

Abteilung für Molekulare Zellbiologie  
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Prof. Dr. rer. Physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel  
Martinistr. 52, 20246 Hamburg

**Untersuchung zur Assoziation der hepatischen Lipase an  
Lipoproteine in Abhängigkeit des Apo E- Genotyps**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Medizin der  
Universität Hamburg

Vorgelegt von

**Mahtab Bazargan**  
aus Teheran  
Hamburg 2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Der Lipoprotein Stoffwechsel .....	4
1.2	Die Funktion der Apolipoproteine.....	6
1.3	Der Apo E- Polymorphismus .....	7
1.4	Die Lipasen .....	9
	1.4.1 Die Lipoproteinlipase (LPL) .....	9
	1.4.2 Die Hepatische Lipase (HL) .....	11
1.5	Zielsetzung .....	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1	Material .....	14
	2.1.1 Chemikalien und Materialien .....	14
	2.1.2 Puffer .....	14
2.2	Geräte .....	14
2.3	Biologisches Material .....	15
2.4	Antikörper .....	15
2.5	Methoden .....	16
	2.5.1 Gelfiltration .....	16
	2.5.2 Bestimmung der Konzentration von Triglyzeriden und Cholesterin .....	16
	2.5.3 Slot Blot und Immundetektion .....	17
	2.5.4 Elektronenmikroskopie .....	17
	2.5.5 HL und LPL Aktivitätsassay .....	18
2.6	Patientenkollektiv .....	18
2.7	Probenaufbereitung .....	19
2.8	Statistik .....	19

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
3.1	Probanden .....	20
3.2	Auftrennung des Plasmas .....	22
3.3	Verteilung von Cholesterin in den Fraktionen .....	24
3.4	Verteilung der HL, LPL und Apo E auf die Lipoproteinfraktionen .....	26
3.5	Vergleich zwischen Plasmafiltration und Plasmazentrifugation .....	31
3.6	Elektronenmikroskopische Darstellung von Lipoproteinen und HL .....	34
3.7	Aktivitätsbestimmung von LPL und HL der Apo E- Genotypen .....	36
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>38</b>
4.1	Einfluss von Heparin auf die HL .....	39
4.2	Auswirkung der Probenbehandlung auf die HL- Intensität .....	40
4.3	FPLC als die Methode der Wahl zur Auftrennung von Lipoproteinen...	40
4.4	Zuordnung der Lipoproteinklassen zu Elutionsfraktionen .....	41
4.5	Auswirkung der Nachweismethode auf die HL- Detektion .....	41
4.6	Verteilung der HL auf Lipoproteine .....	42
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>54</b>
	Abkürzungen .....	70

## **1. Einleitung**

Der seit Jahren zu beobachtende stetige Anstieg der Sterbefälle durch Krankheiten des Herzkreislaufsystems geht vor allem auf eine Zunahme der sogenannten "koronaren Herzkrankheiten" (KHK), insbesondere des Herzinfarktes, zurück. Durch Langzeitstudien konnte ein Zusammenhang zwischen der Manifestation der arteriosklerotischen Herz- Kreislauf- Erkrankung und dem Vorliegen bestimmter Risikofaktoren gesichert werden. Die Hyper- und Dyslipoproteinämie ist als Risikofaktor erster Ordnung für die KHK schon lange bekannt. Die Beziehung zwischen erhöhtem Cholesterin im Serum und dem Risiko einer KHK ist so eindeutig gesichert, daß man zumindest für das LDL- Cholesterin von einer kausalen Beziehung sprechen muß (Steinberg 1989). Da eine Hypercholesterinämie nicht schmerzhaft ist, hat die Früherkennung besondere Bedeutung bei der Vorbeugung der KHK. Die Bewertung und pathobiochemische Einordnung der Lipid- Risikofaktoren erfordern vom Arzt eine fundierte Kenntnis des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels.

### **1.1. Der Lipoproteinstoffwechsel**

Lipide sind in der Ernährung des Menschen von großer Bedeutung. Als Triglyzeride stellen sie einen wichtigen Energieträger und Reservestoff dar. Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin sind Hauptbestandteile der biologischen Membran. Cholesterin ist zugleich Ausgangsstoff für die Synthese der Gallensäuren, der Steroidhormone und des Vitamin D. Fast alle Lipide können im menschlichen Organismus selbst synthetisiert werden, nur die mehrfach ungesättigten Fettsäuren müssen als essentieller Nahrungsbestandteil zugeführt werden.

Lipide sind niedermolekulare, wasserunlösliche Kohlenwasserstoffketten, die aliphatisch oder ringförmig angeordnet sein können. Die hauptsächlich im menschlichen Blut vorkommenden wasserunlöslichen Lipide sind Phospholipide, Triglyzeride, fettlösliche Vitamine und Cholesterin. Sie werden im Blut in Form von Lipoproteinen transportiert (Havel et al 1980). Diese hochmolekularen,

pseudomicellären Komplexe enthalten neben den Lipiden sogenannte Apolipoproteine, die durch ihren amphiphilen Charakter der wesentliche strukturgebende Bestandteil der Lipoproteine sind. Der lipophile Kern dieser Partikel besteht überwiegend aus Triglyzeriden und Cholesterinestern, die Hülle wird gebildet aus dem hydrophilen Bereich der Apolipoproteine und den hydrophilen Gruppen der Phospholipide und des Cholesterins.

Apolipoproteine haben neben der Vermittlung von Transportprozessen von Lipiden im Organismus andere wichtige Funktionen innerhalb des Lipidstoffwechsels. Sie regulieren als Co-Faktoren die Aktivität von Enzymen, z.B. der endothelständigen Lipoproteinlipase (LPL), und dienen als Liganden für spezifische Rezeptoren, die die zelluläre Aufnahme steuern (Havel et al 1989).

Im Plasmalipidstoffwechsel werden das exogene, das endogene und das reverse Cholesterintransportsystem unterschieden (Brown et al. 1986).

Der exogene Stoffwechselweg beschreibt den Metabolismus der Nahrungslipide und ihren Transport vom Darm zur Leber. Nach der Resorption werden die Lipide in der Mukosa des Dünndarms mit Apolipoproteinen, vor allem Apo B-48, assoziiert und als Chylomikronen über den Ductus thoracicus unter Umgehung der Leber in den venösen Kreislauf abgegeben. Ihr Triglyzeridanteil wird in Fett- und Muskelgewebe durch die endothelständige LPL hydrolytisch abgespalten. Das Apo C-II dient dabei als Aktivator der LPL. Die entstehenden Abbauprodukte (Chylomikronen-remnants), die reich an Cholesterinestern sind, besitzen neben dem verbleibenden Strukturprotein Apo B-48 hauptsächlich Apo E. Sie werden über einen Chylomikronen-remnants-Rezeptor in die Leberzellen aufgenommen.

Der endogene Stoffwechselweg beschreibt den Metabolismus der Lipide hepatischen Ursprungs. Die Leber produziert Lipoproteine mit sehr geringer Dichte, VLDL, die Apolipoproteine Apo B-100, Apo E und Apo C enthalten. Sie werden in der Blutbahn über Lipoproteine intermediärer Dichte, IDL, zu Lipoproteinen geringer Dichte, LDL, umgebaut, wobei als Apolipoprotein im wesentlichen nur Apo B-100 erhalten bleibt. Am Abbau der IDL zu LDL ist mit großer Wahrscheinlichkeit die hepatische Lipase (HL) beteiligt (Grundy et al, 1990). Die LDL, die hauptsächlich Cholesterin transportieren, werden von allen Körperzellen über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Die Leber spielt für den LDL- Abbau die größte Rolle (Dietschy et al, 1983).

Durch den reversen Cholesterintransport wird Cholesterin aus der Peripherie zur

Leber transportiert, wobei die sehr dichten Lipoproteine (HDL) eine Schlüsselstellung einnehmen. Leber und Dünndarm synthetisieren diskoidale HDL, die von den peripheren Zellen freies Cholesterin aufnehmen, das durch die Lecithin- Cholesterin-Acyl- Transferase (LCAT) verestert wird. Cholesterinbeladene HDL reichern Apo E an und gelangen als HDL mit Apo E zur Leber. Ein Teil des veresterten Cholesterins wird unter Vermittlung von Cholesterinester- Transfer- Proteinen auf Apo B enthaltende Lipoproteine übertragen, um über LDL in die Leber oder erneut in periphere Gewebe zu gelangen.

Verschiedene Störungen des Lipoproteinstoffwechsels können zu einer Hypercholesterinämie und damit zu der Entwicklung von Atherosklerose führen. Als bekannteste ist die familiäre Hypercholesterinämie zu nennen, bei der es aufgrund des LDL- Rezeptordefektes zu einer Anhäufung dieser Lipoproteine im Blut, verbunden mit stark erhöhten Cholesterinwerten, kommt. Patienten mit der homozygoten Form dieser Hypercholesterinämie beginnen bereits in den ersten 10 Lebensjahren an koronarer Herzkrankheit zu leiden.

## **1.2. Die Funktion der Apolipoproteine**

Apolipoproteine dienen der Stabilisierung und dem Transport von Lipidemulsionen und sind bestimmend für deren Stoffwechsel. Ohne Apolipoproteine können Lipide weder aus der Zelle sezerniert werden noch ist eine effiziente Aufnahme in Zellen bzw. Organe möglich. Darüber hinaus sind Apolipoproteine Co- Faktoren für Enzyme, die den Lipidanteil der Lipoproteine umsetzen.

Apo A-I ist ein Strukturprotein der HDL und gilt als Aktivator der Lecithin- Cholesterin-Acyltransferase, die für die Bildung von Cholesterinester obligat ist. Apo A-II scheint die hepatische Lipase zu aktivieren, es bleibt jedoch zu klären, ob dieser Effekt spezifisch ist. Apo A-IV spielt im Metabolismus triglyceridreicher Lipoproteine und der HDL eine entscheidende Rolle.

Apo B-100 ist das einzige Apolipoprotein der LDL. Es bindet an den B/E- Rezeptor und ist für die Sekretion von Triglyzeride und Cholesterin aus der Leber und Dünndarm verantwortlich. Apo B-48 ist für die Resorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitamine aus der Nahrung verantwortlich.

### 1.3. Apo E- Polymorphismus

Das Apo E ist ein Arginin- reiches Protein, das mehrere Funktionen im Stoffwechsel der Lipoproteine aufweist: Es vermittelt die Aufnahme von Chylomikronen- Remnants in die Leber und ist für den Abbau von VLDL- Remnants und deren Umwandlung zu LDL verantwortlich. Im Plasma findet man Apo E in mehreren Isoformen. Die drei Hauptisoformen des Apo E beim Menschen, E 2, E 3 und E 4, werden durch drei verschiedene Allele eines Genlocus kodiert. Die drei Allelen werden codominant vererbt.

Damit lassen sich drei Homozygote ( E 2/2, E 3/3, E 4/4) und drei Heterozygote (E 2/3, E 4/2, E 3/4) Phänotypen unterscheiden.

Die sechs Phänotypen treten unterschiedlich häufig auf ;

<u>Phänotyp</u>	<u>Häufigkeit (%)</u>
E 3/3	60
E 3/4	22
E 2/3	12
E 4/4	3
E 2/4	2
E 2/2	1

Das Apo E 4 unterscheidet sich von dem Apo E 3 durch einen Austausch des Cystein-112 gegen Arginin, und trägt damit eine positive Ladung mehr .

Beim Apo E 2 hat gegenüber dem Apo E 3 ein Austausch des Arginin-158 gegen Cystein stattgefunden, so dass eine positive Ladung weniger vorliegt (Utermann et al 1977).

Dieser Austausch einer Aminosäure in der Nähe der Bindungsstelle führt zu einer deutlich verminderten Bindungsaktivität des Apo E 2 an der LDL- Rezeptor, während zwischen der Affinität des Apo E 3 und Apo E 4 kein wesentlicher Unterschied besteht (Schneider et al 1981). Der Grund der verminderten Affinität des Apo E 2 liegt vermutlich in einer veränderten Konformation der Bindungsregion (Innerrity et al 1984).

Der Apo E- Polymorphismus beeinflusst sowohl den exogenen als auch den endogenen Cholesterintransport. In Vivo werden Chylomikronen- und VLDL- Remnants, die Apo E 2 enthalten, aufgrund der schlechteren Bindung von Apo E 2

an LDL- Rezeptor und Chylomikronen- Remnants verzögert abgebaut. Die Konzentration der Remnants steigt daher bei Apo E 2/2 Homozygoten im Blut an, die Konzentration der LDL ist eher niedrig, da nämlich einerseits weniger Remnants in LDL umgewandelt und andererseits durch verminderten Einstrom von Cholesterin in die Leberzelle die LDL- Rezeptoren hochreguliert werden. Aus diesem Grund wird dem Apo E 2/2 Allel ein kardioprotektiver Effekt zugeschrieben. Allerdings entwickelt ein geringer Teil der Apo E 2/2 Homozygoten eine Typ- III- Hyperlipoproteinämie nach Friedrickson, wobei der zusätzliche pathogenetische Faktor, der die Hyperlipoproteinämie Typ- III bedingt, noch nicht bekannt ist. Klinisch fällt diese Stoffwechselstörung meist erst im Erwachsenenalter auf. Neben der zum Teil massiven Erhöhung von Cholesterin und Triglyzeride im Plasma treten bei den Patienten Xanthome verschiedenen Ausprägung auf. Auffällig sind Palmarxanthome, die bei Diagnosestellung bei jedem zweiten Erkrankten festzustellen sind, und welche bis heute nicht im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen beschrieben wurden. Die Inzidenz von peripherer Artherosklerose und Koronarsklerose ist bei diesen Patientenkollektiv hoch.

Das Apo E 4/4 hat ein umgekehrten Effekt auf den Lipoproteinstoffwechsel, es ist mit hohem LDL- Cholesterin assoziiert. Obwohl in Vitro Apo E 3 und Apo E 4 die gleiche Affinität zum LDL- Rezeptor aufweisen, wird in Vivo Apo E 4 deutlich schneller abgebaut. Man nimmt an daß dies auf eine unterschiedliche Verteilung der Apo E Isoformen auf die Lipoproteinklassen zurückzuführen ist. Apo E 4 hat eine höhere Affinität für Triglyzerin- reiche Lipoproteine, während Apo E 2 bevorzugt mit HDL assoziiert wird.

Zur Bestimmung des Phänotyps werden die Apo E Genotypen aufgrund ihrer unterschiedliche Nettoladung durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und immunologisch dargestellt. Im Plasma findet man neben genetisch determinierten Isoformen zusätzliche Banden, die dadurch entstehen, daß jede Isoform eine variable Zahl an Neuraminsäureresten trägt, zusätzliche negative Ladungen in das Molekül einführen.

## **1.4. Die Lipasen**

Ausgangspunkt der Fettverwertung zur Energiegewinnung ist die Hydrolyse der Triglyzeride durch die Lipasen. Die Lipoproteinlipase (LPL) bildet mit der Hepatische Lipase (HL) und der Pankreaslipase die Gruppe der neutralen Lipasen (Hide et al 1992). Die drei Lipasen haben eine ähnliche Funktion im Stoffwechsel, der Wirkort ist jedoch unterschiedlich. Während die LPL für die Hydrolyse von VLDL und Chylomikronen verantwortlich ist, katalysiert die HL die Hydrolyse von Triglyzeriden des Intermediate Density Lipoproteins (IDL) unter Bildung der Low Density Lipoproteine (LDL) und die Hydrolyse von Triglyzeriden und Phospholipiden der HDL ( Datta et al.1988).

Im Vergleich zwischen LPL und HL konnte gezeigt werden, daß die beiden Enzyme Triglyzeride hydrolysieren und daß die HL darüber hinaus eine 2- bis 3-fach höhere Affinität gegenüber Phospholipiden aufweist (Deckelbaum et al. 1992). Die Pankreaslipase ist hauptsächlich involviert in die direkte Lipolyse der Nahrungsfette und wird von der Bauchspeicheldrüse sezerniert.

Vergleicht man die Aminosäuresequenz innerhalb der Lipasefamilie, zeigt sich eine hohe Strukturhomologie (Hide et al. 1992). Man nimmt an, daß sie im Laufe der Evolution durch Genduplikation entstanden sind und den speziellen Anforderung angepaßt wurden.

### **1.4.1. Die Lipoproteinlipase (LPL)**

Die LPL ist eine Acylglycerol- und Phosphatidhydrolase und ein multifunktionelles Enzym und ein Schlüsselenzym des Lipoproteinstoffwechsels (Olivecrona et al. 1971). Ihre Funktion besteht in der hydrolytischen Spaltung von Triglyzeriden aus Chylomikronen und VLDL (Olivecrona et al. 1984) und der Bindungsvermittlung von Lipoproteinen an deren Rezeptoren (Beisiegel et al. 1991). Der Wirkort der LPL ist das vaskuläre Endothel, wo sie an Heparinsulfat gebunden ist. Die LPL wird in verschiedenen Geweben synthetisiert. Die mRNA für LPL konnte durch in- situ-Hybridisierung in Adipozyten, Myozyten, epithelialen, intestinalen und anderen Zellen nachgewiesen werden. Die wichtigsten Syntheseorte sind Fettgewebe, Herz und Muskulatur. Die adulte Leberzelle synthetisiert im Gegensatz zur neonatalen Leberzelle keine LPL (Peinado-Onsurbe et al.1992). Das vaskuläre Endothel produziert keine LPL, so daß die LPL von ihrem Syntheseort zu ihrem Wirkungsort wandern muss (Camps et al. 1990).

Die LPL wird als inaktives Proenzym im endoplasmatischen Retikulum gebildet und im Golgiapparat glykosyliert. In ihrer aktiven Form wird die LPL als Homodimer (Iverius et al. 1976) in den interstitiellen Raum sezerniert. Von dort muss die LPL durch die Endothelzellen zu deren luminaler Seite transportiert werden. Es wird angenommen, dass das Enzym durch einen rezeptorabhängigen Prozess in die Zelle aufgenommen wird, die Endothelzelle in einem Vesikel durchwandert und zur luminalen Seite sezerniert wird (Saxena et al. 1989).

Der Proteinanteil des Enzyms besteht aus 448 Aminosäuren (Wion et al. 1987) und besitzt eine Molekularmasse von 50 kDa (Olivecrona et al. 1971). Der Kohlenhydratanteil bildet 8% der Molekularmasse (Iverius et al. 1985) und hat eine entscheidende Bedeutung für die Sekretion und katalytische Aktivität der LPL (Wang-Iverson et al. 1980). Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 8.9 (Yang CZ et al. 1989). Das Maximum ihrer enzymatischen Aktivität liegt zwischen pH 8.0 und 8.5. Salzkonzentrationen größer als 1M NaCl inhibieren ihre katalytische Aktivität (Olivecrona et al. 1971).

Zahlreiche Arbeiten haben gezeigt, dass die entscheidende Region für die Lipidbindung auf dem C-terminalen Ende der LPL zu liegen scheint (Lookene et al. 1993, Williams et al. 1994). Die LPL besitzt zusätzlich zu Apo C-II (Clarke et al. 1983) auch eine Heparinbindungsstelle (Yang et al. 1989), mit welcher sie an Proteoglykane der Endothelzelle binden kann. Es wird angenommen, dass die Bindungsstelle durch elektrostatische Anziehungskräfte entsteht (Bengtsson-Olivecrona et al. 1985), die genaue Lokalisation der Bindungsstelle ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die Bindungsstärke ist von dem Anteil der Sulfateinheiten an den Proteoglykanen und somit deren Ladungsdichte abhängig (Olivecrona et al. 1987).

Die Bindung der LPL an die triglyzeridreiche Lipoproteine ist essentiell für ihre Funktion als Enzym und Rezeptorligand. Die Faktoren, die zu der Assoziation der triglyzeridreiche Lipoproteine mit der endothelständigen LPL führen, sind unzureichend bekannt. In Anlehnung an die Sequenz der Pankreaslipase, für welche die Lipidbindungsstelle bekannt ist, vermutete man zunächst, dass die Region von Asp 125 bis Gly 144 entscheiden sei (Wion et al. 1987). Bei der Aufklärung der Tertiärstruktur der Pankreaslipase zeigte sich jedoch, dass die analoge hydrophobe Region der LPL in einer Tasche im Bereich des aktiven Zentrums verborgen liegt (Winkler et al. 1990).

Die Anlagerung der negativ geladenen Aminosäuren des C-terminalen Endes des

Apo CII an die positiv geladene Bindungsstelle der LPL führt zwar zu deren Aktivierung (Garfinkel et al. 1987, Hide et al. 1992), trägt vermutlich jedoch nicht zur Bindung bei. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Anreicherung von triglyzeridreiche Lipoproteine mit einem physiologisch zusammengesetzten Gemisch von Apo CII und Apo CIII die Affinität für LPL herabsetzt ( van Barlingen et al.1996). Bei Injektion von Heparin bilden sich Komplexe aus LPL und Heparin, was zur Lösung der Bindung zwischen LPL und Proteoglykanen und somit zu einer Freisetzung der Lipase in der Blutstrom führt. Eine Reihe von Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß die Zugabe von Heparin zu einer deutlichen Verminderung der LPL-Bindung an die Zelloberflächen führt ( Cheng et al.1981, Wang-Iverson et al. 1980). In humanem Plasma ist eine niedrige basale LPL Aktivität von 0,3-1 mU/ml meßbar, die weniger als 1% der nach Injektion von Heparin gemessene Aktivität von 150-300 mU/ml (Peterson et al. 1985) beträgt, von der man annimmt, dass sie das gesamte am Endothel gebundene LPL repräsentiert.

Die Feststellung, daß nach der Injektion von Heparin die gesamte im Kreislauf befindliche Menge von LPL freigesetzt wird, wird bei der Bestimmung der Gesamtaktivität und Gesamtmasse der LPL zur Differenzialdiagnostik bei der Patienten mit Fettstoffwechselstörung benutzt.

In dieser Arbeit diente die Tatsache, daß das Postheparinplasma wesentlich mehr LPL enthält als Präheparin- Plasma, als Kontrolle bei der Untersuchung der Assoziation von HL mit Lipoproteinen.

#### **1.4.2. Die Hepatische Lipase (HL)**

Die HL ist ein lipolytisches Enzym mit einer molekularen Masse von 66 kDa, dessen Hauptsyntheseort die Leber ist. Nach ihrer Sekretion wird sie durch Proteoglykane an die Oberfläche der Hepatozyten und des Endothels gebunden. Die HL wirkt als Acylglycerolhydrolase und als Phospholipase, und spaltet dabei sowohl Triglyzeride in Chylomikronen-Remnants, IDL und HDL als auch Phospholipide in HDL<sub>2</sub>. Die HL beeinflusst möglicherweise auch den reversen Cholesteroltransport und beschleunigt den Cholesteroltransfer zu den steroidbildenden Geweben wie den Nebennieren und den Ovarien.

Im Gegensatz zur LPL wird die HL durch 1 M NaCl aktiviert und benötigt für ihre Aktivität keinen Kofaktor. Außerdem besitzt die HL eine stärkere Aktivität für Phospholipide als die LPL.

Die Rolle der HL im Lipoprotein-Stoffwechsel kann in eine lipolytische und eine nicht lipolytische unterteilt werden. Studien, in denen ein funktioneller Defekt der HL in Tiermodellen induziert wurde, weisen auf eine lipolytische Rolle der HL im VLDL, IDL, HDL und Remnant-Stoffwechsel hin (Kussi et al. 1979, Goldberg et al. 1982 und Sultan et al. 1990). Dazu passend sind die klinischen Befunde bei HL-defizienten Patienten, die Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie sowie erhöhte VLDL-Remnants, LDL und HDL aufweisen (Breckenridge et al. 1982, Carlson et al. 1986, Auwerx et al. 1990). Neuere In-Vitro-Studien weisen auf eine zusätzliche, nicht lipolytische Funktion im zellulären Lipidstoffwechsel hin. Die HL könnte als Ligand dienen, der die Interaktion von Lipoproteinen mit Zelloberflächenrezeptoren erleichtert. In Experimenten an Zellkulturen konnte gezeigt werden, daß die HL die Aufnahme von verschiedenen Lipoproteinen steigert (Krapp et al. 1996, Ji Z-S et al. 1994).

Verschiedene Studien haben auf eine protektive Rolle der HL bei der Arteriosklerose hingewiesen. Es wurde gezeigt, daß die Aktivität der HL bei den Heterozygoten für Cholesterinester-Transferprotein-Defekt mit den kardiovaskulären Erkrankungen signifikant niedriger als in der Normalbevölkerung ist (Hirano et al. 1995). Zugleich ist die Aktivität der HL im Postheparin-Plasma bei den Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen mit normalen Lipidwerten deutlich reduziert (Groot et al. 1991). Bei den homozygoten Patienten mit familiären Hypercholesterinämien ist der Grad der Kalzifizierung bei der Arteriosklerose mit der Aktivität der HL invers korreliert (Dugi et al. 1997). Die Mutation des Promotors der HL an der Position -480 ist mit Aktivitätsabnahme der HL bei den Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (Jansen et al. 1997).

Auf eine mögliche pro-atherogene Rolle der HL weist der Effekt des Enzyms auf das Plasmalipoprotein-Profil, besonders des HDL, hin. Entsprechend der Funktion der HL beim Abbau von HDL-Phospholipiden und Triglyzeriden ist ihre Aktivität invers korreliert mit den HDL-Cholesterin-Werten (Jackson et al. 1990, Blades et al. 1993). Da zahlreiche epidemiologische Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen niedrigen HDL-Werten und dem Risiko der Arteriosklerose gezeigt haben, könnte die HL auf diese Weise die Entstehung von Gefäßverkalkung fördern.

## **1.5. Zielsetzung dieser Arbeit**

HL, LPL und Apo E spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Lipoproteine. Defekte bzw. funktionelle Störungen des Apo E und der LPL resultieren in einer Akumulation von Chylomikronen oder VLDL- Remnants, was zur Entstehung von Atherosklerose führen kann. Der genetische Polymorphismus des Apo E beeinflusst ebenfalls den Fettstoffwechsel. Während Apo E 4 eine höhere Affinität für triglyzeridreiche Lipoproteine aufweist, assoziiert Apo E 2 bevorzugt mit HDL.

Die Rolle der HL bei der Entstehung der Atherosklerose wird kontrovers diskutiert. Einige Studien haben auf eine protektive Rolle der HL hingewiesen. Unter anderem ist die HL- Aktivität im Postheparin- Plasma von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen mit normalen Lipidwerten deutlich reduziert. Andere Untersuchungen haben jedoch eine inverse Korrelation zwischen HL- und HDL- Konzentration gezeigt, was auf eine pro- atherogene Rolle schließen lässt.

Ein Ziel dieser Arbeit war, das Plasma von Probanden mit unterschiedlicher Apo E- Homozygotie auf eine mögliche Assoziation der HL an Lipoproteine in Abhängigkeit des Apo E- Genotyps zu untersuchen. Damit sollten Rückschlüsse auf den Einfluss des Apo E- Polymorphismus auf den Lipidstoffwechsel erzielt werden. Es ist denkbar, dass die HL bei den verschiedenen Apo E- Isotypen eine unterschiedliche Affinität gegenüber den Lipoproteinen vorweist. Diese Hypothese könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Stoffwechselverhalten der verschiedenen Apo E- Isotypen geben.

Zweites Ziel dieser Arbeit war, die Aktivität der HL und der LPL bei den verschiedenen Apo E- Genotypen zu bestimmen, um eine mögliche Korrelation der Abnahme der HL- Aktivität mit bestimmten Apo E- Isotypen zu finden. Eine Aktivitätsabnahme der HL bei Apo E 4 könnte die hohen Lipidwerte dieses Geotyps erklären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien und Materialien

Aceton (Merck), BSA Rinderserumalbumin (Sigma), CNBR- aktivierte Sepharose (Pharmacia), 4-Chloro-1-Naphol 30 mg Tab. (Sigma), Diethylbarbitursäure (Merck 276), Diethylbarbitursäure Natriumsalz (Merck 6318), Dodecylsulfat NA-Salz (Meck 9), ECL- Reagenz (Amersham), Eisessig (Merck), Ethanol (Merck), Röntgenfilm (Kodak), Filmkammer (Rego), Filter 0.45µm (Minisart NML, Satorius), Filterpapier (Schleicher und Schuell), glycerol tri [ 1- <sup>14</sup>C] Oleat ( Amersham, Arlington Heigts), Glycerin (Merck), Heparin (Sigma H-7005), 7 ml Heparin- Lithium- Röhchen (Beckton Dickson), Methanol (Merck), Monovette 9 ml EDTA (Sarstedt), Nitrocellulose 0,45 µm (Schleicher & Schuell), Ponceau Lösung (Serva), Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia LKB, Schweden), Testkid (Firma Boehringer Mannheim), Tetrahydrolipstatin (THL, Orlistat, Hoffmann La Roche), Tris- HCL (Roth), Tween 20 (Merck), Wasserstoffperoxid 30% (Merck)

#### 2.1.2. Puffer

PBS            2.7 mM KCL, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NACL, 8.1 mM NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Puffer A        10 mM Tris-CL, 154 mM NACL, 1.5 mM EDTA, pH 8.6  
Puffer B        10 mM Tris-Cl, 140 mM NACL, 1 mM EDTA, pH 7.4

### 2.2. Geräte

Blotting- Kammer (Biorad)

Elektrophoresekammer für SDS- Polyacrylamidgel (Desaga)

Fast Protein Liquid Chromatograph ; FPLC (Phrmacia, Schweden)

FPLC-Säule Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia, Schweden )

Kettenphotometer (Eppendorf)

Laborzentrifuge Rotanda für Plasmazentrifugation (Hettich)

Slot- Blot, Mehrfachfiltrationsgerät für Mikroproben (Schleicher Schuell)

Sterile Filter (Sartorius)

Transmissions- Elektronenmikroskop

### **2.3. Biologisches Material**

**1. Lipoprotein Lipase:** Prof. G Olivecerona, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, University Umea, Schweden.

**2. Hepatische Lipase:** s.o

**3. Apo E:** isoliert aus humanem Plasma, Labor Prof. U Beisiegel

### **2.4. Antikörper**

**Anti HL (erster Antikörper);** polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Verdünnung 1;1000 (Prof. Hans Will, Heinrich- Pette- Institut Hamburg).

**Anti ApoE (erster Antikörper);** polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, Verdünnung 1: 5000 (Firma Dianova).

**Anti LPL (erster Antikörper);** monoklonaler Antikörper aus Maus, Verdünnung 1:250 ( J.D. Brunzell Seattle, USA).

**GARPO (goat anti rabbit peroxidase, zweiter Antikörper);** polyklonaler Ziegenantikörper gegen Kaninchen IgG, Verdünnung 1; 4000 (Firma Dianova).

**GAMPO (goat anti mouse peroxidase, zweiter Antikörper);** monoklonaler Ziegenantikörper gegen Maus IgG, Verdünnung 1; 5000 (Firma Dianova).

**Protein A- Gold Antikörper;** monoklonaler Antikörper gegen Maus mit 6 und 12 nm Goldmarkierung (Firma Dianova).

**Colloidal gold anti mouse IgG;** polyklonaler Antikörper mit 10 nm Goldmarkierung (Firma Polysciences)

## **2.5 Methoden**

### **2.5.1 Gelfiltration**

Lipoproteine können mittels der Gelfiltration nach ihrer Größe getrennt werden. Mit Hilfe einer Präzisionspumpe, FPLC (Fast Protein Fluid Chromatograph), werden die Plasmaproben einzeln unter konstantem Druck und mit konstantem Flußvolumen zusammen mit einem Puffer über eine Gelfiltrationssäule gepumpt. Die Gelfiltrationssäule enthält ein Medium auf Agarosebasis, welches eine definierte Porengröße besitzt. Kleine Lipoproteine können in die Poren eindringen, große nicht. Folglich verteilen sich kleine lipoproteine sowohl innerhalb als auch zwischen der Poren und wandern somit relativ langsam durch das Gel, wohingegen große Lipoproteine zwischen der Poren beschränkt bleiben und die Säul schneller passieren. Somit befinden sich die große Lipoproteine in früheren Fraktionen, wogegen die kleine Lipoproteine in späteren Fraktionen vorkommen.

Die gesamten Gelfiltrationsexperimente in dieser Arbeit wurden mit der FPLC durchgeführt. Die Superose 6 HR Säule wurde vor Gebrauch mit 7.5 µl Ferritin, 40 µl Albumin, 40 µl Cytochrom- C kalibriert.

Die Kalibrierung dient zur genauen Einteilung der Fraktionen entsprechend der Lipoproteinfraktionen. Nach dieser Kallibrierung ist zu entnehmen, daß sich in Fraktionen 15-17 VLDL, in Fraktionen 24-26 LDL, und in die Fraktionen 32-34 HDL befindet.

Vor jedem Plasmaauftrag wurde die FPLC und die zu- bzw. abführenden Schläuche mit PBS Puffer gewaschen, bis eine Nulllinie erschien, welche die Reinheit der Säule anzeigte. Danach wurden die Plasmaproben in einen 200 µl Probenschlauch eingefüllt und die FPLC gestartet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/min, in jeder Fraktion wurde 500 µl gesammelt.

### **2.5.2 Bestimmung der Konzentration von Triglyzeriden und Cholesterin**

Bezüglich der Frage, welche Lipoproteine sich in welchen Fraktionen befinden, wurden die einzelnen Fraktionen auf ihre Triglyzerid- und Cholesterin-Konzentrationen untersucht. Diese Versuche wurden mit Hilfe eines enzymatischen Farbttests (Testkit) der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt.

Cholesterinbestimmungs kit MPR2 CHOD- PAP- Methode

Triglyzeridbestimmungs kit MPR2 CPO- PAP- Methode

### **2.5.3. Slot- Blot und Immundetektion**

Für die Immundetektion wurde als immunologische Technik das Slot- Blotting-Verfahren ausgewählt. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine auf ein Gitter aufgetragen und über Vakuum auf die an der Unterseite des Gitters befestigte Membran gesaugt, wodurch sie für die Reaktion mit dem anschließend zugegebenen spezifischen Antikörpern leichter zugänglich werden. Mit Hilfe dieser Methode können viele Proben gleichzeitig getestet und quantifiziert werden.

Wir haben nach der Gelfiltration 100 µl der gewonnenen Fraktionen einzeln in die Slot- Blot- Kammern auf Nitrocellulose pipettiert. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde die Einziehung beschleunigt. Nach der Proteindetektion mit Ponceau- Lösung wurden die Nitrocellulosen wieder mit PBS entfärbt und eine Stunde in Blocking-Puffer inkubiert. Die Detektion der LPL, HL, Apo E erfolgte mit den bereits erwähnten Antikörpern (Abschnitt 2.4). Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen wurden antikörperspezifisch gewählt (Abschnitt 2.4). Die Inkubation erfolgte während einer Stunde bei Raumtemperatur. Die Nitrocellulosen wurden in vier Schritten auf dem Schüttler gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. (Waschvorgang: 1 min. Puffer A, 2 mal 10 min. Puffer B, 1 min Puffer A). Zur Detektion der gebundenen Anti- LPL- Antikörper wurde GAMPO, zur Detektion der gebundenen Anti-HL/Anti-Apo E GARPO als zweiter Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 mit 5% BSA in Puffer A für eine Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt. Danach wurde der Waschvorgang wiederholt. Daraufhin wurde die Darstellung der Immunreaktion mittels ECL- Reagenz durchgeführt. Hierzu wurden die Nitrocellulosen mit den kurz zuvor zusammengeführten ECL- Reagenz 1 und 2 benetzt, nach einer Minute Einwirkungszeit getrocknet und dann in eine Filmkammer gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Film zur Bandendarstellung für 10, 30, und 60 Sekunden aufgelegt und entwickelt.

### **2.5.5 Elektronenmikroskopie**

Die mit Formvar beschichteten Kupfernetzchen wurden für 5 Minuten auf einem Tropfen ausgewählter Fraktionen nach der Gelfiltration inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde danach mit einem Filterpapier vorsichtig abgesaugt. Unspezifische Reaktionen bei der anschließenden Immunmarkierung wurden durch Inkubation der Netzchen auf einem Tropfen 1% BSA/PBS verhindert. Anschließend wurden die ersten Antikörper auf die Netzchen aufgetragen. Die Reaktion der ersten AK erfolgte

für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurden die Netzen gründlich auf 5 Tropfen 1% BSA/PBS gewaschen und für 30 Minuten auf einem Tropfen mit dem zweiten AK inkubiert. Die an den Zweiten AK gekoppelten Goldpartikel hatten verschiedene Durchmesser. Die Netzen wurden anschließend gründlich auf 6 Tropfen 1% BSA/PBS und 5 Tropfen Wasser gewaschen und mit 2% Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert. Nach dem Trocknen konnten die Proben im Transmissionselektronenmikroskop untersucht werden.

### **2.5.3. HL und LPL Aktivitätsassay**

Die lipolytische Aktivität der LPL und HL wurde nach der Methode, wie von Iverius et al. 1986 für LPL beschrieben, gemessen. Die Postheparin- Plasmen wurden nach der Filtration mit 0.45 µm Filter für 60 Minuten bei 37° C mit einem Glycerol- tri- [1-<sup>14</sup>C] Oleat- und Lecithinhaltigen Substrat inkubiert. Dann wurden die radioaktiven freien Fettsäuren extrahiert und die Aktivität gemessen. Die Lipasenaktivitäten werden in Nanomol freie Fettsäure, die pro Minute und Milliliter freigesetzt werden, angegeben (nmol/min/ml). Separate Bestimmung für die Aktivität von LPL und HL wurden mittels Hemmung der LPL- bzw. HL- Aktivität durch Inkubation der Proben mit Anti- LPL-Antikörper bzw. Anti- HL- Antikörper durchgeführt (Babirak et al. 1989). Als Standard wurde Postheparin- Plasma eines Apo E 3/3 Probanden eingesetzt.

### **2.6.1 Patientenkollektiv**

19 Probanden (11 Frauen, 8 Männer) im Alter von 22 bis 72 Jahren, bei denen alle mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung eine Homozygotie von Apo E diagnostiziert wurde, wurden ausgewählt, um die Assoziation und Verteilung der HL und die Lipoproteine in Prä- und Postheparin- Plasma zu untersuchen. Von diesen Probanden hatten 8 Apo E 3/3, 5 Apo E 4/4 und 6 Apo E 2/2 Genotypen. Keiner der Probanden war zum Zeitpunkt der Blutentnahme in medikamentöser Behandlung. Die Auswahl der Probanden war unabhängig von den Plasmatriglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen.

### **2.6.2 Probenaufbereitung**

Den Probanden wurde vier mal 9 ml EDTA- Blut mit folgendem Zusatz abgenommen:

- a) Präheparin- Plasma mit und ohne Zusatz von THL (30 ng/ml Blut)
- b) Postheparin- Plasma mit und ohne Zusatz von THL (30 ng/ml Blut)

Prä- und Postheparin- Proben wurden in 9 ml EDTA- Röhrchen (Sarstedt) abgenommen und bei 4°C vorgekühlt.

Die Postheparin- Proben wurden 10 Minuten später als die Präheparin- Proben nach Injektion von 70 U/kg Körpergewicht Heparin gewonnen, um die gesamte am Endothel befindliche Lipase aus ihrer Bindung zu lösen.

Um die lipolytische Aktivität zu inhibieren, wurde jeweils die 9 ml EDTA- Röhrchen des Prä- und Postheparin- Plasmas kurz vor der Blutentnahme 6 µl THL aus einer Stammlösung von 10 mg/ml THL in Ethanol zugeführt. THL hemmt die lipolytische Aktivität der LPL, HL, PL.

Zur Plasmagewinnung wurden die Blutproben unmittelbar nach der Entnahme bei 2500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurden die Plasmen mit 0,45 µm filtriert, um aggregierte Lipoproteine und Fibrin aus diesem zu trennen. Die Plasmaproben wurden innerhalb von 12 Stunden analysiert.

### **2.8 Statistik**

Die Ergebnisse von quantitativen Analysen sind in Mittelwerten und Standardfehlern angegeben. Für die Bestimmung der Signifikanzniveaus wurde der Student T-Test mit zwei Endflächen für ungepaarte Stichproben mit ungleicher Varianz verwendet (Exel, Microsoft, USA).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Probanden

Die 19 Probanden (11 Frauen, 8 Männer) zeigten unterschiedlich hohe Plasmakonzentrationen für Triglyzeride und Cholesterin. Die Triglyzeridkonzentrationen lagen im Bereich von 34 mg/dl - 614 mg/dl, die Cholesterinkonzentrationen lagen im Bereich von 121 mg/dl - 374 mg/dl. Die HL-Aktivitäten, LPL- Aktivitäten, Apo E- Genotypen und die Lipidkonzentrationen der untersuchten Probanden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

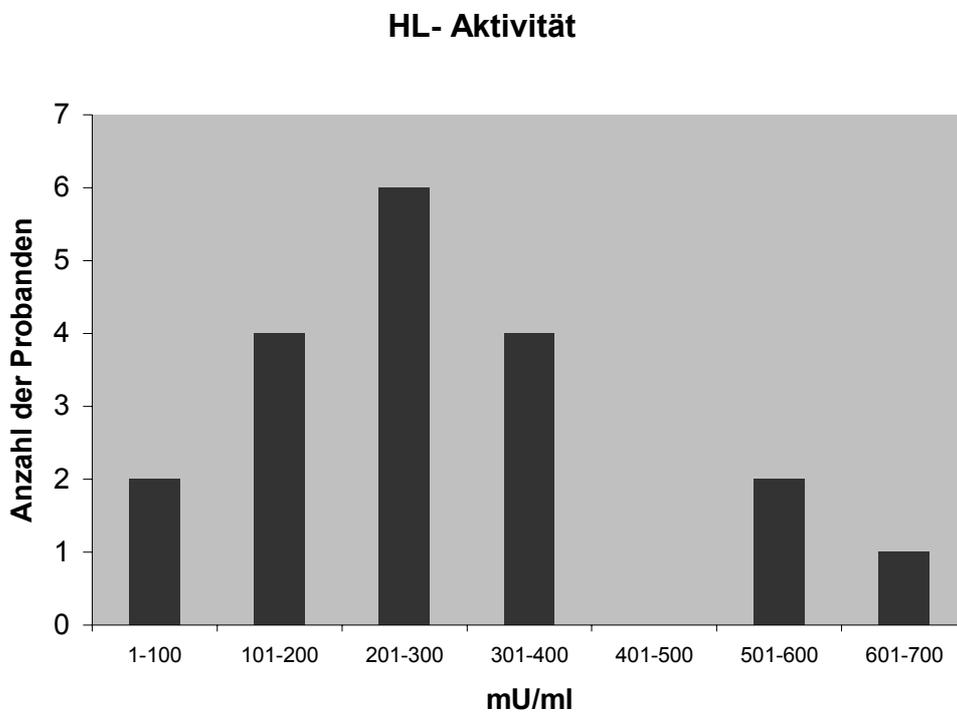
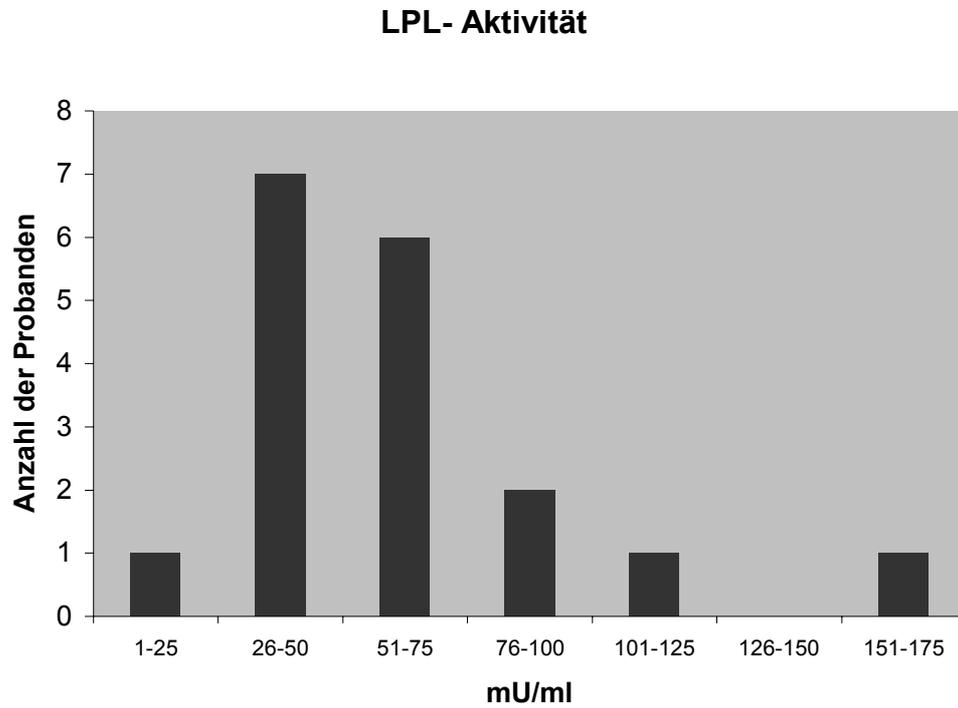
n	Gesch.	E-Typ	LPL.Ak	HL.Ak	TG	Chol	VLDL	LDL	HDL
1	w	(3/3)	102	193	34	206	7	115	54
2	w	(3/3)	8	149	614	189			25
3	m	(3/3)	66	382	59	155	12	89	68
4	w	(3/3)	60	541	95	148	19	68	83
5	w	(3/3)	82	199	46	206	9	140	57
6	m	(3/3)	32	92	172	235			
7	w	(3/3)	60	206	159	152	32	85	35
8	m	(3/3)	53	360	126	170	25	119	26
9	m	(4/4)	50	355	159	159	32	85	35
10	w	(4/4)	47	287	70	191	14	111	66
11	w	(4/4)	27	276	117	215	23	157	35
12	w	(4/4)	55	37	105	232	21	134	77
13	w	(4/4)	62	236	187	221	37	135	49
14	m	(2/2)	83	140	267	184	53	99	32
15	w	(2/2)	47	287	77	135	15	51	70
16	w	(2/2)	29	348	56	121	11	62	48
17	m	(2/2)	152	298	304	374	61	258	55
18	m	(2/2)	35	666	131	160	26	76	58
19	m	(2/2)	46	551	190	150	38	82	30

**Tabelle1**

Apo E- Isotypen, LPL-, HL- Aktivität und Lipidkonzentrationen der untersuchten Probanden.

(n=19), LPL- Aktivität [mU/ml] (LPL.Ak) , HL- Aktivität [mU/ml] ( HL.Ak), Triglyzeride [mg/dl] (TG), Cholesterin [mg/dl] ( Chol), VLDL [mg/dl], LDL [mg/dl], HDL [mg/dl].

Abbildung 1



Histogramm der Verteilung der HL- und LPL- Aktivität im Postheparin- Plasma aller Probanden unabhängig vom Apo E- Genotyp.

### 3.2. Auftrennung des Plasmas durch FPLC

Lipoproteine können mittels Gelfiltration nach ihrer Größe getrennt werden. Mit Hilfe einer Präzisionspumpe werden Plasmaproben der verschiedenen Genotypen einzeln unter konstantem Druck und mit konstantem Flußvolumen zusammen mit einem Puffer über eine Gelfiltrationssäule gepumpt. Die Gelfiltrationssäule enthält ein Medium auf Agarosebasis, welches eine definierte Porengröße besitzt. Kleine Lipoproteine wie die HDL können sich gut durch die Poren bewegen, verteilen sich gut im Säulenmedium und wandern relativ langsam durch das Gel. Sie finden sich in den späten Fraktionen. Große Lipoproteine wie VLDL können sich nur durch die großporigen Bereiche des Gels bewegen, haben somit kleineres Verteilungsvolumen und befinden sich in den frühen Fraktionen. Dieses System ermöglicht die Trennung von Biomolekülen mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und  $5 \times 10^6$ . Es gewährleistet eine vorsichtige Trennung der Lipoproteine unter Schonung der LPL- und HL- Bindung an Lipoproteinen. Nach der Kalibrierung der Säule, wie in Material und Methoden beschrieben, wird in die Säule Plasma injiziert und nach Lipoproteinklassen aufgetrennt. Aus den einzelnen Fraktionen werden Elutionsprofile der Lipoproteine erstellt und zwischen den verschiedenen Genotypen verglichen. Um den Einfluß von Heparin auf die Elutionsprofile darzustellen, wurden sowohl Prä- als auch Postheparin- Plasma verwendet.

Abbildung 2 zeigt die Elutionsprofile nach Gelfiltration von Lipoproteinen bei Prä-, und Postheparin- Plasma bei den drei Apo E- Genotypen. Die VLDL eluierten in Fraktionen 15-17 und machten sich in allen Genotypen als kleinster Peak bemerkbar. Die LDL fanden sich in den Fraktionen 24-26 und weisen einen höheren Peak als VLDL auf. Die HDL eluierten in den Fraktionen 32-34 und zeigten sich als stärkster Peak. Die Plasmaproteine, die zum größten Teil aus Albumin bestehen, eluierten in den Fraktionen 35-50.

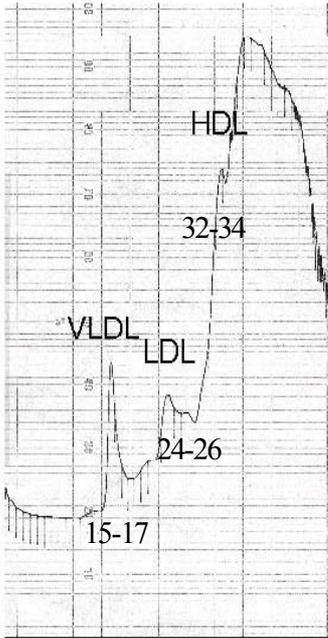
Zwischen den Genotypen zeigten sich durchaus Unterschiede in den Elutionsprofilen. Im VLDL- Bereich besaßen die Apo E 3/3 Genotypen lediglich einen minimalen Peak, die Apo E2/2 Genotypen hingegen einen deutlichen Peak. Apo E 4/4 Genotypen nehmen hinsichtlich des VLDL- Peaks eine Mittelstellung ein. Im LDL- Bereich weisen Apo E 4/4 Genotypen hingegen einen deutlicheren Peak als Apo E 2/2 und Apo E 3/3 Genotypen auf.

Im HDL- Bereich zeigten sich zwischen den drei Genotypen keine deutlichen Unterschiede.

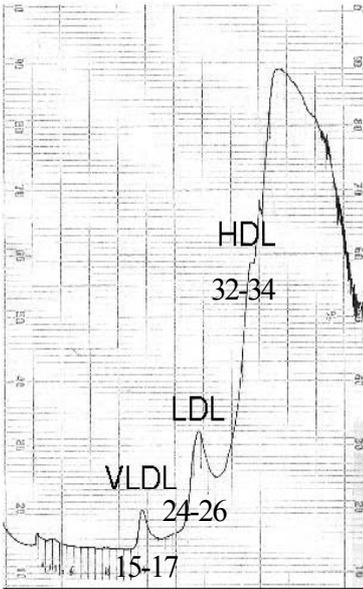
**Abbildung 2** Vergleich der FPLC- Läufe bei den drei Homozygoten Apo E- Genotypen, OD bei 0,5 gemessen. Die Fraktionen sind in den Läufen eingetragen.

**prä Heparin**

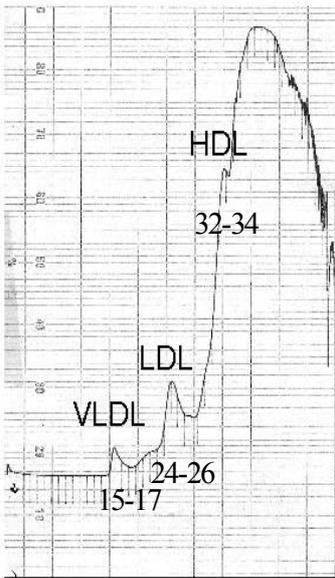
ApoE 2/2



ApoE 4/4

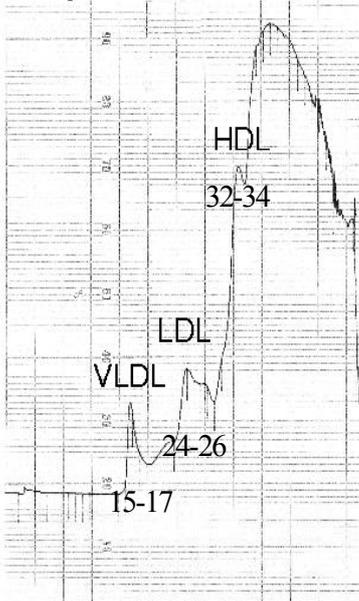


ApoE 3/3

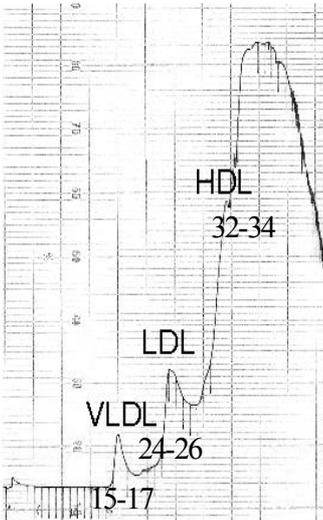


**post Heparin**

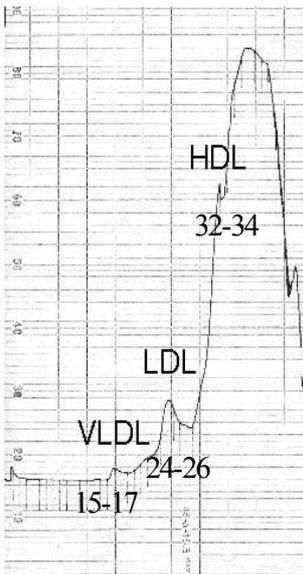
ApoE 2/2



ApoE 4/4



ApoE 3/3



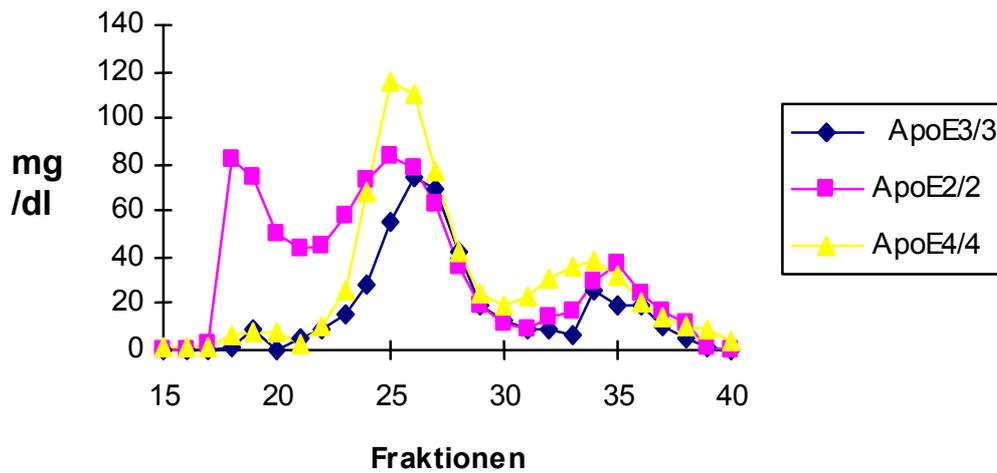
### **3.3 Verteilung von Cholesterin auf die Fraktionen**

Nach der Gelfiltration wurde bei allen 19 Probanden die Cholesterin- konzentration in den Fraktionen sowohl im Prä- als auch im Postheparin- Plasma bestimmt. Diese Untersuchungen dienten zum Vergleich der Cholesterinverteilung auf die Fraktionen zwischen den verschiedenen Genotypen. Wie auf der Abbildung 3 zu sehen ist, lassen sich Unterschiede in der Cholesterinverteilung zwischen den verschiedenen Genotypen weder in Prä- noch in Postheparin- Plasma erkennen.

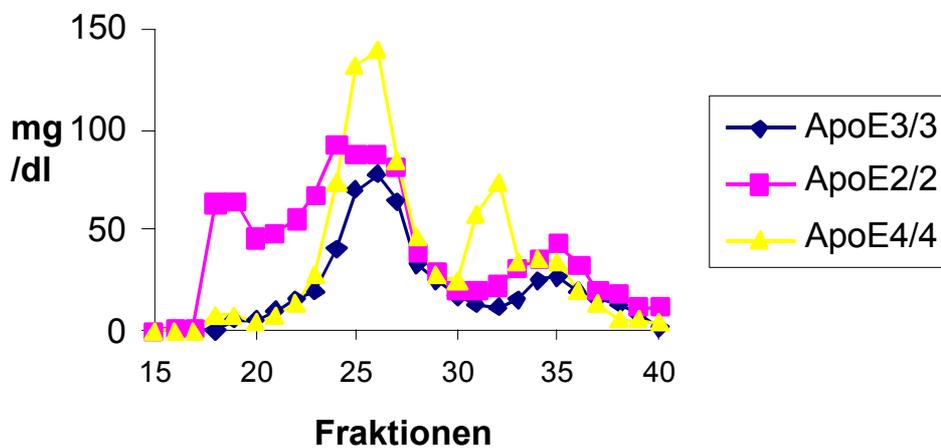
Die Bestimmung von Cholesterin diente zusätzlich noch als Kontrolle der FPLC- Läufe. Da der überwiegende Teil von Plasma- Cholesterin durch LDL transportiert wird, ist in diesem Bereich auch die höchste Cholesterin- konzentration zu erwarten. Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, liegt der Cholesterin- Peak zwischen den Fraktionen 24 bis 26, also im LDL- Bereich, so daß die FPLC- Läufe bestätigt werden konnten.

**Abbildung 3a, 3b** Vergleich der Elutionsprofile für Cholesterin in Prä- und Postheparin- Plasma der Apo E- Genotypen nach Gelfiltration von Lipoproteinen. VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26, HDL; Fraktionen 32-34.

a) **Cholesterinverteilung in Präheparinfraktionen**



b) **Cholesterinverteilung in Postheparinfraktionen**



### **3.4. Verteilung der HL, LPL und Apo E auf die Lipoproteinfraktionen**

Um die Verteilung der HL auf die verschiedenen Lipoproteine zu untersuchen, wurde die HL nach dem Slot- Blot- Verfahren mit spezifischen Antikörpern detektiert. Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat schon gezeigt, daß nach der Injektion von Heparin die gesamte im Plasma befindliche LPL freigesetzt wird, d.h. eine deutliche Zunahme des LPL- Gehaltes nach Heparin-gabe zu beobachten ist (Shimada, K et al. 1981). Dieser Effekt wurde als Kontrolle zur korrekten Durchführung des Versuches benutzt, in denen die Verteilung der LPL auf verschiedenen Lipoproteinfraktionen sowohl vor als auch nach Heparin-gabe gemessen wurde.

Abbildung 4 zeigt die Verteilung der zu untersuchenden Proteine (LPL, HL, Apo E) bei einem Apo E 3/3 Genotyp vor und nach Heparin-gabe. Die Intensität der LPL im Präheparin- Plasma ist im VLDL- Bereich (Fraktionen 15-17) schwach, im LDL- Bereich (Fraktionen 24-26) und im HDL- Bereich (Fraktion 32-34) jedoch stärker. Dies entspricht den zu erwartenden Ergebnissen und weist auf eine korrekte Versuchsdurchführung hin. Im Postheparin- Plasma ist die LPL in allen Fraktionen stärker nachweisbar. Die Verteilung des Apo E zeigt in den verschiedenen Fraktionen sowohl im Prä- als auch im Postheparin- Plasma ein sehr homogenes Muster. Es ist in allen Fraktionen gleich stark zu beobachten und zeigt nach Heparin-gabe weder Veränderung in der Intensität noch in der Verteilung. Die HL ist im Präheparin- Plasma im VLDL- Bereich kaum, im LDL- und HDL- Bereich stärker nachweisbar. Im Postheparin- Plasma ist nur im LDL- Bereich eine leichte Intensitätszunahme im Vergleich zum Präheparin- Plasma zu beobachten. Nach den obigen Untersuchungen ist anzunehmen, daß aufgrund mangelnder Detektion von HL im VLDL- Bereich, HL kaum in diesem Bereich bindet. Die Verteilung der Proteine zeigten bei 7 von 8 der Untersuchten Probanden mit Apo E 3/3 Genotyp ein ähnliches Muster wie beschrieben auf.

Abbildung 5 zeigt die Verteilung der LPL, HL, Apo E 2/2 Genotyp vor und nach Heparin-gabe. Im Präheparin- Plasma ist LPL im VLDL- Bereich kaum und im LDL-, HDL- Bereich mit starker Intensität vorhanden. Wie erwartet zeigt die LPL im Postheparin- Plasma in allen Fraktionen eine Intensitätszunahme. Bei diesem Genotyp zeigt das Apo E in allen Fraktionen genau so ein homogenes Muster wie bei Apo E 3/3 Genotyp. Heparin-gabe reichert den Apo E- Gehalt des Plasmas nicht an. Die HL ist im VLDL- Bereich sehr schwach und in den LDL-, HDL- Bereich stärker nachweisbar. Eine unterschiedliche Detektion ist in Prä- und Postheparin- Plasma

nicht zu beobachten. Bei allen 6 untersuchten Probanden mit Apo E 2/2 war die gleiche Proteinverteilung zu beobachten.

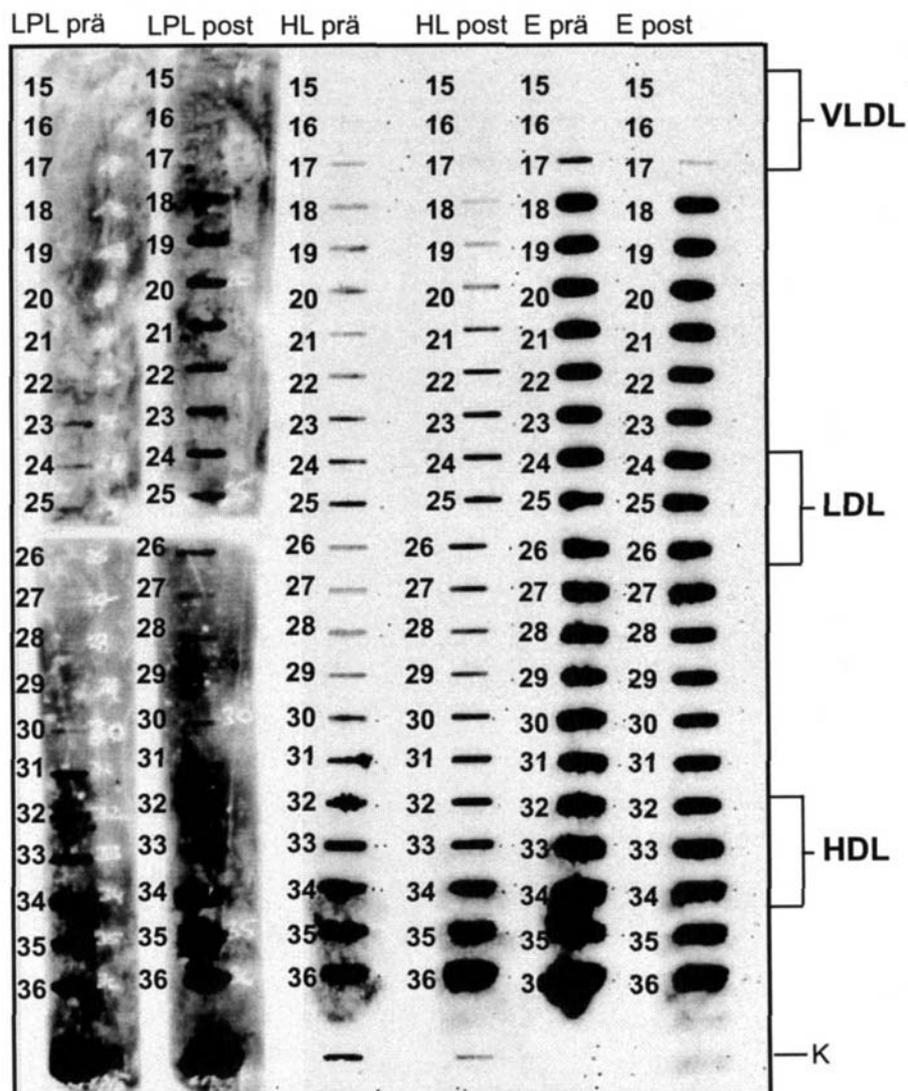
Abbildung 6 zeigt die Verteilung der LPL, HL und Apo E bei Apo E 4/4 Genotyp vor und nach Heparinisierung der Probanden. Die Verteilung der LPL im Prä- und Postheparin- Plasma war in den VLDL-, LDL- und HDL- Bereichen der Erwartung entsprechend homogen. Die Apo E- Verteilung zeigte keine Unterschiede zu den anderen homozygoten Genotypen (Apo E 2/2 und 3/3). Die HL kann weder in Prä- noch in Postheparin- Plasma nachgewiesen werden. Die Detektion ist im LDL- und HDL- Bereich im Prä- und Postheparin- Plasma gleichermaßen leicht verstärkt. Die beschriebene Intensitätsverteilung trat bei allen 5 untersuchten Probanden mit Apo E 4/4 Genotyp auf.

Als Ergebnis dieser Untersuchung kann zusammenfassend gesagt werden:

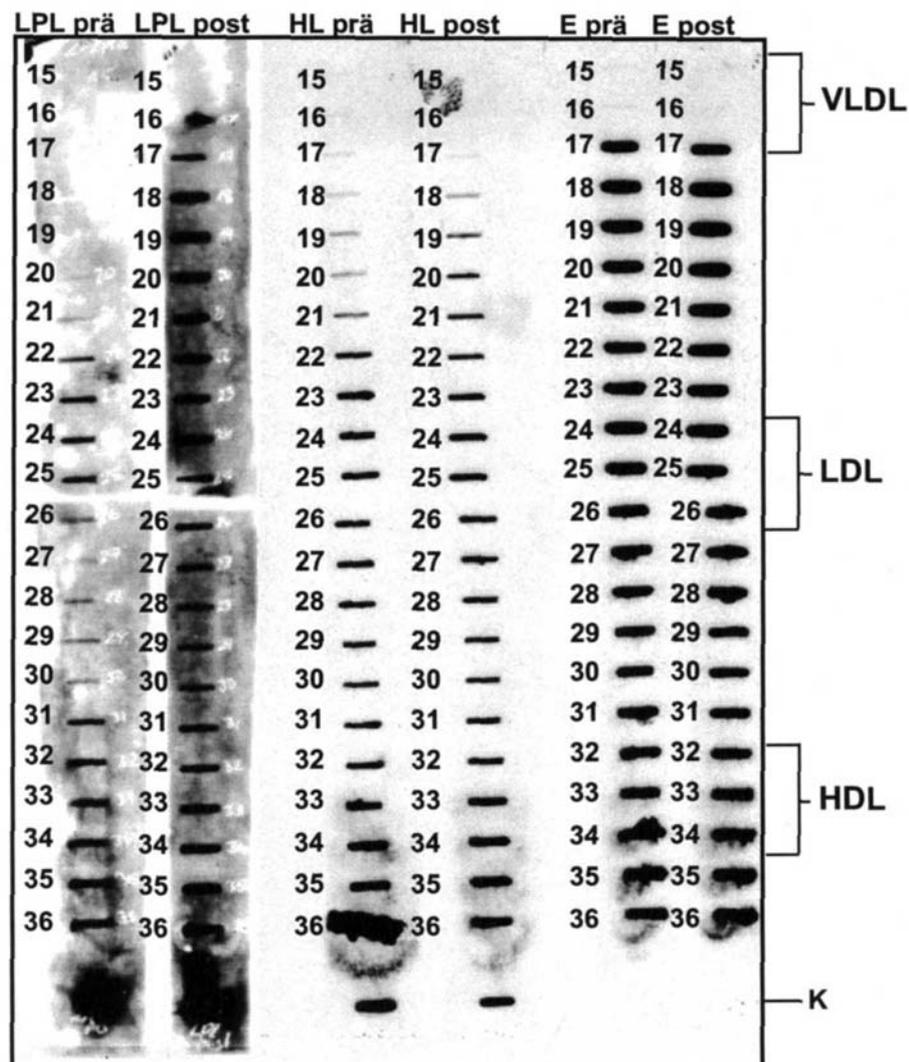
- a) Die HL- Verteilung wird überwiegend in der HDL- Fraktion gefunden, weniger in der LDL- und fast gar nicht in der VLDL- Fraktion
- b) Es finden sich keine Unterschiede in der Verteilung von HL zwischen den Apo E- Isoformen.
- c) Es wird im Gegensatz zur LPL bei der HL kein Unterschied zwischen der Verteilung im Prä- und Postheparin - Plasma gefunden.

**Abbildung 4** Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinenklassen zwischen Plasmafraktion 15 und 36 nach der Gelfiltration bei Apo E 3/3 Genotyp in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

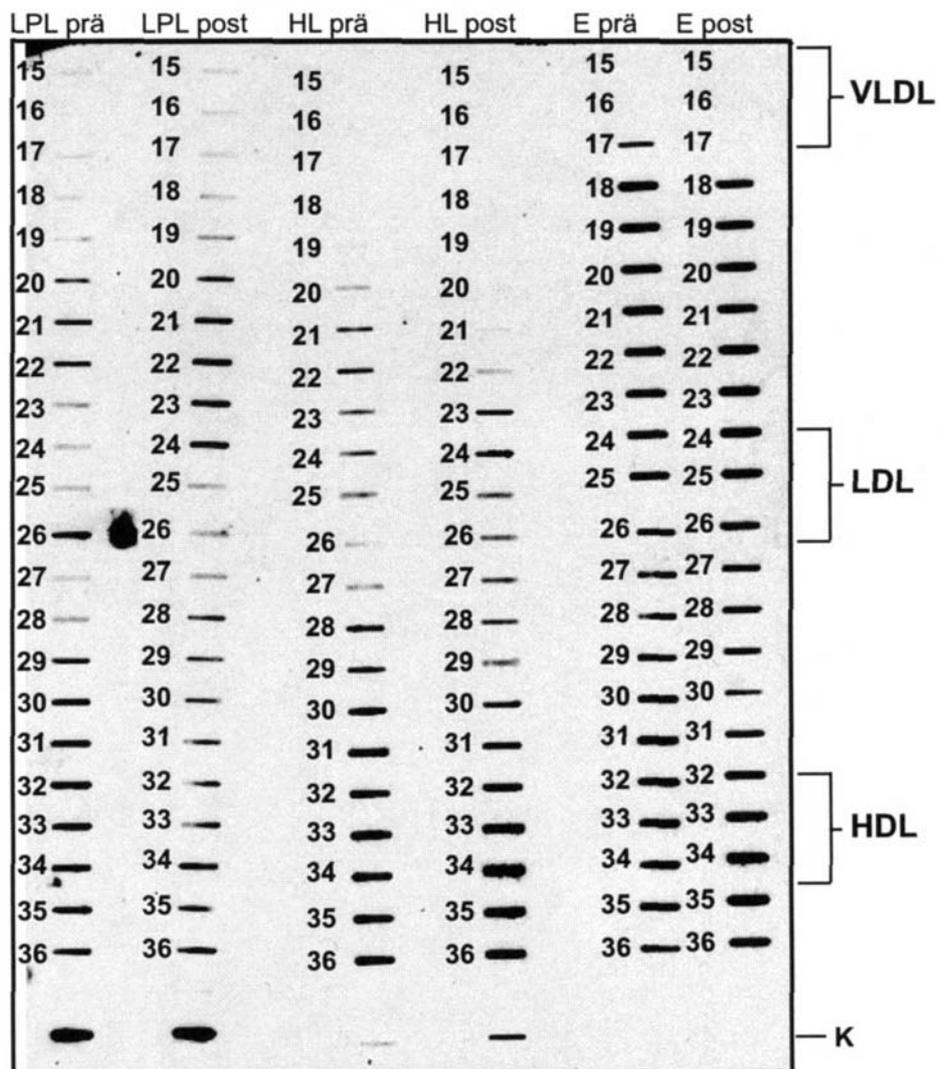


**Abbildung 5** Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinenklassen zwischen Plasmafraktion 15 und 36 nach der Gelfiltration bei Apo E 2/2 Genotypen in Prä- und Postheparin- Plasma. VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.



**Abbildung 6** Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktion 15 und 36 nach der Gelfiltration bei Apo E 4/4 Genotyp in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34



### **3.5. Vergleich zwischen Plasmafiltration und Plasmazentrifugation**

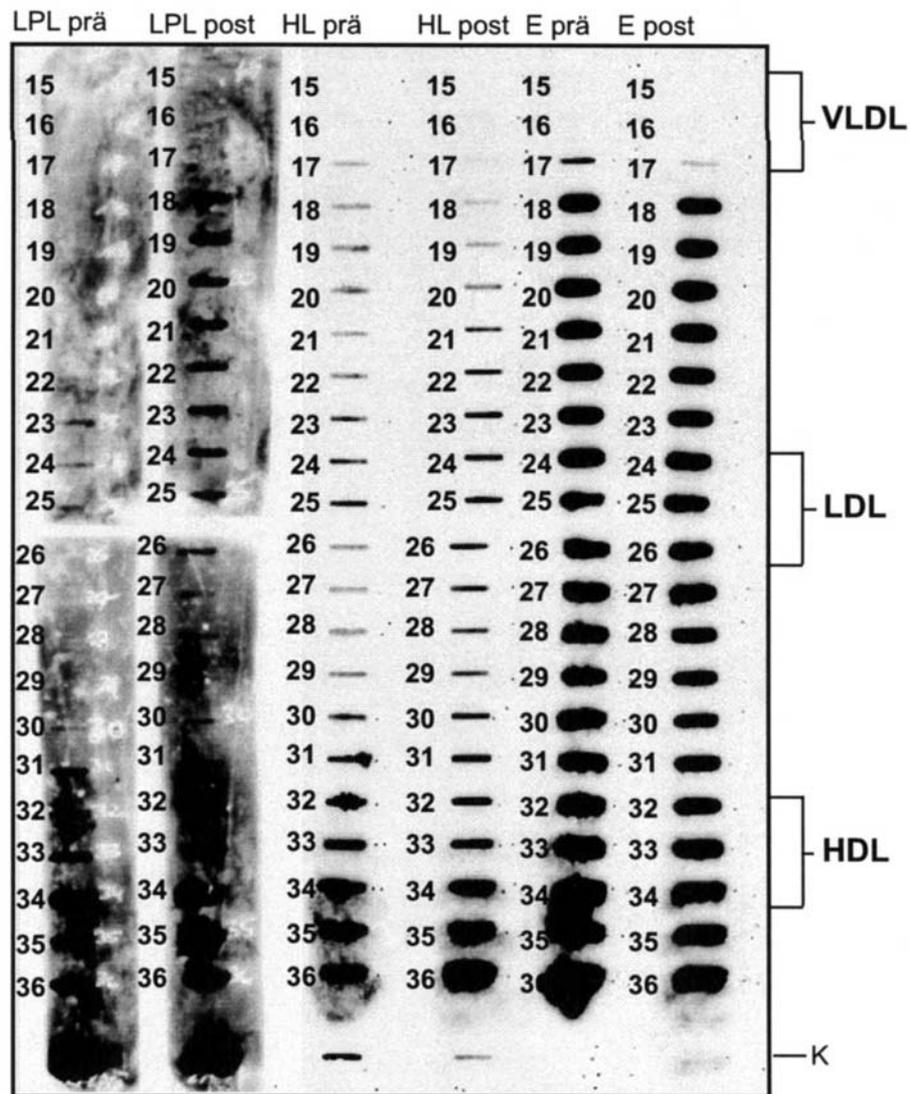
Bei der Untersuchung der Verteilung der HL auf die Lipoproteinfraktionen, wie in Abschnitt 3.4 schon beschrieben, konnten zwischen den drei Apo E- Isoformen weder im Prä- noch im Postheparin- Plasma deutliche Intensitätsunterschiede beobachtet werden. Die HL kann im VLDL- Bereich in allen drei Apo E- Isotypen nur mit schwacher Intensität detektiert werden.

Um einen Methodenfehler, welcher durch die Filtration von Plasma mit 0.45µm Filter entstanden und für die schwache Intensität verantwortlich sein könnte, ausschließen zu können, haben wir als Vergleich einen Teil des Plasmas eines Probanden mit Apo E 3/3 Genotyp einmal mit einem Filter mit der Porengröße von 0.45 µm filtriert und unter den gleichen Versuchsbedingungen den anderen Teil des Plasmas einer Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm für 15 Minuten unterzogen. Die Triglyzeridkonzentration des Probanden betrug 126 mg/dl, die Cholesterinkonzentration 170 mg/dl. Beim Vergleich der FPLC- Läufe zwischen den unterschiedlich behandelten Präheparin- Plasmen ist nur eine leichte Steigerung im Bereich des VLDL- Peaks nach der Filtration gegenüber Zentrifugation zu beobachten. Zwischen Filtration und Zentrifugation sind bei den Postheparin- Plasmen keine Unterschiede zu beobachten. Auf der Abbildung 7 ist die Verteilung der LPL, HL, und Apo E nach Filtration und auf der Abbildung 8 nach Zentrifugation dargestellt. Die LPL weist nach Filtration eine leicht homogene Intensitätszunahme gegenüber Zentrifugation auf, und zwar vor und nach Heparin-gabe in gleicher Weise. Bei der Verteilung des Apo E kann bei der Filtration eine leichte Intensitätszunahme in Präheparin- Plasma in Fraktionen 17-21 und in Fraktionen 26- 30 beobachtet werden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem FPLC- Lauf, kann man in den Fraktionen 17-26 auch einen höheren Peak in Präheparin- Plasma bei der Filtration beobachten.

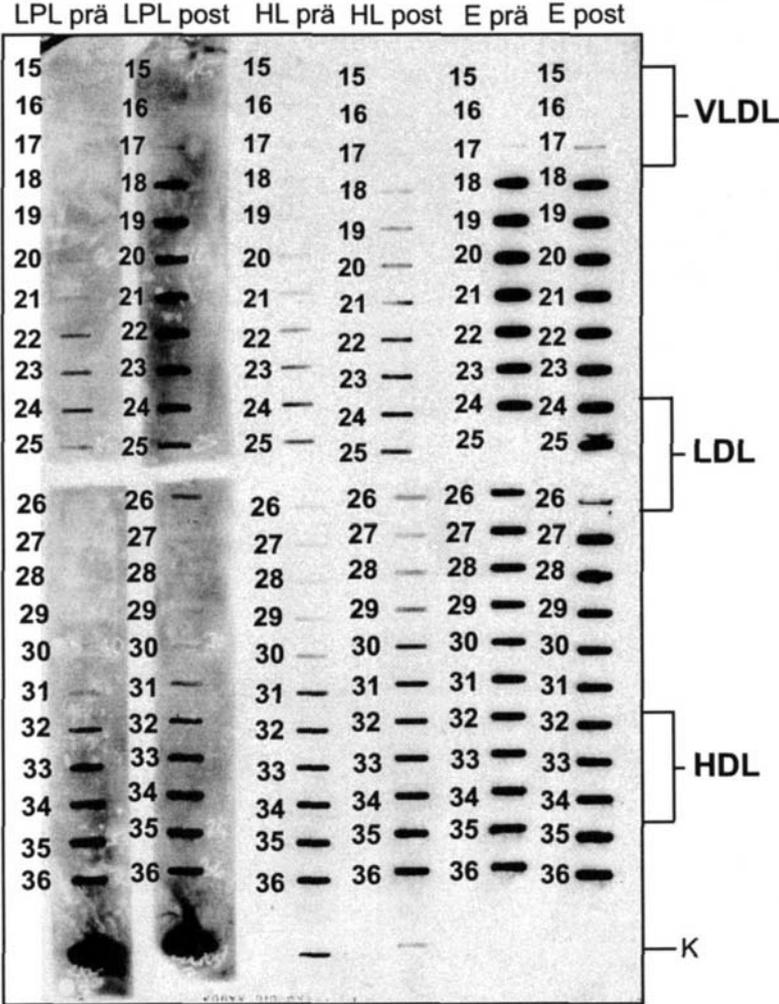
Die HL zeigt zwischen Filtration und Zentrifugation keine Intensitätsänderung sowohl im Prä-, als auch im Postheparin- Plasma an. Insgesamt sind die Unterschiede in den Analysen nach Filtration und Zentrifugation so gering, daß es keine Rolle spielt, wie das Plasma vor dem FPLC- Lauf behandelt wurde. Der fehlende Nachweis von HL in VLDL- Bereich ist somit nicht auf einen Artefakt durch die Filtration zurückzuführen.

**Abbildung 7** Verteilung der HL in Prä- und Postheparin- Plasma bei dem Probanden Nr.8 mit Apo E 3/3 Genotyp nach der Filtration.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.



**Abbildung 8** Verteilung der HL in Prä- und Postheparin- Plasma bei dem Probanden Nr. 8 mit Apo E 3/3 Genotyp nach der Zentrifugation.



### **3.6 Elektronenmikroskopische Darstellung von Lipoproteinen und HL**

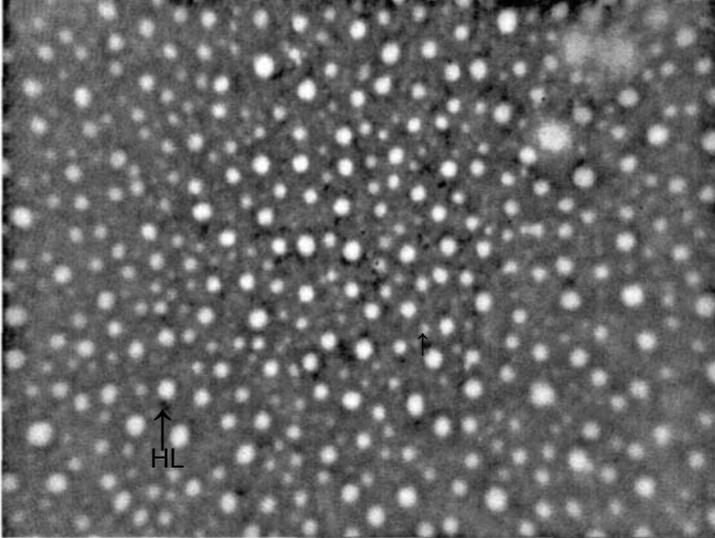
Im Slot- Blot- Verfahren konnte die HL sowohl im Prä-, als auch im Postheparin-Plasma kaum im VLDL- Bereich nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war unabhängig von der Methode der Aufbereitung des Plasmas, d.h. ob es zuvor filtriert oder zentrifugiert wurde.

Da das Slot- Blot- Verfahren eine relativ unsensitive Methode ist, die eher zur Quantifizierung größerer Mengen benutzt wird, wurden die Plasmen nach der Auftrennung einer elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Dazu haben wir die HL in den Fraktionen 16, 24 und 32, in denen jeweils VLDL, LDL und HDL angenommen werden, mit goldbeladenen Antikörpern markiert und anschließend mit dem Transmissionselektronen- mikroskop untersucht (Abbildung 9). In Fraktion 16 befanden sich überwiegend Teilchen mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Diese entsprechen der Größe der VLDL, die in dieser Fraktion erwartet werden. In Fraktion 24 fanden sich wesentlich kleinere Partikel mit einem Durchmesser von etwa 20 nm, entsprechend der Größe der LDL. In Fraktion 32 zeigten sich überwiegend sehr kleine Teilchen mit einem Durchmesser von etwa 12 nm, was mit der Größe der HDL vergleichbar ist. Unsere Annahme über die Verteilung der Lipoproteine auf die FPLC- Fraktionen wird durch diese Untersuchung bestätigt.

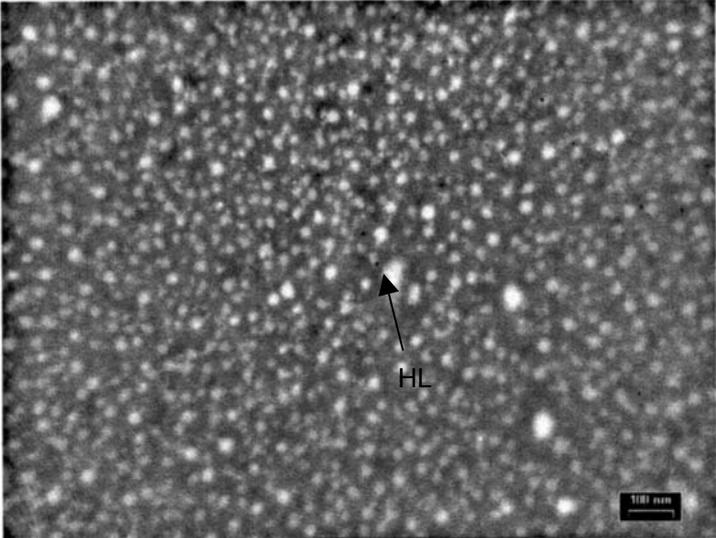
Die HL- Markierung mit Gold zeigte, daß HL im VLDL-, LDL- und HDL- Bereich vorhanden ist. Dieses Ergebnis war in allen drei Isotypen in gleicherweise zu beobachten. Hinsichtlich der HL kann aber auch mit Hilfe dieser Methode keine Aussage gemacht werden, da die HL im VLDL-, LDL- und HDL- Bereich ähnliche Dichte zeigt , im Gegensatz von Slot- Blot- Verfahren, wo die HL eine unterschiedliche Verteilung auf VLDL-, LDL- und HDL- Bereich aufweist.

**Abbildung 9** Elektronmikroskopische Darstellung von markierten HL mit Goldantikörper, VLDL in Fraktion 16 (**oben**), HDL in Fraktionen 32 (**mitte**), LDL in Fraktion 25 (**unten**). HL mit Pfeil markiert

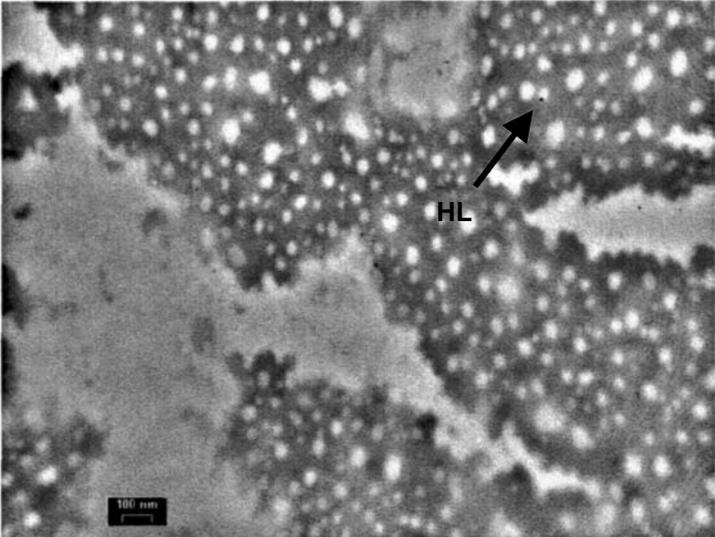
VLDL ca. 50 nm



HDL ca. 12nm



LDL ca. 20 nm



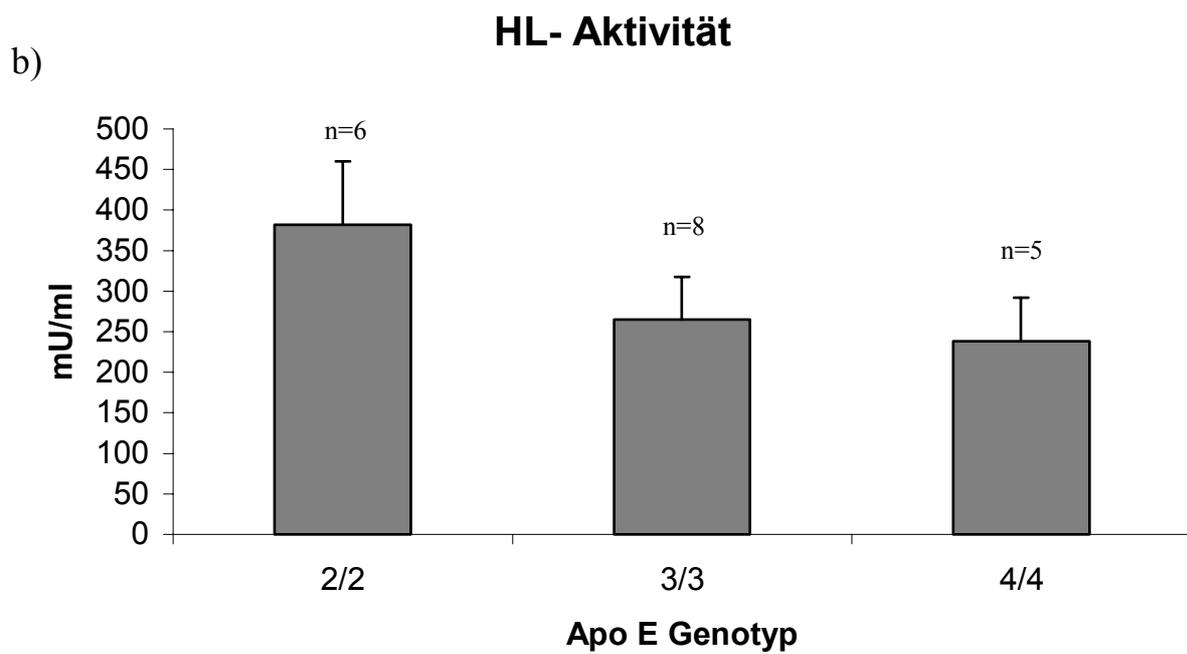
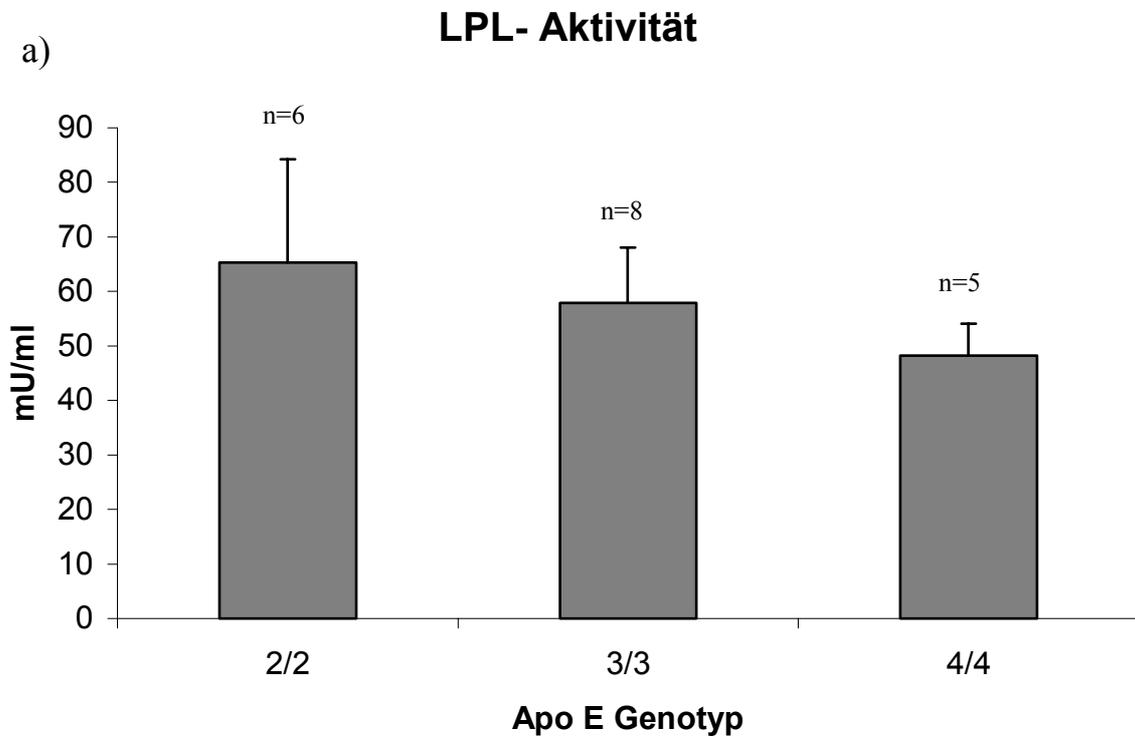
### 3.7 Aktivitätsbestimmung der LPL und HL in Apo E- Genotypen

Da bezüglich des Verteilungsmusters der HL zwischen den Genotypen kein Unterschied gefunden werden konnte, wurde bei allen Probanden eine Aktivitätsmessung der LPL und HL durchgeführt. Denn möglicherweise liegt den Unterschieden statt einer veränderten Verteilung der Enzyme auf die Lipoproteine eine veränderte Enzymaktivität zugrunde.

Die LPL- Aktivität betrug bei Apo E 2/2 Genotypen  $65,3 \pm 34,8$  (n=6), Apo E 3/3  $57,9 \pm 20,2$  (n=8) und Apo E 4/4  $48,2 \pm 9,0$  (n=5). Für die Aktivität der LPL zeigten sich zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 10a) (2/2 vs. 3/3  $p=0,249$ ; 2/2 vs. 4/4  $p=0,168$ ; 3/3 vs 4/4  $p=0,727$ ).

Die HL- Aktivität betrug bei Apo E 2/2 Genotypen  $381,7 \pm 151,2$  (n=6), Apo E 3/3  $225,3 \pm 121,8$  (n=8) und Apo E 4/4  $238,2 \pm 81,4$  (n=5) (Abbildung 10b). Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (2/2 vs. 3/3  $p=0,738$ ; 2/2 vs. 4/4  $p=0,421$ ; 3/3 vs. 4/4  $p=0,428$ ), jedoch zeigte sich eine Tendenz zu höheren Enzymaktivitäten bei Apo E 2/2 Genotypen. Diese erhöhte HL- Aktivität könnte ein Element sein, mit dem die geringere Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei Individuen mit dem Apo E 2/2 Genotyp zu erklären sein könnte. Für eine definitive Aussage müsste aufgrund der großen Streuung der Werte jedoch eine wesentlich größere Anzahl von Probanden untersucht werden.

**Abbildung 10a und 10b** HL und LPL Aktivität in Apo E- Genotypen



## 4. Diskussion

Die Bewertung und pathobiochemische Einordnung der Risikofaktoren und eine fundierte Kenntnis des Lipid- und Lipoproteinstoffwechsels sind für die Prävention und Therapie der Krankheiten des Herzkreislaufsystems von großer Bedeutung. In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Proteinen identifiziert, die eine entscheidende Rolle im Fettstoffwechsel des menschlichen Organismus spielen.

Der Apo E- Polymorphismus z.B. beeinflusst den Cholesterintransport und kann somit über eine primäre Fettstoffwechselstörung die Ursache einer Hyperlipoproteinämie sein und damit das Risiko für KHK und Arteriosklerose erhöhen. Beim Vorliegen des Apo E 4/4 Phänotyps wird das mit der Nahrung zugeführte Cholesterin rascher und vollständiger als normal resorbiert, wodurch eine mäßige Erhöhung des LDL-Cholesterins resultiert. Patienten mit Apo E 4/4 weisen deshalb ein erhöhtes KHK-Risiko auf. Im Gegensatz dazu weisen Apo E 2/2 Genotypen hohe HDL- Werte auf.

Ein weiteres Protein ist das lipolytische Enzym HL, das eine wichtige Rolle in der Triglyzeridhydrolyse spielt. In klinischen Studien weisen Patienten mit HL- Defizienz erhöhte Cholesterin-, Triglyzerid-, VLDL- Remnants-, HDL- und LDL- Werte auf. Die Aktivität der HL ist im Postheparin- Plasma bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen mit normalen Lipidwerten deutlich reduziert. Verschiedene Studien haben auf eine protektive Rolle der HL bei der Arteriosklerose hingewiesen (Hirano et al.1995). Der Mechanismus, über den die HL der Entwicklung der kardiovaskulären Erkrankungen entgegenwirken kann, ist jedoch nicht genau geklärt und Gegenstand dieser Arbeit.

Möglicherweise gibt es unterschiedliche HL- Verteilung innerhalb der Apo E- Genotypen, die für die bestimmte Lipoprotein- Assoziationen innerhalb der Genotypen verantwortlich sein könnte. Ziel dieser Arbeit war es, die Verteilung von HL auf die Lipoproteine bei verschiedenen Apo E- Genotypen zu untersuchen. Dazu wurde das Plasma von 19 Probanden verschiedener Apo E- Genotypen mit Hilfe von FPLC aufgetrennt und die Verteilung von HL , LPL und Apo E mit Antikörpern detektiert. Zusätzlich wurde die Aktivität der Lipasen HL und LPL bei den verschiedenen Genotypen gemessen.

#### **4.1 Einfluß von Heparin auf die HL**

Die HL zeigt eine hohe Strukturhomologie zur LPL, und DNA-Untersuchungen zeigen eine Homologie von 46% zwischen HL der Ratte und menschlichen LPL (Wion et al. 1987). Bezüglich der Spezifität für Heparin zeigen beide Enzyme kaum Differenzen, wobei die HL eine schwächere Wechselwirkung mit Heparin als die LPL aufweist (Bengtsson et al. 1980). Die detaillierte Wechselwirkung zwischen Heparin und HL ist im Gegensatz zu der von Heparin mit LPL noch nicht geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Bindung von Heparin an HL keinen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms hat, sondern lediglich der Stabilisation dient (Jansen et al. 1980).

In unseren Untersuchungen wurde die LPL als direkter Vergleich sowie als zusätzliche Kontrolle zur HL benutzt, da die Wechselwirkung von Heparin mit LPL besser bekannt ist. Heparin löst Endothel- gebundene LPL, so daß diese im Postheparin- Plasma deutlich ansteigt. Aufgrund der oben erwähnten Kenntnisse wurden die Probanden vor Gewinnung des Plasmas mit einer Dosis von 70U/kg Körpergewicht heparinisiert, um eine Anreicherung und Stabilisierung von HL und der LPL im Plasma zu erreichen. Trotz dieser Maßnahme konnten wir im Gegensatz zur LPL bei der Immundetektion keine Anreicherung von HL im VLDL- Bereich nachweisen. Es ist nicht auszuschließen, daß dieser Effekt lediglich auf einer mangelnden HL- Anreicherung durch submaximale Heparindosen zurückzuführen ist. Die verwendeten Dosen beruhen im wesentlichen auf Erfahrungswerten für die LPL. Da die HL eine schwächere Wechselwirkung mit Heparin als die LPL aufweist (Bengtsson et al. 1980), könnte eine Dosiserhöhung von Heparin eine Zunahme der HL- Anreicherung in den Lipoproteinen und damit auch im VLDL- Bereich bewirken. Eine größere Menge gelöster HL würde wahrscheinlich zu einer vermehrten Bindung in allen Lipoproteinfraktionen und in allem Genotypen statt zu einer völligen Verschiebung des Bindungsmusters führen. Außerdem kann eine Dosiserhöhung von Heparin die Nebenwirkungsrisiken für Blutungen oder heparininduzierte Thrombozytopenien erhöhen, was bei wissenschaftliche Untersuchungen an gesunden Probanden unvertretbar ist. Deshalb wurden die herkömmlichen Heparindosen benutzt und die absolute Menge der HL außer Betracht gelassen.

## **4.2 Auswirkung der Probenbehandlung auf die HL- Intensität**

Das menschliche Blut enthält eine Reihe von Bestandteilen wie Fibrin und Chylomikronen, die vor der Auftrennung des Plasmas entfernt werden müssen. Damit soll eine Irritation oder Schädigung der FPLC- Säule verhindert werden, da diese sonst die Meßergebnisse verfälschen würden. Aus diesem Grund wurde das Plasma sofort nach der Entnahme mit einem 0.45 µm Filter gereinigt.

Bei unseren Untersuchungen war zu beobachten, daß die Intensität der HL und der LPL im allgemeinen sehr schwach ausgeprägt waren. Die Ursache könnte in der Methode der Plasma- Filtration liegen, die möglicherweise einen Teil der HL und der LPL in Filter- Apparat und FPLC- Einrichtung anhaften läßt. Um einen solchen Fehler auszuschließen, haben wir als exemplarisches Beispiel das Plasma eines Probanden mit Apo E 3/3 Genotyp einmal nach der Entnahme filtriert und einmal bei 4°C und 2500 rpm für 15 Minuten einer Zentrifugation unterzogen. Da durch die Zentrifugation weniger störende großmolekulare Substanzen eliminiert werden als durch die Filtration, kam es im Verlauf der FPLC- Läufe zu einer gefährlichen Drucksteigerung in der Säule. Um eine Schädigung der Säule zu verhindern, haben wir deshalb bei der Methode der Zentrifugation den FPLC- Lauf mit einer niedrigeren Geschwindigkeit fortgesetzt, um eine Abnahme des Druckes zu gewährleisten, was außer einer längeren Versuchsdauer keine anderen Auswirkungen auf unsere Untersuchungsergebnisse hatte. Das Ergebnis dieses Vergleiches hat die Vermutung, daß es bei der Filtration zu einer Bindung von großen Mengen von HL und LPL mit dem Filterapparat kommt, nicht bestätigt. Es waren keine signifikanten Unterschiede der Enzymintensitäten zwischen den beiden Methoden nachweisbar. Die Auswahl der Methoden Zentrifugation oder Filtration hat also keinen Einfluß auf die Intensität von LPL und HL.

## **4.3 FPLC als die Methode der Wahl zur Auftrennung von Lipoproteine**

Die Ultrazentrifugation ist die Standardmethode zur Auftrennung von Lipoproteine. Diese Methode wird als Routineuntersuchung für klinische Zwecke oder Studien mit großen Patientenkollektiven benutzt, da sie mit geringem technischen und zeitlichen Aufwand durchführbar ist. Die bei der Ultrazentrifugation auftretenden Kräfte sind jedoch so groß, daß sie die Bindungen zwischen LPL und Lipoproteine zerstören (Goldberg et al.1986). Da zwischen HL und LPL eine große Strukturhomologie vorliegt, könnte bei Ultrazentrifugation auch die Bindung zwischen HL und

Lipoproteine zerstört und damit die Verteilungsmuster beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde diese Methode bei dieser Arbeit nicht benutzt.

Die Gelfiltration stellt eine Alternative zur Auftrennung der Lipoproteine dar, die aber wegen ihres größeren Aufwandes keinen Eingang in der Routine im klinischen Alltag gefunden hat. Ihr wesentlicher Vorteil ist die schonende Trennung ohne Einfluß auf die Lipoprotein- Lipasen- Bindungen (Vilella et al. 1991). Da bei dieser Arbeit die Bindungen zwischen HL/LPL und Lipoproteinen eine zentrale Rolle spielen und wir eine geringe Anzahl von Probanden untersucht haben, wurde FPLC zur Auftrennung von Lipoproteinen benutzt.

#### **4.4 Zuordnung der Lipoproteinklassen zu Elutionsfraktionen**

Um sicher davon ausgehen zu können, daß sich in den Fraktionen auch die zu erwartenden Lipoproteine befinden, wurden als Kontrolle nach dem FPLC- Lauf alle Fraktionen einer Cholesterin- Messung unterzogen. Durch die Cholesterin- Messung kann der LDL- Bereich identifiziert werden, da LDL am meisten Cholesterin enthält. Die Cholesterin- Messungen zeigen, daß in Fraktionen 24-26 ein Cholesterin- Peak zu sehen ist, was als Bestätigung für die Eluierung von LDL in diesem Bereich dient. Wir haben zusätzlich nach dem FPLC- Lauf die Fraktionen 16, 25 und 34, in denen Peaks zu sehen waren, nach der Goldmarkierung unter dem Elektronenmikroskop untersucht, um zu zeigen, daß in diesen Fraktionen die zu erwartenden Lipoproteine tatsächlich vorhanden sind. Die Größe der Moleküle in Fraktion 16 betrug ca. 55 nm, in Fraktion 25 ca. 20 nm, in Fraktion 34 ca.10 nm. Die erwähnten Molekülgrößen entsprechen den Molekülgrößen von VLDL, LDL und HDL, d.h. in Fraktion 16 ist vorwiegend VLDL, in Fraktion 24 LDL und in Fraktion 34 HDL vorhanden. Dem mangelnden Nachweis der HL im VLDL- Bereich liegt also kein systematischer Fehler bei der Zuordnung von Elutions- und Lipoprotein- Fraktionen zugrunde.

#### **4.5 Auswirkung der Nachweismethode auf die HL-Detektion**

Bei der Immundetektion konnten wir für die Verteilung der HL in den Lipoproteinen keine spezifische Verteilung in den verschiedenen Apo E-Genotypen feststellen. Die Verteilung der HL zeigte zwischen allen drei Apo E- Genotypen sowohl in Prä- als auch in Postheparin- Plasma keine gravierenden Unterschiede. Die Intensitäten waren bis auf eine Probe gering im VLDL-, mäßig im LDL- und stärker im HDL- Bereich. Im Gegensatz dazu haben wir bei der elektronenmikroskopischen

Darstellung die HL homogen auf die Fraktionen, die den einzelnen Lipoproteinklassen entsprechen, verteilt nachweisen können. Diese Diskrepanz könnte erklärt werden durch eine Kreuzreaktion mit Albumin im Slot- Blot- Verfahren. Auf Grund der Molekülgröße wird Albumin in den gleichen Fraktionen wie die HDL eluiert. Da Albumin bekanntermaßen von vielen Antikörpern angefärbt wird und großer Menge vorliegt, kann es trotz zusätzlichem BSA- Block zu einer Färbung im HDL- Bereich führen und somit eine Mehranreicherung an HL vortäuschen. Dies wird im Slot- Blot- Verfahren nicht erkannt, kann bei der Elektronenmikroskopie durch optische Identifizierung der Partikel jedoch ausgeschlossen werden. Für die Inhomogenitäten der HL- Verteilung sind also am ehesten Artefakte bei der Immundetektion verantwortlich.

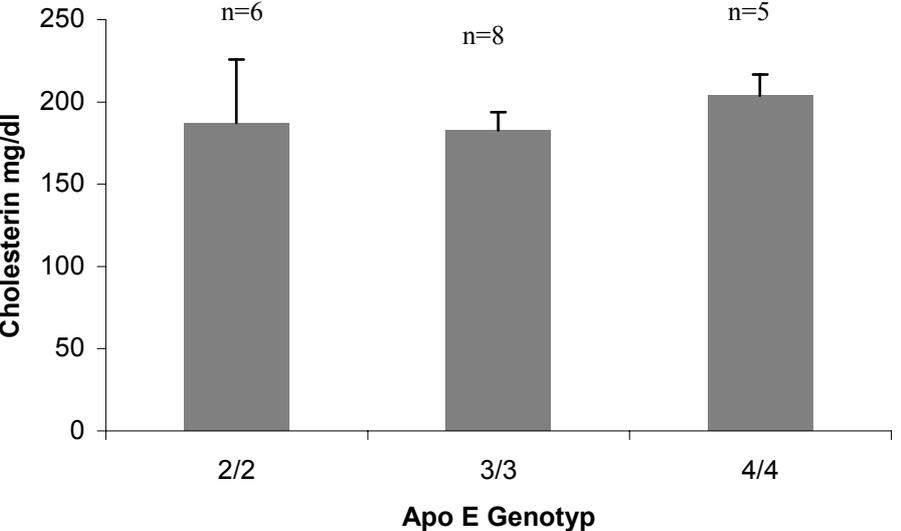
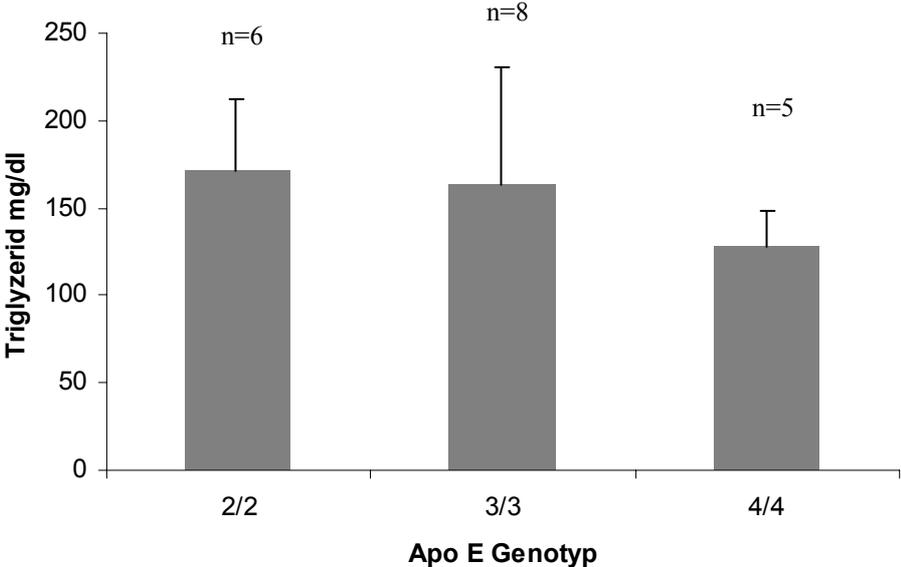
#### **4.6 Verteilung der HL auf Lipoproteine**

In einigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe (Sebastian Götz 1998, persönliche Mitteilung), konnte in einigen Fällen gezeigt werden, daß die HL bei Apo E 2/2 in VLDL- Bereich viel stärkere Intensität und bei Apo E 4/4 eine geringere Intensität in VLDL aufweist. Ich habe bei meinen Untersuchungen größere Anzahl von Probanden untersucht und dabei festgestellt, daß bei den drei Homozygoten-Gruppen keine spezifische Verteilung bezüglich der HL in den VLDL- Bereich weder in Postheparin- noch in Präheparin- Plasma nachweisbar ist. Die Verteilung der LPL zeigte bei unseren Untersuchungen eine stärkere Intensität in Postheparin- Plasma, aber keine Spezifität bezüglich der Verteilung in VLDL- Bereich bei den verschiedenen Apo E- Genotypen.

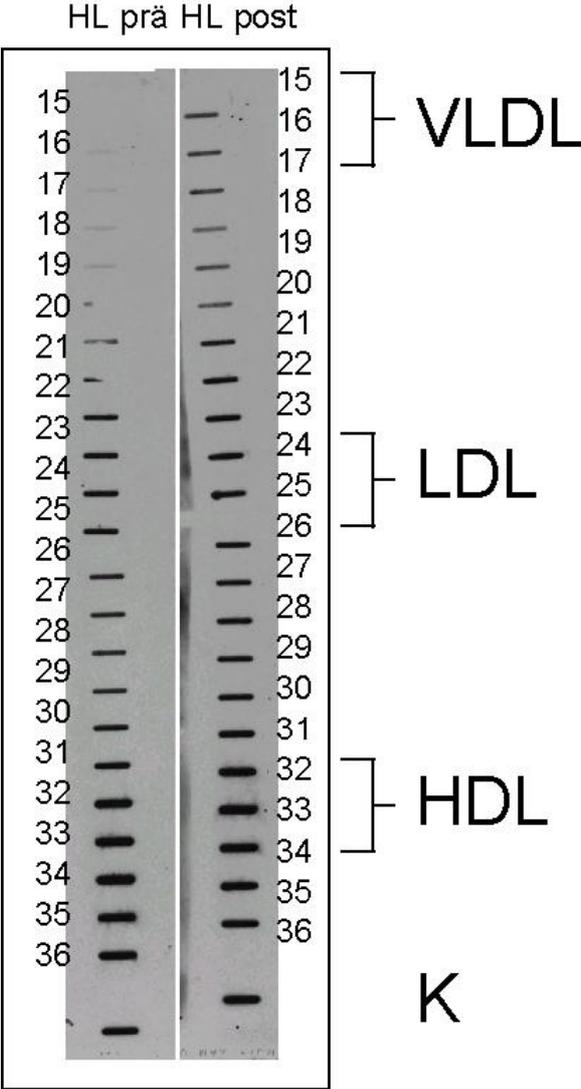
Das Hauptkriterium zur Auswahl unseres Probandenkollektives war das Vorliegen der Apo E- Homozygotie. Die Cholesterin- und Triglycerid- Werte haben als Kriterium für die Aufnahme in den Probandenkollektiv keine Rolle gespielt. Auf der Abbildung 10 ist eine Triglycerid- und Cholesterinkonzentration der Apo E- Gruppen dargestellt. Die Gesamtcholesterin- Werte unseres Probandenkollektives liegen im Normbereich (Normwerte für Cholesterin <220 mg/dl). Die Gesamttriglycerid- Werte sind als minimal erhöht zu betrachten (Normwert für Triglyceride <150 mg/dl). Der Triglyceridwert lag bei einem unseren Probanden mit Apo E 3/3 Genotyp bei 614 mg/dl. Dieser Wert ist der höchste Triglyceridwert, der in dieser Arbeit gemessen wurde. Bei diesem Probanden konnte als einzigem eine deutliche Intensitätszunahme der HL im Postheparin- Plasma im VLDL- Bereich beobachtet

werden (Abbildung 12). Bei einem anderen Probanden mit Apo E 2/2 Genotyp konnte trotz eines Triglyzeridwertes von 304 mg/dl keine Intensitätszunahme von HL im VLDL- Bereich beobachtet werden (Abbildung 5). Es wäre in weiteren Studien interessant, bei der Auswahl des Patientenkollektives außer der Homozygotie von Apo E auch die Triglyzeridwerte zu berücksichtigen, um feststellen zu können, ob hohe Triglyzeridwerte die Verteilung von HL auf die Lipoproteine bei verschiedenen Apo E- Genotypen unterschiedlich beeinflussen.

**Abbildung 11** Übersicht der Gruppendaten für die Triglyzeridkonzentration und Cholesterinkonzentration. Zur Darstellung kommen die Mittelwerte mit Standartabweichung.



**Abbildung 12** Verteilung der hepatischen Lipase (HL) bei ApoE 3/3 Probanden mit Triglycerid- Wert von 614 mg/dl.



## 5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Verteilung der HL auf die Lipoproteine in Prä- und Postheparin- Plasma zu untersuchen, um einen möglichen Einfluss der Apo E- Isotypen zu demonstrieren. Im Postheparin- Plasma von 19 Probanden mit Apo E- Homozygotie wurden Cholesterin- und Lipaseaktivitätsmessungen durchgeführt. Nach der Gelfiltration des Prä- und Postheparin- Plasmas wurde mit Hilfe der Immundetektion die Verteilung der HL auf die Lipoprotein- Klassen VLDL, LDL und HDL untersucht und anschließend mit Hilfe eines Elektronenmikroskops genauer betrachtet.

Die Elutionsprofile nach der Gelfiltration zeigten Unterschiede zwischen den verschiedenen Apo E- Genotypen. Im VLDL- Bereich war bei Apo E 2/2 ein deutlich höherer Peak als bei Apo E 3/3 und 4/4 zu beobachten. Im LDL- Bereich hingegen wiesen Apo E 4/4 Genotypen einen höheren Peak als die beiden anderen Genotypen auf. Im LDL- Bereich waren keine deutlichen Unterschiede zu sehen.

Die Immundetektion zeigte, daß die HL überwiegend in den HDL- Fraktionen, weniger in den LDL- und fast gar nicht in den VLDL- Fraktionen gebunden wird. Dieses Verteilungsmuster war bei allen drei Apo E- Isotypen gleich. Diese Ergebnisse waren unabhängig davon, ob das Plasma vorher filtriert oder zentrifugiert wurde. Im Vergleich zur LPL zeigte die HL bei allen drei Apo E- Isotypen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen Prä- und Postheparin- Plasma. Bei der Aktivitätsbestimmung der LPL zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Apo E- Genotypen. Die HL- Aktivität zeigte jedoch eine Tendenz zu höherer Aktivität bei Apo E 2/2 Probanden. Diese Tendenz könnte eine Rolle für die geringere Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei Apo E 2/2 Genotypen spielen. Für eine definitive Aussage müsste jedoch wegen der starken Streuung der Werte eine wesentlich größere Anzahl von Probanden untersucht werden.

Die Cholesterinverteilung zeigte bei allen drei Apo E- Isotypen keine Unterschiede in Prä- und Postheparin- Plasma auf.

Aus meinen Untersuchungen folgt, dass die HL keine spezifische Assoziation mit den Lipoproteinen in Abhängigkeit des Apo E- Genotyps aufweist und die HL keinen direkten Einfluss auf das Lipidstoffwechselverhalten der Apo E- Genotypen hat.

## 6. Literaturverzeichnis

Auwerx JH, Babirak SP, Hokanson JE, Stahnke G, Will H, et al. Coexistence of abnormalities of hepatic lipase and lipoprotein lipase in a large family. *Am J Hum genet* 1990; 46: 470-477.

Babirak SP, Brown BG, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989; 3: 326-324.

Beisiegel U, Weber W, Bengtsson-olivecrona G. Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8342-8346.

Bengtsson G, Olivecrona T, Höök M, Riesenfeld and Lindahl U. Interaction of Lipoprotein lipase with native and modified heparin-like polysaccharides. *Biochemical Journal* 1980;189; 625.

Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T, Jörnvall H. Lipoprotein Lipase from cow, guinea-pig and man: Structural characterisation and identification of protease sensitive internal regions. *Eur J Biochem* 1986; 161; 281-288.

Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T. Binding of active and inactive forms of lipoprotein lipase to heparin. *Biochem J* 1985; 226: 409-413.

Blades B, Vega GL, Grundy SM. Activities of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in postheparin plasma of patients with low concentrations of HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993; 13: 1227-1235.

Borensztain J, Getz GS, Kotlar TJ. Uptake of Chylomicron remnants by the liver: Further evidence for the modulating role of phospholipids. *J Lipid Res* 1988;29:1087-1096.

Breckenridge WC, Little JA, Alaupovic P, Wang CS, Kuksis A, Kakis G, Lindgren F, Gardiner G. Lipoprotein abnormalities associated with a familial deficiency of hepatic lipase. *Atherosclerosis* 1982; 45: 161-179.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor mediated pathway for Cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-37.

Camps L, Reina M, Liobera M, Vilaro S, Olivecrona T. Lipoprotein Lipase; Cellular Origin and functional distribution. *Am J Physiol* 1990; 258; C673-C681.

Carlson LA, Holmquist L, Nilsson-Ehle P. Deficiency of hepatic lipase activity in post-heparin plasma in familial hyper- $\alpha$ -triglyceridemia. *Acta Med Scand* 1986, 219: 435-447.

Cheng CF, Oosta M, Bensadaoun A, Rosenberg RD. Binding of Lipoprotein Lipase to endothelial cell in culture. *J Biol Chem* 1981; 256-12893-12896.

Clarke AR, Luscombe M, Hoolbrooke JJ. The effect of the chain length of heparin units interaction with Lipoprotein Lipase. *Biochim Biophys Acta* 1983; 747; 130-135.

Datta, S, Luo, C-C, Li, W-H, van Tuinen, P, Led better, D, H, Brown, M..A Chen, S - H, Liu, S W, Chan, L. (1988) " Human hepatic Lipase " *J. Biol. Chem.* 263, 1107-1110.

Deckelbaum, R.J Ramakrishnan, Eisenberg, S, Olivecrona, T, Bengtsson-Olivecrona, G (1992) Triacylglycerol and phospholipid Hydrolysis in human Plasma Lipoprotein and hepatic lipase *Biochem.*31, 8544-8551.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK (1983). The role of the liver in lipid and lipoprotein metabolism. In : *Liver in metabolic diseases*. Bianchi L, Gerok W, Landmann L, Sickinger K, Stalder GA (eds) pp 25-39

Dugi KA, Feuerstein IM, Hill S, Shih J, Santamarina Fojio S, Brewetr HB, Jr, Hoeg JM. Lipoprotein lipase correlates positively and hepatic lipase inversely with calcific atherosclerosis in homozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 354-364.

Garfinkel AS, Schotz M. Lipoprotein lipase. In: *Plasma Lipoproteins*. 1st ed. Gotto AM ed. Elsevier, Amsterdam 1987: 335-357.

Goldberg IJ, Kandel JJ, Blum CB, Ginsberg HN. Association of plasma lipoproteins with postheparin lipase activities. *J Clin Invest* 1986; 78: 1523-1528.

Grundey SM, *Atlas of Lipid disorders / Cholesterol, atherosclerosis and coronary heart disease*. Gower Medical Publishing 1990.

Groot PHE, Van Stiphoud WAHJ, Krauss XH, Jansen H, von Tol A, Van Ramshorst E, et al. Postprandial lipoprotein metabolism in normal lipidemic men with and without coronary artery disease. *Arteriosclerosis* 1991; 11: 653-662.

Havel RJ, Goldstein JL, Brown MS (1980). Lipoproteins and Lipid transport. In Bondy PK, Rosenberg LE (eds) *Metabolic and disease*, 8th edn. WB Saunders, Philadelphia, pp 393-371.

Hide WA, Chan L, Wen-Hsiung L. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 1992; 33; 167-178.

Hirano K-i, Yamashita S, Kuga Y, Sakai N, Nosaki S, Kihara S, et al. Atherosclerotic disease in mixed hyperalphalipoproteinemia; combined reduction of Cholesteryl ester transfer protein and hepatic triglyceride lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1849-1856.

Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Rall SC Jr, Mahley RW (1984). Normalization of receptor binding of apolipoprotein E2; evidence for modulation of the binding site conformation. *J Biol Chem* 259; 7261- 7267

Iverius PH, Brunzell JD. Human adipose tissue lipoprotein Lipase; Changes with feeding and relation to postheparin plasma. *Am J Physiol* 1985; 249; E107- E 114.

Iverius PH, Oslund- Linquist AM. Lipoprotein lipase from bovine milk: Isolation procedure, chemical characterization , and molecular weight analysis, *J Biol Chem* 1976; 252: 7791-7796.

Jackson RL, Yates MT, McNemey CA, Kashyap ML. Relationship between post-heparin plasma lipases, triglycerides and high density lipoproteins in normal subjects. Cincinnati College of medicine, Ohio. *Horm Metab Res* 1990; 22: 289-294.

Jansen H, Van Tol A, Hulsmann Wc. On the metabolic function of heparin releasable liver lipase. *Biochem biophys Res Commun* 1980, 92: 53-59.

Jansen H, Verhoveen AJ, Weeks L, Kastelein JJ, Halley DJ, Van den Owend A, et al. Common C-to-T substitution at Position -48 of the hepatic lipase promotor associated with a Lowered lipase activity in coronary artery disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2837-2842.

Ji Z-S, Lauer SJ, Fazio S, Bensadoun A, Taylor JM, Mahley RW. Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipasesecreting hepatoma cells in culture. *J Biolog Chem* 1994; 269: 13429-13436.

Krapp A, Ahle S, Kersting S, Hua Y, Kneser K, Nielsen M, et al. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomikrons and  $\beta$ -VLDL into cells via the LDL receptor-related protein. *J Lipid Res* 1996: 37: 926-936.

Lookene A, Bengtsson-Olivecrona G. Chymotryptic cleavage of Lipoprotein Lipase-identification of cleavage sites and functional studies of the truncated molecule. *Eur J Biochem* 1993; 213:185-194.

Mahley RW, Rall SC JR. Type III hyperlipoproteinemia (dyslipoproteinemia); The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In ; The metabolic basis of the inherited disease. 6th ed. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D eds. McGraw Hill, New York 1989; 1195-1213.

Olivecrona T, Bengtsson G, Lipoprotein lipase, the model enzyme. Borstom B and Brockmann HI eds. Elsevier, Amsterdam 1984: 205-261.

Olivecrona T, Engerlund T, Iverius PH, Lindaahl U. Evidence of an ionic binding of Lipoprotein Lipase to heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43; 524-529.

Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Lipoprotein- Lipase from milk, the model enzyme in Lipoprotein Lipase research. in; Lipoprotein Lipase. J. Borensztajn ed. Evener, Chicago 1987; 15-58

Peinado-onsurbe J, Staels B, Deeb S, Auwerx J. Lipoprotein Lipase expression in undifferentiated liver cells is regulated by progesteron and proteinkinase A. *Biochem* 1992; 31; 10121-10128.

Peterson J, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G. Distribution of Lipoprotein Lipase and hepatic lipase between plasma and tissues: Effect of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta* 1985; 837: 262-270.

Saxena U, Witte LD, Goldberg IJ. Identification and characterization of the endothelial lipoprotein lipase receptor. *J Biol Chem* 1991; 26: 1751- 17521.

Schneider WJ et al. (1981). Familial dyslipoproteinemie ; Abnormal binding of mutant apoprotein E to low density lipoprotein receptors of human fibroblasts and membranes from liver and adrenal of rats, rabbits, and cows, *J Clin Invest* 68; 1075-1085

Shimada K, Gill PJ, Sildert LE, Douglas WHJ, Fanburg BL. Involvement of cell surface heparin sulfate in the binding of lipoprotein lipase to cultured bovine endothelial cells in culture. *J Clin Invest* 1981; 68: 995-1002.

Steinberg D, parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989). Modifications of lowdensity lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320; 915-927.

Sultan F, Lagrange D, Janssen H, Grigolio S. Inhibition of hepatic lipase activity impairs chylomicron remnant-removal in rats. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1042: 150-152.

Thurne T, Wilcox RW, Sisson P, Waite M. Hepatic Lipase hydrolysis of lipid monolayers. Regulation by apoproteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 4853-4861.

Utermann G, Hees M, Steinmetz A (1977) . Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dyslipoproteinemia in man .*Nature* 269; 604-607

Van Barlingen HHJJ, de Jong H, Erkelens DW, de Bruin TWA, Lipoprotein lipase-enhanced binding of human triglyceride-rich lipoproteins to Heparin sulfate: Modulation by apolipoprotein E and apolipoprotein C. *J Lipid Res* 1996; 37: 757-763.

Viella E, Joven J, Fernandez M, Vilaro S, Brunzell JD, Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G, Lipoprotein lipase in human plasma is mainly inactive and associated with cholesterol-rich lipoproteins. *J Lipid Res* 1993; 34: 1555-1564.

Winkler FK, D Arcy A, Hunzicker W. Structure of Pancreatic lipase. *Nature* 1990; 343: 771-774.

Wang-Iverson P, Jaffe EA, Brown WV. Triglyceride lipolysis by lipoprotein Lipase bound to endothelial cells in culture. *Arteriosclerosis* 1980; 5; 375-378.

Williams SE, Inoue Z, Trean H, Fry GL, Pladet MW, Iverius P-H, Lalouel J-M, Chappell DA, Strickland DK. The carboxy-terminal domain of Lipoprotein lipase binds to the Low density Lipoprotein receptor related protein /  $\alpha$  2-macroglobulin receptor receptor (LRP) and mediates binding of normal very low density lipoproteins to LRP. J Biol Chem 1994; 269: 8653-8658.

Wion KL, Kirchgessner TG, Lusic AJ, Schotz MC, Lawn RM, Human Lipoprotein Lipase Complementary DNA sequence. Science 1987; 235: 1638-1641.

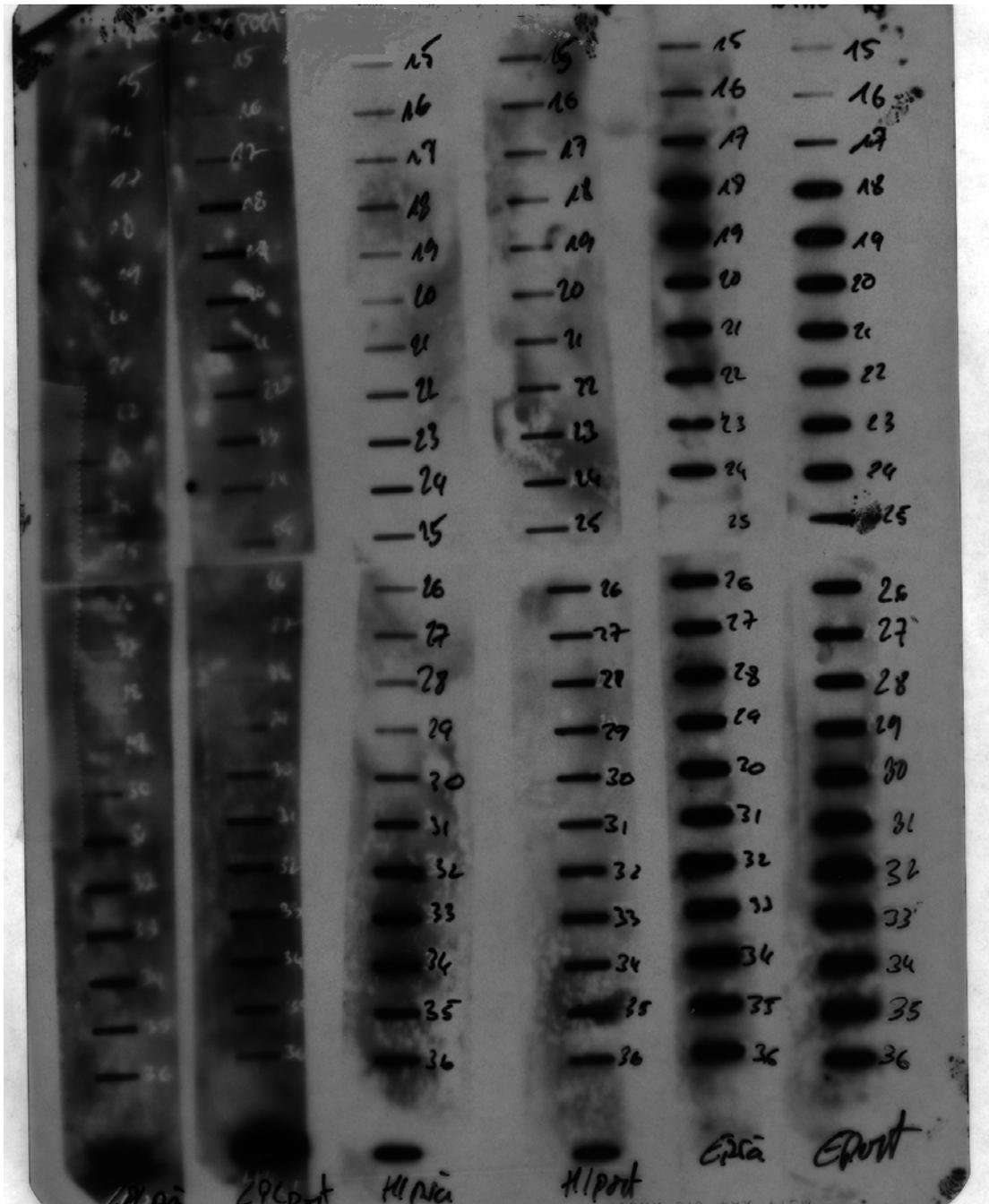
Yang CY, GU ZW, Yang HX, Rhode MF, Gotto AM, Pownell HJ. Structure of bovine milk lipase. J Biol Chem 1989; 264: 16822,16827.

## **Anhang**

Auf den folgenden Seiten sind zur besseren Darstellung der HL-Verteilung auf Lipoproteine bei den unterschiedlichen Apo E – Homozygoten die Immunblots der Probanden, die nicht im Ergebnisteil abgebildet wurden, zu sehen.

Proband 1 Apo E 3/3

LPL prä    LPL post    HL prä    HL post    E Prä    E post

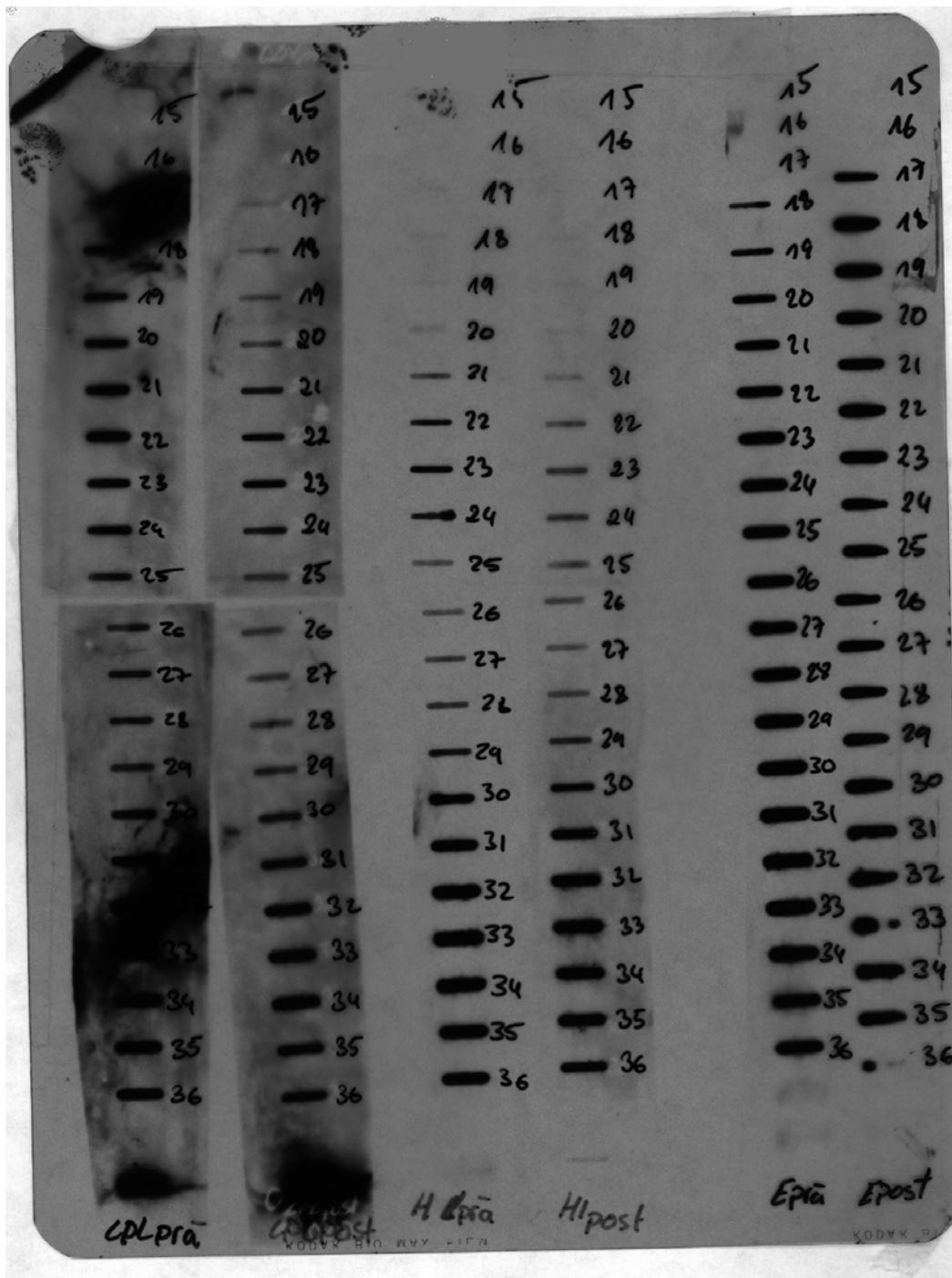


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

# Proband 3 Apo E 3/3

LPL prä      LPL post      HL prä    HL post      E Prä      E post

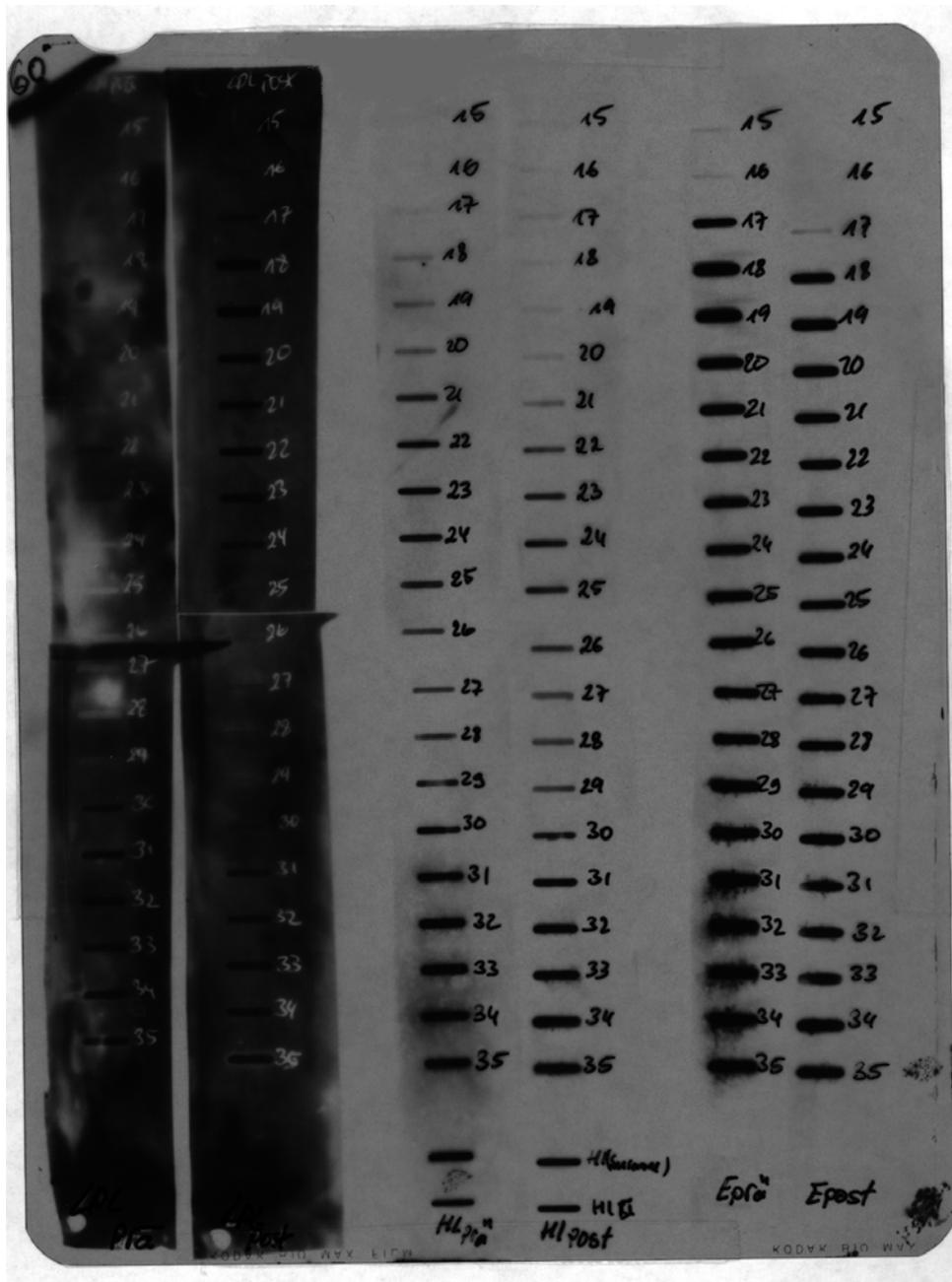


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

# Proband 4 Apo E 3/3

LPL prä LPL post HL prä HL post E Prä E post

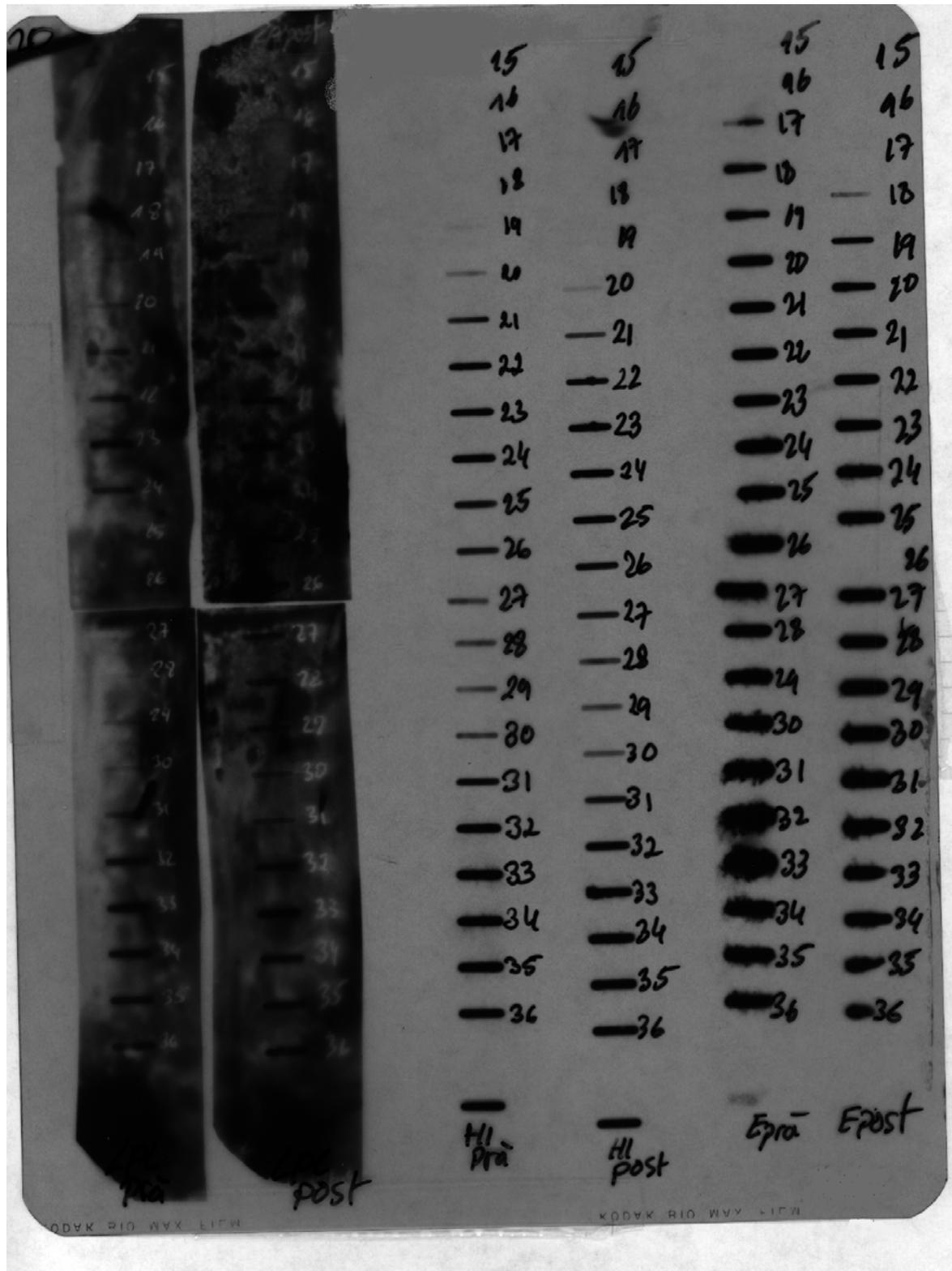


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 5 Apo E 3/3

LPL prä                  LPL post                  HL prä    HL post                  E Prä                  E post

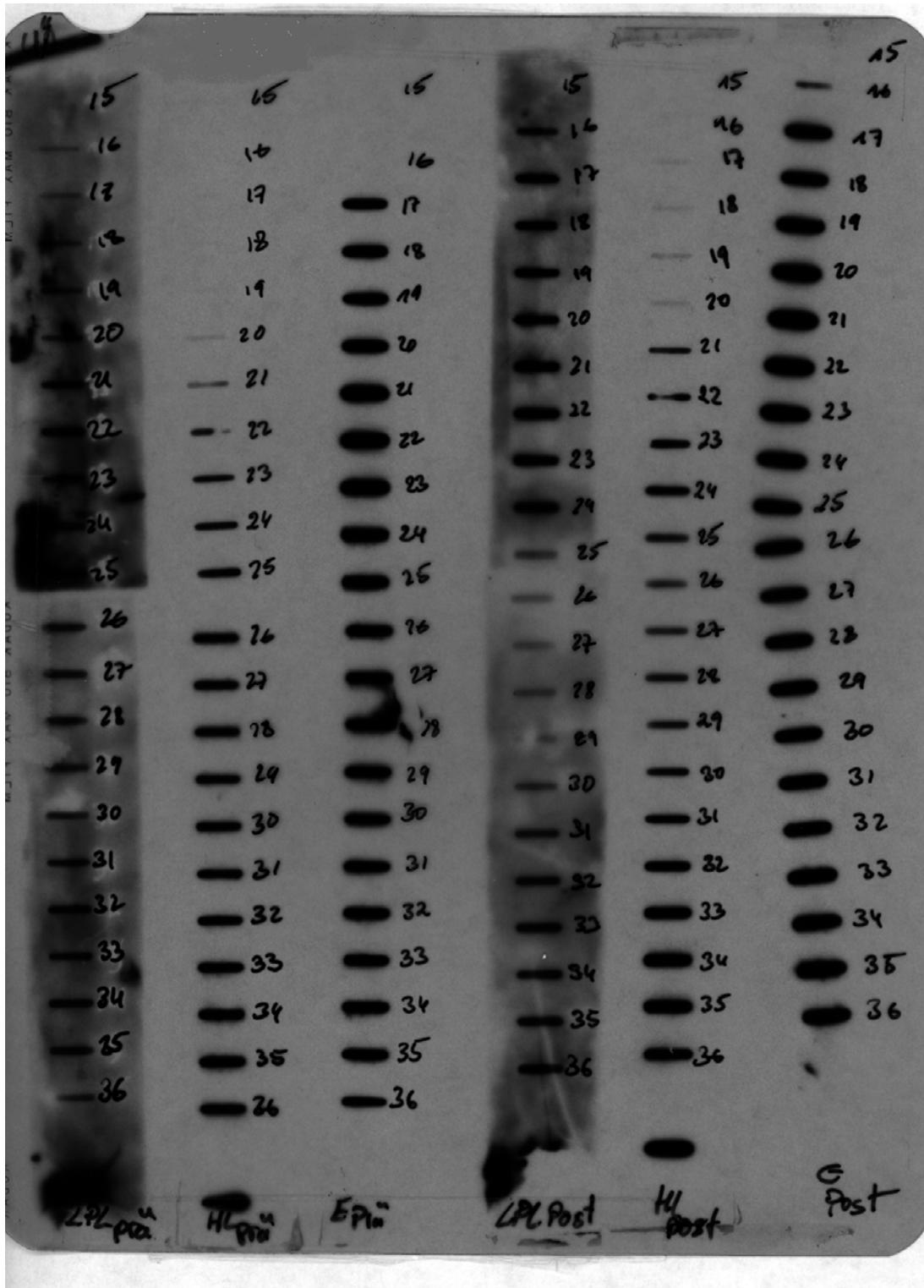


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 6 Apo E 3/3

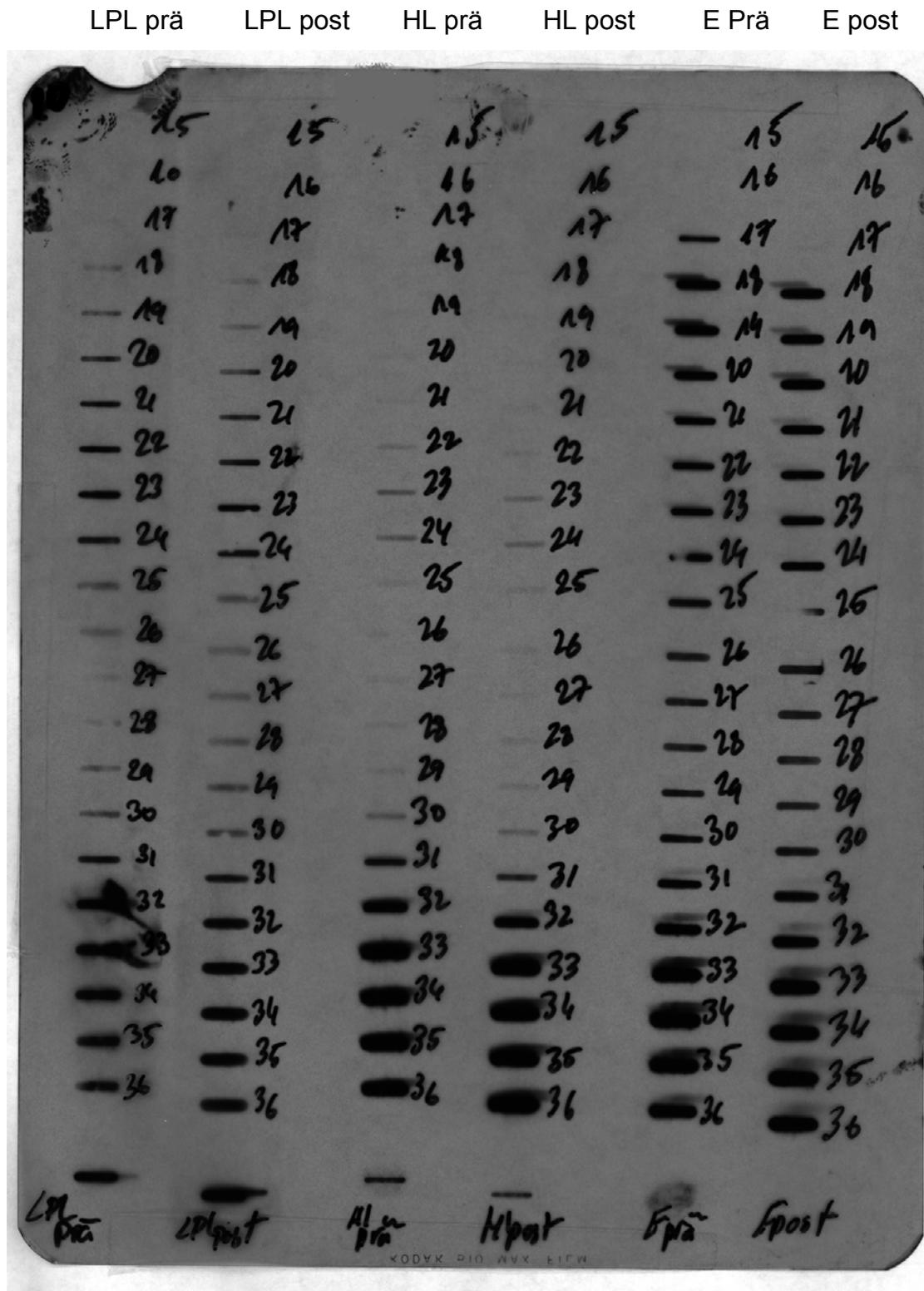
LPL prä      LPL post      HL prä      HL post      E Prä      E post



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

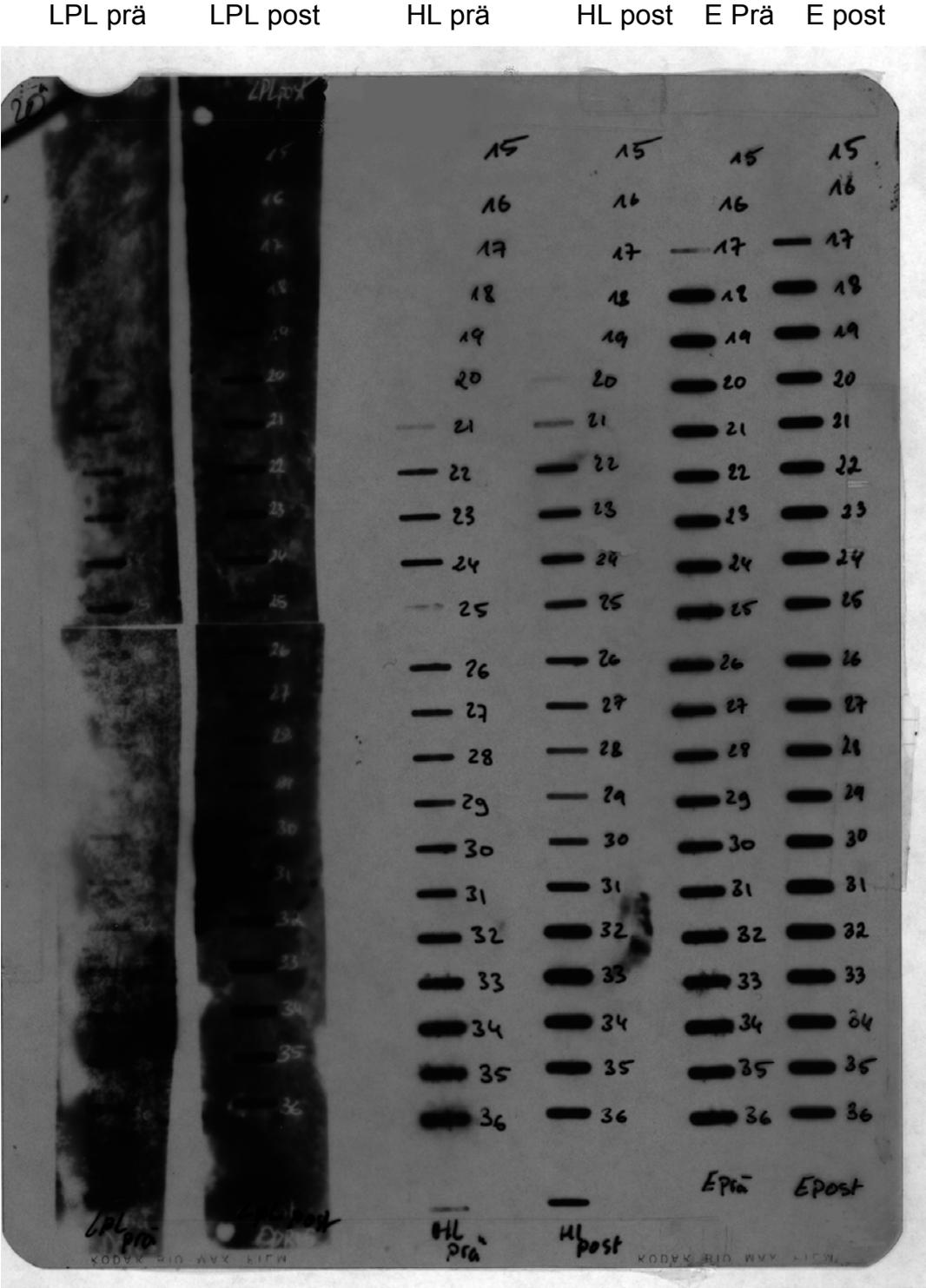
Proband 7 Apo E 3/3



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

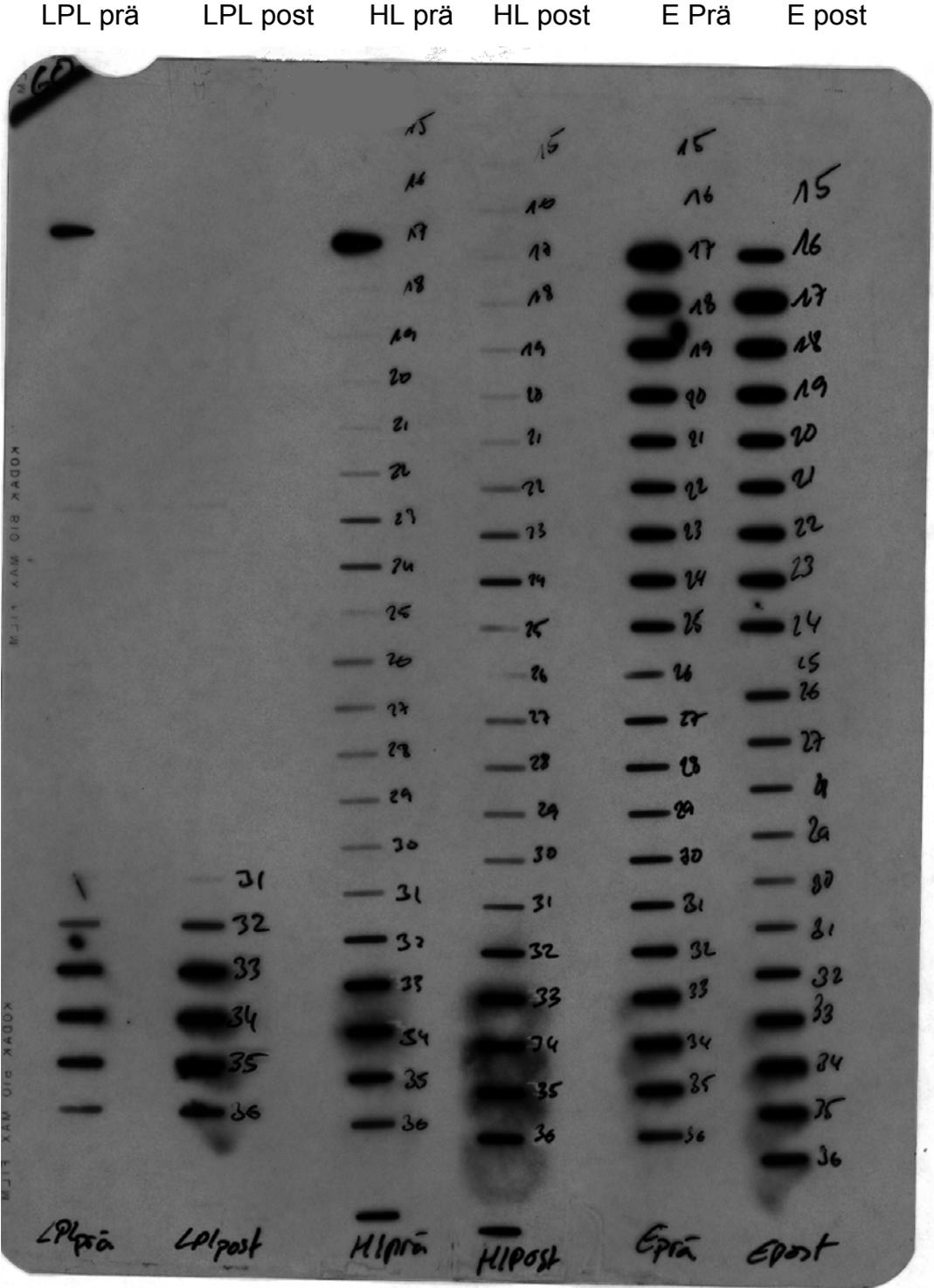
Proband 10 Apo E 4/4



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 11 Apo E 4/4

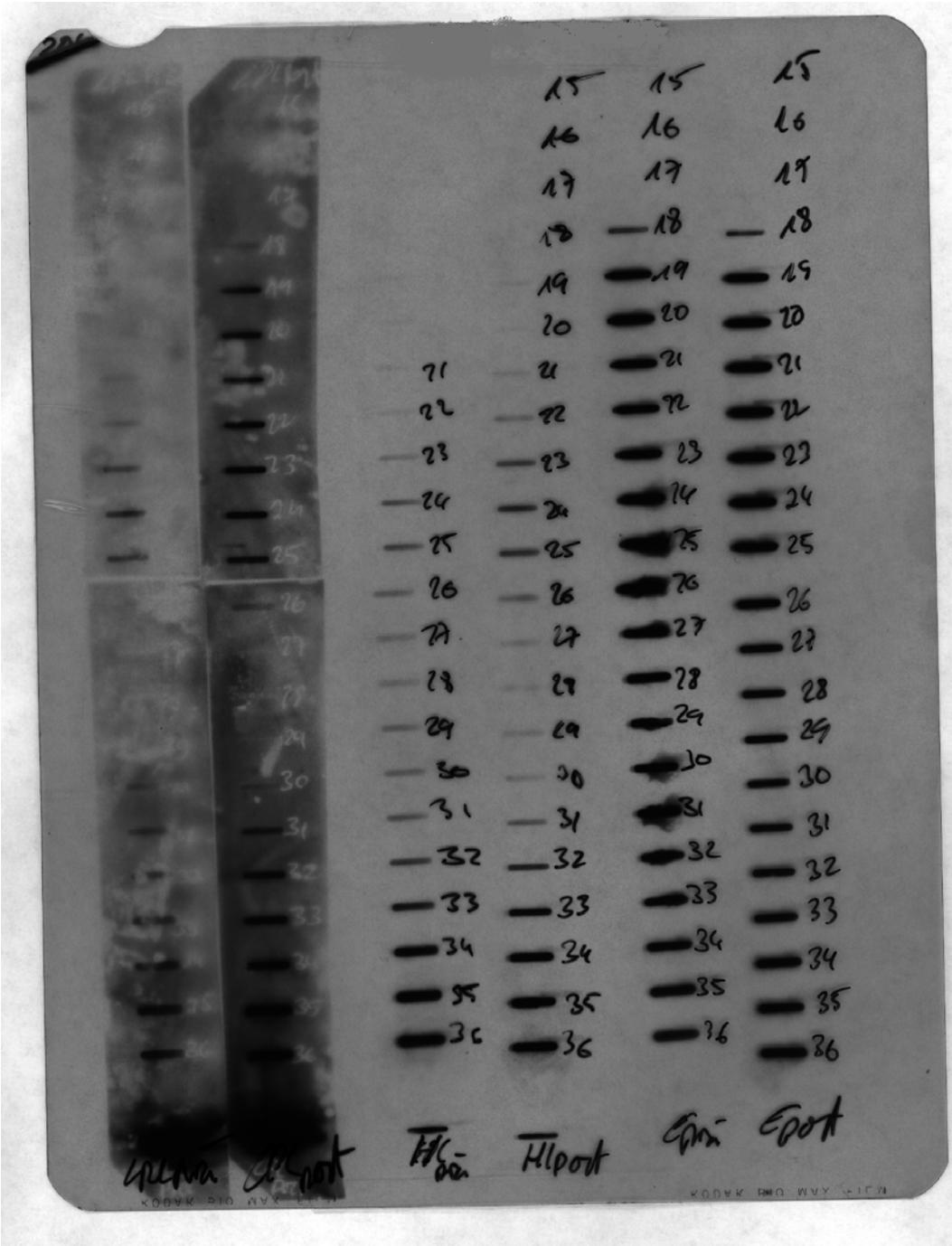


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 12 Apo E 4/4

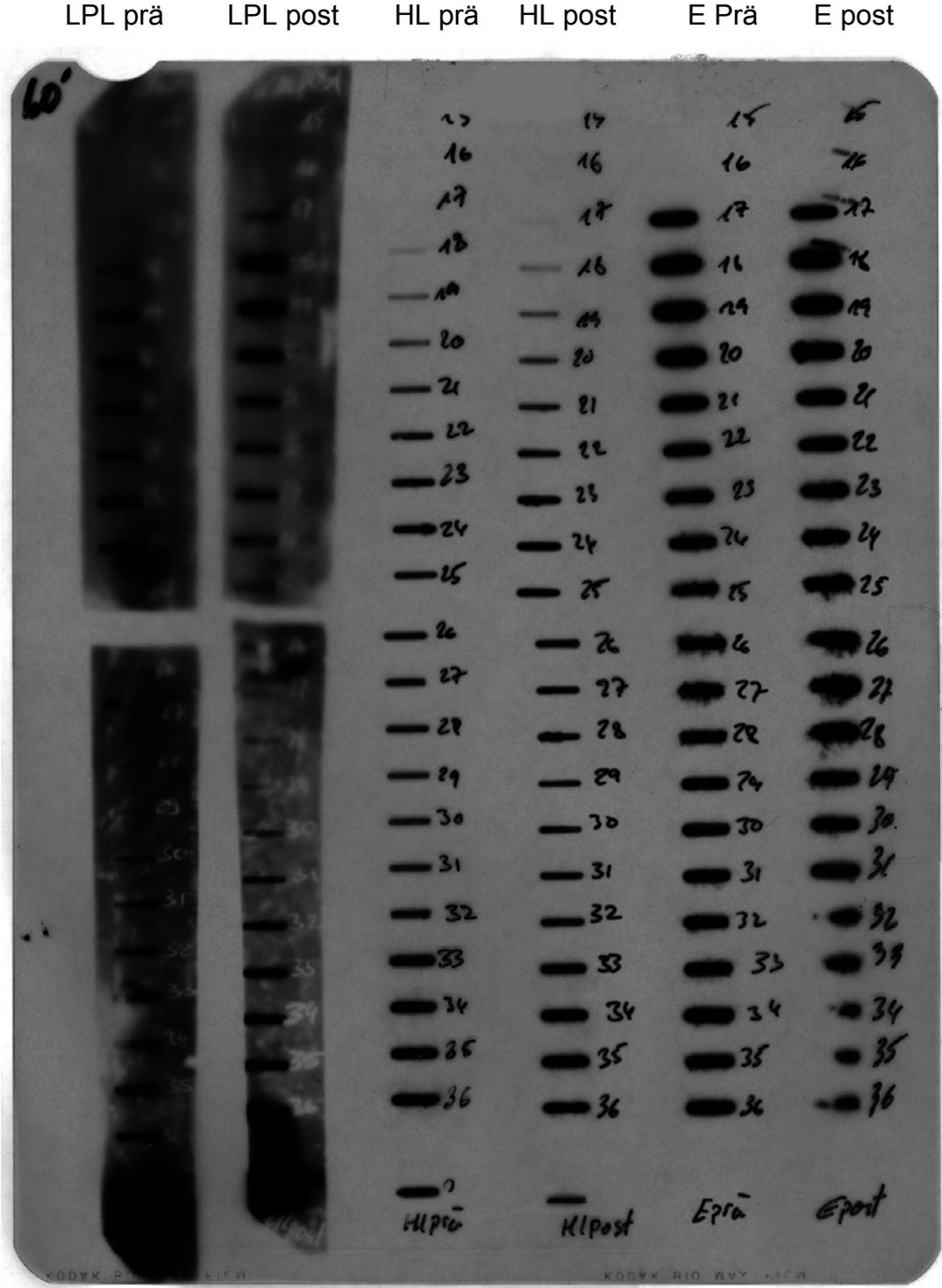
LPL prä    LPL post    HL prä    HL post    E Prä    E post



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 13 Apo E 4/4

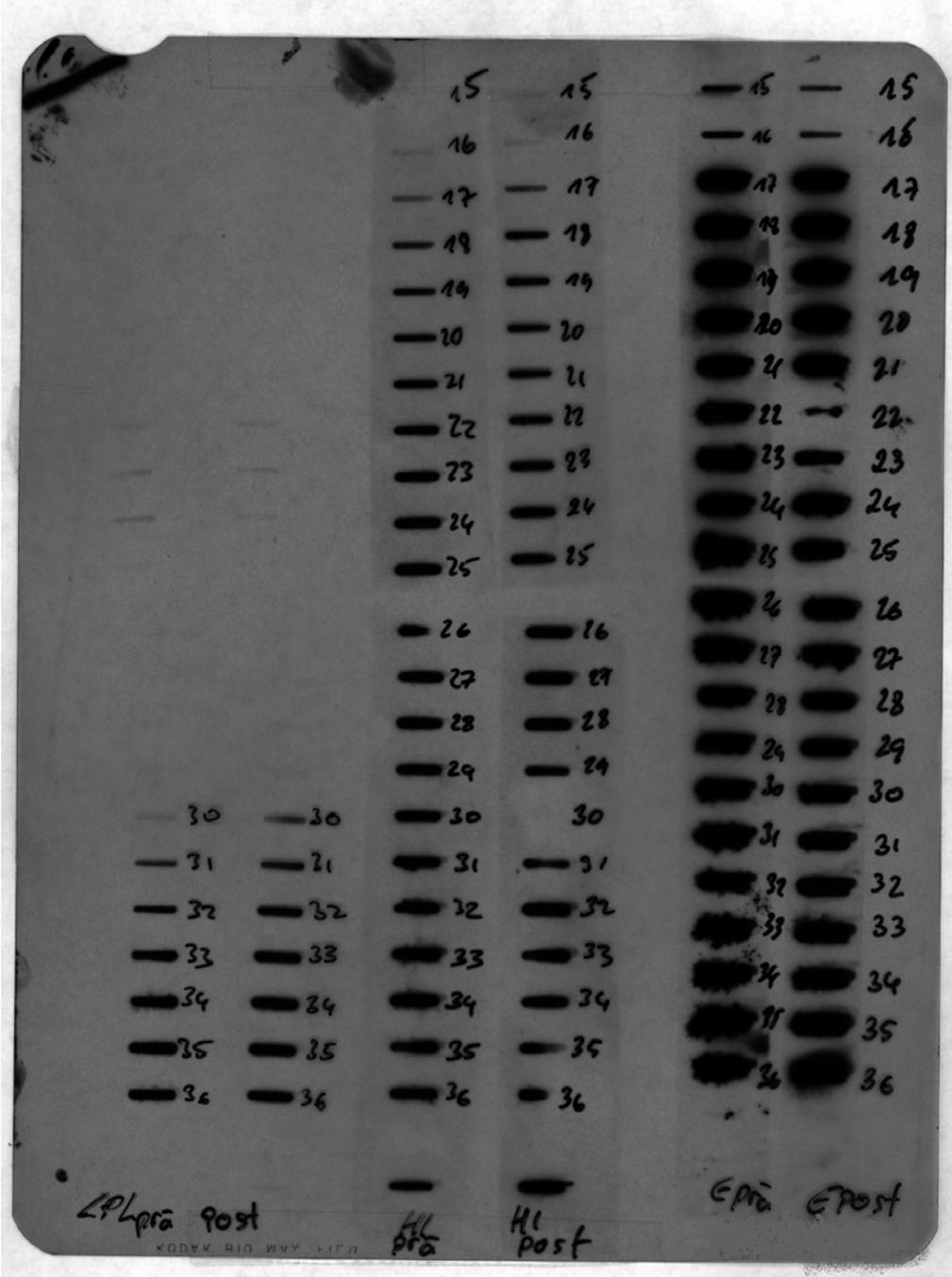


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 14 Apo E 2/2

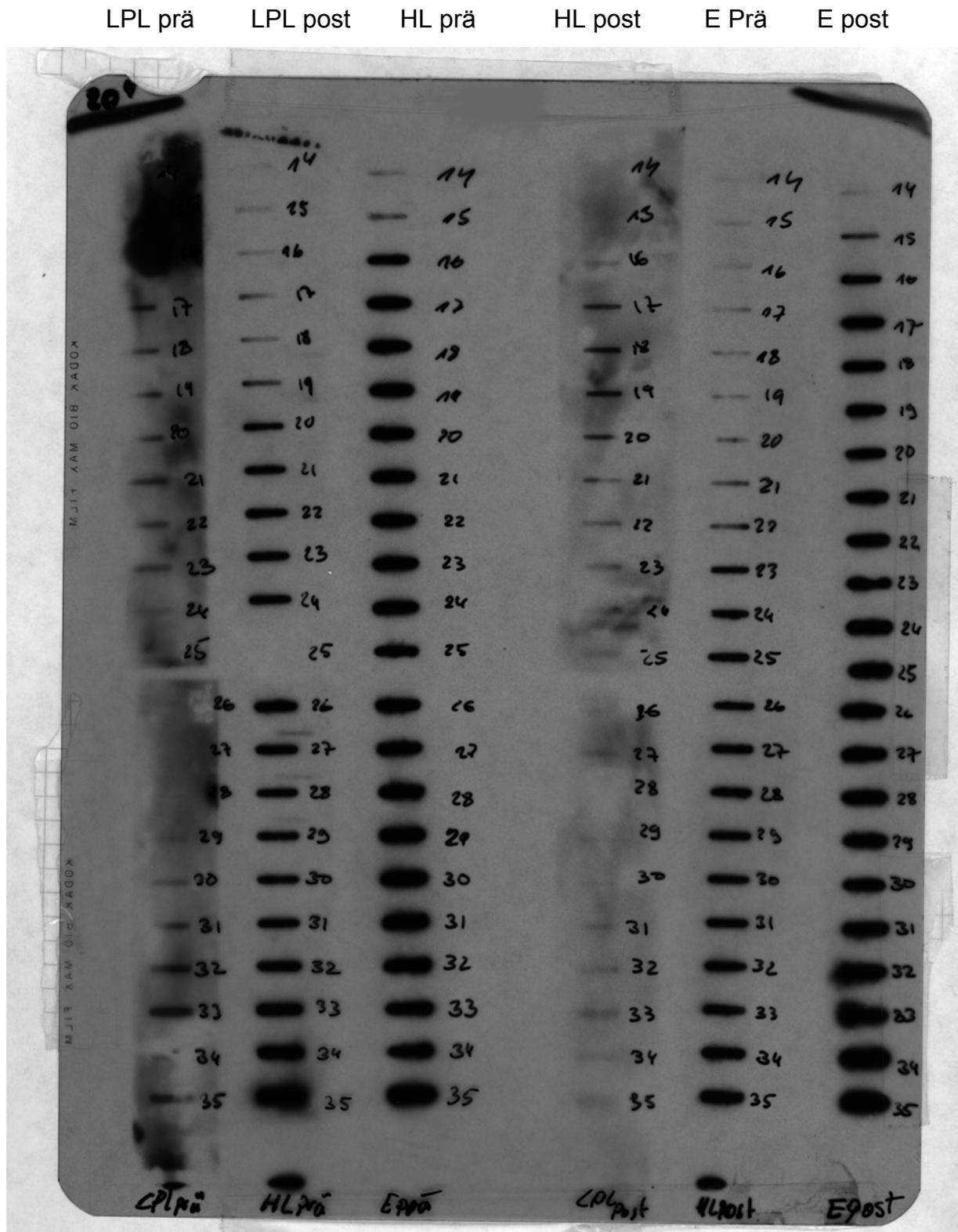
LPL prä LPL post HL prä HL post E Prä E post



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 15 Apo E 2/2

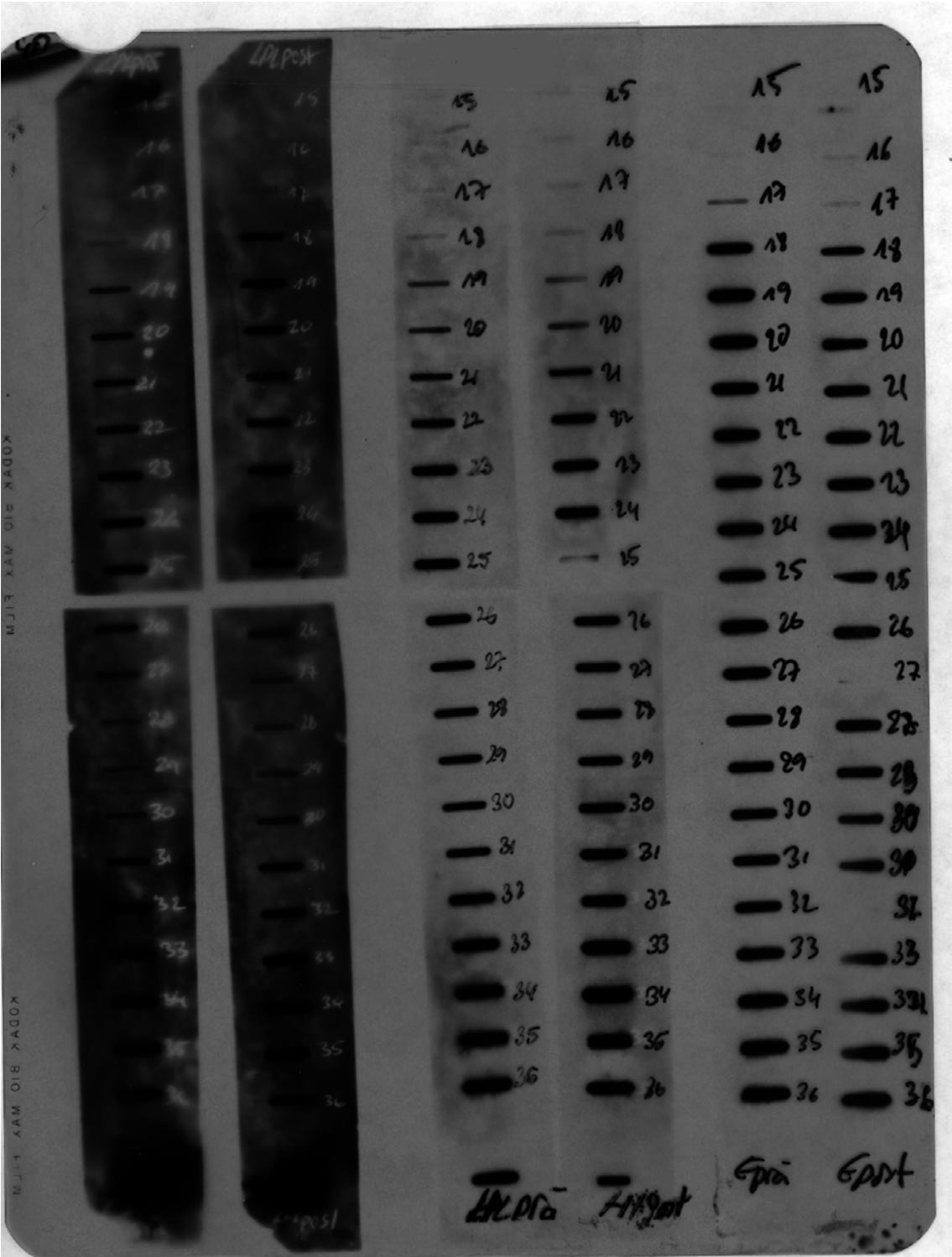


Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

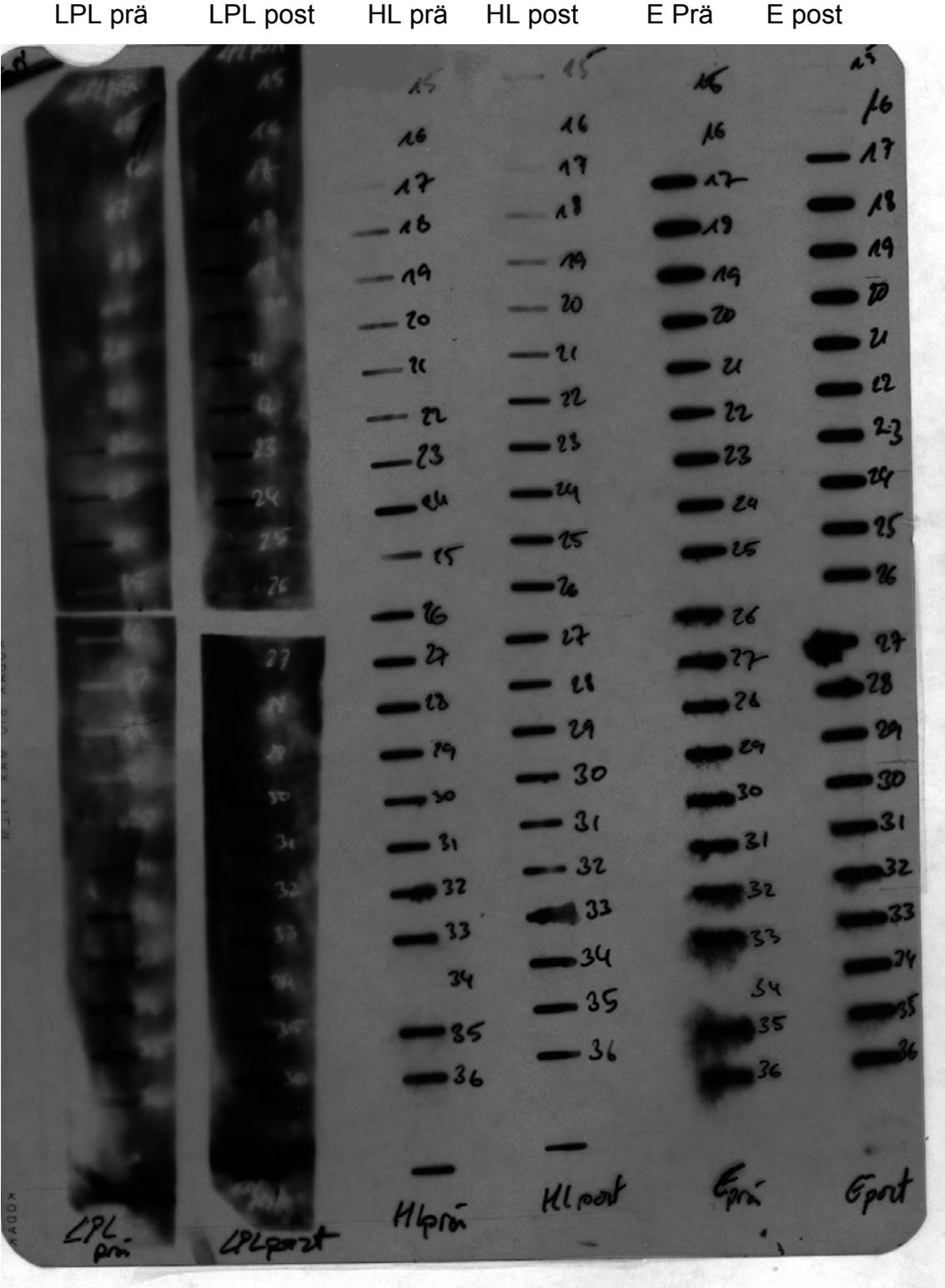
Proband 16 Apo E 2/2

LPL prä    LPL post    HL prä    HL post    E Prä    E post



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.  
 VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

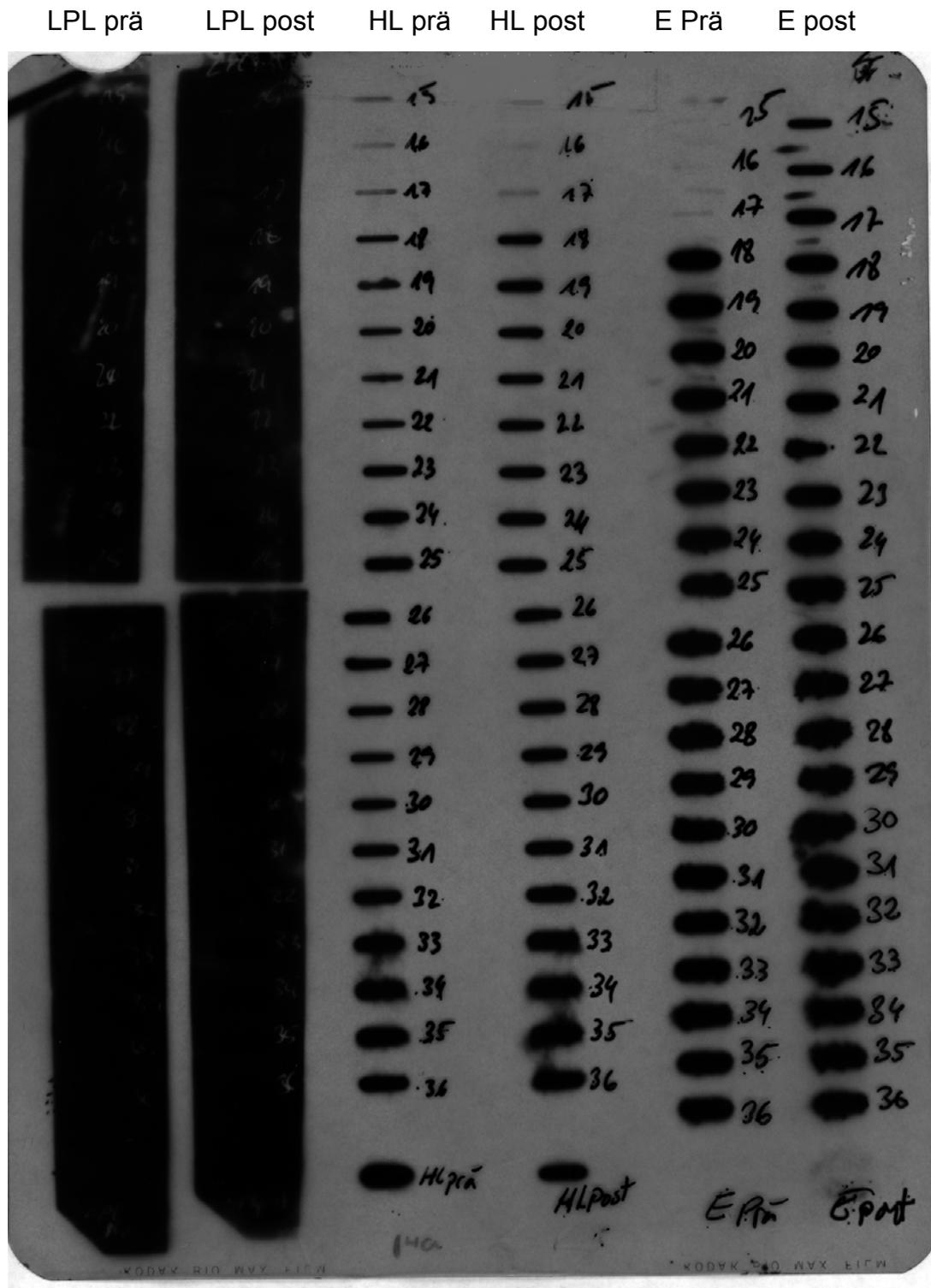
Proband 18 Apo E 2/2



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

Proband 19 Apo E 2/2



Verteilung von HL, LPL und Apo E in den Lipoproteinklassen zwischen Plasmafraktionen 15 und 36 nach der Gelfiltration in Prä- und Postheparin- Plasma.

VLDL; Fraktionen 15-17, LDL; Fraktionen 24-26 und HDL; Fraktionen 32-34.

## Abkürzungen

AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronenremnant
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
HDL	High Density Lipoprotein
HL	hepatische Lipase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
LPL	Lipoprotein Lipase
LDL	Low Density Lipoprotein
PL	Pankraslipase
THL	Tetrahydrolipstatin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Beisiegel für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Nico Dornarski danke ich herzlich für ihre hervorragende Beratung und Unterstützung. Mein Dank gilt auch an allen Mitarbeitern des Biochemischen Labors, die mir die Arbeit durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit erleichtert haben.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Gunter Schmidt, Dr. Susanne Wegener und Sebastian Jeßberger für die Hilfe bei der Lösung statistischer und graphischer Probleme.

Meiner Mutter danke ich, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich ständig unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich bei Axel Neu für die wertvollen Anregungen und Beratungen sowie liebevolle Unterstützung und Geduld in den letzten Jahren bedanken.

## **Curriculum Vitae**

Name: Mahtab Bazargan  
Geburtsdatum: 26.06.1971  
Geburtsort: Teheran  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Ausbildung:**

1977-1981 Grundschule, Teheran  
1981-1985 Gymnasium, Teheran  
1986-1992 Lohmühlen-Gymnasium, Hamburg  
1992-1993 Ausbildung zur medizinisch-technischen  
Radiologieassistentin am AK St. Georg, Hamburg  
1993-2000 Studium der Medizin an der Universität Hamburg  
1998-1999 Dissertation bei Prof. Ulrike Beisiegel, Biochemisches  
Stoffwechsellabor des Universitätsklinikum Eppendorf in  
Hamburg mit dem Thema: "Untersuchung zur Assoziation  
der hepatischen Lipase an Lipoproteine in Abhängigkeit  
des Apo E- Genotyps  
November 2000 Ärztliche Prüfung

### **Beruflicher Werdegang**

Seit Dezember 2000 Ärztin im Praktikum, Abteilung für Gynäkologie  
Marienkrankenhaus, Lübeck

## **Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Mahtab Bazargan