

Diplomarbeit

**Beeinflussung der Apolipoprotein(a) Expression
durch Liganden nukleärer Rezeptoren (CAR und
FXR)**

**Gallensäuren-Analoga als mögliche Senker eines Arterio-
sklerose-Risikofaktors**

eingereicht von

Gerald Markus Eibinger

Mat.Nr.:0211178

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für med. Biochemie und med. Molekularbiologie

unter der Anleitung von

Prof. Dr. Gerhard Kostner

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe, mit Ausnahme von Routineanalysen, verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwende habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Kurzfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die intrazellulären Regulationsmechanismen der Apo(a) Transkription mit besonderem Augenmerk auf die intrazellulären Rezeptoren FXR und CAR ein wenig besser zu verstehen. *In vitro* wurden der Einfluss von 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzen (TCPOBOP), ein Agonist für den CAR-Rezeptor, und Stanozolol, ein AR Agonist, an primären Hepatozyten von YAC-Apo(a)-transgenen Mäusen untersucht. Stanozolol konnte die Apo(a) Expression verringern, während TCPOBOP *in vitro* keine Wirkung zeigte. *In vivo* erhöhte jedoch TCPOBOP die Apo(a) Plasmaspiegel von transgenen Mäusen signifikant.

In weiteren Experimenten wurde die Rolle des FX-Rezeptors in der Regulation des Apo(a) *in vivo* untersucht, indem ein transgener Apo(a) Mausstamm mit einem FXR k.o. Mausstamm gekreuzt und einem Fütterungsexperiment mit dem FXR-Agonisten, Cholsäure unterzogen wurde. Dabei zeigte sich, dass Mäuse, die sowohl Apo(a) transgen, als auch FXR k.o. sind, deutlich höhere Apo(a) Plasmaspiegel aufweisen als normale Apo(a) transgene Mäuse, wobei dieser Effekt bei den Männchen besonders deutlich erkennbar ist. Die Fütterung mit Gallensäuren senkte bei jenen Mäusen, die sowohl Apo(a) transgen, als auch FXR k.o. sind, die Apo(a) Plasmaspiegel nur auf 50 % des Ausgangswertes, während bei normalen Apo(a) transgenen Mäusen eine Senkung auf ca. 10 % des Ausgangswertes erreicht werden konnten.

Abstract

The aim of this thesis was to elucidate the mechanisms of apo(a) regulation with special attention to the intracellular receptors FXR and CAR. *In vitro* the effects of TCPOBOP, a CAR agonist and stanozolol, an AR agonist on cultures of primary YAC-apo(a)-transgenic mouse hepatocytes have been examined. Stanozolol was able to reduce the apo(a) expression, whereas 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) did not show any effects *in vitro*. *In vivo* however, TCPOBOP led to an increase of apo(a) plasma levels in transgenic mice. Moreover, to investigate the role of FXR in the regulation of apo(a), YAC-apo(a)-transgenic mice were crossed with FXR-knockout mice. The resulting mice, which were transgenic for apo(a) in addition to FXR knock out, had distinctively higher apo(a) plasma levels than normal apo(a) transgenic mice, especially the male ones. These apo(a) transgenic FXR k.o. mice were used in a feeding experiment with cholic acid, a FXR agonist. Cholic acid was able to reduce apo(a) plasma levels in normal apo(a) transgenic mice to 10 % and in apo(a) double transgenic FXR k.o. mice only to 50 % of the starting value.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Entdeckung und Struktur des Lipoprotein(a) [Lp(a)].....	7
1.2	Physiologisches zum Lipoprotein(a).....	9
1.2.1	Lp(a) und Arteriosklerose	9
1.2.2	Lp(a) und Tumorerkrankungen	9
1.2.3	Lp(a) und Thrombose	10
1.3	Einflüsse auf den Lp(a)-Plasmaspiegel	11
1.4	Regulation der Apo(a) Transkription.....	12
1.5	CAR (constitutive androgen receptor)	12
1.6	FXR (farnesoid x receptor)	13
1.7	Ziel der Arbeit	14
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	16
2.1	Rationale der Versuchsansätze.....	16
2.2	Mäusestämme	17
2.2.1	Transgene YAC-Apo(a) Maus	17
2.2.2	FXR knock out Maus	18
2.3	Genotypisierung der FXR k.o. Mäuse: PCR	18
2.3.1	Allgemeines zur Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
2.3.2	Genotypisierung der FXR knock out Mäuse	19
2.4	Bestimmung der Apo(a) Plasmakonzentration: Delfia	20
2.5	Primärzellkulturen von Maus-Hepatozyten	21
2.5.1	Gewinnung der Zellen	21
2.5.2	Behandlung der Zellkultur.....	21
2.5.3	Isolierung der RNA	22
2.6	Isolierung von RNA aus Gewebe.....	22
2.7	RNA Quantitierung	22
2.7.1	Reverse Transkription	22
2.7.2	Real time RT-PCR.....	22
2.7.3	Mathematische Auswertung	23
2.8	Spezielle Versuchsanordnungen.....	24

Inhaltsverzeichnis

2.8.1	Einfluss von Stanozolol auf die Expression von Apo(a) in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten	24
2.8.2	Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten	24
2.8.3	Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in Apo(a) transgenen Mäusen.....	25
2.8.4	Kreuzung FXR negativer Mäuse mit Apo(a) transgenen Mäusen	25
2.8.5	Gallensäurefütterung Apo(a) transgener FXR negativer Mäuse.....	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	Einfluss von Stanozolol auf die Expression von Apo(a) in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten	27
3.2	Ergebnisse bezüglich CAR.....	28
3.2.1	Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten	28
3.2.2	Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in Apo(a) transgenen Mäusen.....	28
3.3	Ergebnisse bezüglich FXR	30
3.3.1	Kreuzung FXR negativer Mäuse mit Apo(a) transgenen Mäusen	30
3.3.2	Fütterung von Gallensäuren an Apo(a) transgene FXR negative Mäuse .	32
4	DISKUSSION	34
4.1	Behandlung von primären Hepatozyten mit Stanozolol	34
4.2	CAR.....	35
4.3	FXR	36
5	LITERATURVERZEICHNIS	40
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	45

1 Einleitung

1.1 Entdeckung und Struktur des Lipoprotein(a) [Lp(a)]

Lp(a) wurde zum ersten Mal von Berg (1963) beschrieben. Es kommt nur im Blutplasma von Menschen, einigen Primaten (Makino et al. 1991) und im Igel (Laplaud et al. 1988) vor.

Lipoprotein(a) gehört zur Gruppe der „Low-density lipoproteins“ (LDL), den Lipoproteinen mit geringer Dichte, die reich an Cholesterin und Cholesterinestern sind. Das wichtigste und charakteristische Apolipoprotein des LDL ist das Apolipoprotein B-100 [ApoB-100]. (Nelson und Cox 2001)

Lp(a) ist ein modifiziertes LDL-Partikel, bei dem das ApoB-100 durch eine einzige Disulfidbrücke mit einem weiteren Apolipoprotein, dem Apolipoprotein(a) [Apo(a)] verbunden ist. Die Disulfidbrücke besteht zwischen dem einzigen freien Cystin des Apo(a), Cys-4057 und dem Cys-4326 des ApoB-100 des LDL.

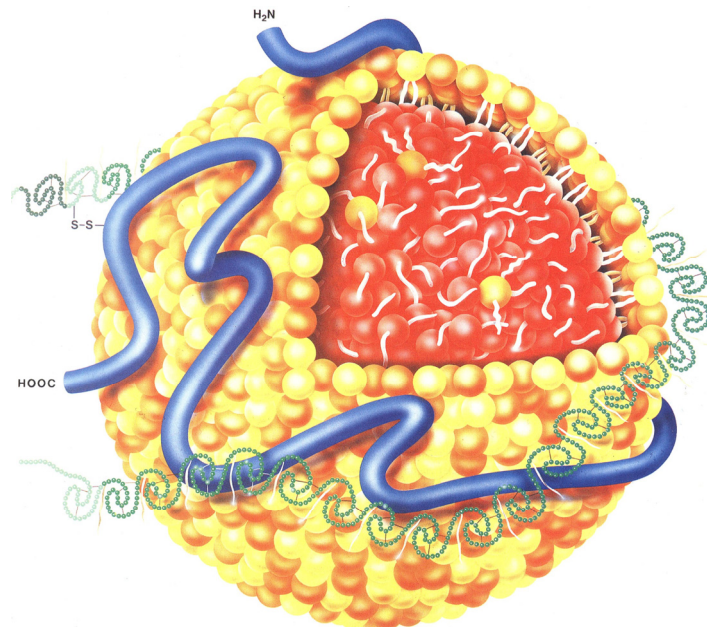


Abbildung 1: Diese Abbildung zeigt ein LDL Partikel mit dem Apolipoprotein(a), das sich wie eine Kette um das LDL legt. Man erkennt auch die Wiederholungssequenzen des Kringel-4 Motivs.

Die Bildung dieser Disulfidbrücke findet nicht intrazellulär statt, sondern erst in der Blutbahn (Dieplinger und Utermann 1999 und Koschinsky und Marcovina 2004). Chemisch gesehen besteht Lp(a) aus 30 % Protein, 10 % Kohlenhydraten, 37 % Cholesterin und Cholesterinester, 18 % Phospholipiden und 5 % Triglyceriden. Apo(a) besitzt eine relativ große Ähnlichkeit zu Plasminogen durch seine repetitiven Sequenzen, die sogenannten Kringel (engl. „kringles“) (McLean et al. 1987), aber auch durch seine endständige Proteasedomäne. Alleine im Menschen gibt es über 30 verschiedene Isoformen, die sich durch die unterschiedliche Anzahl an repetierenden Kringel-4 Domänen unterscheiden, was zu einem extremen Größenpolymorphismus des Lipoproteins führt. (Lackner et al. 1993)

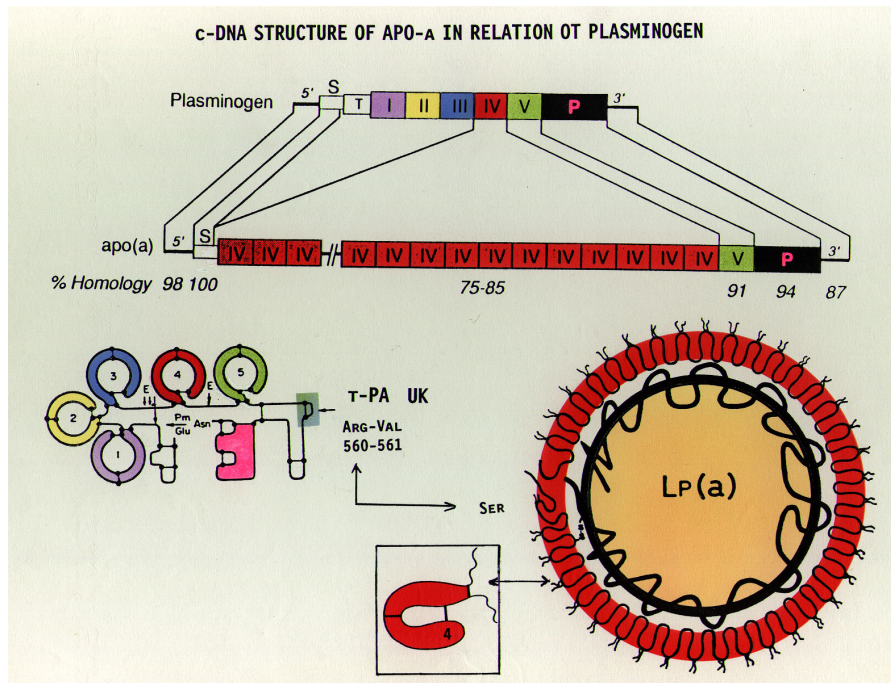


Abbildung 2: Apolipoprotein(a) und die Homologie zu Plasminogen. Die Abbildung zeigt oben einen Vergleich der cDNA (revers transkribierte mRNA als Abbild der Proteinaufbaus) von Plasminogen und Apo(a) mit den Wiederholungssequenzen der Kringel-4 Domänen. Unten zeigt die Abbildung einen Vergleich der fertigen Proteinstruktur von Plasminogen und Apo(a). Man beachte die Schnittstelle (nur Plasminogen weist eine auf) des Plasminogenaktivators (t-PA), der Plasminogen in das fibrinolytische Plasmin umwandelt.

1.2 Physiologisches zum Lipoprotein(a)

Trotz vieler, teilweise kontroversieller Vermutungen bleibt die physiologische Funktion des Lp(a) weiterhin unklar. Es ist jedoch auffallend, dass der Lp(a) Plasmaspiegel im Laufe des Lebens zunimmt und dass Personen mit hohen Lp(a) Spiegeln weniger häufig an Krebs erkranken. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieses Lipoprotein möglicherweise einen protektiven Effekt vor Krebserkrankungen besitzt.

Außerdem besitzt Lp(a) Eigenschaften, die die Entstehung von Thromben fördern. (Caplice et al. 2001).

Einen Hinweis auf entzündungsfördernde Wirkungen von Apolipoprotein(a) gibt es bei Busso et al. (2001), die Apo(a) in der Synovialflüssigkeit von entzündeten Gelenken finden, wobei das Apo(a) aus dem Blut stammen muss, da keine Expression von Apo(a) in den das Gelenk umgebenden Geweben gefunden werden konnte.

1.2.1 Lp(a) und Arteriosklerose

Erste Vermutungen, dass Lp(a) starke atherogene Wirkungen haben könnte, gab es bereits in den 70er Jahren. Bestätigt wurden diese Vermutungen durch umfangreiche Studien.

So zeigten Kostner et al. (1981), dass Patienten mit Lp(a) Werten über 50 mg/dl ein 2,3 faches relatives Risiko besitzen einen Myocardinfarkt zu erleiden. Marcovina et al. (2003) zeigten schließlich, dass das KHK Risiko bei Personen mit erhöhten Lp(a)-Plasmaspiegeln (> 30 mg/dl) mehr als verdoppelt ist.

Die Lp(a) Plasmaspiegel schwanken in der Bevölkerung zwischen <1 und 1000 mg/l, der Durchschnittswert liegt bei ca. 5-20 mg/dl. Der Lp(a) Spiegel einzelner Personen erscheint gut reguliert und im Laufe des Lebens relativ konstant gehalten, wobei er im Alter allerdings zunimmt.

1.2.2 Lp(a) und Tumorerkrankungen

Die Wirkung des Lp(a) gegen Tumorerkrankungen wird bereits lange vermutet. Einerseits gibt es Hinweise, dass Personen, die an Tumorerkrankungen leiden, höhere Lp(a) Plasmaspiegel besitzen. In Studien von Wright et al. (1989) zeigte sich, dass der Lp(a) Plasmaspiegel von Krebspatienten verglichen mit denen von Kontrollpati-

enten eine Ungleichverteilung aufweist. Ebenso stellten Kim et al. (2003) bei Nacktmäusen fest, dass Apo(a) das Wachstum von Colonicarcinomen hemmt. Der Anstieg von Lp(a) im Alter könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass Personen entweder im Alter einen höheren Schutz benötigen oder dass Personen mit höheren Lp(a) Plasmaspiegeln älter werden, weil sie ein geringeres Risiko besitzen an Krebs zu erkranken. Andererseits zeigten Trieu et al. (1999) neben diesen statistischen Beobachtungen, dass besonders jene Isoformen mit höherem Molekulargewicht und vielen Kringle-4 Wiederholungssequenzen in der Lage sind, das Zellwachstum von LL/2 Lungenkrebszellen in Mäusen zu verringern. Seine Studie mit je 6 Mäusen dauerte 15 Tage. In jenen Mäusen, die Apo(a) exprimierten wuchs der Tumor nur zur halben Größe (600 statt 1200 mm³). Trieu fand außerdem eine verminderte Angiogenese und führte das geringere Tumorwachstum auf diese zurück.

Die Hemmung der Angiogenese ist allerdings ein umstrittener Punkt, da in anderen Studien gerade diese widerlegt wird. So findet z.B. Lou et al. (1998) keinen Einfluss von Apo(a) auf das Gefäßwachstum.

1.2.3 Lp(a) und Thrombose

Kann erhöhtes Lipoprotein(a) die Entstehung von Thrombose fördern? Die Auseinandersetzung mit dieser Frage ist nicht nur in bezug auf die tiefe Beinvenenthrombose und ihrer Komplikation, der Lungenembolie interessant, sondern auch deshalb, weil der Verschluss arterieller Gefäße oft auf dem Boden einer bereits bestehenden Arteriosklerose stattfindet. Falls Lipoprotein(a) die Bildung von Blutgerinnseln also fördert, könnte dies die Bedeutung von Lipoprotein(a) als zusätzlichen Risikofaktor bei der Arteriosklerose besser verständlich machen.

Tatsächlich gibt es einige Studien, die diese Ansicht unterstützen. So konnten Caplice et al. (2001) zeigen, dass das Apoprotein(a) in der Lage ist an TFPI („tissue factor pathway inhibitor“, Hemmer des Faktors VII in der Blutgerinnung) zu binden und diesen dadurch zu hemmen.

So wirkt Apoprotein(a) sowohl prothrombotisch, indem es die Blutgerinnung durch Hemmung eines Inhibitors (TFPI) fördert, als auch antithrombolytisch durch die Hemmung der Wirkungen von Plasminogen.

Plasminogen ist die Vorstufe des Plasmin, einer gerinnselauflösenden Fibrinprotease. Plasminogen muss sich vor seiner Aktivierung an das Fibrin des Blutgerinnsels

binden und kann dann durch den ebenfalls dort gebundenen Gefäßwand Plasmin Aktivator (tPA) in Plasmin umgewandelt werden.

Außerdem aktiviert Apo(a) den Inhibitor des Plasminogenaktivators (PAI).

Die sowohl prothrombotischen als auch antithrombolytischen Eigenschaften könnten in der Tat die Entstehung von Komplikationen, die meist auf Verschlüssen bereits geschädigter Gefäße beruhen, bei der Arteriosklerose fördern.

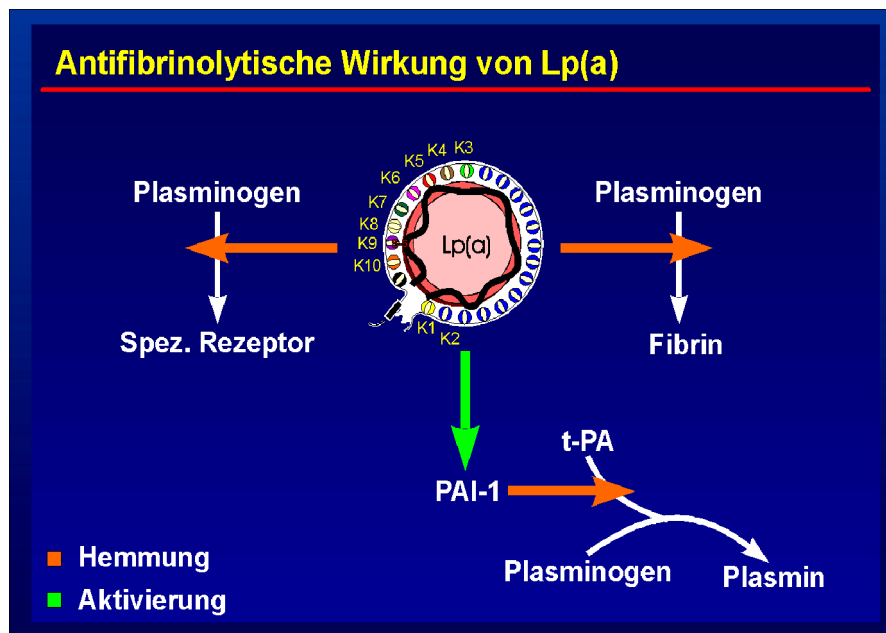


Abbildung 3: Lipoprotein(a) wirkt durch seine Ähnlichkeit zu Plasminogen über mehrere Wege prothrombotisch. Einerseits hemmt es die Bindung von Plasminogen an seinen spezifischen Rezeptor und auch an das Fibrin des Blutgerinnsels, andererseits aktiviert es den Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1), der durch Hemmung des Gefäßwand Plasminogenaktivators (t-PA) die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, der fibrinolytischen Protease, bremst.

1.3 Einflüsse auf den Lp(a)-Plasmaspiegel

Es wurde beobachtet, dass Menschen die an Gallenstau (Cholestase) leiden, durchwegs niedrige Lp(a) Werte besitzen. Nach Beseitigung der Ursache des Gallenstaus gehen die Werte wieder auf die ursprüngliche Höhe zurück. Dies ist ein möglicher Hinweis darauf, dass die Apo(a) Transkription durch Rezeptoren für Gallensäuren reguliert wird.

Ebenso wurde beobachtet, dass Personen, die sich unter einer antiepileptischen Therapie mit Valproinsäure befinden, höhere Lp(a) Werte besitzen als vor Therapiebeginn.

Es wurden bereits viele Behandlungsversuche unternommen, die meisten davon durch Diäten oder Lipidsenker, wie zum Beispiel Statine. Gerade die Statine jedoch besitzen unvorhersehbare Wirkung auf den Lp(a) Spiegel. Zum Teil wird er von ihnen sogar erhöht (Kostner et al. 1989).

Nicotinsäure und deren Derivate erniedrigen den Lp(a) Plasmaspiegel bis zu 30%, werden jedoch wegen ihrer Nebenwirkungen wenig eingesetzt. Auch durch anabole Steroide kann der Lp(a) Spiegel gesenkt werden, was jedoch auf Grund der Nebenwirkungen gerade im Herzkreislaufsystem keine verwendbare Behandlungsmöglichkeit erhöhter Lp(a) Werte darstellt (Kostner 2005).

1.4 Regulation der Apo(a) Transkription

Promotorstudien zeigen, dass der Apo(a) Promotor unter vielen anderen 4 Bindungsstellen für HNF1a, 2 Bindungsstellen für CAR und eine Bindungsstelle für FXR aufweist. Die Regulation von Apo(a) durch HNF1a ist schon lange bekannt (Wade et al. 1994).

1.5 CAR (constitutive androgen receptor)

Der erste Rezeptor dieser Gruppe wurde im Menschen gefunden und CAR α oder hCAR genannt. Erst später wurde CAR β der Maus entdeckt. (mCAR). Das Verhältnis dieser beiden Rezeptoren zueinander ist allerdings unklar.

Die Homologie zwischen CAR α (hCAR) und CAR β (mCAR) beträgt nämlich nur 88%. Dies ist im Vergleich zu den meisten anderen Rezeptoren relativ niedrig.

Normalerweise werden in Versuchen zwei verschiedene Aktivatoren, nämlich Phenobarbital für hCAR und 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP) für mCAR, eingesetzt.

Der Name CAR stammt von der Hypothese ab, dass dieser Rezeptor konstitutive Aktivität (d.h. Aktivität im nicht ligandengebundenen Zustand) besitzt. Man fand näm-

lich überraschenderweise, dass CAR durch die Androgene Androstenol und Androstanol gehemmt wird. Dasselbe gilt auch für alle anderen Androgene, wie zum Beispiel Testosteron. Die in Laborversuchen eingesetzten Substanzen Phenobarbital (für hCAR) und TCPOBOP (für mCAR) sind jedoch Aktivatoren von CAR. (Laudet und Gronemeyer 2002)

TCPOBOP erwies sich in Versuchen als der beste Aktivator von mCAR (Tzamelli et al. 2000)

1.6 FXR (farnesoid x receptor)

Dieser Rezeptor, der sich schließlich als der nukleäre Rezeptor für Gallensäuren herausstellte, wurde ursprünglich nach seiner Eigenschaft benannt, dass Farnesoide an ihn binden und ihn aktivieren können. Farnesoide sind Vorstufen des Cholesterins und der Gallensäuren. (Nelson und Cox 2001)

Nach seiner Funktion ist FXR ein Rezeptor für Gallensäuren weil er die Expression des Cholesterin 7 α -Hydroxylase (Cyp7A) Gens hemmt. Cyp7A ist das Schlüsselenzym für die Gallensäurensynthese. Außerdem aktiviert FXR die Expression von IBABP (ileal bile acid binding protein), das für den Transport der Gallensäuren vom Magen-Darm-Trakt zur Leber verantwortlich ist.

Zunächst konnte keine direkte Bindung der Aktivatoren beschrieben werden, woraus der Schluss gezogen wurde, dass der physiologische Ligand von FXR möglicherweise eine Substanz aus dem Farnesoidmetabolismus sein könnte. Ein Zwischenprodukt aus diesem Stoffwechselweg ist tatsächlich in der Lage FXR zu aktivieren, woraus gefolgert wurde, dass FXR Teil des Signaltransduktionsweges für die Kontrolle der Cholesterinbiosynthese sein könnte.

Man fand heraus, dass alle Gallensäuren selektive Aktivatoren von FXR vermittelter Transkription sind und dass die Gallensäurekonzentrationen in Leber und Darm ausreichend sind, um FXR zu aktivieren. (Laudet und Gronemeyer 2002)

Außerdem besitzen Mäuse, deren FXR Gen ausgeschaltet wurde (FXR knock out, FXR k.o. Mäuse) keinen normalen Glucosetoffwechsel mehr. Dies konnten Ma et al. (2006) zeigen. Die Mäuse besitzen erhöhte Glucose Serumspiegel und eine abnorme Insulin- und Glucosetoleranz.

Li et al. (2006) fanden heraus, dass FXR auch im Gewebe der Gefäßwände exprimiert wird und dass Aktivierung von FXR entzündungshemmend auf die glatten Gefäßmuskelzellen wirkt und außerdem deren Wanderung hemmt.

Neuere Forschungsarbeiten zeigen, dass FXR die normale Leberregeneration reguliert und die Leber vor Krebsentstehung schützt. (Wang et al. 2008)

Gallensäuren sind in der Lage die FXR vermittelten Reaktionen in der Zelle hervorzurufen, allerdings scheint die Bindung der verschiedenen Gallensäuren (Chenodesoxycholsäure, Desoxycholsäure, Cholsäure, Ursodesoxycholsäure und Lithocholsäure) unterschiedliche Konformationen von FXR mit Aktivierung von unterschiedlichen Zielgenen hervorzurufen. (Lew et al. 2004)

In einer Studie unserer eigenen Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2002 wurde festgestellt, dass Menschen, die durch Gallenstau erhöhte Gallensäurekonzentrationen in Blut und Leber besitzen, viel niedrigere Apo(a) Plasmaspiegel haben. Nachdem die gleiche Beobachtung auch bei transgenen Mäusen, die mit Gallensäuren gefüttert wurden, gemacht werden konnte, liegt der Verdacht nahe, dass die Apo(a) Regulation FXR vermittelt ist.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die intrazellulären Regulationsmechanismen der Apo(a) Transkription besser zu verstehen, um daraus möglicherweise eine Therapie für Patienten mit erhöhtem Lp(a) Spiegel ableiten zu können. Besonderes Augenmerk soll in dieser Arbeit auf die intrazellulären Rezeptoren FXR und CAR gelegt werden.

Um die Wirkung von Androgenen zu untersuchen, wird zunächst *in vitro* ein Vorversuch mit Stanozolol gemacht, von dem eine Senkung der Apo(a) Transkription erwartet wird.

Um die Rolle von CAR als konstitutivem Androgenrezeptor besser zu verstehen, soll *in vitro* eine Zellkultur von Apo(a) transgenen Mäusehepatozyten mit dem mCAR-Agonisten TCPOBOP in verschiedenen Konzentrationen und für unterschiedlich lan-

ge Zeitdauer behandelt werden. Schließlich sollen *in vivo* Versuchen Apo(a) transgene Mäuse einem Fütterungsexperiment mit TCPOBOP unter ständiger Kontrolle der Apo(a) Spiegel im Blutplasma unterzogen werden.

Letztlich soll noch *in vivo* die Rolle des FX Rezeptors in der Regulation des Apo(a) untersucht werden, indem zunächst ein transgener Apo(a) Mausstamm mit einem FXR k.o. Mausstamm gekreuzt und anschließend einem Fütterungsexperiment mit FXR-Agonisten, nämlich Cholsäure unterzogen wird.

2 Materialien und Methoden

2.1 Rationale der Versuchsansätze

Da Apo(a), wie oben erwähnt, außer vom Menschen nur von einigen wenigen Tierarten gebildet wird, ist es schwierig, mögliche Modellorganismen zu finden, um Laboruntersuchungen durchführen zu können. Menschliche immortalisierte Zelllinien sind ebenfalls keine guten Studienobjekte, da sie kein Apo(a) mehr produzieren. Die Apo(a) Translation der Zellen hört nämlich nach ca. 2-3 Tagen in Kultur auf.

Das klassische Tiermodell, die Maus, besitzt kein Lp(a). Es gibt allerdings transgene Mäuse, die im Anschluss auch näher beschrieben werden sollen, die das Apolipoprotein(a) produzieren und ins Blut sezernieren, wo es frei, also an kein anderes Protein gebunden, vorkommt. Beim Menschen wird das Apo(a) translatiert und sezerniert und es verbindet sich erst in der Blutbahn mit dem LDL, um das Lp(a) zu bilden (Dieplinger und Utermann 1999). Ebenso wie beim Menschen findet auch bei der transgenen Maus die meiste Apo(a) Translation in der Leber, genauer gesagt in den Hepatozyten statt. Dies ist deshalb der Fall, weil für die Transkription eines bestimmten Gens die Sequenz des Promotorabschnittes entscheidend ist und die Proteine und intrazellulären Rezeptoren, die an diesen binden, teilweise sehr spezifisch für bestimmte Zellarten des Organismus sind. Diese Proteine sind innerhalb verschiedener Säugetierspezies doch so ähnlich, dass auch in der transgenen Maus in der selben Zellart wie beim Menschen die Translation des Apo(a) Gens stattfindet (Leber, Hoden). Übrigens gibt es auch transgene Hasen; auch diese besitzen die meiste Apo(a) Expression in Leber und Hoden (Rouy et al. 1997). Dass jene Proteine, die an die Promotorsequenz binden, bei der Maus doch etwas anders sind als die menschlichen, zeigt sich zum Beispiel in der Tatsache, dass die weiblichen Mäuse bis zu zehnmal höhere Apo(a)-Werte aufweisen können (bis zu 20 mg/dl) als ihre männlichen Artgenossen (meist < 2 mg/dl). Allerdings schwankt dieser Wert mit dem Zyklus, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass der hohe Wert der Mäuseweibchen mit den weiblichen Geschlechtshormonen zusammenhängt. Der Zyklus dauert bei der Maus drei Tage, außerdem sind die Apo(a)-Spiegel selbst bei Geschwistern oft sehr unterschiedlich, was randomisierte *in vivo* Experimente natürlich erschwert.

Um nun die Vergleichbarkeit bei der Behandlung mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen zu erhöhen, wäre es natürlich von Vorteil auch *in vitro* und somit in der Zellkultur einen passenden Modellorganismus zu besitzen. Leider produziert, wie oben erwähnt, keine der bekannten Zelllinien Apo(a).

Kürzlich wurde auch die Möglichkeit der Verwendung von menschlichen Leberscheiden aus Operationspräparaten publiziert. (Jung et al. 2006) Diese zeichnen sich durch den Erhalt der physiologischen Leberstruktur und große Stabilität in der Genexpression aus, sind allerdings sehr schwierig zu bekommen.

Darum wurde nun der Versuch unternommen, Hepatozyten von transgenen Mäusen als Primärzellkultur zu kultivieren und als Modellorganismus für verschiedene pharmakologische Substanzen zu verwenden.

2.2 Mäusestämme

Im folgenden Abschnitt sollen die verwendeten Mäusestämme näher charakterisiert und ihre ursprüngliche Entstehung beschrieben werden.

2.2.1 Transgene YAC-Apo(a) Maus

Dieser Mausstamm hat ein zusätzliches künstliches Hefechromosom (Yeast artificial chromosome) in seinem Genom, das sowohl das menschliche Apo(a) Gen als auch den menschlichen Promotor trägt. (Aquatì et al. 1999)

Die Methode des künstlichen Hefechromosomes gibt es bereits seit 1987. (Burke 1987). Das Prinzip besteht darin, ein bestimmtes Gen gemeinsam mit seinem Regulationsabschnitt, dem Promotor, in einem künstlichen Chromosom in Hefezellen einzubringen und dort zu vervielfältigen (Hefe teilt sich rasch).

Schedl (1992) erzeugte transgene Mäuse, indem er die in den Hefezellen vervielfältigte DNA in die Vorkerne von Maus-Eizellen durch Mikroinjektion einbrachte. Die so behandelten Eizellen wurden in den Uterus weiblicher Mäuse implantiert und die entstandenen Nachkommen auf die Aktivität des zusätzlichen Gens geprüft und danach weitergezüchtet. Entscheidend verbessert wurde dieses Verfahren durch eine neue Reinigungstechnik (Schedl 1993).

2.2.2 FXR knock out Maus

Dieser Mausstamm besitzt keinen Farnesoid X Rezeptor (FXR) mehr, da er künstlich ausgeschaltet wurde. Diese Maus wurde im Jahr 2000 von Sinal et al. erzeugt. Zur Ausschaltung bediente man sich eines Vektors mit einem Genkonstrukt, das in eine Mauseizelle eingebracht wurde. Anschließend wurden diese transgenen Mäuse mit anderen transgenen Mäusen gekreuzt, die ein spezielles virales Enzym exprimieren, die Cre Rekombinase. Dieses Enzym bewirkt den Ausschluss jenes bestimmten Genabschnittes, das durch den Vektor gekennzeichnet wurde. Dies führte in diesem Fall zum Ausschluss der Sequenz, die für FXR kodiert.

Die Mäuse ohne FX-Rezeptor, dessen Ligand Gallensäuren sind, zeichnen sich durch erhöhte Plasmaspiegel von Gallensäuren, Cholesterin und Triglyceriden aus. Äußerlich unterscheiden sie sich nicht von normalen Wildtyp-Mäusen und entwickeln sich auch völlig normal. Allerdings sind sie besonders empfindlich für gallensäurereiche Kost. Schon 1 % Cholsäuregehalt in der Nahrung bewirken bereits nach 5 Tagen 30 % Gewichtsverlust und schwere Leberschäden, da diese Mäuse immer gleich viel Gallensäuren über den Stuhl ausscheiden und nicht in der Lage sind, die Menge entsprechend anzupassen. Daher verbleiben diese viel länger im Körper und müssen auch vermehrt über die Nieren ausgeschieden werden. Ebenso bewirkt auch cholesterinreiche Nahrung bei den Mäusen Leberschäden durch Fettvakuolenbildung. Die Untersuchung der Leber zeigte stark verminderte Mengen an Transportproteinen, die die Gallensäuren aus den Leberzellen in die Gallenwege ausschleusen, zum Bsp. Bsep, I-BABP. (Sinal et al. 2000)

2.3 Genotypisierung der FXR k.o. Mäuse: PCR

2.3.1 Allgemeines zur Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde 1983 von Mullis entdeckt und stellte eine Revolution in der Biochemie und Genetik dar. Die Methode basiert darauf, spezifische DNA Sequenzen gezielt zu vervielfältigen. Dabei werden sogenannte Primer verwendet, die aus einer komplementären Sequenz zu den Beginn- und Endabschnitten bestehen und ein Enzym, das den dazwischenliegenden DNA Komplementärstrang aus freien Nuc-

leotridriphosphaten (ATP, GTP, CTP, TTP) synthetisiert. Dieses Enzym, die sogenannte taq-Polymerase ist in der Lage diese Reaktion bei 72°C durchzuführen und stammt ursprünglich aus einem Bakterium, das in heißen Schwefelquellen lebt, dem *thermophilus aquaticus*. Ein PCR-Reaktionszyklus besteht daher aus drei Teilvorgängen, die bei unterschiedlichen Temperaturen stattfinden:

1. Schmelzen: Das ist das Lösen der beiden DNA Komplementärstränge voneinander bei 95°C
2. Der Anlagerung der Primer meist zwischen 55°C und 65°C
3. Der Synthese eines neuen Komplementärstranges auf dem durch die Primer definierten Abschnitt durch die taq-Polymerase bei 72°C

Diese drei Schritte werden nun 30-40 Mal durchlaufen, wobei sich die DNA bei jedem Zyklus theoretisch verdoppelt.

Diese drei Temperaturen sowie die Zyklenanzahl lassen sich in einer speziellen Maschine genau einstellen, wobei besonders der zweite Schritt optimiert werden muss, da die Anlagerungstemperaturen von Primer zu Primer unterschiedlich sind.

2.3.2 Genotypisierung der FXR knock out Mäuse

Zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse wird von der Schwanzspitze mittels Skalpell eine kleine Probe genommen („Tailtip“). Diese wird in 95 µl Puffer (Quiagen) mit 5 µl Proteinase K (Quiagen) bei 56°C im Thermomixer gelöst (ca. 3 h). Die Proteinase K ist ein spezielles Enzym, das die DNA, die in der Gewebeprobe vorkommt, von den Proteinen trennt, indem es diese zersetzt. Anschließend wird für 30 min zur Inaktivierung der Proteinase auf 85°C erhitzt. Die Proteinase verliert bei dieser Temperatur ihre Aktivität. Dank der Entwicklung dieser speziellen Methode (Proteinase K) ist es nicht mehr notwendig, die DNA zu fällen und zu reinigen.

1,6 µl der so entstandenen Lösung wird mit je 1 µl Primer mit den folgenden Sequenzen: F1 (forward 1): 5'-tctctttaagtgatgacgggaatct-3', F2 (forward 2): 5'-gctctaaggagagtcaactgtca-3', R (reversed): 5'-gcatgctctgttcataaacgccat-3', 3,4 µl Wasser und 8 µl GoTaq Green Mastermix (Promega) versetzt und im Thermocycler mit folgendem Temperaturverlauf behandelt:

1 Zyklus mit 5 min bei 95°C, 35 Zyklen mit 45 s bei 95°C, 45 s bei 60°C und 45 s bei 72°C und 1 Zyklus mit 6 min bei 72°C.

Das PCR-Produkt wird auf ein 2,5 % Agarosegel mit Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNA-Banden aufgetragen und 40 min bei 70 Volt in 0,5 x TAE-Puffer laufen gelassen.

Die Detektion der Banden erfolgt unter UV-Licht.

2.4 Bestimmung der Apo(a) Plasmakonzentration: Delfia

Diese Methode dient der Bestimmung des Plasma Apo(a)-Spiegels der untersuchten Maus. Es wird eine kleine Blutprobe benötigt, die zumeist retrobulbär genommen und mittels 1-2 µl EDTA ungerinnbar gemacht wird. Die Probe wird zentrifugiert und das Plasma abgehoben. 1 µl Plasma wird 1:5000 verdünnt und auf eine Delfia Platte, die zuvor mit einem primären Antikörper beschichtet wurde, aufgetragen.

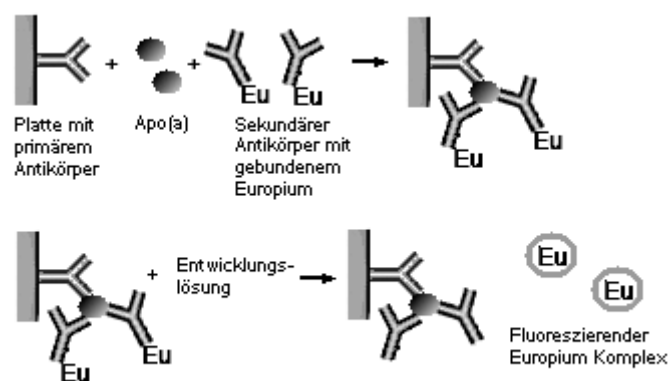


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Apo(a) Delfia-Assays.

Nach Inkubation wird die Platte gewaschen und ein sekundärer Antikörper gegen Apo(a) aufgetragen, der kovalent mit dem Lanthanoid Europium gebunden ist. Nach Zugabe einer Entwicklerlösung bildet sich ein fluoreszierender Europiumkomplex, der photometrisch vermessen werden kann. Es ist unbedingt notwendig mit einem Apo(a) Standard eine Eichreihe zu erstellen, um die Apo(a) Werte der Proben genau bestimmen zu können.

2.5 Primärzellkulturen von Maus-Hepatozyten

2.5.1 Gewinnung der Zellen

Bei dieser Prozedur handelt es sich um eine modifizierte Amaxa-Arbeitsvorschrift. (www.amaxa.com) Zur Gewinnung der Primärzellen muss die Maus zunächst betäubt werden. Dies geschieht mit 200 µl einer Lösung von Pentobarbital. Sobald die Maus schläft und keine Reflexe mehr zeigt, wird mit der Operation begonnen. Die Bauchdecke wird median eröffnet, das Darmkonvolut beiseite geschoben und in die Vena portae hepatis eine Venenkanüle (Braun) eingebracht. Danach erfolgt die Spülung der Leber mit Heseleit Puffer für ca. 10 min und anschließend die Spülung mit Kollagenaselösung (Worthington), ebenfalls für ca. 10 min. Sobald die Leber blass schimmert, wird sie herausgeschnitten und durch ein steriles Sieb passiert, mit Puffer gewaschen und die Zellsuspension durch ein engmaschiges Zellsieb filtriert. Es wird mit Medium (DMEM) aufgefüllt, zentrifugiert, die Zellen gezählt und in mit Kollagen beschichteten 6wells (BD) mit 800000 Zellen pro well ausplattiert. Als Medium wird DMEM Medium verwendet mit 20 % FCS.

2.5.2 Behandlung der Zellkultur

Die Zellkultur wird für 4 h im Inkubator stehen gelassen, damit sich die Zellen absiedeln und am Kollagen der Platte anhaften können; danach wird das alte Medium abgesaugt, frisches Medium ohne FCS zugegeben, um die Zellen für ca. 6-8 h auszu hungern. Zu Versuchsbeginn wird das Medium erneut gewechselt, das mit der entsprechenden Substanz versetzte Medium wird zugegeben und die Zellkultur nach Ablauf der Versuchszeit mit Lyse Puffer (Quiagen) lysiert. Dabei sollte beachtet werden, dass die Primärzellkultur prinzipiell nicht länger als 3 Tage verwendet wird, da sich sonst die Zellen zu transformieren beginnen oder absterben, was natürlich die Ergebnisse beeinträchtigt. Außerdem fanden Wang et al. (2001), dass Hepatozyten von YAC-Apo(a) Mäusen nach 48 h in Zellkultur ohne Stimulation die Apo(a) Expression stark verringern.

2.5.3 Isolierung der RNA

Aus dem Zellysat der Kultur wird die RNA mittels eines Kits (Peglab) isoliert und die Konzentration photometrisch gemessen (Nanodrop). Die RNA muss bei -70°C aufbewahrt werden.

2.6 Isolierung von RNA aus Gewebe

Die Gewebeprobe wird in ein Homogenisatorröhrchen mit Keramikkügelchen, das vorher mit 1 ml RIPA Puffer beschickt wurde gegeben und am Homogenisator homogenisiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand abgehoben und daraus die RNA gefällt. Diese wird nun wiederum abzentrifugiert, mit Ethanol gewaschen und getrocknet, anschließend in nukleasefreies Wasser aufgenommen und die Konzentration am Nanodrop Photometer gemessen. Nun kann die RNA der reversen Transkription und Regulationsanalyse zugeführt werden.

2.7 RNA Quantitierung

2.7.1 Reverse Transkription

Je nach Ausbeute werden $0,5\ \mu\text{g}$, $1\ \mu\text{g}$ oder $2\ \mu\text{g}$ RNA revers transkribiert.

Die reverse Transkriptase ist ein Enzym, das ursprünglich in Retroviren vorkommt und auch künstlich rekombinant hergestellt werden kann. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 37°C und synthetisiert zu einem RNA-Strang einen komplementären DNA-Strang und vervollständigt diesen zum Doppelstrang. Diese aus mRNA durch reverse Transkription gewonnene doppelsträngige DNA nennt man cDNA (für complementary DNA, copy DNA).

2.7.2 Real time RT-PCR

Die durch die reverse Transkription gewonnenen cDNA-Proben müssen entsprechend verdünnt werden ($1:50$ für $2\ \mu\text{g}$, $1:25$ für $1\ \mu\text{g}$,... je nach eingesetzter mRNA-

Menge), bevor sie nun wiederum einer PCR-Reaktion (siehe oben) unterzogen werden, wobei die Primer auf die entsprechenden mRNA-Sequenzen der zu untersuchenden Gene zurechtgeschnitten sind. Es wird ein spezieller Fluoreszenzfarbstoff (SyBr Green) zugesetzt, der mit steigender DNA-Konzentration mehr Signal abgibt. Die Reaktion selbst erfolgt in einer 96-Proben Platte in einem speziellen Gerät, dem „*LightCycler*“ (Roche). Dieses Gerät führt die PCR-Reaktion (35 Cyclen) für alle 96 Proben gleichzeitig durch und misst nach jedem Cyclus die Fluoreszenz jeder einzelnen Probe. Entsprechend der Konzentration der zum Primer passenden cDNA steigt nun die Fluoreszenz bei niedrigerer oder höherer Zyklusanzahl sprunghaft an, wobei man den Wendepunkt in diesem sprunghaften Anstieg als „Crosspoint“ (CP) bezeichnet.

2.7.3 Mathematische Auswertung

Die mathematische Auswertung geschieht durch das REST[®] Programm von Michael W. Pfaffl. Dieses Programm setzt die vom Gerät ausgegebenen Crosspoints (CPs) mathematisch zueinander in Korrelation und berechnet den Faktor der relativen Hin- auf- oder Hinunterregulation des untersuchten Gens. (Pfaffl 2001)

Die PCR-Effizienz (E) ist ein Parameter, der die Qualität der eingesetzten cDNA (revers transkribierte DNA) beschreiben soll und mit steigender DNA-Menge exponentiell ansteigt. Berechnet wird diese aus einer cDNA-Verdünnungsreihe und den entsprechenden CPs nach der Formel: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, wobei „slope“ den Abfall des CP nach Verzehnfachung der cDNA-Konzentration bedeutet.

Da es sich allerdings um keine absolute, sondern um eine relative Quantifizierung handelt, benötigt man ein Referenzgen, das in den unterschiedlichen Zell- oder Gewebetypen möglichst gleich stark exprimiert wird. Auf die Menge der vorhandenen RNA des Referenzgens soll nämlich die Menge der RNA des Zielgens bezogen werden.

Am geeignetsten sind die sogenannten „housekeeping“ Gene. Dies ist deswegen erforderlich, um etwaige Schwankungen in der Gesamtmenge von RNA oder cDNA mathematisch ausgleichen zu können.

Mit folgender Formel wird das Verhältnis der RNA Mengen des Zielgens der Probegruppe im Verhältnis zur RNA Menge des Zielgens in der Kontrollgruppe berechnet.

$$\text{Ratio (R)} = (E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})} / (E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}$$

R ist das Verhältnis der RNA Mengen.

E sind wiederum die Effektivitätswerte, die zuvor mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt werden müssen, ΔCP bezeichnet die Differenz der vom Gerät ausgegebenen Crosspoints sowohl des Zielgens als auch des Kontrollgens, wobei sich „control“ auf das Kontrollgewebe (in dem die Expression unter Umständen bereits gut bekannt ist) und „sample“ auf das Probegewebe bezieht.

2.8 Spezielle Versuchsanordnungen

2.8.1 Einfluss von Stanozolol auf die Expression von Apo(a) in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten

Die primären Hepatozyten werden auf die oben beschriebene Art und Weise gewonnen. Das Medium (DMEM mit 20 % FCS) wird nach 4 Stunden gewechselt und durch DMEM ohne FCS ersetzt. 24 h nach Gewinnung der Zellen wird der Versuch begonnen. Es wird das Medium gewechselt und der Behandlungsgruppe (12 Wells) DMEM Medium mit 10 % FCS und 100 μM Stanozolol (gelöst in 40 μl Ethanol) und der Kontrollgruppe DMEM Medium mit 10% FCS und 40 μl Ethanol (12 Wells) zugesetzt. Es werden je 6 Platten nach 12 h und nach 24 h lysiert und wie oben beschrieben die RNA gewonnen, revers transkribiert und mit Real time PCR analysiert. Als Referenzgen dient Cyclophilin.

2.8.2 Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten

Die primären Hepatozyten werden auf die oben beschriebene Art und Weise gewonnen. Das Medium (DMEM mit 20 % FCS) wird nach 4 Stunden gewechselt und durch DMEM ohne FCS ersetzt. 24 h nach Gewinnung der Zellen wird der Versuch begonnen. Es wird das Medium gewechselt und die Platten mit DMEM Medium mit 10 %

FCS und dem CAR-Liganden (TCPOBOP, gelöst in DMSO, oder nur DMSO) beschickt.

Die erste Platte erhält 3 Wells mit DMSO als Kontrolle und 3 Wells mit 250 nM TCPOBOP.

Die zweite Platte erhält 3 Wells mit DMSO als Kontrolle und 3 Wells mit 500 nM TCPOBOP.

Die dritte Platte erhält 3 Wells mit DMSO als Kontrolle und 3 Wells mit 1 μ M TCPOBOP.

Nach 48 h werden die Zellen lysiert, die RNA mittels Kit extrahiert und der Regulationsanalyse (oben beschrieben) zugeführt. Als Referenzgen dient Cyclophilin.

2.8.3 Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in Apo(a) transgenen Mäusen

Dieser Versuch erfolgt *in vivo*. Es werden 8 Apo(a) YAC transgene Mäuseweibchen mit ähnlichen Apo(a) Plasmaspiegeln ausgewählt. Diese werden in 2 Gruppen zu je 4 Mäusen unterteilt. Gruppe 1 erhält für 6 Tage täglich 3 mg TCPOBOP pro kg Körpergewicht in der Nahrung, Gruppe 2 erhält normale Nahrung ohne TCPOBOP. TCPOBOP wird mit der Pulvernahrung vermengt, anschließend werden mit etwas Wasser kleine Würstchen geformt, die im Abzug getrocknet und am nächsten Tag zerteilt werden.

Die Apo(a) Plasmaspiegel werden alle 2 Tage mittels Delfia kontrolliert.

Zu Versuchende werden die Tiere getötet und die Lebern der RNA Isolierung aus Gewebe mit anschließender Regulationsanalyse (oben beschrieben) zugeführt. Als Referenzgen dient Cyclophilin.

2.8.4 Kreuzung FXR negativer Mäuse mit Apo(a) transgenen Mäusen

Zur Überwachung der Mäusezucht wird einerseits Delfia, wie oben beschrieben verwendet, um die Apo(a) Plasmaspiegel zu kontrollieren, wobei die Mäuse dazu mindestens 4 Wochen alt sein müssen, um über einen konstanten Gallensäurestoffwechsel zu verfügen.

Andererseits werden zur Feststellung des FXR Genotyps Tailtips der Mäuse genommen, die durch Proteinase K verdaut werden. Die PCR und Gelelektrophorese wird wie oben beschrieben durchgeführt.

Es werden für die F1 Generation 3 FXR negative Männchen (F0) mit 6 FXR positiven, Apo(a) transgenen Weibchen (F0) gekreuzt (3 Käfige mit jeweils einem Männchen und zwei Weibchen).

Von der F1 Generation werden Mäuse mit Apo(a) Plasmaspiegeln für die Zucht der F2 Generation verwendet.

Für die Zucht der F3 Generation werden homozygote FXR k.o. Mäuse mit hohen Apo(a) Plasmaspiegeln und FXR positive und heterozygote Mäuse mit hohen Apo(a) Plasmaspiegeln verwendet.

2.8.5 Gallensäurefütterung Apo(a) transgener FXR negativer Mäuse

Es wird die F3 Generation der oben beschriebenen gekreuzten Mäuse verwendet, wobei 6 weibliche Mäuse mit vergleichbaren Apo(a) Plasmaspiegeln aus der FXR negativen Gruppe und 6 Mäuseweibchen mit ähnlichen Apo(a) Plasmaspiegeln aus der FXR positiven/heterozygoten Gruppe ausgewählt werden.

Die Fütterung erfolgt nun 4 Tage mit pulverisierter Kost, die mit 0,5 % Cholsäure gründlich vermengt wurde. Es wurden eigene Behälter für Pulverfutter verwendet, die einer Maus keine größere Menge als 5 g Futter pro Tag erlauben.

Die Blutabnahmen mit Kontrollen der Apo(a) Plasmaspiegel (Delfia) erfolgen zu Versuchsbeginn (Tag 0), am 2. Tag und zu Versuchende (Tag 4).

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Stanozolol auf die Expression von Apo(a) in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten

Die Behandlung von primären Hepatozyten mit 10^{-4} M Stanozolol zeigte eine nicht signifikante Reduktion der Apo(a) Expression auf 80 % nach 12 Stunden und eine signifikante Reduktion auf 60 % der Expression der unbehandelten Gruppe nach 24 Stunden. Als Referenzgen für die mathematische Auswertung diente Cyclophilin.

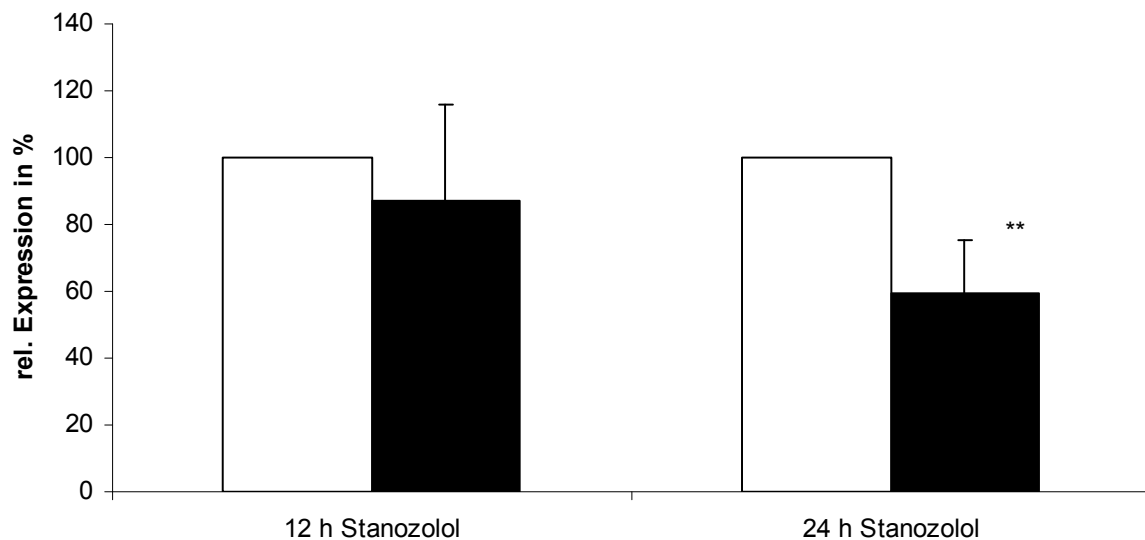


Abbildung 5: Die Graphik zeigt den Verlauf der relativen Apo(a) Expression von Hepatozyten, die mit Stanozolol (10^{-4} M) behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten primären Hepatozyten nach 12 h und 24 h in Kultur. Es wurden Hepatozyten von Mäuseweibchen verwendet. Der Versuch begann 12 h nach der Gewinnung der Zellen. (** $p < 0,01$)

3.2 Ergebnisse bezüglich CAR

3.2.1 Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in primären Apo(a) transgenen Hepatozyten

Die Behandlung mit dem CAR Agonisten zeigte bei keiner verwendeten Konzentration signifikante Veränderungen in der Expression von Apo(a). Als Referenzgen diente wiederum Cyclophilin. Als Kontrollgen für die Wirkung diente Cyp2b. Dieses war zwar erhöht (zehnfach), jedoch nicht im zu erwartenden Ausmaß (tausendfach).

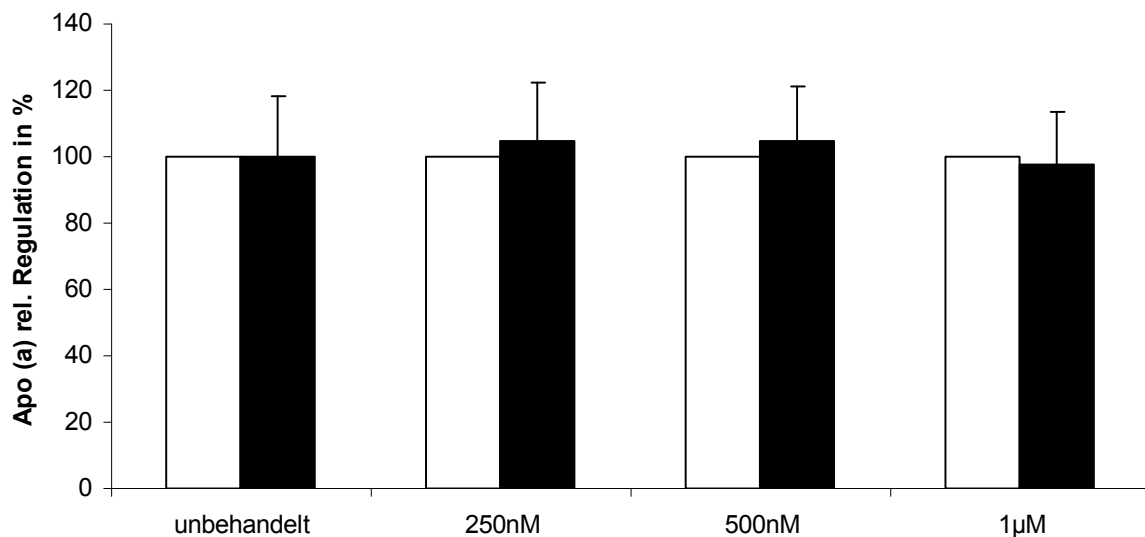


Abbildung 6: Primäre Hepatozyten von Apo(a) transgenen Mäuseweibchen wurden für 48 h mit 250 nM, 500 nM und 1 μM TCPOBOP behandelt. Der Versuch wurde 12 h nach Gewinnung der Zellen begonnen. Es konnte jedoch keine signifikante Veränderung im Vergleich zu unbehandelten primären Hepatozyten (nur DMSO) festgestellt werden.

3.2.2 Einfluss von TCPOBOP auf die Apo(a) Expression in Apo(a) transgenen Mäusen

Bei der Fütterung der Tiere mit dem CAR Agonisten zeigte sich eine Erhöhung der Apo(a) Plasmaspiegel ab dem 4. Tag. Die Mäuse fraßen jedoch durch die Futterumstellung an den ersten 3 Tagen deutlich weniger als die vorgesehenen 5 g pro Tag. Nach der Gewöhnungsphase kam es zu einem deutlichen Anstieg der Apo(a) Plas-

maspiegel der behandelten Mäuse, während die Plasmaspiegel der unbehandelten Mäuse gleich blieben. Die Regulationsanalyse zeigte eine 2,5 fache Erhöhung der Apo(a) Transkription der behandelten gegenüber der unbehandelten Gruppe und interessanterweise auch eine Reduktion der FXR/SHP Transkription. Als Referenzgen diente Cyclophilin. Das Kontrollgen Cyp2b war 28000 fach erhöht, woraus sich schließen lässt, dass der Agonist TCPOBOP seine Wirkung entfalten konnte.

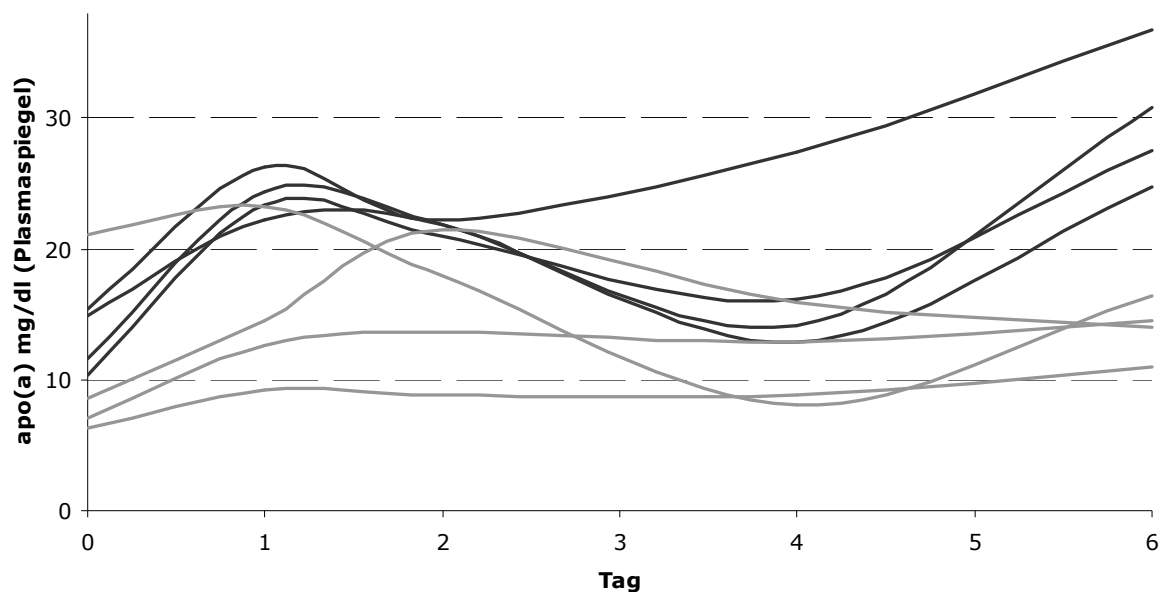


Abbildung 7: Der Verlauf zeigt, dass jene 4 Apo(a) transgenen Mäuseweibchen, deren Nahrung 3 mg TCPOBOP pro kg Körpergewicht pro Tag enthielt (schwarz), nach 6 Tagen deutlich höhere Apo(a) Plasmaspiegel besaßen als jene, die nur normale Kost erhielten (grau). Man erkennt auch den zyklischen Verlauf, der durch den Einfluss der Sexualhormone entsteht. Die geringe Beeinflussung der Apo(a) Plasmaspiegel durch TCPOBOP während der ersten Tage lässt sich durch die Beobachtung erklären, dass die Mäuse das ungewohnte Futter zunächst verschmähten, später aber der Hunger groß genug wurde, sodass sie schließlich die angebotene Menge doch verzehrten.

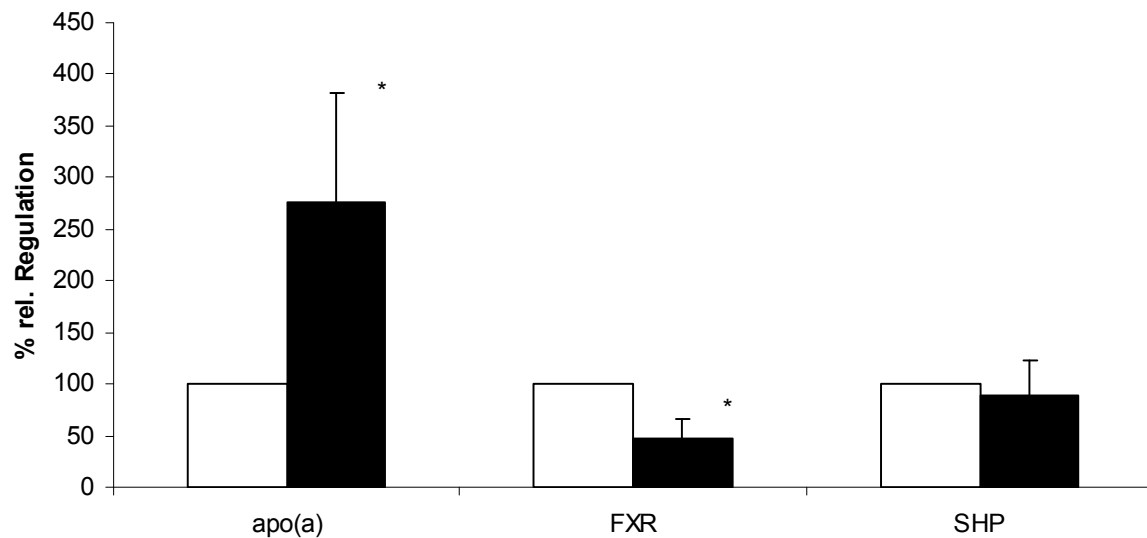


Abbildung 8: Die Transkriptionsanalyse der Hepatozyten der 8 Mäuseweibchen nach Versuchende zeigt die deutliche Erhöhung der Apo(a) Transkription der TCPOBOP Gruppe bezogen auf die unbehandelte Gruppe. Es zeigt sich auch eine Hinunterregulation von FXR und die Tendenz einer Abnahme von SHP. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (* $p < 0,05$)

3.3 Ergebnisse bezüglich FXR

3.3.1 Kreuzung FXR negativer Mäuse mit Apo(a) transgenen Mäusen

Nach der Kreuzung der beiden Stämme zeigte sich, dass in der F3 Generation jene Mäuse, die homozygot FXR negativ sind und das Apo(a) Genkonstrukt besitzen, fast doppelt so hohe Apo(a) Plasmaspiegel aufweisen wie ihre heterozygot und homozygot FXR positiven Geschwister. Außerdem besitzen die FXR negativen Männchen annähernd gleich hohe Spiegel wie FXR negative Weibchen. Bei FXR positiven Mäusen betragen die Spiegel der Männchen nur ungefähr ein Zehntel der Spiegel der Weibchen.

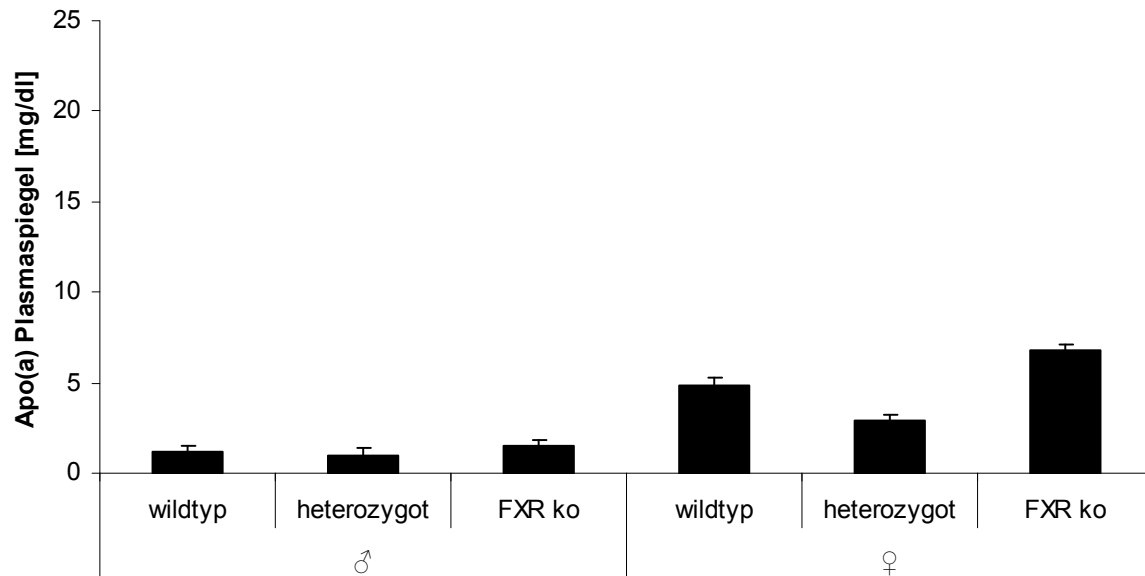


Abbildung 9: Die zweite Generation (F2) zeigte keine sehr deutlichen Unterschiede in den Apo(a) Plasmaspiegeln - die höchsten besitzen FXR negative Weibchen. Das Kollektiv besteht aus 5 Wildtyp-Männchen, 7 heterozygoten Männchen, 7 FXR negativen Männchen, 12 Wildtyp-Weibchen, 11 heterozygoten Weibchen und 12 FXR negativen Weibchen. Die Balken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

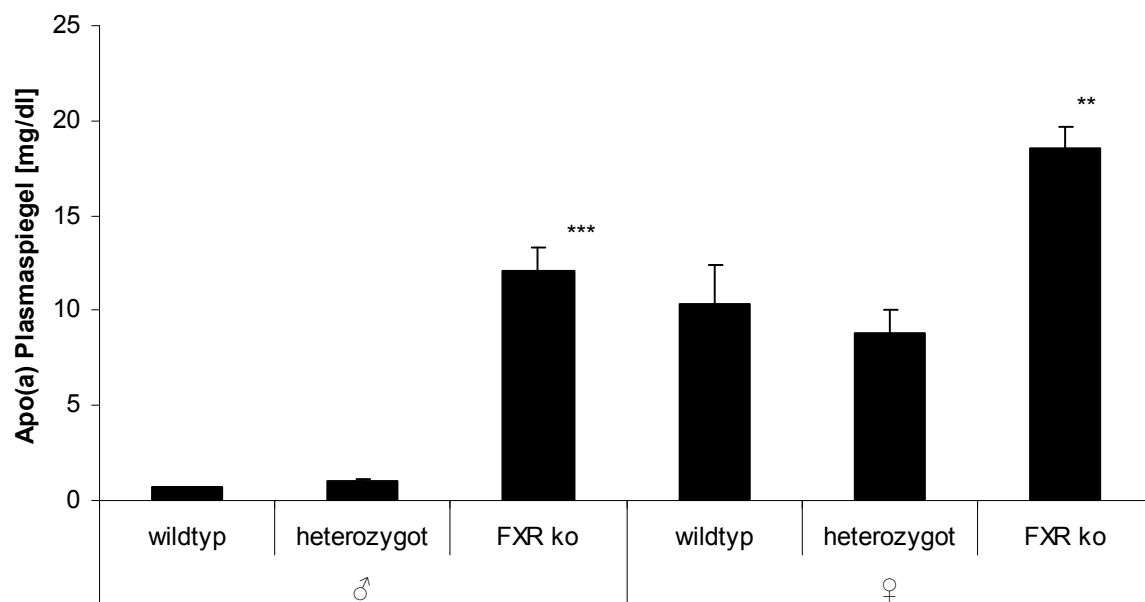


Abbildung 10: Die dritte Generation (F3) zeigt, dass die FXR negativen Männchen signifikant erhöhte Apo(a) Plasmaspiegel besitzen. Unter den Weibchen besitzen FXR negative fast doppelt so hohe Apo(a) Plasmaspiegel wie FXR positive. Das Kollektiv besteht aus 16 Wildtyp-Männchen, 17 heterozygoten Männchen, 34 FXR negativen Männchen, 15 Wildtyp-Weibchen, 22 heterozygoten Weibchen und 45 FXR negativen Weibchen. Die Balken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

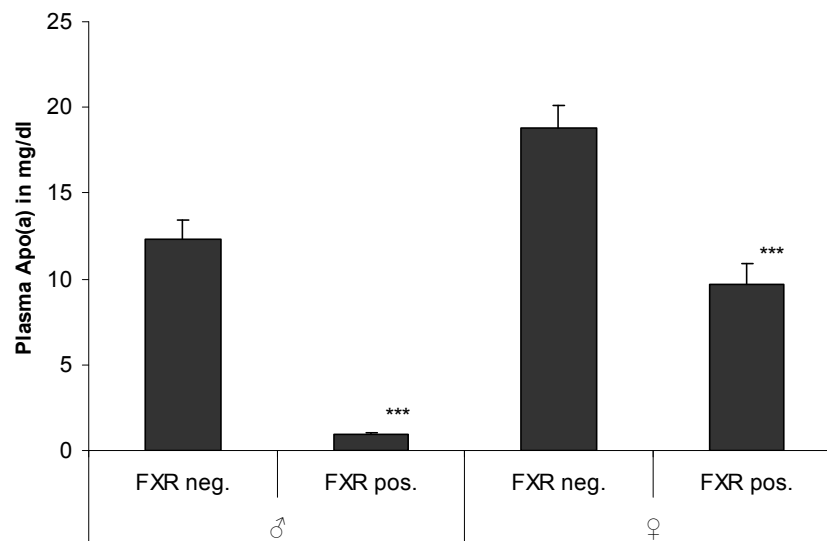


Abbildung 11: Unter der Annahme, dass FXR ein dominantes Merkmal ist, ergibt sich diese Darstellung, bei der heterozygot und homozygot FXR positive Mäuse zusammengefasst sind (FXR pos.). Das Kollektiv besteht aus 33 FXR positiven und 34 FXR negativen Männchen und 37 FXR positiven und 45 FXR negativen Weibchen. Die Balken geben wieder den Standardfehler des Mittelwertes an. FXR positive Mäuse besitzen hochsignifikant niedrigere Plasma Apo(a) Werte als FXR negative Mäuse. (***) $p < 0,001$)

3.3.2 Fütterung von Gallensäuren an Apo(a) transgene FXR negative Mäuse

Die Hypothese für diesen Versuch war, dass FXR negative Mäuse mit ihren Apo(a) Plasmaspiegeln nicht auf Gallensäuren ansprechen. Es zeigte sich allerdings, dass FXR negative Mäuse ebenfalls, nur bei weitem nicht so stark wie FXR positive, mit ihren Apo(a) Plasmaspiegeln absinken. So erreichen FXR negative Mäuse am zweiten Tag circa 80 % und am vierten Tag circa 50 % der Anfangswerte, während FXR positive bereits am zweiten Tag auf 40 % und am vierten Tag auf 10 % der Anfangswerte absinken.

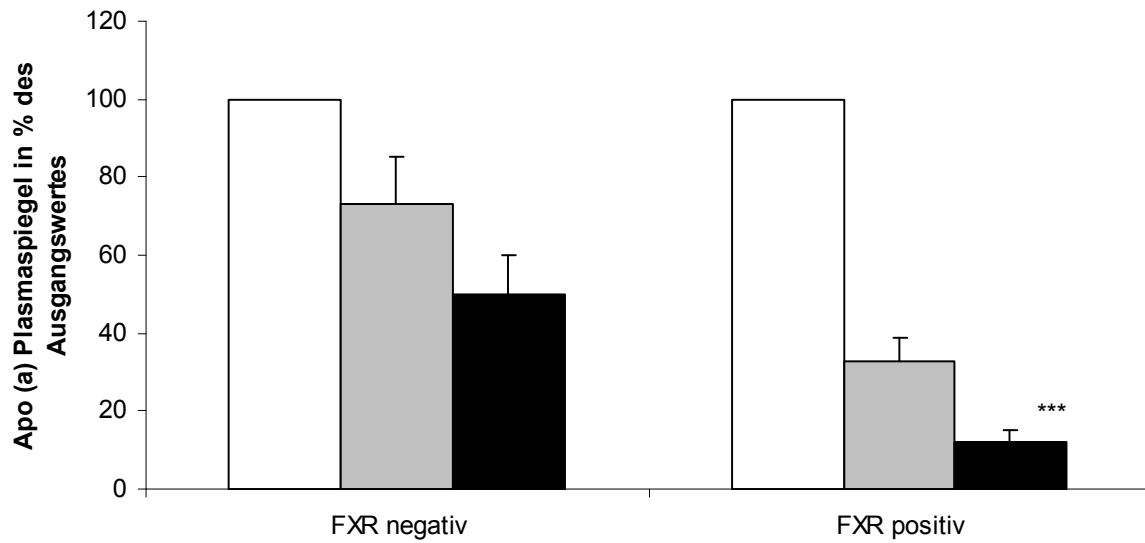


Abbildung 12: Die grauen Balken zeigen die Reduktion der Apo(a) Plasmaspiegel in % des Ausgangswertes nach 2 Tagen Gallensäurefütterung, die schwarzen Balken nach 4 Tagen. Es wurden jeweils 5 (mit und ohne FXR) Apo(a) transgene Mäuseweibchen mit einer 0,5 % cholsäurehaltigen Kost gefüttert. Die Werte sind auf den Apo(a) Plasmaspiegel des jeweiligen Versuchstieres zu Versuchsbeginn bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Plasmaspiegel zu Versuchende sind in der FXR positiven Gruppe deutlich niedriger als in der FXR negativen Gruppe. (***) $p < 0,001$)

4 Diskussion

4.1 Behandlung von primären Hepatozyten mit Stanozolol

Stanozolol ist ein Ligand des Androgenrezeptors (AR) und ein bekanntes anaboles Steroid. Der stärkste natürliche Aktivator dieses Rezeptors ist Dihydrotestosteron. AR übt hemmende Wirkung auf die Expression vieler Gene aus, wobei die genauen Mechanismen größtenteils noch ziemlich unerforscht sind. (Laudet und Gronemeyer 2002) Stanozolol wurde deswegen gewählt, weil es im Menschen zu einer starken Senkung des Lipoprotein(a) Plasmaspiegels führte (Kostner 2005). Die Behandlung von primären Hepatozyten mit Stanozolol zeigte, dass es zu einer Herunterregulation des Apo(a) Gens kommt, jedoch nicht in dem erwarteten Ausmaß.

Wie sich später zeigte, ist das verwendete Narkotikum, Pentobarbital, ein starker Agonist an CAR, was durch den in den CAR Experimenten beobachteten hochregulierenden Effekt von CAR die Wirkung von Stanozolol verringern könnte. Die 12 h von der Gewinnung der Zellen bis zum Versuchsbeginn und das zweimalige Wechseln des Mediums sind möglicherweise nicht ausreichend, um das Pentobarbital vollständig aus der Zellkultur auszuwaschen.

Stanozolol sollte eigentlich keine Wirkung an CAR besitzen, da für CAR nach langem Austesten verschiedenster Androgene nur Androstanol und Androstenol als Liganden (und überraschenderweise Antagonisten) identifiziert werden konnten (Laudet und Gronemeyer, 2002).

Die Beobachtung, dass das Androgen und AR Ligand Stanozolol Apo(a) Plasmaspiegel verringern kann, deckt sich auch mit der unten diskutierten Publikation von Frazer (1995), der feststellte, dass Dihydrotestosteron in Apo(a) transgenen Mäusen für das Abfallen der Apo(a) Plasmaspiegel von Mäusemännchen zum Zeitpunkt der Geschlechtsreife verantwortlich ist.

Wieso es dann allerdings beim Menschen keine nennenswerten Unterschiede der Apo(a) Plasmaspiegel zwischen Männern und Frauen gibt, bleibt unklar.

4.2 CAR

Der *in vitro* Versuch mit dem Agonisten für Mäuse-CAR zeigte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Expression des Gens. Dies könnte auch an dem verwendeten Narkotikum liegen, Pentobarbital, das selbst ein Agonist für CAR ist. Es wurde in der Zellkultur zwar vor Versuchsbeginn innerhalb von 12 h zweimal das Medium gewechselt, allerdings scheint diese Maßnahme nicht auszureichen, um Pentobarbital genügend aus den Zellen auszuschwemmen, um einen Effekt durch TCPOBOP beobachten zu können. Außerdem sind die in der Primärzellkultur beobachteten Effekte generell viel kleiner als die *in vivo* beobachteten Effekte. Um die CAR vermittelten Mechanismen in primärer Zellkultur besser studieren zu können, sollte in Zukunft eine Möglichkeit gefunden werden, die Tiere anders zu betäuben, zum Beispiel mit Isofluran, einem Inhalationsnarkotikum, das auch leicht flüchtig genug ist, um aus der Zellkultur abzdampfen, und von dem auch keine Effekte auf CAR oder FXR beschrieben sind.

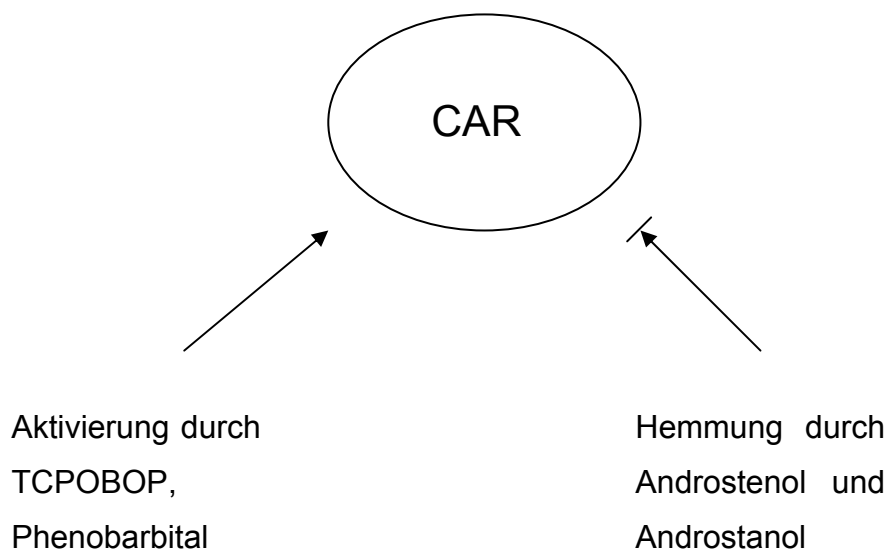


Abbildung 13: Bei CAR handelt es sich wie der Name schon sagt, um einen konstitutiv, aktiven Rezeptor, das heißt: dieser Rezeptor benötigt keinen Liganden, um aktiv zu sein. Durch die Bindung der Liganden TCPOBOP oder Phenobarbital (und andere Barbiturate) kann er allerdings noch zusätzlich aktiviert werden. Die Bindung der Androgene Androstenol und Androstanol führt zu einer Hemmung des Rezeptors.

Die *in vivo* Experimente zeigten, dass die Aktivierung von CAR zu einer Erhöhung der Apo(a) Expression führt, wenn auch zu keiner allzu starken. Dabei sollte man sich bewusst sein, dass es sich bei CAR um einen konstitutiv aktiven Rezeptor handelt (Siehe Abb. 13) und dass die verwendete Substanz, TCPOBOP, im Unterschied zu den Androgenmetaboliten ein Aktivator von CAR ist (Laudet und Gronemeyer, 2002). Somit scheinen Androgene über zwei verschiedene Wege eine Herunterregulation von Apo(a) zu bewirken: einerseits über die Aktivierung von AR (Dihydrotestosteron, Stanozolol) und andererseits über die Hemmung von CAR (Androstenol und Androstanol).

4.3 FXR

Der Umstand, dass Apo(a) transgene Mäuse mit künstlich ausgeschaltetem FX-Rezeptor schon viel höhere Apo(a) Basisplasmaspiegel haben als ihre FXR positiven Apo(a) transgenen Artgenossen, ist ein starker Hinweis darauf, dass FXR eine entscheidende Rolle in der Regulation des Apo(a) Gens spielt.

Die niedrigen Apo(a) Plasmawerte in der F2 Generation lassen sich dadurch erklären, dass die Mäuse in dieser Generation nur heterozygot Apo(a) transgen waren. Bei der Züchtung der nächsten (F3) Generation wurde dann besonderes Augenmerk darauf gelegt, nur jene Mäuse mit den höchsten Apo(a) Plasmaspiegeln weiterzuzüchten. Die Genotypisierung zur Unterscheidung zwischen Apo(a) homozygoten und heterozygoten Tieren ist nämlich sehr aufwendig und liefert oft keine eindeutigen Ergebnisse. Der Phänotyp erwies sich als vollkommen ausreichend, um eine stabile Apo(a) Expression in den Nachkommen zu erzielen, die man auch statistisch auswerten konnte.

Die Tatsache, dass normale Apo(a) transgene Weibchen zehn bis hundertfach höhere Apo(a) Plasmaspiegel besitzen als Apo(a) transgene Männchen ist schon lange bekannt. Dies wurde den Sexualhormonen zugeschrieben. Dafür spricht auch, dass die Apo(a) Werte zyklusabhängig sind.

Frazer et al. (1995) konnten zeigen, dass dieser Effekt androgenabhängig ist. Eine Woche nach der Geburt besitzen nämlich Männchen und Weibchen gleich hohe Apo(a) Plasmaspiegel, nach 4 Wochen nehmen sie bei den Männchen mit beginnender Geschlechtsreife auf 1/10 bis 1/100 des ursprünglichen Werts ab (0,1 bis 1

mg/dl). Durch Kastration kann dieser Vorgang wieder rückgängig gemacht werden und die Plasmaspiegel steigen an auf ca. 10 mg/dl. Durch künstliche Dihydrotestosteronsubstitution bei den kastrierten Männchen nehmen die Apo(a) Plasmaspiegel wieder ab auf den Wert vor der Kastration.

Die Beobachtung, dass Mäusemännchen, die FXR negativ sind, annähernd gleich hohe Apo(a) Plasmaspiegel besitzen wie die Weibchen, ist ein Hinweis darauf, dass die Herunterregulation des Apo(a) Gens auch über einen FXR vermittelten Mechanismus stattfindet.

Dass homologe Proteine zwischen den Spezies sich in bestimmten Eigenschaften mehr oder weniger unterscheiden können, ist hinlänglich bekannt. Möglicherweise unterscheidet sich der FX-Rezeptor der Maus vom menschlichen FXR unter anderem dadurch, dass er bei der Maus neben Gallensäuren auch durch Sexualhormone, wie zum Beispiel Dihydrotestosteron (eigentlich ein Androgenrezeptoragonist), aktiviert werden kann, was beim Menschen nicht der Fall ist. Eine derartige Aktivierung würde nun bei der Maus einen ähnlichen Effekt zeigen wie die Aktivierung durch Gallensäuren: Die Reduktion der Translation von Apo(a). Damit ließe sich auch der beim Menschen nicht beobachtete Unterschied der Apo(a) Plasmaspiegel zwischen Männern und Frauen erklären.

Allerdings könnte die Beobachtung auch darauf beruhen, dass der aktivierte Androgenrezeptor (AR) direkt oder indirekt die Expression von FXR erhöht oder über einen noch komplexeren Mechanismus Einfluss auf das Geschehen nimmt.

Der Fütterungsversuch mit Gallensäuren bestätigte den Einfluss von FXR auf die Apo(a) Expression. Er zeigte aber auch, dass nicht nur FXR alleine für die Herunterregulation des Apo(a) Gens verantwortlich ist, da in der FXR negativen Gruppe die Apo(a) Translation ebenfalls, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß, abnahm.

Die Ergebnisse in der FXR positiven Gruppe sind durchaus vergleichbar mit einer im Jahr 2003 in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten, noch nicht veröffentlichten Studie, in der transgene Mäuse mit 0,5 % Cholsäure gefüttert wurden.

Gallensäuren sind allerdings für FXR negative Mäuse stark toxisch. Sinal et al. (2000) verwendeten in ihren Versuchen 1 % Cholsäure, um die toxische Wirkung von Gallensäuren auf FXR negative Mäuse darzustellen. Dabei zeigte sich der toxische Effekt bereits nach 5 Tagen. Aus diesem Grund wurde in dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch eine nur 0,5 % cholsäurehaltige Kost für 4 Tage verwendet.

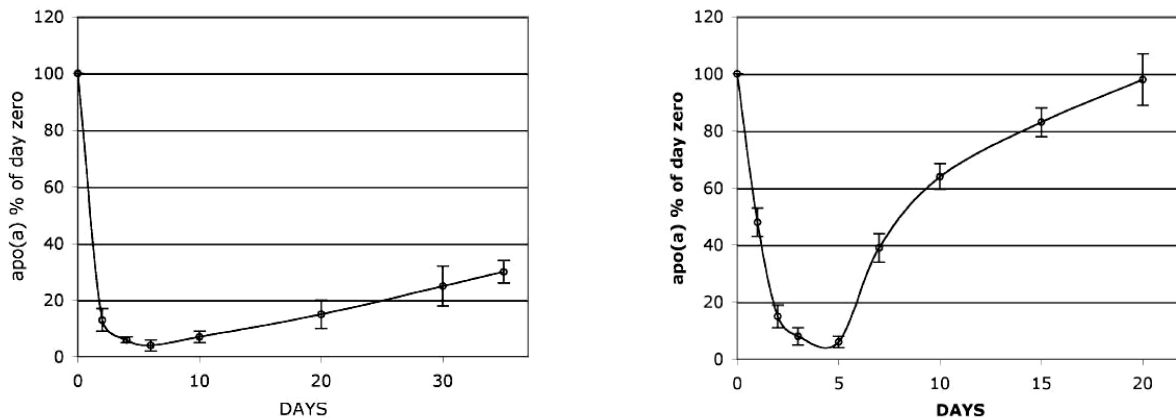


Abbildung 14: Fütterungsversuch 2003 mit Cholsäure. Die linke Graphik zeigt 4 transgene Mäuse, die 35 Tage lang mit 0,5 % Cholsäure gefüttert wurden. Die rechte Graphik zeigt den Verlauf von 4 transgenen Mäusen, die nur für 5 Tage 0,5 % Cholsäure in der Nahrung erhielten und dann auf normale Nahrung umgestellt wurden. Man erkennt die maximale Reduktion der Apo(a) Plasmaspiegel am 5. Tag. Allerdings ließ sich schon in den ersten beiden Tagen eine Abnahme auf unter 20 % des Ausgangswertes erreichen.

Die Verringerung der Apo(a) Expression in FXR negativen Mäusen könnte natürlich auch auf den direkten toxischen Effekt der Gallensäurekost zurückzuführen sein. Dieser sollte jedoch durch die kürzere Versuchsdauer und die geringe Konzentration der Cholsäure (0,5 %) möglichst hintangehalten worden sein. Außerdem ermöglicht auch die Wahl des Referenzgens bei der RT-PCR noch einen gewissen mathematischen Ausgleich eines derartigen Effekts, und zwar unter der Annahme, dass die Expression des Referenzgens konstant bleibt.

Es scheint also zusätzlich noch weitere FXR unabhängige Mechanismen zu geben, die die Expression von Apo(a) beeinflussen, immerhin konnten ja selbst in der FXR negativen Gruppe die Apo(a) Plasmaspiegel auf 50 % reduziert werden. So zeigen Mitro et al. (2007), dass ein FXR unabhängiger Mechanismus durch Gallensäuren aktiviert wird, der die Expression des Gens für die Cholesterin 7 α -hydroxylase (CYP7A1), einem Schlüsselenzym in der Gallensäuresynthese, unterdrückt. Dieser Mechanismus wirkt über HDAC 7. Mitro et al. zeigen, dass Gallensäuren in der Lage sind, die Bereitstellung von HDAC 7, 3 und 1 und zusätzlich SMRT α zu fördern, während ein selektiver FXR Agonist (GW4064) dies nicht vermag. Dies ist insofern interessant, als es viel logischer auf der Hand läge, dass Gallensäuren direkt über ihren Rezeptor, nämlich FXR, ihre eigene Synthese hemmen könnten. Allerdings ist es

umstritten, ob überhaupt alle Gallensäuren in der Lage sind, an FXR zu binden (Laudet und Gronemeyer 2002).

Zusammenfassend kann man folgern, dass die Einnahme von Cholsäure bzw. nicht-toxischer Analoga auch beim Menschen zu einer Reduktion der Apo(a) führt. Um eine effektive Therapie von Patienten mit hohem Lp(a) Spiegel zu entwickeln, werden ohne Zweifel weitere Studien notwendig sein.

5 Literaturverzeichnis

Acquati, F., Hammer, R., Ercoli B., Mooser V., Ruixan, T., Rönicke V., Michalich, A., Chiesa, G., Taramelli, R., Hobbs H.H. und Müller H.J. (1999) Transgenic mice expressing a human apolipoprotein(a) allele. *Journal of Lipid Research* 40: 994-1006

Berg, K. (1963) A new serum type in man: the Lp system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 59: 362-382

Burke, D.T., Carle, G.F. und Olson, M V. (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236 (4803): 806-812,

Busso, N., Dudler, J., Salvi, R., Péclat, V., Lenain, V., Marcovina, S., Darioli, R., Nicod, P., So, A.K. und Mooser, V. (2001) Plasma apolipoprotein(a) co-deposits with fibrin in inflammatory arthritic joints. *American journal of pathology* 159: 1445-1453

Caplice, Noel M., Panetta, Carmelo, Peterson, Timothy E., Kleppe, Laurel S., Mueske, Cheryl S., Kostner, Gert M., Broze, George J. und Simari, Robert D. (2001) Lipoprotein(a) binds and inactivates tissue factor pathway inhibitor: a novel link between lipoproteins and thrombosis. *Blood* 98: 2980-2987

Dieplinger, H. und Utermann G. (1999) The seventh myth of lipoprotein(a): where and how is it assembled? *Current opinion in lipidology* 10: 275-283

Frazer, K.A., Narla, G., Zhang, J.L. und Rubin, E.M. (1995) The apolipoprotein(a) gene is regulated by sex hormones and acute-phase inducers in YAC transgenic mice. *Nature Genetics* 9: 424-431

Jung, D., Elferink, M.G.L., Stellaard, F. und Groothuis, G.M.M. (2006) Analysis of bile acid-induced regulation of FXR target genes in human liver slices. *Liver international*: 137-144

Kim, J.S., Chang, J.H., Yu, H.K., Ahn, J.H., Yum, J.S., Lee, S.K., Jung, K.H., Park, D.H., Yoon, Y., Byun, S.M. und Chung, S.I. (2003) Inhibition of angiogenesis dependent tumor growth by the cryptic kringle fragments of human apolipoprotein(a). *J. Biol. Chem.* 278 (31): 29000-29008

Koschinsky, M.L. und Marcovina, S.M. (2004) Structure-function relationships in apolipoprotein(a): insights into lipoprotein(a) assembly and pathogenicity. *Current opinion in lipidology* 15: 167-174

Kostner G.M., Gavish D., Leopold B., Bolzano K., Weintraub M.S. und Breslow J.L. (1989) HMG CoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lipoprotein(a) levels. *Circulation* 80(5): 1313-1319

Kostner, G.M., Avogaro, P., Cazzolato, G., Marth, E., Bittolo-Bon, G. und Qunici, G.B. (1981) Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 38:51-61

Kostner, K.M. und Kostner, G.M.: (2005) Therapy of hyper-Lp(a). *Handb Exp Pharmacol* 170: 519-536.

Lackner, C., Cohen, J.C. und Hobbs, H.H. (1993) Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum. Molec. Gen.* 2: 933-940

Laplaud, P.M., Beaubatie, L., Rall, S.C., Luc, G., Saboureau, M. (1988). Lipoprotein(a) is the major apoB-containing lipoprotein in the plasma of a hibernator, the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *J. Lipid Res.* 29: 1157-1170

Laudet, V. und Gronemeyer, H. (2002) The nuclear receptor. *Facts book*, Academic press, London: 199ff, 227ff und 391ff

Lew, J.-L., Zhao, A., Yu, J., Huang, L., de Pedro N., Peláez, F., Wright, S.D., Cui, J. (2003) The farnesoid x receptor controls gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion. *Journal of Biological Chemistry* 279: 8856-8861

Li, Y.T.Y., Swales, K.E., Thomas, G.J., Warner, T.D. und Bishop-Bailey, D. (2007) Farnesoid x receptor ligands inhibit vascular smooth muscle cell inflammation and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27: 2606-2611

Lou, Xing Jian, Boonmark, Nataya W., Horrigan, Frank T., Degen, Jay L. und Lawn, Richard M. (1998) Fibrinogen deficiency reduces vascular acculation of apolipoprotein(a) and development of atherosklerosis in apolipoprotein(a) transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 12591-12595

Lou, Xing Jian, Kwan, Helen H., Prionas, Stavros D., Yang, Zhuoying, Lawn, Richard M. und Fajardo, Luis F. (1998) Despite its homology to angiostatin apolipoprotein(a) does not affect angiogenesis. *Experimental and molecular pathology* 65: 53-63

Ma, K., Saha, P.K., Chan, L. und Moore, D.D. (2006) Farnesoid x receptor is essential for normal glucose homeostasis. *Journal of clinical investigation* 116: 1102-1109

Makino, K. und Scanu, A. M. (1991) Lipoprotein(a): nonhuman primate models. *Lipids* 26: 679-683

Marcovina S.M., Koschinsky M.L., Albers J.J., Skalaratos, S. (2003) Recent Advances and Future Directions. In: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Lipoprtein(a) and Cardiovascular Disease. *Clin Chem* 49(11): 1785-1796

Mc Lean, J., Tomlinson, J., Kuang, W-J., Eaton, D., Chen, E., Fless, G., Scanu, A. und Lawn, R. (1987) cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330: 132 - 137

Mitro, N., Godio, C., de Fabiani, E., Scotti, E., Galmozzi, A., Gilardi, F., Caruso, D., Chacon, A.B.V. und Crestani, M. (2007) Insights in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene reveal a target for modulating bile acid synthesis. *Hepatology* 46: 885-897

Nelson, D.L. und Cox, M.M. (2001) Lehninger Biochemie. 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 868ff

Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: 2001-2007

Rouy, D., Duverger, N., Lin, S.D., Emmanuel, F., Houdebine, L.-M., Deneffe, P., Viglietta, C., Gong, E., Rubin, E.M. und Hughes, S.D. (1997) Apolipoprotein(a) yeast artificial chromosome transgenic rabbits. *Journal of Biological Chemistry* 273: 1247-1251

Schedl, A., Beermann, F., Thies, E., Montoliu, L., Kelsey, G. und Schütz, G. (1992) Transgenic mice generated by pronuclear injection of a yeast artificial chromosome. *Nucleic Acids Research* 20: 3073-3077

Schedl, A., Larin, Z., Montoliu, L., Thies, E., Kelsey, G., Lehrach, H. und Schütz, G. (1993) A method for the generation of YAC transgenic mice by pronuclear microinjection. *Nucleic Acids Research* 21: 4783-4787

Sinal, C. J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J. M., Lambert, G., Gonzalez, F. J. (2000) Targeted Disruption of the Nuclear Receptor FXR/BAR Impairs Bile Acid and Lipid Homeostasis. *Cell* 102: 731-744

Trieu, Vuong N. und Uckun, Faith M. (1999) Apolipoprotein(a), a link between atherosclerosis and tumor angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 257: 714-718

Tzamelli, I., Pissios, P., Schuetz, E.G., Moore, D.D. (2000) The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Molecular and Cellular Biology*: 2951-2958

Wade, D.P., Lindahl, G.E. und Lawn, R.M. (1994) Apolipoprotein(a) gene transcription is regulated by liver-enriched trans-acting factor hepatocyte nuclear factor 1 α . *Journal of Biological Chemistry* 269: 19757-19765

Wang, J., Boedecker, J., Hobbs, H.H. und White, A.L. (2001) Determinants of human apolipoprotein [a] secretion from mouse hepatocyte cultures. *J. Lipid Res.* 42: 60-69

Wang, Y.D., Chen, W.D. und Haung W. (2008) FXR, a target for different diseases. *Histology and Histopathology* 23: 621-627

6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Diese Abbildung zeigt ein LDL Partikel mit dem Apolipoprotein(a), das sich wie eine Kette um das LDL legt. Man erkennt auch die Wiederholungssequenzen des Kringel-4 Motivs..... 7
- Abbildung 2: Apolipoprotein(a) und die Homologie zu Plasminogen. Die Abbildung zeigt oben einen Vergleich der cDNA (revers transkribierte mRNA als Abbild der Proteinaufbaus) von Plasminogen und Apo(a) mit den Wiederholungssequenzen der Kringel-4 Domänen. Unten zeigt die Abbildung einen Vergleich der fertigen Proteinstruktur von Plasminogen und Apo(a). Man beachte die Schnittstelle (nur Plasminogen weist eine auf) des Plasminogenaktivators (t-PA), der Plasminogen in das fibrinolytische Plasmin umwandelt. 8
- Abbildung 3: Lipoprotein(a) wirkt durch seine Ähnlichkeit zu Plasminogen über mehrere Wege prothrombotisch. Einerseits hemmt es die Bindung von Plasminogen an seinen spezifischen Rezeptor und auch an das Fibrin des Blutgerinnsels, andererseits aktiviert es den Plasminogenaktivatorinhibitor 1 (PAI-1), der durch Hemmung des Gefäßwand Plasminogenaktivators (t-PA) die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin, der fibrinolytischen Protease, bremst. 11
- Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Apo(a) Delfia-Assays..... 20
- Abbildung 5: Die Graphik zeigt den Verlauf der relativen Apo(a) Expression von Hepatozyten, die mit Stanozolol (10^{-4} M) behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten primären Hepatozyten nach 12 h und 24 h in Kultur. Es wurden Hepatozyten von Mäuseweibchen verwendet. Der Versuch begann 12 h nach der Gewinnung der Zellen. (** $p < 0,01$) 27
- Abbildung 6: Primäre Hepatozyten von Apo(a) transgenen Mäuseweibchen wurden für 48 h mit 250 nM, 500 nM und 1 μ M TCPOBOP behandelt. Der Versuch wurde 12 h nach Gewinnung der Zellen begonnen. Es konnte jedoch keine signifikante Veränderung im Vergleich zu unbehandelten primären Hepatozyten (nur DMSO) festgestellt werden. 28
- Abbildung 7: Der Verlauf zeigt, dass jene 4 Apo(a) transgenen Mäuseweibchen, deren Nahrung 3 mg TCPOBOP pro kg Körpergewicht pro Tag enthielt (schwarz), nach 6 Tagen deutlich höhere Apo(a) Plasmaspiegel besaßen als jene, die nur normale Kost erhielten (grau). Man erkennt auch den zyklischen

Verlauf, der durch den Einfluss der Sexualhormone entsteht. Die geringe Beeinflussung der Apo(a) Plasmaspiegel durch TCPOBOP während der ersten Tage lässt sich durch die Beobachtung erklären, dass die Mäuse das ungewohnte Futter zunächst verschmähten, später aber der Hunger groß genug wurde, sodass sie schließlich die angebotene Menge doch verzehrten..... 29

Abbildung 8: Die Transkriptionsanalyse der Hepatozyten der 8 Mäuseweibchen nach Versuchsbeginn zeigt die deutliche Erhöhung der Apo(a) Transkription der TCPOBOP Gruppe bezogen auf die unbehandelte Gruppe. Es zeigt sich auch eine Hinunterregulation von FXR und die Tendenz einer Abnahme von SHP. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (* $p < 0,05$) 30

Abbildung 9: Die zweite Generation (F2) zeigte keine sehr deutlichen Unterschiede in den Apo(a) Plasmaspiegeln - die höchsten besitzen FXR negative Weibchen. Das Kollektiv besteht aus 5 Wildtyp-Männchen, 7 heterozygoten Männchen, 7 FXR negativen Männchen, 12 Wildtyp-Weibchen, 11 heterozygoten Weibchen und 12 FXR negativen Weibchen. Die Balken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. 31

Abbildung 10: Die dritte Generation (F3) zeigt, dass die FXR negativen Männchen signifikant erhöhte Apo(a) Plasmaspiegel besitzen. Unter den Weibchen besitzen FXR negative fast doppelt so hohe Apo(a) Plasmaspiegel wie FXR positive. Das Kollektiv besteht aus 16 Wildtyp-Männchen, 17 heterozygoten Männchen, 34 FXR negativen Männchen, 15 Wildtyp-Weibchen, 22 heterozygoten Weibchen und 45 FXR negativen Weibchen. Die Balken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)..... 31

Abbildung 11: Unter der Annahme, dass FXR ein dominantes Merkmal ist, ergibt sich diese Darstellung, bei der heterozygot und homozygot FXR positive Mäuse zusammengefasst sind (FXR pos.). Das Kollektiv besteht aus 33 FXR positiven und 34 FXR negativen Männchen und 37 FXR positiven und 45 FXR negativen Weibchen. Die Balken geben wieder den Standardfehler des Mittelwertes an. FXR positive Mäuse besitzen hochsignifikant niedrigere Plasma Apo(a) Werte als FXR negative Mäuse. (*** $p < 0,001$)..... 32

Abbildung 12: Die grauen Balken zeigen die Reduktion der Apo(a) Plasmaspiegel in % des Ausgangswertes nach 2 Tagen Gallensäurefütterung, die schwarzen Balken nach 4 Tagen. Es wurden jeweils 5 (mit und ohne FXR) Apo(a) transgene Mäuseweibchen mit einer 0,5 % cholsäurehaltigen Kost gefüttert. Die

Werte sind auf den Apo(a) Plasmaspiegel des jeweiligen Versuchstieres zu Versuchsbeginn bezogen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Plasmaspiegel zu Versuchende sind in der FXR positiven Gruppe deutlich niedriger als in der FXR negativen Gruppe. (***) $p < 0,001$)..... 33

Abbildung 13: Bei CAR handelt es sich wie der Name schon sagt, um einen konstitutiv, aktiven Rezeptor, das heißt: dieser Rezeptor benötigt keinen Liganden, um aktiv zu sein. Durch die Bindung der Liganden TCPOBOP oder Phenobarbital (und andere Barbiturate) kann er allerdings noch zusätzlich aktiviert werden. Die Bindung der Androgene Androstenol und Androstanol führt zu einer Hemmung des Rezeptors. 35

Abbildung 14: Fütterungsversuch 2003 mit Cholsäure. Die linke Graphik zeigt 4 transgene Mäuse, die 35 Tage lang mit 0,5 % Cholsäure gefüttert wurden. Die rechte Graphik zeigt den Verlauf von 4 transgenen Mäusen, die nur für 5 Tage 0,5 % Cholsäure in der Nahrung erhielten und dann auf normale Nahrung umgestellt wurden. Man erkennt die maximale Reduktion der Apo(a) Plasmaspiegel am 5. Tag. Allerdings ließ sich schon in den ersten beiden Tagen eine Abnahme auf unter 20 % des Ausgangswertes erreichen. 38