

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

Differentielle Analyse des HDL-Proteoms mittels Massenspektrometrie

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jürgen Thomas Lichtenstein

aus Aachen

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am:

22.09.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuß, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Dr. h.c. U. Beisiegel

Prüfungsausschuß: 2. Gutachter/in:

PD Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuß: 3. Gutachter/in:

Prof. Dr. H. Schlüter

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. ZIEL DER ARBEIT	5
2. EINLEITUNG	6
2.1 BEDEUTUNG UND ZUSAMMENSETZUNG DER LIPOPROTEINE.....	6
2.1.1 Apolipoproteine und wichtige Interaktionspartner des Lipidstoffwechsels	7
2.1.2 HDL-Subklassen.....	10
2.1.3 HDL-Proteomanalytik.....	12
2.2 STOFFWECHSELWEG DER LIPIDE	13
2.2.1 Der exogene Stoffwechsel der Lipide.....	13
2.2.2 Der endogene Stoffwechsel der Lipoproteine	15
2.2.3 Reverser Cholesterintransport	16
2.2.4 Apo E-Recycling und dessen Bedeutung für HDL und Chylomikronen ..	16
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 GERÄTE.....	19
3.2 CHEMIKALIEN	20
3.3 VERBRAUCHSMATERIAL	20
3.4 METHODIK	20
3.4.1 Probanden, Blutentnahme und Plasmagewinnung.....	20
3.4.2 Isolation des Lipidanteils durch die präparative Ultrazentrifuge.....	21
3.4.3 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) zur Abtrennung der HDL- Fraktion mit HDL-Subklassen	21
3.4.4 Charakterisierung der FPLC-Fraktionen	22
3.4.5 Separation der HDL ₂ und HDL ₃ -Proteine durch 2D-SDS-PAGE.....	23
3.4.6 MALDI-ToF Analyse	26
4. ERGEBNISSE	29
4.1 GEWINNUNG PRÄ- UND POSTPRANDIALER PLASMAPROBEN	29
4.2 ISOLATION DES LIPIDANTEILS DURCH DIE PRÄPARATIVE ULTRAZENTRIFUGE].....	30
4.3 FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY ZUR ABTRENNUNG DER HDL-FRAKTION MIT HDL-SUBKLASSEN	30
4.3.1 Charakterisierung der FPLC-Fraktionen	30

4.3.2	<i>HDL-Subklassen-Identifikation</i>	33
4.4	SEPARATION DER HDL ₂ UND HDL ₃ -PROTEINE DURCH 2D-SDS-PAGE.....	33
4.5	MALDI-TOF ANALYSE	35
4.5.1	<i>Auswertung</i>	38
4.5.2	<i>Differentielle Analyse des Proteoms der HDL</i>	42
5.	DISKUSSION	43
5.1	PLASMAPROBEN.....	43
5.2	ISOLATION DES LIPIDANTEILS DURCH DIE PRÄPARATIVE ULTRAZENTRIFUGE (UZ) 43	
5.3	FAST PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY ZUR ABTRENNUNG DER HDL-FRAKTION MIT HDL-SUBKLASSEN	45
5.4	SEPARATION DER PROTEINE DER HDL ₂ UND HDL ₃ DURCH 2D-SDS-PAGE	45
5.5	MASSENSPEKTROMETRISCHE DETEKTION DER PEPTIDE NACH TRYPSINVERDAUUNG DER PROTEINE.....	45
5.6	PROTEINE	46
5.6.1	<i>Apo A-I</i>	46
5.6.2	<i>Apo A-IV</i>	47
5.6.3	<i>Apo A-II, C-II und Apo C-III</i>	47
5.6.4	<i>Apo C-I</i>	48
5.6.5	<i>Apo E</i>	48
5.6.6	<i>α-1-Antitrypsin</i>	49
5.7	DIFFERENTIELLE ANALYSE DES PROTEOMS DER HDL.....	49
6.	ZUSAMMENFASSUNG	51
7.	LITERATURVERZEICHNIS	52
8.	ANHANG	56
	DANKSAGUNG	73
	LEBENS LAUF	74
	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG.....	75

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
ABCA1	ATP-binding-casette-transporter A1
ACN	Acetonitril
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Apo	Apolipoprotein
BPB	Bromphenolblau
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino] -propansulfate
Chol	Cholesterin
CM	Chylomikronen
CMR	Chylomikronen-Remnants
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Endothelständige Lipase
ELISA	Enzyme-linked Immosorbent Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSW	Fettstoffwechsel
HDL	High Density Lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
IAA	Iodacetamid
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH Gradient
KBr	Kalium Bromid
kcal	Kilo Kalorien

kDa	Kilo Dalton
LCAT	Lecithin Cholesterin Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	LDL-Receptor
LP	Lipoproteine
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDLR-Related Protein
NaCl	Natriumchlorid
MALDI-(ToF)	Matrix assisted Laser Ionization – Time of Flight
pI	isoelektrischer Punkt
PL	Phospholipide
PLTP	Phospholipid Transferprotein
SDS-Page	Sodium (Natrium)-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SR-B1	Scavenger Receptor-B1
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Triglyceride
TRL	Triglyceridreiche Lipoproteine
Tris	tris-(Hydroxymethyl) aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. Ziel der Arbeit

Lipoproteine sind Partikel aus Lipiden und Proteinen, die aus einem unpolaren Kern und einer Hülle aus Apolipoproteinen, Phospholipiden und unverestertem Cholesterin bestehen. Verschiedene Lipoproteinklassen vermitteln den Transport von Cholesterin und Triglyzeriden zur Versorgung der Gewebe. Diese Lipoproteine sind jedoch keine starren Einheiten, sondern unterliegen einem kontinuierlichen Austausch von Lipiden und Proteinen. Viele Bereiche des Lipoproteinstoffwechsels konnten in den letzten Jahren detailliert auf molekularer Ebene beschrieben werden. Doch aufgrund der Komplexität der interagierenden Partikel ist es immer nur möglich kleine Ausschnitte bestimmter Stoffwechselschritte zu betrachten. In der molekularen Zellbiologie ist man dagegen häufig mit der Problematik konfrontiert, große Mengen an Proteinen beschreiben zu müssen, bzw. aus einer großen Anzahl an Proteinen einzelne Eiweiße zu identifizieren. Hier hat sich die Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie zur Analyse bewährt.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist es nun, dieses Verfahren auf die Charakterisierung des Proteoms der HDL zu übertragen. Mit dieser Methode sollten sämtliche HDL-Apolipoproteine nachgewiesen werden. Es sollen dabei die HDL-Subgruppen HDL₂ und HDL₃ isoliert betrachtet werden, weil es sich immer deutlicher abzeichnet, dass es gerade auf die Protein-Zusammensetzung der Subgruppen ankommt, wenn man HDL als prognostischen Faktor im Bezug zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques heranziehen möchte. Darauf aufbauend soll das HDL-Subgruppen-Proteom im Rahmen nutritiver Einflüsse betrachtet werden, da verschiedene Apolipoproteine der HDL im postprandialen Fettstoffwechsel ausgetauscht werden.

2. Einleitung

2.1 Bedeutung und Zusammensetzung der Lipoproteine

Lipide sind essentielle Bestandteile eines jeden Organismus. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften vermag der Körper ein Maximum an Energie auf kleinstem Raum zu konzentrieren, da zusammen mit den Lipiden nur sehr wenig Wasser eingelagert wird. Gleichzeitig stellt diese herausragende Eigenschaft besondere Anforderungen an den Transport im hydrophilen Medium Blut. Bezogen auf ihre Wasserlöslichkeit, unterscheidet man amphiphile von hydrophoben Lipiden. Fettsäuren, Phospholipide und Cholesterin zählen zu den Amphiphilen, Cholesterinester und Triglyceride zu den Hydrophoben. Die Fettsäuren binden an Albumin, wogegen Phospholipide zusammen mit spezifischen Proteinen amphipathische Komplexe bilden, die den Transport der übrigen Lipide vermitteln. Die besondere Eigenschaft der Proteine basiert auf ihrer Zusammensetzung aus einer hydrophilen sowie einer hydrophoben Domäne. So stellen sie einen Emulgator für die wasserunlöslichen Lipide dar. Diese Proteine werden als Apolipoproteine, der Protein-Lipid-Komplex als Lipoprotein bezeichnet. Die Lipoproteine bilden jedoch keine homogene Klasse. Vielmehr sind sie eine Substanzgruppe, deren Vielfältigkeit man gerade erst beginnt zu verstehen. Die erste und nach wie vor gültige Unterteilung richtet sich nach ihrem Flotationsverhalten in der präparativen Ultrazentrifuge. Durch diese lassen sich die Lipoproteine anhand ihrer unterschiedlichen Dichte auftrennen. So differenziert man insgesamt fünf verschiedene Klassen [1]. Eine Übersicht der Lipoproteine ist in Tab. 2.1 dargestellt. Neben dieser Einteilung ist das elektrophoretische Migrationsverhalten sowie die Apolipoproteinkomposition Grundlage weiterer Einteilungen [2, 3].

Tab. 2.1: Lipoproteine

Name	Dichte (δ =g/ml)	Größe (\varnothing =nm)	Dominantes Apolipoprotein	Funktion
Chylomikronen	<0,96	75-1200	Apo B ₄₈	Exogene Lipide
VLDL	0,96-1,006	30-80	Apo B ₁₀₀	Endogene Lipide
IDL	1,006-1,019	25-35	Apo B ₁₀₀	Endogene Lipide
LDL	1,019-1,063	18-25	Apo B ₁₀₀	Endogene Lipide
HDL	1,063-1,21	4-13	Apo A-I	Reverser Cholesterintransport
VHDL*	≈1,23	<7	Apo A-I	Reverser Cholesterintransport

*VHDL zählen nicht zu den klassischen Lipoproteinen.

Die Chylomikronen zeichnen sich durch die größte räumliche Ausdehnung sowie die geringste Dichte aus. Sie werden ausschließlich im Darm gebildet und dort mit Triglyceriden und Cholesterin aus der Nahrung beladen. Anschließend werden sie in die Lymphe des Darms sezerniert. Dementsprechend sind Chylomikronen reich an Triglyceriden und Cholesterin, worauf ihre geringe Dichte zurückzuführen ist. Der Stoffwechsel der Chylomikronen wird auch als exogener Fettstoffwechsel bezeichnet, da die Nahrungslipide über die Chylomikronen transportiert werden. Die nächst dichtere Klasse sind die Very Low Density Lipoproteins (VLDL), die in ihrer Zusammensetzung den Chylomikronen ähneln aber in der Leber gebildet werden. Es folgen zwei weitere Klassen, die durch den Abbau der VLDL entstehen. Sie heißen ihrer Dichte entsprechend Intermediate Density Lipoproteins (IDL) und Low Density Lipoproteins (LDL). Die VLDL, IDL und LDL sind Grundlage des endogenen Fettstoffwechsels, also dem Stoffwechselweg der endogen – durch die Leber – gebildeten Lipide. Schlussendlich bilden die High Density Lipoproteins (HDL) die kleinsten und dichtesten Lipoproteine. Sie spielen im Rahmen des Fettstoffwechsels eine besondere Rolle, da sie den reversen Cholesterintransport vermitteln. Das bedeutet, daß sie nicht wie die anderen Lipoproteine für die Versorgung einer Zielzelle mit Lipiden zuständig sind, sondern überschüssiges Cholesterin aus der Peripherie abtransportieren.

2.1.1 Apolipoproteine und wichtige Interaktionspartner des Lipidstoffwechsels

Form und Funktion der Lipoproteine werden hauptsächlich durch die jeweiligen Apolipoproteine bestimmt. Diese bilden zum einen die räumliche Grundstruktur der Lipoproteine, zum anderen sind sie für die Interaktion mit Enzymen und Rezeptoren verantwortlich. In Tab. 2.2 sind die wichtigsten und für diese Arbeit relevanten Apolipoproteine mit Hauptfunktion zusammengefaßt.

Tab. 2.2: Apolipoproteine

Apolipoprotein	Masse (kDa)	Vorkommen	Funktion
Apo A-I	28,4	HDL, Chylomikronen, VLDL	Strukturprotein; LCAT -Aktivator
Apo A-II	8,7	HDL, Chylomikronen, VLDL,	Unklar; pot. A-I-Antagonist
Apo A-IV	46	HDL, Chylomikronen	Unklar; atheroprotektiv; pot. Veränderung des Sättigungsgefühls
Apo A-V	39	HDL, Chylomikronen, VLDL	Regulation des TRL-Spiegels
Apo B₄₈	265	Chylomikronen	Strukturprotein
Apo B₁₀₀	550	VLDL, IDL, LDL	Strukturprotein und Bindung an LDL-R
Apo C-I	6,5	HDL, Chylomikronen, VLDL,	Hemmung der Bindung an LDL-R & LRP; LCAT-Aktivierung
Apo C-II	8,8	HDL, Chylomikronen, VLDL,	LPL-Aktivierung
Apo C-III	8,8	HDL, Chylomikronen, VLDL,	LPL-Inhibition
Apo C-IV	16	VLDL	Regulation der Triglyceride
Apo D	33	HDL	Cholesterin-Bindung,
Apo E	34	HDL und Chylomikronen	LDL-R und HL-Bindung
Apo F (LTIP*)	35	HDL	CETP-Inhibition
Apo H	44	Chylomikronen	Antigen für Cardiolipin+ Apo E-R+ Antiphospholipid-Antikörper
Apo J (Clusterin)	2x35-39	HDL	Apoptose, Lipidhomöostase,
Apo L (1)	42	HDL	Korrelation ↑ zu TRL, toxische Wirkung auf Trypanosomen
Apo M	26	HDL, Chylomikronen, VLDL + LDL	Prebeta-HDL Bildung, potentiell atheroprotektive Wirkung

*lipid transfer inhibitor protein

Das Apolipoprotein (Apo) A-I bildet die räumliche Grundstruktur der HDL. Im Falle der naszenten HDL bestehen sie sogar gänzlich aus einem einzigen Molekül Apo A-I. Neben dieser physikalischen Funktion aktiviert es die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und induziert den Efflux von Cholesterin an Zellmembranen [4]. Apo A-I wird vorwiegend in Leber und Darm gebildet, und dort in Form der naszenten HDL oder an Chylomikronen gebunden sezerniert. Homozygote Defekte des Apo A-I führen zu erniedrigten HDL-Spiegeln und damit zu einer Erhöhung des Risikos an Atherosklerose zu erkranken. Als partieller Gegenspieler des Apo A-I ist das Apo A-II zu nennen, daß aber nicht auf allen HDL gefunden wird (s. 2.1.2). Die genaue Funktion des Apo A-II ist noch umstritten, jedoch weiß man, daß die Konzentration an Apo A-II-haltigen HDL mit der Entwicklung koronarer Erkrankungen korreliert [5, 6]. Auf dieser Entdeckung beruhen die Bemühungen die Bestimmung des HDL-Spiegels als atherosklerotischen Risikomarker durch entsprechende Auswertungen des Apo A-I/Apo A-II-Verhältnisses zu

ergänzen [5]. Neben diesen beiden Apo A-Proteinen kennt man noch zwei weitere Proteine der Gruppe A, die auch beide innerhalb der HDL-Klasse gefunden werden. Das Apo A-IV wird vorwiegend im Dünndarm mit den Chylomikronen sezerniert und gilt als atheroprotektiver Faktor [7]. Zusätzlich wird eine regulatorische Funktion im Rahmen des Sättigungsgefühls diskutiert [8, 9]. Das Apo A-V korreliert positiv mit der plasmatischen Hydrolyse triglyceridreicher Lipoproteine (TRL), und ist ein noch relativ junges Mitglied der Apolipoprotein-Familie [10]. Die Gruppe C der Apolipoproteine besteht aus insgesamt vier Proteinen. Zum einen das Apo C-II als essentieller Kofaktor der Lipoproteinlipase (LPL) [11]. Im Gegensatz zu Apo C-II stehen die anderen Apo C-Formen der Lipolyse entgegen. So hemmt das Apo C-III direkt die LPL [12], das Apo C-I zudem noch die LCAT. Das Apo C-IV findet sich vorwiegend auf den VLDL, und spielt daher in diesem Zusammenhang keine Rolle. Das Apo D wird in der Literatur als Marker für verschiedene Tumoren sowie in Verbindung mit Schizophrenie erwähnt, die Rolle im Lipidhaushalt ist jedoch nicht geklärt, außer daß es wohl an Cholesterin bindet. Das Apo E dagegen ist eines der bekanntesten und wichtigsten Apolipoproteine, nicht nur für die HDL. Es bindet an Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Familie, wodurch der Abbau der Chylomikronen und VLDL ermöglicht wird (s. entsprechende Kapitel). Man kennt drei Hauptisoformen des Apo E: Apo E₂, Apo E₃ und Apo E₄. Unter Kaukasiern ist die Allelfrequenz des E₃ mit ca. 70% am höchsten. Die Isotypen unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Rezeptoren, woraus sich vielfältige Konsequenzen ergeben. Dieser Umstand ist ein zentrales Thema der Lipidforschung und kann an dieser Stelle nur unzureichend erfaßt werden. Im Kern beläuft sich die Bedeutung des Isotyps auf das gehäufte Auftreten atherosklerotischer Erkrankungen bei Apo E₂ und Apo E₄ sowie des M. Alzheimer unter dem Isotyp E₄ [14]. Das Apo F oder auch Lipid transfer inhibitor Protein (LTIP) unterdrückt, wie der Name schon andeutet, den Transfer von Cholesterin zwischen den HDL und anderen Lipoproteinen [15]. Dem Apo H kommt eine untergeordnete Rolle im Lipidhaushalt zu, doch hat es in letzter Zeit als Tumormarker in der Onkologie das Interesse der Wissenschaft geweckt. Außerdem ist es Hauptangriffspunkt der Antikörper des Antiphospholipid-Syndroms [16]. Da in den letzten Jahren die immunologische Relevanz der HDL immer deutlicher wird, könnte sich hier zukünftig eine Querverbindung ergeben. Auch das Apo J oder auch Clusterin genannt, spielt eine Rolle in der onkologischen Forschung, und zwar im Rahmen der Apoptose-Induktion. Man hat aber erst vor Kurzem mit der Erforschung dieser Funktion begonnen [17]. Außerdem bringt man es mit dem M. Alzheimer in Verbindung [18]. Im Rahmen des Lipidstoffwechsels diskutiert man eine potentielle Induktion des Cholesterin-

effluxes aus Makrophagen [19]. Das Apo L(1) ist in seiner Funktion noch nicht verstanden worden, jedoch weiß man, daß eine positive Korrelation zwischen Apo L(1) und dem Spiegel plasmatischer Triglyceride besteht [20]. Wiederum zeigt sich anhand dieses Proteins in neueren Studien, daß ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und den HDL besteht. So ließ sich nachweisen, daß eine Infektion durch Trypanosomen ausschließlich durch die Anwesenheit von Apo L1-haltigen HDL bekämpft werden kann. Apo L(1) wirkt direkt toxisch auf Trypanosomen [21]. Das Apo M ist eines der jüngsten Mitglieder der Familie der Apolipoproteine. Die genaue Funktionsweise ist bisher nicht bekannt, jedoch weiß man, daß es an Megalin, einen Rezeptor der LDL-R-Gruppe, bindet und daß es bei Überexpression zu einem verminderten Auftreten von Atherosklerose kommt [22].

Die für den Stoffwechsel der HDL relevanten Interaktionspartner (Transferproteine, Rezeptoren, Lipasen) sind in Tab. 2.3 aufgeführt. Die Bedeutung dieser Proteine wird im Rahmen der Schilderung des Stoffwechsels der Lipoproteine im weiteren Verlauf erläutert.

Tab. 2.3: Transferproteine, Rezeptoren und Lipasen

	Masse (kDa)	Vorkommen	Interaktion mit	Funktion
LCAT	68	Plasma	Apo A-I,	Cholesterinveresterung
CETP	74	Plasma	Apo A-I, Apo B _x	Cholesterin gegen Triglycerid Austausch
PLTP	81	Plasma	Apo A-I, Apo B _x	Protein und Phospholipidtransfer
LDL-R	85	Zellmembranen	Apo B ₁₀₀ , Apo E, RAP	LDL, VLDL und Chylomikronen Abbau
LRP1	600	Zellmembranen	Apo E, HL, LPL, Apo B ₁₀₀ , u.a.	Chylomikronen Abbau
ABCA1	248	Leber, Gehirn, Makrophagen	Apo A-I	Cholesterintransfer auf HDL
SR-B1	82	Leber, endokrine Organe	Apo A-I	Cholesterinestertransfer von HDL auf Zielzellen
LPL	54	Endothelständig	(Lipoproteinrezeptoren)	Lipidspaltung
HL	55	Vorw. hepatisch	(Lipoproteinrezeptoren)	Lipidspaltung
EL	68	Endothelständig	(Lipoproteinrezeptoren)	Spaltung von HDL-Phospholipiden

2.1.2 HDL-Subklassen

Da die HDL im Rahmen dieser Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sollen sie an dieser Stelle näher vorgestellt werden. Aufgrund der ihr zugeschriebenen atheroprotektiven Eigenschaften stehen die HDL seit Mitte der 80er Jahre im Fokus der Lipidfor-

schung. Daher weiß man mittlerweile, daß die HDL bei weitem keine homogene Gruppe von Lipidvesikeln sind. Man klassifiziert die HDL anhand unterschiedlicher Kriterien. In erster Linie ist dies die Dichte, außerdem das elektrische Migrationsverhalten, die räumliche Gestalt und die Apolipoproteinzusammensetzung. Die HDL werden als sogenannte naszente oder auch diskoidale HDL in Leber und Darm synthetisiert. In dieser Form bestehen sie aus Phospholipiden und mindestens einem Molekül Apo A-I. Stammen sie aus der Leber, so findet man zusätzlich Apo A-II und Apo E, sind sie intestinalen Ursprungs befindet sich Apo A-IV auf den HDL. Die HDL werden in einer Form ähnlich einer Scheibe sezerniert, weswegen sie auch als „diskoidal“ bezeichnet werden. In diesem Zustand lassen sie sich nicht durch die Ultrazentrifuge isolieren. Aufgrund ihrer hohen Dichte nennt man sie „Very High Density Lipoproteins“ (VHDL). Auch ihr elektrophoretisches Verhalten unterscheidet sich von dem der anderen HDL – sie migrieren in der prä- β -Bande. Durch die LCAT und Cholesterinester Transferprotein (CETP)-vermittelte Interaktion mit anderen Lipoproteinen, sowie die über ATP-binding-cassette-transporter A1 (ABCA1) und Scavenger Receptor-B1 (SR-B1)-vermittelte Interaktion mit peripheren Zellen, kommt es zur Akkumulation von Cholesterinestern und Cholesterin. Dadurch dehnen sich die VHDL aus und verlieren ihre Scheibenform zugunsten einer kugelähnlichen Gestalt. Daher werden sie nun als „spheroidale“ (kugelförmige) HDL bezeichnet. Aufgrund des höheren Lipidgehaltes ändern sich zusätzlich die Dichte und das elektrophoretische Verhalten. Aus den (prä- β -) VHDL sind (α -) HDL geworden. Innerhalb der Dichteklasse der HDL vollzieht sich der Prozeß der Akkumulation von Cholesterin und Cholesterinestern weiter. Daher unterscheidet man innerhalb der α -HDL zwischen HDL₃, HDL₂ und HDL₁. Die HDL₃ sind die dichtere und kleinere Form, welche direkt aus den VHDL entsteht. Aus den HDL₃ bilden sich die HDL₂. Diese beiden HDL-Varianten lassen sich durch die präparative Ultrazentrifuge nachweisen und bilden die „klassische“ Variante der HDL. Die HDL₁ stellen eine kleine Population leicht größerer HDL dar, die besonders Apo E-haltig sind und daher auch als HDL_E bezeichnet werden. Neben dieser physikochemisch orientierten Einteilung existiert zusätzlich die Klassifikation anhand der Apolipoproteinzusammensetzung. Hier werden in erster Linie HDL mit Apo A-II von HDL ohne Apo A-II unterschieden. Über die physiologische bzw. klinische Bedeutung dieser Unterteilung herrscht nach wie vor Uneinigkeit [6]. Jedoch scheint sich abzuzeichnen, daß eine einfache Bestimmung des HDL-Spiegels zur Risikoabschätzung einer atherogenen Erkrankung in Zukunft durch eine differenziertere Erhebung des HDL-Profiles abgelöst werden wird [5].

2.1.3 HDL-Proteomanalytik

Möchte man die Funktion der HDL verstehen, ist es zwingend notwendig sich mit der Zusammensetzung und Physiologie des Proteinanteils der HDL auseinanderzusetzen. Diese Proteine dienen nicht ausschließlich der Bereitstellung eines emulsionsvermittelnden Substrates, auch wenn das ein essentieller Bestandteil ihrer Funktion ist. Ihre Bedeutung geht weit über diese rein physikalische Funktion hinaus. Jegliche Interaktion der HDL mit anderen Komponenten des Lipidhaushaltes ist direkt abhängig von der Funktionalität der Apolipoproteine. So wird die Bindung an Enzyme wie LCAT oder CETP aber auch an die Rezeptoren ABCA1 und SR-B1 über entsprechende Apolipoproteine vermittelt. Die Apolipoproteine können aber auch als Kofaktoren dienen, ohne die die entsprechenden Enzyme nicht ausreichend tätig werden. Abgesehen von diesen, ausschließlich den Lipidmetabolismus betreffenden Eigenschaften, gibt es eindeutige Belege, daß über die Proteine der HDL weitere Prozesse vermittelt werden. In erster Linie ist hier die antiinflammatorische und antioxidative Potenz der HDL zu nennen. Bereits 1979 konnte gezeigt werden, daß HDL die Zytotoxizität von LDL-Partikeln verringern können [23]. Mittlerweile gibt es Anhaltspunkte, daß die HDL an unterschiedlichsten Stellen die Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen hemmen [24]. Für diese Eigenschaften sind zum einen die Apolipoproteine selbst verantwortlich, zusätzlich hat man aber immer wieder Proteine des Immunhaushaltes mit den HDL assoziiert vorgefunden [25]. Diese Belege für eine direkte immunmodulatorische Wirkung der HDL machen die Untersuchung der genauen Zusammensetzung der HDL immer interessanter. Erst durch ein besseres Verständnis des tatsächlichen Aufbaus der HDL wird es möglich sein, das volle diagnostische und therapeutische Potential der HDL auszuschöpfen. Die geläufigste Methode um den Proteinanteil der HDL zu untersuchen, besteht darin, die isolierten Proteine elektrophoretisch aufzutrennen und anschließend mittels Westernblot zu identifizieren. Der große Nachteil dieser Methode ist, daß immer nur nach einer begrenzten Anzahl von Proteinen gesucht werden kann. Würde man beispielsweise die Proteinexpression einer Zelle beschreiben wollen, stößt man mit dieser Technik schnell an seine Grenzen. Aus diesem Grunde setzt man seit einiger Zeit bei einer solchen Proteinuntersuchung eine völlig andere Technik mit großem Erfolg ein – die Massenspektrometrie nach der elektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemisches. Diese Technik ist so erfolgreich, da sie mit einem relativ kurzen Versuchsablauf die Suche nach allen bekannten Proteinen ermöglicht. Dies ist seit einigen Jahren auch in kleineren Labors durch die Leistungsfähigkeit moderner Rechensysteme möglich. Gerade im Rahmen der Analyse der Genexpression einer Zelle

ist diese Technik unverzichtbar geworden. Durch die Erfahrungen aus der Zellforschung ermutigt, beginnt man nun die, auch als Proteomik bezeichnete, Technik auf andere Bereiche als die reine Zellforschung auszudehnen. Insbesondere im Hinblick auf die HDL-Forschung verspricht die Massenspektrometrie einen tieferen Einblick in die Komposition und damit auch Funktion der HDL. Ein eindrucksvolles Beispiel für das Potential dieser Technik lieferten Vaisar et. al in ihrer Arbeit über das antiinflammatorische Potential der HDL [26].

2.2 Stoffwechselweg der Lipide

Nachdem im ersten Teil dieser Einleitung die Klassen der Lipoproteine mit einem Schwerpunkt auf den HDL vorgestellt wurden, sollen im folgenden Kapitel die für diese Arbeit relevanten Stoffwechselwege der durch die Lipoproteine transportierten Lipide erläutert werden. Grundsätzlich unterteilt man drei große Bereiche des Lipidstoffwechsels. Der Erste beschreibt den Weg der durch die Nahrung aufgenommenen Lipide vom Darm zur Leber. Dieser wird als der exogene Lipidstoffwechsel bezeichnet. Im zweiten Bereich werden die Transportvorgänge der über die Leber umgesetzten Lipide zu den peripheren Geweben zusammengefaßt. Diesen nennt man den endogenen Lipidstoffwechsel. Der dritte Bereich befaßt sich mit dem Rücktransport überflüssigen Cholesterins aus der Peripherie zurück zur Leber. Diese „Wiederverwertung“ bezeichnet man als den reversen Cholesterintransport. Da der endogene Weg für das Verständnis dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung ist, soll er hier nur kurz skizziert werden.

2.2.1 Der exogene Stoffwechsel der Lipide

Den exogenen Stoffwechsel der Lipide kann man in zwei Hauptbereiche unterteilen. Der Eine besteht aus der eigentlichen Nahrungsaufnahme der Lipide und dem Weg bis zur Resorption durch die Enterozyten des Dünndarms. Der Andere setzt sich dann durch die Prozessierung der Lipide in den Enterozyten und dem Transport der Lipide im Blut zur Leber fort. Mit der Aufnahme der Lipide in die Hepatozyten endet der exogene Lipidstoffwechsel.

Werden lipophile Substanzen wie Cholesterin, Phospholipide, Triglyceride und fettlösliche Vitamine durch die Nahrung aufgenommen, bilden diese spontan Fettröpfchen, da sie als hydrophobe Substanzen nicht in dem hydrophilen Milieu des Magens in Lösung gehen können. In dieser Form werden sie auch nicht durch die Enterozyten aufgenommen. Erst in Verbindung mit den Gallensäuren bilden die Lipide amphiphile Li-

pidmizellen. Die Nahrungslipide werden noch im Lumen des Darms durch Lipasen hydrolysiert, die Triglyceride in freie Fettsäuren, Mono- und Diglyceride sowie isoliertes Glycerin gespalten. Fettsäuren, Cholesterin, Monoglyceride sowie Glycerin werden über verschiedene Transportsysteme von den Enterozyten resorbiert. Innerhalb des glatten endoplasmatischen Retikulums der Enterozyten werden aus den Fettsäuren wieder Triglyceride gebildet. In das glatte endoplasmatische Retikulum wird Apo B₄₈ (als Strukturproteine), Apo A-I und Apo A-IV aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum übertragen, an das sich die Triglyceride binden. Zusammen mit Phospholipiden und Cholesterin formen sich daraus die Chylomikronen. Diese werden von den Enterozyten in die Lymphe des Darms, aufgrund seiner milchartigen Konsistenz auch Chylus (gr=Milchsaft) genannt, sezerniert. Im Gegensatz zu dem Blutfluß des Darmes mündet die Lymphe nicht in die Leberpforte, sondern wird über den Ductus Thoracicus direkt in den Körperkreislauf abgegeben [27]. Dennoch ist die Leber das Zielorgan der Chylomikronen. Während der Verweilzeit der Chylomikronen im Blutkreislauf erfahren diese Lipoproteine einige Veränderungen. Triglyceride werden aus den Chylomikronen durch die endothelständige Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert. Die dadurch freigesetzten Fettsäuren werden zum größten Teil vom Fettgewebe aufgenommen, während die Chylomikronen an Größe verlieren. Erst ab einem bestimmten Durchmesser sind die Chylomikronen in der Lage, das fenestrierte Endothel der Leber zu passieren. Lösen sich die Chylomikronen im weiteren Verlauf wieder vom Endothel, verbleibt die LPL teilweise an den Chylomikronen [28]. Die LPL dient später als Ligand an der Leberoberfläche. Die kleineren Chylomikronen werden daraufhin als Chylomikronen-Remnants bezeichnet. Zusätzlich vollzieht sich intravaskulär ein zweiter entscheidender Prozeß: Wie erwähnt, werden die Chylomikronen im Darm vorwiegend mit den Apo B₄₈, A-I, und A-IV ausgestattet. Es finden sich auch andere Apolipoproteine, aber nicht in physiologisch relevanter Konzentration. Der Abbau der Chylomikronen durch die endothelständige LPL erfordert die Anwesenheit von Apo C-II, da die LPL erst durch dieses Apolipoprotein als Kofaktor hydrolytisch aktiv sein kann [29, 30]. Außerdem wird später das Apo E benötigt, damit der Abbau der Chylomikronen-Remnants in der Leber stattfindet. Das Apo E führt zu einer deutlichen Steigerung der Affinität zu LDL-R und LRP [31-35]. Diese beiden Apolipoproteine werden im Austausch gegen Triglyceride, Phospholipide, Apo A-I, Apo A-II, und Apo A-IV von den HDL aufgenommen. Dem entsprechend ändert sich postprandial die Zusammensetzung der HDL [36]. Die Interaktion zwischen Chylomikronen und HDL ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Nachdem so aus Chylomikronen die kleineren Chylomikronen-Remnants entstanden sind, kann der letzte Schritt des exogenen Lipidstoffwechsels stattfinden: Der weitere Abbau im Disse-Raum und die endgültige Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Hepatozyten siehe Abbildung 2.1.

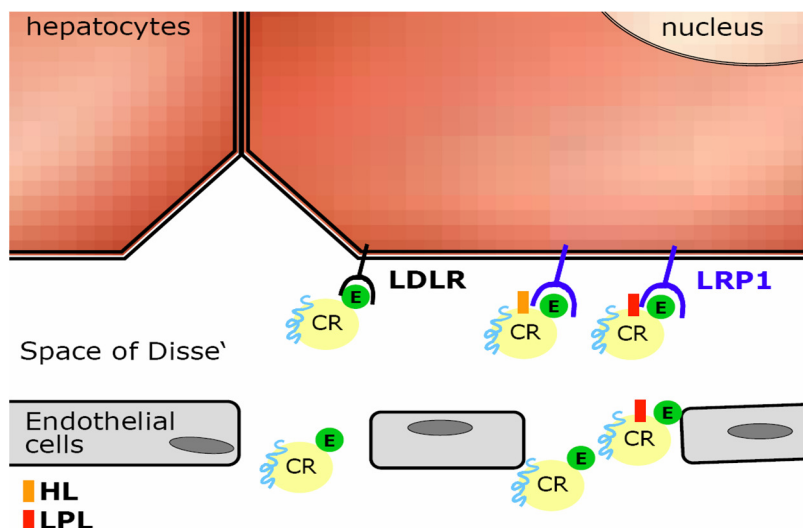


Abbildung 2.1: Chylomikronen-Remnant-Aufnahme im Disse-Raum, adaptiert nach Heeren et al. 2009.

Sind die Chylomikronen-Remnants klein genug um in den Disse-Raum eintreten zu können, werden sie über LPL, Apo E und die hepatische Lipase (HL) an Heparin-Sulfat der Oberfläche der Hepatozyten gebunden. Über diese Proteoglykane werden sie vermutlich dem LDL-receptor related protein (LRP) zugeführt [32, 33, 37-39]. Über LPL und HL erfolgt ein weiterer Abbau der Triglyceride [40-43], bis die Chylomikronen-Remnants schließlich endgültig in die Hepatozyten aufgenommen werden [44-47].

2.2.2 Der endogene Stoffwechsel der Lipoproteine

Der Ausgangspunkt des endogenen Lipidstoffwechsels ist die Synthese des Apo B₁₀₀ in der Leber. Das Apo B₁₀₀ wird im endoplasmatischen Retikulum mit Lipiden, Cholesterin und Phospholipiden beladen und durch den Golgi-Apparat als VLDL in den Disse-Raum sezerniert. Wie auch die Chylomikronen nehmen die VLDL Apolipoproteine der HDL auf. Auch der Abbau ähnelt dem der Chylomikronen, werden doch auch die VLDL über LPL und Apo E durch den LRP metabolisiert. Durch die Entfernung immer größerer Anteile von Triglyceriden gehen die VLDL fließend in die Lipoproteinklasse der IDL und später der LDL über. Die LDL werden dann zum größten Teil wieder durch die Leber über den LDL-R aufgenommen, der verbleibende Anteil dient der Versorgung peripherer Gewebe mit Cholesterin. Ca. 60% der LDL werden über den LDL-R aufge-

nommen. Diese sind aber ab einem bestimmten LDL-Spiegel gesättigt, und können keine weiteren LDL mehr abbauen. Trotzdem werden weiterhin LDL verstoffwechselt werden. Dies wird durch den „Scavenger Pathway“ ermöglicht. Dieser setzt sich aus verschiedensten Rezeptoren, unter anderem der Klasse der Scavenger Rezeptoren, zusammen. Vor allem der Scavenger-Receptor Class B1 (SR-B1) ist für den Lipidstoffwechsel der Leber von besonderer Bedeutung.

2.2.3 Reverser Cholesterintransport

Teile des reversen Cholesterintransportes wurden bereits in Kapitel 2.1.2 behandelt, da der reverse Cholesterintransport durch die HDL-Subklassen und deren Interkonversion realisiert wird. Grundlage dieses Transportweges ist, daß Cholesterin in peripheren Geweben nicht abgebaut werden kann. Daher muß überschüssiges Cholesterin wieder der Leber zugeführt werden, die Cholesterin in Form von Gallensäuren ausscheiden kann. Eine Ausnahme stellen die steroidhormon-produzierenden Gewebe und die Haut dar, die Cholesterin als Hormonsubstrat benötigen bzw. Cholesterin über abgestoßene Epidermiszellen dem Körper entziehen. HDL, insbesondere cholesterinarme HDL₃ und VHDL, induzieren Cholesterinefflux aus Zellen über den ABCA1. Die LCAT verestert diese dann zu Cholesterolestern. Über die bereits angesprochene Interaktion mit Chylomikronen und VLDL werden über das CETP Triglyceride gegen Cholesterin der HDL ausgetauscht. So nimmt die Größe der HDL weiter zu, und die Dichte weiter ab, bis sie den HDL₂ zugeordnet werden. HDL₂ können auch durch die PLTP vermittelte Übertragung von Surface-Remnants der Chylomikronen und VLDL auf bestehende HDL₃ oder durch die Fusion zweier HDL₃ entstehen [48, 49]. Das Cholesterin der HDL kann dann über verschiedene Wege weiter metabolisiert werden: SR-B1 exprimierende Zellen binden HDL und führen zu einer Abgabe von Cholesterin an diese Zellen, vorwiegend Hepatozyten und steroidsynthetisierende Zellen [50-52]. Bei der bereits erwähnten Aufnahme von Triglyceriden aus Chylomikronen und VLDL wird Cholesterin über CETP auf diese Lipoproteine übertragen [53]. In geringem Umfang hydrolysiert die Hepatische Lipase Triglyceride und Phospholipide der HDL₂, so daß HDL₃ und VLDL entstehen [54].

2.2.4 Apo E-Recycling und dessen Bedeutung für HDL und Chylomikronen

In den vorangehenden Abschnitten ist bereits mehrfach auf den Austausch von Lipiden und Proteinen zwischen den einzelnen Lipoproteinen eingegangen worden. Über die Enzyme LCAT, PLTP und CETP kann so Cholesterin aus den HDL entfernt werden,

ohne das eine Endozytose der Partikel erforderlich wäre. Mindestens ebenso bedeutend ist die Übertragung von Apolipoproteinen. Die einzeln oder in Form von „Surface Remnants“ übertragenen Proteine sind unabdingbar notwendig um die Metabolisierung der Chylomikronen und VLDL zu ermöglichen. An erster Stelle sind hier die beiden Apolipoproteine C-II und E zu nennen. Wie bereits angesprochen, erfordert die LPL die Anwesenheit des Apo C-II als Kofaktor. Das Apo E wird dagegen als Ligand für eine Bindung an den LDL-R und LRP1 benötigt. Chylomikronen werden vorwiegend durch Apo E (und in geringerem Masse über an den Chylomikronen-Remnants verbleibender LPL) über diese Rezeptoren abgebaut, der VLDL-Abbau erfolgt durch Apo E schneller, als wenn nur Apo B100 zur Verfügung steht. Mittlerweile weiß man jedoch, daß der direkte Proteintransfer von Lipoprotein zu Lipoprotein nicht der einzige Austauschpunkt ist. So konnten Rensen et al. zeigen, daß das Apo E nach der Aufnahme in Hepatozyten nicht wie andere Apolipoproteine vollständig abgebaut wird, sondern, vor allem unter der Anwesenheit lipidfreier bzw. -armer Apolipoproteine reseziert wird [55]. Dieses „Recycling“ konnten Heeren et al. nicht nur für Apo E, sondern auch für das Apo C und die LPL nachweisen [56, 57]. Bei den Untersuchungen bzgl. des Apolipoprotein-Recyclings konnte markiertes Apo E der TRL im Verlauf in der Fraktion der HDL nachgewiesen werden [57]. So schließt sich der Apolipoproteintransfer zu einem Kreislauf. Abbildung 2.2 fast den Stoffwechselweg des Apo E zusammen.

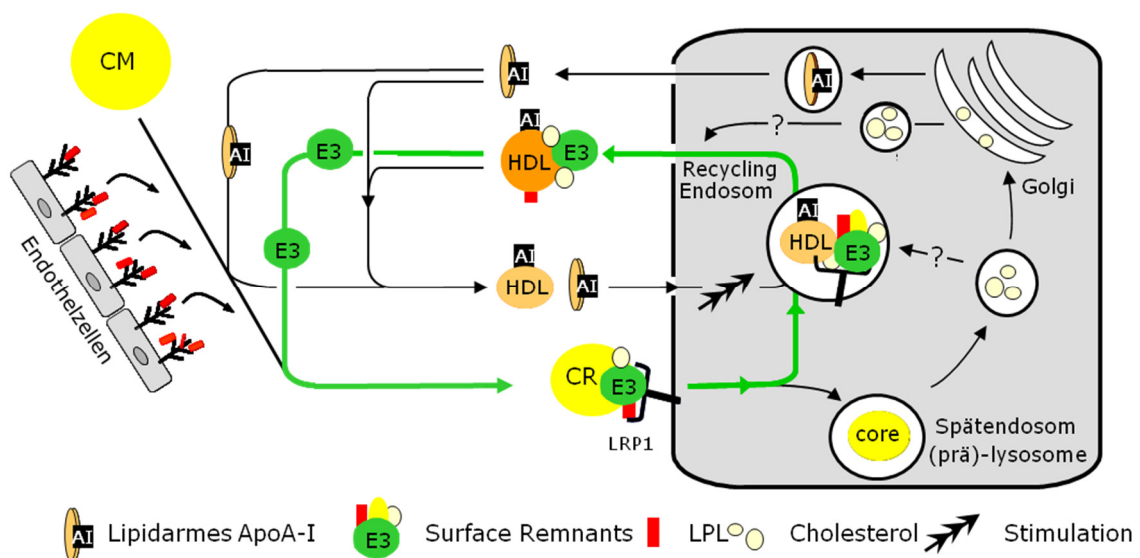


Abbildung 2.2: Apo E-Recycling in der Leber und extrazellulärer Stoffwechsel des Apo E, adaptiert nach Heeren et al. 2006. Die Chylomikronen (CM) nehmen Apo E von den naszenten HDL (A1) auf und geben im Austausch Triglyceride und andere Substanzen ab. Es entstehen Chylomikronen-Remnants (CR).

Ein besseres Verständnis des Apo E-Stoffwechsels ist Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Beeinflussung des Lipidhaushaltes. Gerade im Rahmen

der postprandialen Hypertriglyceridämie wäre eine Veränderung (Erhöhung) der Apo E-Konzentration im Disse-Raum durch erhöhtes Recycling ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden kurz und nachvollziehbar die einzelnen analytischen Verfahren, die in dieser Arbeit genutzt wurden, vorgestellt.

3.1 Geräte

- Zentrifuge „Minifuge T“ (Heraeus)
- Refraktometer „24043“ (Schmidt+Haensch)
- Wärmeschrank (Binder)
- Ultrazentrifuge „Ultracentrifuge-90“ (Beckman-Coulter)
- Zentrifugenrotor „SW32“ (Beckman-Coulter)
- Fast Protein Liquid Chromatography (Pharmacia) bestehend aus:
 - Pumpe „P-500“
 - Steuereinheit „LCC 500Plus“
 - Fraktionskollektor „Frac-100“
 - Säule „Hi-Load 16/60 Superdex 200“
- ELISA Lesegerät „MRX V 1.12“ (Dynatech Lab.)
- Drucker „LQ-300“ (Epson)
- IBM-kompatibler PC + „Excel 2003“ (Microsoft)
- Zentrifuge „1-15k“ (Sigma)
- Isoelektrische Fokussierung „IPGphor“ (Amersham Biosciences)
- Striphholder „Reswelling 24“ (Amersham Biosciences)
- Gelgußkammer „DALTtwelve Gel Caster complete“ (Amersham Biosciences)
- Zweidimensionale Gelelektrophoresekammer „DELTtwelve System“ (Amersham Biosciences) bestehend aus:
 - Separation Unit
 - Power Supply
 - Control Unit
- Thermomixer „Compact“ (Eppendorf)
- Vortexer „Reax 1 DR“ (Heidolph)
- „Ettan Spotpicker 18-1145-28“ (Amersham Biosciences)
- „Ettan Digester 18-1142-68“ (Amersham Biosciences)
- Massenspektrometer „Ettan MALDI-ToF/Pro“ (Amersham Biosciences)

3.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma Chemie (Steinheim), Roche (Freiburg) und Serva (Heidelberg) in analytischer (p.A.) oder HPLC Qualität.

3.3 Verbrauchsmaterial

Das Verbrauchsmaterial, wie Spritzen, Pipetten, Tubes, Zentrifugationsröhrchen etc. stammt von den Firmen Sarstedt, Nalge Nunc International, Eppendorf, Beckman

3.4 Methodik

3.4.1 Probanden, Blutentnahme und Plasmagewinnung

Die Probanden sind definiert durch:

- Männliches Geschlecht
- Normolipämisches Plasmaprofil (Triglyceride, Cholesterin, HDL und LDL in den Normbereichen)
- 20-40 Jahre alt
- 10-stündige Nahrungskarenz (minimaler Transport exogener Lipide)

Überprüfung des Apolipoprotein E-Isotypen um Genotypen E₂ und E₄ auszuschließen, da eine starke Assoziation zu einer Veränderung des Lipidhaushaltes bekannt ist [58, 59].

Material

- Lipidhaltige Mahlzeit pro Person (McDonald's):
- Milchshake Vanille (250 ml)
- Big Bacon & Eggs
- Bacon & Egg McMuffin
- Entspricht einem Nährwert von insgesamt 1316 kcal, bestehend aus:
- 62,5 g Fett (945 mg Cholesterin)
- 81,95 g Protein
- 36,42 g Kohlenhydrate
- Aprotinin 2,5 mg/ml in 0,9% NaCl Lösung (Sigma)
- EDTA KE Monovette (Sarstedt)
- Multiflyset (Sarstedt)

Methode

Der vorbereitete Proband wird morgens einbestellen. Unmittelbar vor der Blutentnahme erfolgt die Befüllung der EDTA-Monovette mit 100 µl Aprotininlösung. Dem Probanden wird 3 x 10 ml venöses Blut entnommen. Daraufhin erfolgt die Einnahme der lipidhaltigen Nahrung. 3 Stunden nach der Mahlzeit wird die postprandiale Blutprobe entnommen. Zur Gewinnung des Plasmas wird das Blut nach 10-minütiger Kühlung bei 4 °C für 10 Minuten bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert.

3.4.2 Isolation des Lipidanteils durch die präparative Ultrazentrifuge

Material

- 50 ml Zentrifugenröhrchen (Beckman)
- Unterschichtungskanüle
- Dichtelösung 1,21 g/ml: 0,9% NaCl, 10 mM EDTA, 327,72 g/l KBr, 10 mM Tris pH 8,6

Methode

Das Plasma wird durch das Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,22 g/ml eingestellt. Es erfolgt eine Kontrolle mittels des Refraktometers. 5 ml der Dichtelösung werden als Trennmittel in das Zentrifugenröhrchen gefüllt. Das beschwerte Plasma wird mit der Unterschichtungskanüle unter die Lösung gegeben. Für einen Zentrifugationslauf müssen je zwei gegenüberliegende Röhrchen mit einer Toleranz von 4 µg aufeinander geeicht werden. Die Zentrifugation erfolgt bei 32.000 rpm und 4 °C für 60 Stunden. Anschließend wird der lipidhaltige Überstand mit einer Pipette abgenommen.

3.4.3 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) zur Abtrennung der HDL-Fraktion mit HDL-Subklassen

Material

- FPLC-Puffer: 10 mM EDTA, 0,15 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0
Der Puffer wird mit „Filtration Products“ (NalgeNunc Products) steril gefiltert.

Methode

Je 1 ml der Lipidlösung wird der FPLC ohne weitere Modifikation zugeführt. Über die S-200 Säule erfolgt eine gröÙenselektive Trennung in 50 Fraktionen. Der Auflösungsbereich dieser Säule beträgt 10-500 kDa. Der Puffer dient als Laufmittel und wird von der FPLC automatisch mit der Probe vermischt.

3.4.4 Charakterisierung der FPLC-Fraktionen

Die HDL-haltigen Fraktionen der Lipidlösung können durch die Cholesterinkonzentration identifiziert werden, da sie die ersten cholesterinhaltigen Partikel sind, die durch die FPLC-Säule gelangen. Die unten dargestellten Verfahren wurden aber auch an anderen Stellen dieser Arbeit als Standardverfahren zur Lipidbestimmung eingesetzt.

3.4.4.1 Cholesterolester- und Triacylglyceridkonzentration

Material

- Cholesterin-Reagenz (Roche)
- Triglycerid-Reagenz (Roche)
- Precipath L-Control (Roche)
- Mikrotiterplatte 96 well (NalgeNunc)

Methode

Die Bestimmung der Cholesterolester- und Triglyceridkonzentration erfolgt analog durch die photometrische Messung einer enzymatischen Reaktion. Es werden 100 µl der zu testenden Probe in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Dazu werden 200 µl der Reagenz pipetiert. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wird die Konzentration des entstandenen Farbstoffes photometrisch bei 550 nm bestimmt. Die gemessene Extinktion wird anhand eines parallel bestimmten Standards zu der tatsächlichen Konzentration errechnet.

3.4.4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Material

- Substanz A: 2% Na₂CO₃, 0,02% NaK-Tartrat, 0,1 M NaOH
- Substanz B: 0,5% CuSO₄, 5% SDS
- 50% Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz
- Bovines Serumalbumin
- Mikrotiterplatte 96 well

Methode

Es wird die Proteinbestimmung nach Lowry durch photometrische Bestimmung einer enzymatischen Reaktion verwendet. Proben und Standard werden 1:5 mit NaOH verdünnt. Substanz A und B werden dann 50:1 gemischt. Auf je 100 µl der Probe wird 1 ml der A+B-Lösung gegeben – vortexen und 10-minütige Inkubation bei Raum-

temperatur im Dunklen. Zu jeder Probe kommen nun 100 µl der Folinreagenz, wieder vortexen und 30 min. bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubieren. 250 µl der Probe kommen in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte, daraufhin erfolgt die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 760 nm.

3.4.5 Separation der HDL₂ und HDL₃-Proteine durch 2D-SDS-PAGE

Um die Proteine der HDL in einem 2D-Gel aufzutrennen, sind drei aufeinander aufbauende Schritte notwendig. Diese sind das Ausfällen der Proteine mittels TCA, die Trennung der Proteine in der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung „IEF“) und die Trennung in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE. In dem der Praxis entsprechenden Ablauf sollen sie an dieser Stelle nacheinander vorgestellt werden.

3.4.5.1 TCA-Proteinfällung

Material

- 50% Trichloressigsäure (TCA) bei 4 °C
- Aceton bei 4 °C
- 10% Triton X-100
- Lysispuffer: 8 M Urea, 4% CHAPS, 1% Pharmalyte (pH 3-10), DTT 60mM, Aqua dest.
- Eis

Methode

Es werden je 150 µl der Tritonlösung in ein auf Eis stehendes Eppendorf-Tube gegeben, das dann für 10 Minuten abkühlt. Darauf werden 1 ml der Probe und 350 µl der TCA-Lösung gegeben. Das TCA fällt die Proteine, Triton X-100 bindet die Lipide. Die Mischung vortexen und 30 min. auf Eis stellen. Anschließend bei 13.000 rpm 10 min. zentrifugieren. Den Überstand abnehmen und 1 ml Aceton auf das Pellet geben, um die Probe zu waschen. Daraufhin Vortexen und wieder bei 13.000 rpm 2 min. zentrifugieren – zweimal wiederholen. Nach dem zweiten Mal wieder den Überstand abnehmen, kurz anzentrifugieren und den restlichen Überstand entfernen. Je 8 Pellets werden in insgesamt 800 µl Lysispuffer gelöst.

3.4.5.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Material

- Rehydrationspuffer: 8 M Urea, 0,5% CHAPS, 0,5% Pharmalyte (pH 3-10), 0,002% BPB, 18 mM DTT, Aqua dest.
- IPG-Streifen „Immobiline Drystrip linear 24cm“
- Sealing-Solution
- 0,5 mm x 15 mm Blottingzellstoffstreifen

Methode

Es werden die 800 µl Proben nach der Fällung bei 13.000 rpm für 2 min. zentrifugiert, um evtl. ungelöste Bestandteile zu entfernen. 2 x 300 µl des Überstandes pro Probe werden mit je 150 µl des Rehydrationspuffers versetzt. Die nun 450 µl umfassenden Proben werden daraufhin in den Stripholdern der IEF-Einheit einpipetiert. Die beiden Kontakte des Stripholders bedeckt man mit Zellulosestreifen (zur Verhinderung des Verklebens der Gelstreifen während der Elektrophorese). Nun werden die IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten auf die Probe in den Stripholder gegeben, ohne daß sich Luftblasen unter dem Gel befinden. Zur Abdichtung werden 2 ml der Sealing-Solution auf den Streifen gegeben. Wir verwendeten zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine folgendes Spannungsschema:

IEF Schema:

- | | | |
|----------|------|-------------|
| - 30 V | Step | 10 h – 16 h |
| - 300 V | Step | 3 h |
| - 1000 V | Grad | 1 h |
| - 8000 V | Grad | 1 h |
| - 8000 V | Step | 8 h |
| - 1000 V | Step | 2 h |

Während des letzten Schrittes werden die Streifen entnommen, da die Proteine nur unter elektrischer Spannung fixiert bleiben. Nach Ablauf der Fokussierung müssen die Streifen entweder direkt in die zweite Dimension eingebracht, oder bei -80 °C eingefroren werden.

3.4.5.3 2D-SDS-PAGE

Material

- Lösung für 14 Gele (12% Acryl): 281 ml Aqua dest., 375 ml 30% Duracryl, 9 ml 10 % SDS, 9 ml 10% APS, 1,24 ml 10% TEMED, 225 ml 1,5 M/L Tris pH 8,8
- Equilibrierungspuffer: 6 M Urea, 2% SDS, 30% Glycerol, 0,002% BPB, 50 mM Tris pH 8,8, Aqua dest. ad 250 ml, Aliquots à 10 ml bei -20 °C aufbewahren
- 12 x 100 mg Dithiothreitol (DTT)
- 12 x 250 mg Iodacetamid (IAA)
- Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1% SDS, Aqua dest. ad 10 L
- Displacing Solution: 0,375 M Tris, 50% Glycerol, 0,002% BPB, Aqua dest. ad 200 ml
- Sealing Solution: 100 ml Elektrophoresepuffer, 0,5% Agarose, 0,002% BPB, Aqua dest. ad 200 ml
- Isopropanol
- Rainbow Marker RPN 735
- Zellulosestreifen
- Hot Coomassie: 1 x Tablette Coomassieblau R-350, 1,6 L Essigsäure
- 10% Essigsäure
- 1% Essigsäure
- Gel-Behälter

Methode

In dieser Arbeit wurden selbst angefertigte 12%ige SDS-Acrylamidgele verwendet. Diese Gele werden mit Hilfe des Gelcast-Systems angefertigt. Alternativ sind direkt einsetzbare Gele kommerziell verfügbar. Das Gelcast-System ermöglicht die Herstellung von bis zu 14 Gelen gleichzeitig. Zunächst setzt man der gewünschten Anzahl an Gelen entsprechend viele Gelgußplatten in die Kammer ein. Freiräume werden mit Ersatzplatten aufgefüllt. Zur leichteren Entfernung der fertigen Gele werden Plastiktrennscheiben zwischen die Glasplatten gesetzt. Erst unmittelbar vor der Befüllung der Gußkammer wird die Gellösung mit TEMED versetzt. Über einen Trichter kann man die Kammer mit der Gellösung befüllen. Der Oberrand der Gele wird mit Isopropanol bedeckt, um eine gleichmäßige Oberfläche der Gele zu erhalten. Die vollständige Polymerisation benötigt 12 Stunden. Da die Gele leicht austrocknen, sollten die Gele während der Polymerisation abgedeckt werden. Die fertigen Gele sind nur wenige Tage verwendbar, daher empfiehlt es sich, die Gele zeitnah einzusetzen. Vor der zweiten

elektrophoretischen Aufspaltung müssen die Proteine equilibriert werden. Dies bedeutet, daß die IPG-Streifen in einem ersten Schritt 15 Minuten mit einer DTT-haltigen Lösung gespült werden. Das DTT reduziert die evtl. noch vorhandenen Disulfid-Brücken der Proteine. Im zweiten Schritt werden die freien Cysteinreste durch eine wiederum 15-minütige Spülung mit Iodacetamid (IAA) acetyliert, so daß eine erneute Ausbildung der Disulfidbrücken verhindert wird. So wird sichergestellt, daß die Proteine in der entfalteten Position verbleiben. Der benötigte Equilibrierungspuffer läßt sich tiefgekühlt aufbewahren. Für die eigentliche Equilibrierung kann er dann mit den benötigten Mengen DTT bzw. IAA versetzt werden.

Die Elektrophorese erfolgt nach dem Schema:

- 2 h 0,5 W pro Gel
- ca. 15 h 1 W pro Gel

Die benötigten Zeiten variieren je nach Anzahl und Qualität der Gele um bis zu mehrere Stunden. Nach 15 h kann bei Bedarf die Leistung auf max. 2 W pro Gel gesteigert werden.

Im Anschluß an die Elektrophorese müssen die Gele gefärbt und fixiert werden. Dazu wird die Hot-Coomassie-Lösung auf 90°C erhitzt. Erst jetzt wird die Elektrophorese beendet (um eine Diffusion der Proteine zu verhindern). Die Gele werden in die Behälter gelegt und mit der heißen Lösung übergossen. Auf einem „Schwenktisch“ läßt man das Coomassie 10 min. lang einwirken. Anschließend werden die Gele für 2 Stunden mit der 10%igen Essigsäure entfärbt. Im letzten Schritt tauscht man die 10%ige Essigsäure gegen eine 1%ige Essigsäure und läßt die Gele für 12 Stunden schärfen. Zu Dokumentationszwecken erfolgt das Scannen der Gele.

3.4.6 MALDI-ToF Analyse

Auch die massenspektrometrische Identifikation der Proteine erfordert die Durchführung mehrerer aufeinander aufbauender Prozesse. Zu diesen zählt das Zertrennen der Proteine in ein Peptidgemisch; das Einbetten dieser Peptide in eine Trägermatrix; die Detektion der massenabhängigen Flugzeiten im MALDI-ToF und der Abgleich der Flugzeiten (m/z) mit einer Proteindatenbank.

3.4.6.1 Aufspaltung der Proteine durch Trypsin

Material

- 15 mg/ml Trypsin in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
- 20% Ethanol
- 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)
- 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat in 50% Methanol
- 70% Acetonitril (ACN)
- Aqua dest.

Mit Hilfe des Robotersystems „Spotpicker“ können einzelne proteinhaltige Gelpunkte ausgeschnitten werden. Diese Gelpunkte werden daraufhin in dem angeschlossenen „Digester“ für die MALDI-Analyse vorbereitet. In einem automatisierten Prozeß erfolgt die Aufspaltung der Proteine durch Trypsin. Dazu müssen die Gelpunkte gewaschen und mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat in 50% Methanol entfärbt werden. Dann erfolgt eine erneute Spülung durch 70% Acetonitril, bevor sie getrocknet werden. Die Proteine in den getrockneten Gelpunkten können nun mit einer Lösung aus 15 ng/µl Trypsin in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat über 4 h bei 37 °C verdaut werden. Der Digester überführt den Überstand in eine neue 96-well-Platte. Das verbleibende Gel wird mit 0,1% TFA in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat zweifach inkubiert, wodurch die Peptide aus dem Gel extrahiert werden. Der entstandene Überstand wird mit dem bereits entfernten Überstand vereinigt. Nach der folgenden Eindampfung können die Proben bei -20 °C gelagert werden.

3.4.6.2 Matrixeinbettung der Peptide

Die Analyse des Peptidgemisches durch das MALDI-ToF erfordert die Einbettung der Peptide in eine Trägermatrix. Diese Matrix besteht aus 5 mg/ml α -hydroxy-cyano-Zimtsäure in 0,5% TFA und 50% ACN. Die getrocknete Peptidprobe wird ebenfalls in 2,5 µl 0,5% TFA und 50% ACN gelöst. 1 µl Peptidlösung wird mit 1 µl der Matrixlösung auf einem Stück Parafilm vermischt. Davon pipetiert man 0,3 µl auf einen speziellen Probenträger („Slide“). Dieser Slide trägt bis zu 24 Proben und kann dem MALDI direkt zugeführt werden.

3.4.6.3 Massenspektrometrische Analyse

Das Matrix Assistet Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-ToF) basiert auf der massenabhängigen Flugzeit eines beschleunigten Ions. Wie erwähnt, erfordert das MALDI die Einbettung der Zielsubstanz in eine Trägermatrix. Durch einen Laser wird das Probenmaterial aus der Matrix gelöst und gleichzeitig ionisiert. Dieses Ion wird durch ein Hochspannungsfeld in einem Vakuum beschleunigt, und durch einen Detektor registriert. Durch die Summe der Peptid-Flugzeiten einer Probe wird ein spezifisches Spektrum („Peptid-Fingerprint“) erstellt. Von großer Bedeutung ist die sorgsame Kalibrierung des Systems. Es gibt mehrere mögliche Kalibranten. Interne, wie z. B. autolytische Fragmente des Trypsins, und Externe, wie ACTH und Angiotensin, die den Proben beigemischt werden. Im Anschluß an die Messung und Eichung des Systems werden die Peptidspektren mit einer Proteindatenbank abgeglichen.

4. Ergebnisse

Diese Arbeit basiert auf der Erhebung und Auswertung massenspektrometrischer Daten. Im folgenden Kapitel sollen zunächst die Ergebnisse der einzelnen Präparations-schritte dargestellt werden. Die darauf aufbauenden Auswertungen werden im An-schluß behandelt.

4.1 Gewinnung prä- und postprandialer Plasmaproben

Zunächst galt es, für unsere Untersuchungen geeignetes Ausgangsmaterial zu erhal-ten. Hierzu war es notwendig, die humanen Plasmaproben anhand ihres Lipidprofils zu charakterisieren. Bei der Analyse der Plasmalipide bestimmten wir den Cholesterin-und Triglyceridspiegel. Dabei stellten sich die Werte der Plasmaproben weitestgehend unauffällig dar. Lediglich eine der Proben (1) wies einen HDL-Anteil unterhalb der Normgrenze von 40 mg/dl auf.

Tab. 4.1: Plasmalipidwerte

Probe	prä-HDL (mg/dl)	post-HDL (mg/dl)	prä-Chol (mg/dl)	post-Chol (mg/dl)	prä-TG (mg/dl)	post-TG (mg/dl)
1	17	21	152	143	59	84
2	46	47	159	164	83	186
3	48	45	164	168	153	235
4	46		162		94	
5	43	41	176	174	87	151
6	48	45	101	101	99	139
7	54	44	149	148	77	177

Lipidparameter der einzelnen Proben; jeweils prä- und postprandiale Angaben der HDL-, Cholesterin- und Triglyceridkonzentration. Angaben in mg/dl Plasma.

In der Tab. 4.1 erkennt man, daß die Konzentration an Triglyceriden postprandial stark zunahm. Diese Zunahme entspricht dem physiologischen Anstieg der exogenen Lipide 3 Stunden nach Nahrungszufuhr. Dagegen änderte sich der Cholesterinspiegel nur geringfügig, da der Cholesterinanteil in Chylomikronen sehr gering. Damit unterliegt der Cholesterinspiegel nicht den postprandialen Schwankungen der Triglyceride. Außerdem wird das Resorptionsmaximum des Cholesterins erst 6 Stunden nach Nahrungsaufnahme erreicht, und nicht schon nach 3 Stunden wie bei den Triglyceriden [60]. Die Proben können also als normolipämisch angesehen werden, und erfüllen damit die

Voraussetzung die wir Zwecks Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an das Ausgangsmaterial stellten.

4.2 Isolation des Lipidanteils durch die präparative Ultrazentrifuge

Die präparative Ultrazentrifuge wurde eingesetzt, um die Lipoproteine aus dem Plasma zu lösen. Hierzu war es notwendig, das Plasma durch Kaliumbromid auf 1,22 g/ml einzustellen, wodurch die weniger dichten plasmatischen Bestandteile in der Ultrazentrifuge auffloatierten. Daraufhin wurden die Proben für 60 h bei ca. 100.000 g und 4°C im Schwingrotor zentrifugiert. Der lipidhaltige Überstand konnte nun mit einer Kanüle abgenommen. Dieses Lipidkonzentrat war Ausgangsmaterial für die Isolation der HDL und ihrer Subklassen.

4.3 Fast Protein Liquid Chromatography zur Abtrennung der HDL-Fraktion mit HDL-Subklassen

Um die zeit- und temperaturabhängige Veränderung der Lipoproteine möglichst gering zu halten, war es notwendig, die Proben zügig zu verarbeiten. Daher erfolgte im unmittelbaren Anschluß an die Entnahme der Lipide aus der Ultrazentrifuge die Aufschlüsselung durch die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

4.3.1 Charakterisierung der FPLC-Fraktionen

Die FPLC trennt Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe über einer Säule aus porösen Polymerkugeln auf. Zur Detektion der verschiedenen Lipoproteinklassen wurde im Anschluß der Cholesteringehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt. Anhand des Profils der Cholesterinkonzentration konnten so die HDL-haltigen Fraktionen identifiziert werden. Die von uns eingesetzte Superdex S-200-Säule trennte die Lipoproteine in dem in Abbildung 4.1 gezeigten Profil auf. Die kleinsten Lipoproteine, die HDL (5-17 nm), durchliefen die Säule am langsamsten. Das erste Cholesterinmaximum der Fraktionen umfaßt alle größeren Lipoproteine, das zweite Maximum entspricht den HDL. Standardmäßig wurden bei allen Versuchen die Konzentrationen des Cholesterin- und Triglyceridgehaltes bestimmt.

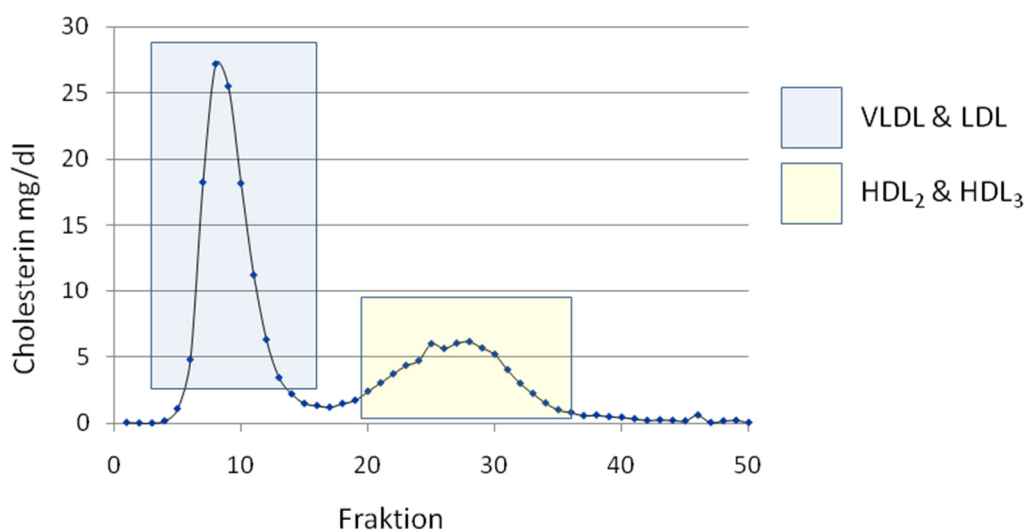


Abbildung 4.1: Exemplarische Darstellung der Lipoproteinauftrennung mittels FPLC. In der Grafik ist die Cholesterinkonzentration über der jeweiligen Fraktion aufgetragen.

In Abbildung 4.1 ist beispielhaft aufgezeigt, wie sich die Cholesterinkonzentration der Proben über die Durchflußzeit ändert. Dies ist durch die unterschiedliche Laufzeit verschieden großer Lipoproteine bedingt. Durch die Superdex S-200 lassen sich insbesondere die kleineren HDL besonders gut auftrennen. Vergleicht man das Cholesterinprofil einer präprandialen mit dem einer postprandialen Probe, so läßt sich gut veranschaulichen, daß die Konzentration des Cholesterins durch die Nahrungsaufnahme kaum beeinflusst wird (Abbildung 4.2).

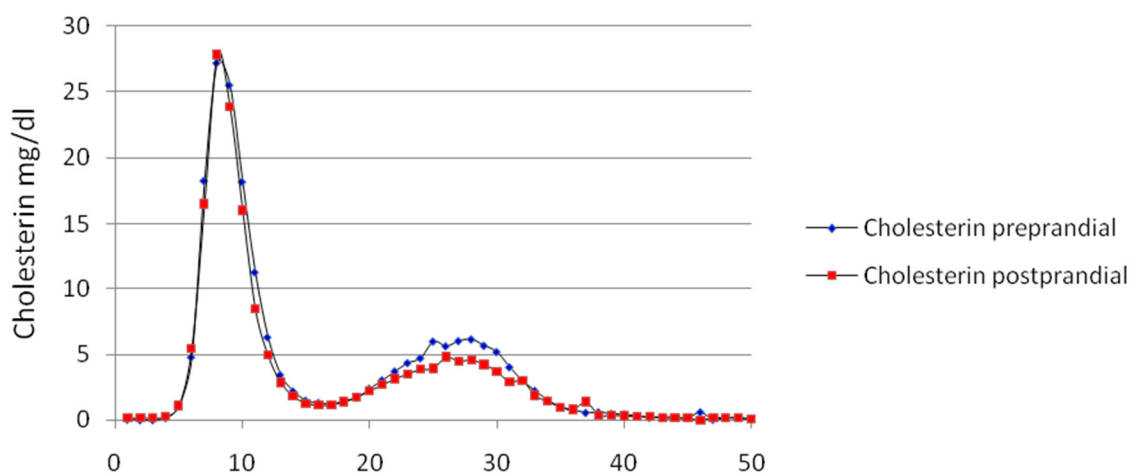


Abbildung 4.2: Die beiden Cholesterinkonzentrationen sind in mg/dl gegeneinander aufgetragen. Die beiden Kurven überlagern sich beinahe vollständig. Dies verdeutlicht, daß es zu praktisch keiner Verschiebung der Cholesterinkonzentration nach der Nahrungsaufnahme kommt.

Zunächst stellt sich ein deutlicher Peak bei Fraktion #8 dar. Dieser entspricht den großen und dadurch am schnellsten durch die Säule laufenden Lipoproteinen der Chylomikronen, VLDL und LDL (18nm-1 μ m). Aufgrund des Größenspektrums der verwendeten Säule erscheinen diese unterschiedlichen Lipoproteine hier nicht voneinander getrennt. Der zweite Peak (#18-#32) entspricht den HDL, deren Größenverteilung differenziert aufgelöst wird. Vergleicht man die beiden Kurven miteinander, so zeigt sich, daß der Cholesteringehalt postprandial kaum zunimmt. Im Unterschied zum Cholesterin stellt sich die postprandiale Hypertriglyceridämie deutlich in der Konzentrationsänderung der Triglyceride dar (Abbildung 4.3).

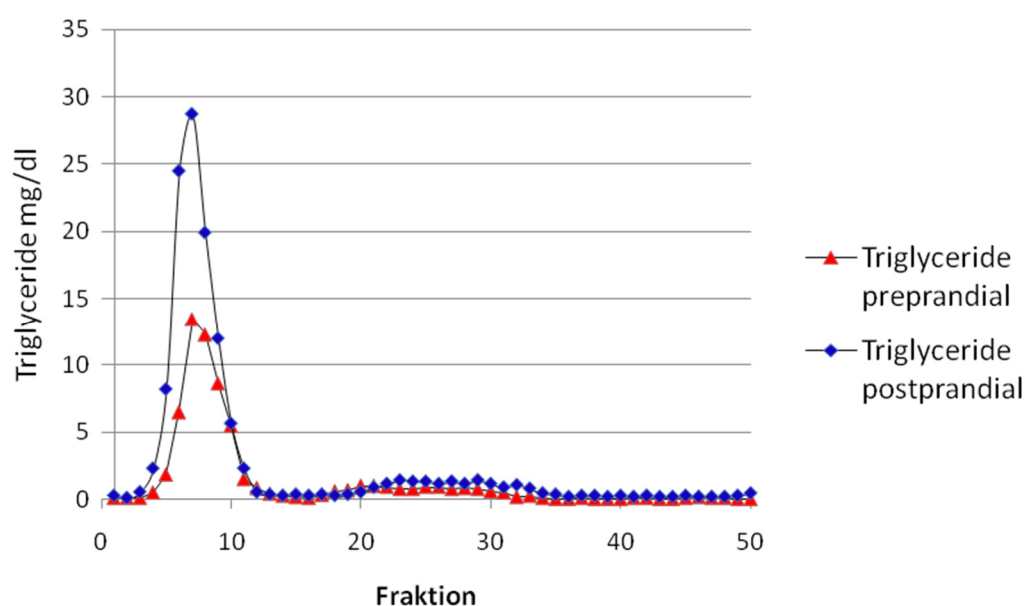


Abbildung 4.3: Triglyceride prä- und postprandial.

Im direkten Vergleich erkennt man, daß sich die Triglycerid-Konzentration im postprandialen Stoffwechsel auf mehr als das Doppelte erhöht. Außerdem kann man der Grafik entnehmen, daß die Zunahme der Triglyceride fast ausschließlich an die größeren Lipoproteine gekoppelt ist. Die Konzentration der HDL ändert sich nur geringfügig, die der anderen Lipoproteine dagegen deutlich.

4.3.2 HDL-Subklassen-Identifikation

Wie bereits beschrieben, konnte anhand des Cholesterinkonzentrationsprofils eine Unterscheidung der Lipoproteine vorgenommen werden. Die Auflösung der Superdex-S-200-Säule ermöglichte es, die HDL zusätzlich in die beiden Untergruppen HDL₂ und HDL₃ zu trennen (Abbildung 4.4).

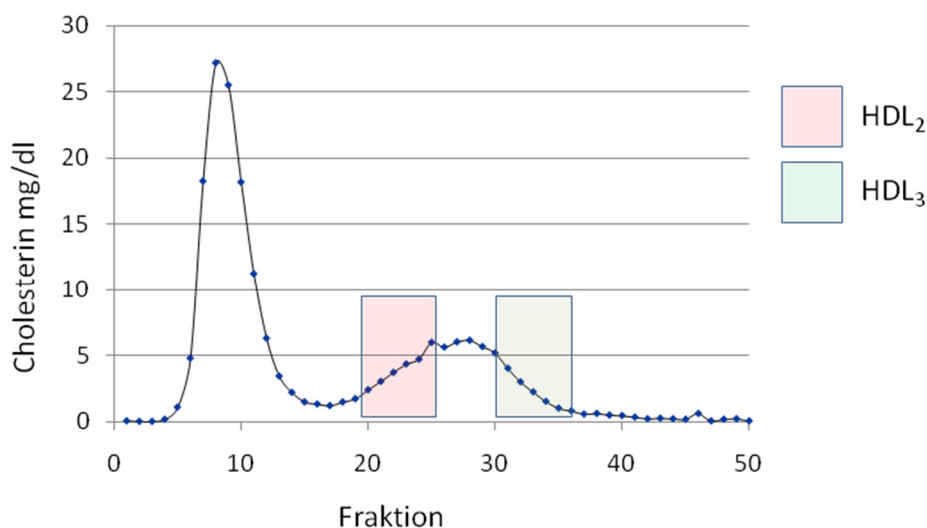


Abbildung 4.4: HDL Subklassen - es sind die beiden Untergruppen der HDL eingetragen, die sich durch die FPLC unterscheiden lassen (HDL₂ und HDL₃).

Ab Fraktion #20 bis #40 treten die langsameren (weil kleineren) HDL auf. Die Fraktionen #20-25 entsprechen den größeren HDL₂ (12nm-17nm), die #30-35 den kleineren HDL₃ (7nm-11,9nm). Zur sicheren Differenzierung der beiden Subpopulationen wurden die mittleren Fraktionen verworfen.

Wir verfügten nun über insgesamt vier verschiedene Ausgangsproben (HDL₂ und HDL₃, diese in einer prä- sowie einer postprandialen Variante). Um deren Proteom zu analysieren, war es notwendig, das Proteom in einzelne Proteine aufzuschlüsseln.

4.4 Separation der HDL₂ und HDL₃-Proteine durch 2D-SDS-PAGE

Die Standardmethode zur Auftrennung von Proteingemischen in der Proteomik ist die zweidimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE). Erst durch dieses Verfahren ist es möglich, einzelne Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren. Die 2D-SDS-PAGE besteht aus zwei aufeinander aufbauenden Verfahren. Zunächst werden die Lipoproteine auf ihren Proteinanteil reduziert. Im ersten Schritt (erste Dimension) erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihres unter-

schiedlichen isoelektrischen Punktes (IEF = isoelektrische Fokussierung; Abbildung 4.5) über einem pH-Gradientengel (IPG = Immobilisierter pH Gradient).

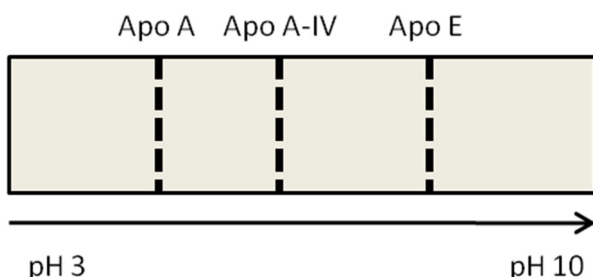


Abbildung 4.5: IEF - die Proteine einer Probe werden entsprechend ihrem pI über einem pH Gradienten aufgetrennt.

Abbildung 4.5 verdeutlicht schematisch das Prinzip der IEF. Über der Länge eines Acrylamidgelstreifens ist ein pH Gradient aufgetragen, der die einzelnen Proteine während des Anlegens einer elektrischen Spannung dazu zwingt, sich ihres pI entsprechend anzuordnen.

Danach werden die Disulfid-Brücken der Proteine durch Dithiothreitol (DTT) gespalten und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) eine gleichmäßige Ladungsverteilung erreicht (Equilibrierung). Außerdem verhindert das SDS die spontane Neubildung der Disulfidbrücken. Die Proteine werden so in der denaturierten Struktur fixiert. Durch die Behandlung mit SDS korreliert die Größe eines Proteins mit dessen (negativer) Ladung. Das ist für die folgende Größenauftrennung von Bedeutung, da so gleich große Moleküle auch die gleiche Ladung besitzen. In dem zweiten Schritt werden die IEF-Streifen auf selbst gegossene 10%ige Acrylamidgele gelegt. Durch das Anlegen eines mehrstufigen Hochspannungsprotokolls werden die Proteine aus den IEF-Streifen gelöst und wandern umso schneller durch das Gel, je kleiner sie sind. So wird die zweite Dimension erzeugt (Abbildung 4.6). Vor der Weiterverarbeitung erfolgt die Anfärbung der Proteine mit Coomassieblau.

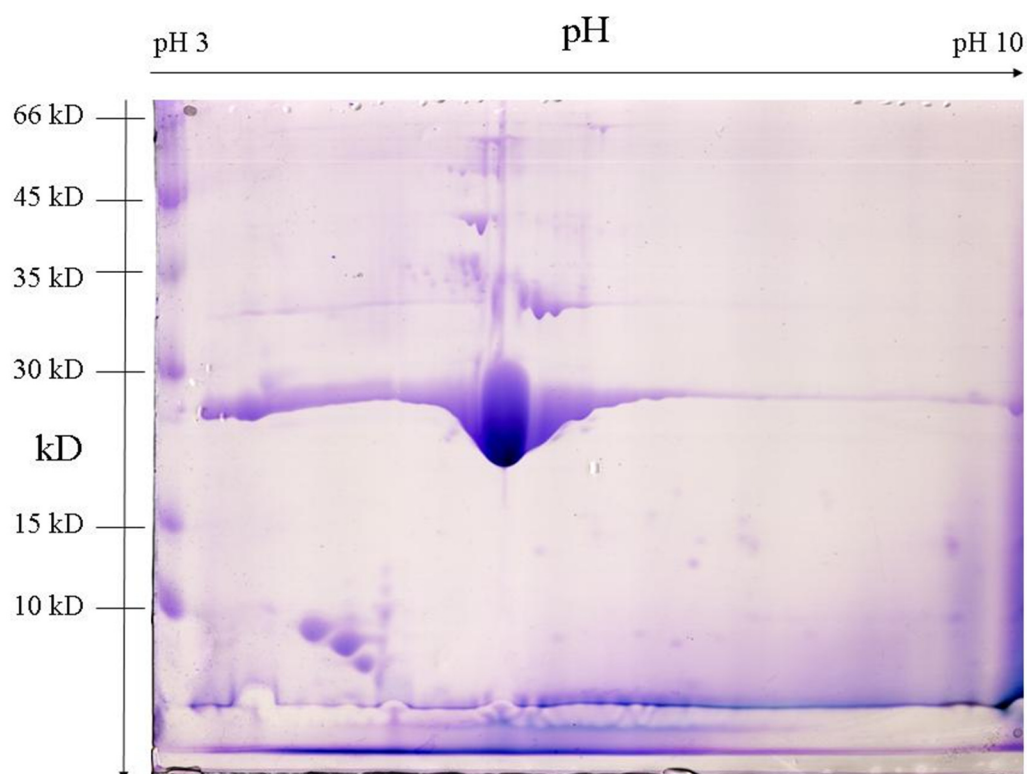


Abbildung 4.6: 2D-Gel - in diesem zweidimensionalen System werden Molekülgröße und Molekül-pI unterschieden. Die Proteine sind blau angefärbt – umso größer der Punkt, so höher die Konzentration des jeweiligen Proteins.

Die Abbildung zeigt ein typisches zweidimensionales Gel nach der Anfärbung mit Coomassieblau. Über die x-Achse verläuft der pH-Gradient (von 3-10). Über die y-Achse die Molekülgröße (ca. 5 kDa -100 kDa). Am linken Rand ist die Referenzprobe zur Größeneinordnung zu erkennen. Die einzelnen Punkte entsprechen den Isoformen der HDL-Proteine.

Zu diesem Zeitpunkt liegen nun die einzelnen Isoformen der HDL-Proteine getrennt voneinander vor. Damit ist die Grundvoraussetzung geschaffen, um die Proteine der MALDI-ToF-Analyse zuzuführen.

4.5 MALDI-ToF Analyse

Diese Technik ermöglicht es, in Kristalle eingebettete Substanzen durch Laserionization in einem elektrischen Spannungsfeld zu beschleunigen und anschließend die Flugzeit zu messen (Abbildung 4.7). Dieses Verfahren ist unter dem Namen MALDI (-ToF) bekannt, abgekürzt für **Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization** (- Time of

Flight). Anhand der gemessenen Flugzeit ist die Zuordnung zu einer bestimmten Substanz durch Abgleich mit einer Datenbank möglich.

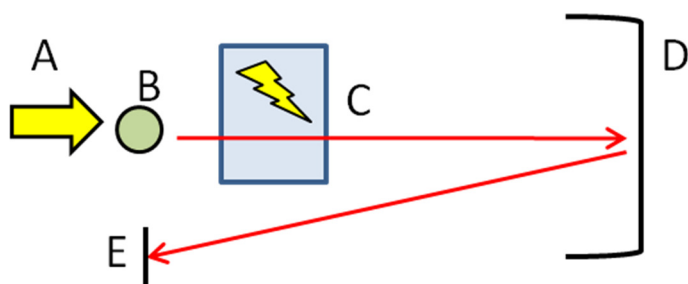


Abbildung 4.7: MALDI-ToF - Laserenergie (A) ionisiert und löst die in der Matrix verankerte Probe (B). Die durch ein Hochspannungsfeld (C) beschleunigten Ionen werden im Reflektor (D) umgelenkt und treffen auf den Detektor (E).

In Abbildung 4.7 ist die Funktionsweise eines MALDI-ToF dargestellt. Der Laser ionisiert und löst die in die Matrix eingebettete Probe. Daraufhin erfolgt die Beschleunigung in einem Spannungsfeld. Das ionisierte Molekül trifft schlußendlich auf einen Detektor, der die Flugzeitbestimmung ermöglicht. Da das Diskriminierungspotential mit steigender Masse abnimmt (verschiedene Stoffe haben dann häufiger die gleiche Masse), trennt man Proteine mittels Trypsin in Peptide auf, so daß man trotz ihrer Größe einzelne Proteine identifizieren kann. Hierzu nutzt man eine computergestützte Datenbankrecherche, bei der das jeweilige Peptidprofil, auch „Peptid-Fingerprint“ (Abbildung 4.8), dem wahrscheinlichsten Protein zugeordnet wird.

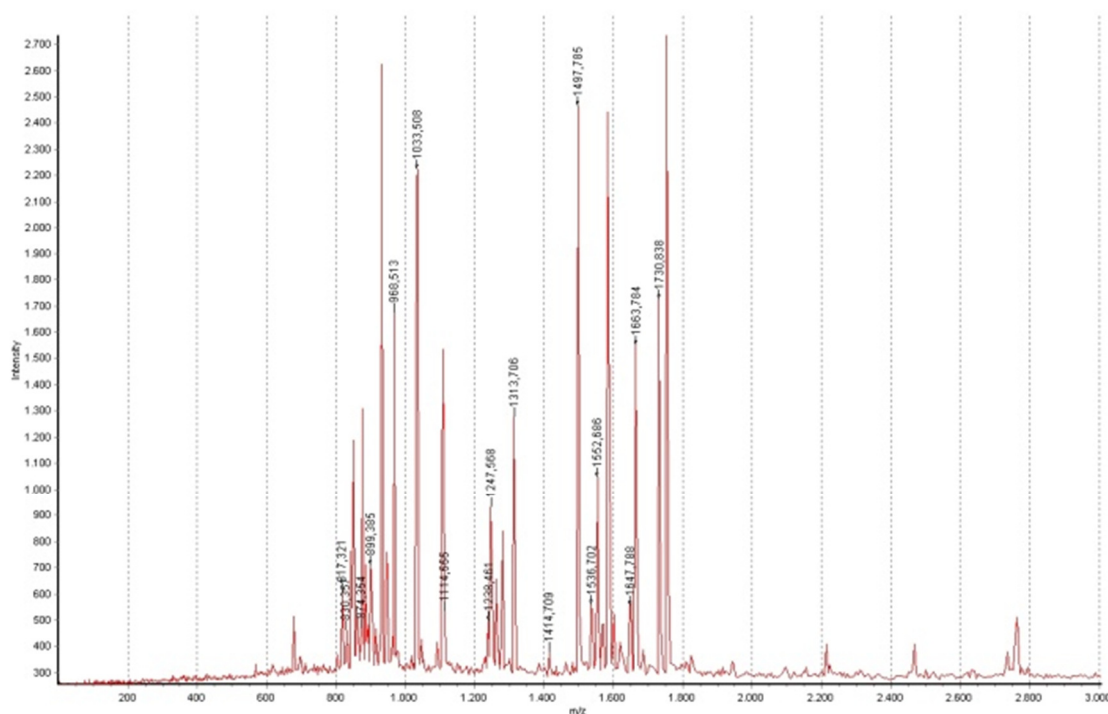


Abbildung 4.8: "Peptid Fingerprint" – Signalintensität über Peptidgröße. Aus diesem Peptidprofil werden die wahrscheinlichsten Ursprungproteine errechnet.

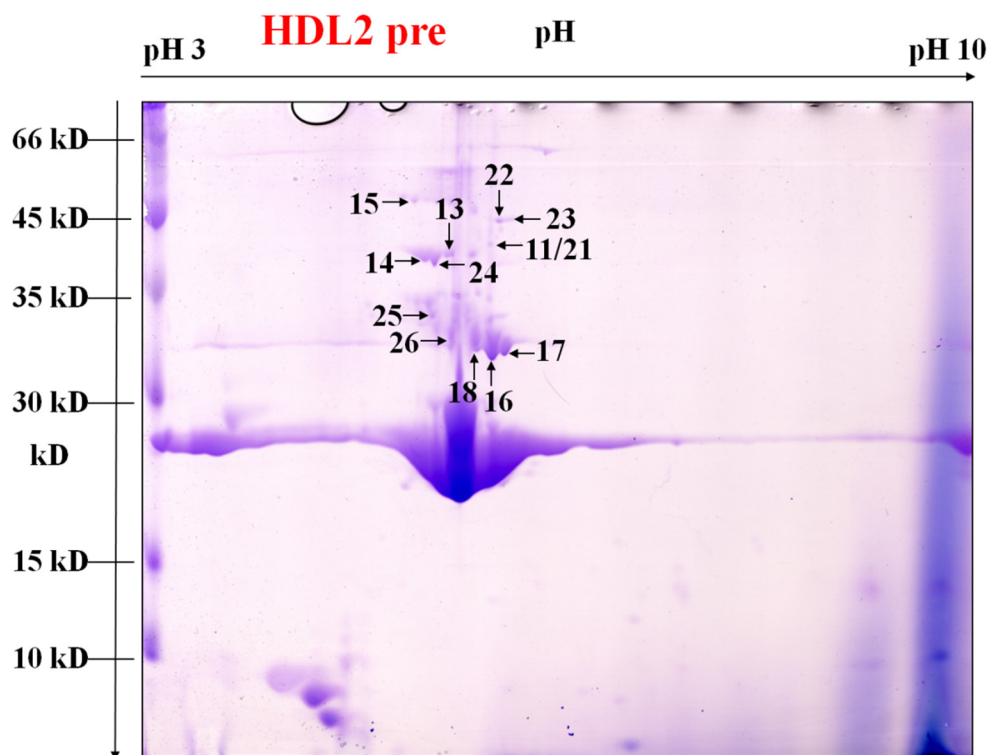
Auf der Abbildung 4.8 ist beispielhaft das Massenspektrum der Peptide einer als Apolipoprotein E identifizierten Probe gezeigt. Die Detektion ist begrenzt auf Peptide zwischen einer Größe/Geschwindigkeit $[m/z]$ von 500-10.000 m/z . Die y-Achse gibt die Intensität der gemessenen Peptide wieder.

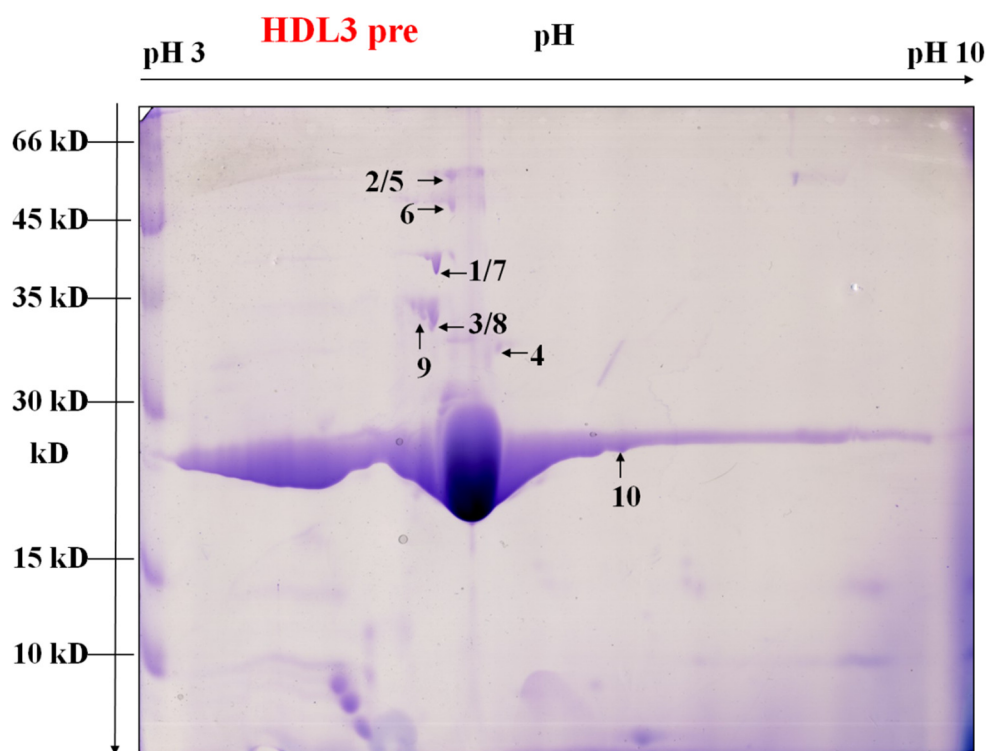
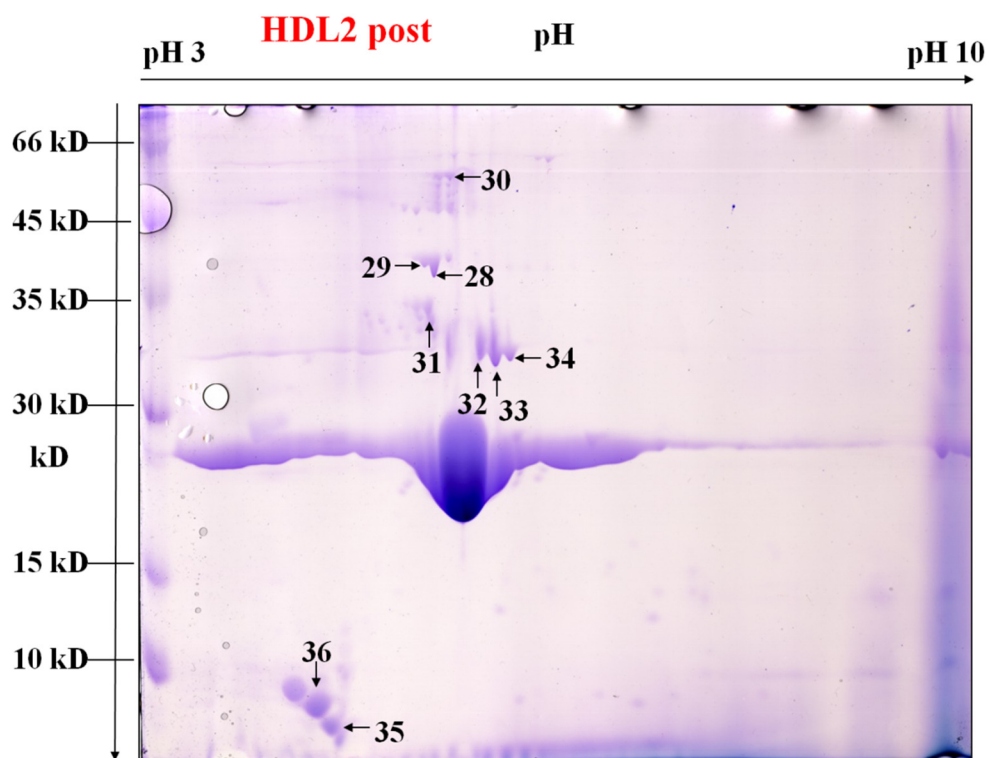
Die durch das MALDI-ToF erhobenen Daten der Proteinproben mußten im Anschluß durch die zugehörige Analysesoftware der Firma GE-Healthcare ausgewertet werden. Dieser liegt eine regelmäßig aktualisierte firmeneigene Proteindatenbank zugrunde. Diese Datenbank umfaßt sämtliche aktuell bekannten humanen Proteine. Das wichtigste Kriterium des Programmes ist die errechnete Proteinsequenzdeckung der gemessenen Peptide. Die Wahrscheinlichkeit plausible Ergebnisse zu erhalten ist direkt von der Sorgsamkeit der Kalibration des Systems durch den Nutzer abhängig, da das MALDI-ToF häufig zwischen Peptiden differenzieren muß, die sich nur um die Masse eines Protons unterscheiden. Eine zusätzliche Herausforderung ist es, relevante von irrtümlichen Daten zu unterscheiden. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen, werden neben den in die Auswertung einbezogenen Peptiden eine große Anzahl anderer Peptide gemessen, die sich aber nicht von der Software mit dem Zielprotein in Einklang bringen lassen. Die Software errechnet aus den gemessenen Peptiden die möglichen Kombi-

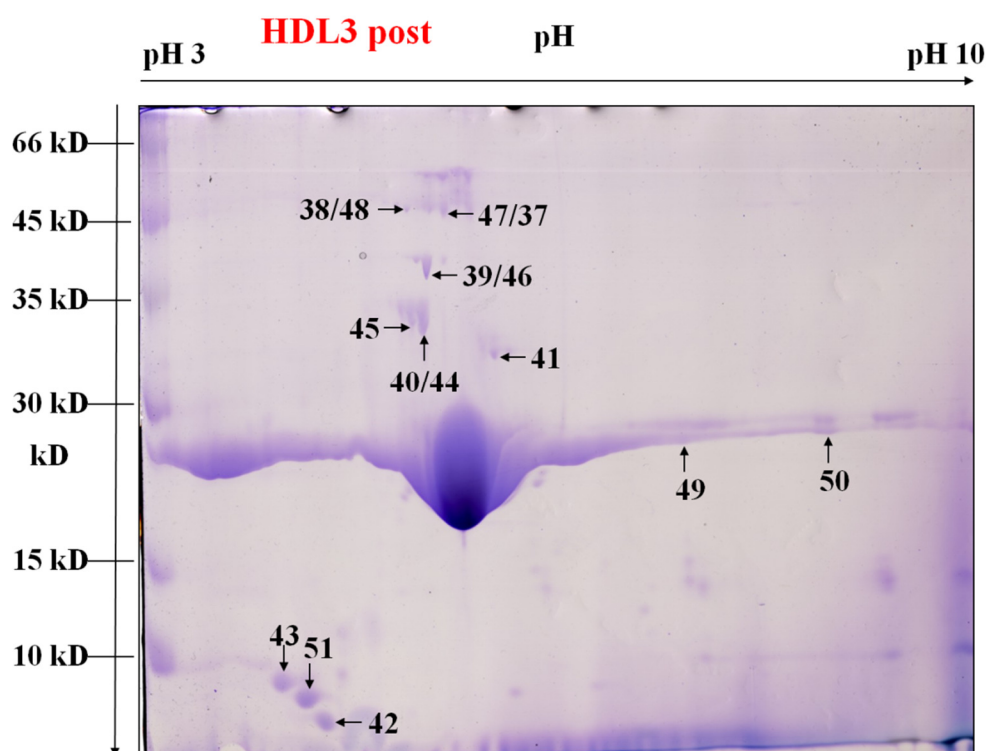
nationen. Diese werden in einer Rangliste nach Wahrscheinlichkeit sortiert. Wahrscheinlichkeiten ab $p < 0.03$ wurden als erkanntes Protein gewertet.

4.5.1 Auswertung

Die in der Auswertung angegebenen Zahlen beziehen sich auf die in den Abbildungen 4.9 angegebenen Nummerierungen der Proteinpunkte.







Abbildungen 4.9: 2D-SDS-PAGE – vier verschiedenen HDL-Proben – HDL₂ / HDL₃ jeweils prä- sowie postprandial. Die Zahlen geben den jeweiligen Proteinpunkt an.

4.5.1.1 Apolipoprotein A-I

Die massenspektrometrische Analyse der einzelnen Proteine der prä- und postprandialen Proben der HDL-Subklassen, HDL₂ und HDL₃, ergab, daß bei sämtlichen Proben das strukturgebende Apolipoprotein A-I nachgewiesen werden konnte. Das Apo A-I stellte sich in den Gelen als deutliche Bande im Bereich kleiner 30 kDa mit der höchsten Konzentration im leicht sauren Bereich dar (64). Dies läßt sich mit der Größe von 28,9 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) von 5,4 vereinbaren. Außerdem fand sich Apo A-I noch an 2 weiteren Stellen in allen Proben (40, 44, 45; 3, 8, 9; 31; 25, 26) die einem höheren Molekulargewicht von etwas 40 kDa und einem leicht saureren pI entsprechen. In den Proben der HDL₃ ermittelten wir an zwei weiteren Stellen Apo A-I. Der pI entspricht genau (5,4) dem des dominierenden Apo A-I, allerdings bei doppelter (ca. 50 kDa) Masse. Die Intensität (und damit Proteinkonzentration) dieser Gelpunkte lag auf einem niedrigeren Niveau im Vergleich zur Hauptform.

4.5.1.2 Apolipoprotein A-IV

Das Apolipoprotein A-IV, als eines der wichtigsten Proteine der HDL-Fraktion, mit 45,4 kDa und einem pI von 5,3, konnte in allen vier Testsettings nachgewiesen wer-

den. Dem Gewicht und pI entsprechend ungefähr bei 40 kDa und pI von ca. 5 in zwei Isoformen (14, 24; 1, 7; 29, 28; 39, 46).

4.5.1.3 Apolipoprotein C-II

Das Apolipoprotein C-II (8,9 kDa und pI 4,6) konnte in den Punkten 35 und 42 in einer solitären Isoform sicher festgestellt werden. Obwohl laut ETTAN Datenbank größer und saurer als das verwandte Apolipoprotein C-III, stellte es sich im kleineren und alkalischeren Bereich dar.

4.5.1.4 Apolipoprotein C-III

Apolipoprotein C-III (8,6 kDa und pI 4,7) fand sich in direkter Nähe zu Apo C-II, in der Region unter 10 kDa und in saurer Umgebung. Es ließen sich in allen Proben je 2 Gelpunkte aufzeigen. Die beiden Punkte unterschieden sich leicht in Ihrer Ladung.

4.5.1.5 Apolipoprotein E

Das Apolipoprotein E (36,3 kDa und pI 5,6) konnte ebenfalls in allen Proben gefunden werden. Allerdings zeigte sich hier ein Unterschied zwischen HDL₂ und HDL₃. HDL₂ wies deutliche Apo E-Gelpunkte auf, während sich bei HDL₃ nur schwache Punkte zeigten. Außerdem fand sich bei ca. 45-50 kDa ebenfalls Apo E. Eine Zuordnung der Gelpunkte zu den einzelnen Isoformen E₂/ E₃/ E₄ war bedingt möglich. Diese unterscheiden sich durch Cystein (E₂ & E₃) oder Arginin (E₄) in Position 112 und Cystein in Position 140 (E₂) bzw. Arginin (E₃ & E₄). Da in Punkt 16 und 34 der Sequenzabschnitt 159-167 gefunden wurde, läßt sich daraus schließen, daß es sich in Position 158 um Arginin (E₃/ E₄) gehandelt haben mußte, da nach Cystein(E₂) keine Trennung durch Trypsin stattgefunden hätte. Also kann hier E₂ (158= Cystein) ausgeschlossen werden. Leider konnte kein Peptid mit Position 112 gefunden werden, mit welchem man dann zwischen E₃ (Cystein) und E₄ (Arginin) hätte differenzieren können [61]. Es wurden regelmäßig je 3 Gelpunkte (18, 16, 17) gefunden.

4.5.1.6 Alpha-1-Antitrypsin

Die Detektion von α -1-Antitrypsins im Proteom der HDL wurde erst in jüngeren Arbeiten beschrieben [62]. Der Nachweis in dieser Arbeit kann die Untersuchungsergebnisse der anderen Gruppen bestätigen. In den Gelpunkten (15; 30; 38, 48) wurde das α -1-Antitrypsin gefunden. Das als 46,8 kDa große und mit einem pI von 5,4 laut ETTAN Datenbank charakterisierte Protein stellte sich in den 2D-Gelen in den der angegebenen Größe entsprechend, aber mit einem leicht saureren pI dar.

4.5.2 Differentielle Analyse des Proteoms der HDL

Aufbauend auf den vorangehenden Ergebnissen untersuchten wir, ob sich durch einen direkten Vergleich der unterschiedlichen Proben Verschiebungen innerhalb der Proteinkonzentrationen darstellen ließen. Dazu verglichen wir die 2D-Gele, so daß sich anhand der relativen Proteinpunktgröße (die zumindest grob mit der jeweiligen Konzentration korreliert) eine Aussage über das Mengenverhältnis der Apolipoproteine untereinander treffen ließ. Zunächst wurden die beiden HDL-Subspezies, HDL₂ und HDL₃ untersucht.

Vergleicht man die beiden Proben (Abbildungen 4.9), so zeigen sich zwei homogen wirkende Proteinmuster. Bei näherer Betrachtung stellt sich jedoch eine deutliche Diskrepanz in der Ausprägung der als Apolipoprotein E identifizierten Gelpunkte dar. In den Proben der dichteren und kleineren HDL₃ sind die entsprechenden Proteinpunkte kaum zu erkennen. Dagegen sind die drei Isoformen des Apo E innerhalb der Proben der HDL₂ deutlich auszumachen. Die anderen Proteinpunkte zeigen keine weiteren Konzentrationsverschiebungen. So sind in beiden Subklassen die entsprechenden Isoformen auszumachen, ohne sich erkennbar in ihrem Mengenverhältnis zu unterscheiden. Weiterhin sind in beiden Proben alle der sechs identifizierten Proteine nachgewiesen worden. Auch das α -1-Antitrypsin ließ sich in beiden HDL-Klassen darstellen.

Das zweite Unterscheidungsmerkmal, der nutritive Status, wurde nach dem gleichen Schema analysiert. In beiden Proben ließen sich wiederum alle sechs identifizierten Proteine nachweisen. Auch die jeweiligen Isoformen der Proteine waren als einzelne Gelpunkte zu erkennen. In der komparativen Untersuchung stellten sich jedoch keine eindeutigen Differenzen dar. Alle Proteine stellten sich prä- und postprandial gleichmäßig deutlich dar.

Tab. 4.2: Vergleich der Proteinkonzentrationen innerhalb der HDL Subklassen

Protein	Prä-HDL ₂	Post-HDL ₂	Prä-HDL ₃	Post-HDL ₃
Apo A-I	+++++	+++++	+++++	+++++
Apo A-II	-	-	-	-
Apo A-IV	++	++	++	++
Apo C-I	-	-	-	-
Apo C-II	++	++	++	++
Apo C-III	++	++	++	++
Apo E	+++	+++	+	+
α-1-Antitrypsin	+	+	+	+

Intensität der Proteingelpunkte nach optischer Auswertung; - entspricht null, +++++ ist die maximal festgestellte Punktgröße

5. Diskussion

In den von uns untersuchten Proben ließen sich insgesamt sechs verschiedene Proteine nachweisen. Fünf dieser Proteine sind seit geraumer Zeit als Bestandteile der HDL bekannt. Außer diesen Apolipoproteinen fanden wir in mehreren Proben das α -1-Antitrypsin, ein Akute-Phase-Protein, daß erst in neueren Arbeiten beschrieben wurde [63]. Neben der reinen Analyse der MALDI-ToF Peptidspektren wurden sämtliche Proben, die standardmäßig nüchtern entnommen werden, mit einer dazugehörigen postprandialen Probe verglichen. In dieser differentiellen Analyse ließen sich keine Unterschiede zwischen den prä- und postprandialen Proben aufzeigen. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit kritisch betrachtet, beginnend mit den Ergebnissen der Proteinanalyse.

5.1 Plasmaproben

Sämtliche Untersuchungen basieren auf humanen Plasmaproben. Bei der Auswahl der Probanden wurde darauf geachtet, daß ihr Lipidprofil möglichst innerhalb der Normwerte liegt. Zusätzlich wurde eine Genotypisierung des Apolipoprotein E durchgeführt, da bekannt ist, daß die einzelnen Isotypen zu einer Veränderung des Lipidhaushaltes führen [58, 59]. Zur Standardisierung trugen zusätzlich Kriterien wie eine 10-stündige Nahrungskarenz bei. Neben der so gewonnenen Nüchternprobe entnahmen wir zusätzlich noch eine postprandiale Probe um etwaige Modifikationen des Proteinprofils zu untersuchen (5.7).

5.2 Isolation des Lipidanteils durch die präparative Ultrazentrifuge (UZ)

Der Einsatz der UZ ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von Lipoproteinen. Zunächst hatten wir jedoch versucht, auf den Einsatz der UZ zu verzichten. Man weiß, daß die hohe Salzkonzentration, die bei Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt wird, zu Proteinverlust führen kann [64]. Aus diesem Grund hatten wir primär versucht, ausschließlich die FPLC zur Abscheidung der HDL-Subklassen zu verwenden. Hierbei zeigte sich jedoch, daß es so zu einer massiven Kontamination durch Immunglobuline und Albumin kam. Eine Analyse der HDL-Proteine war dann nicht mehr möglich. Erst bei Vorabpräparation der Lipoproteine durch die Ultrazentrifuge ließen sich keine Im-

immunglobuline mehr in den Proben nachweisen (Abbildung 5.1). Andere Autoren setzen kürzere Zeiten bei höheren Umdrehungsraten (65.000) ein [63].

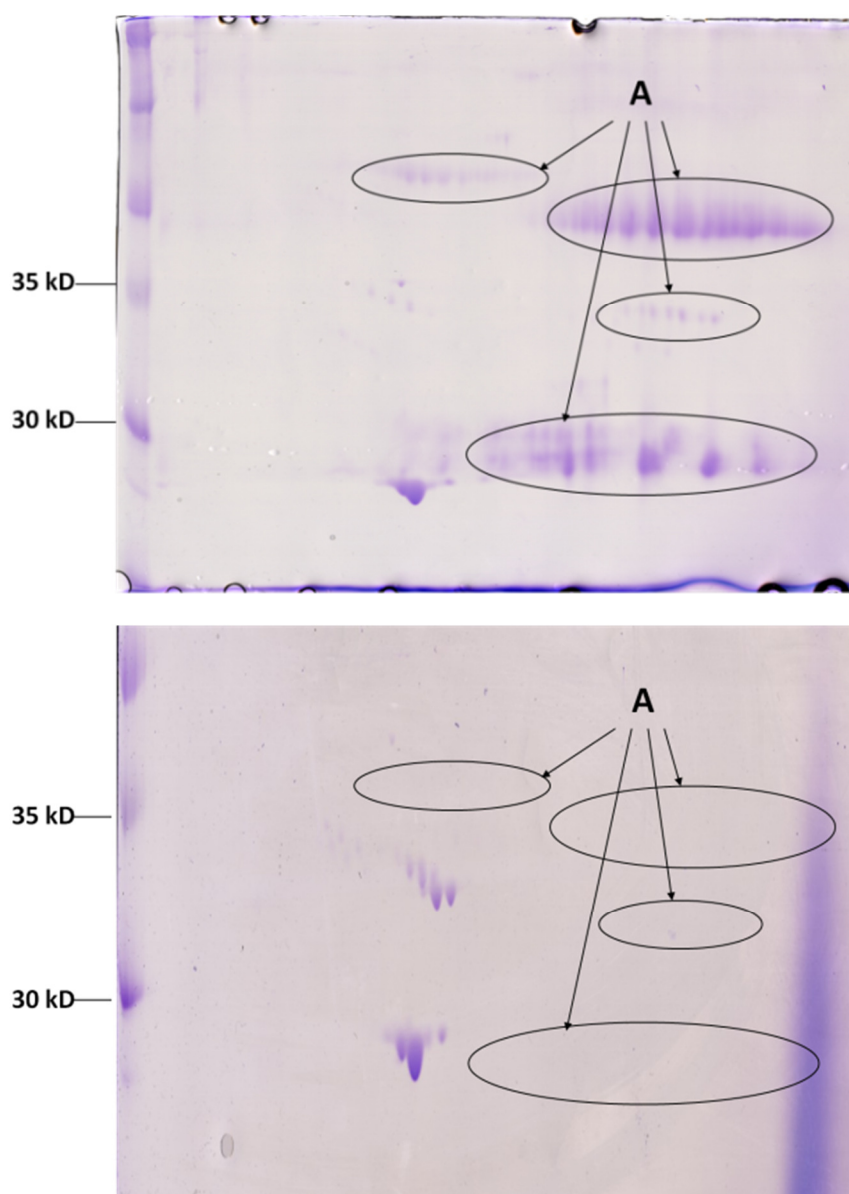


Abbildung 5.1: 2D-Gele – oben ohne Zentrifugation mit deutlicher Kontamination des Gels durch Immunglobuline (A), unten aufgereinigtes Gel.

Auf der Abbildung 5.1 ist die Veränderung des Proteinmusters zu erkennen, die sich durch den Einsatz der präparativen Ultrazentrifuge erzielen lässt. Verzichtet man auf diesen Schritt, so werden nur Apo A-I und diverse Immunglobuline detektiert.

5.3 Fast Protein Liquid Chromatography zur Abtrennung der HDL-Fraktion mit HDL-Subklassen

Primär als alleiniges Verfahren zur Gewinnung der HDL eingesetzt, wurde die Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) auch nach dem zusätzlichen Einsatz der Ultrazentrifuge zur Gewinnung der HDL und HDL-Subklassen genutzt. Die FPLC zeichnet sich durch eine geringe physikochemische Belastung des Probenmaterials sowie ihre leichte Handhabung aus. Gleichzeitig ermöglicht sie eine gute Auftrennung der Lipoproteine nach ihrer Größe.

5.4 Separation der Proteine der HDL₂ und HDL₃ durch 2D-SDS-PAGE

Die weitere Präparation wurde mit der 2-dimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) durchgeführt. Dieses ist ein etabliertes Verfahren um Proteingemische aufzuschlüsseln und einem entsprechenden Auswertungsverfahren zugänglich zu machen. Üblicherweise ist dies eine massenspektrometrische Analyse, die auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Die Methode stammt aus der Zellproteomik und wird dort vorwiegend zur Beschreibung des Proteoms, also der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, genutzt. Aufgrund der Erfahrungswerte im Umgang mit dieser Methode konnte dieses Verfahren problemlos auf die Auftrennung des HDL-Proteoms übertragen werden.

5.5 Massenspektrometrische Detektion der Peptide nach Trypsinverdauung der Proteine

Die Auswertung der 2D-SDS-PAGE erfolgte durch ein MALDI-ToF-Massenspektrometer. Dieses Verfahren ist ein leistungsstarkes Werkzeug um aufgereinigte Proteinproben zu analysieren, da es durch die geringe Fehlertoleranz zum einen sehr spezifisch, zum anderen durch den hohen Grad der Automatisierung äußerst schnell ist. Durch die ständige Aktualisierung der Proteindatenbank können sämtliche momentan bekannten Proteine detektiert werden. Das System ist jedoch anfällig gegenüber Fehleichungen, da durch die Trypsinspaltung der Proteine eine hohe Anzahl von Peptiden erzeugt werden, die sich in ihrer Masse häufig nur um das Gewicht eines Protons unterscheiden. Von dieser Differenz hängt dann aber ab, ob ein bestimmtes Protein identifiziert werden kann oder nicht. Durch den Einsatz spezieller Kalibranten ist es

jedoch möglich jede Messung separat und intern, also innerhalb der jeweiligen Messung, zu eichen. Hierdurch kann die Genauigkeit der Messung deutlich gesteigert werden. Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der MALDI-Identifikation diskutiert werden.

5.6 Proteine

5.6.1 Apo A-I

Betrachtet man eines der 2D-Gele, so erkennt man deutlich eine Bande in der Höhe von ca. 30 kDa. Diese Bande konnte als das Apolipoprotein A-I identifiziert werden. Apo A-I bildet die Grundstruktur der High Density Lipoproteine. Unter den Proteinen der HDL besitzt es den größten Massenanteil. Das Zentrum des Apo A-I-Spots befand sich an der Stelle des Gels, die den Datenbankangaben von Größe und Ladung des Apo A-I entspricht (28,9 kDa und 5,4 pI). Interessanterweise ließ sich in allen Proben an zwei weiteren Stellen Apo A-I nachweisen. Diese befanden sich in einer Region, die einer Größe von ca. 40 kDa bei einem leicht niedrigeren pI entspricht. Möglicherweise ist es hier zu einer Komplexbildung aus Apo A-I und anderen Apolipoproteinen gekommen. Gerade durch den Einsatz der präparativen Ultrazentrifuge wäre eine solche spontane Assoziation möglich. In einigen Proben wurden gleich große Proteine mit deutlich höherem pI gefunden – ursächlich vorstellbar wären posttranslationale Modifikationen des Apo A-I. Neben diesen zusätzlichen Varianten fanden sich in der Gruppe der HDL₃ noch zwei weitere Apo A-I Formen. Hier entsprach der pI genau dem der Hauptform, die Masse lag jedoch bei ca. 50 kDa. Damit entsprechen diese Formen ca. der doppelten Größe der Hauptform. Denkbar ist in diesem Fall, daß sich je zwei Apo A-I Moleküle zu einem Dimer verbunden haben. Dieses Phänomen wie auch das der posttranslationalen Modifikation wurde von anderen Gruppen beschrieben [65, 66]. Im Gegensatz zu der Arbeit von Karlsson et al. [63] ist es in unseren Versuchen nicht möglich gewesen Aussagen darüber zu machen, ob es sich bei einer Form des Apo A-I definitiv um dessen Pro-Form oder die reife Variante handelte. In den verschiedenen Proben wurden die Gelpunkte z.T. als Apo A-I, z.T. als pro-Apo A-I bezeichnet. Obwohl die Identifikationssicherheit der Software bei allen aufgeführten Proben mit 100% angegeben wurde, könnte es möglich sein, noch genauere Angaben zu den Proteinen zu treffen. Vergleicht man die Angaben zu den einzelnen Proteinen zwischen unserer und der Arbeit von Karlsson et al., so fallen die unterschiedlichen Massenangaben zu den einzelnen Gelpunkten auf. Karlsson et al. geben eine durchschnittliche Sequenzde-

ckung von 55-60% an. In unseren Versuchen erreichten wir im Schnitt ca. 30%. Anmerken muß man an dieser Stelle, daß in den beiden Arbeiten zwei unterschiedliche (Analyse-)Systeme verwendet wurden, und so die Vergleichbarkeit stark eingeschränkt ist. Dennoch ist bei einer weiteren Optimierung der Methodik eine Erhöhung der Deckungsrate, und damit eine Steigerung der Differenzierung, vorstellbar.

5.6.2 Apo A-IV

In allen Proben ließen sich je zwei Isoformen des Apolipoproteins A-IV nachweisen. Die Gelposition entsprach den Einträgen der Proteindatenbank (54,4kDa und pI von 5,3). Die Angaben der Ettan-Software waren in diesem Fall eindeutig – es wurde immer als Apo A-IV bezeichnet. Das Auftreten zweier gleich großer Formen läßt sich, wie auch bei dem Apo A-I, als posttranslationale Modifikation interpretieren. Theoretisch möglich wäre auch eine Heterozygotie der Spender. Da aber bei allen Proben zwei Isoformen gefunden wurden, und nur jeder siebte Europäer heterozygot ist [67], kann man diese Möglichkeit aufgrund ihrer Unwahrscheinlichkeit ausschließen.

5.6.3 Apo A-II, C-II und Apo C-III

Die drei Apolipoproteine A-II, C-II und C-III zeichnen sich durch sehr ähnliche Parameter bzgl. Größe und pI aus und werden deswegen an dieser Stelle gemeinsam besprochen. In sämtlichen Proben ließen sich die beiden Apo C Proteine nachweisen. Dabei konnten eine Variante des C-II, und jeweils zwei des C-III gefunden werden. Bei den beiden Isoformen des Apo C-III handelt es sich vermutlich um einfach bzw. zweifach sialisierte Formen [12]. Die Positionen der Proteine im Gel lassen sich grundsätzlich mit den Datenbankangaben in Einklang bringen. Vergleicht man jedoch die Gelpositionen der Proteine untereinander, so stellt man fest, daß das Apolipoprotein C-II sich im Bezug zu den beiden C-III-Punkten in einem Bereich befindet, der einer kleineren und alkalischeren Substanz entsprechen müßte. Das Apo C-II wird jedoch in der Datenbank mit einer Größe und pI von 8,9 kDa / 4,6 pI, das C-III mit 8,6 kDa und pI von 4,7 beziffert. Hier scheint es sich, wie bei dem Apo A-I, um modifizierte Varianten zu handeln. Das Apo A-II konnten wir in keiner Probe nachweisen – obwohl es nach dem Apo A-I das zweithäufigste Protein der HDL ist. Hätten wir ausschließlich die kleineren HDL₃ untersucht, wäre das sogar eine Bestätigung unserer Ergebnisse gewesen. Es ist nämlich bekannt, daß die dichtereren HDL₃ Apo A-II arm sind [64]. Wir konnten jedoch auch in den weniger dichten HDL₂ kein Apo A-II nachweisen. Eine weitere Erklärung für das Fehlen des Apo A-II in den HDL hätte sein können, daß man HDL

intestinalen Ursprungs untersucht hat. Diese sind ebenfalls Apo A-II frei, da der Darm kein Apo A-II synthetisieren kann. Unsere Proben stammen aber alle aus humanem Plasma. Karlsson et al. wiesen in Ihren Untersuchungen Apo A-II nach, und zwar in unmittelbarer Nähe zu den Apo C-II und Apo C-III Punkten. In unseren Proben könnte es also zu einer Überschneidung der Punkte gekommen sein, so daß ein Nachweis nicht mehr möglich gewesen ist. Bei Apo A-II relevanten Fragestellungen wäre es daher notwendig eine sorgfältige Auftrennung des Größenbereiches zwischen dem pH 4 und 7 (durch die Verwendung entsprechender IEF-Streifen) vorzunehmen.

5.6.4 Apo C-I

Das kleinste Apolipoprotein der HDL, das Apo C-I (6,6 kDa), wurde in keiner Probe identifiziert. Möglicherweise ist es aufgrund seiner geringen Größe bei der SDS-PAGE verloren gegangen, und konnte so nicht aufgefunden werden. Eine entsprechend höhere Auflösung im niedrigeren Molekülgrößenbereich hätte demnach eine Detektion des Apo C-I ermöglichen können. Das Risiko Substanzen in den Grenzbereichen der Analysemethoden zu verlieren, schließt ein weitgefaßter Ansatz wie in dieser Arbeit grundsätzlich ein. Entsprechend dem Apo A-II wäre es bei Fragestellungen bzgl. der C-Apolipoproteine notwendig, sich auf deren Größenbereich zu konzentrieren. In diesem Falle müßte man Acrylamidgele mit entsprechend höherer Vernetzung nutzen.

5.6.5 Apo E

Das Apolipoprotein E liegt mit einer Größe von 34,2 kDa und einem pI von 5,5 im optimalen Auflösungsbereich der verwendeten 2D-SDS-PAGE. Auch hier stimmte Datenbank- und Gelposition miteinander überein. In sämtlichen Proben zeigten sich je drei Proteinpunkte. Diese Punkte befanden sich im Gel auf einer Linie gleicher Größe, voneinander nur durch einen geringen Ladungsunterschied getrennt. Eine unterschiedliche Ladung bedeutet aber in diesem Fall nicht, daß mehr als eine Isoform vorliegt (da der Genotyp des Apo E bekannt war, konnte diese Möglichkeit ohnehin ausgeschlossen werden). Es beruht vielmehr auf einer variablen Anzahl von Neuraminsäureresten. Jedes zusätzliche Molekül fügt dem Apo E eine weitere negative Ladung hinzu [68]. Eine Identifikation des Apo E Isotypen sollte grundsätzlich per MALDI-ToF möglich sein. Jedoch wäre es dazu zwingend notwendig, genau den isotyp-definierenden Sequenzabschnitt zu finden. In unseren Ergebnissen zeigte sich dieses Merkmal nicht.

5.6.6 α -1-Antitrypsin

Als letztes Protein identifizierten wir das α -1-Antitrypsin in unseren Proben. Dieses Akute-Phase-Protein ist 46,8 kDa groß, und hat einen pI von 5,4. In den Gelen entsprach es der angegebenen Größe, lediglich die Ladung stellte sich saurer als angegeben dar. Dieses Eiweiß konnte bereits während des Entstehens dieser Arbeit von anderen Gruppen in Zusammenhang mit HDL beschrieben werden. Dieser Verbund aus HDL und α -1-Antitrypsin könnte sich zu einem interessanten Forschungsobjekt entwickeln. So ist bekannt, daß das Apo E₄ mit der Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit in Verbindung steht [14]. Jedoch konnte dieses Phänomen bisher nicht ursächlich geklärt werden. Das Apo E bindet, auch im Gehirn, an das LRP1 [33, 69, 70]. Nun weiß man ebenfalls, daß auch das α -1-Antitrypsin an das LRP1 bindet [71]. Da sich nun das α -1-Antitrypsin mehrfach als Bestandteil der HDL nachweisen ließ, ist es durchaus vorstellbar, daß dem α -1-Antitrypsin in diesem Zusammenhang eine funktionelle Rolle zukommt.

5.7 Differentielle Analyse des Proteoms der HDL

Im vorangehenden Abschnitt wurden die einzelnen Proteine diskutiert. Hier sollen nun die unterschiedlichen HDL-Proben als Ganzes betrachtet werden. Zum Ende unserer Untersuchung standen uns insgesamt vier verschiedene Ausgangsproben zur Verfügung. Zum einen die beiden Subfraktionen der HDL₂ und HDL₃. Zum Anderen diese beiden Untergruppen noch einmal als prä- sowie als postprandiale Probe. Dieser Ansatz sollte es ermöglichen, im Anschluß an die rein deskriptive Analyse, eine vergleichende Betrachtung der verschiedenen Proben durchzuführen. Bei dieser differentiellen Analyse wurde untersucht, ob es zu unterschiedlichen Verteilungen im Proteinstrom zwischen den einzelnen Proben gekommen ist. Vergleicht man die beiden Subfraktionen der HDL, so stellt man fest, daß die Apo E-Konzentration innerhalb der HDL₃ deutlich geringer ist als bei der größeren HDL₂. Da die HDL₂ aus der HDL₃ durch Aufnahme von Cholesterinestern und Apolipoproteinen entsteht, und zu diesen im besonderen das Apo E zählt, ist es nachzuvollziehen, daß es zu einem Unterschied in der Konzentration des Apo E kommt. Bei den anderen Proteinen läßt sich dieser Unterschied nicht nachweisen – sie zeigen in beiden Subfraktionen ein konstantes Profil.

Das zweite Unterscheidungsmerkmal dieser Analyse war der prä- bzw. postprandiale Zustand. Im Rahmen des Abbaus von Chylomikronen-Remnants im postprandialen Stoffwechsel werden Apolipoproteine und Cholesterin zwischen den HDL und den Chylomikronen-Remnants ausgetauscht [72-75]. Ändern sich durch diesen Vorgang die

Konzentrationsverhältnisse der HDL-Proteine, so könnte man erwarten, daß diese Veränderung anhand der Größe der Proteinpunkte zu erkennen ist. Leider war es nicht möglich, eine solche Alteration nachzuweisen. Die Punkte stellten sich auf allen Gelen gleich deutlich dar, so daß eine Aussage über eine etwaige Konzentrationsänderung nicht möglich war. Vermutlich waren die Konzentrationsverschiebungen nicht groß genug, als das man sie mit bloßem Auge hätte beobachten können. Ein neuer Ansatz um eine quantitative Bestimmung direkt während der massenspektrometrischen Auswertung zu vollziehen wurde von Vaisar et. al [26] vorgestellt. Alternativ bleibt nur eine konventionelle Methode der Proteinmessung, wie beispielsweise der RIA.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte das HDL-Proteom mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Hierbei lag der Schwerpunkt auf dem Vergleich der HDL-Subgruppen sowie des prä- und postprandialen Zustandes. Dazu wurde eine Methode zur qualitativen Analyse des HDL-Proteoms etabliert. Mittels dieser Methode konnte ein Großteil der bekannten Apolipoproteine der HDL erkannt werden. In dem Vergleich der HDL-Subgruppen ließ sich eine deutlich höhere Konzentration der Apo E-Isoformen in der Subgruppe der HDL₂ nachweisen. Zwischen den verschiedenen Stoffwechselluständen zeigte sich jedoch kein eindeutiger Unterschied. Zusätzlich wurde das α -1-Antitrypsin als Bestandteil der HDL identifiziert. Es befanden sich keine Proteine anderer Lipoproteine in den Proben – so kam es in anderen publizierten Arbeiten immer wieder zur Detektion von Apo B in HDL-Proben. Dies beruht vermutlich auf einer Verunreinigung der Proben während der Entnahme aus der Ultrazentrifuge. Da in der hier vorgestellten Methode grundsätzlich alle Lipoproteine gemeinsam entnommen, und erst dann durch die FPLC in einzelne Lipoproteinklassen aufgetrennt wurden, konnte dieses Risiko ausgeschlossen werden. Ebenso konnte die Kontamination der Proben durch Plasmaeiweiße wie Albumin und Immunglobuline erfolgreich verhindert werden. Im Vergleich zu ähnlichen Arbeiten muss festgestellt werden, dass die Anzahl der identifizierten Proteine zum Teil sehr stark voneinander abweicht. So beschreiben andere Autoren mehr als 40 Proteine. Die größte Differenz dürfte in der Präparation der Proben liegen. So wird in der Arbeit von Vaisar et al. darauf hingewiesen, dass der Großteil der Proteine erst nach dem Einsatz einer Immunpräzipitationssäule identifiziert werden konnte. In dem von mir genutzten Probenaufbereitungsverfahren ist die überwiegende Anzahl der Proteine des Immunhaushaltes sowie des Komplementsystems durch die stringente Probenaufbereitung verlorengegangen, so daß in dieser Arbeit die Proteine identifiziert wurden, die eine hohe Affinität zur HDL aufweisen. Weitere Analysen mit quantitativen massenspektroskopischen Methoden werden vermutlich die Bedeutung der HDL-assoziierten Proteine bei verschiedenen Krankheitsbildern näherbringen.

7. Literaturverzeichnis

1. Gofman, J.W. and F. Lindgren, *The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis*. Science, 1950. **111**(2877): p. 166-71.
2. Alaupovic, P., *Apolipoproteins and lipoproteins*. Atherosclerosis, 1971. **13**(2): p. 141-6.
3. Marz, W., M. Trommlitz, and W. Gross, *Differential turbidimetric assay for subpopulations of lipoproteins containing apolipoprotein A-I*. J Clin Chem Clin Biochem, 1988. **26**(9): p. 573-8.
4. Sorci-Thomas, M.G. and M.J. Thomas, *The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(3): p. 121-8.
5. Asztalos, B.F., et al., *High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 2181-7.
6. Tailleux, A., et al., *Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2002. **164**(1): p. 1-13.
7. Kronenberg, F., et al., *Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(3): p. 751-7.
8. Qin, X. and P. Tso, *The role of apolipoprotein AIV on the control of food intake*. Curr Drug Targets, 2005. **6**(2): p. 145-51.
9. Tso, P. and M. Liu, *Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity*. Physiol Behav, 2004. **83**(4): p. 631-43.
10. Merkel, M., et al., *Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21553-60.
11. Olivecrona, G. and U. Beisiegel, *Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(8): p. 1545-9.
12. Mann, C.J., et al., *Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31348-54.
13. Davignon, J., R.E. Gregg, and C.F. Sing, *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis*. Arteriosclerosis, 1988. **8**(1): p. 1-21.
14. Schmechel, D.E., et al., *Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9649-53.
15. Nishide, T., J.H. Tollefson, and J.J. Albers, *Inhibition of lipid transfer by a unique high density lipoprotein subclass containing an inhibitor protein*. J Lipid Res, 1989. **30**(2): p. 149-58.
16. Roubey, R.A., *Antiphospholipid syndrome: antibodies and antigens*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(5): p. 316-20.
17. Shannan, B., et al., *Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer*. Cell Death Differ, 2006. **13**(1): p. 12-9.
18. Shayo, M., et al., *The putative blood-brain barrier transporter for the beta-amyloid binding protein apolipoprotein j is saturated at physiological concentrations*. Life Sci, 1997. **60**(7): p. PL115-8.
19. Gelissen, I.C., et al., *Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function?* Biochem J, 1998. **331** (Pt 1): p. 231-7.

20. Albert, T.S., et al., *Apolipoprotein L-I is positively associated with hyperglycemia and plasma triglycerides in CAD patients with low HDL*. J Lipid Res, 2005. **46**(3): p. 469-74.
21. Perez-Morga, D., et al., *Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes*. Science, 2005. **309**(5733): p. 469-72.
22. Dahlback, B. and L.B. Nielsen, *Apolipoprotein M--a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2006. **17**(3): p. 291-5.
23. Hessler, J.R., A.L. Robertson, Jr., and G.M. Chisolm, 3rd, *LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture*. Atherosclerosis, 1979. **32**(3): p. 213-29.
24. Barter, P.J., et al., *Antiinflammatory properties of HDL*. Circ Res, 2004. **95**(8): p. 764-72.
25. Malle, E. and F.C. De Beer, *Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice*. Eur J Clin Invest, 1996. **26**(6): p. 427-35.
26. Vaisar, T., et al., *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 746-56.
27. Hussain, M.M., et al., *Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1300**(3): p. 151-70.
28. Zambon, A., et al., *Dimeric lipoprotein lipase is bound to triglyceride-rich plasma lipoproteins*. J Lipid Res, 1996. **37**(11): p. 2394-404.
29. Breckenridge, W.C., et al., *Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II*. N Engl J Med, 1978. **298**(23): p. 1265-73.
30. Fojo, S.S. and H.B. Brewer, *Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II*. J Intern Med, 1992. **231**(6): p. 669-77.
31. Shelburne, F., et al., *Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat*. J Clin Invest, 1980. **65**(3): p. 652-8.
32. Kowal, R.C., et al., *Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5810-4.
33. Beisiegel, U., et al., *The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein*. Nature, 1989. **341**(6238): p. 162-4.
34. Beisiegel, U., *Receptors for triglyceride-rich lipoproteins and their role in lipoprotein metabolism*. Curr Opin Lipidol, 1995. **6**(3): p. 117-22.
35. Bradley, W.A. and S.H. Gianturco, *ApoE is necessary and sufficient for the binding of large triglyceride-rich lipoproteins to the LDL receptor; apoB is unnecessary*. J Lipid Res, 1986. **27**(1): p. 40-8.
36. Redgrave, T.G. and D.M. Small, *Quantitation of the transfer of surface phospholipid of chylomicrons to the high density lipoprotein fraction during the catabolism of chylomicrons in the rat*. J Clin Invest, 1979. **64**(1): p. 162-71.
37. Beisiegel, U., *New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 1996. **124**(1): p. 1-8.
38. Kowal, R.C., et al., *Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10771-9.
39. Heeren, J., et al., *Endothelial-derived lipoprotein lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo*. J Mol Med, 2002. **80**(9): p. 576-84.
40. Beisiegel, U., W. Weber, and G. Bengtsson-Olivecrona, *Lipoprotein lipase enhances the binding of chylomicrons to low density lipoprotein receptor-related protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8342-6.

41. Ji, Z.S., et al., *Enhanced binding and uptake of remnant lipoproteins by hepatic lipase-secreting hepatoma cells in culture*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13429-36.
42. Mulder, M., et al., *Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase*. J Biol Chem, 1993. **268**(13): p. 9369-75.
43. Shafi, S., et al., *Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver*. J Lipid Res, 1994. **35**(4): p. 709-20.
44. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 601-37.
45. Cooper, A.D., *Hepatic uptake of chylomicron remnants*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2173-92.
46. Herz, J. and D.K. Strickland, *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 779-84.
47. Willnow, T.E., *Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance*. Diabet Med, 1997. **14 Suppl 3**: p. S75-80.
48. Hersberger, M. and A. von Eckardstein, *Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment*. Drugs, 2003. **63**(18): p. 1907-45.
49. von Eckardstein, A., J.R. Nofer, and G. Assmann, *High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 13-27.
50. Connelly, M.A. and D.L. Williams, *Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 287-95.
51. Trigatti, B.L., M. Krieger, and A. Rigotti, *Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(10): p. 1732-8.
52. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
53. Barter, P.J., et al., *Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 160-7.
54. Barrans, A., et al., *Pre-beta HDL: structure and metabolism*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1300**(2): p. 73-85.
55. Rensen, P.C., et al., *Apolipoprotein E is resistant to intracellular degradation in vitro and in vivo. Evidence for retroendocytosis*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8564-71.
56. Heeren, J., W. Weber, and U. Beisiegel, *Intracellular processing of endocytosed triglyceride-rich lipoproteins comprises both recycling and degradation*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 3)**: p. 349-59.
57. Heeren, J., et al., *Recycling of apolipoprotein E and lipoprotein lipase through endosomal compartments in vivo*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42333-8.
58. Bohnet, K., et al., *Apolipoprotein (apo) E genotype and apoE concentration determine binding of normal very low density lipoproteins to HepG2 cell surface receptors*. J Lipid Res, 1996. **37**(6): p. 1316-24.
59. Dong, L.M., et al., *Novel mechanism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(8): p. 718-22.
60. Cohn, J.S., et al., *Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages*. J Lipid Res, 1988. **29**(4): p. 469-79.

61. Vasanthi Narayanaswami, S.S.W.S., and Robert O. Ryan, *Lipid Association-induced N- and C-terminal Domain Reorganization in Human Apolipoprotein E3* Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(41): p. 37853-60.
62. Vaisar T, P.S., Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuletic S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp RH, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao XQ, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram JF, Heinecke JW, *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the anti-inflammatory properties of HDL.* journal of clinical investigation, 2007. **117**(3): p. 746-56.
63. Karlsson, H., et al., *Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.* Proteomics, 2005. **5**(5): p. 1431-45.
64. Cheung, M.C. and A.C. Wolf, *Differential effect of ultracentrifugation on apolipoprotein A-I-containing lipoprotein subpopulations.* J Lipid Res, 1988. **29**(1): p. 15-25.
65. Hoeg, J.M., et al., *Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by fatty acid acylation.* J Biol Chem, 1986. **261**(9): p. 3911-4.
66. Beg, Z.H., et al., *Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by covalent phosphorylation.* J Biol Chem, 1989. **264**(12): p. 6913-21.
67. Ehnholm, C., et al., *Genetic polymorphism of apolipoprotein A-IV in five different regions of Europe. Relations to plasma lipoproteins and to history of myocardial infarction: the EARS study. European Atherosclerosis Research Study.* Atherosclerosis, 1994. **107**(2): p. 229-38.
68. Steinmetz, A., et al., *Differential distribution of apolipoprotein E isoforms in human plasma lipoproteins.* Arteriosclerosis, 1989. **9**(3): p. 405-11.
69. Rohlmann, A., et al., *Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cremediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants.* J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 689-95.
70. Zhang, H., et al., *Localization of low density lipoprotein receptor-related protein 1 to caveolae in 3T3-L1 adipocytes in response to insulin treatment.* J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 2221-30.
71. Kounnas, M.Z., et al., *Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein.* J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6523-9.
72. Havel, R.J., J.P. Kane, and M.L. Kashyap, *Interchange of apolipoproteins between chylomicrons and high density lipoproteins during alimentary lipemia in man.* J Clin Invest, 1973. **52**(1): p. 32-8.
73. Imaizumi, K., M. Fainaru, and R.J. Havel, *Composition of proteins of mesenteric lymph chylomicrons in the rat and alterations produced upon exposure of chylomicrons to blood serum and serum proteins.* J Lipid Res, 1978. **19**(6): p. 712-22.
74. Imaizumi, K., et al., *Origin and transport of the A-I and arginine-rich apolipoproteins in mesenteric lymph of rats.* J Lipid Res, 1978. **19**(8): p. 1038-46.
75. Patsch, J.R., *Postprandial lipaemia.* Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1987. **1**(3): p. 551-80.

8. Anhang

Tabelle 8.1: Peptidparameter

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
HDL2 pre									
11	proApoAI	29,7	5,4	28,94	868,513	123	129	0,047	7 17
					1011,571	213	221		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
13	ApoAIV	38,6	5,3	45,38	975,514	156	163	0	14 20
					982,656	267	275		
					1075,534	351	359		
					1103,561	135	143		
					1230,639	317	326		
					1257,668	212	221		
					1310,968	80	90		
					1318,689	349	359		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1573,792	234	246		
					1633,831	52	65		
					1804,911	329	345		
					1926,944	288	304		
14	ApoAIV	29,4	5,3	45,38	975,514	156	163	0	10 22
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1230,639	317	326		
					1257,668	212	221		
					1257,668				
					1310,698	80	90		
					1351,652	306	316		
					1573,792	234	246		
					1926,944	288	304		
					1992,986	170	187		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
15	Antitrypsin	19,3	5,4	44,29	1802,988	260	274	0,085	4 12
					1832,935	311	328		
					1890,863	202	217		
					2057,022	137	154		
16	ApoE	31,9	5,6	36,25	829,382	169	175	0,002	9 28
					947,519	177	185		
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1237,507	122	132		
					1312,71	259	269		
					1496,795	210	224		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
17	ApoE	33,1	5,6	36,25	829,429	252	258	0,002	10 24
					885,467	114	121		
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1113,578	261	269		
					1312,71	259	269		
					1496,846	210	224		
					1619,765	301	317		
					1662,839	138	152		
					1729,88	94	108		
18	ApoE	25,2	5,6	36,25	829,429	252	258	0,015	8 24
					885,467	114	121		
					1032,535	270	278		
					1113,71	261	269		
					1312,71	257	269		
					1496,795	210	224		
					1662,809	138	152		
					1729,853	94	108		
21	ApoE	25,6	5,6	36,31	829,382	169	175	0,639	7 29
					829,429	252	258		
					967,545	199	207		
					132,535	270	278		
					1312,71	259	269		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1496,795	210	224		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
22	Apo E	23,3	5,6	36,25	967,545	199	207	0,257	6 19
					1032,535	270	278		
					1312,71	259	269		
					1496,795	210	224		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
23	ApoE	26,2	5,6	36,25	947,519	177	185	0,005	7 13
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1312,71	259	269		
					1496,795	210	224		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
24	ApoAIV	35,6	5,3	45,38	982,545	267	275	0	13 19
					1075,534	351	359		
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1230,639	317	326		
					1257,668	212	221		
					1310,698	80	90		
					1318,656	349	359		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1573,841	234	246		
					1926,988	288	304		
					1993,022	170	187		
25	proApoAI	31,5	5,5	30,75	1011,571	231	239	0,004	8 19
					1046,555	165	173		
					1229,622	240	250		
					1300,66	185	195		
					1317,614	165	175		
					1385,702	251	262		
					1399,653	52	64		
					1729,914	3	19		

Nr.	Name	%	pl	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
26	proApoAI	26,9	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,046	6 13
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
HDL3 pre									
1	ApoAIV	52,3	5,3	45,38	974,503	256	264	0	22 31
					975,514	156	163		
					1075,534	351	359		
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1195,551	307	316		
					1230,639	317	326		
					1257,668	212	221		
					1286,658	144	154		
					1310,698	80	90		
					1318,656	349	359		
					1349,646	222	233		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1438,793	79	90		
					1486,793	317	328		
					1573,792	234	246		
					1633,831	52	65		
					1804,911	329	345		
					1926,935	288	304		
1993,077	170	187							
2083,063	288	305							
2	proApoAI	26,9	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,01	6 12
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
3	proApoAI	28,5	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,019	8 22
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	30	46		
4	proApoAI	22,5	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,045	5 12
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
5	proApoAI	26,9	5,4	28,94	1011,601	213	221	0,092	6 14
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
6	proApoAI	26,1	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,218	6 18
					1056,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
7	ApoAIV	41,4	5,3	45,38	975,514	156	163	0 00	15 21
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1230,639	317	326		
					1258,663	256	266		
					1310,698	80	90		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1438,793	79	90		
					1486,793	317	328		
					1573,792	234	246		
					1633,831	52	65		
					1804,911	329	345		
					1926,94	288	304		
					1992,986	170	187		

Nr.	Name	%	pl	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
8	proApoAI	21,3	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,339	5 13
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1399,662	34	46		
9	proApoAI	26,9	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,39	6 10
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
10	proApoAI	31,7	5,4	28,94	872,435	130	137	0,036	9 31
					1011,571	213	221		
					1046,504	147	155		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1814,844	30	46		
HDL2 post									
28	Apo A-IV	49,7	5,3	45,38	974,503	256	264	0	20 28
					975,514	156	136		
					982,545	267	275		
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1131,615	155	163		
					1230,639	317	326		
					1257,668	212	221		
					1286,658	144	154		
					1310,698	80	90		
					1318,656	349	359		
					1349,646	222	233		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1438,793	79	90		
					1573,792	234	246		
1633,831	52	65							
1804,911	329	345							

Nr.	Name	%	pl	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1926,937	288	304		
					2083,067	288	305		
52	C-II	84,8	4,6	8,9	893,497	49	55	0,0003	5 15
					1034,528	40	48		
					1285,853	20	30		
					2218,058	1	19		
					2248,13	56	76		
53	Apo E	42,3	5,6	36,31	816,388	225	231	0	14 30
					829,382	169	175		
					829,429	252	258		
					843,46	44	50		
					898,434	51	56		
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1237,558	122	132		
					1246,675	34	43		
					1312,804	259	269		
					1496,873	210	224		
					1551,757	271	292		
					1646,878	138	152		
					1729,921	94	108		
54	Apo E	42	5,8	36,25	816,388	225	231	0	14 33
					829,429	252	258		
					885,467	114	121		
					898,434	51	56		
					947,519	177	185		
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1113,578	261	269		
					1246,567	34	43		
					1312,71	259	269		
					1496,795	210	224		
					1535,708	281	292		
					1646,793	138	152		
					1729,885	94	108		
55	Apo E	33,8	5,6	36,31	967,545	199	207	0,003	10 32
					1032,535	270	278		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1113,578	261	269		
					1237,507	122	132		
					1246,567	34	43		
					1312,71	259	269		
					1496,765	210	224		
					1551,703	281	292		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
56	Apo C-II	53,2	4,6	8,9	2202,063	1	19	0,009	4 10
					2218,058	1	19		
					2248,13	56	76		
					2563,236	56	79		
57	Apo C-II	41,8	4,7	8,75	1715,844	25	40	0,306	3 14
					1921,844	1	17		
					1937,839	1	17		
58	proApoAI	37,8	5,4	28,94	780,424	160	166	0,0001	11 29
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1282,565	114	122		
					1298,56	114	122		
					1300,641	167	177		
29	ApoAIV	47,7	5,3	45,35	974,5	256	264	0	19 29
					982,545	267	275		
					1075,534	351	359		
					1082,528	201	209		
					1086,556	190	198		
					1103,561	135	143		
					1195,551	307	316		
					1230,639	317	326		
					1257,668	276	287		
					1257,668	212	221		
					1286,658	144	254		
					1299,678	190	200		
					1310,698	80	90		
					1318,656	349	359		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1573,792	234	246		
					1804,911	329	345		
					1926,944	288	304		
					1992,986	170	187		
30	alpha-1-antitrypsin	33	5,4	46,86	1014,607	325	334	0	12 37
					1077,52	299	306		
					1109,597	315	324		
					1262,59	248	257		
					1322,756	356	367		
					1640,856	50	63		
					1778,761	35	49		
					1832,916	335	352		
					1890,848	226	241		
					2056,938	161	178		
					2185,033	160	178		
					2185,033	161	179		
					2573,334	126	149		
31	precursor ApoA1	45,7	5,6	30,76	868,513	141	147	0,105	11 51
					872,435	148	155		
					930,502	113	120		
					1011,571	132	239		
					1156,62	202	212		
					1229,702	240	250		
					1300,641	185	195		
					1317,635	165	175		
					1385,708	254	262		
					1399,662	52	64		
					1814,844	48	64		
32	ApoE	40,7	5,6	36,31	816,388	225	231	0,017	11 41
					829,429	169	175		
					885,467	252	258		
					9673545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1237,507	122	132		
					1246,569	34	43		
					1312,71	259	269		
					1496,795	210	224		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1551,703	281	292		
					1662,188	138	152		
					1729,837	94	108		
33	ApoE	43,2	5,6	36,31	816,388	225	231	0	16 38
					829,429	169	175		
					885,467	252	258		
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1113,578	261	269		
					1237,507	122	132		
					1246,569	34	43		
					1312,71	259	269		
					1413,746	247	258		
					1496,768	210	224		
					1535,708	281	292		
					1551,709	281	292		
					1646,793	138	152		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
					2092,032	91	108		
34	ApoE	53,3	5,6	36,31	816,388	225	231	0	15 39
					947,519	177	185		
					967,545	199	207		
					1032,535	270	278		
					1113,578	261	269		
					1237,507	122	132		
					1246,569	34	4		
					1312,71	259	269		
					1413,746	247	258		
					1496,795	210	224		
					1551,703	281	292		
					1662,788	138	152		
					1729,837	94	108		
					2092,032	91	108		
					2729,387	57	79		
35	Apo C-II	54,9	4,5	10,17	893,497	61	67	0	5 17
					1034,528	52	60		
					1285,583	32	42		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					2248,13	68	88		
					2563,236	68	91		
36	Apo C-III	50,6	4,7	8,75	929,356	52	58	0,0281	3 9
					1715,859	25	40		
					1937,873	1	17		
HDL3 post									
37	proApoAI	37,3	5,4	28,94	872,435	130	137	0,004	11 36
					1011,571	213	221		
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1298,56	114	122		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1466,784	125	137		
					1814,844	30	46		
38	alpha-1-antitrypsin	23,2	5,5	46,86	1077,52	299	306	0	9 19
					1262,59	248	258		
					1640,856	50	63		
					1778,761	35	49		
					1802,953	284	298		
					1832,916	335	352		
					1862,817	226	241		
					2056,938	161	178		
					2185,033	161	179		
					2185,033	160	178		
39	ApoAIV	59,8	5,2	46,86	952,498	44	51	0	24 47
					975,541	156	163		
					982,545	267	275		
					1075,534	351	359		
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1131,615	155	163		
					1214,644	317	326		
					1230,639	317	326		
					1257,668	212	221		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1286,658	144	154		
					1299,678	190	200		
					1310,968	80	90		
					1318,656	349	359		
					1349,646	222	233		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1438,793	79	90		
					1573,792	234	246		
					1633,831	52	65		
					1804,911	329	345		
					1926,944	288	304		
					1992,986	170	187		
					2083,045	288	305		
40	proApoAI	36,1	5,4	28,94	872,435	130	137	0,026	9 34
					1011,571	213	221		
					1156,62	184	194		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1814,844	30	46		
41	ApoE	39,4	5,6	36,31	816,388	225	234	0,001	15 46
					829,382	169	175		
					829,413	252	258		
					843,459	44	50		
					873,408	245	251		
					967,573	199	207		
					1032,535	270	278		
					1113,578	261	269		
					1237,507	122	132		
					1246,569	34	43		
					1312,71	259	269		
					1413,746	247	258		
					1496,795	210	224		
					1624,794	20	33		
					1729,837	94	108		
					2092,032	91	108		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
42	Apo C II	49,5	4,6	11,27	893,497	71	77	0	5 18
					1034,528	62	70		
					1285,583	42	52		
					2248,13	78	98		
					2563,236	78	101		
43	ApoCIII	45,6	4,7	8,75	1715,844	25	40	0,103	4 18
					1921,844	1	17		
					1937,839	1	17		
					2016,024	22	40		
44	proApoAI	27,7	5,4	28,94	1011,571	213	221	0,119	7 28
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1385,708	233	244		
					1399,663	34	46		
					1814,844	30	46		
45	proApoAI	31,3	5,4	28,94	868,513	123	129	0,077	8 32
					1011,571	213	221		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1814,844	30	46		
46	ApoAIV	46	5,3	45,38	975,514	156	163	0	16 33
					982,545	267	275		
					1082,528	201	209		
					1103,561	135	143		
					1230,639	317	326		
					1258,663	256	266		
					1310,698	80	90		
					1318,656	349	359		
					1351,652	306	316		
					1406,704	66	78		
					1573,792	234	246		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1633,831	52	65		
					1804,911	329	356		
					1926,944	288	304		
					1992,986	170	187		
					2083,045	288	305		
47	proApoAI	30,9	5,4	28,94	868,513	123	129	0,039	9 33
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1466,784	125	137		
					1714,844	30	46		
48	alpha-1-antitrypsin	15,3	5,4	46,86	1077,52	299	306		
					1870,965	390	404		
					1890,848	226	241		
					2185,033	161	179		
					2185,033	160	178		
					2573,334	126	149		
49	proApoAI	36,5	5,4	28,94	830,429	195	201	0,02	10 33
					872,435	130	137		
					1011,571	213	221		
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1466,784	125	137		
					1814,844	30	46		
50	proApoAI	41	5,4	28,94	872,435	130	137	0,003	11 33
					1011,571	213	221		
					1046,507	147	155		
					1229,702	222	232		
					1282,565	114	122		
					1298,56	114	122		
					1300,641	167	177		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1814,844	30	46		
					1931,927	68	83		
51	transferrin	16,7	6	55,23	1210,54	51	60	0,123	6 19
					1891,983	228	243		
					1921,943	256	271		
					1937,938	256	271		
					2232,118	144	164		
					2312,144	207	225		
58	Apo A-I	29,6	5,6	30,76	872,435	148	155	0,002	9 19
					1011,571	231	231		
					1046,507	165	173		
					1229,702	240	250		
					1300,641	185	185		
					1317,635	165	165		
					1385,708	251	251		
					1399,662	52	52		
					1814,844	48	48		
59	Apo A-I	28,1	5,6	30,76	872,435	147	155	0	8 15
					1011,571	231	239		
					1046,507	164	173		
					1229,702	240	250		
					1300,641	185	195		
					1317,635	165	175		
					1385,723	251	262		
					1399,688	52	64		
60	Antitrypsin	17,5	5,1	35,33	1077,52	302	309	0,001	5 12
					1640,856	53	66		
					1802,953	287	301		
					2089,088	202	218		
					2185,033	164	182		
					2185,033	163	181		
61	Antitrypsin	19,5	5,4	44,29	1077,52	275	282	0,001	6 17
					1418,6691	223	133		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1778,761	11	25		
					1832,916	311	328		
					2185,033	136	154		
					2185,033	137	155		
					2573,334	102	125		
62	Antitrypsin	17,9	5,4	46,88	1262,59	248	157	0	6 19
					1778,761	35	49		
					1802,953	284	298		
					1832,916	335	352		
					1890,848	226	241		
					2185,033	161	179		
					2185,033	160	178		
63	Antitrypsin	20,8	5,4	44,29	1077,52	275	282	0,001	6 13
					1262,59	224	233		
					1778,761	11	25		
					1802,953	260	274		
					1832,916	311	328		
					1890,848	202	217		
64	opt. Apo A-I	39	5,4	28,94	780,424	160	166	0	10 13
					872,435	130	137		
					1011,571	213	224		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1379,709	103	113		
					1385,709	233	244		
					1399,662	34	46		
					1814,844	30	46		
65	opt. Apo A-I	34,5	5,6	30,76	780,424	178	184	0	9 13
					868,513	141	147		
					872,435	148	155		
					1011,571	231	239		
					1156,62	202	212		
					1229,702	240	250		

Nr.	Name	%	pI	kDa	Massen	AS-Nr.	AS-Nr.	exp. Ratio	Peptide gefunden/allen
					1300,626	185	195		
					1317,635	165	175		
					1814,844	48	64		
66	opt. Apo A-I	34,1	5,6	30,76	780,424	178	184	0	10 13
					872,435	148	155		
					1011,571	231	239		
					1229,702	240	250		
					1300,641	185	195		
					1317,635	164	175		
					1385,708	251	262		
					1399,662	52	64		
					1466,784	143	155		
					1814,844	48	64		
67	opt Apo A-I	39,4	5,4	28,94	780,424	160	166	0	11 16
					872,435	130	137		
					895,476	140	146		
					1011,571	213	221		
					1229,702	222	232		
					1300,641	167	177		
					1317,635	147	157		
					1385,708	233	244		
					1399,662	34	46		
					1466,784	125	137		
					1814,844	30	46		

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas, sowie Herrn PD Dr. Jörg Heeren für die geduldige Unterstützung während der Arbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes bedanken, die mir während dieser Arbeit bei kleinen und großen Schwierigkeiten zur Seite standen.

Außerdem ein großes Dankeschön den Mitdoktoranden für die vielen interessanten und netten Gespräche.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf Jürgen Thomas Lichtenstein

Geboren am 18.04.1980 in Aachen, ledig

Eltern: Dr. med. Alexander Lichtenstein, Internist
Dr. med. Mechthild Lichtenstein, Dermatologin

Geschwister: Thorsten Lichtenstein, Arzt, geb. am 15.03.1982

- Evangelischer Kindergarten von August 1983 bis Juli 1986 in Aachen
- Katholische Grundschule Höfchensweg von August 1986 bis Juli 1990
- Couvengymnasium von August 1990 bis Juni 1999
- Abitur im Mai 1999
- Weltreise von Juli 1999 bis April 2000
- Beginn des Medizinstudiums an der RWTH Aachen zum WS 2000/2001
- Ärztliche Vorprüfung im September 2002
- Medizinstudium in Hamburg von WS 2002 bis WS 2006/2007
 - Medizinstudium in Bordeaux im WS 2003/2004
- Ärztliche Approbation im Mai 2007
- Beginn des Zahnmedizinstudiums an der RWTH Aachen zum WS 2007/2008
- Abschluss des zahnärztlichen Staatsexamens im April 2010

Eidesstattliche Versicherung:

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

Unterschrift: