Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie Zentrum für Experimentelle Medizin Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Isolierung und Charakterisierung kleiner Apo Al-haltiger Partikel aus humanem Plasma

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sarah Vogel

aus Lengerich (Westf.)

Hamburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 23.10.2007 Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. C. Buhmann Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. M. Merkel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	
1. Einleitung	
	<u> </u>
1.1. Lipoproteinstoffwechsel	4
1.2. Lipoproteine als Transportpartikel für Vitamine und Fettsäuren	18
1.3. Aufbau und Funktion der Bluthirnschranke als Barriere für Lipoproteine	23
1.4. Stoffwechselvorgänge und Lipoproteinmetabolismus im ZNS	27
1.5. Ziel der Arbeit	31
2. Material und Methoden	
	<u> </u>
2.1. Gewinnung des Ausgangsmaterials: humanes Plasma	32
2.2. Isolierung der Lipoproteine aus humanem Plasma	33
2.2.1. Fast Performance Liquid Chromatographie	33
2.2.2. Affinitätschromatographie gegen Apolipoprotein Al	34
2.3. Biochemische Charakterisierung der Lipoproteinpartikel	35
2.3.1. Photometrischen Methode	35
Cholesterinbestimmung	35
Triglyzeridbestimmung	37
Bestimmung der freien Fettsäuren	38
Proteinmessung nach Bradford	39
2.3.2. Immunologische Methoden	40
SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	40
Das Gradientengel	42
Die Coomassiefärbng	43
Die Western Blot Analyse	43
Apo E Enzym Linked Immuno Sorbent Assay	46
2.3.3. Chromatographische Methoden	49
GC - Bestimmung der Gesamtfettsäuren	49

3. Ergebnisse

	- 53
3.1. Charakterisierung des eingesetzten Plasmas	54
3.2. Kalibrierung der FPLC-Säule mit Lipoproteinfraktionen	54
3.3. Auftrennung der Plasmapartikel mittels FPLC und Charakterisierung der	59
Fraktion	
3.4. Gewinnung kleiner Apo Al-haltiger Partikel mittels Affinitätschromatographie	63
3.5. Charakterisierung des Affinitätschromatographieeluates	65
3.5.1. Apolipoproteinanalyse des Eluates	65
3.5.2. Gaschromatographische Messung von Fettsäuren im Eluat	76
3.5.3. Messung von Vitamin A und E im Eluat	81

4. Diskussion

	- 84	
4.1. Charakterisierung des eingesetzten Plasmas		
4.1.1. Lipid- und Proteinkonzentration im Nüchternplasma		
4.1.2. Apo E-Typisierung	85	
4.2 Kalibrierung der FPLC-Säule mit Lipoproteinfraktionen		
4.3. Auftrennung der Plasmalipoproteine mittels FPLC und Charakterisierung	86	
der Fraktion		
4.4. Gewinnung kleiner Apo AI-haltiger Partikel mittels Affinitäts-	88	
chromatographie		
4.5. Charakterisierung des Affinitätschromatographieeluates	89	
4.5.1. Apolipoproteinanalyse des Eluates	90	
4.5.2. Gaschromatographische Messung von essentiellen Fettsäuren im Eluat	92	
Zusammenfassung	97	
Literaturverzeichnis		
Danksagung		
Lebenslauf	114	
Erklärung		

Abkürzungen

ABCAI	= ATP-binding-cassette-transporter AI
AK	= Antikörper
Аро	= Apolipoprotein
Apo E ELISA	A= Enzyme-linked Immunosorbent Assay
BHS	= Bluthirnschranke
bzw.	= beziehungsweise
С	= Celcius
CE	= Cholesterinester
CETP	= Cholesterinestertransferprotein
Chol	= Cholesterin
СМ	= Chylomikronen
CR	= Chylomikronenremnants
DaG-PO	= donkey anti goat Peroxidase
DaSh-PO	= donkey anti sheep Peroxidase
FABP	= fatty acid binding protein
FPLC	= Fast Performance Liquid Chromatographie
FS	= Fettsäure
GaM-PO	= goat anti mouse Peroxidase
GaR-PO	= goat anti rabbit Peroxidase
GC	= Gaschromatographie
HDL	= high density lipoprotein
HDLp	= HDL-precursor
HPLC	= High Performance Liquid Chromatographie
IDL	= intermediate density lipoprotein
kDa	= Kilodalton
Konz	= Konzentration
LCAT	= Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
LDL	= low density lipoprotein
LDL-R	= LDL-Rezeptor
LPL	= Lipoproteinlipase
LRP1	= LDL receptor-related protein 1
mA	= Milliampere

min	= Minute
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
mRNA	= messenger Ribonukleinsäure
μA	= Mikroampere
μl	= Mikroliter
nm	= Nanometer
PL	= Phospholipide
PPARα	= peroxisome proliferation-activated receptor $\boldsymbol{\alpha}$
RBP	= retinolbindendes Protein
Rpm	= rounds per minute
RT	= Raumtemperatur
SDS-PAGE	= sodium dodecyl sulfate-Polyacrylgelelektophorese
sec	= Sekunde
sek	= sekundär
SR-BI	= scavenger receptor class B, type I
TG	= Triglyzerid
u. a.	= unter anderem
vgl.	= vergleiche
VLDL	= very low density lipoprotein
z. B.	= zum Beispiel
ZNS	= Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Das Gehirn ist eines der stoffwechselaktivsten Organe des menschlichen Körpers. Es benötigt neben Energielieferanten Glukose und dem den Neurotransmittervorstufen Aminosäuren, noch zahlreiche andere Substanzen für die Aufrechterhaltung seiner Funktion. Dazu gehören Vitamine und essentielle Fettsäuren. Dabei handelt es sich um Stoffe, die über die Nahrung zugeführt werden müssen. Sie werden vom Darm resorbiert und in den Blutkreislauf abgegeben. Fettsäuren und andere lipophile Moleküle müssen für ihren Transport im hydrophilen Medium des Blutes an Transportvehikel gebunden sein. Diese Transportfunktion wird z. B. von Albumin, einem wasserlöslichen, globulären Plasmaprotein, oder von den Lipoproteinen übernommen. Sie binden die fettlöslichen Stoffe und bringen sie zu den entsprechenden Zielorganen. Um vom Blut in das Zentrale Nervensystem (ZNS) zu gelangen, müssten die Lipoproteine die Bluthirnschranke (BHS) überwinden. Nach derzeitigem Wissensstand ist diese jedoch für Albumin und Lipoproteine impermeabel.

In der vorliegenden Arbeit wird postuliert, dass die Vehikelfunktion für den Transport von lipophilen Vitaminen und essentiellen Fettsäuren über die BHS von kleinen Apo Al-haltigen Partikeln übernommen wird. Diese Partikel könnten den kleinen HDL (high density lipoprotein) im Plasma ähnlich sein und kein Apo E tragen. Die theoretischen Grundlagen für dieses Postulat werden in den folgenden Kapiteln der Einleitung dargelegt.

Es folgt zunächst die Beschreibung des Lipoproteinstoffwechsel im Blut. Dabei wird die Funktion der Apolipoproteine und ihrer Rezeptoren im Lipoproteinstoffwechsel erläutert. Von den lipophilen Vitaminen A und E, sowie von den essentiellen Fettsäuren werden Struktur und Funktion beschrieben. Anschließend wird der Aufbau und die Funktion der Bluthirnschranke sowie die Stoffwechselvorgängen im Liquor cerebrospinalis aufgezeigt.

1.1. Lipoproteinstoffwechsel

Rolle der Lipoproteine

Lipoproteine ermöglichen den Transport von Lipiden im hydrophilen Plasma. Sie bestehen aus Proteinen und Lipiden. Außer den freien Fettsäuren, welche auch mit Hilfe des Plasmaproteins Albumin transportiert werden können, sind andere Lipide für ihren Transport auf die Lipoproteine angewiesen. Zu den Lipiden gehören Triglyzeride (TG), Cholesterinester (CE), Phospholipide (PL) und lipophile Vitamine. Aufgebaut sind die Lipoproteine aus einem lipophilen Kern, welcher von einer amphiphilen Hülle umgeben ist. Der Kern besteht aus den unpolaren Lipiden TG und CE wohingegen die Hülle von Apolipoproteinen und amphipatischen Lipiden (PL und unverestertes Cholesterin) gebildet wird. Diese Hülle ermöglicht durch ihre hydrophile Oberfläche den Transport der hydrophoben Lipide im wässrigen Milieu des Plasmas. Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt nach ihrer Dichte. Diese ist abhängig vom Verhältnis zwischen Lipid- und Proteinanteil der Partikel. Je mehr Lipide ein Lipoprotein trägt, desto geringer ist seine Dichte.



Abb. 1 Aufbau eines Lipoproteins

Lipoproteine bestehen aus einem lipophilen Kern, welcher umgeben ist von einer amphiphilen Hülle. Der Kern besteht aus den unpolaren Lipiden TG und CE und die Hülle wird von Apolipoproteinen und amphipatischen Lipiden (PL und unverestertes Cholesterin) gebildet. Die Hülle stellt den Kontakt zwischen dem lipophilen Kern und dem hydrophilen Plasma dar. (Abb. adaptiert aus dem World-Wide-Web; Internetseite der Firma Peprotech; Rocky Hill, NJ, USA). Die Auftrennung der Lipoproteine geschieht mittels Dichtegradientenzentrifugation. Es werden vier Hauptklassen unterschieden:

- 1. Chylomikronen (CM),
- 2. very low density lipoprotein (VLDL),
- 3. low density lipoprotein (LDL) und
- 4. high density lipoprotein (HDL).

Diese Lipoproteinklassen sind außerdem charakterisiert durch verschiedene Apolipoproteinanteile.



Abb. 2 Charakterisierung der vier Hauptklassen der Lipoproteine Abb. aus Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag Die unterschiedliche elektrische Ladung der Lipoproteine ermöglicht eine weitere Klassifizierung. Nach ihrem Wanderungsverhalten im elektrischen Feld lassen sich die Plasmaproteine bei der Agarosegelelektrophorese der pre-ß-Globulinfraktion, der ß-Globulinfraktion und der α -Globulinfraktion zuordnen. So wandern die LDL bei ihrer elektrophoretischen Auftrennung in der "ß-Fraktion" und werden daher auch ß-Lipoproteine genannt. Die HDL wandern in der α -Fraktion und werden so als α -Lipoproteinen bezeichnet.

Da im Fokus dieser Arbeit die HDL stehen, wird hauptsächlich auf deren Stoffwechselweg eingegangen. Der Stoffwechsel der übrigen Lipoproteine wird im Folgenden nur kurz beschrieben.

Es wird der exogene von dem endogenen Stoffwechsel unterschieden. Der exogene Stoffwechsel beschreibt den Transport der Nahrungslipide in Chylomikronen. Diese werden in den Mucosazellen der Darmschleimhaut aus Nahrungslipiden aufgebaut und bestehen neben TG, PL und Cholesterin aus Apo B₄₈, Apo AI, Apo AII und Apo AIV. Sie übernehmen die Aufnahme und den Transport der aus der Nahrung stammenden Lipide. Von den Mucosazellen des Darms gelangen sie über die Lymphe und den Ductus thoracicus in die Blutbahn. Hier stehen sie im Stoffaustausch mit anderen Lipoproteinen. Insbesondere die Assoziation von Apo CII und Apo E an die CM ist bedeutend, da Apo CII als Aktivator der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL) fungiert. Die LPL hydrolysiert die TG der CM und vermittelt so die Abgabe von FS an das extrahepatische Gewebe, insbesondere an das Fettgewebe und die Muskeln. Dabei entstehen die Chylomikronenremnants (CR), welche reich an Cholesterinester und Apo E sind. LPL verbleibt in inaktiver Form am CR und vermittelt gemeinsam mit Apo E die rezeptorgebundene Aufnahme der CR über das LDL receptor-related protein 1 (LRP1) in die Leber, wo diese Restpartikel verstoffwechselt werden (Beisiegel 1996; Beisiegel 1995). Bei der LPL-vermittelten Hvdrolvse der lipidreichen Lipoproteine können diskoidale HDL-Vorläufer abdissoziieren (von Eckardstein et al. 2005). Diese HDL-precursor (HDLp) sind lipidarm und reich an Apo AI. Die HDLp treten in den Stoffwechsel der HDL ein, welcher zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben wird.

Der endogene Stoffwechsel beschreibt den Weg der von der Leber synthetisierten VLDL. Die VLDL werden aus TG, Cholesterin, CE, PL und den Apolipoproteinen Apo B₁₀₀, Apo C sowie Apo E gebildet. Abgebaut werden die VLDL wie die CM von der LPL. Beim Abbau entstehen über die Zwischenstufe der intermediate density

6

lipoproteins (IDL) die LDL. LDL sind sehr cholesterinreich und bringen Cholesterin von der Leber zu extrahepatischem Gewebe, wo es z. B. als Membranbaustein oder als Vorstufe für die Steroidhormon- oder Vitamin D-Synthese genutzt oder in Form von CE gespeichert werden kann. Die LDL enthalten als Apolipoprotein das Apo B₁₀₀, welches die Endozytose (= Aufnahme des gesamten Lipoproteins in die Zelle) über den LDL-Rezeptor (LDL-R) vermittelt. Der im extrahepatischen Gewebe exprimierte LDL-R spielt daher eine wichtige Rolle im Cholesterinstoffwechsel. Neben der Aufnahme der LDL über den LDL-R gibt es noch einen weiteren Abbauweg. Oxidativ veränderte LDL können über den scavenger receptor class B, type I (SR-BI) aufgenommen und so entsorgt werden.



HDL – Aufbau und Stoffwechsel

Abb. 3 Stoffwechsel der HDL

Die Abbildung zeigt die Entstehungsmechanismen von HDL und deren Stoffwechselweg. Weitere Erläuterungen zur Abbildung finden sich im Text

Reife HDL-Partikel bestehen aus einer amphiphilen Hülle und einem lipophilen Kern. Die Hülle besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, unverestertem Cholesterin und Apo AI. Der lipophile Kern besteht primär aus CE. Neben der Einteilung der HDL nach ihrer Dichte in HDL₂ und HDL₃ ergibt sich eine weitere Subklassfizierung nach ihrem Apolipoproteingehalt. Den größten Anteil haben die HDL, die hauptsächlich Apo Al enthalten. Daneben gibt es HDL, die neben Apo Al auch die Apolipoproteine E und All enthalten. Mit einem sehr geringen Anteil existieren auch HDL, die ausschließlich Apo All aufweisen (Fruchart and Ailhaud 1992). Die reifen HDL-Partikel entstehen auf verschiedenen Wegen. HDLp werden zum einen von Hepatozyten gebildet. Zum anderen entstehen HDLp bei der LPL-vermittelten Hydrolyse von triglyzeridreichen Lipoproteinen (CM und VLDL). Die CM entstehen aus exogenen Lipiden postprandial im Darm. Die VLDL werden im nüchternen Zustand aus endogenen Lipiden in der Leber gebildet. Bei der Hydrolyse von CM und VLDL dissoziieren Oberflächenbestandteile ab und bilden HDLp. Die HDLp sind reich an Apo AI. Das Apo AI der HDLp bindet zunächst an das Lipidtransportprotein ATP binding cassette AI (ABCAI) in der Zellmembran von peripheren Zellen. Dieses Transmembranprotein vermittelt den bidirektionalen Transfer von Phospholipiden (PL) und unverestertem Cholesterin auf die Apo Al-haltigen Partikel. Ein Teil des unveresterten Cholesterins wird mittels der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) verestert (Ishida et al. 1990) und wandert in den Kern der entstehenden HDL. So wird gewährleistet, dass der Konzentrationsgradient des Cholesterins zwischen Zelle und aufnehmendem Apo Al-haltigem Partikel stets aufrechterhalten wird. Es entstehen HDL₃. Eine weitere Anreicherung mit Cholesterinestern erfolgt über das Cholesterinestertransferprotein (CETP), welches CE, die bei der Hydrolyse der triglyzeridreichen Lipoproteine entstehen, auf die reifenden HDL transferiert. Durch die weitere ABCAI-vermittelte Aufnahme von Cholesterin und PL aus peripheren Zellen, reift die HDL₃ zu HDL₂. Die reifenden HDL nehmen außerdem im Rahmen des Apo E-Recyclings Apo E auf. Das Apo E-Recycling findet in peripheren Zellen und in Leberzellen statt. Dabei werden HDL als Holopartikel internalisiert und in frühen endosomalen Kompartimenten mit recyceltem Apo E versehen wieder aus der Zelle ausgeschleust. Das Apo E gelangt bei der Apo E-vermittelten Aufnahme von CR in die Zelle und wird im Rahmen dieses Vorgangs recycelt. Das so recycelte Apo E kann außerhalb der Zelle von den HDL wieder an die CR abgegeben werden. Die CR können anschließend Apo E-vermittelt über LRP1 in die Leber aufgenommen werden (Heeren and Beisiegel 2001;Heeren et al. 2006).

Die reifen HDL₂ können über SR-BI an die Leber gebunden werden. Hier erfolgt eine selektive Lipidaufnahme. Da auf diesem Weg Cholesterin von den peripheren Zellen zurück zur Leber gebracht wird, spricht man auch vom reversen Cholesterintransport. Parallel dazu kann die HDL₂ vermutlich auch als Holopartikel über einen noch nicht abschließend definierten Rezeptor in die Leber aufgenommen werden. Es wurde postuliert, dass es sich bei diesem Rezeptor um LRP1 handeln könnte (Heeren et al. 2006). In der Leber kann Apo E vom Partikel ab dissoziieren und auch hier dem Apo E-Recycling zugeführt werden.

Das aus den peripheren Zellen stammende Cholesterin der HDL wird über die Gallensäurebildung in der Leber und die Exkretion der Galle ausgeschieden. Eine wichtige Aufgabe der HDL ist somit die Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase der Zelle.

Apolipoproteine

Jede Lipoproteinklasse verfügt über einen charakteristischen Besatz von Apolipoproteinen. Neben ihrer Funktion als Strukturprotein vermitteln sie Wechselwirkungen mit anderen Lipoproteinen oder Zellen und dienen als Cofaktoren für Stoffwechselenzyme oder als Liganden für Rezeptoren. Sie tragen somit entscheidend zum Metabolismus der Lipoproteine bei.

Zunächst werden die Apolipoproteine Apo AI, AII und E ausführlicher beschrieben, die zusätzlich untersuchten Apolipoproteine (Apo AIV, AV, C, D, H und J) werden anschließend kurz erläutert.

Apo Al

Das reife Apo Al Molekül besteht aus 243 Aminosäuren (Primärstruktur) und ist 28,4 kDa groß. Es unterliegt posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Acylierung), deren Bedeutungen jedoch noch unklar sind. Der Serumspiegel von Apo Al beträgt bei Männern 90 bis 180 mg/dl und bei Frauen

100 bis 210 mg/dl. Apo AI können folgende wesentliche Eigenschaften zugeordnet werden:

- es ist das quantitativ häufigste Apolipoprotein im Plasma
- für die HDL dient es als Strukturprotein
- es fungiert als Aktivator für Enzyme und als Ligand einiger Rezeptoren
- es wird hauptsächlich im Darm und in der Leber gebildet.

Apo AI wird zum einen in der Leber gebildet und dort meist an diskoidale HDL (englisch: "nascent" HDL) assoziiert in die Blutbahn ausgeschüttet. Diese Apo AIhaltige Komplexe können ein, zwei oder auch mehrere Apo AI Moleküle enthalten (Jonas et al. 1989). Apo AI kann aber auch wenig lipidiert oder als Homodimer/Homooligomer vorliegen. Des weiteren wird Apo AI auch im Dünndarm gebildet und an die dort synthetisierten Chylomikronen gebunden.

Eine wichtige physiologische Rolle spielt das Apo AI als Aktivator für das Enzym LCAT, welches bei der Entstehung von HDL₃ aus diskoidalen HDL (HDLp) aktiv wird. Als Hauptapolipoprotein der HDL bindet es an spezifische Oberflächenrezeptoren der peripheren Zellen und mobilisiert intrazelluläres Cholesterin, welches dann von den peripheren Zellen auf die HDLp übertragen wird (Sparks et al. 1995). Auf diesem Weg trägt das Apo AI zum Rücktransport von überschüssigem Cholesterin aus der Peripherie zurück zur Leber bei.

Außer in Darm und Leber, kann Apo Al darüber hinaus auch in den Endothelzellen der Kapillaren des ZNS gebildet werden. So konnte Β. Z. in Gehirngefäßendothelzellen die messenger Ribonukleinsäure (mRNA) von Apo Al nachgewiesen werden. In einem in vitro Modell von Endothelzellen der BHS konnte zudem auch die Expression des Proteins und seine Sekretion in den Zellüberstand gezeigt werden (Mockel et al. 1994). Im Gegensatz zum Kapillarendothel im ZNS erzeugt das Endothel der Aorta oder anderer peripherer Gefäße kein Apo Al. Auch nur die zerebralen Endothelien reagieren bei der Ausschüttung von stimulierenden Botenstoffen, wie z. B. Insulin, mit einer vermehrten Apo Al Bildung (Mockel et al. 1994). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dem Apo AI eine wichtige Funktion beim Lipidmetabolismus im ZNS zukommt. Bezüglich der Faktoren, welche die Apo Al Bildung stimulieren, ist zu diskutieren, ob diese eventuell eine therapeutische Relevanz besitzen. Vorstellbar wäre, dass sie zur vermehrten Bildung von Apo Al beitragen könnten und potentiell den Cholesterinefflux aus den peripheren Zellen verstärken, was wiederum Konsequenzen für die Cholesterinhomöostase, haben

10

könnte. So ist z. B. dokumentiert, dass in peripheren Gefäßen ein Mangel an Apo Al und daraus resultierend ein Mangel an funktionstüchtigem HDL zu vermehrter Arteriosklerose und den hierdurch verursachten Krankheiten (koronare Herzerkrankung, Schlaganfall) führen kann (Stein and Stein 1999), (Enger et al. 1979).

Weitere medizinisch interessante Aspekte des Apo AI sind, dass es z. B. Prostazyklin, ein Prostaglandin, das die Thrombozytenaggregation hemmt, stabilisiert. Zusätzlich kann Apo Al, gemeinsam mit Apo J, Faktoren des Komplementsystems inhibieren (Yui et al. 1988). Somit hat Apo AI auch einen indirekten Einfluss auf die Blutgerinnung. Ein weiterer Aspekt ist, dass Apo Al pathologische Zellfunktionen, welche durch Virusinduktion entstehen, hemmen kann. Diese Eigenschaft ist aktuell Bestandteil intensiver Forschung (Owens et al. 1990; Srinivas et al. 1991). Ferner wurde im Rahmen der Apo Al Forschung die erste Mutation in der Primärstruktur eines Plasmaproteins entdeckt; es lag hier ein Aminosäureaustausch der Aminosäure Arginin gegen Cystin an Position 173 vor (Franceschini et al. 1980). Das verantwortliche mutierte Gen wurde Milano-Gen genannt (Weisgraber et al. 1980), da diese Mutation bei einer italienischen Familie aus Milano zum ersten Mal festgestellt worden war. Die Mitglieder dieser Familie durch erniedrigte HDL-Spiegel und Hypertriglizeridämie aufgefallen. waren Erstaunlicherweise wiesen sie jedoch keine konsekutiven Anzeichen einer arteriosklerotischen Erkrankung auf. Manche Autoren sehen in dieser Mutation nicht nur einen Schutz sondern eine neue Behandlungsmöglichkeit bei Arteriosklerose. Denn das Milano-Apo AI verweilt länger im Plasma und ist somit effektiver am Rücktransport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber beteiligt (Chiesa and Sirtori 2003). Durch diese Mutation wurde die wichtige Funktion von Apo AI im Lipidstoffwechsel deutlich.

Apo All

Der Serumspiegel des Apolipoprotein All beträgt im Durchschnitt 20 bis 50 mg/dl. Es ist nach Apo AI das zweithäufigste Protein der HDL. Apo All gehört mit Apo AI zu einer multigenen Superfamilie, welche die Gene von verschiedenen Apolipoproteinen codiert, dazu gehören zusätzlich Apo C und Apo E (Lauer et al. 1988). Apo All wird hauptsächlich in der Leber erzeugt, kleine Mengen werden auch im Darm gebildet.

Das Molekulargewicht von monomerem Apo AII beträgt 8,7 kDa. Im Plasma liegt es vorwiegend als über Cystin-Cystin-Disulfidbrücken gekoppeltes Homodimer vor und hat dann eine Größe von ca. 17 kDa. Im Western Blot ist Apo AII darum häufig als Doppelbande an den entsprechenden molekularen Größen (8 und 17 kDa) sichtbar. Des weiteren ist Apo AII dafür bekannt, dass es häufig Heterodimere mit anderen Apolipoproteinen bildet. So kommen zum Beispiel Heteromerisierungen mit Apo E und Apo D vor. Eine nennenswerte Auswirkung auf den Lipidstoffwechsel sollen diese Dimerisierungen nicht haben (Lund-Katz et al. 1996). Außerdem kommt Apo AII im Plasma in unterschiedlichen Glycosylierungsformen vor.

HDL-Partikel können als Hauptapolipoprotein Apo Al und/oder Apo All tragen. Es wurde bereits beschrieben, dass Apo Al-haltige HDL das Arterioskleroserisiko senken können. Hingegen wurde auch festgestellt, dass Lipoproteine, die sowohl Apo AI als auch Apo AII tragen, keinen positiven Einfluss auf den Cholesterinefflux haben. Man vermutet sogar, dass Apo All proarteriogen wirkt, da Apo All bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung in höheren Konzentrationen gefunden wurde (Fruchart and Ailhaud 1992). Es wurde daher postuliert, dass das Vorhandensein von Apo All die HDL von antiinflammatorischen in proinflammatorische Partikel verwandeln kann (Castellani et al. 1997). Des weiteren wurde die Bindungskapazität von Apo All an SR-BI untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Apo All zwar effektiver als Apo Al gebunden wird. Jedoch hat Apo All einen antagonistischen Effekt auf die Apo Al vermittelte Cholesterinesteraufnahme (Pilon et al. 2000). Das bedeutet, dass Apo Al über SR-BI einen Cholesterinefflux bewirken kann, Apo All hingegen nicht. Neben dem gemeinsamen Auftreten von Apo Al und Apo All als Strukturprotein der HDL, gibt es auch die reine Heterodimerisierung. Das gesamte Funktionsspektrum des Apo AII ist noch nicht vollständig geklärt.

Apo E

Das Apolipoprotein Apo E wird prädominant in Leber, Gehirn und Makrophagen exprimiert (Elshourbagy et al. 1985;Xu et al. 2006). Das Apolipoprotein E-Gen stammt, wie oben bereits erwähnt, von dem selben Vorläufergen ab, wie die Gene der Apolipoproteine AI, AII, AIV und C (Lauer et al. 1988). Apo E kommt in drei Hauptisoformen vor; diese sind Apo E2, Apo E3 und Apo E4. Diese Isoformen gehen

auf die Allelvarianten ε2, ε3 und ε4 zurück. Die Isoform E3 ist am häufigsten in der mitteleuropäischen Bevölkerung vertreten (Zannis et al. 1982;Chmurzynska 2006).

Apo E ist Apolipoproteinbestandteil der VLDL, HDL und CR und vermittelt die Aufnahme von IDL und Chylomikronenremnants in die Leber. Apo E ist Ligand aller Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie. Neben seiner Funktion im Plasmalipidstoffwechsel spielt Apo E auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Lipidhomöostase im ZNS. Hier wird Apo E überwiegend von Gliazellen synthetisiert und ist neben Apo AI, das am häufigsten vorkommende Apolipoprotein. Die Konzentration im Liquor beträgt jedoch nur 1/20 der Plasmakonzentration (Roheim et al. 1979b). Apo E hat im ZNS wichtige Aufgaben im Lipidtransport (Transfer zwischen Gliazellen und Neuronen, Cholesterinhomöostase) und bei der Regeneration und Erhaltung der Funktion der Nervenzellen. So wurde nachgewiesen, dass sich Apo E in verletzten peripheren und zentralen Nervengeweben anreichert, was auf die regenerative Funktion hinweist.

Es ist anzumerken, dass Apo E nicht bluthirnschrankengängig ist (Roheim et al. 1979c;Linton et al. 1991). Der Hauptsyntheseort des Apo E ist die Leber. Wird nun die Leber entfernt und im Rahmen einer Organtransplantation ersetzt, so findet man anschließend im Blut des Empfängers den Apo E Phänotyp der Spenders. Untersucht man später den Apo E Gehalt des Liquors, persistiert hier auch Monate nach dem Eingriff noch der ursprüngliche Apo E Phänotyp des Spenders. Dies beweist, dass das von der Leber gebildete Apo E die BHS nicht überwinden kann.

Diese mangelnde Bluthirnschrankengängigkeit des Apo E ist für die vorliegende Arbeit insofern von Bedeutung, als dass es kein Bestandteil der postulierten und zu untersuchenden bluthirnschrankengängigen Transportvehikel sein kann.

Apo AIV

Das Apolipoprotein AIV wird hauptsächlich im Dünndarm synthetisiert und dort als Komponente der Chylomikronen sezerniert. Geringe Mengen Apo AIV werden auch in der Leber exprimiert und von dort als Baustein der VLDL in die Blutbahn abgegeben. In HDL-Subfraktionen ist Apo AIV assoziiert mit Apo AI und Apo AII, bindet an die gleichen Zelloberflächenerkennungsmerkmale (Savion and Gamliel 1988) und fördert so den Cholesterinefflux. Auf diese Weise spielt es eine Rolle bei der Cholesterinentfernung aus peripheren Zellen (Steinmetz et al. 1990). Ein großer Teil des Apo AIV liegt allerdings frei, d. h. nicht lipoproteinassoziiert, im Plasma vor. Apo AIV hat ein Molekulargewicht von 46 kDa.

Apo AV

Die Gene für Apo AV liegen auf demselben Gencluster wie die von Apo AI, Apo CIII und Apo AIV, und zwar auf dem langen Arm von Chromosom 23. Es wurde nachgewiesen, dass Apo AV die Plasmatriglyzeridkonzentration verringert, da es bei einem Defekt dieses Apolipoproteins zu einer Konzentrationserhöhung der Triglyzeride kommt (Pennacchio et al. 2001). Apo AV aktiviert proteoglykanständige LPL und erhöht so die Hydrolyse von triglyzeridreichen Lipoproteinen (Merkel et al.; 2005). Die Plasmakonzentration von Apo AV ist sehr gering. Es hat ein Molekulargewicht von 39 kDa.

Apo C

Es gibt drei Subtypen des Apo Cs: Apo CI, Apo CII und Apo CIII. Apo C wird hauptsachlich in der Leber mit einer Größe von ca. 6 bis 8 kDa gebildet. Apo C ist Apolipoproteinbestandteil von Chylomikronen, VLDL und HDL.

Apo CII aktiviert die LPL. Es trägt entscheidend zur Clearance der Chylomikronen und der VLDL bei. Bei einem Defekt des Apo CII kommt es dabei zu einer Akkumulation von Chylomikronen im Blut und zu einer Hypertriglyzeridämie. Apo CI kann die Aktivität der LCAT steigern. Apo CIII interagiert ebenfalls mit LPL und inhibiert den Abbau von triglyzeridreichen Lipoproteinen. Die Apo C-Subtypen haben somit einen Einfluss auf den Stoffwechsel der Lipoproteine (Jong et al. 1999).

Apo D

Apo D wird neben der Leber auch in vielen anderen Organen synthetisiert, u. a. im Nervengewebe. Im ZNS wird Apo D von den Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert. Es hat eine Molekulargewicht von 33 kDa. Apo D ist beteiligt am Cholesterinrücktransport von der Peripherie zur Leber. Es interagiert mit der LCAT und mit dem Komplementsystem. Interessant ist die Anreicherung des Apo D in verletzten Nerven (Boyles et al. 1990). Es wird angenommen, dass Apo D am Heilungsprozess der Nerven beteiligt ist. Neben Apo D finden sich auch die Apolipoproteine AI, AIV und E in sich regenerierenden peripheren Nerven.

Аро Н

Das 54 kDa große Apo H befindet sich ebenfalls auf Chylomikronen; es hat eine Plasmakonzentration von 15 bis 30 mg/dl und soll die Aktivität von Thrombozyten beeinflussen (Steinkasserer et al. 1992).

Apo J

In der Literatur wird anstelle von Apo J auch häufig der Begriff Clusterin verwendet. Apo J ist ca. 70 kDa groß, bestehend aus zwei über Disulfidbrücken verbundene Untereinheiten und hat im Plasma eine Konzentration von 7 bis 20 mg/dl. Eine Bindung von Apo J an Apo Al wurde beschrieben. Sie formen lipidhaltige Komplexe, die den HDL ähneln. In dieser Kombination beeinflusst Apo J die Lipidverteilung und hat eventuell auch Einfluss auf den Cholesterinrücktransport von der Peripherie zur Leber (de Silva et al. 1990;Jenne et al. 1991).

Rezeptoren des HDL-Stoffwechsels

Es werden zwei Rezeptoren des HDL-Stoffwechsels beschrieben: der scavenger receptor class B, type I (SR-BI) und der ATP-binding-cassette-transporter AI (ABCAI). Da diese Rezeptoren Apo AI binden können, werden sie hier detailiert vorgestellt.

Scavenger Rezeptor Class B, Type I

Für die vorliegende Arbeit ist die Betrachtung des SR-BI als möglicher Rezeptor für die kleinen Apo AI-haltigen Partikeln wichtig. Es wird postuliert, dass er den Transfer der Partikel bzw. des Lipidanteils der Partikel über die BHS vermitteln kann.

Der auch als "docking-receptor" bezeichnete SR-BI ist 82 kDa groß und wurde 1996 als erster HDL-bindender Rezeptor beschrieben (Acton et al. 1996). SR-BI findet sich

überwiegend auf Leberzellen, wird aber auch in Endothelzellen der BHS exprimiert. Es folgt die Betrachtung der Funktion von SR-BI im Hinblick auf den Plasmalipoproteinmetabolismus. Anschließend wird seine Transferfunktion über die BHS diskutiert.

Nach Bindung von HDL via Apo AI vermittelt SR-BI einen selektiven Cholesterinestertransport von den HDL in die Leberzelle (Brundert et al. 2005). Des weiteren wurde festgestellt, dass Lipoproteine, welche nur Apo AI tragen, einen effektiveren Transfer ermöglichen, verglichen mit den Lipoproteinen die sowohl Apo AI als auch Apo AII tragen (Rinninger et al. 2003). Die Lipide der HDL, vornehmlich Cholesterinester, wurden über den selektiven Lipidtransfer aufgenommen. Dabei werden die Apolipoproteine (Apo AI und AII) der HDL nicht in die Zelle endozytiert und degradiert. Folglich ist der Umsatz an Lipiden viel höher als der Apolipoproteinumsatz.

Eine hepatische Überexpression von SR-BI in Mäusen resultierte in einer Abnahme des HDL-Cholesterins im Plasma und in einer Zunahme der Cholesterinsekretion über die Gallenflüssigkeit. Dies bestätigte die Annahme, dass SR-BI eine wichtige Rolle im Rücktransport des Cholesterins von der Peripherie zu Leber und in der Ausscheidung über die Galle spielt und als Rezeptor für die HDL fungiert (Kozarsky et al. 1997).

Auf der Zelloberfläche kolokalisiert SR-BI mit Caveolin 1 (Babitt et al. 1997). Caveolin 1 ist Bestandteil der Caveolae. Caveolae ein sind spezialisierte Zelloberflächendomänen an welchen spezielle Aufnahmemechanismen stattfinden. Die Kolokalisation von SR-BI und Caveolin 1 verstärkt die Annahme, dass SR-BI als Transportprotein, möglicherweise auch für die kleinen Apo Al-haltigen Partikel, fungiert. Eine weitere Funktion hinsichtlich des Plasmalipoproteinmetabolismus von SR-BI ist, dass er modifizierte, oxidierte oder acetylierte LDL binden und aus dem Plasmametabolismus eliminieren kann (Krieger et al 1997), worauf sich der Name "scavenger-receptor" begründet. Die Eliminierung erfolgt mittels Endozytose des gesamten LDL-Partikels (Brown and Goldstein 1986),

Um die Funktion von SR-BI in der BHS zu untersuchen, wurde in einem invitro-Modell der BHS aus Kapillarendothelzellen des Schweinehirns SR-BI überexprimiert. In Relation zum Grad der Überexpression von SR-BI war auch der Cholesterintransfer zwischen Endothelzelle und HDL steigerbar (Panzenboeck et al. 2002), was die Bedeutung von SR-BI im Lipidtransfer potentiell auch über die BHS deutlich macht. Neben dem Cholesterintransport wurde auch die Aufnahme von HDL₃-assoziiertem Vitamin E (alpha-Tocopherol) in die eingesetzten Endothelzellen untersucht. Diese SR-BI vermittelte Aufnahme von Vitamin E und Cholesterinester erfolgte über einen selektiven Lipidtransfer. D. h. es wurde nicht das gesamte Lipoprotein aufgenommen, sondern nur die genannten Stoffe über die Zellen der BHS befördert. So spielt der SR-BI potentiell eine wichtige Rolle in der Versorgung des ZNS mit diesen essentiellen Substanzen (Goti et al. 2001).

ATP-binding cassette transporter AI

ABCAI wurde bei der Erforschung der Tangierkrankheit entdeckt. Die Tangierkrankheit ist durch niedrige HDL-Spiegel im Plasma sowie einer Akkumulation von Cholesterinester in Makrophagen charakterisiert und korreliert mit einer erhöhten Inzidenz der koronaren Herzkrankheit. Bei Tangier-Patienten ist das ABCAI-Gen mutiert (Bodzioch et al. 1999).

ABCAI ist 240 kDa groß und gehört zur Familie der Transmembranproteine. Er vermittelt den Transfer von Cholesterin und Phospholipiden auf lipidarme Apo Alhaltige Partikel. Dabei ist die ABCAI-vermittelte Abgabe von PL und Cholesterin direkt an freies Apo AI effektiver als die Abgabe an HDL. Das führte zu der Annahme, dass Apo AI direkt mit ABCAI interagiert und umgekehrt ABCAI präferentiell freies Apo AI bindet (Wang et al. 2000).

Aus den phospholipid- und cholesterintragenden Apo Al-haltigen Partikeln werden, wie im HDL-Metabolismus bereits beschrieben, unter Vermittlung der LCAT und unter Aufnahme weiterer Cholesterinmoleküle über ABCAI reife HDL (Brewer, Jr. and Santamarina-Fojo 2003). Sie vermitteln den Transport von überschüssigem zellulären Cholesterin zur Leber. Die Expression ABCAI erfolgt von cholesterinreguliert. Bei Cholesteringehalt steigendem werden mehr Transportproteine gebildet, um die Zelle vor einem Cholesterinüberschuss zu schützen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die HDL-Plasmakonzentration und das Vorhandensein von ABCAI positiv korreliert, d. h. die HDL-Konzentration sinkt bei einer Reduktion von hepatischen ABCAI. Von Interesse für die hier bearbeitete Arbeitshypothese ist, dass ABCAI auch auf Endothelzellen der Hirnkapillaren zu finden ist (Panzenboeck et al. 2002), und folglich potentiell als Transporter für die kleinen Apo Al-haltigen Partikel zu diskutieren ist.

1.2. Lipoproteine als Transportpartikel für Vitamine und Fettsäuren

Substanzen wie lipophile Vitamine und Fettsäuren benötigen für die Resorption aus dem Darm und für den Transport innerhalb des Blutes die Möglichkeit sich an lipophile Stoffe zu assoziieren. Darüber hinaus stellt die BHS eine Barriere für diese Substanzen dar. Auf welche Weise sie die BHS überwinden, ist noch nicht vollständig beschrieben worden. Dass die Substanzen für den Metabolismus des ZNS unabdingbar sind, erklärt sich aus ihren Aufgaben; so besitzen Vitamin A und E z. B. wesentliche Funktionen bei der Regeneration von Nervenzellen und die essentiellen FS sind wichtige Bestandteile der Membranen.

Vitamin A



Abb. 5 Strukturformel des ß-Carotins

Das Vitamin A wurde 1913 entdeckt und seine positive Wirkung auf diverse Augenerkrankungen beschrieben. Später wurden verschiedene Vitamin A bindende Proteine, sowohl im Blut, als intrazellulär, speziell innerhalb des Zellkernes, gefunden. Zu den verschiedenen physiologischen Wirkungen des Vitamin A gehören seine Rolle im Sehzyklus und seine Funktion für Zellproliferation und – differenzierung, insbesondere während der Embryogenese.

Nach der internationalen chemischen Nomenklatur werden Vitamin A und seine Derivate zusammengefasst als Retinoide bezeichnet. Unter dem Begriff "Vitamin A" versteht man alle Verbindungen, die die Wirkungen des Vitamins beinhalten (Retinol und Retinylester). Aufgenommen wird Vitamin A entweder in Form des Provitamins

Das ß-Carotin ist das Provitamin des Vitamin A. Es wird im Darm an der zentralen Doppelbindung gespalten, wodurch zwei Moleküle Retinal entstehen, die über Retinol oder Retinsäure weiter verstoffwechselt werden (hier nicht dargestellt).

(Betakarotin) aus Pflanzen, oder in Form von Fettsäureestern aus tierischen Produkten. Nach der Resorption im Darm werden die unterschiedlichen Metabolite des lipophilen Vitamin A in Chylomikronen inkorporiert und gelangen über die Lymphbahn ins Blut. Die Vitamin-A-Metabolite werden von peripheren Zellen aufgenommen oder gelangen mit den Chylomikronenremnants in die Leber. Die Leber ist das Speicherorgan für Vitamin A, ihre Speicherkapazität ist fast unbegrenzt. Um Vitamin A aus der Leber auszuschleusen, wird es zunächst auf das retinolbindende Protein (RBP), ein 21 kDa großes Transportprotein, übertragen. Dieses bindet dann zusätzlich an Transthyretin, welches den Vitamin-Protein-Komplex vor der Ausscheidung über die Niere schützt. Es sei hier nochmals betont, dass es für den Transport von Vitamin-A-Metaboliten im Blut zwei Formen gibt. Zum einen dienen die Chylomikronen als Vehikel für den Transport von Vitamin A vom Darm zur Peripherie, sowie zur Leber. Zum anderen vermittelt das RBP, gemeinsam mit Transthyretin, den Transport des fettlöslichen Vitamin A im Blut.

Um in die Proliferations- und Differenzierungsprozesse der Zelle eingreifen zu können, binden die Vitamin-A-Metabolite an Rezeptoren innerhalb des Zellkernes. Hier beeinflussen sie die Expression von Faktoren, die für die Entwicklung der Zellen und des Gewebes zuständig sind, wie zum Beispiel Wachstumshormonrezeptoren, Protoonkogene, Zytokine oder Interleukine. So sind neben den eben beschriebenen Bindungsrezeptoren für den Transport im Blut auch die Kernrezeptoren innerhalb der Zelle von Bedeutung für den Wirkungskreislauf des Vitamin A.

Ein Vitaminmangel kann Xerophthalmie (Trockenheit des äußeren Auges), die in Mangelsituationen bis zur Erblindung führen kann, ausgeprägten sowie Erkrankungen der Atemwege verursachen. Der Mangel an Vitamin A kann zum einen durch eine zu geringe Zufuhr über die Nahrung entstehen, zum anderen aber auch aus einem bestehenden Eiweißmangel resultieren, da bei einem Mangel an Proteinen auch das für den Transport von Vitamin A benötigte RBP nicht in ausreichendem Maße gebildet wird und so Vitamin A nicht zum Wirkungsort gelangen kann. RBP konnte auch intrazellulär, in menschlichem, neuronalen Gewebe nachgewiesen werden. Insbesondere konnte es in solchen Zellen isoliert werden, die für die Bildung der Bluthirnschranke zuständig sind: in den Endothelzellen der Gehirnkapillaren und in den cuboidalen Epithelzellen des Plexus choroideus. Diese Analysen lassen eine Transfer von Vitamin A, gebunden an das RBP, über die BHS vermuten (MacDonald et al. 1990).

19

Vitamin E



Abb. 6 Strukturformel des α -Tocopherols. Das dargestellte α -Tocopherol ist die wichtigste natürliche Verbindung mit Vitamin-E-Aktivität.

Der für Vitamin E gebräuchlichste chemische Name ist α -Tocopherol. Per definitionem ist Vitamin E die Sammelbezeichnung für alle natürlichen und synthetischen Derivate, die die biologische Aktivität von α -Tocopherol zeigen.

Das fettlösliche Vitamin E wird aus der Nahrung aufgenommenen und über die Darmschleimhaut resorbiert. Besonders reich an Vitamin E sind pflanzliche Öle. Das resorbierte Vitamin E wird wie das Vitamin A in Chylomikronen inkorporiert und über das Lymphsystem abtransportiert; es gelangt so ins Blut. Im Blut besteht ein Vitamin E Austausch zwischen den Lipoproteinfraktionen (VLDL, LDL, HDL) und den Blutzellen, der von dem α -Tocopherol-Transferprotein (α -TTP) kontrolliert wird (Arita et al. 1995). Dabei befinden sich 45 bis 65 % des Tocopherols in den Lipoproteinen und 35 bis 55 % in den Erythrozyten. In die Zelle gelangt das Vitamin E gemeinsam mit freien Fettsäuren und Glyzeriden, es ist dabei eng an den Katabolismus der Lipoproteine gebunden.

Tocopherol ist in allen Geweben zu finden, die höchsten Konzentrationen sind in Nebennierenrinde und Fettgewebe messbar, aber auch im Gehirngewebe ist Vitamin E nachweisbar.

Vitamin E ist ein Antioxidans, welches Lipide vor der oxidativen Schädigung durch Sauerstoffradikale schützt. Derzeit werden viele Krankheiten, wie Arteriosklerose, Krebs und Alterung mit oxidativem Stress, freien Radikalen und Lipidoxidation in

gebracht. In tierischen Zellen ist Tocopherol Bestandteil aller Verbindung biologischen Membranen. Seine Funktion besteht hier darin, die Membranlipide, Lipoproteine und Depotfette vor dem Abbau durch die Lipidperoxidation zu schützen. Hypovitaminosen können zum Beispiel bei Störungen der Galleund Pankreassekretion, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und auch bei einem Mangel an α-TTP vorkommen. Symptome einer Hypovitaminose können sich u. a. als hämolytische Anämie mit verringerter Lebenszeit der Erythrozyten äußern oder können als neurologische Störungen in Erscheinung treten. Besonders bei Kindern kann ein persistierender Mangel von Vitamin E zu progressiven, neurologischen Schäden führen. Tocopherol ist somit von äußerster Wichtigkeit für eine angemessene, neurologische Funktion im ZNS. Es wurde gezeigt, dass der Transport von Tocopherol über Zellen, die die Bluthirnschranke im Modell darstellen, LPL abhängig ist (Goti et al. 2002). Unter der Vermittlung von LPL wird LDLgebundenes Tocopherol effektiver in die Zellen der BHS aufgenommen. In Abwesenheit von LPL sinkt die Aufnahme von Tocopherol dagegen ab. Hinzu kommt, dass SR-BI die Aufnahme von HDL-assoziiertem Tocopherol in die als Modellsystem der BHS genutzten Zellen unterstützt und somit eine entscheidende Rolle für die Versorgung des ZNS mit dem unverzichtbaren Vitamin spielt (Goti et al. 2001).

Essentielle Fettsäuren

Fettsäuren bestehen aus einer langen Kohlenwasserstoffkette und einer endständigen Carboxylgruppe. Sie variieren in bezug auf ihre Kettenlänge und die Anzahl der darin vorhandenen Doppelbindungen, ihrem Sättigungsgrad. Am häufigsten kommen Fettsäuren mit 16 oder 18 C-Atomen vor. Sie können in gesättigter, einfach ungesättigter oder mehrfach ungesättigter Form vorliegen. Sowohl die Länge als auch der Sättigungsgrad beeinflussen ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften.

Unter essentiellen Fettsäuren versteht man solche Fettsäuren, die vom Körper nicht selbst hergestellt werden können und daher zur Aufrechterhaltung seiner Funktion über die Nahrung zugeführt werden müssen. Es handelt sich dabei um Fettsäuren, die nach dem neunten C-Atom eine Doppelbindung tragen. Säugern fehlt das Enzym, welches diese Doppelbindung einführt.

Fettsäuren sind Bausteine von Phospholipiden und Glykolipiden, welche als amphiphatische Moleküle wichtige Strukturelemente biologischer Membranen darstellen. Die Zusammensetzung der gebundenen Fettsäuren beeinflusst dabei die Fluidität der Membran. Außerdem sind Fettsäuren Bestandteile der Triglyzeride. Diese bilden das Speicherfett und somit die Hauptenergiereserve des Körpers. In Zeiten der Nahrungskarenz werden die Fettsäuren aus den Triglyzeriden freigesetzt, in den Mitochondrien verschiedener Zellen oxidiert und somit die gespeicherte Energie dem Körper zur Verfügung gestellt. Weiterhin werden aus Fettsäuren bestimmte Hormone, die Eikosanoide gebildet. Diese Hormonklasse vermittelt im Körper eine Vielfalt von Funktionen, z.B. Entzündungsreaktionen, Regulation von Blutdruck und Blutgerinnung.

Insbesondere langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren können maßgeblich Einfluss auf die Regulation der Genexpression einer Zelle nehmen. Dabei dienen die Fettsäuren selber oder ihre Derivate als spezifische Liganden von Transkriptionsfaktoren, die nach der Translokation in den Zellkern dort das Ablesen (Transkription) bestimmter Zielgene veranlassen. So können mehrfach ungesättigte Fettsäuren z. B. in der Leber über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors peroxisome proliferation-activated receptor PPAR α die Aktivierung von Genen des Hungerstoffwechsels bewirken und die funktionelle Ausstattung der Leberzelle an die Anforderungen der spezifischen Stoffwechsellage anpassen (Kersten et al.; 1999). Die beiden essentiellen Fettsäuren Linolsäure und α -Linolensäure werden im Rahmen dieser Arbeit eingehender betrachtet und werden darum an dieser Stelle gesondert genannt. Linolsäure ist ein wichtiger Vertreter der ω 6-, α -Linolensäure der ω3-Fettsäuren. Sie sind Ausgangsmaterial für weitere Fettsäuren, die der Körper ebenfalls nicht de novo synthetisieren kann. So stellt Linolsäure den Vorläufer der Arachidonsäure und α -Linolensäure den der Eicosapentaensäure dar, die jeweils für die Biosynthese einer bestimmten Gruppe von Eicosanoiden von Bedeutung sind. Das Verhältnis exogen zugeführter Linol- zu α -Linolensäure kann so Einfluss auf die Zusammensetzung der gebildeten Eicosanoide und somit auf die Funktion des Körpers nehmen.

Die Wirkung von ω 6- und ω 3-Fettsäuren auf die Gesundheit des Körpers ist in zahlreichen Studien untersucht worden. Entscheidend ist dabei das Verhältnis von ω 6- zu ω 3-Fettsäuren in der Nahrung, da beide Fettsäuren zur Bildung ihrer Derivate

22

kompetitiv das gleiche Enzymsystem benutzen. Vor allem für ω3-Fettsäuren wird ein positiver z.B. antiarteriosklerotischer Effekt postuliert.

Nicht zuletzt sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren bedeutend für eine normale Entwicklung und Funktion des Gehirns. Sie machen einen Anteil von 25 bis 30 Prozent der Fettsäuren im menschlichen Gehirn aus (Spector 159-65). Da auch im ZNS die Enzyme für die Neusynthese essentieller Fettsäuren fehlen, müssen diese mit der Nahrung aufgenommen und dem ZNS aus dem Plasma zugeführt werden. Dafür müssen sie die BHS passieren. Ob dieser Transport in Form von Lipoproteinen oder von freien Fettsäuren abläuft, ist Inhalt der vorliegenden Arbeit.

1.3. Aufbau und Funktion der Bluthirnschranke als Barriere für Lipoproteine



Aufbau der Bluthirnschranke

Die Abbildung 7.a zeigt den Ausschnitt einer Hirnkapillare, gebildet von Endothelzellen und umhüllt von Astrozyten. Abb. 7.b stellt einen Querschnitt durch die selbe Kapillare dar. Man erkennt den dreischichtigen Aufbau, bestehend aus den über tightiunctions verbundenen Endothelzellen, der zwischen Endothelzellen und Astrozyten liegenden Basalmembran und den Fortsätzen der Astrozyten. Details zur Funktion der BHS finden sich im Text. (Quelle: Deetjen/Speckmann: Physiologie; München 1992)

Abb.7 Bluthirnschranke

Die BHS bildet die Grenze zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf. Sie ist aus drei Schichten aufgebaut. Dem Blut zugewandt ist die Endothelschicht der Kapillaren. Sie wird von Endothelzellen gebildet, die über tight-junctions fest und zum größten Teil undurchlässig miteinander verbunden sind. Tight-junctions sind enge Verbindungen der Membranen benachbarter Epithelzellen; sie werden auch als Zona occludens bezeichnet. Unter der Endothelzellschicht liegt die Basalmembran. Die bildet die zweite Schicht und wird gebildet aus Kollagen Typ IV, aus Glycoproteinen und sauren Proteoglycanen. Die dritte Schicht wird von den Fortsätzen der Astrozyten gebildet. Astrozyten gehören zu den Gliazellen des ZNS; sie bilden, neben den Oligodendrozyten und den Ependymzellen, die größte Klasse der Gliazellen. Sie haben einen sternförmigen Zellkörper und lange Fortsätze, von denen einige Kontakt zu den Blutgefäßen aufnehmen. Den Astrozyten wird eine Ernährungs-, Stütz- und Phagozytosefunktion zugerechnet. Außerdem ist bekannt, dass die Astrozyten die Dichte und die Ausprägung der BHS beeinflussen können, d. h. die hirnversorgenden Kapillaren entwickeln unter dem Einfluss der Astrozyten die für die Endothelien der BHS typischen tight-junctions. Außerdem können die Astrozyten Mediatoren (Interleukine, Steroide) ausschütten, die die Permeabilität der BHS beeinflussen (Abbott 2002). Auch feine Nervenendigungen um die Endothelien können modulierende Stoffe sekretieren. So können z. B. Entzündungsmediatoren die Barrierefunktion der BHS im Falle einer Infektion verändern.

Außerdem stellt die BHS die Homöostase des ZNS sicher, indem sie das Gehirn vor möglicherweise schädigenden Substanzen, z. B. Medikamente, oder Konzentrationsschwankungen von physiologischen Substanzen, z. B. pH-Schwankungen, im Blut schützt. Großen und elektrisch geladenen Molekülen wird der Übertritt vom Blut ins ZNS verwehrt. Wenn die Integrität der BHS geschädigt ist, wie es bei Infektion, einem Tumorleiden im Gehirn oder Exposition mit Bakterientoxin der Fall sein kann, kann es zu einem vasogenen Ödem kommen. Ein vasogenes Ödem entsteht, wenn aufgrund einer Permeabilitätsstörung der Kapillaren Albumin oder andere Plasmaproteine die Gefäße verlassen und Plasmaflüssigkeit osmotisch mit sich in den Interzellularraum ziehen. Ein Ödem im knöchernen Schädel kann zur Schädigung des Gehirns, bzw. der Neurone führen. Darum ist eine Aufrechterhaltung der Integrität der BHS äußerst bedeutsam.

Neben den Gefahren, die eine Permeabilitätssteigerung der BHS hervorrufen kann, sind auch Situationen vorstellbar, in denen eine erhöhte Permeabilität Nutzen

24

bringen könnte. Eine erhöhte Permeabilität wäre z. B. sinnvoll, wenn heilende oder ernährende Stoffe aus dem Plasma zum verletzten Hirngewebe gelangen oder wenn Medikamente zu einem Infektionsherd im ZNS dringen sollen. Ein gerichteter und kontrollierbarer Integritätsverlust wäre dabei wünschenswert. Es zeigte sich, dass eine Permeabilitätsänderung punktuell und reversibel über die Verabreichung bestimmter Mediatoren möglich war, ohne einen generellen Effekt auf die Homöostase des gesamten Gehirns auszuüben (Abbott 2002). Dabei wirkten verschiedene Mediatoren auf die Astrozyten, die Einfluss auf die tight-junctions der Endothelzellen nahmen und so zu einer Permeabilitätssteigerung führten. Die Integrität der BHS wurde so verändert und ein gerichteter Stofftransport konnte ermöglicht werden.

Bemerkenswert ist auch, dass Astrozyten Apo E bilden können (Methia et al. 2001; Boyles et al. 1985). Apo E trägt zur Stabilität und insbesondere zur Regeneration der BHS nach Verletzung bei. Dies zeigte sich in Versuchen mit Apo E-defizienten Mäusen. Im Vergleich zu gesunden Mäusen schritt nach Verletzung der BHS dieser Mäuse die Heilung langsamer voran oder es blieben erhebliche Defizite in der Funktion der BHS zurück (Methia et al. 2001).

Blutliquorschranke und Circumventrikuläre Organe

Im ZNS gibt es neben der BHS noch weitere Grenzschichten mit variabler Permeabilität; dazu gehören die Blut-Liquor-Schranke und die circumventrikulären Organe.

Die Blut-Liquor-Schranke ist zwischen den Kapillaren der Plexus choroidei und der Hirnhäute und dem äußeren wie inneren Liquorraum lokalisiert. Der dort vorhandene Schrankeneffekt zwischen den Blutgefäßen und dem Liquorraum trägt wesentlich zur Aufrechterhaltung der Liquorzusammensetzung bei. Der Wirkungsgrad der Blut-Liquor-Schranke liegt allerdings unter dem der BHS, sie hat also eine höhere Permeabilität.

Die circumventrikulären Organe haben im Vergleich zur BHS ebenfalls eine höhere Permeabilität. Zu den Aufgabenbereichen zählt die Aufrechterhaltung der Körperfluidhomöostase. Sie bilden einen Zielpunkt für aus dem Blut stammende Mediatoren, die z. B. Auskunft über eine bestimmte Stoffkonzentration im Körperkreislauf geben, so dass rückwirkend der Erhalt der Homöostase vom ZNS gelenkt werden kann (Gross 1992;Johnson and Gross 1993). Ferner können auch Zentren im ZNS Stoffe an die Körperperipherie abgeben, die über die circumventrikulären Organe das ZNS verlassen und in das Blutsystem gelangen können. Zu den circumventrikulären Organen gehören die Area postrema, die Eminentia mediana und das subfornicale Organ (Gross 1992). Auch die Eminentia mediana des Hypothalamus besitzt eine "gefensterte BHS", die es den Neuronen des ZNS ermöglicht, Botenstoffe, die in den Kernen des Hypothalamus gebildet wurden, ins Blut abzugeben (Methia et al. 2001;Peruzzo et al. 2000). Das subfornicale Organ ist eine kleine neuronale Struktur, die sich in den dritten Ventrikel hinein erstreckt. Sie besitzt gefensterte Kapillare, welche im Blut befindlichen Molekülen den ungehinderten Durchtritt gestattet. Ob an diesen Stellen ein Austausch von Molekülen aus der Nahrung, wie essentiellen Fettsäuren und lipophilen Vitaminen möglich ist, stellt eine interessante Fragestellung dar.

Transportvorgänge über die Blut-Hirn-Schranke

Der Ernährungsstatus und die Versorgungssituation des ZNS sind abhängig von mehreren Faktoren. Zunächst muss ein Nahrungsstoff, um vom Blut in das ZNS zu gelangen, die BHS überwinden. Dafür sind folgende Transportmechanismen vorstellbar: ein carriervermittelter Transport oder ein rezeptorvermittelten Transport Der carriervermittelte Transport bewirkt die spezifische Translokation eines Moleküls durch eine Zellmembran mittels eines speziellen Carriers. Der Transport von Glukose, Aminosäuren und anderen kleinen, hydrophilen Molekülen ist ein typisches Beispiel für diesen Mechanismus. Ein bekannter Carrier für Glukose ist der insulinunabhängige GLUT 1 (Caballero B. and Sadler, M. J. Encyclopedia of human nutrition, ACADEMIC PRESS, 1998).

Der rezeptorvermittelte Transport über die Blut-Hirn-Schranke wird am Beispiel des Transportes von Eisen beschrieben. Dieser Prozess soll hier als gedankliches Konstrukt für mögliche Wege der Überwindung der BHS dienen. Im Blut ist das Eisen u. a. an Transferrin, ein Plasmaprotein, gebunden. Es gibt zwei Hypothese, nach denen ein Transfer über die BHS vorstellbar ist: Zunächst gibt es auf den Endothelzellen der BHS Rezeptoren für Transferrin, die die Aufnahme von mit Eisen beladenem Transferrin in die Zelle vermitteln. Nun kann der Transferrin-Eisen-Komplex nach kompletter Endozytose innerhalb der Endothelzelle getrennt werden und nur das Eisen gelangt anschließend in das ZNS. Das Transferrin wird dem Prozess der Retroendozytose unterworfen und wird wieder aus der Endothelzelle ins Blut entlassen und kommt somit nicht mit dem ZNS in Kontakt. Die zweite Möglichkeit ist der Prozess der Transzytose, wobei der gesamte Komplex nach Bindung an den endothelzellständigen Rezeptor durch die Endothelzelle hindurch geschleust und ins ZNS abgegeben wird. Hier erfolgt dann die Trennung von Eisen und Transferrin; letzteres wird erneut endozytiert und mittels Transzytose durch die Endothelzelle dem Blut wieder zugeführt (Zhang and Pardridge 2001).

Ein weiterer Rezeptor, der im ZNS exprimiert wird, ist LRP1. LRP1 reguliert den Gefäßtonus der Gehirnkapillaren und fungiert so als Regulator der Permeabilität der BHS. Es ist bekannt, dass LRP1 in Anwesenheit von Mediatoren, z. B. von tissuetype plasminogen activator, die Durchlässigkeit der BHS modulieren kann (Yepes et al. 2003). Insofern ist auch der LRP1 von großer Relevanz bei der Betrachtung von Transportvorgängen über die BHS.

1.4. Stoffwechselvorgänge und Lipoproteinmetabolismus im ZNS

Metabolismus des ZNS

Zur Veranschaulichung des speziellen Metabolismus des ZNS sollen nun einzelne Stoffwechselwege bestimmter Nahrungsstoffe näher erläutert werden.

Glukose ist der wichtigste Energielieferant des Gehirns. Die Glukoseaufnahme wird im ZNS nicht über Insulin reguliert, obwohl dieses im ZNS vorkommt. Sie erfolgt über insulinunabhängige Glucosetransporter. Bei reduziertem Glukoseangebot kann sich das Gehirn an die Verwertung anderer Energiespeicher adaptieren. Die wichtigste Energiequelle sind dann Ketonkörper. Aminosäuren dienen nicht zur Energiegewinnung sondern primär der Produktion von Neurotransmittern. Die Energiegewinnung durch den Abbau der Fettsäuren mittels ß-Oxidation findet im ZNS ebenfalls nicht statt. Fettsäuren werden im Gehirn stattdessen als Bestandteil von Gangliosiden, Sphingolipiden und Phospholipiden zum Zellmembranbau verwendet. Das elektrisch aktive Gewebe enthält hohe Konzentrationen an Phospholipiden und an Metaboliten der essentiellen Fettsäuren Linolsäure und Linolensäure. Die Versorgung des ZNS mit langen ungesättigten Fettsäuren (Arachidonsäure) ist besonders während der Hirnentwicklung im letzten Trimenon der intrauterinen Entwicklung unverzichtbar (Caballero B. and Sadler, M. J. Encyclopedia of human nutrition, ACADEMIC PRESS). Trotz dieser Erkenntnisse ist die Rolle der ungesättigten Fettsäuren und der Mechanismus der Aufnahme der Fettsäuren ins ZNS noch nicht vollständig geklärt. Vorstellbar wäre der Transfer der Fettsäuren über die Plasmamembranen mittels spezieller Transportproteine, den FABPs (fatty acid binding proteins) (Chmurzynska 2006).

Lipoproteine im Liquor cerebrospinales

Als Liquor cerebrospinalis (Liquor) wird die Gehirn-Rückenmark-Flüssigkeit, die das ZNS umgibt, bezeichnet. Sie wird von den Plexus choroidei gebildet, zirkuliert von den inneren, im Gehirn liegenden, zu den äußeren, das Gehirn umschließenden Liquorräumen und wird dort von den Pacchioni-Granulationen resorbiert. Physiologisch ist Liquor klar, farblos und fast zellfrei (1 bis 6 Zellen pro mm³). Der Proteingehalt beträgt 15 bis 25 mg/dl. Er dient dem Schutz des zentralen Nervensystems vor mechanischen Einflüssen und dem Ausgleich hydrostatischer Druckveränderungen im Gefäßsystem und hat darüber hinaus auch stoffwechselgebundene Aufgaben. Das Liquorsystem wird auch als modifiziertes Lymphsystem für das nervöse Zentralorgan angesehen. Bezüglich der vorhandenen Lipide kann davon ausgegangen werden, dass die meisten Lipide, wie Fettsäuren, Cholesterin und Phospholipide im Gehirn synthetisiert werden. Allerdings ist auch das Gehirn auf die Zufuhr von essentiellen Fettsäuren und Vitaminen aus der Nahrung und damit aus dem Blut angewiesen. Für die Supplementierung des ZNS mit essentiellen Metaboliten muss daher die BHS überwunden werden.

Der Transport der im Liquor zirkulierenden Lipide erfolgt auch im ZNS mit Hilfe von Lipoproteine. Die Anfänge in der Erforschung der Lipoproteine des Liquors wurden 1961 gemacht (DENCKER et al. 1961). Apolipoproteine im Liquor wurden dann 1979 beschrieben. Es wurden die Apolipoproteine Apo AI, Apo E und Apo C entdeckt. Die meisten Apolipoproteine waren in einem Dichtebereich von 1,060 bis 1,25 mg/ml zu finden, was annähernd dem Dichtebereich der Plasma-HDL entspricht. Auch wurde postuliert, dass die beiden Hauptapolipoproteine im Liquor Apo E und Apo AI sind (Roheim et al. 1979a;Xu et al. 2006;Pitas et al. 1987;Guyton et al. 1998). Bis auf das Apolipoprotein B konnten später noch weitere Apolipoproteine im Liquor nachgewiesen werden.

28

Eine erste Klassifikation der Lipoproteine im ZNS wurde 1995 von Borghini et al. vorgeschlagen, wonach drei Klassen von Lipoproteinen unterschieden wurden. Zum einen wurde eine Untergruppe beschrieben, die hauptsächlich Apo AI und geringere Mengen der Apolipoproteine Apo D, Apo E und Apo J enthielt. Eine weitere Untergruppe enthielt hauptsächlich Apo E. Die dritte Gruppe wurde durch ihren hohen Gehalt an Apo AIV charakterisiert (Borghini et al. 1995).

Eine neue Einteilung der Lipoproteine im Liquor (CSF; cerebrospinal fluid) wurde 2001 von Koch et al. publiziert. Hier wurden vier Klassen postuliert, welche nach ihrem Gehalt an Apo AI und Apo E eingeteilt wurden. So ergaben sich folgende CSF-Lipoproteine: CSF-LpEA, welches Apo E und Apo AI enthält, CSF-LpE, welches nur Apo E aufweist, dementsprechend CSF-LpA, nur mit Apo AI und eine Untergruppe, die weder Apo E noch Apo AI enthält: sCSF-Lp. Jede dieser CSF-Lp enthält Apo AIV, Apo D sowie Apo J. In der Gruppe des CSF-LpA lässt sich auch noch das Apo AII nachweisen (Koch et al. 2001).

Zum Abschluss der Einleitung folgt die Abbildung 4, welche einen Überblick über die Arbeithypothese der vorliegenden Dissertation geben soll.



Abb. 4 Zusammenfassung der Arbeithypothese

Die Abbildung fasst die Fragestellung der vorliegenden Arbeit schematisch zusammen. Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob im Blut kleine Apo Al-haltige Partikel nachweisbar sind, die potentiell essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine über die BHS in das ZNS transportieren könnten. In der Mitte der Abbildung ist das kleine Apo Al-Partikel dargestellt (mit rotem Fragezeichen gekennzeichnet), welches möglicherweise aus dem HDL-Metabolismus des Blutes generiert wird und potentiell als Vehikel über die BHS für aus der Nahrung aufgenommene essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine fungiert. Auf diese Weise würden diese dem Metabolismus der Liquor-Lipoproteine zugeführt. Des weiteren sind verschiedene Arten eines möglichen Transfers über die BHS dargestellt.

1.5. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Existenz von kleinen Apo Al-haltigen Plasmalipoproteinen geprüft werden, welche als mögliche bluthirnschrankengängige Transportvehikel für essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine fungieren könnten. In der Arbeit sollte versucht werden solche Partikel aus humanem Plasma zu isolieren und zu charakterisieren. Folgende Eigenschaften wurden für diese Partikel postuliert: 1. Ihre Partikelgröße sollte kleiner als die von HDL sein, da so eine Passage über die BHS erleichtert wäre. 2. Sie sollten Apo AI, jedoch kein Apo E enthalten, da gezeigt worden ist, dass Apo E nicht aus dem Blutkreislauf in den Liquor übertritt. 3. Ihr Lipidbestandteil sollte lipophile Vitamine und essentielle Fettsäuren umfassen.

Zur Isolation solcher kleiner Apo Al-haltiger Partikel sollten zunächst die Plasmalipoproteine mittels Gelfiltration gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden. Die SO gewonnenen kleinen Partikel sollten dann affinitätschromatographisch aufgereinigt werden, um Apo Al-haltige von nicht Apo Al-haltigen Partikeln zu trennen. Die Apo Al-Partikel sollten anschließend mittels Western Blot Analysen und chromatographischer Verfahren hinsichtlich ihres Gehaltes an Apolipoproteinen, Fettsäuren und Vitaminen untersucht werden. Anschließend sollte die Bluthirnschrankengängigkeit dieser Partikel geprüft werden.

Sollte es gelingen solche Partikel zu isolieren, könnten sich Untersuchungen zur Bluthirnschrankengängigkeit anschließen.

2. Material und Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (Steinheim), Baker (Deventer) oder Serva (Heidelberg) in analytischer (p. A.) oder in HPLC-Reinheit bezogen.

Das Wasser (Aqua dest.) wurde mit einer Reinstwasseranlage der Firma Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Hamburg, hergestellt.

2.1. Gewinnung des Ausgangsmaterials: humanes Plasma

Geräte:

Zentrifuge Heraus Sepatech Minifuge T Stauschlauch zur Venenstauung

Material:

S-Monovetten von Sarstedt, Blutentnahmesystem, EDTA KE/9ml (als Antikoagulanz) Multifly Set von Sarstedt

Proteaseinhibitor Aprotinin aus der Rinderlunge von Sigma-Aldrich 2,5mg/ml gelöst in 0,9 % NaCI-Lösung

Methode:

Zuerst werden pro Monovettenröhrchen 100 µl Aprotinin zum EDTA hinzupipettiert. Das Aprotinin fungiert als Proteaseinhibitor, der das Plasmaprotein vor dem Abbau durch Enzyme schützen soll. Das EDTA dient der Antikoagulation. Es bindet Calciumionen, welche zur Bildung von Thrombin und somit von Fibrin nötig sind. Die Blutentnahme erfolgt aus der Armvene. Das in die Monovetten gefüllte Blut wird

mit EDTA und Aprotinin vermengt. Die Monovetten werden dann für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der Monovetten bei 4° C, 2500 rpm für 10 Minuten. Nach der Zentrifugation wird das Plasma abgenommen und bei – 80° C in 1500 ml (entspricht der für einen FPLC-Lauf benötigten Menge) Aliquots eingefroren.
2.2. Isolierung der Lipoproteine aus humanem Plasma

2.2.1. Fast Performance Liquid Chromatographie (= FPLC)

Geräte:

Die Apparatur der FPLC von Pharmacia besteht aus folgenden Komponenten:

LKB – Pump P-500 LKB – Controller LCC-500 Plus LKB – FRAC-100 Motor Valve MV-7 Trennsäule von Amersham Bioscience: HiLoad TM 16/60, Superdex TM 200, prep grade

Material:

Als Laufphase wird FPLC-Puffer (10 mM Tris pH 8.0; 0,15 M NaCl; 10 mM EDTA pH 8.0) benötigt. Der Puffer wird vor Benutzung steril filtriert mit Filtration Products von Nalgene, Nunc Products.

Die Fraktionen werden in Reaktionsgefässen 1,5 ml von NalgeNuncInternational gesammelt.

Methode:

Die FPLC ist eine Form der Gelfiltrationschromatographie, mit Hilfe derer eine Trennung von Proteinen aufgrund der Größe gelingt.

Die HiLoad TM 16/60, Superdex TM 200, prep grade Säule, auf welche die zu trennende Probe aufgetragen wird, besteht aus porösen Kügelchen, welche aus unlöslichen, aber hydratisierten Polymeren bestehen. Das Material für die Säule besteht aus Sepharose.

Wegen der Hydratation der Polymere ist es essentiell darauf zu achten, dass die Säule stets feucht gehalten wird, d. h. sie darf nie austrocknen indem man vernachlässigt, neuen Puffer nachzufüllen oder die Säule Luft ziehen lässt.

Je nach Größe passen die Moleküle der Probe in die Poren der Kügelchen. Das hat zur Folge, dass sich die kleinen Proteine sowohl innerhalb der Kügelchen, wie auch in dem umgebenden Medium verteilen können. Der Verteilungsraum der größeren Partikel beschränkt sich auf das wässrige Medium zwischen den Kügelchen. So steht den großen Partikeln ein kleineres Verteilungvolumen zur Verfügung. Das hat wiederum zur Folge, dass sie die Säule schneller passieren und zuerst verlassen. Sie sind in den ersten Fraktionen nach einem FPLC-Lauf zu finden; die kleinen Partikel in den folgenden Fraktionen. Die hier verwendete Säule hat einen Fraktionierungsbereich von einem Molgewicht von 1×10^4 bis 5×10^5 M_r.

Das Säuleneluat wird mit Hilfe des Fraktionierers in 50 Fraktionen à 1 ml getrennt, in den 1,5 ml fassenden Reaktionsgefässen gesammelt und steht anschließend für die unterschiedlichen Analyseverfahren zur Verfügung. Es ist darauf zu achten, die Proben in den Reaktiongefässen stets zu kühlen, um eine Degradation der Proteine zu verhindern.

2.2.2. Affinitätschromatographie gegen Apolipoprotein AI

Geräte:

Laborschüttler IKA Vibrax VXR Zentrifuge Heraus Sepatech Minifuge T

Material:

Amicon Centricon Centrifugal Filter Falcons TBS-Puffer (Tris-Buffer-Saline-Puffer) pH 6,6 1M Tris-Puffer pH 8,5 100 mM Glycin-Puffer pH 2,5 Affinitätschromatographiesäule gegen Apo AI (verwendeter Antikörper ist im Kapitel "Immunologische Methoden" vermerkt). Trägermatrial der Säule ist Sepharose. Die Kopplung des Antikörpers erfolgte an CNBr-aktivierte Sepharose.

Methode:

Die Affinitätschromatographiesäule stammt aus den Beständen des Labores und hat ein Säulenvolumen von ca. 2 ml. Bereits etabliert und durchgeführt wurde diese Methode von Koch et al. (Koch et al. 2001)

Vor dem Gebrauch wird die Säule mit TBS-Puffer gewaschen, dazu wird der Puffer einige Male über die Säule gegeben.

Das Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie bestand aus gepoolten Gelfiltrationsfraktionen. Die gepoolten Fraktionen wurden auf die gewünschte Ausgangsmenge ankonzentriert. Dazu wurde das Ausgangsmaterial in Millipore Zentrifugentubes (Amicon Centricon Centrifugal Filter Devices mit 10 kDa großen Poren) gefüllt und bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Ausgangsmaterial wird dann mit dem Inhalt der Säule gemischt, so dass die auf dem Trägermaterial der Säule immobilisierten Antikörper, die Apolipoproteine zu binden. Die beladene Säule wird auf einem Laborschüttler über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird der Durchlauf aufgefangen und die Säule zweimal mit TBS-Puffer gespült, um unspezifisch gebundenes Material auszuwaschen. Durchlauf und Waschlösungen werden aufgefangen, um sie ebenfalls zu analysieren. So wird die Effizienz der Bindung der Affinitätssäule überprüft.

In zehn Eppendorfgefässen werden je 50 µl 1M Tris-Puffer, pH 8,5 vorgelegt. Die Eluierung des spezifisch gebundenen Materials erfolgt mit 100 mM Glycin-Puffer, pH 2,5. Durch den sauren pH-Wert des Elutionspuffers werden die Bindungen zwischen den Antikörpern der Affinitätssäule und den Apolipoproteinen der aus Ausgangslösung gelöst. Die eluierten Apolipoproteine werden fraktionert (à 500 µl) und in die vorbereiteten Eppendorfgefässe mit der 1M Trislösung pH 8,5 überführt. Die 1M Trislösung pH 8,5 neutralisiert den sauren pH-Wert, so dass die eluierten Proteine in einem neutralen Milieu sind.

Die Affinitätssäule wird nach dem Gebrauch wieder mit TBS-Puffer gewaschen und mit PBS-Puffer, sowie mit Natriumacid zur Konservierung gefüllt, und bei 4° C gelagert.

2.3. Biochemische Charakterisierung der Lipoproteinpartikel

2.3.1. Photometrischen Methode

Cholesterinbestimmung

Geräte:

ELISA-Reader, Dynatech Laboratories, MRX version 1.12 Verarbeitende Software Microsoft Excel Laborschüttler IKA Vibrax VXR

Material:

Cholesterin-Reagenz der Firma Roche

Precipath L Control für die Erstellung der Standardreihe der Firma Roche

Mikrotiterplatte 96 well von Nalge Nunc

Methode:

Die Bestimmung von Cholesterin erfolgt photometrisch.

Als Standard für die photometrische Bestimmung wird eine Eichreihe erstellt. Dafür wird nach folgendem Schema eine Standardreihe mit unterschiedlichen Mengen an Precipath L pipettiert:

Precipath in µI	Puffer in µl	Chol. Konz. in mg/dl
2847	153	15,0
2923,6	76,4	7,5
2961,8	38,2	3,75
2974,5	25,5	2,5
2987,3	12,7	1,25
2994,9	5,1	0,5

Precipath L ist eine lyophilisierte Kontrolle auf Humanserumbasis.

Für die Messung werden je 100 µl Probe bzw. 100 µl Standard als Doppelwerte in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Sowohl zum Standard als auch zur Probe werden je 200 µl Cholesterinreagenz hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgt für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler.

Das Testprinzip beruht auf einem enzymatischen Farbtest. Mit Zugabe des Cholesterinreagenz wird die Reaktion gestartet: Die Cholesterinester in der Probe werden unter Einwirkung der Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Das Cholesterin wird von der Cholesterinoxidase zu Cholestenon und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das entstandenen Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol unter katalytischer Wirkung der Peroxidase einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der Cholesterinkonzentration direkt proportional ist und photometrisch gemessen werden kann. Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mit Hilfe der Extinktionswerte der Standardreihe wird eine Eichkurve erstellt, durch welche die Werte der Proben bestimmt werden. Zur Berechnung der Konzentrationen wird das Computerprogramm Excel benutzt.

Triglyzeridbestimmung

Geräte:

ELISA-Reader, Dynatech Laboratories, MRX version 1.12 Drucker von EPSON LQ – 300 Verarbeitende Software Microsoft Excel und Hardware Laborschüttler IKA Vibrax VXR

Material:

TG - Reagenz der Firma Roche Precipath L Control für die Erstellung der Standardreihe der Firma Roche Mikrotiterplatte 96 well von Nalge Nunc

Methode:

Auch die Messung von TG erfolgt photometrisch und nach dem gleichen Prinzip wie bei der beschriebenen Cholesterinmessung. Für den Erhalt der Standardwerte wird die Eichreihe in gleicher Weise pipettiert, allerdings entsprechen die jeweiligen Precipathmengen anderen Triglyderidkonzentrationen, die hier dargestellt werden:

Precipath in µl	Puffer in µl	TG Konz. in mg/dl
2847	153	18,2
2923,6	76,4	9,1
2961,8	38,2	4,5
2974,5	25,5	3,03
2987,3	12,7	1,55
2994,9	5,1	0,62

Zur Messung der TG Konzentration werden pro well (= Vertiefung der Mikrotiterplatte) je 100 µl Probe, bzw. 100 µl Standard pipettiert. Auch hier wird stets

in Doppelwerten gemessen. Hinzu werden je 200 µl TG Reagenz pipettiert. Inkubiert wird für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Laborschüttler.

Die Methode beruht auf der Arbeit von Wahlenfeld unter Verwendung einer Lipoproteinlipase aus Mikroorganismen zur schnellen und vollständigen Hydrolyse von TG zu Glycerin mit anschließender Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet unter katalytischer Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol in einer Endpunktreaktion nach Trinder einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der TG-Konzentration direkt proportional ist und photometrisch gemessen werden kann. Es wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Mit Hilfe der Extinktionswerte der Standardreihe wird eine Eichkurve erstellt, mit welcher dann die Werte der Proben bestimmt werden.

Zur Berechnung der TG-Konzentration wird das Computerprogramm Excel benutzt.

Bestimmung der freien Fettsäuren

Geräte:

ELISA-Reader, Dynatech Laboratories, MRX version 1.12 Drucker von EPSON LQ – 300 Verarbeitende Software Microsoft Excel und Hardware Wärmeschrank (Zellinkubator von Binder)

Material:

Enzymatisches Farbtestkit NEFA C (Wako) Mikrotiterplatte 96 well von Nalge Nunc

Methode:

Bei dem Kit NEFA C (Wako) handelt es sich um einen enzymatischen Farbtest zur quantitativen Bestimmung der freien Fettsäuren (free fatty acid = FFA).

Die FFA werden mittels AcylCoA-Synthetase zu AcylCoA umgewandelt, in das unter Entstehung von H₂O₂ Sauerstoff eingeführt wird. Das Wasserstoffperoxid bildet in Reaktion mit dem Farbreagenz B einen roten Farbstoff, dessen Konzentration der der unveresterten Fettsäuren proportional ist. Zur photometrischen Bestimmung der FFA wird zunächst eine Standardreihe aus der Standardlösung angesetzt mit deren Werten die Eichkurve für die Probenwerte erstellt wird. Der NEFA-Standard besteht aus Oleinsäure.

Pro well werden 20 µl der Probe, bzw. des Standards pipettiert. Gemessen wird in Doppelwerten. Dazu werden je 100 µl der Lösung A pipettiert. Nun wird bei 37° C im Wärmeschrank genau 10 min inkubiert. Es ist wichtig zu beachten, die Mikrotiterplatte mit einem Deckel zu versehen, um Verdunstung zu vermeiden. Anschließend werden 200 µl der Lösung B hinzugefügt und wieder wird bei 37° C für genau 10 min inkubiert. Nach Ablauf der 10 min wird sofort die Extinktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die Werte werden mit Hilfe des Programms Excel verarbeitet.

Proteinmessung nach Bradford

Geräte:

ELISA-Reader, Dynatech Laboratories, MRX version 1.12 Verarbeitende Software Microsoft Excel und Hardware

Material:

Bradfordreagenz für BioRad Protein Assay von BioRad Laboratories Albumin-Standard 2,0 mg/ml (BSA-Standard), Fa. Pierce Mikrotiterplatte 96 well von Nalge Nunc

Methode:

Mit dem Assay nach Bradford kann die Proteinkonzentration einer Probe einfach und genau bestimmt werden. Der quantitative Nachweis des Proteingehaltes einer Probelösung erfolgt anhand von Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit dem farbstoffbildenden Bradfordreagenz. Die Intensität des Farbstoffs korreliert direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen und kann im ELISA-Reader gemessen werden. Es werden immer Mehrfachbestimmungen durchgeführt und ein Mittelwert gebildet. Sowohl Proben, als auch Standard werden gegen eine Leerwert vermessen, der aus destilliertem Wasser oder wie hier aus FPLC-Puffer besteht. Die entsehenden blauen Säurefarbstoffe werden als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet.

In Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu verschiebt sich ihr Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Bei dieser Wellenlänge (595 nm) wird die Absorption gemessen.

Um eine Standardkurve zu erhalten, wird ein Eichreihe aus verschiedenen Konzentrationen von Albumin-Standard erstellt, indem der vorhandene Albumin-Standard (Konz. 2,0 mg/ml) in mehreren Stufen verdünnt wird. Für die Messung werden je 10 µl der Standardlösungen für die Eichreihe und je 10 µl der Proben in die wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Es wird in Doppelwerten gemessen. Die Bradfordreagenzlösung wird 1:5 mit aqua dest. verdünnt. Von dieser Lösung werden pro well 200 µl hinzupipettiert. Die bei 595 nm Wellenlänge im ELISA-Reader gemessene Extinktion wird mit Hilfe des Computerprogrammes Excel in Proteinkonzentrationen umgerechnet und kann dann z. B. als Diagramm dargestellt werden.

Die Proteinkonzentration kann auch nach folgender Formel berechnet werden:

Extinktion (Probe) x Konzentration (Standard) in mg/ml / Extinktion (Standard) = Konzentration (Probe) in mg/ml.

2.3.2. Immunologische Methoden

SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Geräte:

Minigel-Elektrophorese-Apparatur und Zubehör (BioRad) Netzgerät Power Pac 300 (BioRad) Thermomixer compact (Eppendorf) Tischzentrifuge Sigma 1-15 K Giessstand für Minigel, Spacer 1,5 mm, Glas Plates MiniProtean 3, 1,5 mm (BioRad) Schutzbrille

Material:

SDS-Probenpuffer (4x): 3% SDS; 80 mM Tris, pH 6,8; 16 % Glycerol; 3,75% Mercaptoethanol; 0,2% Bromphenolblau Obergelpuffer: 40 mM Borsäure; 41 mM Tris; 0,0001% SDS, pH 8,64

Untergelpuffer: 427 mM Tris, pH 9,5 mit HCl eingestellt

Trenngel (12,5%) (Angaben für 1 Minigel): 2,5 ml Acrylamidlösung (40%N,N'Methylenbisacrylamid) (BioRad); 2 ml Untergelpuffer (1,7 M Tris-HCl (Invitrogen); pH 9,18 mit 18% HCl;10 µl Temed (Tetramethylethylendiamin); 40 µl APS-Lösung (10% Ammoniumpersulfat in Aqua bidest) ad 8,5 ml

Sammelgel (3%) (Angaben für 1 Minigel): 385 µl Acrylamidlösung (40% N,N'-Methylenbisacrylamid) (BioRad); 1,25 ml Obergelpuffer (0,2 M Tris-HCl (Invitrogen); pH 6,15 mit 1 N H₂SO₄); 25 µl APS-Lösung (10% Ammoniumpersulfat in aqua dest.) 5 µl Temed (Tetramethylethylendiamin) ad 5 ml

Proteinstandard Rainbow Marker RPN 800 (Amersham Life Science)

Methode:

Eine weitere Methode zur Auftrennung von Proteine ist die Gelelektrophorese nach Neville. Das Prinzip beruht darauf, dass die Proteine denaturiert werden und über den Zusatz von SDS einem Ladungsausgleich unterzogen werden. So werden sie während der Elektrophorese nur ihrer Größe nach aufgetrennt.

Zuerst werden die Gele hergestellt. Dazu stellt man zunächst getrennt Trenn- und Sammelgel her. Zuerst wird das Trenngel zwischen die Glasplatten im Giessstand gefüllt. Eine glatte Oberflache erzielt man, indem man vorsichtig 1 ml aqua dest. auf das Trenngel gibt, welches man nach Auspolymerisation wieder abgiesst. Dann wird das Sammelgel eingefüllt und der Kamm eingesetzt. Dabei sollte eine Schutzbrille getragen werden, da das acrylamidhaltige Gel nicht in die Augen spritzen darf. Ist auch das Sammelgel auspolymerisiert, kann das Gel verwendet werden. Dazu wird es in eine Gelelekrophoresekammer eingespannt, diese wird mit ausreichenden Mengen von Untergelpuffer und Obergelpuffer bestückt.

Die Proben werden zunächst mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95° C im Thermomixer aufgekocht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probengefäße (eppendorf-tubes) nicht aufspringen und Inhalt verloren geht. Nach dem Aufkochen werden die Proben sofort auf Eis gestellt. Anschließend werden sie anzentrifugiert, um kein Kondenswasser im Deckel des Gefässes zu verlieren, damit die Konzentration des Proteins unverändert bleibt. Vorsichtig werden die Proben nun in die Taschen des Geles pipettiert. In eine Tasche wird der Marker (RPN 800 Batch 41) pipettiert. Im elektrischen Feld von 120 Volt laufen die Proben in das Sammelgel ein und werden im Trenngel aufgetrennt. Ist die Lauffront am unteren Ende des Geles angekommen, wird die Stomzufuhr gestoppt und damit der Auftrennungsprozess beendet.

Das Gradientengel

Das Gradientengel erlaubt eine Auftrennung von Proteinen unterschiedlicher Größe. Da in diesem Gel unterschiedliche Konzentrationen des Polyacrylamids übereinander geschichtet vorliegen, deckt es dabei eine größere Spannweite von auftrennbaren kDa-Werten der Proteine ab als das Nevillegelsystem.

Geräte:

Netzgerät Power Pac 300 (BioRad) Gelkammer X Cell Sure Lock[™] Novix Mini Cell (invitrogen)

Material:

Gradientengel Nu Page Novex Bis-Tris Gels 4 - 12 % (invitrogen) Puffer Nu Page MES SDS Running Buffer (20x) (invitrogen) Marker See Blue Plus 2 LC 5925 (invitrogen)

Methode:

Die Methode nach der das Gradientengel benutzt wird, unterscheidet sich kaum von der Methode nach Neville. Die genutzten Gradientengele wurden käuflich erworben. Bevor das Gel mit den aufzutrennenden Proben beladen werden kann, wird es in die Gelkammer eingespannt und die Kammer mit dem ebenfalls käuflich erworbenen Puffer aufgefüllt. Nun können die vorbereiteten Proben in die Taschen des Gradientengels pipettiert werden. Die Bestandteile der Proben werden innerhalb des Gels ihrer molekularen Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Haben die Proben den gewünschten Weg innerhalb des Gels zurückgelegt, kann das Gel weiterverarbeitet und analysiert werden. Dazu kann sich nun eine Western Blot Analyse oder eine Coomassiefärbung anschließen.

Die Coomassiefärbung

Material:

Coomassie-Färbelösung: 0,1 % Coomassie-Brilliantblau R250, 45 %; Ethanol, 10 % Eisessig (v/v) Coomassie-Entfärbelösung: 45 % Ethanol, 10% Eisessig (v/v)

Methode:

Die Coomassiefärbung ist eine Proteinfärbung.

Zur Färbung wird das Gel, welches die aufgetrennten Proteine trägt, in die Färbelösung gelegt und dabei leicht geschwenkt. Nach Anfärbung der Proteine wird das Gel in der Entfärbelösung geschwenkt und solange entfärbt, bis das Bandenmuster gut sichtbar wird. Die Proteine stellen sich hier also gemäß ihrer Größe als Banden auf unterschiedlicher Höhe dar und können mit Hilfe der Laufeigenschaft des Markers analysiert werden.

Eine weitere Methode zur Darstellung und Analyse der Proteine ist der Western Blot.

Die Western Blot Analyse

Geräte:

Minigel-Blottingkammer und Zubehör (BioRad) Netzgerät Power Supply LKB (Bromma) Filmentwicklermaschine Kodak X-Omat 1000 Processor

Material:

Gel-Blotting-Papier (=Filterpapier) (Schleicher & Schuell) Blotmembran aus Nitrocellulose Porengröße 0,1 µm (Protran) Ponceaufärbelösung, SERVA, 33427 (0,2% Ponceau in 3% TCA=Trichloressigsäure) Röntgenfilme Scientific Imaging Film Biomax MR (Kodak) Photokassette (rego) Sterilfilter 0,2 µm (Schleicher & Schuell) Blotpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % Methanol) Waschpuffer A (10 mM Tris pH 7,4, 154 mM NaCl, 0,1 % Tween) Waschpuffer B (10 mM Tris pH 7,4, 154 mM NaCl, 0,1 % Tween, 1 % SDS, 0,25 M Natriumdesoycholat)

Blockingpuffer (10 % Milchpulver in Waschpuffer A)

BSA als 5 %ige Lösung

Western blotting detection reagents 1 + 2 (Amersham Biosciences) für die ECL-Reaktion (= Chemielumineszenz-Reaktion)

Primäre Antikörper:

Antigen	Wirt	Verwendung ^A	Verdünnung	Firma/Referenz
Apo A-I	Maus	WB	1:1000	Dunn/Biodesign
Apo A-I	Schaf	AF	Serum	Beckman & Coulter
Apo A-II	Ziege	WB	1:250	WAK-Chemie
Apo A-IV	Kaninchen	WB	1:5000	Dr. H. Dieplinger, Innsbruck
Apo A-V	Kaninchen	WB	1:2000	Labor Merkel, Hamburg
Apo D	Kaninchen	WB	1:250	Dr. H. Dieplinger, Innsbruck
Apo E	Kaninchen	WB	1:5000	DAKO, Hamburg
Apo E (EE7)	Maus	Elisa	1:2000	Labor Beisiegel, Hamburg
Аро Н	Kaninchen	WB	1:1000	Dr. S. Moestrup, Arhus
Apo J	Maus	WB	1:1000	Serotec
	1	1	1	

^AWB: Westernblot, AF: Affinitätschromatographie

Sekundäre Antikörper:

Goat anti Mouse Peroxidase 1:5000 (= GaM-PO) Goat anti Rabbit Peroxidase 1:5000 (= GaR-PO) Donkey anti Goat Peroxidase 1:2500 (= DaG-PO) Donkey anti Sheep Peroxidase 1:5000 (= DaSh-PO)

Methode:

der Elektroblot:

Die Western Blot Methode dient dazu, im SDS-PAGE aufgetrennte Proteine mittels Elektroblot auf Nitrocellulose zu übertragen. So werden die aufgetrennten Proteine weiteren Analysen zugänglich gemacht. Für den Elektroblot schichtet man in den Blothalter zunächst ein Fließ zur Polsterung, darauf zwei Filterpapiere und anschließend das Gel, aus welchem man die Proteine extrahieren will. Das Gel wird mit der Nitrocellulosemembran abgedeckt. Anschließend werden zur Polsterung wieder zwei Lagen Filterpapier und ein Fließ aufgelegt und der Blothalter zusammengeklappt und verschlossen. Die gesamte Prozedur sollte in einem Blottingpufferbad durchgeführt werden, um einerseits die Austrocknung des Gels zu verhindern und andererseits, um zu vermeiden, dass Luftblasen zwischen Gel und Membran gelangen.

Der resultierende "Sandwich" wird nun in die Blottingkammer gestellt, ein Kühlaggregat hinzugefügt und die Kammer mit Blottingpuffer gefüllt. Geblottet wird bei 400 mA für 1 Stunde.

die Ponceaufärbung:

Nach dem Blot wird die Nitrocellulosemembran mit Ponceau rot gefärbt. Diese Färbung dient zur ersten Kontrolle des Blots oder auch zur Orientierung, wenn man die Membran für die sich anschließende Antikörperinkubation schneiden muss. Gel und Filterpapier werden verworfen, die Nitrocellulosemembran wird in die Ponceaufärbelösung gelegt und darin für ca. 10 min belassen. Wenn die Proteine als Banden sichtbar werden, wird die Membran mit Aqua dest. entfärbt, so dass die Banden als rote Striche auf weißem Grund erscheinen. Nach elektronischer Dokumentation (durch Scannen der Membran) und evtl. nach Schneiden der Membran, wird sie wieder entfärbt. Die Entfärbung erfolgt mit PBS.

die Antikörperinkubation:

Um nun die Proteine auf der Nitrocellulosemembran spezifisch darstellen zu können, bedient man sich gegen die gesuchten Proteine gerichteter Antikörper. Bei diesen Antikörpern spricht man von primären AK. Die primären Antikörper werden in einer 5 %igen BSA-Lösung angesetzt, dabei müssen die vorgeschriebenen Verdünnungen eingehalten werden (siehe Tabelle). Zunächst wird die Membran mindestens eine Stunde mit Blockingpuffer inkubiert und dann mit PBS gewaschen. Die Membranstücke werden dann mit dem spezifischen primären Antikörper für mindestens 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran gewaschen. Der Waschvorgang erfolgt nach folgender Prozedur: 1 min in Waschpuffer A, 2 mal je 10 min in Waschpuffer B, 1 min in Waschpuffer A. Danach wird mit dem sek. AK inkubiert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der sek. AK zu dem vorher verwendeten primären AK passt. Es wird wieder für mindestens 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt wieder die oben beschriebene Waschprozedur.

die Detektion:

Zuerst wird die ECL-Lösung angesetzt, wobei Lösung 1 und Lösung 2 jeweils zu gleichen Teilen in ein Gefäss pipettiert werden. Dieses Gemisch trägt man auf die bereits in der Fotokassette liegende Membran gleichmäßig auf, so dass die gesamte Membran bedeckt ist. Nach ein paar Sekunden wird die ECL-Lösung mit einem Filterpapier abgenommen. Die ECL-Lösung reagiert mit der an den zweiten AK gekoppelten Peroxidase und bewirkt eine Lichtreaktion. Diese kann mit Hilfe der aufgelegten Filme detektiert und nach Entwicklung der Filme sichtbar und auswertbar gemacht werden. Je nach Stärke des Signals wird die Belichtungszeit variiert. Durch das Scannen der Filme erfolgt die elektronische Dokumentation.

Apo E ELISA (= Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Geräte:

Wärmeschrank ELISA-Reader, Dynatech Laboratories, MRX version 1.12 Verarbeitende SoftwareMicrosoft Excel und Hardware

Material:

Microtiter-Stripes von Nunc Waschpuffer (0,5 % NaCl, 0,02% Tween20) Blockingpuffer: 0,1 M NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (p. A.), 0,15 M NaCl, 1,0% BSA (Merck 112018), 1,0 mM EDTA (Titripoex III, Merck 1.08418), 0,055 Tween 20 (Bio-Rad 170-6531), 0,01% Thimerosal (FLUKA 71230), pH 7,0) Positivkontrolle für Apo E (Behring) polyklonaler Antikörper gegen Apo E (DAKO) sekundärer Antikörper GaR-PO HRP-Substratpuffer (1,3 M Malonic acid (Fluca 63290), 0,6 M Na-Acetat (Merck 1.006268), NaOH 1,11 M (Merck 1.06495)) H₂O₂ 0,2%ig Tetramethylbencidine (TMB) 0,3%ig 2 M H₂SO₄

Methode:

Der Apo E ELISA ist eine sehr spezifische Methode um die Apo E Gesamtkonzentration zu messen.

1. Coaten der Microtiter-Stripes:

Das Prinzip beruht darauf, dass zunächst die Microtiter-Stripes mit monoklonalen EE7 Antikörpern (gegen Apo E) gecoatet werden. Diese Antikörper sollen die in den jeweiligen Proben befindlichen Apo E Moleküle binden. Die Inkubation der Microtiter-Stripes mit der Antikörperlösung erfolgt bei 4° C über Nacht. Nach dem Coaten werden die wells der Stripes mit je 300 µl Waschpuffer dreimal gewaschen.

2. Blockieren:

Anschliessend folgt der Blockierungsschritt, wobei noch freie Stellen im well blockiert werden sollen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Geblockt wird mit 300 μ l Blockingpuffer pro well. Es wird bei 37° C 90 min inkubiert. Anschließend werden die Platten ausgeschlagen und so vom Blockingpuffer entleert. Auch nach diesem Schritt werden die wells gewaschen und können nun für bis zu 6 Monate bei –20° C gelagert werden.

3. Proben-, Standard- und Kontrollvorbereitung:

Bei der Aufbereitung der Proben, der Standards und der Positivkontrollei ist darauf zu achten, dass die Proben stets auf Eis gelagert werden, um den Abbau der Lipoproteine zu vermeiden.

Die Plasmaproben werden mit Blockingpuffer 1:6000 verdünnt. Auch die Positivkontrolle (Apo E von Behring) wird 1:6000 vorverdünnt. Die FPLC-Fraktinonen, wie sie hier vorlagen, werden nur 1:2 vorverdünnt indem 50 µl Blockingpuffer pro well vorgelegt wurden und 50 µl je Fraktion hinzugefügt werden.

Eine Plasmapool-Standardreihe wird mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 64 ng/ml, 32 ng/ml, 16 ng/ml, 8 ng/ml, 4 ng/ml, 2 ng/ml, 1 ng/ml.

4. Auftragen der Proben, Standards und Kontrollen:

Gemessen wird immer in Doppelwerten. Pro well werden 100 µl der vorbereiteten Ansätze aufgetragen. Es erfolgt eine Inkubation bei 37° C für 2 Stunden. Während der Inkubation ist darauf zu achten, dass die Proben nicht verdunsten. Die Verdunstung wird vermieden, indem man die Microtiterplatten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wird wieder gewaschen: je drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer.

5. Inkubation mit polyklonalem Antikörper gegen Apo E:

Dieser Schritt erfolgt, um die von den EE7 AK (Schritt 1) gebundenen Apo E Moleküle zu markieren.

Der Antikörper muss auf eine Endverdünnung von 1:7407 gebracht werden. Pro well werden 100 µl der Antikörperverdünnung aufgetragen. Die Inkubation erfolgt für 2 Stunden bei 37° C. Auch nach dieser Inkubation wird wieder drei Mal mit Waschpuffer gewaschen.

6. Inkubation mit GAR-PO:

Der sekundäre Antikörper GAR-PO erkennt den polyklonalen AK (Schritt 5). GAR-PO muss auf eine Endverdünnung von 1:60000 gebracht werden. Die Verdünnung erfolgt wieder mit Blockingpuffer. Es werden 100 µl der Verdünnung pro well aufgetragen. Nun wird für nur 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Es wird drei Mal wie in den vorigen Schritten gewaschen.

7. Photometrische Messung der enzymatischen Reaktion:

Der HRP-Substratpuffer für die Reaktion mit der Peroxidase (an den sek. AK gekoppelt) muss zwei Wochen vorher angesetzt werden. Um die Substratlösung für die anschließende Reaktion herzustellen, werden 25 ml gereinigtes Wasser mit 1 ml HRP-Substratpuffer, 1 ml H₂O₂ und 1 ml TMB sofort gut gemischt. Von der Substatlösung werden 250 μ l pro well pipettiert. Bei Inkubation im Dunkeln und bei RT entwickelt sich ein blauer Farbstoff. Nach 20 min wird die Reaktion mit je 50 μ l 2 M H₂O₂ gestoppt. Die Extinktion wird photometrisch im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt und ist proportional zur Apo E Konzentration der Probe.

2.3.3. Chromatographische Methoden

Gaschromatographie (GC): Bestimmung der Gesamtfettsäuren

Geräte:

Trockenschrank von Memmert Zentrifuge: sigma laboratory centrifuges 6 K 15 HP 5890 Series II Gaschromatograph (Agilent Technologies) mit HP 7673 B Autosampler (Agilent Technologies) HP 3356 ChemStation Chromatographische Bedingungen: Injector 250° C, split/splitless purge off 90 sec., septum purge: 1 ml/min; split 1:20 Injektionsvolumen 1 µl Säule DB–225; 30 m x 0,25 mm; 0,25 µm Filmdicke (J & W, Agilent) Constant Flow 1,5 ml/min, Helium T₀ 70° 1 min; 20° C/min bis 180° C; 3° C/min bis 238° C; 22,57 min hold; Gesamtzeit 54 min Detektor FID 300° C Verarbeitende Software HP-ChemStation

Material:

Zentrifugenröhrchen mit Deckel, vorgespült mit Hexan, Schott Mikroeinsatz G 301s/6 mm (CS-Chromatographie Service GmbH) Flasche R 1, braun/6.2 mmBF (CS-Chromatographie Service GmbH) Bördelkappe R 11-1.0/HP (CS-Chromatographie Service GmbH) Heptadecansäure (17:0, 200 mg/l in Ethanol), als interner Standard, Fluka BHT(Butyl-Hydroxy-Toluol)-Lösung (0,1 M in Ethanol) = 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol von Fluka Chemika als Antioxidationsmittel Methanol/Toluol Gemisch 4:1 p.A. oder HPLC-Qualität Acetylchlorid, Fluka 6%ige Natriumcarbonatlösung, 30 g Na₂CO₃ wasserfrei p.A. Merck ad 500 ml H₂O Hexan, SuperSolv, Merck

Methode:

Mit dieser Methode wird die Konzentration der Plasmafettsäuren bestimmt, dabei werden alle freien und chemisch gebundenen Fettsäuren erfasst und als Fettsäuremethylester gemessen. Daher müssen vor der GC-Messung die Fettsäuren in die entsprechenden Methylester überführt werden.

Die Gaschromatographie ist eine empfindliche Methode, mit der sich Gase und flüchtige Substanzen bestimmen lassen. Das Prinzip beruht darauf, dass ein inertes Trägergas durch eine Säule strömt und die zu analysierenden Substanzen nach Siedepunkt und/oder Polarität aufgetrennt und diese dann im Gasstrom detektiert werden. Als Trägergas wird Helium verwendet. Die Detektion erfolgt durch Flammenionisation. Aufgrund der Auftrennung in der Säule verlassen die Fettsäuren der Probe die Säule zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Sie verbrennen über der Flamme und setzten dabei Ionen frei. Diese bilden in einem durch die Flamme gehenden elektrischen Feld einen Strom. Dieser wird verstärkt und der Datenverarbeitung zugeführt. Es werden Zeitpunkt und Stärke der Ionisation in der Flamme festgehalten (über die Stärke des Stromflusses) und darüber die spezifische Fettsäure und ihre Konzentration bestimmt. Die gemessene Stromstärke ist der Konzentration der zu bestimmenden Stoffe proportional.

Durchgeführt wird stets eine Dreifachbestimmung. 50 μ I Probe werden in ein Pyrexröhrchen pipttiert. Dazu werden 100 μ I Heptadecansäurelösung als interner Standard pipettiert. Als Antioxidationsmittel werden je 25 μ I BHT-Lösung hiunzugegeben. 2 ml Methanol-Toluol-Gemisch (4:1) werden hinzugefügt. Vorsichtig und bei gleichzeitigem vortexen werden mit einer Pipette 200 μ I Acetylchlorid hinzugegeben. Dabei ist eine Schutzbrille zu tragen, da es sich um eine stark exotherme Reaktion handelt und das Reaktionsgemisch verspritzen kann. Nach der Zugabe des Acetylchlorides wird das Gefäß dicht verschlossen und in den Trockenschrank gestellt. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 80° C lässt man das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend wird mit 5 ml 6%iger Natriumcarbonatlösung neutralisiert. Das Gefäß wird wieder verschlossen und 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Danach werden aus der oberen Phase ca. 150-200 μ I in den Mikroeinsatz pipettiert. Diesen stellt man in eines der braunen Fläschchen und verschließt es mit der Bördelkappe.

Damit ist die Vorbereitung der Probe abgeschlossen und die Messung kann beginnen. Die Proben können auch in dieser Form bei – 80° C eingefroren und später vermessen werden.

Es können mehr als 20 Substanzen registriert werden, die je nach Kohlenstoffanzahl und Doppelbindungen aus der Säule eluiert werden.

Nach der Messung wird die Probe mit Hilfe entsprechender Software (HP-ChemStation) und einem Personalcomputer ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgt nach der internen Standardmethode. Die HP-ChemStation gibt für jedes Chromatogramm einen Report aus, der die Bestimmung und die Konzentration der Fettsäuren in µg/ml bezogen auf die eingesetzte Probe angibt. Die gemessenen Konzentrationswerte sind trotz Kalibrierung Schätzwerte, die einen Messfehler von ca. 20 % beinhalten können.

High Performance Liquid Chromatographie (HPLC): Messung von Vitamin A und E

Geräte:

Agilent 1100 isokratisches Chromatographiesystem (Agilent)

Detektion von Vitamin A: Diodenarray Detektor (Agilent) für Vitamin A Messung bei 325 nm Säule: Prevail C 18 5µ 150 mm x 4,6 mm; Vorsäule: 4,6 mm, Alltech Eluent: Acetonitril/Methanol 3:1; Fluss: 1,2 ml/min; 35° C Injektionsvolumen: 100 µl Externer Standard: 2 Punktkallibrierung mit 0,236 µmol/l und 1,89 µmol/l Retinol in Ethanol

Detektion von Vitamin E: Elekrochemischer Detektor (ESA Coulochem II) für Vitamin E Messung; Zellenpotentiale: Oxidation (E2) 600 mV; Reduktion und Nachweis (E1) – 150 mV; Bereich: 100 μA; Dämpfung 10 sec. Säule: LiChroCART 250-4 HPLC Cartridge, LiChrospher 100 RP-18 (5 μm); Vorsäule: 4 mm Eluent: Methanol/Propanol/Ethanol 720:80:200; Fluss: 1,5 ml/min; Raumtemperatur Injektionsvolumen: 100 μl Externer Standard: 3-Punktkallibrierung mit 0,79 μmol/l; 2,36 μmol/l und 3,94 μmol/l α-Tocopherol Verarbeitende Software Agilent ChemStation Tischzentrifuge Sigma 1-15 K Vortexer VF 2 von Janke & Kunkel

Material:

Ethanol p.A. oder HPLC-Qualität n-Hexan, SupraSolv, Merck

Methoden:

Für die Messung von Vitamin A und E steht als Methode die HPLC zur Verfügung. Die Vitamine werden aus dem Plasma mit Hexan exrahiert. Die zentrifugierte Hexanphase wird eingedampft und mit Ethanol gelöst. Die HPLC pumpt die Proben nach Verlassen des Injektors über eine Trennsäule. Die in der Probe befindlichen Analyten werden mit fallender Polarität eluiert, d. h. lipophile Substanzen haben eine längere Retentionszeit als weniger lipophile. Die Substanzen passieren anschließend die Detektoren. Vitamin E wird in einem elektrochemischen Detektor durch Reduktion detektiert. Die bei der Reduktion bewegte Ladung ist der Konzentration des Vitamins proportional. Vitamin A wird in einem Diodendarray-Detektor detektiert, dessen UV-Absorption proportional zur Vitamin A Konzentration ist. Bei der Detektion für die Bestimmung von Vitamin A wird die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 325 nm gemessen.

Durchführung: Vor der Messung müssen die Proben aufbereitet werden. Pro zu vermessender Probe werden je zwei Eppendorfgefäße mit 100 µl der Probe, 100 µl Ethanol und 500 µl n-Hexan bestückt. Es wird eine Doppelbestimmung gemacht. Jedes Gefäß wird dann 1 min gevortext. Anschließend werden die Ansätze 3 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden 400 µl vom Überstand abpipettiert, unter Stickstoffzufuhr verdampft und mit 1000 µl Ethanol gelöst.

Die Proben können nun vermessen werden oder sorgfältig mit Parafilm verschlossen und bei – 80° C gelagert werden.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob im Plasma kleine Apo Al-haltige Partikel dargestellt werden können, die essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine über die Bluthirnschranke ins ZNS bringen könnten.

Die Arbeit wurde in fünf Arbeitsschritte untergliedert.

- 1 Zuerst wurde das humane Plasma als Ausgangsmaterial charakterisiert, indem die Konzentration von TG, Cholesterin und Apolipoprotein AI gemessen und eine Apo E-Typisierung durchgeführt wurde.
- 2 Die zur FPLC eingesetzte Gelfiltrationssäule wurde mit isolierten Lipoproteinen kalibriert.
- 3 Nach der Kalibrierung der Säule erfolgte die Isolierung und Charakterisierung der lipoproteinhaltigen Fraktionen des humanen Plasmas.
- 4 Zur weiteren Aufreinigung der Partikel wurden mit der Affinitätschromatographie mit anti-Apo AI-Antikörpern spezifisch Apo AI-haltige Partikel isoliert.
- 5 Das Eluat der Affinitätschromatographie wurde im Bezug auf den Apolipoproteinund Lipidgehalt charakterisiert. Dieser fünfte Abschnitt präsentiert den Hauptteil des Ergebnisteils dieser Arbeit.

3.1. Charakterisierung des eingesetzten Plasmas

Zur Charakterisierung des Ausgangsmaterials dieser Arbeit wurden die Konzentrationen der Lipide und Lipoproteine im Nüchternplasma der gesunden weiblichen Probandin bestimmt. Die Messungen ergaben folgende Konzentrationen; die Normwerte sind in eckigen Klammern angegeben:

Triglyzeride: 141 mg/dl [< 150 mg/dl] Cholesterin, gesamt: 164 mg/dl [< 190 mg/dl] LDL-Cholesterin: 89 mg/dl [< 130 mg/dl] HDL-Cholesterin: 46 mg/dl [> 45 mg/dl]

Die Konzentration des Apolipoproteins Apo AI betrug 120 mg/dl und lag damit im Normbereich von 100 bis 210 mg/dl. Die Probandin hatte den Apo E Genotyp ɛ3/ɛ3. Es handelte sich bei dem verwendeten Ausgangsmaterial folglich um Plasma mit normalen Lipidparametern. Für alle Experimente wurde das Plasma derselben Probandin verwendet.

3.2. Kalibrierung der FPLC-Säule (Superdex TM 200) mit Lipoproteinfraktionen

Zur Kalibrierung der FPLC-Säule wurde die Gelfiltration mit LDL, HDL und HDL₃ durchgeführt. Die Lipoproteinfraktionen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugantion hergestellt und mir vom Institut zur Verfügung gestellt. Das Lipid- und Proteinprofil der Gelfiltrationsläufe (Abb. 1) wurde mit den Ergebnissen der sich im nächsten Schritt anschließenden Gelfiltration des Plasmas (Abb. 4) verglichen.



Abb. 1 Kalibrierung der Gelfiltration mit aufgereinigten LDL, HDL und HDL3 Partikeln

Nach der Auftrennung von 1 ml der entsprechenden Partikel mittels Gelfiltration wurden die Konzentrationen von Cholesterin (in mg/dl; linke y-Achse) und Protein (in mg/ml; rechte y-Achse) bestimmt. Die Fraktionen der Gelfiltration finden sich auf der x-Achse.

a) LDL-Partikel: Fraktionen 5 bis 8 zeigen den LDL-Peak an. b) HDL-Partikel: innerhalb der Fraktionen 16 bis 22 sind drei Peaks erkennbar, bezeichnet mit I, II, III. c) HDL₃-Partikel: Fraktionen 19 bis 28 zeigen den HDL₃-Peak. Die Proteinkonzentrationskurve zeigt zwei Höchstwerte; bei Fraktion 25 und 36. Diese Peaks wurden weitergehend analysiert. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Kalibrierung der Säule ergab folgende Ergebnisse: die Höchstwerte der Stoffkonzentrationen um Fraktion 5 bis 8 verdeutlich in Abb. 1 a), dass sich in diesen Fraktionen die LDL-Partikel befinden. Folglich befinden sich in diesen Fraktionen Partikel mit einer Größe von 15 bis 25 nm. 1 b) zeigt in den Fraktion 16 bis 22 die Verteilung der HDL-Partikel. Die Cholesterinkonzentrationskurve zeigt, dass es sich hier um drei Teilpeaks handelt. Diese Kurve spricht für ein Partikelgemisch aus HDL unterschiedlicher Dichte. Die Größe der Partikel dieser Fraktion beträgt 9 bis 11 nm. Wobei sich vermutlich hinter dem Teilpeak I und II HDL_{2a} und HDL_{2b} verbergen, und der Teilpeak III von HDL₃ gebildet wird. Abb. 1.c) zeigt die Fraktionierung der HDL₃-Partikel nach Gelfiltration. Es ist ein Peak in den Fraktionen 19 bis 28 erkennbar, entsprechend ihrer Größe sind hier die HDL₃-Partikel zu finden. Sie sind 8 bis 9 nm groß. Aufgrund der Streuung der HDL-Partikel ist auch hier von einer geringfügigen Beimischung von HDL₂-Partikeln auszugehen.

Zur Vervollständigung der Größenbestimmung des Plasmaprofils wurden zwei weitere Marker eingesetzt: das Plasmaprotein Albumin (66 kDa); Abb. 2 a) und delipidierte HDL; Abb. 2 b). Delipidiert HDL₂ enthält fast ausschließlich Apo Al und hat somit ein Molekulargewicht von 28 kDa. Die Gelfiltration von delipidierter HDL₂ zeigt daher, in welchen Fraktionen freies Apo Al zu finden ist (Abb. 2 b).

Da sich das freie Apo AI in den Fraktionen um 39 befindet, ist anzunehmen, dass sich die gesuchten Apo AI-haltigen Partikel in den Fraktionen davor, welche größere Molekulargewichte enthalten, befinden.



Abb. 2 Gelfiltration von Albumin und delipidierter HDL_2 und Identifizierung der proteinhaltigen Fraktionen

Jeweils 1 ml Albumin (2 mg/ml) und delipidierte HDL_2 wurden mittels Gelfiltration in 50 Fraktionen aufgetrennt. In diesen Fraktionen wurde der Gehalt an Protein bestimmt. Dargestellt sind die proteinhaltigen Fraktionen 30 bis 50. Man erkennt eine Proteinkonzentrationspeak der Albuminauftrennung um Fraktion 36 und der delipidierten HDL-Auftrennung um Fraktion 39.

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem Proteinpeak in Fraktion 39 der delipidierten HDL₂-Gelfiltration um Apo AI handelt, wurde eine SDS-PAGE mit Coomassiefärbung durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Fraktionen 25 und 36 der HDL₃-Gelfiltration (Abb. 1 c) analysiert. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse der Spezifizierung des Proteingehaltes dieser Fraktionen.



Abb. 3 Spezifizierung des Proteingehaltes ausgesuchter Fraktionen nach Gelfiltration der HDL₃-Partikel und der delipidierten HDL₂.

Analysiert werden sollten die Fraktionen 25 und 36 der HDL₃-Gelfiltration und die Fraktion 39 der Gelfiltration von delipidierter HDL. Dazu wurden jeweils 10 µg und 30 µg Protein der zu untersuchenden Fraktionen in einem 12,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Des weiteren wurde ein Marker (RPN 800 Batch 41 "Full range Rainbow") zur Darstellung der molekularen Standardgrößen, sowie 5 µl präparierte HDL-Partikel und 10 µl BSA als Positivkontrollen aufgetragen. Man erkennt, dass es sich bei dem gemessenen Protein der Fraktion 39 der delipidierten HDL um Apo Al handelt. Ebenso ist Apo Al in der Fraktion 25 der HDL₃-Partikel Gelfiltration nachweisbar. Bei dem gemessenen Protein in Fraktion 36 der HDL₃-Partikel Gelfiltration handelt es sich um Albumin.

Die Abbildung zeigt, dass es sich bei dem Protein der Fraktion 39 der delipidierten HDL-Gelfiltration um freies Apo AI handelt. In der Fraktion 25 der HDL₃-Partikel-Gelfiltration ist lipidassoziiertes Apo AI nachweisbar. Der Vergleich des aufgetragenen Proteins der Fraktion 36 der HDL₃-Partikel-Gelfiltration mit der BSA-Positivkontrolle lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um Albumin handelt, welches ebenfalls in der HDL₃-Präparation vorhanden ist. Des weiteren ist Apo C in der Positivkontrolle von HDL₂ und in der Fraktion 25 der HDL₃-Gelfiltration zu erkennen.

Nach dieser Kalibrierung der FPLC-Säule kann nun zur Gelfiltration des zu untersuchenden humanen Plasmas und zur Analyse der Plasmafraktionen übergegangen werden.

3.3. Auftrennung der Plasmapartikel mittels FPLC und Charakterisierung der Fraktion

Als Ansatz zur Gewinnung kleiner Apo Al-haltiger Partikel wurden die Partikel in je 1 ml Plasma mittels Gelfiltration mit der FPLC-Säule nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt. Die Versuchsbedingungen entsprachen denen der Kalibrierung. Die größten Partikel befanden sich in den ersten und die kleinsten Partikel in den letzten Fraktionen. In den Fraktionen 1 bis 50 wurden die Konzentrationen von Cholesterin, TG, Protein und FFA bestimmt und in Abb. 4 dargestellt.

Die Abbildung zeigt eine normale Verteilung der Lipoproteinfraktionen in humanem Plasma nach Gelfiltration. Die Konzentrationsprofile ermöglichen das Auffinden von lipid- und proteinhaltigen Fraktionen und eine Aussage über die relative Partikelgröße in den einzelnen Fraktionen.

Die Konzentrationshöchstwerte des Plasmaprofiles um Fraktion 7 entsprechen dem Peak der Stoffkonzentration der Gelfiltration der LDL-Partikellösung (Abb. 1 a). Dabei kann es sich im Plasma um LDL und VLDL handeln, welche von der hier verwendeten Gelfiltrationssäule in diesem Partikelgrößenbereich nicht getrennt werden können.

Der Konzentrationspeak im Plasmaprofil zwischen den Fraktionen 18 und 30 entspricht den Peaks der Gelfiltration von HDL und HDL₃.

Wichtig für diese Arbeit ist die Bestimmung dieses HDL-Peaks, da dieser durch seinen Endpunkt den Anfang der Fraktionen markiert, die die kleinen Apo Al-haltigen Partikel enthalten könnten. HDL₃ selbst enthält noch Apo E. Daher musste sichergestellt werden, dass sich HDL₃ nicht in den Fraktionen befand, die für die Materialgewinnung für die folgenden Analysen genutzt wurden.



Abb. 4 Gelfiltration zur Auftrennung von Partikeln aus humanem Plasma Nach der Gelfiltration mittels FPLC von 1 ml humanem Plasma wurde in den Fraktionen 1 bis 50 (x-Achse) die Konzentrationen von FFA, TG, Cholesterin (in mg/dl; linken y-Achse) und Protein (in mg/ml; rechten y-Achse) bestimmt. Die Abbildung zeigt die normale Verteilung der gemessenen Stoffkonzentration in den 50 Fraktionen von humanem Plasma nach Gelfiltration.

Da neben der molekularen Größe auch die Apolipoproteinen von Interesse für die Auswahl der Partikel war, wurde im folgenden die Apolipoproteinverteilung in den Fraktionen 21 bis 48 mittels Western Blot analysiert. Gesucht wurden Apo Al-haltige Partikel, die frei von Apo E sind, da Apo E nicht bluthirnschrankengängig ist. Auch Apo All wurde in die Analyse miteinbezogen, weil Apo Al und Apo All Heterodimere ausbilden können.

Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen die Abbildungen 5 a) und b).



Abb. 5 Apolipoproteinverteilung in den Plasmafraktionen 21 bis 48

Die Proteine wurden mit 50 µg (Fraktion 21 bis 38) und 40 µg (Fraktion 31 bis 48) pro Spur aufgetragen und per SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt. Die molekularen Standardgrößen sind auf der linken Seite (RPN 800 Batch 41 "Full range Rainbow" Marker (M)), die analysierten Apolipoprotein auf der rechten Seite der Abbildung dargestellt. In Abb. 2 a) wurden Apo AI und Apo E, für Abb. 2 b) Apo AI und Apo AII per Western Blot detektiert. Apo E ist bis Fraktion 31, Apo AI ist in allen Fraktionen und Apo AII bis zur Fraktion 39/40 detektierbar. Die HDL-haltigen Fraktionen sind gesondert gekennzeichnet (vgl. Abb. 1 und 4).

In Abb. 2 a) wurden die Apolipoproteine Apo AI und Apo E detektiert, da zunächst von Interesse war, bis zu welcher Partikelgröße, entsprechend der Fraktion, Apo E nachweisbar war. Für Abb. 2 b) wurden Apo AI, Apo AII und Apo E detektiert. Apo E ist hier nicht dargestellt, da sich die Ergebnisse aus Abb. 2 a) wiederholten und somit bestätigen ließen. Die Signale der jeweiligen Western Blots verdeutlichen in welchen Lipoproteinfraktionen die untersuchten Apolipoproteine enthalten sind. So ist das Signal von Apo E bis Fraktion 31 erkennbar. Für Apo AII ist das Signal bis zur Fraktion 39/40 erkennbar. Wichtig für die nun folgenden Experimente ist, dass Apo AI in allen Fraktionen detektierbar ist.

Um die per Western Blot gewonnenen semiquantitativen Ergebnisse bezüglich der Verteilung von Apo E zu verifizieren, wurde ein weiteres Analyseverfahren angewandt. Es folgte die Messung von Apo E in den 50 Fraktionen nach Gelfiltration mittels Apo E ELISA.



Abb. 6 Messung von Apo E in den Plasmafraktionen 1 bis 50 nach Gelfiltration mittels Apo E ELISA

1 ml Plasma wurde mittels Gelfiltration in 50 Fraktionen aufgetrennt und die Fraktionen durch einen Sandwich-ELISA auf ihren Gehalt an Apo E untersucht. Die Abbildung zeigt die Extinktionswerte. Die Werte spiegeln die Verteilung der Apo E Konzentration wider. Man erkennt einen Anstieg der Konzentration bei Fraktion 4 und einen Abfall der Konzentration von Fraktion 27 bis 33. Ab Fraktion 33 ist Apo E nicht messbar. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Weitere Erläuterung zur Abbildung im Text.

Das Ergebnis diese Apo E ELISA bezüglich der Verteilung von Apo E stimmt mit denen des Western Blots ab Fraktion 21 (Abb. 5 a) überein. Die leichte Verschiebung der Nachweisgrenze zu den Fraktionen hin, die kleineren Partikel enthalten, ist auf die höhere Sensitivität des ELISA zurückzuführen. Hervorzuheben ist, dass die Abbildung 6 die Apo E-Verteilung auf die jeweiligen VLDL/LDL- bzw. HDL-Peaks nicht zu erkennen gibt. Demnach wären auch bei der Messung der Konzentration von Apo E mittels ELISA eine Darstellung von zwei Peaks zu erwarten gewesen, worauf in der Diskussion noch eingegangen wird.

Nach der Charakterisierung des Ausgangsmaterials durch die Gelfiltration wurde zur spezifischen Gewinnung der Apo Al-haltigen Partikel übergegangen.

3.4. Gewinnung kleiner Apo Al-haltiger Partikel mittels Affinitätschromatographie

Die gesuchten Apo Al-haltigen Partikel sollten kleiner als HDL₃-Partikel sein und kein Apo E enthalten. Darum wurden zu deren Gewinnung die Fraktionen ab Fraktion 31 der Gelfiltration des humanen Plasmas gepoolt (vgl. Abb. 4 und 5). Denn bei dieser Fraktion endete der zuvor definierte HDL₃-Peak (Abb. 1 c) und Apo E war nicht mehr detektierbar (Abb. 5 a und 6). Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge des Analysematerials wurden zehn Gelfiltrationsläufe durchgeführt und jeweils die Fraktionen 31 bis 48 zusammengefügt und aufkonzentriert. Dieses Konzentrat stellte das Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie (Abb. 7) dar.



Abb. 7 Schematische Darstellung des Prinzips der Aufreinigung kleiner Apo Al-haltiger Partikel mittels Affinitätschromatographie

Die Abbildung zeigt schematisch das Prinzip der Affinitätschromatographie. Es beruht darauf, dass Antikörper gegen Apo AI an die Sepharose der Chromatographiesäule gekoppelt sind. Auf die Säule wurden gepoolte Plasmafraktionen (= Pool) der Gelfiltration gegeben. Während der Inkubationszeit binden die in diesem Fraktionspool enthaltenen Apo AI-haltigen Partikel an die Antikörper auf den Sepharosekügelchen. Nach der Inkubationszeit wird die Ausgangslösung abgelassen und als Durchlauf aufgefangen. Bei dem dann folgenden Waschschritt werden alle nicht gebundenen Plasmabestandteile ausgewaschen und aufgefangen und stehen zur Analyse als Waschlösung bereit. Nachdem die Säule mehrmals gewaschen wurde, wird die Bindung zwischen Antikörper und Apo AI mittels pH-Wertverschiebung getrennt. Die Apo AI-haltigen Partikel befinden sich im Eluat. (Quelle: world wide web)

Abb. 7 schematische Darstellung Prinzips zeigt die des der Affinitätschromatographie. Die Affinitätschromatographiesäule besteht aus Sepharose, an welche Antikörper gegen Apo Al gekoppelt sind. Auf die Säule wurden die gepoolten Plasmafraktionen nach Gelfiltration (Pool) gegeben. Während der Inkubation binden die Antikörper der Säule Apo Al-haltige Partikel. Nach der Inkubationszeit wurde der Durchlauf aufgefangen. Die unspezifisch gebundenen Plasmabestandteile befanden sich in der Waschlösung. Die Verbindung zwischen Antikörper und Apo Al wurden mittels pH-Wertverschiebung durch einen sauren Glycinpuffer gelöst und die Apo Al-haltigen Partikel konnten eluiert werden. Der pH-Wert wurde in den Fraktionen mittels 1M Trispuffer (pH 8,5) neutralisiert, um eine Denaturierung der Proteine im Eluat zu verhindern.

Um sicherzustellen, dass die Affinitätschromatographie erfolgreich war, wurden die Eluatfraktionen per Western Blot auf ihren Gehalt an Apo AI untersucht. Die Abb. 8 zeigt das Ergebnis der durchgeführten Analyse gegen Apo AI und Apo AII.



Abb. 8 Apolipoproteinidentifizierung in den Eluatfraktionen

Zur Identifizierung der Apolipoproteine im Eluat nach Affinitätschromatographie wurden die Eluatfraktionen (1 bis 6) zu je 10 µg Protein pro Spur aufgetragen und per SDS-PAGE (12,5 %) aufgetrennt. Als Marker wurde der RPN 800 Batch 41 "Full range Rainbow" verwendet. Die molekularen Standardgrößen sind an der rechten Seite, die untersuchten Apolipoproteine an der linken Seite der Abbildung gezeigt. Die Identifizierung der Apolipoproteine erfolgte per Western Blot gegen Apo AI und Apo AII. Sowohl für Apo AI wie auch für Apo AII lassen sich deutliche Signale erkennen.

Sowohl für Apo AI wie auch für Apo AII lassen sich in allen untersuchten Eluatfraktionen deutliche Signale erkennen, welche das Vorhandensein der beiden untersuchten Apolipoproteine zeigen. Die Eluatfraktionen wurden gepoolt und standen nun als Eluat zur Analyse bereit.

3.5. Charakterisierung des Affinitätschromatographieeluates

3.5.1 Apolipoproteinanalyse des Eluates

Im weiteren Verlauf der Analyse der Apolipoproteine wurden jeweils das humane Plasma, die gepoolten Gelfiltrationsfraktionen 31 bis 48 von zehn Läufen und das Eluat der Affinitätschromatographie auf ihren Gehalt an Apolipoproteinen verglichen. Diese drei Proben werden im folgenden stets als Plasma (1), Pool (2) und Eluat (3) bezeichnet.

Um die Apolipoproteine des Eluates zu charakterisieren wurden die drei Proben zunächst auf ihren Gehalt an Apo AI, Apo AII und Apo E mittels Western Blot untersucht.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigt Abb. 9. In Plasma, Pool und Eluat ist Apo Al nachweisbar. Somit war der Aufreinigungsprozess per Affinitätschromatographie erfolgreich. Dieses Ergebnis bestätigt die in Abb. 8 getroffene Aussage.

Der Western Blot des Gradientengels gegen Apo AII zeigt ein Signal für Apo AII in allen drei Spuren. Das Ergebnis entspricht ebenfalls dem von Abb. 8. Apo E zeigt im Plasma ein Signal, ist jedoch im Pool nicht detektierbar. Im Eluat zeigt sich ein unspezifisches Signal, welches bezogen auf die molekulare Größe nicht exakt dem des Plasmasignals entspricht. Bei diesem Signal handelt es sich um eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers (+); eventuell um eine Kreuzreaktion mit den Antikörpern der Affinitätschromatographiesäule (DaSh-PO).



Abb. 9 Western Blot von Plasma, Pool und Eluat gegen Apo Al, Apo All und Apo E

Um die Apolipoproteine des Eluates zu identifizieren, wurden die Proteine von Plasma (1), Pool (2) und Eluat (3) mit einer Menge von je 10 µg aufgetragen und in einem Gradientengel (4 - 12%) elektrophoretisch aufgetrennt. Des weiteren wurde auch ein Marker (See Blue Plus 2 LC 5925) aufgetragen. Anschließend erfolgte die Detektion der Apolipoproteine mittels Western Blot. Man erkennt, dass in Plasma, Pool und Eluat Apo AI und Apo AII nachweisbar sind. Der Western Blot gegen Apo E zeigt, dass Apo E im Plasma ein Signal gibt, jedoch im Pool (2) nicht detektierbar ist. Im Eluat (3) zeigt sich ein breites Signal, welches, wie weitere Analysen zeigten, auf einer Kreuzreaktion des sekundären basiert.

Dies konnte im folgenden Western Blot (Abb. 10) bewiesen werden. Das schwarze Viereck in Abb. 10 a) stellt den Ausschnitt des in Abb. 9 gezeigten Western Blot gegen Apo E dar. Plasma, Pool und Eluat wurden in 10 a) mit einem primären Antikörper gegen Apo E und dem sekundären Antikörper "goat anti rabbid Peroxidase" (GaR-PO) inkubiert (vgl. Abb 9). In 10 b) wurde als Kontrolle nur mit dem sekundären Antikörper GaR-PO inkubiert. Die Ergebnisse der beiden Blots stehen sich in dieser Abb. 10 gegenüber.



Abb. 10 Kontrolle des sekundären Antikörpers GaR-PO

Plasma (1), Pool (2) und Eluat (3) wurden jeweils mit 10 µg Protein pro Spur auf ein Gradientengel aufgetragen. a) Inkubation mit primärem Antikörper gegen Apo E und sekundärem Antikörper GaR-PO. b) Inkubation nur mit sekundärem Antikörper GaR-PO. Das Bandenmuster im Eluat bei a) ähnelt dem Signalmuster des Eluates nur mit sekundärem Antikörper GaR-PO (b). In den Spuren von Plasma und Pool sind bei der Inkubation nur mit GaR-PO (b) keine Signale sichtbar. Das Viereck in a) stellt den Ausschnitt des in Abb. 9 gezeigten Western Blot gegen Apo E dar.

Der Western Blot in (a) zeigt eine Bande im Plasma, jedoch kein Signal im Pool. Demnach kann auch das Eluat kein Apo E enthalten. Das auffällig breitgefächerte Bandenmuster im Eluat ähnelt dem Signalmuster des Eluates in (b). Dieser Vergleich bestätigt die oben angestellte Vermutung, dass es sich bei dem unspezifischen Signal in Abb. 9 um eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers GaR-PO handelt. Diese Kreuzreaktion ist reproduzierbar und bei folgenden Analysen mittels des sekundären Antikörpers "GaR-PO" zu berücksichtigen. Zur weiteren Charakterisierung des Eluates, wurden die Apolipoproteine AIV und AV in Plasma, Pool und Eluat mittels Western Blot identifiziert (Abb.11). Apo AIV kann im Plasma und im Pool detektiert werden. Ein Signal im Eluat ist nur sehr schwach sichtbar. Apo AV konnte nicht detektiert werden, da Apo AV selbst im Plasma nur in sehr geringer Konzentration vorliegt.



Abb. 11 Western Blot gegen Apo A IV und Apo A V

Zur Detektion dieser Apolipoproteine wurden die Proteine von Plasma (1), Pool (2) und Eluat (3) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Apolipoproteine per Western Blot identifiziert. Die molekularen Größenangaben befinden sich in der Abbildung links. Apo A IV kann in Plasma und Pool detektiert werden. Ein Signal im Eluat ist nur sehr schwach sichtbar. Apo A V konnte nicht detektiert werden.

Weiterhin wurden die Apolipoproteine Apo D, Apo H und Apo J in Plasma, Pool und Eluat durch Western Blots untersucht. Abbildung 12 zeigt die zusammengestellten Ergebnisse der Western Blots gegen Apo D, Apo H und Apo J.


Abb. 12 Western Blot gegen Apo D, Apo H und Apo J

Zur Detektion dieser Apolipoproteine wurden die Proteine von Plasma (1), Pool (2) und Eluat (3) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Apolipoproteine per Western Blot identifiziert. Die molekularen Größenangaben befinden sich in der Abbildung links. Die Pfeile kennzeichnen die molekulare Größe des jeweiligen Apolipoproteins. Bei allen Blots lässt sich das jeweilige Apolipoprotein im Plasma identifizieren. Beim Western Blot gegen Apo D kann man auch ein Signal in der Spur des Pools ausmachen. Auch für Apo H ist ein Signal im Pool erkennbar. Der Western Blot des Eluats (3) gegen Apo D und Apo H ergibt ein Signal fast auf der gesamten Länge der Spur. Dabei handelt es sich um eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers Gar-PO (vgl. Abb. 10 b). Der Western Blot gegen Apo J zeigt im Plasma ein Signal bei 70 kDa, bei dem es sich um Apo J handelt. Im Pool erscheint kein Signal. Als sekundärer Antikörper wurde hier GaM-PO verwendet.

Die drei Pfeile in der Abbildung kennzeichnen die molekulare Größe des jeweilig identifizierten Apolipoproteins (Apo D = 33 kDa, Apo H = 54 kDa, Apo J = 70 kDa). Apo D und Apo H sind jeweils im Plasma und im Pool detektierbar; Apo J befindet sich nur im Plasma.

Apo AI, Apo AII und Apo E wurden zusätzlich in einem "nichtreduzierten Gradientengel" analysiert. Dabei wurden die Proben (Plasma, Pool und Eluat) nicht mit ß-Mercaptoethanol inkubiert, so dass eventuell vorhandene Disulfidbrücken erhalten blieben und somit Polymerisierungen darstellbar wären. Der Western Blot des nichtreduzierten Gradientengels wird in Abb. 13 dargestellt.



Abb. 13 Western Blot gegen Apo Al, Apo All und Apo E mit nicht reduzierten Proben (WB von Apo All ist ein Teilausschnitt aus Abb. 14)

Plasma (1), Pool (2) und Eluat (3) wurden unreduziert mit einem Proteingehalt von 10 µg aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennten. Der Blot gegen Apo E zeigt ein Signal nur im Plasma (Kommentar; siehe Text). Apo Al ist im Plasma, sowie in Pool und Eluat nachweisbar. Ebenso ist Apo All in allen drei Spuren detektierbar.

Der Western Blot gegen Apo E zeigt nur im Plasma eine Bande; im Eluat traten auch hier die bereits bekannten sekundären Antikörperreaktionen auf (hier nicht gezeigt).

Apo AI ist im Plasma, sowie in Pool und Eluat nachweisbar. Ebenso ist Apo AII in allen drei Spuren detektierbar. Die zuvor gewonnenen Ergebnisse (vgl. Abb. 9) lassen sich also auch im nichtreduzierten Gel reproduzieren.

Die nun folgende Abbildung 14 zeigt den gesamten Western Blot gegen Apo All des nichtreduzierten Gradientengels (vgl. Abb. 13). Sie soll verdeutlichen, dass es sich bei dem in Abb. 13 gezeigten Signal in der Eluatspur tatsächlich um Apo All handelt und nicht um eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers (DaG-PO), wie sie zuvor bei den Western Blots gegen Apo E aufgetreten war.



Abb. 14 Western Blot des nichtreduzierten Gradientengels gegen Apo All mit Kontrolle des sekundären Antikörpers DaG-PO

Diese Abbildung dient dem Vergleich zwischen dem Western Blot des Gradientengels a) inkubiert mit primärem (gegen Apo AII) und sekundärem Antikörper (DaG-PO) und b) inkubiert mit dem sekundären Antikörper DaG-PO. Das weiße Viereck in a) stellt den Ausschnitt des Western Blots gegen Apo AII von Abb. 13 dar. a) zeigt ein vielfältiges Signalmuster, u. a. auch das Signal an der Stelle der molekularen Größe von Apo AII (bei 17 kDa), d. h. Apo AII ist in allen drei Proben detektierbar (siehe Viereck). Das Signal in der Eluatspur von b) zeigt, dass auch nur der sekundäre Antikörper bei Inkubation unspezifisch bindet. Beim Vergleich der Signale des Eluat in a) und b) lassen sich reale Apo AII Signale identifizieren, im Gegensatz zu denen, die nur durch den sekundären Antikörper hervorgerufen werden.

Diese Abbildung dient dem Vergleich zwischen dem Western Blot des Gradientengels a) inkubiert mit primärem (gegen Apo AII) und sekundärem Antikörper (DaG-PO) und b) inkubiert nur mit dem sekundären Antikörper DaG-PO. Das weiß gerahmte Viereck kennzeichnet den Ausschnitt des Western Blots gegen Apo AII von Abb. 13. Abb. 14 a) zeigt ein vielfältiges Signalmuster. Die zahlreichen Signale der Plasmaspur stellen die Auswirkung der ausgebliebenen Reduzierung dar. Viele Heteromerisierungen und Polymerisierungen sind erhalten geblieben. Die Banden die in Plasma, Pool und Eluat bei der Größe von ca. 8 kDa auftreten, stellen das Monomer von Apo AII, die Banden bei 17 kDa das Homodimer dar.

Das Signal in der Eluatspur von 14 b) zeigt eine Kreuzreaktion des sekundären Antikörpers. Beim Vergleich der Signale der Eluatspuren von a) und b) lassen sich

reale Apo AII Signale von sekundären Antikörperreaktionen trennen. Das Signal im Eluat a) bei 17 kDa spricht daher für das Vorhandensein von Apo AII.

Auch bei 28 kDa, dem Molekulargewicht von Apo AI, ist ein Signal in allen drei Proben erkennbar (→Apo AI). Fraglich ist, ob hier der Antikörper gegen Apo AII an Apo AI gebunden hat. Apo AI und Apo AII weisen Homologien in ihren Aminosäuresequenzen auf. Diese Homologie könnte eine Ursache für die Bindung des Antikörpers auch an Apo AI sein. Auch die Western Blots mit nicht reduzierten Proben zeigen, dass Apo AII im Eluat nach der Affinitätschromatographie gegen Apo AI identifiziert werden kann. Diese Tatsache lässt auf ein Verbindung zwischen Apo AI und Apo AII schließen. Bislang ist aber keine Aussage über die Art der Verbindung möglich.

Wie in Abbildung 5 deutlich wurde, nimmt die Konzentration von Apo All in den Fraktionen der Gelfiltration mit abnehmender Partikelgröße ab. Um die Untersuchungsbedingungen zu optimieren und einen Pool von Fraktionen mit geringerer Konzentration an Apo All zu erhalten, wurde die Gewinnung des Ausgangsmaterials im Fortgang der Arbeit verändert. Zunächst waren nach der Gelfiltration des Plasmas die Fraktionen 31 bis 48 gepoolt worden. Nun wurde dieser Pool geteilt in einen Pool A und einen Pool B. Pool A umfasste die Fraktionen 32 bis 37, Pool B die Fraktionen 38 bis 43. Durch diese Auftrennung wurde es möglich, die im Pool A vermuteten kleinen Partikel von den im Pool B vermuteten freien Apo Al Molekülen (vgl. Abb. 2 b) zu trennen. Wieder wurden Gelfiltrationsläufe mit dem selben humanem Plasma durchgeführt und die Konzentration von Protein und Cholesterin in den einzelne Fraktionen gemessen. Die Konzentrationsverteilung der Mittelwerte von fünf Läufen und die Standardabweichung zeigt Abb. 15 a). Mit dieser Abbildung soll die Reproduzierbarkeit der Konzentrationswerte von Cholesterin und Protein in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration dargestellt werden. Abb. 15 b) verdeutlicht die zu Pool A und Pool B zusammengefassten Fraktionen.



Abb. 15 a Reproduzierbarkeit der Gelfiltration von Plasmaproben Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Konzentrationen von Cholesterin in mg/dl und von Protein in mg/ml in 50 Fraktionen der Gelfiltration einer Plasmaprobe von fünf Läufen.





Neben der Darstellung der Fraktionen von Pool A (Fraktion 32 bis 37) und Pool B (Fraktion 38 bis 43) zeigt die Abbildung die Konzentrationen von Cholesterin in mg/dl und von Protein in mg/ml. Die Abbildung zeigt die normale Verteilung der gemessenen Stoffkonzentration in den 50 Fraktionen von 1 ml humanem Plasma nach Gelfiltration. Die jeweils zusammengefassten Fraktionen sind durch die Vierecke dargestellt.

Zur erneuten Gewinnung des zu untersuchenden Eluates wurden von jeweils sechs Gelfiltrationsläufen die Fraktionen 32 bis 37 (Pool A) und 38 bis 43 (Pool B) gepoolt und mittels Zentrifugation aufkonzentriert. Pool A und Pool B dienten dann wiederum als Ausgangsmaterial für die Affinitätschromatographie gegen Apo AI. Neben dem Eluat A und B wurden auch Waschlösung A und B und Durchlauf A und B aufgefangen (vgl. Abb. 7). Pool, Eluat und Durchlauf wurden auf ihren Gehalt an Apolipoproteinen hin untersucht. Diese Analyse des Eluates sollte wieder den Erfolg der Affinitätschromatographie zeigen. Zur Kontrolle diente die Analyse des Durchlaufes. Die Untersuchung von Pool A und Pool B als Ausgangsmaterial war dabei obligatorisch. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigt Abb. 16.



Abb. 16 Identifizierung der Proteine in Pool A und Pool B nach Affinitätschromatographie – Coomassie Gel

Aufgetragen wurden Pool A und Pool B sowie jeweils Eluat und Durchlauf nach Affinitätschromatographie (vgl. Abb. 7). Alle Proben wurden mit einem Proteingehalt von 20 μ g pro Spur aufgetragen. Als Kontrollen wurden der Marker (See Blue Plus 2 LC 5925), sowie BSA (2 mg/ml; 10 μ l), und eine HDL₂ Lösung (4 μ l) für die Positivkontrolle von Apo Al aufgetragen. BSA zeigt ein Signal bei 66 kDa. Sowohl in der HDL₂-Kontrolle, als auch in Pool A, Eluat A und Durchlauf A ist ein Signal für Apo Al (\leftarrow) erkennbar. Des weiteren färben sich Proteine, die Albumin oder Antikörpern der Affinitätschromatographiesäule entsprechen könnten, an. Die Identifizierung der Proteine mittels Western Blot zeigt Abb. 17.

Dazu wurden Pool A und B und jeweils Eluat und Durchlauf auf das Gradientengel geladen. Als Positivkontrollen dienten BSA und HDL₂. Die Proteine der Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Sowohl in der HDL₂-Kontrolle, als auch in Pool A, Eluat A und Durchlauf A ist ein Signal für Apo AI (\rightarrow Apo AI) erkennbar. Des weiteren färben sich Proteine, die oder fragmentierten Antikörpern (50 100 Albumin kDa: kDa) der Affinitätschromato-graphiesäule entsprechen könnten, an. Die Coomassiefärbung ist eine unspezifische Methode der Proteindarstellung. Die genaue Identifizierung der Proteine wurde mittels Western Blot gegen Apo AI, AII und E erreicht (Abb. 17).



Abb. 17 Western Blot gegen Apo Al, Apo All und Apo E

Aufgetragen wurden Pool A und Pool B sowie jeweils Eluat und Durchlauf nach Affinitätschromatographie (vgl. Abb. 7). Alle Proben wurden mit einem Proteingehalt von 20 µg pro Spur aufgetragen. Als Kontrollen wurden der Marker (See Blue Plus 2 LC 5925) für die Standardgröße verwendet; sie sind am linken Rand der Abb. verzeichnet. Am rechten Rand sind die Apolipoproteine aufgezeigt.

Der Western Blot gegen Apo E zeigt kein eindeutig identifizierbares Signal. Der Western Blot gegen Apo AI ergibt ein starkes Signalmuster für Pool A, das Eluat A und den Durchlauf A. In allen drei Proben ist Apo AI enthalten. Etwas schwächere Signale von Apo AI sind in Pool B, Eluat B und Durchlauf B zu erkennen. Der Western Blot gegen Apo AII zeigt, dass eine vergleichbare Verteilung von Apo AI und Apo AII in den untersuchten Proben vorliegt. Diese Abbildung lässt den Schluss zu, dass Apo AI und Apo AII miteinander verbunden sind.

Der Western Blot gegen Apo AI ergibt ein starkes Signalmuster sowohl für Pool A, als auch für das Eluat A und den Durchlauf A. In allen drei Proben ist Apo AI enthalten. Etwas schwächere Signale, entsprechend einer geringeren Menge an Apo AI, sind in Pool B, Eluat B und Durchlauf B zu erkennen. Diese Apo AI Signale waren von der Coomassiefärbung in Abb. 16 nicht erfasst worden. Die Konzentration von Apo AI hatte hier die Nachweisgrenze der Färbemethode unterschritten. Der Nachweis von Apo AI in Pool B weist auf das Vorkommen von freiem Apo AI in den Fraktionen 38 bis 43 hin. Der Western Blot gegen Apo AII zeigt, dass eine vergleichbare Verteilung von Apo AI und Apo AII in den untersuchten Proben vorliegt. Auch Apo AII lässt sich in Pool A, Eluat A und Durchlauf A in größerer Menge finden, als in Pool B, Eluat B und Durchlauf B. Im Vergleich mit dem Western Blot in Abb. 5 b) wird deutlich, dass im Pool B (Fr. 37 bis 43) weniger Apo AII vorhanden sein muss als im Pool A (Fr. 32 bis 37), da das Signal für Apo AII nur bis zur Fraktion 40 nachweisbar ist. Diskutiert werden muss jedoch das Auftreten von Apo AI und Apo AII im Durchlauf.

Der Western Blot gegen Apo E zeigt kein eindeutig identifizierbares Signal.

Das stete gemeinsame Auftreten von Apo AI und Apo AII im Eluat der Affinitätschromatographie gegen Apo AI bestätigt wiederum (vgl. Ergebnisse der Western Blots in Abb. 9 und 13) die Annahme, dass Apo AI und Apo AII miteinander assoziiert sind. Nun gilt es zu klären, ob die Apolipoproteine als Heterodimer oder in Form einer Micelle vorliegen. Hierzu wurde im nun folgenden Teil der Gehalt des Eluates an Fettsäuren bestimmt.

3.5.2 Gaschromatographische Messung von Fettsäuren im Eluat

Zunächst wurde eine Kontrollmessung mit dem Ausgangsmaterial durchgeführt. Das Ergebnis dieser Messung zeigt Abb. 18.

Diese Abbildung zeigt das gaschromatographisch gemessene Fettsäurenmuster im humanen Plasma. Die Detektion erfolgt per Flammenionisation. Durch Zuordnung der Retentionszeiten der Peaks zu denen eines Multifettsäurestandards wurden die Fettsäuren identifiziert.



Abb. 18 GC Analyse der Fettsäuren - Positivkontrolle: humanes Plasma

Diese Abbildung zeigt das gaschromatographisch gemessene Fettsäurenmuster des humanen Plasmas der Probandin. Über die Zeit (min) des Auftretens der Peaks (x-Achse) wird die jeweilige Fettsäure definiert. Die Peakhöhe (y-Achse) entspricht der Konzentration der entsprechenden Fettsäure. Die Namen der Fettsäuren befinden sich an den jeweiligen Peaks. Zur Stabilisierung der Proben wird Butyl-Hydroxy-Toluol (BHT) hinzugegeben sowie ein interner Standard (Heptadecanoat) dazupipettiert.

Die Namen der Fettsäuren befinden sich an den jeweiligen Peaks. Das hier dargestellte Fettsäurenmuster entspricht dem erwarteten Gehalt an Fettsäuren im menschlichen Plasma.

Es wurde das Fettsäurenprofil von dem jeweiligen Pool der Fraktionen nach Gelfiltration, dem Durchlauf, dem entsprechenden Eluat sowie der Waschlösung gemessen (vgl. Abb.7). Es wurde jeweis in Dreifachwerten gemessen.

Abb. 19 zeigt zunächst die Analyse der Fettsäuren in den gepoolten Fraktionen 31 bis 48 nach Gelfiltration, d. h. noch vor der Auftrennung der Fraktionen in einen Pool A und einen Pool B, sowie die Analyse des Eluats, des Durchlaufs und der Waschlösung (vgl. Abb. 7).



Abb. 19 Analyse der Fettsäuren mittels GC in den gepoolten Plasmafraktionen 31 bis 48 nach Gelfiltration

Die gaschromatographische Analyse der Fettsäuren erfolgte für die nach Gelfiltration gepoolten Plasmafraktionen 31 bis 48 (= Pool) sowie für Eluat, Durchlauf und Waschlösung der Affinitätschromatographie. Die Abbildung zeigt das Muster der Fettsäuremessung für jede der vier Proben. Im Pool sind die Fettsäuren Palmitat, Stearat, Oleat und Linoleat nachweisbar, erkennbar an den durch die Retentionszeit (x-Achse) definierten Peaks. Sie finden sich im Durchlauf und in der Waschlösung wieder. Dagegen ist im Eluat keine der Fettsäuren nachweisbar. Man erkennt lediglich die Grundlinie und den Peak des internen Standards Heptadecanoat.

Die Abbildung zeigt das Muster der Fettsäurenmessung für jede der vier Proben, die im jeweiligen Teil der Abbildung vermerkt sind. Im Pool sind die Fettsäuren Palmitat, Stearat, Oleat und Linoleat nachweisbar. Sie finden sich im Durchlauf und in der Waschlösung wieder. Dagegen sind im Eluat keine Fettsäuren nachweisbar. Man erkennt lediglich die Grundlinie und den Peak des internen Standards Heptadecanoat. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass sich im Eluat keine Fettsäuren befinden, bzw. deren Konzentration so gering ist, dass sie unterhalb der Detektionsgrenze liegt.

Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die Analyse der Fettsäuren mit den beiden Pools A und B (vgl. Abb. 15) wiederholt. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen die Abbildungen 20 und 21. Die Abbildungen zeigen das Muster der Messung der Fettsäuren für jede der jeweils vier A- und B-Proben (Pool, Eluat, Durchlauf und Waschlösung). Die gemessenen Fettsäurenmuster von Pool A und Pool B entsprechen sich und werden hier gemeinsam besprochen.

In Pool A und Pool B sind die Fettsäuren Palmitat, Stearat, Oleat und Linoleat nachweisbar. Wobei die Konzentration von Linoleat in Pool A größer als in Pool B ist, und die Konzentration von Oleat in Pool B größer als in Pool A ist. Die genannten Fetsäuren finden sich auch im Durchlauf und teilweise in der Waschlösung wieder. Dagegen ist im jeweiligen Eluat keine der Fettsäuren nachweisbar. Man erkennt lediglich die Grundlinie und den Peak des internen Standards Heptadecanoat. Diese Ergebnisse entsprechen denen der Abb. 19. Man kann aus der Tatsache, dass im Eluat keine Fettsäuren auftreten, schließen, dass die Affinitätschromatographie gegen Apo AI keine an Apo AI gekoppelten Fettsäuren separieren kann. D. h. die Fettsäuren, welche im Pool nachweisbar sind, sind nicht an Apo AI gebunden. Es sei darauf hingewiesen, dass es sich bei diesen Analysen um qualitative und nur bedingt um quantitative Messungen handelte.

Nach der gaschromatographischen Analyse der Fettsäuren liegt der Schluss nahe, dass die mittels Affinitätschromatographie gegen Apo AI gewonnenen Apo AIhaltigen Partikel im Eluat wahrscheinlich keine Micellen und folglich keine Lipoproteinpartikel darstellen. Zur Festigung der Annahme, dass es sich bei den kleinen Apo AI-haltigen Partikeln um Micellen handelte, hätten Fettsäuren gefunden werden müssen. Das bedeutet, dass es sich bei dem gemeinsamen Auftreten von Apo AI und Apo AII wahrscheinlich um ein fettsäurefreies Heterodimer handelt.



Abb. 20 und 21 GC-Analyse der Fettsäuren in den gepoolten Fraktionen 32 bis 37 (= Pool A); 38 bis 43 (= Pool B) nach Gelfiltration

gaschromatographische Die Analyse der Fettsäuren erfolgte für die nach Gelfiltration gepoolten Fraktionen 32 bis 37 (= Pool A); 38 bis 43 (= Pool B), sowie für Eluat A; B, Durchlauf A; B und Waschlösung A; B der Affinitätschromatographie (vgl. Abb. 7). Die Abbildungen zeigen das Muster der Fettsäurenmessung für jede der vier jeweiligen Proben. Im Pool A; B sind die Fettsäuren Palmitat, Stearat, Oleat und Linoleat nachweisbar, definiert durch die Retentionszeit (x-Achse) der Peaks. Sie finden sich im Durchlauf und in der Waschlösung wieder. Dagegen ist im Eluat keine der Fettsäuren nachweisbar. Man erkennt lediglich die Grundlinie und den Peak des internen Standards Heptadecanoat. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen von Abb. 19.

3.5.3. Messung von Vitamin A und E im Eluat

Die Hypothese der Arbeit basierte auch auf der Annahme, dass kleine Apo Al-haltige Partikel eine Transportfunktion für lipophile Vitamine besitzen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden in Pool, Eluat, Durchlauf und der jeweiligen Waschlösung von Pool A und Pool B (vgl. Abb. 7 und 15) der Gehalt an den fettlöslichen Vitaminen A und E gemessen. Die Messung erfolgte mittels HPLC. Die Ergebnisse der Vitaminmessung sind in Tabelle 1 und in Abbildung 22 dargestellt. Die Tabelle 1 zeigt die Konzentrationen in μ g/ml von Vitamin A und Vitamin E jeweils in den einzelnen Proben von Pool A und Pool B (vgl. Abb 7).

in [µg/ml]	Pool	Eluat	Durchlauf	Waschlösung
Pool A; Vit. A	0,0104	0	0,0066	0
Vit. E	0,024	0	0	0
Pool B; Vit. A	0,067	0	0	0
Vit. E	0,005	0	0,002	0

Tab. 1 Nachweis von Vitamin A und Vitamin E in den kleinen Apo Al-haltigen Partikel - HPLC-Analyse

Die Abbildung zeigt die gemessenen Konzentrationen in μ g/ml von Vitamin A und Vitamin E jeweils in den einzelnen Proben von Pool A und Pool B. In den Pools sind die Vitamine nachweisbar. Nach der Affinitätschromatographie von Pool A ist nur Vitamin A im Durchlauf detektierbar; im Durchlauf der Affinitätschromatographie von Pool B ist lediglich Vitamin E messbar. In den jeweiligen Waschlösungen liegt die Konzentration von Vitamin A und Vitamin E unterhalb der Nachweisgrenze. Die entscheidende Aussage dieser Tabelle ist, dass weder im Eluat A noch im Eluat B fettlösliche Vitamine nachweisbar sind.

Die gemessenen Konzentrationen leiten sich von der Detektion der Probenpeaks der HPLC ab. Die Konzentrationsangaben zeigen, dass in den Pools A und B die Vitamine A und E nachweisbar sind. Nach der Affinitätschromatographie von Pool A ist Vitamin A nur im Durchlauf noch detektierbar. Vitamin E ist nicht mehr messbar. Das Eluat ist frei von nachweisbaren Spuren von Vitamin A und Vitamin E. Für die Vitaminmessungen im Pool B und seinen Komponenten Eluat, Durchlauf und Waschlösung lässt sich lediglich im Durchlauf Vitamin E nachweisen. Die entscheidend Aussage dieser Tabelle ist. dass weder im Eluat der Affinitätschromatographie von Pool A noch im Eluat der Affinitätschromatographie von Pool B fettlösliche Vitamine nachweisbar sind. Die Annahme, dass kleine Apo Alhaltigen Partikel Vehikelfunktion für den Transport von fettlöslichen Vitaminen haben, kann nicht bestätigt werden.

Interessant ist der Aspekt, den die Abbildung 22 verdeutlicht.



Abb. 22 Vergleich der Konzentrationen von Vitamin A und Vitamin E in Pool A und Pool B Dieses Balkendiagramm stellt die Konzentrationen [µg/ml] von Vitamin A und Vitamin E jeweils in Pool A und Pool B einander gegenüber.

In Pool A kann vergleichsweise mehr Vitamin E als in Pool B gemessen werden, wobei sich in Pool B mehr Vitamin A als in Pool A befindet.

Die Abbildung vergleicht die Konzentration der Vitamine A und E in Pool A und Pool B. Im Pool A, der aus den Gelfiltrationsfraktionen mit größeren Partikeln gepoolt wurde (vgl. Abb. 15) ist eine größere Menge an Vitamin E nachweisbar. Vitamin A ist in größerer Menge in Pool B zu finden, welcher die kleineren Partikel enthält. Dieses Ergebnis wird im folgenden Abschnitt ebenfalls zu diskutieren sein.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass mit der hier angewandten Methoden kleine Apo Al-haltige Proteinpartikel mittels Gelfiltration und anschließender Affinitätschromatographie gewonnen werden können. Diese Partikel liegen als Heterodimere, gebildet von Apo Al und Apo All, eventuell noch verbunden mit Apo AlV, vor.

Die Annahme, dass es sich bei den kleinen Apo Al-haltigen Partikeln um Micellen handelt, die eine Vehikelfunktion für essentielle Fettsäuren und fettlösliche Vitamine haben, konnte nicht bestätigt werden.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob im Plasma kleine Lipoproteinpartikel zu finden sind, die essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine vom Gefäßsystem des Körpers in das Versorgungssystem des ZNS transportieren könnten. Es galt aufzuzeigen, ob es lipoproteinähnliche Partikel gibt, die potentiell in der Lage sind, die BHS zu überwinden. Diese Arbeit sollte einen Beitrag zum Verständnis der cerebralen Lipidversorgung liefern und basiert auf der Analyse und der Charakterisierung von im humanen Plasma vorliegenden Lipoproteinpartikeln.

Zunächst schien die Größe der Partikel für die Überwindung der BHS von Bedeutung zu sein. Des weiteren sollten diese Partikel frei von Apo E und Apo B sein, da bereits bekannt ist, dass Apo E nicht bluthirnschrankengängig (Linton et al., 1991) und Apo B im Liquor nicht vorhanden ist. Apo Al wurde als Strukturprotein für das Partikel postuliert um eine rezeptorvermittelte Aufnahme, z. B über ABCAI oder SR-BI, welche beide mit Apo Al interagieren, zu ermöglichen. Gesucht wurde folglich nach kleinen Apo Al-haltigen Partikeln. Da essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine über die Nahrung aufgenommen werden müssen und anschließend mit dem Blut transportiert werden, wurde als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen humanes Plasma herangezogen. Dieses Plasma galt es zunächst zu charakterisieren. Die Plasmalipoproteine wurden mittels Gelfiltration nach ihrer Größe aufgetrennt und in den einzelnen Fraktionen der Lipid- und Proteingehalt gemessen. Anhand der zuvor durchgeführten Kalibrierung der FPLC-Säule mit definierten Lipoproteinfraktionen konnte die Größe der kleinen Apo Al-haltigen Partikel bestimmt werden. Diese Fraktionen wurden gesammelt, konzentriert und über eine Affinitätschromatographie mit Anti-Apo Al-Antikörpern aufgereinigt. Das gewonnene Eluat wurde analysiert und charakterisiert. Der Gehalt des Analysematerials an Apolipoproteine, Fettsäuren und Vitaminen wurde bestimmt. Die durchgeführten Analysen zeigten. dass Heteromerisierungen von Apolipoproteinen vorhanden waren. Eine Vehikelfunktion in Form kleiner Apo Al-haltiger Partikel für essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine konnte nicht dargestellt werden.

Es sollen nun die gewählten Arbeitsschritte, die angewandten Methoden und die gewonnenen Ergebnisse diskutiert werden.

4.1. Charakterisierung des eingesetzten Plasmas

4.1.1. Lipid- und Proteinkonzentration im Nüchternplasma

Die Analyse des Plasmas hinsichtlich seines Gehalts an Lipiden und Proteinen war notwendig, da sichergestellt werden musste, dass es sich bei dem Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche um normales humanes Plasma handelte. Die Versuchsergebnisse wären nicht verwendbar gewesen, wenn bereits im Ausgangsmaterial ein abnormes Lipoproteinmuster zu finden gewesen wären. Hinzu kam, dass für die Analysen stets das Plasma der selben gesunden Probandin verwendet wurde. Der Gehalt des Plasmas an Fettsäuren und Vitaminen konnte somit über die Ernährung konstant gehalten werden. Die Analyse hat gezeigt, dass alle untersuchten Stoffe in ihrer jeweiligen physiologischen Konzentration vorlagen.

4.1.2. Apo E-Typisierung

Es wurde eine Apo E-Typisierung durchgeführt, um festzustellen, welcher Apo E Phänotyp in dem hier verwendeten Plasma vorliegt, da sich die jeweiligen Phänotypen unterschiedlich auf den Lipidmetabolismus auswirken können. So ist zum Beispiel die Lipidabgabefähigkeit von Zellen bei vorliegendem Apo E Typ 4/4 eingeschränkt. Arbeiten zum Apo E-abhängigen Lipidmetabolismus der Zelle, dem Transport von Cholesterin und der Verstoffwechselung von HDL wurden von Heeren et al. durchgeführt (Heeren et al., 2003). Wie von Heeren et al. gezeigt, ist Apo E ein wichtiger Stimulator für die Cholesterinabgabe der Zellen des peripheren Gewebes an Lipoproteine. Liegen Abnormitäten in der Apo E-Isoform vor, kann es zu einer Einschränkung der Abgabe des Cholesterins der peripheren Zelle an die HDL und somit zu einer Störung des Cholesterinrücktransportes und des Lipidmetabolismus kommen. Diese Normabweichung konnte durch die Apo E-Typisierung ausgeschlossen werden. Der im hier verwendeten Plasma vorliegende Apo E Phänotyp 3/3 ist mit einem Anteil von 55 % der meist verbreitete Phänotyp in der Gesamtbevölkerung. Es war folglich keine Auswirkung seitens des Apo E-Typs auf den Lipidmetabolismus und damit auf die zu charakterisierenden kleinen Apo Alhaltigen Partikel, abweichend von der Norm, zu erwarten.

4.2. Kalibrierung der FPLC-Säule mit Lipoproteinfraktionen

Um die Gelfiltrationsläufe des Plasmas mit einem internen Standard vergleichen zu können, wurden die FPLC-Säule mit isolierten Lipoproteinfraktionen definierter Dichte kalibriert. Die Lipoproteinlösungen waren mittels Dichtegradientenzentrifugation hergestellt worden. Anhand der erstellten Protein- und Lipidkonzentrationsprofile konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um intakte Lipoproteinfraktionen handelte, da sich die gemessenen Stoffkonzentrationen auf bestimmte Fraktionen begrenzten (vgl. Abb. 1). Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte die Größenbestimmung der Plasmapartikel durchgeführt werden. Diese Vorgehensweise sicherte die korrekte Gewinnung des Ausgangsmaterials für die sich anschließende Affinitätschromatographie. Es war also möglich, das Vorhandensein von Apo Alhaltigen Fraktionen zu zeigen, die nicht mehr in den Bereich der bereits bekannten HDL fallen. Außerdem konnte bei der HDL₃-Präparation nachgewiesen werden, dass Albumin im gleichen Größenbereich zu finden ist. Diese Überlappung störte jedoch Standardisierung nicht und konnte durch einen Vergleich mit dem die Gelfiltrationslauf des Albumins (Abb. 2 a) und dem angefertigten Coomassie Gel (Abb. 3) definiert werden.

4.3. Auftrennung der Plasmalipoproteine mittels FPLC und Charakterisierung der Fraktion

Die Auftrennung der Plasmapartikel gemäß ihrer Größe wurde mittels der Gelfiltration erreicht. Dazu ist anzumerken, dass viele Faktoren die Auftrennungsgüte der Gelfiltration beeinflussen können. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel das Probenvolumen, das Verhältnis von Probenvolumen zum Volumen der Säule, die Größe der aufzutrennenden Partikel, die Partikelgrößenverteilung, die Porengröße der Säule, die Flussrate sowie die Viskosität der Probe und des Puffers. Nach der Wahl der Säule, des Puffers und der Laufgeschwindigkeit erfolgte eine Standardisierung des Arbeitsprotokolls zur Gelfiltration. Zur Vermeidung von Denaturierung der in der Probe enthaltenen Proteine wurde die Gelfiltration in gekühlter Umgebung durchgeführt. Unter Optimierung der genannten variablen Faktoren wurde die Gelfiltration zu einer guten Trennmethode. Die potentielle

Auftrennungsmöglichkeit der Partikel war jedoch eingeschränkt. Besonders in den Größenrandbereichen, d. h. bei besonders großen oder kleinen Partikeln, war die Auftrennfähigkeit der Säule begrenzt. Dies zeigte sich daran, dass zum Beispiel VLDL und LDL nicht getrennt werden konnten, sondern sich gemeinsam in den Fraktionen befanden, die den ersten Konzentrationspeak bildeten (vgl. Abb. 4). Eine Auftrennung dieser triglyzeridreichen Lipoproteine war für die vorliegende Arbeit jedoch nicht ausschlaggebend. Hier sollten Partikel isoliert werden, die kleiner als die bereits bekannten und isolierten HDL waren. Auch sie lagen in einem kritischen Auftrennbereich der Säule für besonders kleine Partikel. Es musste in Erwägung gezogen werden, dass gerade in diesen letzten Fraktionen Partikel gleicher Größe vorlagen. Trotzdem gelang es, Apo E-freie von Apo E-haltige Fraktionen zu trennen. Somit konnten Apo E-freie und gleichzeitig Apo Al-haltige Fraktionen gewonnen werden. Zum Nachweis des Gelingens dieser Aufreinigung diente der Western Blot der Abb. 5 und der Apo E ELISA (Abb. 6). In Abbildung 6 wäre eine Darstellung von zwei Peaks (Apo E in LDL/VLDL-Partikel und in HDL-Partikel) zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung für die Darstellung nur eines Peaks ist, dass diese Peaks ineinander übergreifen oder die Konzentration von freiem Apo E gemessen wurde.

Eindeutig gezeigt werden konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Plasmagelfiltration, dargestellt in Abb. 15 a. Denn zur Analysematerialgewinnung wurden zahlreiche Gelfiltrationsläufe gefertigt, wobei in den 50 Fraktionen jeweils die Konzentrationen von Cholesterin und Protein gemessen wurden. Die gemessenen Konzentrationspeaks verschoben sich nicht, das Protein- und Lipidprofil war von Lauf zu Lauf reproduzierbar (vgl. Abb. 4 und 15 a).

Dies spricht für eine zuverlässige Auftrennung mittels der FPLC-Säule und für eine verlässliche Methode der Konzentrationsmessung von Cholesterin und Protein. Es konnte daher eine definierte Analysematerialgewinnung zum Auffinden von kleinen Apo AI-haltigen Partikeln stattfinden.

4.4. Gewinnung kleiner Apo Al-haltiger Partikel mittels Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographiesäule gegen Apo AI wurde mir aus den Beständen des Instituts zur Verfügung gestellt. Da sie bereits für frühere Experimente eingesetzt worden war, wurde vor ihrer Anwendung eine Funktionsprüfung durchgeführt. Es wurde Material der Säule entnommen und das Vorhandensein von Antikörpern mittels Western Blot überprüft. Diese Säule hatte den Vorteil, dass ihre Funktionstüchtigkeit bereits erwiesen war. Erfolge bei der Nutzung dieser Methode erzielten Koch et al. (Koch et al., 2001). Es ließ sich allerdings nicht vermeiden, dass ein Teil der an die Sepharosebeats gebundenen Antikörper nach jedem Aufreinigungsvorgang von der Säule gewaschen wurden. Diese fanden sich dann im Eluat wieder und waren für Kreuzreaktionen der sekundären Antikörper und für eine Verunreinigung des Eluates verantwortlich.

Obwohl die Methode schon einmal erfolgreich angewendet worden war, musste zusätzlich noch in Erwägung gezogen werden, dass sich die unterschiedlichen pH-Werte, denen das Eluat während seiner Gewinnung ausgesetzt war, eventuell auf den Gehalt an Vitaminen und besonders an Fettsäuren ausgewirkt hatten. Es wurde versucht, die Einflüsse der extremen pH-Werte während der Affinitätschromatographie so gering wie möglich zu halten. Trotzdem konnte ein schädigender Einfluss auf die gesuchten Stoffe nicht völlig ausgeschlossen werden.

Betont werden muss jedoch, dass es sich bei dieser Methode um eine schonende Möglichkeit der spezifischen Partikelaufreinigung handelt, die einen Weg eröffnet Apo AI-haltige Partikel zu gewinnen, was ein Ziel dieser Arbeit war.

Eine alternative Methode zur Gelfiltration und zur Affinitätschromatographie ist die Gewinnung von definierten Partikeln mittels Heparinchromatographie. Viele Moleküle binden an Heparin, so zum Beispiel auch Apo E, Apo B und Apo H. Nun sollte hier jedoch Apo AI isoliert werden. Apo AI sowie Apo AII und Apo AIV, welche die Apolipoproteine der cholesterin-transportierenden Lipoproteine sind, können nicht an Heparin binden. So hätten aus dem Plasmapool mittels Heparinchromatographie zwar Apo E-haltige Partikel abgeschieden werden können, und im Durchlauf wären die Apo AI-haltigen Partikel zu finden gewesen. Doch wäre dieser noch stärker mit Albumin und anderen Plasmabestandteilen verunreinigt gewesen, da keine Gewinnung ausschließlich mittels Affinität zu Apo AI stattgefunden hätte. Aus diesem Grund konnte diese schnelle, schonende und reproduzierbare Methode hier nicht angewendet werden.

Als weitere alternative Methode kann die Dichtegradientenzentrifugation diskutiert werden. Mittels Dichtegradientenzentrifugation ist es möglich, Partikel einer bestimmten Dichte zu gewinnen. In diesem Fall wäre ein Dichtegradient mit Dichtelösungen über 1,21 g/ml notwendig gewesen, da Partikel mit einer größeren Dichte als die der HDL (bis 1,21 g/ml) aufgereinigt werden sollten. Bei hoher Dichte, welche mittels Kaliumbromid erreicht wird, bestünde die Gefahr der Desintegration der Proteine wegen des hohen Salzgehaltes. In Folge dieser Desintegration der Lipoproteinpartikel wäre mit einem artifiziellem Anteil an freien Apolipoproteinen im Button der Zentrifugenröhrchen zu rechnen. Diese Artefakte hätten die Gewinnung der kleinen Apo Al-haltigen Partikel erheblich gestört.

4.5. Charakterisierung des Affinitätschromatographieeluates

Die Analyse des durch die Affinitätschromatographie mit Anti-Apo Al-Antikörpern gewonnenen Eluates sollte die Fragestellung klären, ob sich im Eluat Apo Al-haltige Partikel befinden, und ob diese Partikel lipophile Vitamine und essentielle Fettsäuren enthielten.

Es wurde zunächst der Gehalt des Eluates an Apolipoproteinen überprüft, um anschließend die Konzentrationen von Fettsäuren und Vitaminen zu bestimmen. Bei einer Kombination von Apolipoproteinen mit Vitaminen und Fettsäuren im Eluat hätte davon ausgegangen werden können, dass die Apolipoproteine mit Vitaminen und Fettsäuren ein micellenförmiges Partikel bilden. In diesem Fall hätten sie radioaktiv markiert werden können, um einen möglichen Transfer über die BHS im Tierexperiment darzustellen.

Eine weitere Methode, um den Gehalt des Eluat an micellenförmigen Partikeln zu untersuchen, wäre die Elektronenmikroskopie gewesen. Dieses Verfahren wurde von Koch et al. angewandt, um die Lipoproteine des Liquors bildhaft darzustellen (Koch et al., 2001). Das Verfahren der Elektronenmikroskopie ist jedoch sehr aufwendig und kostspielig und wurde hier nicht angewandt, da der zuvor notwendige Nachweis von Fettsäuren im Eluat nicht möglich war.

4.5.1 Apolipoproteinanalyse des Eluates

Zunächst diente die Identifizierung der Apolipoproteine der Überprüfung des Gelingens der Affinitätschromatographie. Dazu wurde im Eluat Apo AI, gegen welches die Affinitätschromatographie gerichtet war, nachgewiesen. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen, dass die Methode funktioniert hat, da in den Eluatfraktionen ein Signal für Apo AI erkennbar ist. An diese Western Blots schlossen sich weitere Western Blot Analysen zum Nachweis von verschiedenen Apolipoproteinen in Plasma, Pool und Eluat an.

Die Western Blots in Abbildung 8 und 9 ließ vermuten, dass Apo AI und Apo AII vergesellschaftet sind. Denn im Eluat, welches über die Affinität der Antikörper zu Apo AI gewonnen wurde, zeigt sich auch ein deutliches Signal für Apo AII. Die Annahme, dass Apo AI und Apo AII miteinander assoziiert sind, sollte sich bei den weiteren Experimenten bestätigen. Die Frage war jedoch, in welcher Form sie miteinander verbunden waren. Vorstellbar waren micellenförmige und damit lipidhaltige Partikel oder eine Heterodimerisierung der Apolipoproteine.

Neben Apo AI und Apo AII wurde ein besonderes Augenmerk auf das Vorhandensein von Apo E im Eluat gelegt. Die Abbildung 10 bestätigte jedoch, dass Apo E nicht im Eluat vorhanden war, womit nochmals das Gelingen der Auftrennung und Isolierung der Partikel mittels Gelfiltration und Affinitätschromatographie deutlich wurde.

Des weiteren wurde das Eluat auf das Vorkommen weiterer Apolipoproteine untersucht. Es zeigte sich einzig für das Apo AIV ein schwaches Signal, dargestellt in Abb. 11. Es ist bekannt, dass Apo AIV auf Lipoproteinen im Blut mit Apo AI und AII vergesellschaftet ist und dort den Ablauf des reversen Cholesterintransport mitbestimmen kann (Savion and Gamliel, 1988). Des weiteren wurde im Kapitel über die jeweiligen Apolipoproteinen beschrieben, dass Apo AIV auch einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben kann (Fujimoto et al., 1993). Die Tatsache, dass die Kontrolle von Nahrungsaufnahme und Energiestoffwechsel im Hypothalamus stattfindet (Woods et al., 1998) lässt vermuten, dass Apo AIV die BHS überwinden kann. Dass Apo AIV die BHS gemeinsam mit Apo AI und Apo AII in Form einer Micelle oder eines Heteromers überwindet, ist hypothetisch.

Die Western Blot Analysen des Eluates hinsichtlich der Apolipoproteine D, H und J ergaben, dass keines der genannten Apolipoproteine im Eluat nachweisbar war. Von Interesse wäre der Nachweis von Apo D gewesen, da es wegen seiner geringeren Größe (33 kDa) auf den gesuchten Partikeln hätte vorhanden sein können. Außerdem wird Apo D eine Aufgabe bei der Regeneration von Nerven zugeschrieben (Boyles et al., 1990). Diese Funktion von Apo D macht eine mögliche Aufnahme des Apolipoproteins ins ZNS und seine eventuell hier ausgeübte Regenerationshilfe für die Nervenzellen untersuchenswert.

Die aufgestellte Hypothese, dass Apo AI und Apo AII miteinander assoziiert vorliegen, wird auch durch die Abbildungen 13 und 14 gestützt. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen, dass auch im Gradientengel mit nicht reduzierten Proben Apo AI mit Apo AII verbunden vorliegt. Abbildung 14 bestätigt, dass es sich bei den Signalen für Apo AII um echte Signale handelt und nicht nur um sekundäre Antikörperreaktionen. Der sekundäre Antikörper GaR-PO detektiert möglicherweise Antikörper, die von der Affinitätschromatographiesäule gewaschen wurden. Hierbei handelt es sich um Antikörper aus dem Esel gegen Schafsantigene (DaSh-PO).

Auch die Abbildungen 16 und 17 untermauern die Annahme, dass Apo AI und Apo AII ein Heterodimer bilden können. Besonders in Abbildung 17 wird jedoch deutlich, dass die Gewinnung der Apo AI-haltigen Partikel mittels Affinitätschromatographie nicht optimiert werden konnte. Denn auch im Durchlauf (vgl. Abb. 7) waren sowohl Apo AI als auch Apo AII nachweisbar. Dies spricht dafür, dass die verwendete Säule für die Affinitätschromatographie nicht mehr genügend Antikörper gegen Apo AI enthielt, um alle Apo AI-haltigen Partikel zu binden. Oder es hat bei der Beladung mit den gepoolten Plasmafraktionen nach Gelfiltration eine Überladung der Säule stattgefunden, weshalb nicht alle Apolipoproteine gebunden werden konnten. Die Frage ist, ob eine suffizientere Säule mehr Apo AI-haltige Partikel gebunden hätte, welche anschließend im Eluat nachweisbar gewesen wären, und ob dann ein Nachweis von lipophilen Vitaminen und essentiellen Fettsäuren möglich gewesen wäre.

Zur Analyse der Apolipoproteine kann abschließend festgehalten werden, dass alle Daten auf eine Heterodimerisierung von Apo AI und Apo AII hinweisen konnten. Die physiologische Bedeutung dieses Heterodimers ist allerdings ungeklärt. Es könnte diskutiert werden, ob sie eventuell als Akzeptoren für andere hier nicht untersuchte Stoffe dienen. Oder sie könnten wie Albumin zur Stabilisierung des onkotischen Drucks im Plasma beitragen.

4.5.2. Gaschromatographische Messung von essentiellen Fettsäuren im Eluat

Um nun die Frage nach der Micellenbildung und der Verbindung von Apo AI und Apo zu beantworten, wurde der Gehalt von Fettsäuren in den Apo AI-haltigen Fraktionen bestimmt. Ein Partikel in Form einer Micelle müsste Phospholipide aufweisen, welche u. a. aus Fettsäuren bestehen. Ohne Phospholipide und Cholesterin kann keine Biomembran strukturiert werden.

Zunächst wurde im Ausgangsmaterial das Fettsäuremuster bestimmt. Die Ergebnisse zeigen ein normales Fettsäuremuster der Probandin (Abb. 18). Die Abbildungen 19, 20 und 21 zeigen jedoch, dass im Eluat, in welchem sich die zu untersuchenden Apo Al-haltigen Partikel befanden, keine Fettsäuren nachweisbar waren. Lediglich im Pool, im Durchlauf und in geringerer Konzentration in der jeweiligen Waschlösung konnten Fettsäuren gemessen werden. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass Apo Al und Apo All nicht in Form einer Micelle, sondern als Heterodimer miteinander assoziiert sind. Somit haben die isolierten Apo Al-haltigen Partikel keine Vehikelfunktion für essentielle Fettsäuren über die BHS ins ZNS.

Auch nach einer Verbesserung der Versuchsbedingungen (Bildung von Pool A und Pool B; vgl. Abb. 15 b), konnten im jeweiligen Eluat keine Fettsäurekonzentrationen gemessen werden. Lediglich die Verteilung von Linoleat und Oleat im Pool der jeweiligen Plasmafraktionen war unterschiedlich. Im Pool A war die Konzentration von Linoleat, im Pool B die Konzentration von Oleat höher (vgl. Abb. 20 und 21). Zu diskutieren ist nun, ob Linoleat vermehrt in größeren Lipoproteinen vorkommt und ob Oleat in kleinen Lipoproteinen transportiert wird oder an Albumin oder andere Plasmaproteine gebunden ist.

Es ist bekannt, dass ungesättigte Fettsäuren durch oxidative Prozesse geschädigt und dann nicht mehr als solche nachgewiesen werden können (Halliwell and Chirico, 1993). Im hier durchgeführten Versuchsaufbau der gaschromatographischen Fettsäurebestimmung wurde versucht die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren durch Zugabe von BHT-Lösung zu verringern. BHT ist ein Antioxidanz. Inwieweit eine mögliche Oxidation der Fettsäuren im Eluat jedoch schon vor dem Ansetzen der Proben mit BHT-Lösung stattgefunden hat, konnte nicht festgestellt werden. Es konnte daher nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass ein Verlust von im Eluat befindlichen Fettsäuren bereits vor der Messung stattgefunden hatte. Auch muss diskutiert werden, ob die Sensitivität der Gaschromatographie zum Nachweis der Fettsäuren zu gering war und somit die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Da die freien Fettsäuren im Blut entweder an Albumin gebunden oder in Form von Lipoproteinen transportiert werden, kann diskutiert werden, dass die FS von den Lipoproteinen oder dem Albumin auf der dem Blut zugewandten Seite an die Endothelzellen der BHS abgegeben werden und mittels Transportproteinen für Fettsäuren (Edmond, 2001) das Endothel überwinden. Eine andere Überlegung ist, dass fettsäurehaltige Lipoproteine oder Albumin-FS-Komplexe als Ganzes im Rahmen der Transzytose aufgenommen werden. Wie sich dieser Aufnahmemechanismus vollzieht, und spezielle Rezeptoren oder ob transmembranöse Kanäle für diesen Ablauf verantwortlich sind, bleibt hier unbeantwortet.

4.5.3. Messung von Vitamin A und E im Eluat

Obwohl im zu untersuchenden Eluat keine Fettsäuren messbar waren, wurde der Gehalt der lipophilen Vitaminen E und A bestimmt. Es war vorstellbar, dass die dargestellten Apolipoproteinen AI und AII als Transportvehikel für die Vitamine fungierten, ohne dass sie eine lipoproteinähnliche Struktur haben.

Nach der Affinitätschromatographie von Pool A und Pool B (vgl. Abb. 15) wurde die Vitaminmessung mittels HPLC durchgeführt. Die hier angewandte Methode der Vitaminmessung per HPLC war im Institut etabliert und gilt als Methode der Wahl.

Wie die Tabelle 1 zeigt, konnte im Eluat der Affinitätschromatographie weder von Pool A noch von Pool B eines der beiden Vitamine nachgewiesen werden. Interessant war jedoch, dass in den jeweiligen Ausgangslösungen der Affinitätschromatographie Pool A und B, die Vitamine A und E eine unterschiedliche Konzentrationsverteilung, veranschaulicht in Abbildung 22, zeigten. Hier wird deutlich, dass im Pool A die Konzentration des Vitamins E vergleichsweise größer ist als im Pool B. Umgekehrt ist die Konzentration des Vitamins A im Pool B größer als im Pool A. Erklärbar wäre diese Vitaminverteilung dadurch, dass Vitamin E im Blut zu einem großen Teil lipoproteingebunden ist. Somit findet es sich in den Fraktionen, die noch etwas größere Partikel, zum Beispiel Lipoproteine, beinhalten. Die Betrachtung der Abb. 15 soll nochmals verdeutlichen, dass Pool A so gewählt wurde, dass die bekannten und definierten Lipoproteine HDL₂ und HDL₃ nicht mehr im Pool aufgenommen wurden. Trotzdem scheint sich in diesem Pool noch ein Transportpartikel für Vitamin E zu befinden, sonst wäre Vitamin E hier nicht messbar. Da im Eluat nach der Affinitätschromatographie kein Vitamin detektierbar war, ist anzunehmen, dass die Konzentration hier unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Für Vitamin A wurde das RBP als Vehikel im Blut beschrieben (Raghu et al., 2003). Das RBP ist 21 kDa groß und würde sich daher in den Gelfiltrationsfraktionen befinden, die kleinere Partikel beinhalten (vgl. Abb. 15). Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 22 bestätigen die Vorstellung, dass Vitamin A an RBP gebunden und damit im Pool B vermehrt auffindbar ist. Überprüfen könnte man diese These, indem man den Pool B einer Affinitätschromatographie unterzöge, die gegen das RBP gerichtet ist. Anschließend könnte im Eluat dieses Vorgangs erneut Vitamin A bestimmt werden. Die unterschiedlichen Konzentrationsverteilungen der Vitamine in den Pools A und B lassen sich also durch ihre Bindung im Plasma an Lipoproteine (Vitamin E) oder das RBP (Vitamin A) erklären.

Im Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung dieser Arbeit spricht dieses Ergebnis zusätzlich gegen die Hypothese, dass Vitamin A und Vitamin E als lipophile Vitamine gemeinsam in einem Apo Al-haltigen Partikel transportiert werden. Dieses Ergebnis kann daher die Hypothese, dass Apo Al-haltige Partikel als Vehikel für lipophile Metaboliten fungieren können, nicht untermauern. Es ist wahrscheinlicher, dass Vitamin A an das RBP gebunden und unabhängig von Vitamin E die BHS überwindet. Für Vitamin E wurde bereits gezeigt, dass es vermutlich in einer LPLabhängigen Prozedur die BHS überwinden kann (Goti et al., 2002). Zumindest sank die Konzentration von Vitamin E im Bluthirnschrankenmodell in Abwesenheit der LPL im ZNS ab. Es ist daher anzunehmen, dass Vitamin E an Lipoproteine gebunden an die BHS herangetragen wird, wo es LPL vermittelt in die Endothelzellen aufgenommen und so dem ZNS zugeführt wird. Eine weitere Arbeit der Forschergruppe um Goti machte deutlich, dass Vitamin E, wie auch CE, in einem SR-BI-vermittelten Prozess und mittels selektivem Lipidtransport in die Zellen der BHS aufgenommen werden kann. Es sind hier zwei Aspekte nochmals herauszuheben: Zum einen ist dieser Prozess SR-BI-vermittelt und zum anderen scheint die Aufnahme des Vitamins nicht gemeinsam mit dem gesamten Partikel (hier wurde HDL₃ untersucht) abzulaufen. Der Transport erfolgt stattdessen selektiv nur für die aufzunehmenden Stoffe. Das Lipoprotein selbst wurde nicht aufgenommen. Es müssen für den Transport von lipophilen Substanzen über die BHS daher nicht zwingend spezielle Vehikel existieren, wenn die benötigten Stoffe durch einen selektiven Lipidtransport vermittelt über SR-BI aufgenommen werden können (Goti et al., 2001).

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Fragestellung entsprechend kein spezielles Vehikel für den Transport von lipophilen Vitaminen und essentiellen Fettsäuren vom Plasma über die BHS ins ZNS aufgereinigt werden konnte, sollen abschließend andere mögliche Transportwege diskutiert werden. Wie für periphere, zelluläre Barrieren beschrieben, kommen auch für die Überwindung der BHS mehrere Transportmöglichkeiten in Betracht. Vorstellbar ist zum Beispiel ein selektiver Lipidtransport oder eine rezeptorvermittelte Transzytose. Eine weitere Möglichkeit wäre ein parazellulärer Austausch, bei welchem allerdings die stark ausgeprägten tight-junctions der BHS überwunden werden müssten. Für das Vitamin E wurde bereits der selektive Lipidtransport diskutiert. Auch wurde überlegt, ob es Transporter ausschließlich für Fettsäuren geben könnte. Bisher wurde allerdings noch kein Transporter speziell für ungesättigte Fettsäuren beschrieben (Edmond, 2001).

Es ist bekannt, dass ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie, das ABCAI Transportprotein, für den Cholesterinefflux aus peripheren Zellen aktiv ist. So kann diskutiert werden, ob ABC-Transporter auch eine Rolle im Lipidtransfer über die BHS spielen. Ein Nachweis über eine solche Funktion steht jedoch noch aus. Bereits beschrieben wurde, dass das P-Glycoprotein, ein ABC-Protein, eine Funktion beim Transport über die BHS erfüllt. Allerdings wurde hier erläutert, dass es für den Efflux von Medikamenten aus dem ZNS hinaus und nicht für einen Stofftransport in das ZNS hinein verantwortlich ist (Scherrmann, 2002). Auch von Begley et al. wurde diese Funktion der ABC-Transporter beschrieben. Sie schildern das Problem der Medikamentenresistenz, wobei Medikamente nicht in ausreichender Menge im ZNS konzentriert werden können, da sie, vermittelt über einen ABC-Transporter, aus dem ZNS wieder ausgeschleust werden (Begley, 2004). Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen stehen die Arbeiten von Panzenboeck et al., die eine Abhängigkeit des Apo Al-abhängigen Cholesterintransports, vermittelt durch ABCAI, über ein Modell der BHS beschreiben (Panzenboeck et al., 2002).

Des weiteren kann erwogen werden, dass es an speziellen Stellen besonderer Durchlässigkeit der BHS, an den sogenannten circumventrikulären Organen, zu einem vereinfachten Stofftransport zwischen Blut und ZNS kommen könnte.

Verschiedene Autoren berichten zu den circumventrikulären Organen, dass ihre Kapillarendothelien, im Vergleich zu denen der BHS, eine höhere Fenestrierung aufweisen und damit eine höhere Rate an Stoffaustausch ermöglichen. Die circumventrikulären Organe werden daher als sensorischer Apparat für humorale Botenstoffe zur Aufrechterhaltung der Körperhomöostase beschrieben (Gross, 1992). Wenn an diesen Orten verringerter Barrierefunktion für Hormone und andere Transmitter ein vereinfachter Übertritt vom Blut ins ZNS möglich ist, so wäre dieser auch für andere Stoffe, die vom Gehirn benötigt werden, wie lipophile Vitamine und essentielle Fettsäuren, vorstellbar.

Ein weiterer bedenkenswerter Aspekt ist, dass die BHS unter Einflussnahme der Astrozyten an Permeabilität zunehmen kann (Abbott, 2002). So kann diskutiert werden, dass die Durchlässigkeit der BHS bei Bedarf herabgesetzt und so ein erleichterter Stofftransport bewirkt werden kann.

Weitergehend beschrieben Yepes et al. einen speziellen Einfluss, den der Plasminogenaktivator auf die Permeabilität der BHS hat (Yepes et al., 2003). Hier bewirkte der Plasminogenaktivator eine Öffnung der BHS, vermittelt durch das LRP, und einen damit verbundenen Verlust der Integrität der BHS. Ein Vorgang, der in diesem Fall als pathologisch beschrieben wird, da der Integritätsverlust mit einem vasogenen Ödem und einer Hirndrucksteigerung verbunden sein kann, ist als gelenkter Prozess an anderer Stelle für einen gewünschten Stofftransport über die BHS eventuell nützlich.

Außerdem wurde beschrieben, dass es auf den die Bluthirnschranke bildenden Zellen spezialisierte Bereiche, wie die Caveolen oder "Rafts" gibt. Diese Bereiche sind gesondert für Transportvorgänge mit bestimmten Rezeptoren ausgestattet (Zhang et al., 2004). Auch hier wäre ein gelenkter und kontrollierter Stofftransport vorstellbar.

Es muss davon ausgegangen werden, dass einer der genannten oder ein noch nicht erwähnter Mechanismus für den Transport von lipophilen Vitaminen und essentiellen Fettsäuren vom Blut ins ZNS notwendig ist. Wie sich dieser Transport jedoch vollzieht, muss Inhalt zukünftiger Forschung sein.

Zusammenfassung

Die Fragestellung der Arbeit war, ob Im Blut kleine Apo AI-haltige Partikel gefunden werden können, die essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine über die BHS in das ZNS transportieren könnten.

Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen diente humanes Plasma. Zunächst wurde die Konzentration von Lipiden und Proteinen bestimmt, sowie eine Apo E Phänotypisierung durchgeführt. Die Plasmalipoproteine wurden anschließend mittels Gelfiltration gemäß ihrer Größe aufgetrennt und der Lipid- und Proteingehalt der einzelnen Fraktionen untersucht. Die Fraktionen mit kleinen Apo E-defizienten Partikeln wurden gesammelt, aufkonzentriert und über eine Affinitätschromatographie gegen Apo Al aufgereinigt. Das so gewonnenen Apo Al-haltige Eluat wurde im Hinblick auf folgende Parameter analysiert: Gehalt an Apolipoproteinen, Gehalt an Fettsäuren und Gehalt an Vitamin A und E. Ergebnis dieser Untersuchung war, dass zwar kleine Apo Al-haltige Partikel isoliert werden konnten, in diesen jedoch weder Fettsäuren noch Vitamine detektiert werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich Heterodimere der Apolipoproteine Apo AI und Apo AII vorliegen. Obwohl in den kleinen Apo Al-haltigen Partikeln keine lipophilen Vitamine nachgewiesen werden konnten, stellte sich bei der Untersuchung des Ausgangsmaterials heraus, dass es zu einer spezifischen Verteilung der Vitamine A und E in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration kam. Dabei fand sich Vitamin E tendenziell in den Fraktionen, die größere Partikel und Vitamin A in solchen Fraktionen, die kleinere Partikel enthielten. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Vitamin E an Lipoproteine und Vitamin A an das retinolbindende Protein gebunden transportiert wird. Eine Vehikelfunktion in Form kleiner Apo Al-Partikel für essentielle Fettsäuren und lipophile Vitamine konnte mit den hier angewandten Methoden nicht gezeigt werden.

Literaturverzeichnis

Abbott N. J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. J Anat 200, 629-638.

Acton S., Rigotti A., Landschulz K. T., Xu S., Hobbs H. H., and Krieger M. (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science 271, 518-520.

Apfelbaum T. F., Davidson N. O., and Glickman R. M. (1987) Apolipoprotein A-IV synthesis in rat intestine: regulation by dietary triglyceride. Am J Physiol 252, G662-G666.

Arita M., Sato Y., Miyata A., Tanabe T., Takahashi E., Kayden H. J., Arai H., and Inoue K. (1995) Human alpha-tocopherol transfer protein: cDNA cloning, expression and chromosomal localization. Biochem J 306 (Pt 2), 437-443.

Attie A. D., Kastelein J. P., and Hayden M. R. (2001) Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. J Lipid Res 42, 1717-1726.

Babitt J., Trigatti B., Rigotti A., Smart E. J., Anderson R. G., Xu S., and Krieger M. (1997) Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. J Biol Chem 272, 13242-13249.

Begley D. J. (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. Curr Pharm Des 10, 1295-1312.

Beisiegel U. (1995) Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism. Curr Opin Lipidol 6, 117-122.

Beisiegel U. (1996) New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis. Atherosclerosis 124, 1-8.

Blanco-Vaca F., Via D. P., Yang C. Y., Massey J. B., and Pownall H. J. (1992) Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoproteins. J Lipid Res 33, 1785-1796.

Bodzioch M., Orso E., Klucken J., Langmann T., Bottcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Buchler C., Porsch-Ozcurumez M., Kaminski W. E., Hahmann H. W., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner K. J., and Schmitz G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. Nat Genet 22, 347-351.

Borghini I., Barja F., Pometta D., and James R. W. (1995) Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. Biochim Biophys Acta 1255, 192-200.

Boyles J. K., Pitas R. E., Wilson E., Mahley R. W., and Taylor J. M. (1985) Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. J Clin Invest 76, 1501-1513.

Boyles J. K., Notterpek L. M., and Anderson L. J. (1990) Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. J Biol Chem 265, 17805-17815. Brewer H. B., Jr. and Santamarina-Fojo S. (2003) Clinical significance of high-density lipoproteins and the development of atherosclerosis: focus on the role of the adenosine triphosphate-binding cassette protein A1 transporter. Am J Cardiol 92, 10K-16K.

Brown M. S. and Goldstein J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232, 34-47.

Brundert M., Ewert A., Heeren J., Behrendt B., Ramakrishnan R., Greten H., Merkel M., and Rinninger F. (2005) Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25, 143-148.

Castellani L. W., Navab M., Van Lenten B. J., Hedrick C. C., Hama S. Y., Goto A. M., Fogelman A. M., and Lusis A. J. (1997) Overexpression of apolipoprotein All in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. J Clin Invest 100, 464-474.

Chiesa G. and Sirtori C. R. (2003) Recombinant apolipoprotein A-I(Milano): a novel agent for the induction of regression of atherosclerotic plaques. Ann Med 35, 267-273.

Chmurzynska A. (2006) The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. Journal of Applied Genetics 47, 39-48.

de Silva H. V., Stuart W. D., Duvic C. R., Wetterau J. R., Ray M. J., Ferguson D. G., Albers H. W., Smith W. R., and Harmony J. A. (1990) A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. J Biol Chem 265, 13240-13247.

de Vries H. E., Breedveld B., Kuiper J., de Boer A. G., Van Berkel T. J., and Breimer D. D. (1995) High-density lipoprotein and cerebral endothelial cells in vitro: interactions and transport. Biochem Pharmacol 50, 271-273.

DENCKER S. J., BRONNESTAM R., and SWAHN B. (1961) Demonstration of large blood proteins in cerebrospinal fluid. Neurology 11, 441-444.

Dietschy J. M. and Turley S. D. (2001) Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol 12, 105-112.

Edmond J. (2001) Essential polyunsaturated fatty acids and the barrier to the brain: the components of a model for transport. J Mol Neurosci 16, 181-193.

Elshourbagy N. A., Liao W. S., Mahley R. W., and Taylor J. M. (1985) Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. Proc Natl Acad Sci U S A 82, 203-207.

Enger S. C., Hjermann I., Foss O. P., Helgeland A., Holme I., Leren P., and Norum K. R. (1979) High density lipoprotein cholesterol and myocardial infarction or sudden coronary death: a prospective case-control study in middle-aged men of the Oslo study. Artery 5, 170-181.

Fenstermacher J., Gross P., Sposito N., Acuff V., Pettersen S., and Gruber K. (1988) Structural and functional variations in capillary systems within the brain. Ann N Y Acad Sci 529, 21-30.

Fidge N. H. (1999) High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. J Lipid Res 40, 187-201.

Fielding C. J. and Fielding P. E. (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. J Lipid Res 36, 211-228.

Franceschini G., Sirtori C. R., Capurso A., Weisgraber K. H., and Mahley R. W. (1980) A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. J Clin Invest 66, 892-900.

Francone O. L., Royer L., and Haghpassand M. (1996) Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. J Lipid Res 37, 1268-1277.

Fruchart J. C. and Ailhaud G. (1992) Apolipoprotein A-containing lipoprotein particles: physiological role, quantification, and clinical significance. Clin Chem 38, 793-797.

Fujimoto K., Machidori H., Iwakiri R., Yamamoto K., Fujisaki J., Sakata T., and Tso P. (1993) Effect of intravenous administration of apolipoprotein A-IV on patterns of feeding, drinking and ambulatory activity of rats. Brain Res 608, 233-237.

Goti D., Hrzenjak A., Levak-Frank S., Frank S., van der Westhuyzen D. R., Malle E., and Sattler W. (2001) Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. J Neurochem 76, 498-508.

Goti D., Balazs Z., Panzenboeck U., Hrzenjak A., Reicher H., Wagner E., Zechner R., Malle E., and Sattler W. (2002) Effects of lipoprotein lipase on uptake and transcytosis of low density lipoprotein (LDL) and LDL-associated alpha-tocopherol in a porcine in vitro blood-brain barrier model. J Biol Chem 277, 28537-28544.

Gross P. M., Sposito N. M., Pettersen S. E., and Fenstermacher J. D. (1986) Differences in function and structure of the capillary endothelium in gray matter, white matter and a circumventricular organ of rat brain. Blood Vessels 23, 261-270.

Gross P. M. (1992) Circumventricular organ capillaries. Prog Brain Res 91, 219-233.

Guyton J. R., Miller S. E., Martin M. E., Khan W. A., Roses A. D., and Strittmatter W. J. (1998) Novel large apolipoprotein E-containing lipoproteins of density 1.006-1.060 g/ml in human cerebrospinal fluid. J Neurochem 70, 1235-1240.

Halliwell B. and Chirico S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 57, 715S-724S.

Han X., Cheng H., Fryer J. D., Fagan A. M., and Holtzman D. M. (2003) Novel role for apolipoprotein E in the central nervous system. Modulation of sulfatide content. J Biol Chem 278, 8043-8051.

Heeren J. and Beisiegel U. (2001) Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. Curr Opin Lipidol 12, 255-260.

Heeren J., Grewal T., Laatsch A., Rottke D., Rinninger F., Enrich C., and Beisiegel U. (2003) Recycling of apoprotein E is associated with cholesterol efflux and high density lipoprotein internalization. J Biol Chem 278, 14370-14378.

Heeren J., Beisiegel U., and Grewal T. (2006) Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 442-448.

Herz J. and Strickland D. K. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J Clin Invest 108, 779-784.

Hosomi A., Goto K., Kondo H., Iwatsubo T., Yokota T., Ogawa M., Arita M., Aoki J., Arai H., and Inoue K. (1998) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. Neurosci Lett 256, 159-162.

Ishida B. Y., Albee D., and Paigen B. (1990) Interconversion of prebeta-migrating lipoproteins containing apolipoprotein A-I and HDL. J Lipid Res 31, 227-236.

Jenne D. E., Lowin B., Peitsch M. C., Bottcher A., Schmitz G., and Tschopp J. (1991) Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. J Biol Chem 266, 11030-11036.

Johnson A. K. and Gross P. M. (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. FASEB J 7, 678-686.

Jonas A., Kezdy K. E., and Wald J. H. (1989) Defined apolipoprotein A-I conformations in reconstituted high density lipoprotein discs. J Biol Chem 264, 4818-4824.

Jong M. C., Hofker M. H., and Havekes L. M. (1999) Role of ApoCs in lipoprotein metabolism - Functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 19, 472-484.

Kaplan R. J. and Greenwood C. E. (1998) Dietary saturated fatty acids and brain function. Neurochem Res 23, 615-626.

Koch S., Donarski N., Goetze K., Kreckel M., Stuerenburg H. J., Buhmann C., and Beisiegel U. (2001) Characterization of four lipoprotein classes in human cerebrospinal fluid. J Lipid Res 42, 1143-1151.
Kozarsky K. F., Donahee M. H., Rigotti A., Iqbal S. N., Edelman E. R., and Krieger M. (1997) Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. Nature 387, 414-417.

Lauer S. J., Walker D., Elshourbagy N. A., Reardon C. A., Levywilson B., and Taylor J. M. (1988) 2 Copies of the Human Apolipoprotein C-I Gene Are Linked Closely to the Apolipoprotein E-Gene. Journal of Biological Chemistry 263, 7277-7286.

Linton M. F., Gish R., Hubl S. T., Butler E., Esquivel C., Bry W. I., Boyles J. K., Wardell M. R., and Young S. G. (1991) Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. J Clin Invest 88, 270-281.

Lund-Katz S., Murley Y. M., Yon E., Gillotte K. L., and Davidson W. S. (1996) Comparison of the structural and functional effects of monomeric and dimeric human apolipoprotein A-II in high density lipoprotein particles. Lipids 31, 1107-1113.

MacDonald P. N., Bok D., and Ong D. E. (1990) Localization of cellular retinolbinding protein and retinol-binding protein in cells comprising the blood-brain barrier of rat and human. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4265-4269.

Methia N., Andre P., Hafezi-Moghadam A., Economopoulos M., Thomas K. L., and Wagner D. D. (2001) ApoE deficiency compromises the blood brain barrier especially after injury. Mol Med 7, 810-815.

Mockel B., Zinke H., Flach R., Weiss B., Weiler-Guttler H., and Gassen H. G. (1994) Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium in vitro. J Neurochem 62, 788-798.

Owens B. J., Anantharamaiah G. M., Kahlon J. B., Srinivas R. V., Compans R. W., and Segrest J. P. (1990) Apolipoprotein A-I and its amphipathic helix peptide

105

analogues inhibit human immunodeficiency virus-induced syncytium formation. J Clin Invest 86, 1142-1150.

Panzenboeck U., Balazs Z., Sovic A., Hrzenjak A., Levak-Frank S., Wintersperger A., Malle E., and Sattler W. (2002) ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. J Biol Chem 277, 42781-42789.

Pardridge W. M., Boado R. J., and Farrell C. R. (1990) Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. J Biol Chem 265, 18035-18040.

Pennacchio L. A., Olivier M., Hubacek J. A., Cohen J. C., Cox D. R., Fruchart J. C., Krauss R. M., and Rubin E. M. (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. Science 294, 169-173.

Peruzzo B., Pastor F. E., Blazquez J. L., Schobitz K., Pelaez B., Amat P., and Rodriguez E. M. (2000) A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. Exp Brain Res 132, 10-26.

Pilon A., Briand O., Lestavel S., Copin C., Majd Z., Fruchart J. C., Castro G., and Clavey V. (2000) Apolipoprotein All enrichment of HDL enhances their affinity for class B type I scavenger receptor but inhibits specific cholesteryl ester uptake. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 1074-1081.

Pitas R. E., Boyles J. K., Lee S. H., Foss D., and Mahley R. W. (1987) Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. Biochim Biophys Acta 917, 148-161.

Pitas R. E., Boyles J. K., Lee S. H., Hui D., and Weisgraber K. H. (1987) Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. J Biol Chem 262, 14352-14360.

Raghu P., Ravinder P., and Sivakumar B. (2003) A new method for purification of human plasma retinol-binding protein and transthyretin. Biotechnol Appl Biochem 38, 19-24.

Ragozin S., Niemeier A., Laatsch A., Loeffler B., Merkel M., Beisiegel U., and Heeren J. (2005) Knockdown of hepatic ABCA1 by RNA interference decreases plasma HDL cholesterol levels and influences postprandial lipemia in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25, 1433-1438.

Rinninger F., Brundert M., Budzinski R. M., Fruchart J. C., Greten H., and Castro G. R. (2003) Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates a higher selective cholesteryl ester uptake from LpA-I compared with LpA-I:A-II lipoprotein particles. Atherosclerosis 166, 31-40.

Roheim P. S., Carey M., Forte T., and Vega G. L. (1979) Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 4646-4649.

Rubin E. M., Krauss R. M., Spangler E. A., Verstuyft J. G., and Clift S. M. (1991) Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. Nature 353, 265-267.

Rubin L. L. and Staddon J. M. (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. Annu Rev Neurosci 22, 11-28.

Savion N. and Gamliel A. (1988) Binding of apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-IV to cultured bovine aortic endothelial cells. Arteriosclerosis 8, 178-186.

Scherrmann J. M. (2002) [Exchanges through the blood-brain barrier]. Ann Pharm Fr 60, 372-379.

Schmitz G., Robenek H., Lohmann U., and Assmann G. (1985) Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. EMBO J 4, 613-622.

Schmitz G. and Buechler C. (2002) ABCA1: regulation, trafficking and association with heteromeric proteins. Ann Med 34, 334-347.

Shayo M., McLay R. N., Kastin A. J., and Banks W. A. (1997) The putative bloodbrain barrier transporter for the beta-amyloid binding protein apolipoprotein j is saturated at physiological concentrations. Life Sci 60, L115-L118.

Smith J. D., Le Goff W., Settle M., Brubaker G., Waelde C., Horwitz A., and Oda M. N. (2004) ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. J Lipid Res 45, 635-644.

Sparks D. L., Anantharamaiah G. M., Segrest J. P., and Phillips M. C. (1995) Effect of the cholesterol content of reconstituted LpA-I on lecithin:cholesterol acyltransferase activity. J Biol Chem 270, 5151-5157.

Spector A. A. (2001) Plasma free fatty acid and lipoproteins as sources of polyunsaturated fatty acid for the brain. J Mol Neurosci 16, 159-165.

Srinivas R. V., Venkatachalapathi Y. V., Rui Z., Owens R. J., Gupta K. B., Srinivas S. K., Anantharamaiah G. M., Segrest J. P., and Compans R. W. (1991) Inhibition of virus-induced cell fusion by apolipoprotein A-I and its amphipathic peptide analogs. J Cell Biochem 45, 224-237.

Stein O. and Stein Y. (1999) Atheroprotective mechanisms of HDL. Atherosclerosis 144, 285-301.

Steinberg D. (1996) A docking receptor for HDL cholesterol esters. Science 271, 460-461.

Steinkasserer A., Cockburn D. J., Black D. M., Boyd Y., Solomon E., and Sim R. B. (1992) Assignment of apolipoprotein H (APOH: beta-2-glycoprotein I) to human chromosome 17q23----qter; determination of the major expression site. Cytogenet Cell Genet 60, 31-33.

Steinmetz A., Barbaras R., Ghalim N., Clavey V., Fruchart J. C., and Ailhaud G. (1990) Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. J Biol Chem 265, 7859-7863.

Tso P., Liu M., and Kalogeris T. J. (1999) The role of apolipoprotein A-IV in food intake regulation. J Nutr 129, 1503-1506.

von Eckardstein A., Hersberger M., and Rohrer L. (2005) Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 8, 147-152.

Wang N., Silver D. L., Costet P., and Tall A. R. (2000) Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. J Biol Chem 275, 33053-33058. Weisgraber K. H., Bersot T. P., Mahley R. W., Franceschini G., and Sirtori C. R. (1980) A-Imilano apoprotein. Isolation and characterization of a cysteine-containing variant of the A-I apoprotein from human high density lipoproteins. J Clin Invest 66, 901-907.

Weisgraber K. H., Rall S. C., Jr., Bersot T. P., Mahley R. W., Franceschini G., and Sirtori C. R. (1983) Apolipoprotein A-IMilano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. J Biol Chem 258, 2508-2513.

Wolburg H. and Lippoldt A. (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. Vascul Pharmacol 38, 323-337.

Woods S. C., Seeley R. J., Porte D., Jr., and Schwartz M. W. (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280, 1378-1383.

Xu Q., Bernardo A., Walker D., Kanegawa T., Mahley R. W., and Huang Y. (2006) Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. J Neurosci 26, 4985-4994.

Yepes M., Sandkvist M., Moore E. G., Bugge T. H., Strickland D. K., and Lawrence D. A. (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. J Clin Invest 112, 1533-1540.

Yui Y., Aoyama T., Morishita H., Takahashi M., Takatsu Y., and Kawai C. (1988) Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I. J Clin Invest 82, 803-807.

110

Zannis V. I., Breslow J. L., Utermann G., Mahley R. W., Weisgraber K. H., Havel R. J., Goldstein J. L., Brown M. S., Schonfeld G., Hazzard W. R., and Blum C. (1982) Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. J Lipid Res 23, 911-914.

Zhang H., Links P. H., Ngsee J. K., Tran K., Cui Z., Ko K. W., and Yao Z. (2004) Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment. J Biol Chem 279, 2221-2230.

Zhang Y. and Pardridge W. M. (2001) Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. J Neurochem 76, 1597-1600.

Zitierte Lehrbücher:

Caballero B. and Sadler, M. J. Encyclopedia of human nutrition, ACADEMIC PRESS Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag Schwandt, Richter, Parhofer, Handbuch der Fettstoffwechselstörungen, Schattauer Stryer, Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH Deetjen/Speckmann, Physiologie; München 1992

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas, die freundliche Unterstützung und die Bereitstellung der Mittel.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Behrendt für die kompetente und persönliche Betreuung und den hilfreichen wissenschaftlichen Diskurs.

Vielen Dank an Dr. Lars Rellin der mir über den gesamten Zeitraum der Arbeiten an der Dissertation stets mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und dessen kollegiale Zusammenarbeit ich sehr zu schätzen wusste.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei der gesamten Arbeitsgruppe des Institutes "Molekulare Zellbiologie" für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere möchte ich mich für die Unterstützung durch Herrn Dr. Klaus Tödter und Herrn Dieter Münch-Harrach bei der Arbeit mit dem GC und der HPLC und bei Dorte Wendt, Sandra Ehret und Walter Tauscher für die Einweisung in labortechnische Methoden bedanken.

Bei der Deutschen Forschergemeinschaft möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung während der Arbeit an der Dissertation mittels eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs 336, Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel und seinem Sprecher Prof. Dr. med. H. J. Seitz bedanken.

Personalien

Name:	Vogel
Vorname:	Sarah
Geburtstag:	06.03.1979
Geburtsort:	Lengerich (Westf.)

Schulausbildung

1985-1989:	Grundschule Lengerich
1989-1998:	Hannah-Arendt-Gymnasium/Lengerich
1998:	Erwerb der Hochschulreife/Abitur; Durchschnittsnote: 1,3

Universitätsausbildung

seit April 1999:	Studium an der Friedrich-Wilhelms-Universität/Bonn
März 2001:	Ärztliche Vorprüfung; Note: gut
März 2002:	1. Staatsexamen; Note: gut
seit Okt. 2002:	Studium an dem Universitätsklinikum Eppendorf/Hamburg
August 2003 bis	Durchführung des experimentellen Teils der Doktorarbeit
Januar 2004	
August 2003 bis	Mitglied des Graduierten Kollegs 336
Februar 2004	
März 2005:	2. Staatexamen; Note: gut
Juni 2006:	3. Staatsexamen; Note: sehr gut; Gesamtnote: 1,66

Sarah Vogel

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: _____