## UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie Institutsdirektor Prof. Dr. Dr. Andreas H. Guse

# Metabolische Charakterisierung einer neuartigen humanen Mutation von APOA5

#### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Christian Schlein aus Bochum

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.07.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Jörg Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD. Dr. Martin Merkel

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inha	ıltsverzeichnis	3		
2	Zusammenfassung				
	2.1	Bedeutung des Lipidstoffwechsels für metabolische Erkrankungen	4		
	2.2	Physiologie und Pathophysiologie des Lipoprotein-Stoffwechsels	6		
	2.3	Rolle von APOA5 im Lipoprotein-Stoffwechsel	9		
	2.4	Funktionelle Bedeutung einer <i>APOA5</i> -Mutation für den Lipoprotein-Stoffwechsel (Publikation)	12		
3	resu	ozygosity for a partial deletion of apoprotein A-V signal peptide Its in intracellular missorting of the protein and chylomicronemia breast-fed infant	18		
4	Abb	ildungsverzeichnis	26		
5	Tabellenverzeichnis				
6	Abkürzungsverzeichnis				
7	Literatur- und Quellenverzeichnis				
8	Danksagung				
9	Cur	Curriculum vitae			
10	Sum	nmary	40		
11	Eide	esstattliche Versicherung	41		

# 2 Zusammenfassung

# 2.1 Bedeutung des Lipidstoffwechsels für metabolische Erkrankungen

Die Prävalenz metabolischer Erkrankungen steigt in den letzten Jahrzehnten weltweit epidemisch an<sup>(1-6)</sup>. Dies steht direkt im Zusammenhang damit, dass - aufgrund einer zunehmenden Zufuhr an hochenergetischer Nahrung bei gleichzeitigem Bewegungsmangel - die Anzahl der adipösen Menschen in der Bevölkerung stark ansteigt<sup>(6)</sup>. Anhaltendes Übergewicht führt häufig zur Entwicklung eines metabolischen Syndroms. Dieses beschreibt eine pathophysiologisch-relevante Entgleisung des Stoffwechsels, welche unter anderem durch erhöhte Triglyzerid-Werte im Plasma (Hypertriglyzeridämie), Insulinresistenz, abdomineller Fettleibigkeit und Bluthochdruck charakterisiert ist. Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, sowie Störungen des Lipoprotein-Stoffwechsels mit folgender Atherosklerose und koronarer Herzkrankheit (KHK), spielen im täglichen klinischen Alltag in Bezug auf Morbidität und Mortalität mittlerweile weltweit eine herausragende Rolle<sup>(7)</sup>.

Der Lipidstoffwechsel ist ein entscheidender Faktor bei der Pathophysiologie dieser Erkrankungen<sup>(8)</sup>. Eine Hyperlipoproteinämie und die intrazelluläre Lipidakkumulation, als Folge hochkalorischer Nahrung mit der Entwicklung einer Adipositas, sind eng verzahnt mit der Entstehung von pathophysiologisch-relevanten Lipidablagerungen in der Arterienwand, der sogenannten Atherosklerose. Man unterscheidet primäre Hyperlipoproteinämien, bei denen verschiedene genetische Mutationen alleine den klinisch-relevanten Phänotyp auslösen können, von sekundären, erworbenen Formen der Hyperlipoproteinämie. Die sekundäre Hyperlipoproteinämie entsteht im Zusammenspiel mit genetischen Prädispositionen durch Risikofaktoren wie Adipositas, Rauchen, Bewegungsmangel oder ist auf Grunderkrankungen wie Alkoholismus, einer Hypothyreose, aber auch das nephrotisches Syndrom zurückzuführen<sup>(9)</sup>.

Die Hyperlipoproteinämien werden klassischerweise nach der Fredrickson-Klassifikation eingeteilt<sup>(9)</sup>(Tabelle1). Allen gemeinsam ist ein zu hoher Triglyzerid- und/oder Cholesterinspiegel im Blut. Je nach Lipoproteinpartikel-Klasse kann es zu verschiedenen Ausprägungen von Erkrankungen kommen. So führt zum Beispiel insbesondere eine Hypercholesterinämie, allerdings auch eine kombinierte Hyperlipoproteinämie, zu einem stark erhöhten Risiko an Arteriosklerose zu erkranken<sup>(9)</sup>.

Тур	I	lla	IIb	000	IV	V
Partikel Vermehrung	Chylomikronen	LDL	LDL+VLDL	IDL	VLDL	VLDL+Chylomikronen
CHOL	n	1	<b>†</b>	<b>†</b>	n- <b>†</b>	
TG	1	n	<b>†</b>	<b>†</b>	1	Ť
Serum	lipämisch	klar		trüb bi	s lipämisch	
Verteilung	extrem selten	häufig	häufig	gelegentlich	häufig	sehr selten

n= innerhalb des Referenzbereiches; 1 = stark erhöht; 1 = erhöht

Tabelle 1: Einteilung Hyperlipoproteinämien

Die Fredrickson Klassifikation teilt primäre Hyperlipoproteinämien in fünf verschiedene Typen ein, die sich durch die im Plasma anfallenden Partikel – und damit auch im Triglyzerid- (TG) und Cholesteringehalt (CHOL) – unterscheiden. (Tabelle modifiziert nach Herold – Innere Medizin 2012).

Das Fettgewebe von übergewichtigen Menschen ist durch ein niedrigschwelliges, aber chronifiziertes Entzündungsmuster charakterisiert<sup>(10, 11)</sup>. Durch eine Über- oder Fehlernährung gelangt überschüssige Nahrungsenergie in weiße Fettdepots und wird dort in Form von Triglyzeriden gespeichert<sup>(12)</sup>. Hält dieser Zustand der Überernährung an, kommt es zur Akkumulation von Lipiden, zur Hypertrophie der Fettzellen und einer Expansion des Fettgewebes, welche mit der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-6 und vermehrtem Einwandern von Gewebsmakrophagen einhergehen<sup>(11)</sup>. Durch diesen chronischen Entzündungszustand bedingt, entwickelt sich eine Insulinresistenz des Fettgewebes<sup>(10)</sup>. Aufgrund des daraus folgenden geringen Ansprechens Insulin-responsiver Zielgewebe wie dem Fettgewebe, aber auch dem Muskel, ist ein kompensatorisch höherer basaler Insulinspiegel erforderlich, um eine analoge Wirkung im Zielgewebe zu erzielen<sup>(11)</sup>. In Folge der verstärkten Insulinsekretion kann es zu einer Überlastung der insulinproduzierenden β-Zellen der Langerhans'schen Inseln mit einhergehendem Verlust dieser Zellen im Pankreas kommen. Bei entsprechenden Krankheitsverläufen kann es notwendig sein, dass der Insulinbedarf über exogen zugeführtes rekombinantes Insulin per subkutaner Injektion gedeckt werden muss (11).

Die Vermittler- und Verteilerfunktion von Lipoproteinen verbindet die Pathogenese von metabolischen Erkrankungen, sodass das Verständnis der Regulation des Lipidstoffwechsels unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine Schlüsselrolle in der Prävention und Behandlung von metabolischen Diathesen zukommt.

# 2.2 Physiologie und Pathophysiologie des Lipoprotein-Stoffwechsels

Der Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel ist von essentieller Bedeutung für verschiedene Funktionen des murinen und humanen Organismus. Während Cholesterin und Phospholipide insbesondere als Membranbestanteile von besonderer Bedeutung sind, werden die aus Glyzerol und drei veresterten Fettsäuren zusammengesetzten Triglyzeride vorwiegend über die mitochondriale beta-Oxidation im Muskel und Herz zur Energiegewinnung genutzt. Bei anabolen Stoffwechsellagen werden Triglyzeride in Fetttröpfchen, den sogenannten *lipid droplets*, im Fettgewebe gespeichert, die bei kataboler Stoffwechsellage zur Energieversorgung metabolisch-aktiver Organe freigesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung und Regulation des Triglyzerid-Stoffwechsels untersucht, so dass im Folgenden insbesondere der Stoffwechsel der Triglyzerid-reichen Lipoproteinen beschrieben wird. Da Triglyzeride hydrophob sind, werden sie im wässrigen Milieu des Blutes in Form von Lipid-Protein-Komplexen, den Lipoproteinen, transportiert. Lipoproteine bestehen aus einer hydrophilen Hülle aus Phospholipiden, welche eine polare Kopfgruppe tragen und einem hydrophoben Kern aus Triglyzeriden und Cholesterylestern. Lipoproteine sind insbesondere durch ihre Dichte, Größe und Apolipoproteine charakterisiert, wobei letztere Struktur und Funktion vermitteln<sup>(13)</sup>. Man unterscheidet zwei Arten von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen (TRL): nach Nahrungsaufnahme werden in den Dünndarmzellen die Chylomikronen aus exogen zugeführten Lipiden synthetisiert, während in der Leber die Triglyzerid-reichen VLDL (*very low density lipoproteins*) aus endogen vorhandenen Lipiden vor allem unter katabolen Bedingungen hergestellt und in den Blutkreislauf abgegeben werden.

Exogen zugeführte Nahrungsfette und fettlösliche Vitamine werden in Enterozyten der Darmmukosa in Chylomikronen verpackt und an die Lymphe abgegeben<sup>(14)</sup>. Nachdem im Dünndarm Triglyzeride aus der Nahrung freigesetzt werden, emulgieren Gallensäuren im Duodenum die Nahrungslipide zu Mizellen. Diese sind der Pankreaslipase zugänglich und setzen Monoacylglyzeride und Fettsäuren frei, die von Enterozyten absorbiert werden können. Im Enterozyt findet eine Re-Veresterung zu Triglyzeriden statt, welche mit dem strukturgebenden APOB48, Phospholipiden, sowie Cholesterinestern assembliert werden. Die reifen Chylomikronen, die einen Triglyzerid-Anteil von bis 95% aufweisen, werden daraufhin apikal in die Lymphbahn abgegeben, die im Ductus thoracicus münden und über den Venenwinkel in die Blutbahn gelangen<sup>(14)</sup>.

Dieser Weg erlaubt eine initiale Umgehung der Leber, so dass die Triglyzeride der Chylomikronen zum einen für die Versorgung metabolisch-aktiver Organe wie dem Herzmuskel genutzt werden und zum anderen zur Energiespeicherung dem Fettgewebe zugeführt werden, ohne vorher die Leber zu passieren.

Dieser Prozess wird durch das Protein Lipoproteinlipase (LPL) reguliert, dessen aktive Form an das Endothel der Kapillaren gebunden ist<sup>(15,16)</sup>. Die LPL ist ein Schlüsselenzym in der Hydrolyse von Triglyzeriden im Lipoproteinstoffwechsels - metabolisch aktive LPL ist am Endothel lokalisiert, nachdem es von parenchymalen Zellen produziert und zur luminalen endothelialen Seite mit Hilfe des exklusiv in Endothelzellen synthetisierten Protein GPIHBP1 (*glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1*) transportiert worden ist<sup>(17)</sup>. LPL wird insbesondere in Parenchymzellen – nicht im Endothel selbst – von braunem Fettgewebe (*brown adipose tissue* - BAT), weißem Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT), Herz- und Skelettmuskel exprimiert<sup>(15)</sup>, währenddessen sie postnatal nur während der Säuglingsphase in der Leber relevante Expressionsraten zeigt.

LPL ist am Endothel an Heparansulfat-Proteoglykane und/oder GPIHBP1 gebunden und ausschließlich als Homodimer hydrolytisch aktiv<sup>(16)</sup>. Das Enzym ist in der Lage, Triglyzeride aus TRL zu hydrolysieren und Fettsäuren freizusetzen, besitzt aber auch eine intrinsische Phospholipaseaktivität<sup>(18)</sup>. Als Weiteres kann LPL Lipoproteine binden und sie in räumliche Nähe zur Gefäßwand bringen, um dort Hydrolyse und Lipoproteinaufnahme zu vermitteln (sogenannte Bridging Funktion)<sup>(19)</sup>. LPL kann auch als Ligand für Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie dienen<sup>(20)</sup>, um eine Lipoproteinaufnahme zu stimulieren, als auch selektiv Lipoprotein assoziierte Lipide wie Cholesterylester<sup>(21)</sup> oder Vitamin E<sup>(22)</sup> Aufnahmeraten zu beeinflussen. Nach der Hydrolyse verbleibt LPL als Ligand auf den vom Endothel dissoziierten Chylomikronen-Remnants und vermittelt die schnelle Aufnahme in die Leber über hepatisch Lipoprotein-Rezeptoren wie dem LDL-Rezeptor oder LRP1 (LDL-Receptor-Related-Protein 1)<sup>(23)</sup>.

Der Verlust von enzymatischer Aktivität, etwa durch genetische Mutationen von *LPL*, wie zum Beispiel N291S, D9N, G188E<sup>(24)</sup>, führen zu erhöhten Konzentrationen von Triglyzeriden im Plasma, wobei ca. 10% aller Patienten mit Hypertriglyzeridämie heterozygote Träger von Mutationen der Lipoproteinlipase sind<sup>(25)</sup>. Ein homozygotes Defizit an enzymatisch aktiver LPL ist mit einem Vorkommen von 1:1.000.000 sehr selten und führt bei massiv erhöhten Triglyzeridwerten zum Krankheitsbild der Hyperchylomikronämie (24). Der Verlust bzw. Reduktion von enzymatisch aktiver LPL führt in Mäusen wie in Menschen zu erniedrigten HDL Spiegeln und damit zu einem weiteren, zusätzlichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>(26)</sup>.

Die Fähigkeit Triglyzeride zu hydrolysieren und Lipoproteine zu binden, hat zu der Substrate-Steal-Hypothese geführt<sup>(27)</sup>. Nach dieser bestimmt die LPL-Verteilung organabhängig, durch die lokale enzymatische Wirkung, eine Organverteilung von postprandialen Triglyzeriden. So findet zum Beispiel durch eine Überexpression von Muskel-LPL eine Direktion vom Fettgewebe zum Muskelgewebe statt. Ebenso wurde mittels Leptindefizienten Mäusen dargelegt, dass fettgewebsspezifische LPL ein Hauptfaktor für die Entwicklung von Übergewicht ist<sup>(28)</sup>. Durch Mechanismen der *de novo* Lipogenese gelingt es Adipozyten-spezifischen LPL Knockout Tieren jedoch, ein normales Fettgewebsvolumen zu erlangen<sup>(28)</sup>. In dem Fettgewebe dieser transgenen Tiere sind allerdings nur deutlich reduzierte Anteile an postprandialen, exogen zugeführten, essentiellen Fettsäuren zu detektieren.

Darüber hinaus ist die LPL maßgeblich für die Triglyzeridaufnahme während der adaptiven Thermogenese zuständig. Während der physiologischen Aktivierung von braunem Fettgewebe durch Kälteexposition vermittelt LPL, zusammen mit CD36, die intrazelluläre Substratverfügbarkeit von postprandialen Lipiden<sup>(29)</sup>.

Die Lipoproteinlipase hydrolysiert Triglyzeride aus Lipoproteinen, welche dann in das Zielgewebe aufgenommen werden. Insbesondere das Fettgewebe und oxidative Muskulatur zeigt eine hohe Expressionsraten der LPL. In der Folge sinkt der Triglyzeridanteil in Chylomikronen, so dass der prozentuale Cholesteringehalt steigt und Chylomikronen-Remnants entstehen. Diese Remnants sind potentiell atherogen<sup>(30)</sup>, allerdings beträgt die Halbwertszeit (HWZ) von Chylomikronen-Remnants im Menschen etwa 5 Minuten<sup>(31)</sup>. Von High Density Lipoproteins (HDL) erhalten Chylomikronen Apolipoprotein E (APOE), welches an den LDL-Rezeptor und wie oben beschrieben an LRP1 der Leber binden kann. APOE erzwingt dort durch die Bindung an diese Rezeptoren eine Aufnahme der Partikel und damit eine Clearance der atherogenen, cholesterinhaltigen Remnant-Partikel.

Während einer Nahrungskarenz wäre die HWZ von Chylomikronen zu gering, um eine dauerhafte Triglyzerid-Versorgung der peripheren Organe zu gewährleisten. Durch den endogenen Lipoproteinstoffwechsel zeigt sich die Leber in der Lage, diese Funktion durch die Synthese von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen zu übernehmen. Diese *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL) zeigen im Vergleich zu Chylomikronen eine wesentlich höhere Plasma-HWZ von einer Stunde<sup>(32)</sup>. Die Struktur dieser Lipoproteinklasse wird durch APOB100 beeinflusst<sup>(13)</sup>. Diese unterscheidet sich im Vergleich zu APOB48 der Chylomikronen zunächst einmal durch die Länge des Proteins (APOB48 entspricht 48% von APOB100), sowie der Rezeptorbindungseigenschaft. APOB100 besitzt eine hohe Affinität zum LDL-Rezeptor, nicht aber zu anderen Mitgliedern der LDL-Rezeptor-Familie.

Die Triglyzeridhydrolyse der VLDL findet ebenfalls über LPL statt, sodass auch in diesen Partikeln der Triglyzeridanteil mit zunehmender Zirkulation sinkt. Über die Zwischenstufe der Intermediate Density Lipoproteins (IDL) entstehen Low Density Lipoproteins (LDL). Auch diese Partikel sind potentiell atherogen<sup>(9)</sup>, dienen aber auch der Cholesterinversorgung der Peripherie. Cholesterin ist ein Lipid, welches vom Körper selbst synthetisiert werden kann, allerdings auch in tierischen Produkten und Erzeugnissen vorkommt und somit durch Ernährung exogen dem Körper hinzugefügt werden kann. Kommt es dabei zu einer von dem Bedarf unabhängigen, autonomen Cholesterinsynthese, kann es zu einem erhöhten Plasmacholesterinspiegel, einer Hypercholesterinämie, kommen. Eine Hypercholesterinämie ist ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose<sup>(9)</sup>. Diese ist definiert durch arterielle Lipidablagerungen, welche meistens zwischen Intima und Media der Arterie lokalisiert ist. Die Bildung dieser Plaques ist der erste Schritt beim Prozess der Atherosklerose und wird durch einen hohen LDL Spiegel, aber auch durch hohe Konzentrationen von Cholesterin-reichen Remnant-Lipoproteinen begünstigt. Im Wesentlichen ist davon auszugehen, dass das Verhältnis von LDL zu HDL einen wichtigen Anteil daran hat, ob bei einer Hypercholesterinämie eine Atherosklerose entsteht(9). Der HDL Stoffwechsel beschreibt den sogenannten reversen Cholesterintransport, also ein Transport von der Peripherie zur Leber hin. Dieser Mechanismus schützt vor Atherosklerose, da dieser auch die Cholesterinplaques einschließt, indem es der Entstehung vorbeugt, als auch das Plaque Volumen reduzieren kann. Aktuelle Daten lassen keinen Zweifel, dass auch die Remnants der TRL und damit die Plasma Triglyzerid-Spiegel ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor ist (33).

# 2.3 Rolle von APOA5 im Lipoprotein-Stoffwechsel

Apolipoprotein A5 (APOA5) ist ein relativ neuentdecktes Mitglied der Apolipoprotein Familie, welches erst 2001 von Pennacchio et al. (34) und unabhängig davon gleichzeitig von Van der Vliet et al. (35) innerhalb eines open-reading frames des *APOA-I/C-III/A-IV* Clusters auf Chromosom 11q23 entdeckt wurde. Das humane Gen besteht aus vier Exons und drei Introns und weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu APOA4 auf (34). APOA5 kann auf Triglyzerid-reichen Lipoproteinen und HDL nachgewiesen werden (36), wobei sich die Bindungsstellen zu HDL und VLDL zu unterscheiden scheinen (37). Das Protein besteht aus 366 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 39kDa, wovon 23 Aminosäuren für ein Signalpeptid codieren, welches posttranslational im endoplasmatischen Retikulum abgespalten wird, sodass das sezernierte Proteinkonstrukt noch 343 Aminosäuren beinhaltet. (38). APOA5 wird hauptsächlich in der Leber (35), aber auch im Darm (39) exprimiert, wobei die Leberexpression die Darmexpression im Menschen mehr als 30.000-fach übersteigt (39), nichtsdestoweniger zeigte sich die intestinale *APOA5* Genexpression

Fettsäure und Fibrat responsiv. Sowohl Fettsäuren als auch die zur Triglyzerid-Senkung eingesetzten Fibrate binden dabei an PPAR-alpha (*peroxisome proliferator activated receptor*), so dass die Expression von APOA5 direkt durch einen der wichtigsten Lipidaktivierbaren Transkriptionsfaktor in der Leber reguliert wird<sup>(40,41)</sup>.

APOA5 erfüllt sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär verschiedene Rollen<sup>(41)</sup>. APOA5 ist ein monomeres, austauschbares Apolipoprotein<sup>(35)</sup>, was zur Folge hat, dass es nicht ortsständig auf VLDL und HDL final gebunden ist und deren kataboles Schicksal teilt – anders zum Beispiel als das für Chylomikronen strukturbildende APOB48.

Interessanterweise ist der Plasmaspiegel von APOA5 im Gegensatz zu anderen Apolipoproteinen extrem niedrig. So finden sich zum Beispiel von APOA-I etwa 1g/L, währenddessen APOA5 eine Konzentration von nur etwa 100-250µg/L erreicht<sup>(43)</sup>. Ein im Blut zirkulierendes APOA5 Protein kommt hierbei rechnerisch auf 24 VLDL Partikel<sup>(44)</sup>, so ist es nicht verwunderlich, dass nur auf 6% der VLDL Partikel APOA5 nachgewiesen wurde<sup>(45)</sup>.

Van Der Vliet et al. konnten zeigen, dass eine adenovirale Überexpression zu einer 70% igen Reduktion von Triglyzeriden im murinen Modell führt (46), wohingegen der Knockout zu einer starken Hypertriglyzeridämie führen kann<sup>(34)</sup>. Die genaue Funktion von APOA5 ist nicht vollständig geklärt. Es wurde gezeigt, dass eine experimentell induzierte sehr hohe hepatische APOA5-Konzentration die VLDL Synthese beeinflussen kann<sup>(47)</sup>. So ist zu erklären, dass eine 1000-fach erhöhte APOA5-Konzentration nach adenoviralvermittelter Überexpression<sup>(48)</sup>, nicht aber die etwa 10-fach erhöhten Werte in APOA5trangenen Tieren<sup>(49)</sup>, die VLDL-Lipidierung reduziert und somit den Plasma-Triglyzeridspiegel um etwa 30% senkt<sup>(48)</sup>. Im Gegensatz dazu zeigen Marcais et al., dass die VLDL-Produktion im Menschen mit dysfunktionalem mutierten APOA5 weitestgehend normal ist, jedoch der Katabolismus 20-fach reduziert ist<sup>(50)</sup>. Dies deckt sich mit Daten in APOA5transgenen Tieren, die durch eine erhöhte APOB100 Plasmaclearance charakterisiert sind<sup>(48,49,51)</sup>. Die Hypothese, dass APOA5 mit APOC3 als dessen hypothetischen Gegenspieler im Triglyzeridstoffwechsel interagiert, wurde aufgrund der unter physiologischen Bedingungen wesentlich höheren APOC3-Plasmakonzentration verworfen<sup>(52)</sup>.

Funktionell scheint APOA5 als regulatorischer Faktor der Lipoproteinlipase sowohl im gefasteten Zustand als auch in der postprandialen Phase die Plasma-Triglyzeridkonzentrationen zu beeinflussen<sup>(48,49)</sup>. Hierbei sind Proteoglykane, als auch GPHBP1<sup>(53)</sup>, ein essentieller Bestandteil der APOA5 vermittelten Wirkung. APOA5 aktiviert bei in Anwesenheit von Proteoglykanen die TRL-Hydrolyse der Lipoproteinlipase, sodass APOA5 *in vivo* über eine LPL-Aktivitätssteigerung triglyzeridsenkend wirkt<sup>(48)</sup>, möglicherweise in dem es das Homodimer der LPL als dessen metabolisch aktive Form stabilisiert oder in

einer *bridging* Funktion den lipolytischen Komplex aus LPL und Lipoprotein am vaskulären Endothel stabilisiert.

Hierbei gibt es kein Verbrauch von APOA5, sondern das Protein kann nach der lipolytischen Reaktion vermutlich auf weitere Triglyzerid-reiche Lipoproteine transferiert und wiederbenutzt werden <sup>(51)</sup>, sodass APOA5 trotz niedriger Plasmakonzentration und niedriger APOA5/APOB-Ratio dennoch an der lipolytischen Verarbeitung von vielen TRL wirken kann.

Interessanterweise stimuliert Insulin die LPL Aktivität<sup>(54)</sup>, jedoch zeigt sich in insulinresistentem Status, wie Diabetes mellitus Typ II, oft eine Hypertriglyzeridämie. Insulin reduziert die Genexpression von *ApoA5* in der Leber, was ein mögliches Erklärungsmodell für die Assoziation zwischen Hyperinsulinämie und Hypertriglyzeridämie in Diabetes mellitus Typ II darstellen könnte<sup>(55)</sup>. Das Verständnis um APOA5, den Mechanismus der Triglyzeridsenkung und sonstiger Funktionen ist wichtig, um Zusammenhänge des metabolischen Syndroms genauer charakterisieren, verstehen und behandeln zu können. Dies wird durch eine Studie von Huang et al. verdeutlicht, die einen inversen Zusammenhang von APOA5 Plasmaspiegeln zu Plasmatriglyzeriden und dem sogenannten HOMA Index, dem *Homeostasis Model Assessment* gezeigt hat. Der HOMA Index ist ein rechnerisches Maß für die Abschätzung einer Insulinresistenz<sup>(56)</sup> und kann bei der klinischen Einschätzung der Ausprägung eines Krankheitsbildes helfen.

Klinisch ist APOA5 ebenso interessant, als dass Humandaten zeigen, dass APOA5 eine wichtige Stellung in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit hat (57,58). So wurde bei der Sequenzierung von fast 10.000 Genomen von Patienten mit Herzinfarkt festgestellt, dass APOA5 zusammen mit Mutationen des LDL-Rezeptors die klinisch wichtigsten Mutationen als Risikofaktoren für einen frühen Herzinfarkt sind. Diese Erkenntnis ist deswegen entscheidend, weil das atherogene Potential von einem pathologisch hohen Triglyzeridspiegel weiterhin diskutiert wird. Der Zusammenhang von APOA5 Mutationen und hohen Triglyzeridspiegeln, verbunden mit der Herzinfarktrate in jungen Patientenkollektiven mit APOA5 Mutationen, macht APOA5 und Forschung klinisch äußerst relevant. Das Verständnis zur Funktion von APOA5, sowie dem Mechanismus des Einflusses auf frühe Herzinfarkte ist demnach entscheidend zur Prävention und zur Behandlung von diesen Patienten.

# 2.4 Funktionelle Bedeutung einer *APOA5*-Mutation für den Lipoprotein-Stoffwechsel (Publikation)

Die besondere Stellung von *APOA5* im Lipidstoffwechsel liegt an dem Phänotyp von Mutationen im murinen und humanen Stoffwechsel. Mutationen oder ein Defizit des Genes können zu schwerer Hypertriglyzeridämie und Chylomikronämie führen. In dieser Arbeit wurde eine neuentdeckte homozygote Mutation im Signalpeptid von APOA5 beschrieben, die bei einem 11 Monate alten Säugling entdeckt wurde. Die Mutation, eine 24 Basenpaar Deletion in Exon 2 (p.Ala6\_Ala13del), führte zu einer intrazellulären Fehlverteilung des Proteins. Dieses konnte nicht mehr sezerniert werden und führte damit zu einem gesamtmetabolisch dysfunktionalem APOA5, welches sich in Hypertriglyzeridämie und Chylomikronämie zeigte.

Der elfmonatige Säugling wurde mit intermittierenden abdominellen Schmerzen klinisch vorstellig. Abgesehen von einer abgelaufenen Bronchitis und einer durchgestandenen Norovirus Infektion war die medizinische Vorgeschichte anamnestisch unauffällig. Das Geburtsgewicht lag bei 3400g bei 52cm.

Familienanamnestisch konnte eruiert werden, dass der Großvater väterlicherseits mit 45 Jahren einen Myokardinfarkt erlitt (Plasma Triglyzeride 284mg/dl) und der mütterliche Großvater ebenfalls einen Myokardinfarkt mit 51 erlitt (Plasma Triglyzeride 481). Vater und Mutter des Kindes sind Cousin/Cousine ersten Grades.

Bei der Vorstellung präsentierte sich der Patient mit 80cm Größe (90.Perzentile) und 11,1 kg Gewicht (75.Perzentile). Lunge und Herz waren ohne pathologischen Befund auskultierbar, die Leber 1,5 cm unterhalb des Rippenrandes zu tasten und die Milz nicht palpabel. Eine orientierende Untersuchung hinsichtlich Augen und Hautmerkmalen von einer Hypercholesterinämie waren blande. Sonografisch zeigte sich eine erhöhte Dichte der Leber und Milz.

Die Plasmaspiegel von Triglyzeriden zeigten sich beim Patienten massiv erhöht (2230 mg/dl, Referenzbereich <150 mg/dl), ebenso waren Gesamtcholesterinspiegel leicht erhöht (230 mg/dl, Referenzbereich <200 mg/dl) trotz niedrigem HDL Level (26 mg/dl, Referenzbereich >35 mg/dl). Nach dem therapeutisch empfohlenen Abstillen zur Senkung des prozentualen Fettanteils der Nahrung kam es weitestgehend zu einer Normalisierung der Blutlipide (201 mg/dl Triglyzeride, 118 mg/dl Cholesterin).

Die genetische Analyse des Patienten zeigte nach Sequenzierung keine Mutationen im *LPL*- und *APOC2*-Gen, welche ebenfalls für eine Hypertriglyzeridämie verantwortlich sein können. Durch eine Sequenzierung wurde gezeigt, dass eine homozygote Mutation in *APOA5* vorlag. Die Mutation umfasste eine acht Aminosäuren aussparende Deletion,

welche zur Folge hatte, dass der kodierende Anteil des Signalpeptides für die Erkennung des *signal recongnition particles* (SRP) verkürzt war. Generell ist die Interaktion dieser Signalpeptidsequenzen mit dem SRP essentiell, damit zur Sekretion bestimmte sowie Transmembran-Proteine in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums translatiert werden. Die hier neu entdeckte Deletion im APOA5-Signalpetid verursachte keinen Rasterschub, sondern führte zu einer Verringerung der maximal ununterbrochenen Anzahl an hydrophoben Aminosäuren in einer Reihe von 6 auf 4, welches die intrinsische Signalpeptid-Funktion verlieren lässt. Durch den Verlust des hydrophoben Kerns des Signalpeptids wird dieses dysfunktional<sup>(59)</sup>.

Die durch die Mutation vermutete Dysfunktionalität des sekretorischen Stoffwechselweges für APOA5 wurde im weiteren Verlauf der Analysen bestätigt. APOA5 konnte per ELISA nicht im Plasma des Patienten nachgewiesen werden, beziehungsweise lag unter der Nachweisgrenze. Der Vater des Patienten hatte ebenfalls erhöhte Lipidwerte (325 mg/dl), die Mutter hatte dahingehend unauffällige Werte, bei beiden Personen konnte APOA5 nachgewiesen werden (397 bzw. 300 ng/ml). Diese Werte sind tendenziell niedrig im Vergleich zur Kontrollgruppe zuzuordnen, deren Mittelwert 1113±537ng/ml entspricht. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei den Eltern jeweils ein defektes APOA5-Allel vorliegt, was durch Sequenzierung bestätigt werden konnte.

Da APOA5 einen direkten Einfluss auf die Hydrolyse von TRL hat, wurde eine LPL-Aktivitätsanalyse im post-Heparin Plasma des Patienten durchgeführt. Dazu wird ein Bolus Heparin injiziert, welches zur Folge hat, dass sich die Endothel-gebundene LPL löst und in den Blutstrom gelangt. Dieses Blut kann nun auf die LPL-Aktivität untersucht werden, währenddessen ein prä-Heparin Wert in der Regel sehr niedrig ist und wenig Aussagekraft über die tatsächliche Hydrolysefähigkeit aussagt. Bei Mutationen im GPIHBP1 ist die Analyse der prä-Heparin-Aktivität jedoch durchaus sinnvoll, da diese hypertriglyzeridämischen Patienten aufgrund der fehlenden Verankerung am Endothel durch einen verzögerten Anstieg in der Postheparin LPL-Aktivität charakterisiert sind<sup>(60)</sup>.

Die post-Heparin Plasma LPL Aktivitätsanalyse bei dem Index-Patienten zeigte, dass die Mutation verglichen mit gesunden Probanden zu einer geringeren LPL-Aktivität im Patienten führt, sodass der Mechanismus der hohen Triglyzeridspiegel darauf zurückführbar sein könnte.

Um die Mutationsfrequenz zu bestimmen, wurden sowohl eine anonyme Gendatenbank einer Münchener Kohorte von Menschen mit türkischen Vorfahren nach der Mutation durchsucht, als auch online Gendatenbanken wie der *Exome Variant Server*<sup>(61)</sup> und 1000genomes<sup>(62)</sup> analysiert. In keiner dieser Gendatenbanken konnte diese Mutation, noch eine andere Mutation in der Signalpeptid-kodierenden Sequenz gefunden werden.

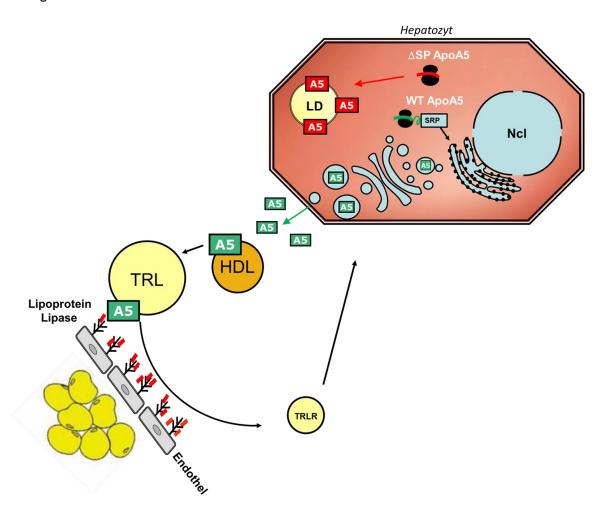
Um die Mutation biochemisch weiter zu charakterisieren, wurde – da eine Leberbiopsie klinisch nicht notwendig und somit ethisch nicht zu vertreten war - ein Kontroll-GFP-Konstrukt, ein APOA5-Konstrukt mit der Wildtyp-Sequenz, sowie ein  $\Delta$ SP-APOA5-Konstrukt mit der entsprechenden Mutation des Patienten mittels molekularbiologischer Methoden hergestellt. Alle Konstrukte wurden danach in primäre Hepatozytenkulturen von APOA5-defizienten Mäusen transfiziert. Anschließend wurde per Western Blot analysiert, inwiefern sich das Sekretionsverhalten des  $\Delta$ SP-APOA5 Konstruktes vom Wildtypkonstrukt unterschied, wohingegen das GFP-Konstrukt als Transfektionskontrolle diente.

Es zeigte sich, dass durch den Verlust von acht Aminosäuren im Signalpeptid eine intrazelluläre Akkumulation des ΔSP-APOA5 Proteins stattfand. Nach Transfektion des Wildtyp-Konstruktes konnte die Sezernierung des Proteins in den Zellkultur-Überstand nachgewiesen und somit die korrekte intrazelluläre Prozessierung gezeigt werden. Auch in Anwesenheit von HDL, einem Akzeptor von APOA5, konnte ΔSP-APOA5 nicht per Western Blot im Überstand detektiert werden. Immunhistologisch wurde dargestellt, dass APOA5 sich als Wildtyp-Protein an der Plasmamembran der Hepatozyten befindet, unterdessen sich die Proteinmutante an intrazelluläre Lipidtröpfchen, den *lipid droplets*, anlagerten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die fehlende Interaktion des APOA5-Signalpeptides mit SRP die Translation an den freien Ribosomen des Zytoplasmas stattfindet. Das aufgrund seiner Funktion als Apolipoprotein prinzipiell hydrophobe APOA5-Protein lagert sich dann fälschlicherweise an intrazelluläre, mizelläre Strukturen wie den *lipid droplets* der Hepatozyten.

Diese Charakterisierungen zeigen, dass die Mutation des Patienten sehr wahrscheinlich in einer Akkumulation von APOA5 in Hepatozyten mündete, welche diätabhängig zu einer Hypertriglyzeridämie und Chylomikronämie führte. Diese monogene Mutation in APOA5 ist die früheste Manifestation einer Hypertriglyzeridämie, die mit APOA5 assoziiert ist, die bislang publiziert wurde. Ferner wurde erstmalig eine homozygote Mutation im APOA5-Gen sowie deren funktionelle Relevanz für den APOA5- und Triglyzerid-Stoffwechsel beschrieben werden. Die Therapie des Patienten besteht jetzt in einer Diät mit einem 35% Lipid Anteil, welche fast zu einer Normalisierung der Laborwerte, aber vor allem zu einer Remission der abdominellen Beschwerden geführt hat. Durch den Verlust der Funktionalität des Signalpeptides resultiert ein Verlust der Ausbildung des hydrophoben Kerns des Signalpeptides, welcher essentiell für deren Funktion ist.

Zusammengefasst beschreibt die Publikation die Wichtigkeit der Sekretion von APOA5 in den Blutstrom für einen funktionierenden Lipidstoffwechsel hinsichtlich der Hydrolyse und der Aufnahme von Triglyzeriden in periphere Organe. In der folgenden Abbildung 1

sind diese zellbiologisch- und klinisch-relevanten Ergebnisse in einem Modell zusammengefasst.



#### Abbildung 1: Modell des dysfunktionalen ΔSP-APOA5.

Aufgrund der Mutation im Signalpeptid des  $\Delta$ SP-APOA5 (rot) akkumuliert APOA5 (rote Rechtecke) im Hepatozyten an intrazellulären Lipidtröpfchen (*lipid droplets* – LD), während WT-APOA5 (grün) ein funktionales Signalpeptid besitzt, welches vom *signal recognition particle* (SRP) erkannt werden kann. WT-APOA5 wird so in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums sezerniert und folgt dadurch dem sekretorischen Stoffwechselweg über den Golgi-Apparat. Das fertiggestellte APOA5-Protein gelangt dann über vesikulären Transport in den Blutkreislauf, wo es mit HDL assoziiert. In metabolisch aktiven Geweben wie dem Fettgewebe stimuliert APOA5 am vaskulären Endothel die LPL-vermittelte Hydrolyse von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) zu *TRL-remnants* (TRLR). Das Fehlen ausreichender APOA5-Mengen aufgrund eines Defektes in der APOA5-Sekretion kann entsprechend zu einer verminderten Hydrolyse und damit zu einer Akkumulation von TRL im Plasma, einer Hypertriglyzeridämie, führen. Diese ist jedoch durch fettarme Diät gut therapierbar, da APOA5 nur ein modulierender Faktor und nicht essentiell für die LPL-vermittelte Hydrolyse ist.

## 2.5 Klinische Einordnung und Ausblick

Die Inzidenz und Prävalenz von metabolischen Erkrankungen berührt auch im klinischen Alltag durch die Quantität vieler Folgeerkrankungen nahezu alle klinischen Fachbereiche, sodass die Prävention und Behandlung metabolischer Erkrankungen oft interdisziplinär notwendig ist und auch regelhaft stattfindet.

Primäre Hypertriglyzeridämien werden von der Deutschen Gesellschaft zur Bekämpfung von Fettstoffwechselstörungen und ihren Folgeerkrankungen (DGFF, Lipid Liga) in familiäre Hypertriglyzeridämien mit durchschnittlichen Triglyzerid-Konzentrationen im Plasma zwischen 150-500 mg/dl eingeteilt, welche nicht als atherogen eingestuft wird. Die zweite Hypertriglyzeridform wird unter Chylomikronämie-Syndrome mit Triglyzerid-konzentrationen über 1000 mg/dl subsumiert, ohne dass diese Symptom sekundärer Ursachen wären (Alkoholabusus, Pankreatitis, Diabetes melltius), welche mäßige Hypertriglyzeridämien entgleisen lassen können<sup>(63)</sup>.

Laut Empfehlung zur Diagnostik und Therapie der Lipid Liga bedarf es dort interventionellen Schritten aufgrund einer erhöhten Plasmaviskosität mit imminenter Neigung zu Pankreatitis und zentraler oder kardialer Minderperfusionen<sup>(63)</sup>.

Im vorliegenden Fall führte die Vorstellung des Patienten mit akutem Abdomen zum Nachweis der Hypertriglyzeridämie, welche durch diätische Maßnahmen sistierte. Generell stehen Lebensstilveränderungen wie strikte Alkoholkarenz, Minimierung von Mono- und Disaccharidzufuhr, eine fettarme Diät und die Steigerung der körperlichen Aktivität in Verbindung mit einer Gewichtsreduktion auch in der Therapieempfehlung der Lipid Liga zunächst im Vordergrund<sup>(63)</sup>. Wenn dies erreicht ist und sich über 3 Monate keine substantielle Rekonvaleszenz erreichen lässt, kann eine medikamentöse Therapie mit Fibraten, Nikotinsäure oder Omega-3-Fettsäuren oder auch eine Gentherapie versucht werden<sup>(64)</sup> – es wird gleichzeitig aber auf eine unzureichende Studienlage für medikamentöse Therapien hingewiesen<sup>(63)</sup>.

Fallberichte über APOA5 Mutationen konnten einen Zusammenhang zwischen starker Hypertriglyzeridämie und APOA5 nachweisen (p.Q148X, p.Q139X, c161+3g>c)<sup>(64)</sup>, die ähnliche Phänotypen wie Patienten mit LPL-Defizienz<sup>(16,24,64)</sup> zeigen. Allerdings waren viele dieser Mutationen ebenfalls mit einem hohen Cholesterinspiegel verbunden, welches oft eine Therapieeskalation nötig macht.

Ebenso konnten Varianten in APOA5 in genomweiten Analysen immer wieder in Relationen zu Myokardinfarkten gesetzt werden<sup>(57,65-70)</sup> und da Hypertriglyzeridämie als eigenständiger Risikofaktor gesehen werden kann<sup>(71-74)</sup>, liegt die Verbindung von APOA5-Mutationen über den Mechanismus einer Dyslipidämie zu Myokardinfarkten nahe. Dieser

kausale Zusammenhang konnte kürzlich mit neuartigen genetischen und epidemiologischen Methoden, dem *Mendelian randomization* Verfahren, eindeutig bewiesen werden<sup>(75)</sup>.

Zumeist sind in der Regel weitere Umweltfaktoren oder ein genetischer Faktor wie ein zusätzlicher APOA5 S19W SNP nötig, damit ApoA5-Mutationen zur Ausprägung des Lipid-Phänotyps führen können<sup>(64)</sup>. Polymorphismen zeigen eine starke Relation zu Triglyzeridspiegeln von gesunden Menschen und dylipidämischen Patienten<sup>(76-80)</sup>. Ebenso wurde eine APOA5-Hochfettdiät-Interaktion beobachtet, die sich einerseits auf den BMI der Patienten<sup>(81)</sup> metabolisch negativ auswirkten. Da das APOA5-Protein generell nur eine modulatorische Funktion innehat, ist bei Patienten mit genetisch-bedingter APOA5-Fehlfunktion die diätische Intervention als besonders sinnvoll zu erachten <sup>(82)</sup>. Auch in dem hier beschriebenen Fall führte das Absetzen der hochkalorischen Muttermilch fast zu einer Normalisierung der Plasmalipidwerte.

Insgesamt ist festzuhalten, dass APOA5-abhängige Hypertriglyzeridämien zu einem hohen Prozentsatz von diätischen Fettrestriktionen zu profieren scheinen, sodass diese Intervention zunächst immer im Vordergrund stehen muss. Einige Studien weisen auch ein Ansprechen von *APOA5*-abhängigen dyslipidämischen Diathesen auf Fibrattherapien nach<sup>(83, 84)</sup>, einige jedoch nicht (p.Q148X, Q139X)<sup>(64)</sup>. Denkbar sind auch Gentherapien analog zu ersten Gentherapiestudien bei bestehender LPL-Defizienz<sup>(85)</sup>, die allerdings noch nicht zu einer breiteren klinischen Anwendung gefunden haben, sondern nur vereinzelt in experimentelle Pilotstudien veröffentlicht sind, aber in Zukunft größeres Potential besitzen könnten.

3 Homozygosity for a partial deletion of apoprotein A-V signal peptide results in intracellular missorting of the protein and chylomicronemia in a breast-fed infant

Albers K\*, **Schlein C**\*, Wenner K, Lohse P, Bartelt A, Heeren J, Santer R, Merkel M. \*geteilte Erstautorenschaft



Contents lists available at ScienceDirect

### Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis



# Homozygosity for a partial deletion of apoprotein A-V signal peptide results in intracellular missorting of the protein and chylomicronemia in a breast-fed infant



Kirstin Albers <sup>a,1</sup>, Christian Schlein <sup>a,1</sup>, Kirsten Wenner <sup>b</sup>, Peter Lohse <sup>c,3</sup>, Alexander Bartelt <sup>a</sup>, Joerg Heeren <sup>a</sup>, René Santer <sup>b,2</sup>, Martin Merkel <sup>d,\*,2</sup>

- <sup>a</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology II, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany
- <sup>b</sup> Department of Pediatrics, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany
- <sup>c</sup>Department of Clinical Chemistry Großhadern, Ludwig-Maximilians-University, Marchioninistr. 15, 81377 München, Germany

#### ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 March 2010
Received in revised form
29 November 2013
Accepted 1 December 2013
Available online 8 January 2014

Keywords:
Apolipoprotein A-V
ApoA-V
APOA5
Mutation
Deletion
Chylomicronemia
Triglyceride
Hypertriglyceridemia
Signal peptide

#### ABSTRACT

Deficiency of apoprotein A-V (apoA-V) can cause hypertriglyceridemia. In an 11 months old boy presenting with a severe hypertriglyceridemia, a formerly unknown 24 nucleotide deletion in exon 2 of the *APOA5* gene was detected. The homozygous mutation results in an eight amino acid loss in the signal peptide sequence (c.16\_39del; p.Ala6\_Ala13del). Screening of control persons proved that this deletion is a rare mutation. Hypertriglyceridemia in the patient was only found at the time when he was breast fed, while after weaning, triglyceride levels were close to normal. Under both dietary conditions, apoA-V protein was undetectable in plasma while post-heparin plasma lipoprotein lipase activity was normal.

Expression analysis of normal and mutated protein by Western blot and immunofluorescence in apoA-V deficient primary hepatocytes revealed that, due to changes in the signal peptide, mutated apoA-V was intracellularly missorted to lipid droplets and not secreted. Wild type apoA-V, instead, was not targeted to lipid droplets but transported via endosomal compartments to the plasma membrane for secretion.

It is concluded that the c.16\_39del mutation in the *APOA5* gene leads to hepatic missorting and impaired secretion, which consequently results in undetectable apoA-V plasma levels. The absence of apoA-V in plasma leads under conditions of fat-rich diets to severe chylomicronemia, suggestive for a modulatory role of apoA-V for lipoprotein lipase mediated intravascular triglyceride lipolysis.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd. Open access under CC BY-NC-ND license

#### 1. Introduction

Type 1 chylomicronemia is characterized by fasting plasma triglyceride (TG) concentrations above 850 mg/dl (10 mmol/l).

The onset of this disorder is usually during childhood; the most common clinical presentation is recurrent acute pancreatitis. Typically, this condition is caused by mutations in the lipoprotein lipase gene (LPL) resulting in a deficient hydrolysis of TG from chylomicrons and VLDL. Less commonly, variants in the genes of apoprotein C-II (APOC2, an essential LPL cofactor), apoprotein A-V (APOA5, functions see below), GPI-anchored HDL-binding protein 1 (GPIHBP1, binding and transporting LPL to the endothelial surface) or the lipase maturation factor 1 (LMF1, a factor involved in maturation and translocation of lipases as LPL) can cause this phenotype. A recent study revealed the majority of severe hypertriglyceridemia type 1 cases being contributed to LPL defects (51%), about one third being without detectable rare variants or with common variants, and only about one sixth being caused by mutations in APOC2, APOA5 or GP1HBP1. In type 5 hypertriglyceridemia, in most cases common (77%) or no genetic variants were found [1].

Identified in 2001, apoA-V is one of the key players in plasma TG metabolism. Since its discovery, different hypotheses explaining

<sup>&</sup>lt;sup>d</sup> Department of Medicine, Asklepios Clinic St. Georg, Lohmuehlenstr. 5, 20099 Hamburg, Germany

Abbreviations: ApoA-V, apolipoprotein A-V; APOA5, human apoA-V gene; ΔSP-A5, c.16\_39del\_apoA-V; apoC-II, apolipoprotein C-II; APOC2, human apoC-II gene; LPL, lipoprotein lipase; TG, triglycerides; GPIHBP1, GPI-anchored HDL-binding protein 1; SNPs, single nucleotide polymorphisms; WT, wild type.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Department of Internal Medicine, Asklepios Clinic St. Georg, Lohmühlenstr. 5, 20099 Hamburg, Germany. Tel.: +49 (0)40 1818 85 2352; fax: +49 (0)40 1818 85 2323.

E-mail addresses: m.merkel@asklepios.com, martin.merkel@web.de (M. Merkel).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> First two authors with equal contribution.

Last two authors with equal contribution.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Present address: Virchowstr. 10c, 78224 Singen, Germany.

the mode of action have been proposed: First, it can activate endothelial bound LPL and thereby decreases plasma TG concentration [2,3]. Interactions with GPIHBP1 may be involved in this process [4]. Second, apoA-V may act as a ligand to hepatocellular receptors or proteoglycans [5,6]. Third, based on its structure, a role of apoA-V in hepatocellular lipid secretion has been discussed [7]. Recent data suggested in addition, that apoA-V may guide TG towards lipid droplet formation thereby decreasing hepatic VLDL production [8].

With more than 40 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and other variations being reported, the human *APOA5* gene is relatively polymorphic. However, for most sequence aberrations, there are no robust data regarding their functional relevance. Three widespread haplotypes have been described to result in significant differences in human plasma TG levels, with *APOA5\*1* (most common variants at all positions); *APOA5\*2* (rare alleles: –1131T>C, c.—3A>G, IVS3+476G>T, c.1259T>C) and *APOA5\*3* (S19W; c.56C>G; signal peptide variant) [9]. In genome wide association studies (GWAS), *APOA5* was found repeatedly to be one of the most significant gene loci influencing TG levels [10]. Beyond TG levels, *APOA5* SNPs were associated with cardiovascular disease, metabolic syndrome as well as the response to a weight loosing diet and lipid medication [5,11].

To date, only few alterations in the APOA5 gene have been found that cause type 1 or type 5 hypertriglyceridemia (Fig. 1). Three nonsense mutations, p.Gln97X (c.289C>T) [12], p.Gln139X (c.415 C>T) [13], and p.Gln148X (c.442C>T) [14] result in a protein truncation, and another three, c.49+1G>A [15], c.161+3G>C [16], and c.161+5G>C [17] cause aberrant splicing. Moreover, sequencing of the APOA5 gene in severely hypertriglyceridemic patients has revealed additional, so far unclassified missense variants. p.Glu255Gly (c.764A>G),p.Gly271Cys (c.821G>T),p.His321Leu (c.962A>T) [18], p.Gly185Cys (c.553G>T) [19] and p.Thr133Arg (c.398C>G) [1]. However, additional genetic or environmental conditions are usually necessary to express the full hypertriglyceridemic phenotype [20].

Here, we report a deletion of eight amino acids in the apoA-V signal peptide which results in an intracellular protein missorting and a hepatic apoA-V secretion defect. Clinically, the mutation caused severe hypertriglyceridemia in an 11 months old boy at a time when he was exclusively breast-fed. Remarkably, after weaning on a normal diet the boy had almost normal plasma TG concentrations.

#### 2. Case report

A Turkish boy 11 months of age presented in an outlying children's hospital with intermittent abdominal pain. He was fully breast fed without any restriction regarding frequency and time of meals. Episodes of abdominal discomfort were not related to the

Table 1

Plasma lipid and apoA-V concentrations in the patient, in his parents, an apoC-II deficient subject and in age-matched healthy controls.

	Triglycerides [mg/dl]	Cholesterol [mg/dl]	HDL cholesterol [mg/dl]	apoA-V [ng/ml]
Patient, breast-fed	2230	223	26	n.d.
Patient, after weaning	201	118	29	n.d.
Father	325	178	39	397
Mother	103	195	62	300
ApoC-II deficient control	2252	219	32	2534
Healthy controls <sup>a</sup>	$151\pm100$	$169 \pm 50$	$38\pm20$	$1113 \pm 537$

n.d., not detectable.

feeding status, they were explained by a mild pancreatitis with repeatedly elevated plasma lipase activity up to 231 U/I (normal <60 U/I) in the past. During blood drawing, a lipemic serum was found. No medication had been taken recently.

#### 2.1. Past medical history

The pregnancy was uncomplicated. The boy was born at term by Caesarean section, with a normal length and weight of 52 cm and 3.4 kg, respectively. Besides recurrent bronchitis and a norovirus infection, his medical history was unremarkable.

#### 2.2. Family history

The parents were first degree cousins, with their mothers being siblings. The paternal grandfather had a cardiac infarction at age 45; his plasma TG concentration was found to be slightly elevated (284 mg/dl; 3.35 mmol/l). The maternal grandfather suffered from an early cardiac infarction at age 51; his plasma TG concentration was 481 mg/dl (5.7 mmol/l) (Table 1). Except for the parents, none of the family members was available for further analyses since they are living in a rural area in Turkey.

#### 2.3. Physical examination

On presentation, the patient's length was 80 cm (90th percentile) and his weight was 11.1 kg (75th percentile). Physical examination of lungs and heart was normal. The liver was palpable 1.5 cm below costal margin; the spleen was not palpable. No lipoid corneal arc, xanthomata, or xanthelasma were found. Psychomotor skills were appropriate for age. An abdominal ultrasound revealed a slightly enhanced echo texture of liver and spleen. At that time, the pancreas did not show any abnormal findings.

#### APOA5 gene

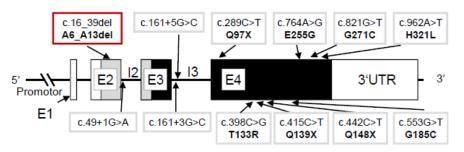


Fig. 1. Structural mutations of the APOA5 gene. The newly discovered mutation is marked with a red box. White boxes, untranslated regions (UTR); gray boxes, signal peptide; black boxes, mature protein; 11–13; introns, E1-E4: exons. See text for references.

Means of 10 healthy children between 0 and 3 years.

#### 2.4. Laboratory findings

Routine laboratory values (blood count, GOT, GPT, creatinine, clotting factors) were normal. When investigated by us, also plasma pancreatic lipase activity was within normal limits. In addition, normal values were found for vitamin A, E, D and essential fatty acids in plasma phosphor lipids. Plasma lipoprotein concentrations are shown in Table 1.

#### 2.5. Ethical consideration

The parents agreed and gave written consent to genetic analyses and biochemical work-up as well as a scientific publication. They refused to have a liver biopsy performed in the boy. Work-up was done in accordance with the Helsinki Declaration and the rules of the Local Ethics Committee of the Hamburg Medical Association.

#### 2.6. Follow-up

Upon our recommendation, the parents stopped breast feeding and started to a regular formula-based diet. Only 4 weeks later, his plasma TG concentration had decreased to an almost normal level (Table 1) and episodes of abdominal pain were no longer present.

#### 3. Methods

#### 3.1. Genetic characterization

Direct sequencing of all exons, the intron/exon regions and the flanking untranslated sequences of APOA5, APOC3, LPL, and APOC2 was performed by standard techniques using the Sanger method on an ABI/Hitachi 3500 Genetic Analyser. Results were automatically compared by SeqPilot<sup>®</sup> software version 4.0.1 to the respective reference sequences (APOA5: NM\_052968).

#### 3.2. Genetic screening for heterozygote frequency

Using specific primers for *APOA5* exon 2 (sn 5'-TAA-CAGGATTTCGGGCACTT-3' and asn 5'-TCTGCTGCTCAACCTCTGT-3'), the wild type (WT) sequence renders a PCR product of 484 bp; in the case of the detected mutation the shortened product has a size of 460 bp. This difference was easily visualized on a 6% polyacrylamide gel (Supplemental Fig. 1). Furthermore, heterozygosity for the deletion resulted in heteroduplex formation.

In order to investigate the frequency of the identified mutation in the APOA5 gene, an anonymous gene bank from 50 healthy individuals of Turkish background living in Germany [21] was screened for the mutation with this technique. Donors had agreed to anonymous use of their DNA for future scientific use. DNA samples were investigated with and without the admixture of WT PCR products.

#### 3.3. Plasma analysis

Plasma triacylglycerol and cholesterol measurements as well as lipoprotein separation by sequential ultracentrifugation were performed as described [2]. Lipoprotein profiling was done by FPLC using an S6-superose column (GE Healthcare), and lipid levels were analyzed in each fraction [2]. Total apoA-V plasma levels were measured by a simple EUSA technique based on a rabbit polyclonal antisera against the human apoA-V C-terminus [2]. His-tagged apoA-V was purified by Ni-NTA column chromatography (Qiagen) and subsequent size exclusion chromatography using a S200-superose column (GE Healthcare). Recombinant apoA-V was used as standard. Dilutions of standards and plasma samples were

immobilized on Maxisorp microtiter plates (Nunc) and apoA-V protein content was determined using apoA-V rabbit antisera and EUSA Development Reagents (R&D Systems). The apoA-V concentration of plasma samples was calculated in relation to the standard curve (Supplemental Fig. 2). Plasma LPL activity was determined using pre- and post-heparin plasma using an artificial glycerol tri-[1-14C]oleate-containing lipid emulsion [22].

#### 3.4. Animals

Animal experiments were done in accordance with the guidelines of the Federation of American Societies for Experimental Biology and approved by the Department of Veterinary Affairs of the State of Hamburg and the Animal Care Committee of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. FVB-background apoA-V-deficient (ApoA5<sup>-/-</sup>) mice [23] were used and genotyping was performed as described [11].

#### 3.5. Constructing plasmids

Plasmid DNA was amplified and isolated using XL1-blue E. coli bacteria; ligated constructs were amplified by ultra-competent XL-10-gold E. coli (Stratagene). WT-APOA5-containing pET-20b plasmid kindly provided by Dr. R. O. Ryan (Oakland, CA) [24] was restricted with Notl/Xbal FastDigest enzymes (Fermentas) and the APOA5-wild-type sequence was cloned via Notl/Xbal restriction enzyme sites into an Addgene pcDNA3.1-vector backbone for expression. Plasmids were isolated using NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey—Nagel). Gel extraction was performed using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey—Nagel). Primers for the site-directed mutagenesis to produce c.16\_39delAPOA5 were purchased from MWG. Sequence was checked via GATC Biotech Sanger Service.

#### 3.6. Cell culture

Primary hepatocytes were prepared according to Meredith [25] with modifications as described [26]. Briefly, harvested cells were seeded in DMEM (10% FCS, 4.5 g/l glucose, [+]gultamine, [-]pyruvate, 2% Antimycotic–Antibiotic from Invitrogen) medium to a density of 200,000 cells/ml. Cells were transfected with WT or mutant pcDNA-apoA-V or, for transfection control, with pcDNA-EGFP with Lipofectamin2000 (Invitrogen). To induce the formation of lipid droplets, 36 h after transfection the cells were administrated with oleic acid (incubated at 37° at 1200 rpm for 1 h in DMEM  $+\ 1$  g/ml BSA  $+\ BODIPY$ ) to a concentration of 100  $\mu M$  for 4 h and then harvested for Western blotting or fixed with 4% PFA for immunofluorescence studies.

#### 3.7. Western blotting

Primary hepatocyte supernatant and cell lysates were analyzed via SDS-PAGE (GE Healthcare), electrotransferred on nitrocellulose membrane (Whatman) and then probed with the following antibodies: Rabbit polyclonal antisera against the human apoA-V C-terminus 1:2.500 [2], apoE (Acris, 1:1000, rabbit), GAPDH (Novus Biologicals, 1:1000, goat).

#### 3.8. Immunofluorescence studies

Fixed primary hepatocytes were washed with PBS and permeabilized with PGS (PBS + 0.5 mg/ml saponin +5 mg/ml glycine). After blocking with Blocking Buffer I (AppliChem) cells were incubated with following antibodies: apoA-V rabbit polyclonal antiserum (1:250 rabbit, gift of Gunilla Olivecrona, Umeå, Sweden)

and Cy5-donkey-anti rabbit (Jackson Immuno Research Laboratories). To visualize lipid droplets, BODIPY (Invitrogen) was used. Nuclei were stained with DAPI.

#### 4. Results

#### 4.1. Genetic characterization of the patient

Direct sequencing of all exons, the intron/exon regions and the flanking untranslated sequences of the LPL and the APOC2 genes did not show any mutations. Analysis of the APOA5 gene revealed homozygosity for a deletion of 24 bases (c.16\_39del) in the second exon, predicting the loss of eight amino acids (p.Ala6\_Ala13del) within the apoA-V signal peptide (ΔSP-apoA-V) without frame shift. Both parents were shown to be heterozygous carriers of this gene defect (Fig. 2A and Supplemental Fig. 1). This eight amino acid deletion in the signal peptide of apoA-V causes a difference in maximal uninterrupted hydrophobic amino acids from 6 to 4 in a row (Fig. 2B). Other frequently identified SNPs in the APOA5 gene (haplotype APOA5\*2 [-1131T>C, c.-3A>G, IVS3+476G>A, c.1259T>C], haplotype APOA5\*3 [c.56C>G; p.S19W], and the polymorphism c.553G>T, p.G185C) were not found [9]. The situation in the APOC3 gene, another TG influencing gene, was as follows: -482C>T (rs2854117), T/T; -455T>C (rs2854116), C/C and 3238C>G (Sst I site; rs5128), C/C. Taken together, except for the disruption of the apoA-V signal peptide, no other mutation was found which may have caused the phenotype of the patient.

#### 4.2. Mutation frequency

To investigate the frequency of the identified mutation of the APOA5 gene in the general Turkish population, an anonymous gene bank from 50 individuals with Turkish ancestors living in the region around Munich, Germany, was screened using the method described for supplemental Fig. 1. From one sample no PCR product could be generated; none of the other analyzed APOA5 genes carried the mutation. Thus, in 98 chromosomes c.16\_39del was not found, indicating that this mutation is not a common APOA5 variant in the Turkish population. In addition, the 1000genomes and the Exome Variant Server databases have been checked for genetic variations in the APOA5 gene. The newly discovered mutation was not reported in these two databases. Even more, no in frame

deletions in the coding sequence are described so far (http://www. 1000genomes.org; http://evs.gs.washington.edu/EVS/).

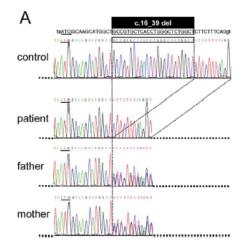
#### 4.3. Biochemical characterization of the patient

Plasma levels of apoA-V were measured by ELISA and compared to the ApoA-V levels of the parents as well as to 10 age-matched controls. As shown in Table 1, apoA-V was not found in the patient's blood both in the hypertriglyceridemic state and after weaning. Diminished apoA-V plasma concentrations were present in both parents. Plasma pre- and post-heparin LPL activity was normal in the patient. Addition of apoA-V did not change in vitro LPL activity (Supplemental Table 1). To investigate TG hydrolysis in vivo, plasma FPLC chromatography before and after heparinization was performed (supplemental Fig. 3). In the apoA-V deficient patient, the VLDL/chylomicron peak decreased and a glycerol peak appeared after heparin injection. Both effects are the results of LPL-mediated TG hydrolysis in plasma. In contrast, in an apoC-II deficient patient [27], there were no changes in the TG peak, and no glycerol peak arose. Since apoA-V accelerates TG hydrolysis especially at endothelial bound LPL [2], this effect supports the hypothesis, that a lack of plasma apoA-V caused the hypertriglyceridemia in the patient under high fat diet conditions.

#### 4.4. Expression analysis of WT and △SP-apoA-V

To investigate the secretion of WT and  $\Delta$ SP-apoA-V from hepatocytes, both proteins were expressed in primary hepatocytes from apoA-V deficient mice. First, medium and cell lysates were investigated for apoA-V by Western blot. As shown in Fig. 3 (upper panels), both after incubation with BSA and HDL as apoA-V acceptor, the 38 kDa apoA-V band was almost only seen in the WT situation. Only traces of apoA-V were detectable in the supernatants of cells transfected with  $\Delta$ SP-apoA-V. In contrast, the cell lysates of  $\Delta$ SP-apoA-V transfected cells contained significantly higher amounts of apoA-V than cells expressing WT-apoA-V (Fig. 3, lower panels). No apoA-V signal was detected after GFP transfection in these apoA-V deficient hepatocytes.

Indirect immunofluorescence using an antibody against apoA-V and lipid droplet staining was performed to gain information about the intracellular fate of mutated apoA-V. In Fig. 4 A—D, transfected WT apoA-V (red) was clearly located at the plasma membrane





Amino acids	WT APOA5	∆SP APOA5
length	23	15
hydrophobic	17/23	10/15
hydrophilic	6/23	5/15
uninterrupted hydrophphilic	6 (WALALL)	4 (MALL)

Fig. 2. Identification of the APOA5 signal peptide deletion. A, sequencing of the APOA5 gene in the patient, in his parents and in a control subject. A homozygous 24-bp-deletion (c16\_39del) is detected in the patient, and a heterozygous pattern was found in both parents. B, eight amino acids (marked in red) are deleted in the signal peptide of apoA-V in the patient resulting in ΔSP-apoA-V. This causes a difference in maximal uninterrupted hydrophobic amino acids in a row (lower panel) which is likely to result in a loss-of-function of the signal peptide.

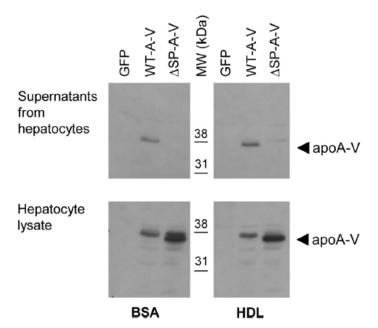


Fig. 3. Detection of apoA-V by Western blot in culture supernatant and cell lysates after expression of different variants in primary hepatocytes from apoA-V deficient mice. GFP, control vector; WT-A-V, wild type apoA-V; ΔSP-A-V, ΔSP-apoA-V (c.16\_39del\_apoA-V). The medium was supplemented with BSA or HDL as apoA-V acceptor, respectively. Western blot was carried out using rabbit apoA-V antiserum.

distinct from green lipid droplets. However, the signal of  $\Delta$ SP-apoA-V (Fig. 4 E–H) was not associated with the plasma membrane. Instead, mutated apoA-V was completely co-localized with lipid droplets (yellow in web version in Fig. 4 G and H). Thus, partial deletion of the apoA-V signal peptide leads to intracellular missorting and defective secretion of the apoA-V protein.

#### 5. Discussion

In a young boy with severe hypertriglyceridemia, a defective plasmatic TG hydrolysis due to an eight amino acid deletion in frame in the apoA-V signal peptide (*APOA5 c.16\_39del*; ΔSP-apoA-V)

was found to cause this condition. To our knowledge, this mutation has not been described before. At the positions of frequently identified SNPs in the *APOA5* gene, the most common haplotype *APOA5\*1* was found to be associated with the lowest TG levels [9]. In the *APOC3* gene, -482T/T and -455C/C have been associated with mild TG increase, 3238C/C is associated with lower TG levels according to different investigators [28,29]. In any case, neither polymorphisms in the *APOA5* nor in the *APOC3* genes suggested other genetic causes for hypertriglyceridemia.

Single homozygosity or compound heterozygosity for mutations in the *APOA5* gene are less common causes of severe hypertriglyceridemia [1]. About eleven mutations and about 20 patients have been reported thus far. The mutation described here has not been previously reported. In most cases, even severe structural apoA-V changes were not sufficient to cause hypertriglyceridemia alone. Other factors such as age, additional *APOA5* sequence aberrations (reported with *APOA5* p.Gln97X [12,30], p.Gln139X [13], p.Gln148X [14], p.Gly271Cys [18] and c.49+1G>A [15]), *IPL* mutations (reported with *APOA5* p.Glu255Gly and *APOA5* p.His321Leu [18]), reduced LPL activity (*APOA5* c.161+3G>C [16]), or pregnancy (*APOA5* c.161+5G>C [17] and *APOA5* p.Glu255Gly <sup>18</sup>) or HIV therapy (*APOA5* p.Gly185Cys [31]) were necessary to result in the full hypertriglyceridemic phenotype.

With his age of only 11 months, our patient had the earliest manifestation of a hypertriglyceridemia associated with an *APOA5* mutation ever reported. However, as reported for other cases described above, an additional factor was necessary for disease manifestation: Severe hypertriglyceridemia and abdominal pain were only found on a diet with a relatively high fat content at an age when he was exclusively fed breast milk (supplying about 50% of energy from fat). When a normal, mildly fat-reduced regular toddler's diet with a calculated caloric intake from fat of 35% was fed, plasma TG concentration decreased substantially to almost normal.

SNPs in the *APOA5*-gene have been found to be strongly associated with plasma TG levels [32]. This is especially true for –1131T>C, a polymorphism which in Caucasians is in strong linkage disequilibrium with c.–3A>G, IVS3+476G>A and c.1259T>C [9,33]. In a genome-wide linkage analysis for TG levels in a subset of Turkish families originating both from Istanbul and a

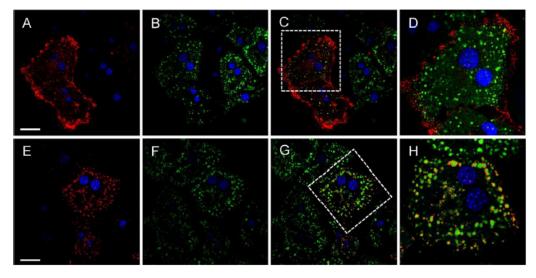


Fig. 4. Deletion in the apoA-V signal peptide causes intracellular missorting of newly synthesized apoA-V. Primary apoA-V-deficient hepatocytes were transfected with plasmids encoding either wild type apoA-V (A–D) or apoA-V with a deleted signal peptide region (c.16\_39del\_apoA-V; ΔSP-apoA-V; E–H). After incubation with oleic acids and Bodipy-labeled fatty acids to visualize lipid droplets (B, F), indirect immunofluorescence using an antibody against apoA-V was performed (A, E). Merged images showed that wild type apoA-V is localized at the plasma membrane (C), whereas ΔSP-apoA-V co-localizes with lipid droplets (G). Magnified images of the dotted boxes are shown in D and H, respectively. Bars denote 20 μm.

rural area of central Turkey, the most significant genetic linkage was found at 11q22 [34]. This suggests that apoA-V may be of high importance for TG regulation also in this population. Data from the Turkish Heart Study (THS) have revealed an incomplete linkage disequilibrium between –1131T>C, -1464T>C and c.1259T>C, however, sequencing of the untranslated region (UTR) and all exons intron/exon splicing boundaries auf *APOA5* in participants of this study did not reveal the deletion c.16\_39del described here [35]. Despite this strong evidence, that the mutation found in this patient is not a common *APOP5* polymorphism, we tested 49 randomly selected samples (98 chromosomes) from healthy individuals of Turkish background living in Germany for this mutation without finding c.16\_39del. Thus, the *APOA5* promoter deletion c.16\_39del seems indeed to be a rare functionally significant mutation and not a polymorphism.

No apoA-V was detected in the patient's plasma and reduced apoA-V levels were found in his parents. It was therefore suggested, that the signal peptide mutation disturbs intracellular trafficking and secretion. The deletion c.16\_39del (p.Ala6\_Ala13del,  $\Delta$ SP-apoA-V) affects the signaling sequence which consists of the 23 N-terminal amino acids of the protein. The deletion causes a difference in maximal uninterrupted hydrophobic amino acids in a row from six (WT) to four ( $\Delta$ SP-apoA-V). This is per se likely to result in a loss-of-function of the signal peptide.

Several experiments were performed to find out, whether and how apoA-V secretion was affected by the signal peptide mutation. Since a liver biopsy was clinically not justified, expression of WT and mutated apoA-V was performed in primary hepatocytes from apoA-V defective mice. Western blot analysis showed ΔSP-apoA-V in high amounts almost exclusively intracellularly, whereas WTapoA-V was secreted from hepatocytes with less protein left over intracellularly. In addition, as shown by immunofluorescence, partial deletion of the apoA-V signal peptide leads to intracellular missorting to hepatocellular lipid droplets and defective secretion of the protein. In contrast, WT-apoA-V was located mainly at the plasma membrane. A localization of apoA-V at the plasma membrane was theoretically predicted and proven by immunofluorescence by Weinberg and co-workers [7]. Indirect immune fluorescence from livers of apoA-V transgenic mice also depicted a clear localization of human apoA-V at the hepatocellular plasma membrane (Supplemental Fig. 4).

It can be concluded that, under normal conditions, high amounts of apoA-V are located at the hepatocellular plasma membrane for secretion. Only due to missorting because of a defective signal peptide, apoA-V is transported to lipid droplets. These data are in contrast to the results of Shu and co-workers [36]. When expressing a FLAG-tagged full length apoA-V in the Hep3B hepatoma cell line, the authors found the protein being associated mainly with lipid droplets. A change in protein processing due to the FLAG tag or the cell model used could be the reason for this difference to our data using primary hepatocytes. In any case, a possible influence of apoA-V on the formation of lipid droplets maybe due to increased lipid uptake by apoA-V as described by Gao et al. [8] - could still occur, since apoA-V is significantly upregulated during liver regeneration [37]. Last but not least, altering signal peptide cleavage could be a way to regulate the fate of liver TG either to droplets or to VLDL formation.

The precise mechanism, how apoA-V decreases plasma TG concentration, is not completely understood. In plasma, apoA-V is mainly bound to VLDL and HDL at very low concentrations. It has been demonstrated, that apoA-V can accelerate plasma TG catabolism by affecting proteoglycan bound LPL [2,3]. However, it could also act as a ligand for hepatic lipoprotein receptors or proteoglycans enhancing remnant removal [38]. In this patient, detaching LPL from endothelial proteoglycans by heparin resulted

in fast TG hydrolysis even in the apoA-V deficient situation. Without heparin, the lipoprotein profile is equal to that of an apoC-II deficient subject with high TG and no glycerol peak. This clearly shows that apoA-V is essential for the hydrolysis of plasma TG by proteoglycan bound LPL, but not for the enzymatic action of unbound LPL

Taken together, a novel structural mutation in the APOA5 gene (c.16\_39del\_APOA5) with a deleterious effect on plasma TG hydrolysis was identified. This signal peptide mutation causes an intracellular missorting and plasma deficiency of apoA-V leading to severe hypertriglyceridemia on a diet relatively high in fat, but not on a fat-reduced diet.

#### Acknowledgments

This work was supported by the German Research Foundation (MM and JH, DFG ME 1507/4–1). We thank Dr. Renneberg, Children's Hospital Bremerhaven for referral of the patient and Sandra Ehret and Juliane Bergmann for excellent technical assistance. Kirstin Albers and Christian Schlein were supported by the DFG-funded Graduiertenkolleg 1459.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.009.

#### References

- Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. J Intern Med 2012;272:185–96.
- [2] Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan bound lipoprotein lipase. J Biol Chem 2005;280:21553—60.
- [3] Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. J Biol Chem 2004;279:27941-7.
- [4] Shu X, Nelbach L, Weinstein MM, et al. Intravenous injection of apolipoprotein A-V reconstituted high-density lipoprotein decreases hypertriglyceridemia in apoav<sup>-/-</sup> mice and requires glycosylphosphatidylinositol-anchored highdensity lipoprotein-binding protein 1. Arteriosder Thromb Vasc Biol 2010;30: 2504–9.
- [5] Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M. Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. Atherosclerosis 2011;219:15–21.
- [6] Gonzales JC, Gordts PL, Foley EM, Esko JD. Apolipoproteins E and AV mediate lipoprotein dearance by hepatic proteoglycans. J Clin Invest 2013;123:2742– 51.
- [7] Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, et al. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. J Biol Chem 2003;278:34438–44.
- [8] Gao X, Forte TM, Ryan RO. Influence of apolipoprotein A-V on hepatocyte lipid droplet formation. Biochem Biophys Res Commun 2012;427:361—5.
- [9] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Krauss RM, Rubin EM, Cohen JC. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence human plasma triglyceride levels. Hum Mol Genet 2002;11:3031–8.
- [10] Johansen CT, Hegele RA. The complex genetic basis of plasma triglycerides. Curr Atheroscler Rep 2012;14:227–34.
- [11] Kluger M, Heeren J, Merkel M. Apoprotein A-V: an important regulator of triglyceride metabolism. J Inherit Metab Dis 2008;31:281—8.
- [12] Priore Oliva C, Carubbi F, Schaap FG, Bertolini S, Calandra S. Hypertriglyceridaemia and low plasma HDL in a patient with apolipoprotein A-V deficiency due to a novel mutation in the APOA5 gene. J Intern Med 2008;263: 450—8
- [13] Marcais C, Verges B, Charriere S, et al. Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment. J Clin Invest 2005;115:2862—9.
- [14] Priore Oliva C, Pisciotta L, Li Volti G, et al. Inherited apolipoprotein A-V deficiency in severe hypertriglyceridemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:411–7.
- [15] Okubo M, Ishihara M, Iwasaki T, et al. A novel APOA5 splicing mutation IVS2+1g>a in a Japanese chylomicronemia patient. Atherosclerosis 2009;207: 24–5
- [16] Priore Oliva C, Tarugi P, Calandra S, et al. A novel sequence variant in APOA5 gene found in patients with severe hypertriglyceridemia. Atherosclerosis 2006;188:215–7.

- [17] Henneman P, Schaap FG, Rensen PC, van Dijk KW, Smelt AH. Estrogen induced hypertriglyceridemia in an apolipoprotein AV deficient patient. J Intern Med 2008;263:107—8.
- [18] Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008;28: 1866–71.
- [19] Pullinger CR, Aouizerat BE, Movsesyan I, et al. An apolipoprotein A-V gene SNP is associated with marked hypertriglyceridemia among Asian-American patients. I Lipid Res 2008:49:1846–54.
- [20] Talmud PJ. Rare APOA5 mutations—clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. Atherosclerosis 2007;194:287—92.
- [21] Lainka E, Neudorf U, Lohse P, et al. Incidence and clinical features of hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) and spectrum of mevalonate kinase (MVK) mutations in German children. Rheumatol Int 2012;32:3253–60.
- [22] Nilsson-Ehle P, Schotz MC. A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. J Lipid Res 1976;17:536–41.
- [23] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Science 2001;294:169–73.
- [24] Beckstead JA, Oda MN, Martin DD, et al. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. Biochemistry 2003;42:9416–23.
- [25] Meredith MJ. Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture. Cell Biol Toxicol 1988;4: 405–25.
- [26] Bartelt A, Orlando P, Mele C, et al. Altered endocannabinoid signalling after a high-fat diet in Apoe(-/-) mice: relevance to adipose tissue inflammation, hepatic steatosis and insulin resistance. Diabetologia 2011;54:2900–10.
- [27] Beil FU, Fojo SS, Brewer Jr HB, Greten H, Beisiegel U. Apolipoprotein C-II deficiency syndrome due to apo C-IIHamburg: clinical and biochemical features and HphI restriction enzyme polymorphism. Eur J Clin Invest 1992;22: 88—95.

- [28] Hallman DM, Srinivasan SR, Chen W, Boerwinkle E, Berenson GS. Longitudinal analysis of haplotypes and polymorphisms of the APOA5 and APOC3 genes associated with variation in serum triglyceride levels: the Bogalusa Heart Study. Metabolism 2006;55:1574—81.
- [29] Talmud PJ, Hawe E, Martin S, et al. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. Hum Mol Genet 2002;11:3039–46.
- [30] Charriere S, Cugnet C, Guitard M, et al. Modulation of phenotypic expression of APOA5 Q97X and L242P mutations. Atherosclerosis 2009;207:150–6.
- [31] Chang SY, Ko WS, Kao JT, et al. Association of single-nucleotide polymorphism 3 and c.553G>T of APOA5 with hypertriglyceridemia after treatment with highly active antiretroviral therapy containing protease inhibitors in HIVinfected individuals in Taiwan. Clin Infect Dis 2009;48:832-5.
- [32] Johansen CT, Hegele RA. Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides. Biochim Biophys Acta 2012;1821:833–42.
- [33] Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, et al. Influence of the APOA5 locus on plasma triglyceride, lipoprotein subclasses, and CVD risk in the Framingham Heart Study. J Lipid Res 2004;45:2096–105.
- [34] Yu Y, Wyszynski DF, Waterworth DM, et al. Multiple QTLs influencing triglyceride and HDL and total cholesterol levels identified in families with atherogenic dyslipidemia. J Lipid Res 2005;46:2202-13.
- [35] Hodoglugil U, Tanyolac S, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. J Lipid Res 2006;47:144–53.
- [36] Shu X, Chan J, Ryan RO, Forte TM. Apolipoprotein A-V association with intracellular lipid droplets. J Lipid Res 2007;48:1445–50.
- [37] van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. J Biol Chem 2001;276:44512—20.
- [38] Nilsson SK, Lookene A, Beckstead JA, Gliemann J, Ryan RO, Olivecrona G. Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. Biochemistry 2007;46:3896—904.

4	Abbildungsverzeichnis	
Abb	ldung 1: Modell des dysfunktionalen ∆SP-APOA5	
5	Tabellenverzeichnis	
Tabe	elle 1: Einteilung primärer Hyperlipidämien	3

# 6 Abkürzungsverzeichnis

APOA5 Apolipoprotein A5

APOE Apolipoprotein E

BAT Brown Adipose Tissue

CHOL Cholesterin

GPIHBP1 Glycosylphosphatidylinositol-anchored HDL Binding Protein 1

HDL High Density Lipoproteins

HWZ Halbwertszeit

IDL Intermediate Density Lipoprotein

IL-6 Interleukin 6

KHK Koronare Herzkrankheit

LDL Low Density Lipoprotein

LDLR LDL-receptor

LPL Lipoproteinlipase

LRP1 LDLR-related Protein 1

Ncl Nucleus

SRP Signal Recognition Particle

TG Triglyzeride

TNF- α Tumor Necrosis Factor Alpha

TRL Triglyzeridreiche Lipoproteine

VLDL Very Low Density Lipoprotein

WAT White Adipose Tissue

### 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- (1) The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. Nat Rev Endocrinol. 2011 Nov 8;8(4):228-36. doi: 10.1038/nrendo.2011.183.
- (2) Type 2 diabetes mellitus incidence in Chinese: Contributions of over weight and obesity. Wang C, Li J, Xue H, Li Y, Huang J, Mai J, Chen J, Cao J, Wu X, Guo D, Yu L, Gu D. Diabetes Res Clin Pract. 2014 Oct 8. pii: S0168-8227(14)00459-8. doi:10.1016/j.diabres.2014.09.059
- (3) Obesity and type 2 diabetes in Sub-Sahara Africa. Mbanya JC, Assah FK, Saji J, Atanga EN. Curr Diab Rep. 2014 Jul;14(7):501. doi: 10.1
- (4) The changing face of diabetes in America. Adebayo O, Willis GC. Emerg Med Clin North Am. 2014 May;32(2):319-27. doi: 10.1016/j.emc.2013.12.004. 007/s11892-014-0501-5.
- (5) Diabetes in South and Central America: an update. Aschner P, Agui lar-Salinas C, Aguirre L, Franco L, Gagliardino JJ, de Lapertosa SG, Se clen S, Vinocour M; IDF Diabetes Atlas. Diabetes Res Clin Pract. 2014 Feb;103(2):238-43. doi: 10.1016/j.diabres.2013.11.010.
- (6) Global and societal implications of the diabetes epidemic. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Nature. 2001 Dec 13;414(6865):782-7.
- (7) The prevention of overweight and obesity in children and adolcents: a review of interventions and programmes. Doak CM, Visscher TL, Renders CM, Seidell JC. Obes Rev. 2006 Feb;7(1):111-36.
- (8) Anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. Bäck M, Hansson GK. Nat Rev Cardiol. 2015 Feb 10. doi: 10.1038/nrcardio.2015.5.
- (9) "HEROLD Innere Medizin", Gerd Herold, 2012, ISBN: 978-3-9814660-1-0
- (10) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Hotamisligil GS. Cell. 2010 Mar 19;140(6):900-17. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.034.
- (11) Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases.

  Hotamisligil GS, Erbay E. Nat Rev Immunol. 2008 Dec;8(12):923-34.

  doi: 10.1038/nri2449.
- (12) Brown adipose tissue: function and physiological significance.

  Cannon B, Nedergaard J. Physiol Rev. 2004 Jan;84(1):277-359.

- (13) Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins.

  Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N. J Lipid Res. 2001

  Sep;42(9):1346-67.
- (14) Molecular processes that handle -- and mishandle -- dietary lipids.

  Williams KJ. J Clin Invest. 2008 Oct;118(10):3247-59. doi:
  10.1172/JCl35206.
- (15) Physiological regulation of lipoprotein lipase. Kersten S. Biochim Biophys Acta. 2014 Jul;1841(7):919-33. doi:10.1016/j.bbaip.2014.03.013.
- (16) Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis. Li Y, He PP, Zhang DW, Zheng XL, Cayabyab FS, Yin WD, Tang CK. Atherosclerosis. 2014 Dec;237(2):597-608. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.016.
- (17) GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase.
  Young SG, Davies BS, Voss CV, Gin P, Weinstein MM, Tontonoz P,
  Reue K, Bensadoun A, Fong LG, Beigneux AP.
  J Lipid Res. 2011 Nov;52(11):1869-84. doi: 10.1194/jlr.R018689. Epub
  2011 Aug 15.
- (18) Comparison of the action of lipoprotein lipase on triacylglycerols and phospholipids when presented in mixed liposomes or in emulsion droplets. Rojas C, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Eur J Biochem. 1991 Apr 23;197(2):315-21.
- (19) Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo.
  Merkel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Gold berg IJ, Breslow JL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 10;95(23):13841-6.
- (20) Apolipoprotein A-V interaction with members of the low density lipoprotein receptor gene family. Nilsson SK, Lookene A, Beckstead JA, Gliemann J, Ryan RO, Olivecrona G. Biochemistry. 2007 Mar 27;46(12):3896-904.
- (21) Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterolester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. Merkel M, Heeren J, Dudeck W, Rinninger F,

- Radner H, Breslow JL, Goldberg IJ, Zechner R, Greten H. J Biol Chem. 2002 Mar 1;277(9):7405-11.
- (22) Lipoprotein lipase in the brain and nervous system. Wang H, Eckel RH. Annu Rev Nutr. 2012 Aug 21;32:147-60. doi: 10.1146/annurev-nutr-071811-150703.
- (23) Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo. Heeren J, Niemeier A, Merkel M, Beisiegel U. J Mol Med (Berl). 2002 Sep;80(9):576-84.
- (24) Lipoprotein lipase deficiency--rare or common? Evans V, Kastelein JJ. Cardiovasc Drugs Ther. 2002 Jul;16(4):283-7
- (25) Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S, Anand S, Yusuf S, Pollex RL, Hegele RA. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Nov;27(11):2450-5.
- (26) Genes associated with low serum high-density lipoprotein cholesterol. Ahmadzadeh A, Azizi F. Arch Iran Med. 2014
  Jun;17(6):444-50. doi: 014176/AIM.0013.
- (27) The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. Zechner R, Strauss J, Frank S, Wagner E, Hofmann W, Kratky D, Hiden M, Levak-Frank S. Int J Obes Relat Metab Disord. 2000 Nov;24 Suppl 4:S53-6.
- (28) Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. Weinstock PH, Levak-Frank S, Hudgins LC, Radner H, Friedman JM, Zechner R, Breslow JL.Proc Natl Acad Sci USA. 1997 Sep 16;94(19):10261-6.
- (29) Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gordts PL, Rin ninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J. Nat Med. 2011 Feb;17(2):200-5. doi: 10.1038/nm.2297.
- (30) Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr. J Lipid Res. 1999 Nov;40(11):1933-49.

- (31) Chylomicron/chylomicron remnant turnover in humans: evidence for margination of chylomicrons and poor conversion of larger to smaller chylomicron remnants. Karpe F, Olivecrona T, Hamsten A, Hultin M. J Lipid Res. 1997 May;38(5):949-61.
- (32) Measuring VLDL-triglyceride turnover in humans using ex vivoprepared VLDL tracer. Gormsen LC, Jensen MD, Nielsen S. J Lipid Res. 2006 Jan;47(1):99-106.
- (33) Triglycerides and cardiovascular disease. Nordestgaard BG, Varbo A. Lancet. 2014 Aug 16;384(9943):626-35. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61177-6.
- (34) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM. Scence. 2001 Oct 5;294(5540):169-73.
- (35) Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA. J Biol Chem. 2001 Nov 30;276(48):44512-20. Epub 2001 Sep 27.
- (36) Apolipoprotein A5 in health and disease. Hubácek JA, Adámková V, Vrablík M, Kadlecová M, Zicha J, Kunes J, Pitha J, Suchánek P, Poledne R. Physiol Res. 2009;58 Suppl 2:S101-9.
- (37) Apolipoprotein A-V N-terminal domain lipid interaction properties in vitro explain the hypertriglyceridemic phenotype associated with natural truncation mutants. Wong-Mauldin K, Raussens V, Forte TM, Ryan RO. J Biol Chem. 2009 Nov 27;284(48):33369-76. doi: 10.1074/jbc.M109.040972.
- (38) Determinants of plasma apolipoprotein A-V and APOA5 gene transcripts in humans. Hahne P, Krempler F, Schaap FG, Soyal SM, Höffinger H, Miller K, Oberkofler H, Strobl W, Patsch W. J Intern Med. 2008 Nov;264(5):452-62. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01987.x.
- (39) Is apolipoprotein A5 a novel regulator of triglyceride-rich lipoproteins? Jakel H, Nowak M, Helleboid-Chapman A, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. Ann Med. 2006;38(1):2-10.
- (40) Apolipoprotein A-V dependent modulation of plasma triacylglycerol:
   a puzzlement. Sharma V, Ryan RO, Forte TM. Biochim Biophys Acta.
   2012 May;1821(5):795-9. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.12.002.

- (41) APOA5 gene expression in the human intestinal tissue and its response to in vitro exposure to fatty acid and fibrate. Guardiola M, Alvaro A, Vallvé JC, Rosales R, Solà R, Girona J, Serra N, Duran P, Esteve E, Masana L, Ribalta J. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2012 Sep;22(9):756-62. doi: 10.1016/j.numecd.2010.12.003.
- (42) The ins (cell) and outs (plasma) of apolipoprotein A-V. Forte TM, Shu X, Ryan RO. J Lipid Res. 2009 Apr;50 Suppl:S150-5. doi: 10.1194/jlr.R800050- JLR200.
- (43) 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. O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, Schultze AE, Konrad RJ. Clin Chem. 2005 Feb;51(2):351-9.
- (44) Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! Merkel M, Heeren J. J Clin Invest. 2005 Oct;115(10):2694-6.
- (45) Structure and metabolism of plasma lipoproteins aus "The metabolic and molecular bases of inherited disease". Volume 2. Havel, R.J., and Kane, J.P. 2001. New York, New York, USA. 2705–2716.
- (46) Adenoviral overexpression of apolipoprotein A-V reduces serum levels of triglycerides and cholesterol in mice. van der Vliet HN, Schaap FG, Levels JH, Ottenhoff R, Looije N, Wesseling JG, Groen AK, Chamuleau RA. Biochem Biophys Res Commun.
- (47) Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. Weinberg RB, Cook VR, Beckstead JA, Martin DD, Gallagher JW, Shelness GS, Ryan RO.2002 Aug 2;295(5):1156-9. J Biol Chem. 2003 Sep 5;278(36):34438-44.
- (48) ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrins C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW. J Biol Chem. 2004 Jul 2;279(27):27941-7.
- (49) Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J. J Biol Chem. 2005 Jun 3;280(22):21553-60.
- (50) Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicrone mia due to lipoprotein lipase impairment.

- Marçais C, Verges B, Charrière S, Pruneta V, Merlin M, Billon S, Perrot L, Drai J, Sassolas A, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC, Durlach V, Moulin P. J Clin Invest. 2005 Oct;115(10):2862-9.
- (51) Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. Fruchart-Najib J, Baugé E, Niculescu LS, Pham T, Thomas B, Rommens C, Majd Z, Brewer B, Pennacchio LA, Fruchart JC. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 25;319(2):397-404.
- (52) Analysis of apolipoprotein A5, c3, and plasma triglyceride concentrations in genetically engineered mice. Baroukh N, Bauge E, Akiyama J, Chang J, Afzal V, Fruchart JC, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Pennacchio LA. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Jul;24(7):1297-302.
- (53) Normal binding of lipoprotein lipase, chylomicrons, and apo-AV to GPIHBP1 containing a G56R amino acid substitution. Gin P, Beigneux AP, Davies B, Young MF, Ryan RO, Bensadoun A, Fong LG, Young SG. Biochim Biophys Acta. 2007 Dec;1771(12):1464-8.
- (54) Effects of insulin, glucocorticoids and adrenaline on the activity of rat adipose-tissue lipoprotein lipids. Ashby P, Robinson DS. Biochem J. 1980 Apr 15;188(1):185-92.
- (55) Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor. Nowak M, Helleboid-Chapman A, Jakel H, Martin G, Du ran-Sandoval D, Staels B, Rubin EM, Pennacchio LA, Taskinen MR, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. Mol Cell Biol. 2005 Feb;25(4):1537-48.
- (56) Decreased apolipoprotein A5 is implicated in insulin resistance-related hypertriglyceridemia in obesity. Huang XS, Zhao SP, Hu M, Bai L, Zhang Q, Zhao W. Atherosclerosis. 2010 Jun;210(2):563-8. doi: 10.1016/j.athero sclerosis.2009.12.004.
- (57) Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction. Do R, Stitziel NO, Won HH, Jørgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, Kiezun A, Farrall M, Goel A, Zuk O, Guella I, Asselta R, Lange LA, Peloso GM, Auer PL; NHLBI Exome Sequencing Pro ject, Girelli D, Martinelli N, Farlow DN, DePristo MA, Roberts R, Stewart AF, Saleheen D, Danesh J, Epstein SE, Sivapalaratnam S, Hovingh GK, Kaste lein JJ, Samani NJ, Schunkert H, Erdmann J, Shah SH, Kraus WE, Davies R, Nikpay M, Johansen CT,

- Wang J, Hegele RA, Hechter E, Marz W, Kleber ME, Huang J, Johnson AD, Li M, Burke GL, Gross M, Liu Y, Assimes TL, Heiss G, Lange EM, Folsom AR, Taylor HA, Olivieri O, Hamsten A, Clarke R, Reilly DF, Yin W, Rivas MA, Donnelly P, Rossouw JE, Psaty BM, Herrington DM, Wilson JG, Rich SS, Bamshad MJ, Tracy RP, Cupples LA, Rader DJ, Reilly MP, Spertus JA, Cresci S, Hartiala J, Tang WH, Hazen SL, Allayee H, Reiner AP, Carlson CS, Kooperberg C, Jackson RD, Boerwinkle E, Lander ES, Schwartz SM, Siscovick DS, McPherson R, Tybjaerg-Hansen A, Abecasis GR, Watkins H, Nickerson DA, Ardissino D, Sunyaev SR, O'Donnell CJ, Altshuler D, Gabriel S, Kathiresan S. Nature. 2015 Feb 5;518(7537):102-6. doi: 10.1038/nature13917.
- (58) The role of apolipoprotein A5 in obesity and the metabolic syndrome. Zheng XY, Zhao SP, Yan H. Biol Rev Camb Philos Soc. 2013 May;88(2):490-8. doi: 10.1111/brv.12005.
- (59) The signal peptide. von Heijne G. J Membr Biol. 1990 May;115(3):195-201.
- (60)chylomicronaemia Childhood-onset with reduced plasma lipoprotein lipase activity and mass: identification of a novel **GPIHBP1 mutation**. Coca-Prieto I, Kroupa O, Gonzalez-Santos P, Ρ. Magne J, Olivecrona G, Ehrenborg Ε, Valdivielso J Intern Med. 2011 Sep;270(3):224-8. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02361.x. Epub 2011 Mar 9.
- (61) Internet: http://www.1000genomes.org/
- (62) Internet: http://evs.gs.washington.edu/EVS/
- (63) http://www.lipid-liga.de/pdf/lldiagn.pdf zuletzt abgerufen 22.02.2015
- (64) Rare APOA5 mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. Talmud PJ. Atherosclerosis. 2007 Oct;194(2):287-92.
- (65) Genetic association and interaction analysis of USF1 and APOA5 on lipid levels and atherosclerosis. Laurila PP, Naukkarinen J, Kristiansson K, Ripatti S, Kauttu T, Silander K, Salomaa V, Perola M, Karhunen PJ, Barter PJ, Ehnholm C, Peltonen L. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Feb;30(2):346-52. doi: 10.1161/AT VBAHA.109.188912.
- (66) Genetic variations of apolipoprotein A5 gene is associated with the risk of coronary artery disease among Chinese in Taiwan. Hsu LA,

- Ko YL, Chang CJ, Hu CF, Wu S, Teng MS, Wang CL, Ho WJ, Ko YS, Hsu TS, Lee YS. Atherosclerosis. 2006 Mar;185(1):143-9.
- (67) APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progresssion of coronary heart disease: results from the LOCAT study. Talmud PJ, Martin S, Taskinen MR, Frick MH, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Pasternack A, Humphries SE, Syvänne M. J Lipid Res. 2004 Apr;45(4):750-6
- (68) Genetic analysis of a polymorphism in the human apoA-V gene: effect on plasma lipids. Aouizerat BE, Kulkarni M, Heilbron D, Drown D, Raskin S, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP. J Lipid Res. 2003 Jun;44(6):1167-73
- (69) APOA5-1131T>C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men. Baum L, Tomlinson B, Thomas GN. Clin Genet. 2003 May;63(5):377-9.
- (70)Linkage and association between distinct variants of the **APOA1/C3/A4/A5** gene cluster and familial combined hyperlipidemia. Eichenbaum-Voline S, Olivier M, EL, Jones Naoumova RP, Jones B, Gau B. Patel HN, Seed M, Betteridge DJ, Galton DJ, Rubin EM, Scott J, Shoulders CC, Pennacchio LA. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Jan;24(1):167-74.
- (71) Demystifying the management of hypertriglyceridaemia. Watts GF, Ooi EM, Chan DC. Nat Rev Cardiol. 2013 Nov;10(11):648-61. doi: 10.1038/nrcardio.2013.140.
- (72) Hypertriglyceridemia and risk of coronary heart disease.

  Hokanson JE. Curr Cardiol Rep. 2002 Nov;4(6):488-93.
- (73) 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. Hokanson JE, Austin MA. J Cardiovasc Risk. 1996 Apr;3(2):213-9
- (74) A risk factor for atherosclerosis: triglyceride-rich lipoproteins.

  Malloy MJ, Kane JP. Adv Intern Med. 2001;47:111-36
- (75) Triglyceride-mediated pathways and coronary disease: collaborative analysis of 101 studies. Triglyceride Coronary Disease Genetics Con sortium and Emerging Risk Factors Collaboration1, Sarwar N, Sandhu MS, Ricketts SL, Butterworth AS, Di Angelantonio E, Boekholdt SM, Ouwehand W, Watkins H, Samani NJ, Saleheen D,

- Lawlor D, Reilly MP, Hingorani AD, Talmud PJ, Danesh J. Lancet. 2010 May 8;375(9726):1634-9. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60545-4.
- (76) Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. Endo K, Yanagi H, Araki J, Hirano C, Yamakawa-Kobayashi K, Tomura S. Hum Genet. 2002 Dec;111(6):570-2.
- polymorphism, **(77) Apolipoprotein** A5-1131T>C but not **APOE** increases susceptibility for dyslipidemia in children genotypes, and adolescents. Brito DD, Fernandes AP, Gomes KB, Coelho FF, Cruz NG, Sabino AP, Cardoso JE, Figueiredo-Filho PP, Diamante R, Norton CR, Sousa MO. Mol Biol Rep. 2011 Oct;38(7):4381-8. doi: 10.1007/s11033-010-0565-5.
- (78) Apolipoprotein AV gene polymorphisms (T-1131/C and Ser19/Trp) influence plasma triglyceride levels and risk of myocardial infarction. Hubacek JA, Skodova Z, Adamkova V, Vrablik M, Horinek A, Lanska V, Ceska R, Poledne R. Exp Clin Cardiol. 2003 Fall;8(3):151-4.
- (79) T-1131-->C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals. Horínek A, Vráblík M, Ceska R, Adám ková V, Poledne R, Hubacek JA. Atherosclerosis. 2003 Apr;167(2):369-70.
- (80) Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. Ribalta J, Figuera L, Fernández-Ballart J, Vilella E, Castro Cabezas M, Masana L, Joven J. Clin Chem. 2002 Sep;48(9):1597-600.
- (81) APOA5 gene variation modulates the effects of dietary fat intake on body mass index and obesity risk in the Framingham Heart Study. Corella D, Lai CQ, Demissie S, Cupples LA, Manning AK, Tucker KL, Ordo vas JM. J Mol Med (Berl). 2007 Feb;85(2):119-28.
- (82) A polymorphism in the apolipoprotein A5 gene is associated with weight loss after short-term diet. Aberle J, Evans D, Beil FU, Seedorf U. Clin Genet.2005 Aug;68(2):152-4.
- (83) The -1131T>C SNP of the APOA5 gene modulates response to feno fibrate treatment in patients with the metabolic syndrome: a postprandial study. Cardona F, Guardiola M, Queipo-Ortuño MI, Murri M, Ribalta J, Tinahones FJ. Atherosclerosis.2009 Sep;206(1):148-52.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.024.

- (84) Fenofibrate effect on triglyceride and postprandial response of apolipoprotein A5 variants: the GOLDN study. Lai CQ, Arnett DK, Corella D, Straka RJ, Tsai MY, Peacock JM, Adiconis X, Parnell LD, Hixson JE, Province MA, Ordovas JM. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Jun;27(6):1417-25.
- (85) Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. Gaudet D, Méthot J, Kastelein J. Curr Opin Lipidol. 2012 Aug;23(4):310-20. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283555a7e.

# 8 Danksagung

Für die großartige Unterstützung bei der Betreuung meiner Arbeit und darüber hinaus möchte ich mich bei Jörg Heeren, Alexander Bartelt und allen Mitgliedern des IBMZ bedanken. Insbesondere ist diese Arbeit durch die Unterstützung von Eva-Marie Azizi, Sandra Ehret, Birgit Henkel und Walter Tauscher möglich geworden. Ebenfalls sei noch Christine Runge gedankt, die oft denkbar Unmögliches eben doch möglich machen kann. Nicht weniger sei ebenso allen nicht-namentlich erwähnten zahlreichen Mitgliedern, Praktikanten, Studenten, Doktoranden, Post-Docs und Alumni des IBMZ während dieser Zeit gedankt, da die Arbeit durch die besondere Atmosphäre des Instituts wesentlich aufgewertet und erleichtert wird und man sich glücklich schätzen kann, Teil dieses Instituts sein zu dürfen.

An dieser Stelle bedanke ich mich ebenfalls bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 1459, sowie der Gertraud und Heinz-Rose Stiftung für die Teilfinanzierung der Arbeit, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Braulke, Herrn Prof. Dr. Greten, und Herrn Prof. Dr. Rinninger. Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Merke und Prof. Dr. René Santer für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin für die große Unterstützung und den Freiheiten, die ich während der Erstellung der Arbeit und der vielen Prüfungsphasen erfahren durfte.

# 9 Curriculum vitae

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

# 10 Summary

APOA5 is a key player in murine and human metabolism as it mediates – at least in part – disposal and retention of lipoproteins. APOA5-deficient mice display a tremendous increase in plasma lipids, with increased amounts of triglycerides of more than 10-50 fold of healthy wild-type reference cohorts. It is also known, that under certain conditions, VLDL particle synthesis is influenced by murine *Apoa5* as well, leading to high plasma triglycerides in deficient mice. For humans, no clear VLDL synthesis effect could be shown, but the VLDL catabolism was markedly decreased, which is likely to indicate the blood phenotype. APOA5 is able to increase the activity of the lipoprotein lipase, which represents the gatekeeper of triglyceride-rich lipoprotein metabolism.

This dissertation describes a novel *APOA5* mutation found in an 11-month old infant. The mutation led to an eight amino acid deletion within the coding region of the signal peptide. The loss of the eight amino acids resulted in dysfunction of the signal peptide, mainly because of the interrupted row of hydrophobic amino acids, which are usually building its hydrophobic core. The hydrophobic core of a signal peptide maintains the function to gate the nascent protein to the endoplasmatic reticulum to undergo the canonical secretory pathway. To analyse the biochemical impairment of the mutation, we cloned a wild-type APOA5 construct into an expression vector, as well as rebuilt the mutation of the infant. The mutation was leading to an accumulation of APOA5 at the lipid droplets of hepatocytes, whereas the wild-type protein could be found at the plasma membrane of transfected primary hepatocytes. Subsequently, no secreted APOA5 could be detected within the supernatant of primary hepatocytes after transfection of the APOA5 construct coding the mutant gene.

The deletion resulted in Hypertriglyceridemia, which was associated with acute abdominal pain. For the purpose of Hypertriglyceridemia, a homozygote mutation was needed, as the father and mother, both first degree cousins and heterozygote for the mutation, did not present severe Hypertriglyceridemia. The father had mildly increased triglyceride levels whereas the levels of the mother were within the reference range. Interestingly, both grandfathers – which also displayed a milder Hypertriglyceridemia - suffered in early heart attacks at the age of 45 and 51, leading to the presumption of an atherogenic influence of the mutation.

The therapy options were at first to lower the amount of food intake derived lipids, which were taken up, so that the suggestion of weaning was enough to normalise the blood triglyceride level. The patient will have to fulfil a lifelong low-fat diet to decrease the risk of atherosclerosis and heart attack.

# 11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

I Intorcobrift:	
Unterschint.	