta* (2011).
- May, P. & Herz, J. LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic* **4**, 291-301 (2003).
- Merkel, M. & Heeren, J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! *J Clin Invest* **115**, 2694-2696 (2005).
- Merkel, M. et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* **280**, 21553-21560 (2005).
- Nelbach, L., Shu, X., Konrad, R. J., Ryan, R. O. & Forte, T. M. Effect of apolipoprotein A-V on plasma triglyceride, lipoprotein size, and composition in genetically engineered mice. *J Lipid Res* **49**, 572-580 (2008).
- Nilsson, S. K. et al. Endocytosis of apolipoprotein A-V by members of the low density lipoprotein receptor and the VPS10p domain receptor families. *J Biol Chem* **283**, 25920-25927 (2008).
- Nilsson, S. K., Heeren, J., Olivecrona, G. & Merkel, M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis* **219**, 15-21 (2011).
- Nilsson, S. K. et al. Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochemistry* **46**, 3896-3904 (2007).
- Nowak, M. et al. Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. *Mol Cell Biol* **25**, 1537-1548 (2005).
- O'Brien, P. J. et al. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* **51**, 351-359 (2005).
- Olivier, M. et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. *Genomics* **83**, 912-923 (2004).
- Olofsson, S. O. ApoA-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides.

9. Literatur

- Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1097-1099 (2005).
- Ordovas, J. M. et al. Restriction fragment length polymorphisms of the apolipoprotein A-I, C-III, A-IV gene locus. Relationships with lipids, apolipoproteins, and premature coronary artery disease. *Atherosclerosis* **87**, 75-86 (1991).
- Park, J. Y. et al. Interactions between the APOA5 -1131T>C and the FEN1 10154G>T polymorphisms on omega6 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and coronary artery disease. *J Lipid Res* **51**, 3281-3288 (2010).
- Pennacchio, L. A. et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* **294**, 169-173 (2001).
- Pennacchio, L. A. et al. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. *Hum Mol Genet* **11**, 3031-3038 (2002).
- Pisciotta, L. et al. Two novel rare variants of APOA5 gene found in subjects with severe hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta* **412**, 2194-2198 (2011).
- Prieur, X. et al. Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5. *J Biol Chem* **280**, 27533-27543 (2005a).
- Prieur, X., Schaap, F. G., Coste, H. & Rodriguez, J. C. Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Endocrinol* **19**, 3107-3125 (2005b).
- Priore Oliva, C. et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 411-417 (2005).
- Priore Oliva, C. et al. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* **188**, 215-217 (2006).
- Pruneta-Deloche, V. et al. Postprandial increase of plasma apoAV concentrations in Type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* **181**, 403-405 (2005).
- Rensen, P. C. et al. Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis. *J Biol Chem* **275**, 8564-8571 (2000).
- Ribalta, J. et al. Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. *Clin Chem* **48**, 1597-1600 (2002).
- Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E. & Herz, J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* **101**, 689-695 (1998).
- Schaap, F. G. et al. Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* **47**, 2333-2339 (2006).
- Schaap, F. G. et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* **279**, 27941-27947 (2004).
- Schaefer, E. J., Eisenberg, S. & Levy, R. I. Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res* **19**, 667-687 (1978).
- Schoonjans, K., Staels, B. & Auwerx, J. The peroxisome proliferator activated

9. Literatur

- receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1302**, 93-109 (1996).
- Shelness, G. S. & Sellers, J. A. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* **12**, 151-157 (2001).
- Shu, X., Chan, J., Ryan, R. O. & Forte, T. M. Apolipoprotein A-V association with intracellular lipid droplets. *J Lipid Res* **48**, 1445-1450 (2007).
- Shu, X., Nelbach, L., Ryan, R. O. & Forte, T. M. Apolipoprotein A-V associates with intrahepatic lipid droplets and influences triglyceride accumulation. *Biochim Biophys Acta* **1801**, 605-608 (2010a).
- Shu, X. et al. Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav^{-/-} mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 2504-2509 (2010b).
- Staels, B. et al. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest* **95**, 705-712 (1995).
- Stanford, K. I. et al. Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest* **119**, 3236-3245 (2009a).
- Stanford, K. I. et al. Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *J Clin Invest* **119**, 3236-3245 (2009b).
- Stanford, K. I. et al. Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase is required for triglyceride-rich lipoprotein clearance. *J Biol Chem* **285**, 286-294 (2010).
- Sun, G. et al. Identification of lipid binding and lipoprotein lipase activation domains of human apoAV. *Chem Phys Lipids* **143**, 22-28 (2006).
- Swift, L. L. et al. A recycling pathway for resecretion of internalized apolipoprotein E in liver cells. *J Biol Chem* **276**, 22965-22970 (2001).
- Szalai, C. et al. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. *Atherosclerosis* **173**, 109-114 (2004).
- Talmud, P. J. et al. The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Northwick Park Heart Study II. *Diabetologia* **49**, 2337-2340 (2006).
- Talmud, P. J. et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. *Hum Mol Genet* **11**, 3039-3046 (2002).
- Talmud, P. J. et al. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. *J Lipid Res* **45**, 750-756 (2004).
- Tang, Y. et al. A genetic variant c.553G > T in the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease and altered triglyceride levels in a Chinese population. *Atherosclerosis* **185**, 433-437 (2006).
- Terrand, J. et al. LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J Biol Chem* **284**, 381-388 (2009).

9. Literatur

- Vaessen, S. F. et al. Plasma apolipoprotein AV levels in mice are positively associated with plasma triglyceride levels. *J Lipid Res* **50**, 880-884 (2009).
- Vaessen, S. F. et al. Apolipoprotein A-V, triglycerides and risk of coronary artery disease: the prospective Epic-Norfolk Population Study. *J Lipid Res* **47**, 2064-2070 (2006).
- van der Vliet, H. N. et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* **276**, 44512-44520 (2001).
- van der Vliet, H. N. et al. Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 1156-1159 (2002).
- von Eckardstein, A., Nofer, J. R. & Assmann, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 13-27 (2001).
- Vu-Dac, N. et al. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* **278**, 17982-17985 (2003).
- Wang, Q. F. et al. Haplotypes in the APOA1-C3-A4-A5 gene cluster affect plasma lipids in both humans and baboons. *Hum Mol Genet* **13**, 1049-1056 (2004).
- Weinberg, R. B. et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. *J Biol Chem* **278**, 34438-34444 (2003).
- Weinstein, M. M. et al. Abnormal patterns of lipoprotein lipase release into the plasma in GPIHBP1-deficient mice. *J Biol Chem* **283**, 34511-34518 (2008).
- Willnow, T. E., Hammes, A. & Eaton, S. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development* **134**, 3239-3249 (2007).
- Willnow, T. E., Sheng, Z., Ishibashi, S. & Herz, J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* **264**, 1471-1474 (1994).
- Wilsie, L. C., Gonzales, A. M. & Orlando, R. A. Syndecan-1 mediates internalization of apoE-VLDL through a low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-independent, non-clathrin-mediated pathway. *Lipids Health Dis* **5**, 23 (2006).
- Wong-Mauldin, K., Raussens, V., Forte, T. M. & Ryan, R. O. Apolipoprotein A-V N-terminal domain lipid interaction properties in vitro explain the hypertriglyceridemic phenotype associated with natural truncation mutants. *J Biol Chem* **284**, 33369-33376 (2009).
- Wong, K. et al. The N-terminus of apolipoprotein A-V adopts a helix bundle molecular architecture. *Biochemistry* **47**, 8768-8774 (2008).
- Yuan, S. et al. [Association between apolipoprotein A5 gene polymorphism and coronary heart disease in the Han population from Xinjiang.]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **32**, 51-54 (2011).
- Zhao, S. P. et al. Association of human serum apolipoprotein A5 with lipid profiles affected by gender. *Clin Chim Acta* **376**, 68-71 (2007).

10. Anhang

10.1. Abkürzungsverzeichnis

Dieses Verzeichnis enthält die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen.

α	anti
Abb.	Abbildung
ApoA1	Apolipoprotein A1
ApoA5	Apolipoprotein A5
ApoB48	Apolipoprotein B48
ApoB100	Apolipoprotein B100
ApoE	Apolipoprotein E
bzw.	beziehungsweise
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterolester-Transferprotein
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronen-remnants
cpm	<i>counts per minute</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>

10. Anhang

ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
epiWAT	<i>epididymal white adipose tissue</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
FCS	<i>fetal calf serum</i>
h	Stunde
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IDL	<i>intermediate-density lipoprotein</i>
i.p.	intraperitoneal
kDa	kilodalton
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LRP1	<i>LDLR- related protein 1</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPxY	Asparagin-Prolin-x-Tyrosin (x = beliebige AS)
NxxY	Asparagin-x-x-Tyrosin (x = beliebige AS)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

10. Anhang

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
s.	siehe
sec	<i>Sekunden</i>
subWAT	<i>subcutaneous white adipose tissue</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TAG	Triacylglycerol
TNF α	<i>tumor necrosis-factor alpha</i>
TRL	<i>triglyceride-rich lipoproteins</i>
VLDL	<i>very low-density lipoprotein</i>
z.B.	zum Beispiel

10.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines Lipoproteins	7
Abb. 2: Überblick über den exogenen und endogenen Lipoproteinstoffwechsel	13
Abb. 3: Ausgewählte Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels	17
Abb. 4: Struktureller Aufbau von ApoA5.....	19
Abb. 5: Überblick über die möglichen Funktionen von ApoA5 im Lipoproteinstoffwechsel.....	21
Abb. 6: Extrazelluläre Mechanismen von ApoA5	24
Abb. 7: Prinzip des cre/loxP-Systems.....	37
Abb. 8: Videodokumentation von PCR-Produkten in Agarose-Gelen.....	41
Abb. 9: Ergebnisse der Mausekreuzung	52
Abb. 10: Die verschiedenen Genotypen der Mausekreuzung	53
Abb. 11: FPLC-Profil der Plasmen von ApoA5 Wildtyp und ApoA5-transgenen Mäusen mit einer LDLR-Defizienz	56
Abb. 12: mRNA-Expressionsanalyse von Lipoprotein-Rezeptoren, Genen des Lipoproteinstoffwechsels und Kohlenhydratstoffwechsels von Organen der LDLR- defizienten Tiere ohne ApoA5-Transgen (A5Wt) und mit ApoA5-Transgen (A5Tr)	58
Abb. 13: Postprandialer Triglyzerid-Spiegel in LDLR-defizienten Mäusen mit und ohne ApoA5	59
Abb. 14: Organverteilung und Plasma-Turnover von Ratten-CM in LDLR- defizienten-Mäusen.....	60
Abb. 15: FPLC-Lauf von Plasmen gefasteter Mäuse	62
Abb. 16: FPLC-Profil von Plasmen gefasteter Mäuse	63
Abb. 17: Postprandialer Triglyzerid-Spiegel in LRP1-Wildtyp und LRP1-Knockout Tieren mit und ohne ApoA5.....	65
Abb. 18: VLDL-Produktion nach Injektion von Tyloxapol	66
Abb. 19: Turnover von doppelmarkierten radioaktiven Partikeln aus Ratten	68
Abb. 20: Organverteilung in LRP1-Wildtyp und leberspezifischen LRP1-defizienten Tieren	69
Abb. 21: Präparation von primären murinen Hepatozyten.....	71

10. Anhang

Abb. 22: Partikelaufnahme in primären murinen Hepatozyten.....	71
Abb. 23: ApoA5-Sekretion in den Zellkulturüberstand nach HDL-Stimulation	72
Abb. 24: FPLC der Plasmen von Mäusen mit einem semikonditionalen Doppelknockout des LDLR und des leberspezifischen LRP1	75
Abb. 25: Produktionsstudie nach Injektion des LPL-Inhibitors, Tyloxapol.	78
Abb. 26: Turnover von radioaktiv markierten CM aus Ratten.....	80
Abb. 27: Organverteilung in LDLR- und LRP1- defizienten Tieren	81
Abb. 28: HDL stimuliert die ApoA5-Sekretion in den Zellkulturüberstand.....	83
Abb. 29: Partikelaufnahme in primären murinen Hepatozyten von semikonditionalen Doppelknockout-Tieren	84
Abb. 30: Interaktion zwischen ApoA5 und LRP1.....	92
Abb. 31: LRP1 ist wichtig für die ApoA5-Sekretion.....	92
Tab. 1: Physikalische Eigenschaften und Zusammensetzung humaner Lipoproteine .	8
Tab. 2: PCR-Reaktionsansätze	38
Tab. 3: Verdünnungen von Plasmen von gefasteten Mäusen.	43
Tab. 4: Plasmalipoprotein-Spiegel	54

10.3. Danksagung

Bei Herrn **Prof. Dr. Jörg Heeren** und bei **Herrn Pd Dr. Martin Merkel** möchte ich mich ganz herzlich für die großartige Unterstützung und für die Betreuung während meiner Arbeit bedanken. Des weiteren möchte ich für die hervorragenden experimentellen Bedingungen bedanken. Weiterhin danke ich herzlich allen Mitgliedern des IBMZ für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die technische Unterstützung. Ins Besondere danke ich **Sandra Ehret, Birgit Henkel, Walter Tauscher, Marianne Flato, Eva-Maria Azzizi, Anette Rosche** und **Dorte Wendt**.

Darüber hinaus danke ich herzlich Herrn **Prof. Dr. Horst Weller** für seine Hilfsbereitschaft und Zeit.

Ich danke **Dr. Oliver Bruns** und **Dr. Alexander Bartelt** für ihre generelle Unterstützung, die guten Diskussionen und Anregungen zu meinem Thema. Auch **Britta Hoffzimmer, Leah Eissing, Barbara Freund, Tobias Schmidt, Brigitte Müller und Kirstin Albers** sei an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen gemeinsamen lustigen Stunden gedankt.

Zum Schluss möchte mich mich noch bei **Matthäus Winnitzki** ganz herzlich für seine großartige Unterstützung, Aufmunterung zur Fertigstellung dieser Arbeit und für das Korrekturlesen bedanken. Für letzteres danke ich auch **Zdenka Hajkova** ganz herzlich.

Ich bedanke mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

10.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

Hamburg, den 15.07.2012

Karoline Brügelmann

10.5. Curriculum Vitae



Persönliche Information

Karoline Brügelmann, geb. 25.01.1979

Bei Schuldts Stift 1, 20355 Hamburg

Bildung

1999-2001: Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin; Universität Hamburg

2001-2008: Studium der Chemie mit dem Nebenfächern Biochemie und dem Schwerpunkt Organische Chemie

2008: Diplom-Arbeit am Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie (IBMZ), Hamburg-Eppendorf bei Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel und Prof. Dr. H. Weller mit dem Titel Markierung des Lipidkerns von HDL mit fluoreszierenden und superparamagnetischen Nanokristallen

2008-2012: Promotion am IBMZ, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf bei Prof. Dr. J. Heeren, PD Dr. M. Merkel und Prof. Dr. H. Weller mit dem Titel Untersuchung der Interaktion von Apolipoprotein A5 mit Lipoprotein Rezeptoren

Poster auf nationalen Kongressen

2009 XVI. Lipid Meeting, Leipzig, GER

10. Anhang

2010 1st International Symposium of GRK 1459: Protein Trafficking in Health and Disease, Hamburg, GER

2010 European Atherosclerosis Society Congress 2010 Hamburg, GER

2010 European Lipoprotein Club 2010, Tutzing, Germany, GER

2011 European Lipoprotein Club 2011, Tutzing, Germany, GER

Wissenschaftliche Publikationen

2011 Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul

MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PLSM,

Rinninger F, **Bruegelmann K**, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J.;

Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance, **Nat Med.**, 2011 Jan 23.