

**Lipoproteinsubfraktionen: Isolierung und Messmethoden, biochemische
Charakterisierung und funktionelle Eigenschaften**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch
die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biochemikerin Lilli Wiens / Weingard

geb. am 28.04.1970 in Almaty

Gutachter: Prof. Dr. med. Claus Luley
Prof. Dr. Peter Schuff-Werner
Prof. Dr. Ralf Bohnensack

Eingereicht am: 29.10.2003

Verteidigung am: 10.02.2004

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. C. Luley für die Vergabe des Themas, die vielfältige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie für die geführten Diskussionen ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank geht an OÄ Dr. S. Westphal für die stete Hilfe bei der Auswahl von Probanden, für aufwendige Bereitstellung von Probandenmaterial sowie für vielfältige Hinweise und Anregungen.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei R. Makarova, E.-M. Gittel und K. Deneser für praktische Hinweise, ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für großes Interesse an meiner Arbeit.

Für das gute Arbeitsklima und die fachlichen Anregungen danke ich PD Dr. J. Dierkes, E. Wölfel, S. Wans, K. Borucki, J. Heinz, S. Kästner, E. Taneva, U.-L. Zimmermann-Krause und allen anderen Kollegen.

Nicht zuletzt möchte ich mich beim Dr. Bode, Universität Ulm und Dr. Rothe, Institut für medizinische Neurobiologie, Magdeburg für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen herzlich bedanken.

Für liebevolle Unterstützung bedanke ich mich bei meiner Familie.

| | | |
|---------------------------|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | | I |
| | Abkürzungsverzeichnis | IV |
| | Abbildungsverzeichnis | VI |
| | Tabellenverzeichnis | IX |
| 1. | <u>Einleitung</u> | 1 |
| 2. | <u>Fragestellung</u> | 5 |
| 3. | <u>Material und Methoden</u> | 6 |
| 3.1. | Gewinnung von Serum und Plasma | 6 |
| 3.2. | Konzentrationsbestimmung von Lipiden und Apolipoproteinen im Serum | 6 |
| 3.2.1. | Ermittlung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen | 6 |
| 3.2.2. | Ermittlung von Apolipoproteinkonzentration | 7 |
| 3.3 | Ultrazentrifugation | 8 |
| 3.3.1. | Isolierung von VLDL, LDL, HDL und LPDS (<i>lipoprotein deficient serum</i>) | 9 |
| 3.3.2. | Entfernen von Lipoproteinen aus den Ziegen-Antiseren | 10 |
| 3.4. | Immunpräzipitation | 10 |
| 3.4.1. | Optimierung der Immunpräzipitation durch Zugabe von Immunpräzipitationsverstärkern | 11 |
| 3.4.2. | Isolierung der Lipoproteine mittels Immunpräzipitation und anschließender Ultrazentrifugation | 12 |
| 3.5. | Gelfiltrationschromatographie | 12 |
| 3.5.1. | Trennung von Lipoproteinen mit FPLC | 12 |
| 3.5.2. | Trennung von Lipoproteinen mit 6B-Sepharose-Säule | 13 |
| 3.6. | Immunabsorption | 13 |
| 3.6.1. | Herstellung einer HDL-Säule, Aufreinigung der Antikörper | 13 |
| 3.6.2. | Doppeldiffusion nach Ochterlony | 15 |
| 3.6.3. | Isolierung von Lipoproteinsubfraktionen | 15 |
| 3.6.4. | Durchsuchen von Probandenseren auf das Vorhandensein von LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E | 16 |
| 3.7. | Biochemische Charakterisierung der Lipoproteinsubpopulationen | 17 |
| 3.7.1. | Ermittlung der Triglycerid-, Cholesterin- und Apolipoproteinmolekülzahl | 17 |
| 3.7.2. | Lipidelektrophorese | 17 |
| 3.7.3. | Elektronenmikroskopie | 18 |
| 3.7.4. | Isoelektrische Fokussierung | 18 |
| 3.8. | Zellversuche | 19 |
| 3.8.1. | Zellkultur von humanen Fibroblasten | 19 |
| 3.8.2. | Markierung der Lipoproteine mit DiI | 20 |
| 3.8.3. | Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in humane Fibroblasten | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.9. Chemikalien und Puffer | 21 |
| 4. <u>Ergebnisse</u> | 24 |
| 4.1. Immunpräzipitation | 24 |
| 4.1.1. Methodenoptimierung | 24 |
| 4.1.1.1. Optimierung der Reaktionszeit und der Temperatur | 25 |
| 4.1.1.2. Ermittlung des optimalen Immunpräzipitationsverstärkers | 25 |
| 4.1.1.3. Optimierung der Antikörpermengen | 27 |
| 4.1.2. Charakteristika von Lipoproteinsubfraktionen nach Immunpräzipitation | 27 |
| 4.1.2.1. Lipidzusammensetzung der Lipoproteinsubfraktionen nach Immunpräzipitation und anschließender Ultrazentrifugation | 28 |
| 4.1.2.2. Relativer Lipidbeitrag der Lipoproteinsubfraktionen zu den Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in VLDL und LDL | 30 |
| 4.1.2.3. Größenverteilung in Lipoproteinsubfraktionen nach Ultrazentrifugation und nachfolgender Immunpräzipitation | 33 |
| 4.1.3. Unplausibilitäten im Quantifizieren der Lipide und Apolipoproteine nach Immunpräzipitation | 35 |
| 4.1.3.1. Methodenbezogene Untersuchungen zur Klärung der unplausiblen Immunpräzipitationsergebnisse | 39 |
| 4.1.3.1.1. Korrektur der Immunpräzipitationsergebnisse für die Lipidkonzentrationen in den Antiseren | 39 |
| 4.1.3.1.2. Einfluss der Probenmatrix auf die Bestimmung der Lipide und Apolipoproteine nach der Immunpräzipitation | 40 |
| 4.1.3.2. Biochemische Untersuchungen zur Klärung der unplausiblen Immunpräzipitationsergebnisse | 42 |
| 4.1.3.2.1. Vergleich der Lipoproteinzusammensetzung bei Probanden mit unterschiedlich hohen Triglyceridkonzentrationen | 42 |
| 4.1.3.2.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der VLDL- und LDL-großen Lipoproteine aus den normo- und hypertriglyceridämischen Probandenserem | 43 |
| 4.2. Immunabsorption | 45 |
| 4.2.1. Einfluss der Natriumthiocyanatkonzentration auf die Wiederfindungsrate | 46 |
| 4.2.2. Charakteristika von Lipoproteinsubfraktionen nach Immunabsorption und Elution mit 3M bzw. 5M NaSCN | 47 |
| 4.2.2.1. Biochemische Charakteristika | 47 |
| 4.2.2.2. Elektrophoretische Charakteristika | 49 |
| 4.3. Vergleich der Immunpräzipitation mit der Immunabsorption | 49 |
| 4.4. Biochemische und funktionelle Charakterisierung der Lipoproteinsubfraktionen von Probanden mit Hyperlipoproteinämie | 53 |
| 4.4.1. Untersuchen der Probandenserem auf Vorhandensein definierter Lipoproteinpartikel | 54 |
| 4.4.2. Größenverteilung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E | 56 |
| 4.4.3. Zusammensetzung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E | 60 |
| 4.4.4. Elektrophoretische Mobilität von LpB, LpB:C-III und LpB:C-III:E | 61 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.4.5. | Internalisation von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in humane Fibroblasten | 62 |
| 5. | <u>Diskussion</u> | 65 |
| 5.1. | Methodenauswahl | 66 |
| 5.1.1. | Immunpräzipitation – Vorteile und Probleme | 66 |
| 5.1.2. | Immunabsorption – eine Alternative zur Immunpräzipitation | 72 |
| 5.1.2.1. | Diskrepanzen zwischen Immunabsorption und Immunpräzipitation | 72 |
| 5.1.2.2. | Weitere methodische Aspekte zur Isolierung der Lipoproteinsubfraktionen | 73 |
| 5.2. | Charakteristika der Lipoproteinsubfraktionen | 74 |
| 5.2.1. | Biochemische Charakteristika | 75 |
| 5.2.1.1. | Lipidzusammensetzung | 75 |
| 5.2.1.2. | Migrationsverhalten in der Elektrophorese | 78 |
| 5.2.1.3. | Größenverteilung | 78 |
| 5.2.2. | Vorkommen der Lipoproteinsubfraktionen beim Menschen | 80 |
| 5.3. | Lipoproteinsubfraktionen im Zellversuch | 82 |
| 5.3.1. | Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in Abhängigkeit von der Apolipoproteinzusammensetzung | 83 |
| 5.3.2. | Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in Abhängigkeit von der Größe | 86 |
| 5.4. | Überlegungen zur medizinischen Relevanz der Lipoproteinsubfraktionen | 87 |
| 5.4.1. | Potentieller Metabolismus einzelner Lipoproteinsubfraktionen | 88 |
| 5.4.2. | ApoB-haltige Lipoproteinsubfraktionen und Atherogenese | 91 |
| 5.4.3. | Pro- und contra: „ <i>family concept</i> “ | 93 |
| 5.4.4. | Ausblick | 95 |
| 6. | <u>Zusammenfassung</u> | 97 |
| 7. | <u>Literaturverzeichnis</u> | 98 |
| 8. | <u>Anhang</u> | 109 |

Wissenschaftliche Leistungen

Selbstständigkeitserklärung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| Å | Ångström (10^{-10} m) |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Ag | Antigen |
| Ak | Antikörper |
| Anti-C-III- | Antikörper gegen Apolipoprotein C-III, verwendet für die Fällung / Immunitätssäule |
| Anti-E- | Antikörper gegen Apolipoprotein E, verwendet für die Fällung / Immunitätssäule |
| ApoB | Apolipoprotein B |
| ApoC-III | Apolipoprotein C-III |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUC | engl. <i>area under curve</i> |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CE | Cholesterinester |
| CH | Cholesterin |
| Chyl. | Chylomikronen |
| CNBr | Cyanbromid |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| Combi-CRF | Immunpräzipitation mit Anti-C-III und Anti-E-Antikörpern engl. <i>chronic renal failure</i> |
| d.h. | das heißt |
| Diab. M. | Diabetes mellitus |
| DiI | 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin |
| DMEM | engl. <i>Dulbecco's minimal essential medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> |
| ELISA | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| Fa. | Firma |
| FC | freies Cholesterin |
| FCS | engl. <i>fetal calf serum</i> |
| FPLC | engl. <i>fast performance liquid chromatography</i> |
| H | engl. <i>hour</i> |
| H ₃ PO ₄ | Phosphorsäure |
| HCH | Hypercholesterinämie |
| HDL | engl. <i>high density lipoproteins</i> |
| HDL-C | HDL-Cholesterin |
| HSPG | Heparansulfatproteoglykan |
| HTG | Hypertriglyceridämie |
| HTGL | Hepatische Triglyceridlipase |
| IDL | engl. <i>intermediate density lipoproteins</i> |
| KBr | Kaliumbromid |
| KDa | Kilodalton |
| KHK | koronare Herzerkrankung |
| korr. | Korrigiert |

| | |
|-------------|--|
| LCAT | Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase |
| LDL | engl. <i>low density lipoproteins</i> |
| LDL-C | LDL-Cholesterin |
| Lp-3M | Lipoproteinsubfraktion, die mit 3M NaSCN-Lösung von den Immunaффinitäts-säulen eluiert wurde |
| Lp-5M | Lipoproteinsubfraktion, die mit 5M NaSCN-Lösung von den Immunaффinitäts-säulen eluiert wurde |
| LpB | Lipoproteine, die nur ApoB enthalten |
| LpB:C-III:E | Lipoproteine, die ApoB, ApoC-III und ApoE enthalten |
| LpB:C-III | Lipoproteine, die ApoB und ApoC-III enthalten |
| LpB:E | Lipoproteine, die ApoB und ApoE enthalten |
| LPDS | engl. <i>Lipoprotein deficient serum</i> |
| LPL | Lipoproteinlipase |
| LRP | engl. <i>LDL-receptor-related protein</i> |
| Mda | Megadalton |
| Min | Minuten |
| Mr | Molekulargewicht |
| n.korr. | nicht korrigiert |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaJ | Natriumjodid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NaSCN | Natriumthiocyanat |
| NL | engl. <i>normolipidemic</i> |
| n.s. | nicht signifikant |
| PBS | engl. <i>phosphate buffered saline</i> |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PL | Phospholipide |
| Prot.A | Protein A |
| PWS | Phosphorwolframsäure |
| RAP | engl. <i>receptor associated protein</i> |
| rpm | engl. <i>Revolutions per minute</i> |
| SDS | engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TC | Total-Cholesterin |
| TG | Triglyceride |
| UZ | Ultrazentrifugation |
| VLDL | engl. <i>very low density lipoproteins</i> |
| z.B. | zum Beispiel |

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PROCAM (Münster Heart Study): Prävalenz von Risikofaktoren in Gruppen mit und ohne koronare Ereignisse.

Abbildung 2: Isolierung einzelner Lipoproteinsubfraktionen.

Abbildung 3: Einfluss des Phosphatpuffers im Vergleich zu NaCl-Lösung auf die Immunpräzipitationseffizienz.

Abbildung 4: Effizienz der Immunpräzipitation bei Zugabe von 25% PEG, bzw. Protein A.

Abbildung 5: Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in VLDL bzw. LDL vor und nach der jeweiligen Fällung.

Abbildung 6: Größenverteilung von Lipoproteinsubfraktionen nach Immunpräzipitation und nachfolgender Ultrazentrifugation.

Abbildung 7: Vergleich der Lipid- bzw. Apolipoproteinkonzentrationen in den Lipoproteinen unterschiedlicher Größe vor und nach der Anti-C-III- bzw. Anti-E-Immunpräzipitation in einem Probandenserum mit Gesamttriglyceridkonzentration von 1,51 mmol/l.

Abbildung 8: Vergleich der Lipid- bzw. Apolipoproteinkonzentrationen in den Lipoproteinen unterschiedlicher Größe vor und nach Anti-C-III-, Anti-E- und der Combi-Fällung in einem Probandenserum mit Gesamttriglyceridgehalt von 7,2 mmol/l.

Abbildung 9: Vergleich der Triglycerid-, Cholesterin-, ApoB-, ApoC-III- und ApoE-Konzentrationen nach den jeweiligen Immunpräzipitationen bei Zugabe von NaCl-Lösung bzw. Ziegen-Serum.

Abbildung 10: TG-, CH-, ApoC-III- und ApoE-Molekülzahl pro Partikel in VLDL-großen Lipoproteinen: 1) in Probandenserum mit Gesamttriglyceriden von 2,6 mmol/l (n = 5); 2) in Probandenserum mit Gesamttriglyceriden von 6,1 mmol/l (n = 4); 3) in Probandenserum mit Gesamttriglyceriden von 12,6 mmol/l (n = 4).

Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VLDL- und LDL- großen Lipoproteinen aus einem hypertriglyceridämischen Probandenserum (Gesamttriglyceride im Serum 7,9 mmol/l) und aus Serum eines gesunden Probanden (Gesamttriglyceride im Serum 2,1 mmol/l).

Abbildung 12: Größenverteilung von a) LpB:C-III nach Abtrennung von LpB, LpB:C-III:E und LpB:E; b) LpB:C-III nach erneutem Auftragen auf die Anti-C-III-Säule und Elution mit 3M NaSCN (Lp-3M); c) LpB:C-III nach Elution mit 5M NaSCN (Lp-5M).

Abbildung 13: Elektrophoretische Mobilität von LpB:C-III, das mit 3M, bzw. 5M NaSCN-Lösung eluiert wurde.

Abbildung 14: Verteilung der Lipoproteinsubfraktionen nach Größe (FPLC) a) im nativen Serum; b) in der nicht retinierten, konzentrierten Fraktion nach der Anti-C-III-Säule; c) im Überstand nach der Anti-C-III-Fällung; d) in der nicht retinierten, konzentrierten Fraktion nach der Anti-E-Säule; e) im Überstand nach der Anti-E-Fällung.

Abbildung 15: Größenverteilung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in drei untersuchten Probanden.

Abbildung 16: Vergleich der Zusammensetzung von VLDL- und LDL-großen LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in drei unterschiedlichen Probandenserum.

Abbildung 17: Elektrophoretische Mobilität von VLDL- und LDL-großen LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E.

Abbildung 18: Internalisation von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in humane Fibroblasten.

Abbildung 19: Zusammenfassung der Literaturangaben zur Lipoproteinzusammensetzung bei verschiedener Pathogenese.

Abbildung 20: Möglicher Metabolismus von LpB, LpB:E und LpB:C-III:E beim gesunden Probanden.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HITACHI-Applikationen für die Bestimmung von Apolipoproteinkonzentrationen mit der „*high*“- und „*low*“-Methode.

Tabelle 2: Pipettierschema der Immunpräzipitationsansätze.

Tabelle 3: Pipettierschema zur Bestimmung der Präzipitationseffizienz.

Tabelle 4: Serum Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in den untersuchten Probandengruppen.

Tabelle 5: Errechnete prozentuelle Verteilung der Triglyceride und des Cholesterins in den Lipoproteinsubfraktionen in VLDL.

Tabelle 6: Errechnete prozentuelle Verteilung der Triglyceride und des Cholesterins in den Lipoproteinsubfraktionen in LDL.

Tabelle 7: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen eines Probandenserums nach den drei Immunpräzipitationen (Anti-C-III-, Anti-E- und Combi-Fällung).

Tabelle 8: Partikelzusammensetzung von Lp-3M und Lp-5M, die vom LpB:C-III durch Eluieren mit 3M und 5M NaSCN-Lösung isoliert worden sind.

Tabelle 9: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in drei Probandenserum, die zuvor mit der Anti-E-Säule aufgetrennt wurden. Die retinierte Fraktion, die das LpB:C-III:E enthält, wurde anschließend mit ApoE-Antiserum präzipitiert.

Tabelle 10: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in drei Probandenserum, die zuvor mit der Anti-C-III-Säule aufgetrennt wurden. Die retinierte Fraktion, die das LpB:C-III:E enthält, wurde anschließend mit ApoC-III-Antiserum präzipitiert.

Tabelle 11: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen sowie nachgewiesene Lipoprotein-subpopulationen in den untersuchten Probandenseren.

Tabelle 12: Vergleich der in dieser Dissertation angewandten Methoden zur Isolierung und Quantifizierung der Lipoproteinsubfraktionen mit den von Alaupovic *et al.* [56] und Campos *et al.* [62] angegebenen Verfahren.

Tabelle 13: Charakteristika der ApoB-haltigen Lipoproteine – Vergleich der Arbeiten von Alaupovic *et al.* und der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 14: Zusammenfassung der biochemischen und metabolischen Eigenschaften der Lipoproteinsubfraktionen in Hinsicht auf ihre mögliche Atherogenität.

Tabellen im Anhang

Tabelle A: Funktion der bekannten Apolipoproteine und deren Vorkommen in den Lipoproteinen [102].

Tabelle B: Überblick über die Lipoproteinrezeptoren und deren Funktion [102].

Tabelle C: Physiko-chemische Eigenschaften der Lipoprotein-Dichtefraktionen [102].

Tabelle D: Überblick über klinische Studien, die den Zusammenhang zwischen Dyslipoproteinämien und KHK widerspiegeln [10, 131].

Tabelle E: Überblick über klinische Studien, die den Zusammenhang zwischen den triglyceridreichen Lipoproteinen und der Atherogenese widerspiegeln [10, 131].

1. Einleitung

Atherosklerotische Gefäßveränderungen und deren Folgen – periphere Verschlusskrankheit, Schlaganfall, Herzinfarkt und plötzlicher Herztod – gehören zu den häufigsten Krankheits- und Todesursachen in den Industrienationen der westlichen Welt [1]. In den USA verursachen kardiovaskuläre Erkrankungen ca. 950000 Todesfälle pro Jahr, dies entspricht 41,5 % aller Todesfälle [2].

In einer Vielzahl von prospektiven Langzeituntersuchungen konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen der Manifestation atherosklerotischer Erkrankungen und dem Auftreten bestimmter Risikofaktoren eindeutig gesichert werden. Zu den unabhängigen Risikofaktoren der Atherosklerose zählen heute Hyper- und Dyslipoproteinämien, Rauchen, Hypertonie, Diabetes mellitus, Lebensalter, Geschlecht, positive Familienanamnese, Nikotinabusus, Adipositas und mangelnde körperliche Aktivität [3-7]. Abbildung 1 zeigt Ergebnisse der PROCAM – Studie zur Prävalenz von Risikofaktoren in Gruppen mit und ohne koronare Ereignisse [8, 9].

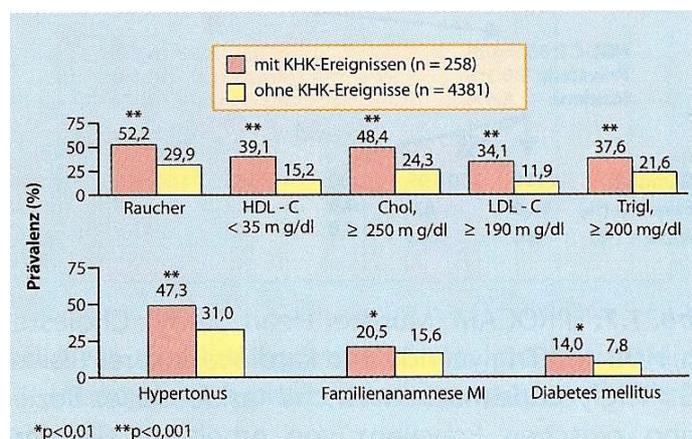


Abbildung 1: PROCAM (Münster Heart Study): Prävalenz von Risikofaktoren in Gruppen mit und ohne koronare Ereignisse.

Zur Ätiologie der Atherosklerose wurde eine Reihe an Hypothesen formuliert, die die herausragende Bedeutung einzelner Risikofaktoren bzw. -konstellationen betonen. Zum Beispiel die Lipidhypothese besagt, dass eine Dyslipoproteinämie (Cholesterin-, LDL-, VLDL-, Lipoprotein (a) -Erhöhung, HDL-Erniedrigung) zentral für den Atheroskleroseprozess ist. Die „Response to injury“ – Theorie beruht darauf, dass der Atherosklerose eine primäre Endothelverletzung vorausgeht. Potentiell atherogene Faktoren, z.B. Infektionen, modifizierte

Lipoproteine, blutdruckvermittelte mechanische Schäden oder auch veränderte Immunität könnten den Schaden hervorrufen. Im zweiten Schritt kommt es zu einer Lipidakkumulation und zu einem zunehmenden Gefäßverschluss [10]. Übereinstimmend für alle Hypothesen ist jedoch die Feststellung, dass die Lipoproteine die Hauptakteure im atherosklerotischen Geschehen sind.

Lipoproteine sind komplex zusammengesetzte Gebilde, die für den Transport von Phospholipiden, Triglyceriden, Cholesterin und dessen Ester verantwortlich sind. Ein anderer Bestandteil der Lipoproteine – die Apolipoproteine – sind nicht nur für die Löslichkeit und Strukturstabilität der Lipoproteine, sondern auch für deren Schicksal in der Zirkulation verantwortlich. Apolipoproteine üben eine Vielfalt an Funktionen aus (Tabelle A, Anhang): einerseits sind sie Kofaktoren vieler enzymatischen Reaktionen, andererseits vermitteln sie die Bindung der Lipoproteine an die Zellrezeptoren (Tabelle B, Anhang). Die physikochemischen Eigenschaften der Lipoproteine wie Dichte, Größe und Ladung wurden als Grundlage für die konventionelle Klassifizierung der Lipoproteine in VLDL, LDL und HDL bzw. in α -, β - und prä- β - Lipoproteine verwendet (Tabelle C, Anhang).

Eine Großzahl an epidemiologischen Interventionsstudien sowie Befunde aus der Grundlagenforschung konnten Aufschluss über das atherogene bzw. anti-atherogene Potential der einzelnen Lipoproteinklassen geben. Angiographisch kontrollierte Studien (MAAS [11], REGRESS [12], LCAS [13], Post-CABG [14]), Primär- (WOSCOP [15], AFCAPS/TexCAPS [16]) und Sekundärpräventionsstudien (4S [17], LIPID [18], CARE [19]) konnten zeigen, dass eine Senkung des LDL-Cholesterins, der Triglyceride und die Steigerung des HDL-Cholesterins zur Reduktion der Progressionsrate (Einengung der Blutgefäße) bzw. zur Reduktion der koronaren Endpunkte führt (Tabelle D, Anhang).

Während die atherogene Rolle von LDL und die anti-atherogenen Eigenschaften von HDL unumstritten sind, wurde die Beteiligung der triglyceridreichen Lipoproteine in der Atherogenese angezweifelt. Denn der positive Zusammenhang zwischen Triglyceriden und kardiovaskulären Ereignissen verlor an Bedeutung, wenn in multivariaten Analysen gleichzeitig für das erniedrigte HDL-Cholesterin bzw. das erhöhte Gesamt-Cholesterin kontrolliert wurde. Gegenwärtig sind Beweise für die atherogenen Eigenschaften der triglyceridreichen Lipoproteine nicht nur in den Tierversuchen, sondern auch in epidemiologischen Studien erbracht worden. Es konnte gezeigt werden, dass triglyceridreiche Lipoproteine

- die Lipid-Akkumulation von peritonealen Makrophagen fördern [20],
- die Blut-Plättchen-Aggregation stimulieren [21] und zur Abnahme der fibrinolytischen Aktivität beisteuern [22, 23],
- die Endothel-abhängige Vasodilatation beeinträchtigen [24],
- in atherosklerotischen Läsionen vorhanden sind [25],
- im Tiermodell ein besserer Parameter zur Abschätzung der Atherosklerose-Entwicklung sind als der konventionell angewandte Parameter – das LDL-Cholesterin [26],
- bei ApoC-III-transgenen Mäusen einen signifikanten Beitrag zur Entwicklung der Atherosklerose leisten [27],
- einen unabhängigen Risiko-Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen [28-31, 32] (Tabelle E, Anhang).

Die relative Atherogenität der triglyceridreichen Lipoproteine ist durch ihre metabolischen und funktionellen Eigenschaften sowie durch ihre ausgeprägte strukturelle Heterogenität zu erklären. Die konventionelle Einteilung der triglyceridreichen Lipoproteinen in VLDL und IDL ist zwar allgemein anerkannt und benutzt, spiegelt jedoch nur eine Eigenschaft der Lipoproteine - ihre Dichte - wider. Für das Schicksal der Lipoproteine in der Zirkulation ist jedoch nicht die Dichte des Partikels, sondern dessen Apolipoproteinzusammensetzung und Größe verantwortlich. Unter normalen Bedingungen werden die triglyceridreichen Lipoproteine hydrolysiert und von den Zellen aufgenommen. In den Zellen werden die in den Lipoproteinen transportierten Triglyceride zur Energiegewinnung oder das Cholesterin z.B. für die Hormon- bzw. Membransynthese verwendet. Die Aufnahme der Lipoproteine erfolgt hauptsächlich über Zellrezeptoren, denen Apolipoproteine als Liganden dienen (Tabelle A und B, Anhang). Ist die Aufnahme der Lipoproteine aufgrund ihrer Apolipoproteinzusammensetzung oder durch einen Zellrezeptordefekt gestört, sind Lipoprotein-Konzentrationserhöhungen zu beobachten. Ob die Lipoproteine in der Zirkulation verbleiben oder die Gefäßwand durchdringen, um von Makrophagen aufgenommen zu werden und hiermit ihren Beitrag zur Entstehung von atherosklerotischen Plaques zu leisten, hängt von mehreren Faktoren ab. Einer davon ist die Lipoprotein-Größe. Nur Lipoproteine, die kleiner als 75 nm sind, können die intakte Endothelwand passieren [33]. Große triglyceridreiche Lipoproteine, wie Chylomikronen und VLDL, können nur nach einer Endothelzell-Läsion in die Arterienwand eindringen. Diese Lipoproteine werden abhängig von der Apolipoprotein-zusammensetzung zu Remnants oder zu LDL hydrolysiert und werden entweder von den Zellen der Leber bzw. der Peripherie oder auch von den Makrophagen im subendothelialen

Raum metabolisiert. Demzufolge ist nicht nur die Lipid-, sondern auch die Apolipoprotein-zusammensetzung und die Größe der Lipoproteine für das Verständnis der atherosklerotischen Vorgänge sowie der Ursachen verschiedener Hyperlipoproteinämien entscheidend.

Aus diesem Grund wurde von Alaupovic *et al.* [34] in den siebziger Jahren eine alternative Klassifikation für die Lipoproteine vorgeschlagen – das Lipoproteinfamilien-Konzept. Demnach wurden die Lipoproteine in ApoA-I- und ApoB-haltige Familien eingeteilt. Die ApoA-I-Gruppe wurde in LpA-I und LpA-I:A-II unterteilt, die ApoB-haltigen Lipoproteine in LpB, LpB:C, LpB:E, LpB:C:E und LpA-II:B:C:D:E. Alle Lipoproteinfamilien setzen sich aus heterogenen Partikeln zusammen, die sich in Größe, Dichte sowie dem Lipid/Protein-Verhältnis unterscheiden, deren Apolipoproteinkomposition dagegen homogen ist [35]. Während VLDL und IDL hauptsächlich aus LpB:C, LpB:E, LpB:C:E und LpA-II:B:C:D:E und LDL aus LpB bestehen, setzen sich HDL aus LpA-I und LpA-I:A-II zusammen.

In einer kleinen Zahl an Studien, die den Zusammenhang zwischen der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen und den triglyceridreichen Lipoproteinsubfraktionen untersucht haben, konnte gezeigt werden, dass

bei Patienten mit erhöhten LpB:C- und LpB:C:E-Spiegeln ein Fortschreiten der atherosklerotischen Läsionen zu verzeichnen war, obwohl die LpB-Konzentration (entspricht der LDL-Konzentration) gesenkt worden war [35, 36],

bei Überlebenden nach einem Myokardinfarkt im Vergleich zu Kontrollen höhere Konzentrationen an ApoC-III-haltigen LpB ermittelt werden konnten [37].

Bezüglich der Rolle der triglyceridreichen Lipoproteine in der Atherogenese stehen diese Ergebnisse im Einklang mit den Studien, die Gesamt-Triglyceride als Risiko-Faktor untersucht haben, enthalten jedoch zusätzliche Informationen zur relativen Atherogenität der ApoB-haltigen Lipoproteine.

Die kleine Zahl an durchgeführten Studien sowie die geringen Zahlen an untersuchten Patienten können auf das Fehlen einer Referenzmethode zur Bestimmung von Lipoproteinsubfraktionen zurückgeführt werden. Der Größen-Aspekt wurde in keiner der durchgeführten Studien einbezogen. Weiterhin sind nur wenige Untersuchungen durchgeführt, die nicht nur physiko-chemische Eigenschaften der einzelnen Lipoproteinsubfraktionen bei verschiedenen Erkrankungen, sondern auch deren funktionelle Eigenschaften berücksichtigen.

2. Fragestellung

In letzter Zeit wurden mehrere Beweise zur möglichen Atherogenität der ApoB-haltigen Lipoproteine erbracht. Welches der strukturell und funktionell heterogenen Lipoproteine das höchste atherogene Potential trägt, bleibt noch zu klären. Vor diesem Hintergrund sollten daher folgende Aspekte untersucht werden:

- 1) Entwicklung und Optimierung eines immunologischen Verfahrens zur Trennung von Lipoproteinsubfraktionen, mit dem eine Isolierung von nahezu intakten Lipoproteinen bestimmter Größe mit einem definierten Apolipoproteinbesatz möglich ist.
- 2) Charakterisierung der biochemischen und funktionellen Eigenschaften der aus humanem Serum isolierten Lipoproteinsubfraktionen (LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E).

3. Material und Methoden

3.1. Gewinnung von Serum und Plasma

Die Blutentnahme erfolgte am nüchternen Probanden. Für die Serum- als auch für die Plasma-Gewinnung wurden Vacutainer der Fa. Becton Dickinson, USA verwendet. Der Serumvacutainer enthält als Zusatz ein Gel, das die Trennung der zellulären Bestandteile des Blutes vom Serum ermöglicht, sowie einen Gerinnungsaktivator (Gel and Clot Activator). Der Plasmavacutainer hat K₃-EDTA [0,85 mmol/l] als Zusatz. Durch EDTA-Komplexierung der Ca²⁺-Ionen im Plasma wurde die Gerinnung inhibiert. Die Proben wurden 10 Min bei 3000 rpm und 10° C zentrifugiert (Heraeus, Labofuge 400 R, BRD). Das Serum bzw. das Plasma wurden sofort für die Isolierung der Lipoproteine eingesetzt.

3.2. Konzentrationsbestimmung von Lipiden und Apolipoproteinen im Serum

Cholesterin-, Triglycerid- und Apolipoprotein-Konzentrationen im nativen Serum sowie in den UZ- und Säulenfraktionen wurden photometrisch bzw. turbidimetrisch am Autoanalyser (Hitachi 911/Boehringer Mannheim, BRD) bestimmt. Dafür wurden kommerzielle Tests der Fa. Roche, Schweiz verwendet. Die Konzentrationsbestimmungen von ApoC-III und ApoE wurden mittels einer in-house Methode durchgeführt.

3.2.1. Ermittlung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen

Die Bestimmung der Triglyceridkonzentration (GPO/PAP-Methode) beinhaltet folgende Schritte:

- 1) Triglyceride + 3H₂O → Glycerin + 3 RCOOH
- 2) Glycerin + ATP → Glycerin-3-phosphat + ADP
- 3) Glycerin-3-phosphat + O₂ → Dihydroxyacetonphosphat + H₂O₂
- 4) H₂O₂ + 4-Aminophenazon + 4-Chlorphenol → 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon + 2 H₂O + HCl

Diese Reaktionen wurden durch folgende Enzyme katalysiert: 1) Lipoproteinlipase, 2) Glycerol-Kinase, 3) Glycerin-phosphat-oxidase und 4) Peroxidase. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei 505/700 nm.

Die Cholesterinbestimmung (CHOD-PAP-Methode) wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt:

- 1) Cholesterinester + H₂O → Cholesterin + RCOOH
- 2) Cholesterin + O₂ → Δ⁴-Cholestenon + H₂O₂
- 3) H₂O₂ + 4-Aminophenazon + Phenol → 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon + 4 H₂O

Die erste Reaktion wurde von der Cholesterinesterase, die zweite Reaktion von der Cholesterinoxidase und die dritte Reaktion von der Peroxidase katalysiert. Die Änderung der Extinktion wurde bei 505/700 nm gemessen.

Abhängig davon, ob die Bestimmung im Serum oder in Säulenfraktionen erfolgte, wurden unterschiedliche Probemengen für die Reaktion verwendet. Für die Konzentrationsbestimmung im Serum wurden nur 3 µl verwendet („*high*“-Methode), in den Säulenfraktionen - 9 µl („*low*“-Methode). Dieser Mengenunterschied wurde wegen einer starken Verdünnung der Probe in den Säulenfraktionen notwendig. Vor jeder Analysenserie wurde eine 2-Punkt-Kalibration mit einer anschließenden Bestimmung der Triglycerid- bzw. Cholesterinkonzentrationen in den Kontrollseren (Precinorm und Precipath der Fa. Roche, Schweiz) durchgeführt.

3.2.2. Ermittlung von Apolipoproteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der ApoB-Konzentration wurde ein kommerzieller immunologischer Trübungstest der Fa. Rolf Greiner Biochemica, BRD verwendet. Im ersten Reaktionsschritt wurde zu der Probe PEG- sowie Detergenzlösung zugesetzt. Im zweiten Schritt erfolgte die Zugabe von Anti-human ApoB-Antikörper (Ziege). Die durch Präzipitation entstandene Trübung wurde bei 340 nm gemessen.

Die Bestimmung der ApoE- und der ApoC-III-Konzentrationen erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die des ApoB. Im zweiten Reaktionsschritt wurden jedoch die Anti-human ApoE- bzw. ApoC-III-Antiseren (Ziege) zugegeben. Der Trübungsnachweis erfolgte ebenfalls bei 340 nm. Die Applikation für den HITACHI wurde jedoch in Vorversuchen festgelegt [38].

Bei den Bestimmungen der Apolipoproteinkonzentrationen im Serum bzw. in den Säulenfraktionen wurden auch wie bei der Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen unterschiedliche Methoden angewandt: die „high“- und die „low“-Methode. Der Unterschied zwischen den beiden Methoden lag in der Konzentration der PEG-Lösung, deren Menge sowie der Menge der zugefügten Antiseren und der Probe (Tabelle 1). Für die „low“-Methode wurde das Anti-C-III- und Anti-E-Antiserum 1+3 verdünnt.

| Test | „high“-Methode | | | | „low“-Methode | | | |
|-----------------|----------------|-----------|----------|-------------|---------------|-----------|----------|-------------|
| | PEG-Konzentr. | PEG-Menge | AK-Menge | Probenmenge | PEG-Konzentr. | PEG-Menge | AK-Menge | Probenmenge |
| ApoB | 4,8 % | 250 µl | 50 µl | 2 µl | 4,8 % | 200 µl | 50 µl | 25 µl |
| ApoC-III | 4,8 % | 240 µl | 25µl | 5 µl | 7,0 % | 180 µl | 25 µl | 50 µl |
| ApoE | 4,8 % | 250 µl | 35 µl | 5 µl | 7,0 % | 180 µl | 37 µl | 50 µl |

Tabelle 1: HITACHI-Applikationen für die Bestimmung von Apolipoproteinkonzentrationen mit der „high“- und „low“-Methode.

Jede Analyseserie fing mit einer 6-Punkt-Kalibration der beiden Methoden mit NT-Standard (Dade Behring, BRD) an. Für die low-Methode wurde der Kalibrator 1+15 verdünnt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apolipoproteinkonzentrationen in den Kontrollseren. Während das Kontrollserum (Apolipoprotein-Kontrollserum CHD, Dade Behring, BRD) für die „high“-Methode unverdünnt eingesetzt wurde, wurde für die „low“-Methode ein Verdünnung 1+9 angewandt.

3.3. Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugationsmethode wurde zur Isolierung von VLDL, LDL und HDL eingesetzt. Diese Methode wurde sowohl für präparative als auch für analytische Zwecke ange-

wandt. HDL wurden für die Herstellung der HDL-Säule verwendet und VLDL wurden im Rahmen der Immunpräzipitationsuntersuchungen isoliert und charakterisiert. Außerdem wurde die Ultrazentrifugation zum Entfernen der Lipide aus den Ziegen-Antiseren verwendet. Alle Ultrazentrifugationsschritte wurden mit der Ultrazentrifuge Beckman L7-55, USA durchgeführt.

3.3.1. Isolierung von VLDL, LDL, HDL und LPDS (*lipoprotein deficient serum*)

Die präparative Trennung der VLDL und LDL von den HDL erfolgte durch Einstellung der Serumdichte mit KBr auf 1,06 g/ml. Nach der Ultrazentrifugation bei 45000 rpm für 24 h bei 4° C wurde der Überstand abgenommen und mit NaCl-Lösung auf eine Dichte von 1,019 g/ml gebracht. Nach einer zweiten Zentrifugation für 24 h bei 45000 rpm und 10° C wurden die VLDL (im Überstand) und die LDL (im Unterstand) voneinander getrennt. Die Konzentrierung der LDL erfolgte durch Einstellung der Dichte auf 1,06 g/ml (KBr-Zugabe) und Zentrifugation bei 45000 rpm für 24 h bei 10° C. Die LDL-Schicht wurde abgenommen und im Tris-Puffer (siehe 3.9) bei 4° C 24 h unter mehrmaligem Pufferwechsel (4-5 mal) dialysiert.

Die HDL-Isolierung erfolgte aus dem Unterstand, der nach der Abtrennung von VLDL und LDL entstanden ist. Hierfür wurde die Dichte des Unterstandes mit KBr auf 1,21 g/ml eingestellt und 48 h bei 45000 rpm und 10° C zentrifugiert. Der Überstand (HDL) wurde abgenommen und für 48 h im Tris-Puffer dialysiert.

Für die Isolierung des LPDS wurde der Unterstand der letzten Ultrazentrifugation mit KBr auf eine Dichte von 1,25 g/ml gebracht und 40 h bei 45000 rpm und 10° C zentrifugiert, um die restlichen HDL zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und der Unterstand, der lipoproteinfrei war, über 48 h in Tris-Puffer dialysiert. Danach wurde das LPDS bei 37° C für 1 h im Wasserbad inaktiviert. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 Min bei Raumtemperatur vom LPDS abgetrennt. Der Überstand wurde filtriert und für die Bestimmung der Protein-, Triglycerid-, Phospholipid- und Cholesterinkonzentrationen eingesetzt.

Protein = 4 g/dl

TG < 10 mg/dl

PL < 15 mg/dl

CH < 10 mg/dl

Beim Erreichen dieser Werte wurde das LPDS steril filtriert (Porengröße 0,8 µm, Millipore, USA) und bei – 20° C eingefroren.

3.3.2. Entfernen von Lipoproteinen aus den Ziegen-Antiseren

Die vom Hersteller angebotenen Ziegen-Antiseren enthielten Lipoproteine, die sich für einen Teil der Untersuchungen als störend erwiesen. Aus diesem Grund wurden die Antiseren auf eine Dichte von 1,25 g/ml mit KBr eingestellt und 24 h bei 30000 rpm, 10° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der lipoproteinfreie Unterstand wurde im Tris-Puffer 24 h dialysiert. Während der Dialyse wurde die Pufferlösung 4-5 mal gewechselt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde durch Messung der Triglycerid-, Cholesterin- und Apolipoprotein-konzentrationen überprüft.

3.4. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation setzte sich aus drei Schritten zusammen:

- 1) Zugabe von Antiseren zu der Probe (Tabelle 2),
- 2) Inkubation: 3 h, 4° C,
- 3) Zentrifugation (Beckman Microfuge, USA) bei 15000 rpm, 15 Min.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand aspiriert und für weitere Untersuchungen eingesetzt, z.B. für die Gelchromatographie oder Ultrazentrifugation.

| Ansatz | Serum | Anti-ApoC-III | Anti-ApoE | NaCl |
|---------------------------|--------------|----------------------|------------------|-------------|
| nativ | 200 µl | --- | --- | 900 µl |
| Anti-C-III-Fällung | 200 µl | 800 µl | --- | 100 µl |
| Anti-E-Fällung | 200 µl | --- | 400 µl | 500 µl |
| Combi-Fällung | 200 µl | 600 µl | 300 µl | --- |

Tabelle 2: Pipettierschema der Immunpräzipitationsansätze.

3.4.1. Optimierung der Immunpräzipitation durch Zugabe von Immunpräzipitationsverstärkern

Durch Zugabe von Immunpräzipitationsverstärkern sollte die Präzipitationsrate beim minimalen Zusatz an Antiseren verbessert werden. Es wurden Immunpräzipitationsversuche mit Zugabe von PEG (Mr = 10000) [39] und Protein A durchgeführt. Die Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung der einzelnen Versuchsansätze.

| Versuch | nativ | Anti-C-III-Fällung | Anti-E-Fällung | Combi-Fällung |
|------------------|--|---|--|--|
| NaCl | 50 µl Serum 250 µl NaCl | 50 µl Serum 100 µl Anti-C-III 150 µl NaCl | 50 µl Serum 50 µl Anti-E 200 µl NaCl | 50 µl Serum 100 µl Anti-C-III 50 µl Anti-E 100 µl NaCl |
| PEG | 50 µl Serum 230 µl NaCl 20 µl 25% PEG-Lösung | 50 µl Serum 100 µl Anti-C-III 130 µl NaCl 20 µl 25% PEG-Lösung | 50 µl Serum 50 µl Anti-E 180 µl NaCl 20 µl 25% PEG-Lösung | 50 µl Serum 100 µl Anti-C-III 50 µl Anti-E 20 µl 25% PEG-Lösung |
| Protein A | 50 µl Serum 150 µl NaCl 100 µl Protein A | 50 µl Serum 100 µl Anti-C-III 50 µl NaCl 100 µl Protein A | 50 µl Serum 50 µl Anti-E 100 µl NaCl 100 µl Protein A | 50 µl Serum 100 µl Anti-C-III 50 µl Anti-E 100 µl Protein A |

Tabelle 3: Pipettierschema zur Bestimmung der Präzipitationseffizienz.

Im dritten Versuchsansatz wurde ein 20- bis 40facher Überschuss an Protein A immer erst nach dreistündiger Reaktionszeit zugegeben. Die Proben wurden eine Stunde geschwenkt und danach wie auch die anderen Ansätze bei 15000 rpm (Beckman Microfuge, USA) 15 Min zentrifugiert. Anschließend wurde in den Überständen die Apolipoproteinkonzentration im niedrigen Messbereich („low“-Methode) ermittelt.

3.4.2. Isolierung der Lipoproteine mittels Immunpräzipitation und anschließender Ultrazentrifugation

Nach der Immunpräzipitation mit ApoC-III- und ApoE-Antiserum allein, sowie nach Combi-Fällung wurden 500 µl des Überstandes mit 100 µl 0,9%-NaCl-Lösung überschichtet und gewogen. Nach 18-stündiger Zentrifugation bei 4° C und 30000 rpm wurde die obere Schicht abgenommen (ca. 100 µl) und die Proben auf das Ausgangsgewicht mit 0,9%-NaCl-Lösung gebracht. Der Unterstand enthielt nun lediglich LDL- und HDL-Fraktionen, in denen die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen bestimmt wurden. Um die LDL zu entfernen, wurde eine Fällung mit PWS-Fällungsreagenz (0,44 mmol/l PWS, 20 mmol/l MgCl₂) vorgenommen [40, 41]. Hierfür wurden zu den 200 µl des Unterstandes 500 µl PWS-Fällungsreagenz dazugegeben. Nach 15 Min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz bei 12000 rpm (Beckman Microfuge, USA) für 3 Min zentrifugiert. Anschließend wurden im Überstand (HDL-Fraktion) die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen ermittelt.

Die Lipide in VLDL wurden durch Subtraktion der Triglycerid- bzw. Cholesterinkonzentrationen im nativen Serum und den Lipidkonzentrationen im Ultrazentrifugationsunterstand bei der Dichte von 1,006 g/ml ermittelt. Die Differenz der Lipidkonzentrationen im nativen Serum, VLDL und dem Überstand der PWS-Fällung (HDL) ergab die Triglycerid- bzw. Cholesterinkonzentrationen in LDL (z.B. $TG_{LDL} = TG_{Serum} - TG_{VLDL} - TG_{HDL}$).

3.5. Gelfiltrationschromatographie

Mittels Gelfiltrationschromatographie wurden die Lipoproteine in VLDL-, LDL-, und HDL-große Lipoproteine eingeteilt. Die Auftrennung erfolgte je nach Probemenge entweder mit einer FPLC-Anlage (*fast performance liquid chromatography*) oder mit einer 6B-Sepharose-Säule (Trennbereich 10-4000 kDa).

3.5.1. Trennung von Lipoproteinen mit FPLC

Die FPLC-Anlage (Amersham Biosciences, UK) wurde für die Trennung von Probemengen bis zu 500 µl verwendet. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Superose 6 HR-Säule

(Amersham Biosciences, UK) mit 2-3 Säulenvolumina bei einer Geschwindigkeit von 0,4 ml/min mit Tris-Puffer gespült. Anschließend wurden 500 µl Probe auf die Säule aufgetragen und mit dem Tris-Puffer eluiert. Während des Laufes betrug die Flußrate 0,3 ml/min. Mit einem Fraktionssammler wurde die eluierte Probe in 30 Fraktionen je 400 µl gesammelt. In jeder Fraktion wurden die Triglycerid-, Cholesterin-, ApoB-, ApoC-III- und ApoE-Konzentrationen gemessen.

3.5.2. Trennung von Lipoproteinen mit der 6B-Sepharose-Säule

Für die Trennung von Probenmengen bis zu 30 ml wurde eine 6B-Sepharose-Säule (60 mm x 650 mm, Amersham Biosciences, UK) verwendet. Das Äquilibrieren der Säule sowie die Eluierung der Probe erfolgte mit Tris-Puffer. Die Laufgeschwindigkeit betrug 0,8 ml/min.

3.6. Immunabsorption

Mit einer Immunabsorptionsmethode wurden die einzelnen Lipoproteinsubfraktionen - LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E isoliert. Während nach der Immunpräzipitation die Zusammensetzung einzelner Lipoproteinsubfraktionen errechnet werden musste, erlaubte die Immunabsorption eine direkte Messung der Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in den Lipoproteinsubspezies. Ein weiterer Vorteil der Immunabsorption bestand in der Möglichkeit, die Lipoproteinsubfraktionen präparativ zu trennen und für die Zellversuche einzusetzen.

3.6.1. Herstellung einer HDL-Säule, Aufreinigung der Antikörper

Für die Herstellung der Anti-C-III- und Anti-E-Säulen wurden polyklonale Antikörper der Fa. Rolf Greiner Biochemica, BRD verwendet. Vor der Kopplung der Antikörper an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences, UK) wurden diese mittels einer HDL-Säule gereinigt.

Die HDL-Säule enthielt an die CNBr-aktivierte Sepharose 4B kovalent gebundene HDL, die mittels Ultrazentrifugation aus 250 ml Plasma eines gesunden Probanden gewonnen wurden. Für die Herstellung der HDL-Säule wurden 4,3 mg Protein pro ml aktivierter Sepharose gekoppelt (Vorschrift Amersham Biosciences, UK). Die Säule wurde nach dem „Sandwich“-Prinzip [42] gepackt: 132 ml Sephadex G-25 Medium, 113 ml HDL-Sepharose, 16 ml Sephadex G-25 Medium. Die oberste Schicht des Sephadex G-25 Medium schützte die Sepharose vor möglichen Verunreinigungen, die beim Auftragen der Probe entstehen können. Die unterste Sephadex G-25 Medium Schicht diente zur Trennung des niedermolekularen NaSCN, das für die Spaltung der Antigen-Antikörper-Bindung eingesetzt wurde. Für die Dissoziation des Antigens von der Säule wurde 5M NaSCN verwendet. Die Kombination der Immunaффinitätssepharose mit dem Sephadex G-25 Medium gewährleistete einen kurzen Kontakt zwischen den NaSCN-Molekülen und dem Antigen, so dass mögliche Veränderungen der Antigenstruktur durch die NaSCN-Lösung vermieden werden konnten.

Der Anti-C-III-Antikörper wurde aus 200 ml ApoC-III-Antiserum gewonnen. Bevor die HDL-Säule mit dem Antiserum beladen wurde, wurde diese mit 5 M NaSCN gespült und mit Tris-Puffer äquilibriert. Das Antiserum wurde in Portionen je 25 ml aufgetragen. Nach der Eluierung der nicht retinierten Fraktion wurde der Antikörper mit dem 5M NaSCN von der Säule eluiert. Alle Fraktionen wurden auf Eis gesammelt. Die retinierten Fraktionen wurden in Saccharose konzentriert, die nicht retinierten Fraktionen wurden wiederholt auf die HDL-Säule aufgetragen, um die restlichen Antikörper zu isolieren. Der isolierte Antikörper wurde bei 4° C gelagert.

Für die Herstellung der Anti-E-Säule wurden 100 ml vom ApoE-Antiserum verwendet. Die Aktivität der isolierten Antikörper wurde mittels Doppeldiffusion nach Ouchterlony überprüft.

Der aufgereinigte und in Saccharose konzentrierte Antikörper wurde im Kopplungspuffer (siehe 3.9) dialysiert und nach der Vorschrift (Amersham Biosciences, UK) an die CNBr-aktivierte 4B Sepharose gekoppelt. Beide Säulen wurden nach dem Prinzip der HDL-Säule gepackt. Als Elutionsmittel wurde 3M bzw. 5M NaSCN verwendet.

Für die Anti-C-III-Säule wurde eine Bindungskapazität von 2 mg ApoC-III, für die Anti-E-Säule von 0,4 mg ApoE ermittelt. Diese Werte wurden bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/h cm² erreicht.

3.6.2. Doppeldiffusion nach Ouchterlony

Die Objektträger wurden mit maximal 3 ml 1,2 % Agarlösung beschichtet. In das erkaltete Agar wurden Löcher gestanzt, wobei das mittlere Loch einen Durchmesser von 5 mm und die um dieses Loch angeordneten Löcher einen Durchmesser von 2 mm aufwiesen. In das mittlere Loch wurde die antigenhaltige Lösung und in die äußeren Löcher jeweils alternierend die Antikörperlösung aufgetragen. Zur Ausbildung der Präzipitationslinien wurden die Agarplatten in verschlossenen Plastikboxen für 48 h bei Raumtemperatur oder für 24 h bei 37° C inkubiert. Um die nicht präzipitierten Proteine zu entfernen, wurden die Agarplatten 24 h in 0,9% NaCl-Lösung inkubiert. Die NaCl-Lösung wurde 4-5 mal gewechselt. Anschließend wurde mit H₂O_{bidest} angefeuchtetes Filterpapier auf die Gelfläche gelegt, und die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet. Die Präzipitationsbanden wurden mit Coomassie-Lösung angefärbt (siehe 3.9). Anschließend wurden die Gele in der Entfärberlösung (siehe 3.9) inkubiert, bis deren Hintergrund hell erschien und die Präzipitationsbanden deutlich zu erkennen waren.

3.6.3. Isolierung von Lipoproteinsubfraktionen

Die einzelnen Lipoproteinsubfraktionen (LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E) wurden durch Kombination der beiden Immunaффinitätssäulen – Anti-C-III- und Anti-E-Säulen - isoliert. Abbildung 2 zeigt die Reihenfolge der durchgeführten Schritte.

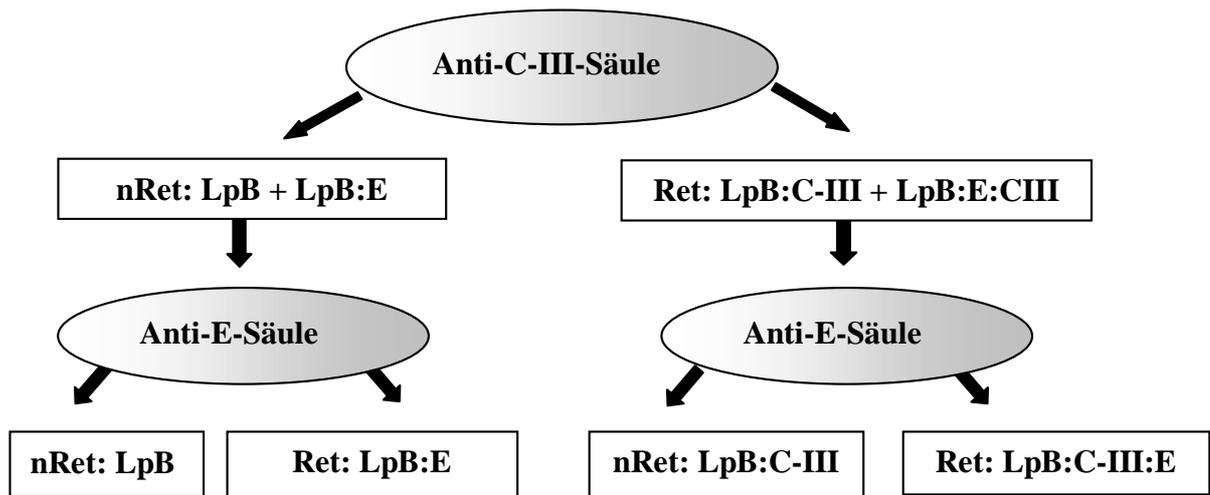


Abbildung 2: Isolierung einzelner Lipoproteinsubfraktionen.

Um für die Durchführung der Zellversuche ausreichende Mengen an Lipoproteinsubfraktionen zu gewinnen, mussten in Abhängigkeit von den ApoC-III- und ApoE-Konzentrationen Serummengen zwischen 20 und 30 ml verarbeitet werden. Um die Säulenkapazität nicht zu überschreiten, musste das Serum in Portionen auf die beiden Immunaffinitätssäulen aufgetragen werden. Konzentrierung und Lagerung der Proben erfolgten mit PEG (Mr = 350000) und/oder Saccharose bei 4° C.

3.6.4. Durchsuchen von Probandenseren auf das Vorhandensein von LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E

Zum Untersuchen der Probandenseren auf Vorhandensein von LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E wurden Anti-C-III- bzw. Anti-E-Säulen verwendet. Abhängig von den ApoC-III- bzw. von den ApoE-Serumkonzentrationen wurden 150 bis 300 µl Serum für die Untersuchungen eingesetzt. Um festzustellen, ob im Serum LpB:C-III vorhanden ist, wurde in der nicht retinierten Fraktion der Anti-E-Säule, die LpB und LpB:C-III enthält, die ApoC-III-Konzentration bestimmt. Das Vorhandensein von LpB:E wurde nach Passage des Serums durch die Anti-C-III-Säule ermittelt. Dafür wurde in der nicht retinierten Fraktion, die aus LpB und LpB:E besteht, die ApoE-Konzentration bestimmt. In den retinierten Fraktionen beider Säulen wurde LpB:C-III:E nachgewiesen.

3.7. Biochemische Charakterisierung der Lipoproteinsubpopulationen

Die nach Größe und Apolipoproteinzusammensetzung isolierten Lipoproteine wurden biochemisch charakterisiert. Dafür wurde die Lipid- und Apolipoproteinmolekülzahl jeder Subspezies pro Lipoproteinpartikel ausgerechnet und das Laufverhalten in der Elektrophorese untersucht. Die Größenverteilung und die Form der Lipoproteine wurden zusätzlich unter dem Elektronenmikroskop überprüft.

3.7.1. Ermittlung der Triglycerid-, Cholesterin- und Apolipoproteinmolekülzahl

Die Ermittlung des Lipid- und Apolipoproteingehaltes pro Partikel wird nahegelegt durch den Umstand, dass die ApoB-haltigen Lipoproteine nur ein einzelnes ApoB-Molekül enthalten. Aus diesem Grund sagt der Quotient der Triglycerid-, Cholesterin-, ApoC-III- und ApoE-Konzentrationen (in mmol/l) pro ApoB (in mmol/l) aus, wie viele Lipid- und Apolipoproteinmoleküle von einem Partikel transportiert werden.

Für die Bestimmung der Lipid- und Apolipoproteinmolekülzahl pro Lipoproteinpartikel in VLDL- bzw. LDL- großen Lipoproteinen wurde wie folgt vorgegangen:

- 1) Umrechnung aller Konzentrationseinheiten im mmol/l.
- 2) Errechnen der Flächen unter den Kurven nach dem FPLC-Lauf für VLDL- und LDL- große Lipoproteine (AUC-TG, AUC-CH, AUC-ApoB, AUC-ApoC-III, AUC-ApoE).
- 3) Bildung der Quotienten:

$$\begin{array}{cccc}
 \frac{\text{AUC-TG}}{\text{AUC-ApoB}} & \frac{\text{AUC-CH}}{\text{AUC-ApoB}} & \frac{\text{AUC-ApoC-III}}{\text{AUC-ApoB}} & \frac{\text{AUC-ApoE}}{\text{AUC-ApoB}}
 \end{array}$$

3.7.2. Lipidelektrophorese

Für die elektrophoretische Trennung wurde das Paragon Lipoprotein Elektrophorese System (Beckman, USA) verwendet. Auf das fertige 0,5 % Agarose Gel wurden mittels einer Schablone 3-5 µl Probe aufgetragen und 5 Min gewartet, um die Diffusion in das Gel zu ermöglichen. Wenn die Probe stark verdünnt war, wurde das Auftragen nach weiteren 5 Min wiederholt. Anschließend wurde die Schablone abgezogen und verworfen. Das Gel wurde auf

die Gelbrücke gebracht und in die Elektrophoresezelle gestellt. Die Elektrophoresezelle wurde vorher mit 90 ml B-2 Barbitalpuffer gefüllt. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 100 V für 30 Min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel in die Fixationslösung für 5 Min gebracht. Danach wurde das Gel vollkommen getrocknet und durch die Entwicklerstation geführt:

- | | | |
|----|-------------------------|----------------|
| 1) | Lipoprotein-Färbelösung | 5 Min |
| 2) | Entfärberlösung 1 | 3 x eintauchen |
| 3) | Entfärberlösung 2 | 3 x eintauchen |
| 4) | Entfärberlösung 3 | 5 Min |

(Die Zusammensetzung der oben erwähnten Lösungen ist unter 3.9 aufgeführt. Bei den Entfärbelösungen 1), 2) und 3) handelt es sich um die gleiche Lösung, die in drei Behälter gefüllt wurde.)

Anschließend wurde das Gel mit deionisiertem Wasser gespült und getrocknet. Die Auswertung erfolgte visuell.

3.7.3. Elektronenmikroskopie

Die Form, Größe und mögliche Aggregation der Lipoproteine konnte mittels negativ-staining Elektronenmikroskopie untersucht werden [43]. Die Proben wurden im Ammonium-Acetat-Puffer (siehe 3.9) 12 h dialysiert. Die Färbung der Lipoproteine erfolgte mit 2% PWS. Die Proben und das Färbemittel wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und davon 10 µl auf die Kupfer-Schlitzblenden mit Formvar/Kohle-Film (Plano W. Plannet GmbH, BRD) aufgetragen. Die Proben wurden eine Minute auf Kupferplättchen inkubiert und anschließend mit Filterpapier aufgesaugt. Nach 30 Min Trocknungszeit wurden die Proben unter das Elektronenmikroskop gebracht und bei einer konstanten Vergrößerung (x 57000) fotografiert.

3.7.4. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde für die Bestimmung des ApoE-Phenotyps eingesetzt. Im ersten Schritt wurde der zwischen den Platten eingesetzte Gelbondfilm (Amersham Bios-

ciences, UK) mit einem Agarose-Gel beschichtet. Dafür wurden 30 ml der vorbereiteten Agarose (siehe 3.9) aufgekocht, auf 70° C abgekühlt und zu dem vorher abgewogenen Harnstoff (7,25 g) zugegeben. Anschließend wurden die Ampholyte (siehe 3.9) zugegeben. Circa 18 ml des Gemisches wurden in die vorgewärmte Platte gegossen, nach 20 Min konnte diese verwendet werden. Das Gel wurde mit Filterpapier geblottet und auf die mit etwas Petroleum betropfte Kühlplatte aufgelegt. An eine Seite des Gels wurde mit 0,5 M NaOH getränkte Elektrode (Kathode) und die Maske aufgelegt, auf die andere Seite der Platte mit 0,5 M H₃PO₄ getränkte Elektrode (Anode). Von den vorbereiteten Proben wurden je 3,5 µl auf 45 Positionen aufgetragen. Die Vorbereitung der Proben wurde wie folgt durchgeführt: 12 µl Serum-Puffer wurden mit 50 µl Serum gut gemischt und 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektrophoresespannung wurde bei 2000 V konstant gehalten, während die Leistung für die ersten 30 Min auf 500 W, für die weiteren 30 Min auf 950 W und für die anschließenden 60 Min auf 1700 W eingestellt wurde. Nach dem Fokussieren wurde die Maske abgenommen, das Gel kurz geblottet und immunpräzipitiert. Hierfür wurde eine Probenauftragsmaske aufgelegt und das Gel in die feuchte Kammer überführt. In jede Spur wurden 30 µl vom Anti-E-Antiserum aufgetragen. Nach 30 Min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Maske abgenommen und das Gel über Nacht in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Dabei wurde die NaCl-Lösung 4-5 mal gewechselt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Blau-Lösung angefärbt. Die unspezifische Färbung wurde mit der Entfärber-Lösung ausgewaschen (siehe 3.9).

3.8. Zellversuche

Die Internalisationsstudien mit den Lipoproteinsubfraktionen [44] wurden an humanen Fibroblasten durchgeführt. Dafür wurden die Lipoproteine mit fluoreszierendem Farbstoff (DiI) markiert [45, 46] und für die Zellversuche eingesetzt.

3.8.1. Zellkultur von humanen Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden aus einer Hautstanze isoliert. Das Wachstum der Zellkultur erfolgte in DMEM-Medium (Gibco BRL, USA) versetzt mit 10% FCS (Gibco BRL, USA), 1% Streptomycin/Penicillin (Gibco BRL, USA) und 1% Glutamin (Gibco BRL, USA). Ein Me-

diumwechsel erfolgte je nach Wachstum, nach 2 oder 3 Tagen. Wenn die Zellen nach 5 bis 6 Tagen „*monolayer*“ gebildet hatten, wurden diese im Verhältnis 1:2 mit Trypsin/EDTA (Gibco BRL, USA) „gesplittet“. Dafür wurde in 25 mm² Kulturflaschen (Greiner Bio-One, BRD) 2 ml und in 75 mm² Kulturflaschen (Greiner Bio-One, BRD) 5 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37° C wurden die Flaschen unter dem Mikroskop angeschaut. Durch leichtes Klopfen wurden die an der Oberfläche noch haftenden Zellen abgelöst. Für den Waschvorgang wurden 7 ml (für 25 mm² Kulturflaschen) bzw. 20 ml (für 75 mm² Kulturflaschen) Medium in Probenröhrchen vorgelegt. Die Zellsuspension aus der Kulturflasche wurde dazugegeben. Nach einer Zentrifugation (Biofuge *primo*, Heraeus, BRD), 5 Min bei 1100 rpm, wurde das Pellet in 0,5–1 ml Medium resuspendiert und in 10 ml Medium in die 25 mm² Kulturflasche bzw. in 25 ml Medium in die 75 mm² Kulturflasche überführt. Durch leichtes Schwenken wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. Das Wachstum der Zellkultur erfolgte in einem CO₂-Inkubator (Heraeus, BRD) bei 37° C und 5% CO₂. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene und nicht haftende Zellen abzutrennen. Für die Zellversuche wurden Zellen bis zur 20. Passage verwendet.

3.8.2. Markierung der Lipoproteine mit DiI

Die Lipoproteinlösung wurde auf eine Konzentration von 1,5 mg Protein/ml mit PBS, der 0,1 g/l EDTA enthält, verdünnt. Pro ml verdünnter Lipoproteinlösung wurden 3 ml LPDS zugegeben und danach mit 1 µl 100 mM Ascorbinsäure pro ml Lösung versetzt. Die Probe wurde durch einen 0,8 µm-Filter (Millipore, USA) filtriert. Danach wurden 18,7 µl DiI-Lösung (Molecular Probes, USA) unter vorsichtigem Rühren pro ml Lipoproteinlösung zugegeben. Anschließend wurde die Probe lichtgeschützt bei 37° C 8 bis 15 h inkubiert. Die Lipoproteine wurden erneut mittels Ultrazentrifugation isoliert. Dafür wurde die Dichte der Lösung mit KBr auf 1,21 mg/l eingestellt und 24 h bei 10° C und 35000 rpm zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman L7-55, USA). Anschließend wurde die Probe über Nacht bei 4° C im DiI-Dialyse-Puffer (siehe 3.9) dialysiert. Die Pufferlösung wurde 4-5 mal gewechselt.

3.8.3. Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in humane Fibroblasten

Die Internalisationsversuche wurden in 16 x 35 mm Petri-Schalen (Greiner Bio-One, BRD) durchgeführt. Die Zellzahl pro Schale betrug ca. $3,5 \times 10^4$. Vor dem Versuch wurden die Zellen 48 h im DMEM-Medium, das anstatt 10% FCS 10% LPDS, 1% Streptomycin/Penicillin und 1% Glutamin enthielt, inkubiert. Dadurch wurden die LDL-Rezeptoren der Fibroblasten hochreguliert. Anschließend wurde das alte Medium schnell abgesaugt und das neue Medium, das die markierten Lipoproteine enthält, zugegeben. Die markierten Lipoproteine wurden in Konzentrationen 1,25; 2,5; 5; 12,5; 25 und 50 nmol ApoB/ml eingesetzt. Jeder Konzentrationsansatz wurde in dreifacher Wiederholung angefertigt. Für den Internalisationsversuch wurden die Zellen 5 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei mal mit PBS + 0,4% BSA und drei mal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Phosphatpuffer vollständig abgesaugt. Durch Zugabe von 1 ml 0,1 N NaOH + 1 g/l SDS wurden die Zellen von der Oberfläche der Petri-Schale abgelöst und lysiert. Zur Beschleunigung dieses Vorgangs wurden die Petri-Schalen 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei einer Excitationswellenlänge von 520 nm und einer Emissionswellenlänge von 570 nm gemessen.

3.9. Chemikalien und Puffer

Doppeldiffusion nach Ouchterlony

- Coomassie-Färbelösung
1 g Serva-Blue R
500 ml Ethanol
70 ml Essigsäure
auf 1 Liter H₂O_{bidest}
- Entfärber
500 ml Ethanol
200 ml Essigsäure
300 ml H₂O_{bidest}

Gelfiltrations- und Immunaffinitätschromatographie

- Tris-Puffer
25 mM Tris/HCl
50 mM NaCl
35 µM Penicillin G
1,5 µM Chloramphenicol
0,75 µM Streptomycin-Sulfat
40 µM Glutathion
75 µM EDTA
250 µM ε-Aminocaprinsäure
auf 1 Liter H₂O_{bidest}, pH 7,5
- 3M bzw. 5M NaSCN
3M bzw. 5M NaSCN, pH 7,5

Lipidelektrophorese

- B-2-Barbital-Puffer
1% Barbital-Puffer, pH 8,6
- Färbelösung
3 ml Paragonstammlösung
165 ml Ethanol
135 ml H₂O_{bidest}
- Fixationslösung
180 ml Ethanol
30 ml Eisessig
90 ml H₂O_{bidest}
- Entfärber
450 ml Ethanol
550 ml H₂O_{bidest}

Elektronenmikroskopie

- Ammonium-Acetat-Puffer
0,125 M Ammoniumacetat
2,6 mM Ammoniumcarbonat
0,2 mM EDTA
pH 7,4

Isoelektrische Fokussierung

- Agarose-Lösung
4,32 g Agarose IEF
0,48 g Agarose EEO
21,6 g Sorbitol
auf 200 ml H₂O_{bidest}
60 Min kochen
- Ampholyte
1,0 ml Servalyte, pH 3-10
0,6 ml Pharmalyte, pH 5-6
0,6 ml Servalyte, pH 5-6
1,0 ml Pharmalyte, pH 3-10
60 mg Dithiotreitol (DTT) in 1,8
ml H₂O_{bidest} lösen

- Präzipitatpuffer
0,154 g Dithiotreitol
0,121 g Tris 10 mmol
5 ml Tween 20
auf 100 ml H₂O_{bidest}
- Serum-Puffer
500 mg Harnstoff
500 µl Präzipitatpuffer
150 µl Tween 20

Lipoproteinmarkierung

- DiI-Dialyse-Puffer
5 mM Tris
154 mM NaCl
0,1 g/l EDTA, pH 7,4
- DiI-Lösung
6 mg DiI/ml DMSO
- PBS (Sigma)
120 mmol/l NaCl
2,7 mmol/l KCl
10 mmol/l Phosphatpuffer,
pH 7,4

4. Ergebnisse

4.1. Immunpräzipitation

Aufgrund der schnellen und einfachen Durchführbarkeit ist die Immunpräzipitation ein Verfahren, mit dem auch größere Probandenserien untersucht werden können. Dabei wird das Probandenserum in drei Schritten mit einem spezifischen Antiserum gegen ein definiertes Apolipoprotein versetzt:

- 1) Fällung der ApoC-III-haltigen Lipoproteine mit ApoC-III-Antiserum („Anti-C-III“)
- 2) Fällung der ApoE-haltigen Lipoproteine mit ApoE-Antiserum („Anti-E“)
- 3) Fällung der ApoC-III- und ApoE-haltigen Lipoproteine mit Anti-C-III- und Anti-E-Antiseren („Combi-Fällung“).

Nach Ablauf bestimmter Reaktionszeiten wird der Antigen-Antikörper-Komplex durch Zentrifugation abgetrennt. Hierdurch wird die Entfernung einer bestimmten Lipoproteinpopulation aus dem nativen Serum erreicht. Die Kombination von spezifischen Antiseren ermöglicht die Isolierung von Lipoproteinen mit definierter Apolipoproteinzusammensetzung.

4.1.1. Methodenoptimierung

Die Immunpräzipitationsmethode bedurfte aus mehreren Gründen einer Optimierung. Als erstes musste gewährleistet sein, dass die Antikörper (Ak) spezifisch sind und keine Kreuzreaktivität aufweisen. Dieses wurde mit der Ouchterlony Doppeldiffusionsmethode (siehe 3.6.2) überprüft. Der zweite wichtige Aspekt der Optimierung betraf die Antikörpermengen, die für die vollständige Präzipitation des Antigens (Ag) zugegeben werden müssten. Einerseits durfte wegen der Vollständigkeit der Fällung nicht zu wenig von dem Antikörper zugegeben werden, andererseits durfte auch nicht zu viel, weil ein großer Überschuss an Antikörpern die maximale Quervernetzung zwischen Antigen und Antikörper verhindern würde. Das optimale Präzipitationsergebnis wird am Äquivalenzpunkt erreicht. In Hinsicht auf die Wirtschaftlichkeit der Immunpräzipitationsmethode spielte die Optimierung der Antikörpermengen auch eine wichtige Rolle. Spezifische Antikörper sind aufgrund ihrer aufwendigen Produktion sehr kostenintensiv und können nach der Immunpräzipitation nicht wieder regeneriert werden. Aus diesem Grund wurde nach Möglichkeiten gesucht, eine vollständige Immunpräzipitation der gewünschten Lipoproteinpopulation mit möglichst kleinen Antikör-

permengen zu erreichen. Dazu wurde zunächst mit einer Optimierung der Reaktionszeit, -temperatur und der Immunpräzipitationsverstärker begonnen. Im letzten Schritt wurden die zugegebenen Antikörpermengen gesteigert.

4.1.1.1. Optimierung der Reaktionszeit und der Temperatur

Die Versuche zur Optimierung der Reaktionszeit und der Temperatur wurden mit 3 normotriglyceridämischen Probandenseren, 3 Probandenseren mit moderat erhöhten Triglyceridkonzentrationen und 3 hypertriglyceridämischen Probandenproben durchgeführt (die Triglyceridkonzentrationen im Serum lagen zwischen 0,7 und 9 mmol/l).

Für die Optimierung der Reaktionszeit wurden Zeitabstände zwischen 0,5 und 3 h in 0,5 h-Schritten gewählt. Die jeweiligen Antiseren wurden im Verhältnis zum Serum 1+1 für Anti-E und 2+1 für Anti-C-III dazugegeben. Die Inkubation erfolgte in parallelen Ansätzen bei Raumtemperatur, bei 4° C und bei 37° C. Nach anschließender Zentrifugation wurde im Überstand die Konzentration des nicht gefällten Apolipoproteins ermittelt. Es stellte sich heraus, dass die beste Immunpräzipitationseffizienz nach drei Stunden erreicht wurde, unabhängig davon, ob die Proben bei Raumtemperatur oder bei 4° C inkubiert wurden. Die Effizienz der Fällung war mit 75-85% in allen drei Ansätzen (Anti-C-III-, Anti-E- und Kombi-Fällung) unzureichend. Identische Ergebnisse wurden auch in den Ansätzen erzielt, die bei 37° C zwei Stunden inkubiert wurden. Da bei einer Inkubation bei 37° C nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine gesteigerte Lipolyse der triglyceridreichen Lipoproteine stattfindet, es sich aber zeigte, dass die Immunpräzipitation bei 4° C vergleichbar gut ist, wurden nachfolgende Optimierungsversuche bei 4° C und 3 Stunden Inkubationszeit durchgeführt.

4.1.1.2. Ermittlung des optimalen Immunpräzipitationsverstärkers

Es wurden drei Immunpräzipitationsverstärker mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen untersucht:

- 1) Phosphatanionen (PBS)
- 2) Polyethylenglykol (PEG)
- 3) Protein A (Prot. A).

Phosphatanionen inhibieren zusammen mit Fluorid- und Sulfidanionen die Entfaltung von Makromolekülen („antichaotroper“ Effekt) und fördern die Bildung von Immunkomplexen. PEG hingegen führt durch das Entfernen der Hydrathülle von den agierenden Agenzien zur Antigen- und Antikörperkonzentrationserhöhung in der Mikroumgebung. Die Wirkungsweise des Protein A auf die Antigen-Antikörper-Reaktion beruht auf seiner Eigenschaft, die konstante Region der Immunglobuline (Fc) zu binden. Es entstehen große Protein A-Antigen-Antikörper-Komplexe, die besser präzipitieren als einfache Antigen-Antikörper-Aggregate.

Als erstes wurde an 5 Probandenseren überprüft, ob PBS anstelle von NaCl-Lösung zur besseren Immunpräzipitation des jeweiligen Apolipoproteins führt (Abb. 3).

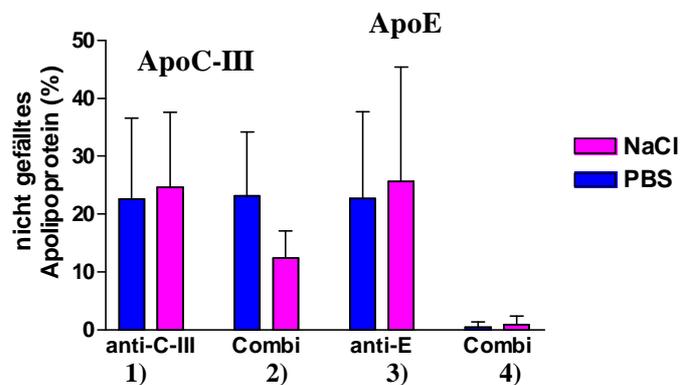


Abbildung 3: Einfluss des Phosphatpuffers im Vergleich zu NaCl-Lösung auf die Immunpräzipitationseffizienz. Es sind Mittelwerte mit Standardabweichungen der 5 untersuchten Probandenseren aufgetragen. 1) nicht gefälltes ApoC-III (%) nach Anti-C-III; 2) nicht gefälltes ApoC-III (%) nach Combi-Fällung; 3) nicht gefälltes ApoE (%) nach Immunpräzipitation mit Anti-E; 4) nicht gefälltes ApoE (%) nach Combi-Fällung.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass durch das Verwenden des Phosphatpuffers anstelle der NaCl-Lösung die Effizienz der Fällung kaum beeinflusst wurde. Für die Immunpräzipitation des ApoC-III in der Combi-Fällung ist eine Verschlechterung zu verzeichnen. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen mit Einsatz von NaCl-Lösung durchgeführt.

Anschließend wurde an vier Probandenseren im parallelen Ansatz die Wirkung von 25% PEG und Protein A auf die Effizienz der drei untersuchten Fällungen getestet. Die genaue Beschreibung der Versuchsansätze ist in 3.4.1 aufgeführt. Abbildung 4 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der vier untersuchten Probandenproben.

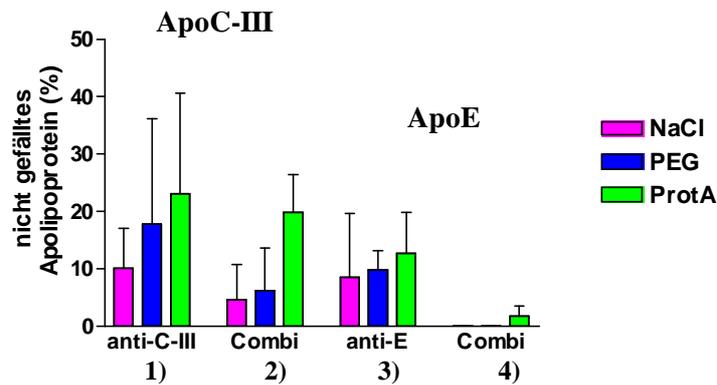


Abbildung 4: Effizienz der Immunpräzipitation bei Zugabe von 25% PEG, bzw. Protein A. 1) nicht gefälltes ApoC-III (%) nach Anti-C-III; 2) nicht gefälltes ApoC-III (%) nach Combi-Fällung; 3) nicht gefälltes ApoE (%) nach Immunpräzipitation mit Anti-E; 4) nicht gefälltes ApoE (%) nach Combi-Fällung.

Wie aus dem Diagramm hervorgeht, wurde die Effizienz der Fällungen durch Zugabe von PEG und Protein A verschlechtert. Infolgedessen wurden weitere Immunpräzipitationsversuche nur mit den jeweiligen Antisera, NaCl-Lösung und dem Probandenserum durchgeführt.

4.1.1.3. Optimierung der Antikörpermengen

Im letzten Schritt der Optimierung wurde eine Steigerung der Antiserumkonzentration bis zu einer Effizienz der Immunpräzipitation von mindestens 95% vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass für hypertriglyceridämische Seren (mit Gesamttriglyceridkonzentrationen von über 6 mmol/l), deren ApoC-III-Konzentrationen zwischen 30 und 50 mg/dl lagen, ein 3 bis 4facher Überschuss an Antiserum erforderlich war, um das gesamte Apolipoprotein zu entfernen. Demzufolge wurde für die Anti-C-III-Fällung ein Verhältnis Serum zu Antiserum von 1+4 und für die Anti-E-Fällung ein Verhältnis von 1+2 gewählt.

4.1.2. Charakteristika von Lipoproteinsubfraktionen nach Immunpräzipitation

Wie oben beschrieben, setzte sich die Immunpräzipitation aus drei Schritten zusammen: der Anti-C-III-, der Anti-E- und der Combi-Fällung. Im Überstand der ersten Fällung mit Anti-C-III verbleibt ein Gemisch aus LpB und LpB:E, im zweiten, nach Fällung mit Anti-E, ein Gemisch aus LpB und LpB:C-III und im Überstand der dritten Fällung mit beiden Antisera, nur das LpB. Um die Effizienz der Fällung ermitteln zu können und auch die Berechnungen für die Lipidwerte der einzelnen Lipoproteinsubklassen vornehmen zu können, müs-

sen die Werte nach der jeweiligen Fällung mit den Werten im nativen Serum verglichen werden. Dafür wurde das native Serum mit NaCl-Lösung um den gleichen Faktor wie die Immunpräzipitationsansätze mit den Antiseren verdünnt. Zum Beispiel: für die Combi-Fällung wurden 100 µl Serum, 300 µl Anti-C-III und 150 µl Anti-E angesetzt. Der Ansatz für das native Serum setzte sich dementsprechend aus 100 µl Serum und 450 µl NaCl-Lösung zusammen. Je nach Fragestellung wurden die isolierten Lipoproteinsubfraktionen entweder nach Größe oder nach Dichte getrennt. Dazu wurden die Immunpräzipitationsüberstände im ersten Fall auf die FPLC-Säule aufgetragen, im zweiten Fall mittels der Ultrazentrifugation aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Messung von Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen der FPLC-Säule oder in den Dichtefraktionen der UZ. Die Werte für die einzelnen Lipoproteinsubfraktionen LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E wurden rechnerisch ermittelt.

4.1.2.1. Lipidzusammensetzung der Lipoproteinsubfraktionen nach Immunpräzipitation und anschließender Ultrazentrifugation

Zur Charakterisierung der Zusammensetzung einzelner Lipoproteinsubfraktionen wurden 14 Probandenserum untersucht. Anhand von Cholesterin- bzw. Triglyceridkonzentrationen erfolgte die Einteilung in vier Gruppen:

- 1) normolipämische Probanden,
- 2) Probanden mit stark erhöhten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen (Typ IV nach Fredrickson),
- 3) Probanden mit Hypercholesterinämie (Typ IIa nach Fredrickson),
- 4) Probanden mit moderat erhöhten Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen (Typ IIb nach Fredrickson).

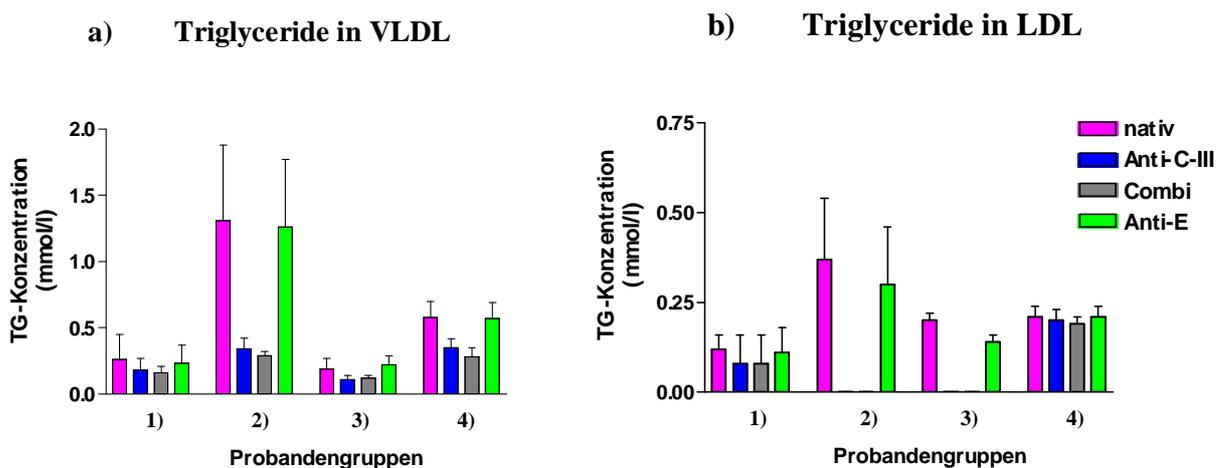
In der Tabelle 4 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in den einzelnen Gruppen aufgeführt.

| Gruppe | N | TG mmol/l | CH mmol/l | ApoB g/l | ApoC-III mg/dl | ApoE mg/dl |
|--------|---|--------------|--------------|-------------|-------------------|---------------|
| 1 | 4 | 1,83 ± 1,01 | 5,42 ± 0,57 | 0,95 ± 0,08 | 12,6 ± 1,5 | 4,3 ± 0,6 |
| 2 | 3 | 7,68 ± 1,27 | 7,98 ± 1,68 | 1,75 ± 0,36 | 29,3 ± 1,4 | 8,2 ± 1,4 |
| 3 | 3 | 1,94 ± 0,49 | 8,41 ± 0,86 | 1,52 ± 0,21 | 16,2 ± 3,9 | 7,9 ± 0,7 |
| 4 | 4 | 3,53 ± 0,51 | 7,03 ± 0,47 | 1,5 ± 0,06 | 17,1 ± 2,1 | 6,3 ± 0,5 |

Tabelle 4: Serum Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in den untersuchten Probandengruppen. 1) normolipämische Probanden; 2) Probanden mit erhöhten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen; 3) hypercholesterinämische Probanden; 4) Probanden mit moderat erhöhten Gesamttriglycerid- und Cholesterinkonzentrationen.

Die Tabelle zeigt, dass die Probanden der Gruppe 2 nicht nur stark erhöhte Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen aufweisen, sondern auch erhöhte ApoC-III-, ApoB- und ApoE-Spiegel haben. Die niedrigsten ApoC-III-Konzentrationen wurden bei normo- und hypercholesterinämischen Probanden nachgewiesen.

Die nach der Immunpräzipitation erhaltenen Lipoproteinsubfraktionen wurden mittels Ultrazentrifugation zusätzlich nach Dichte getrennt. Die Lipidkonzentrationen in den Dichtefractionen VLDL und LDL wurden rechnerisch ermittelt (siehe 3.4.2). In Abbildung 5 sind die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in VLDL und LDL nach der jeweiligen Immunpräzipitation dargestellt.



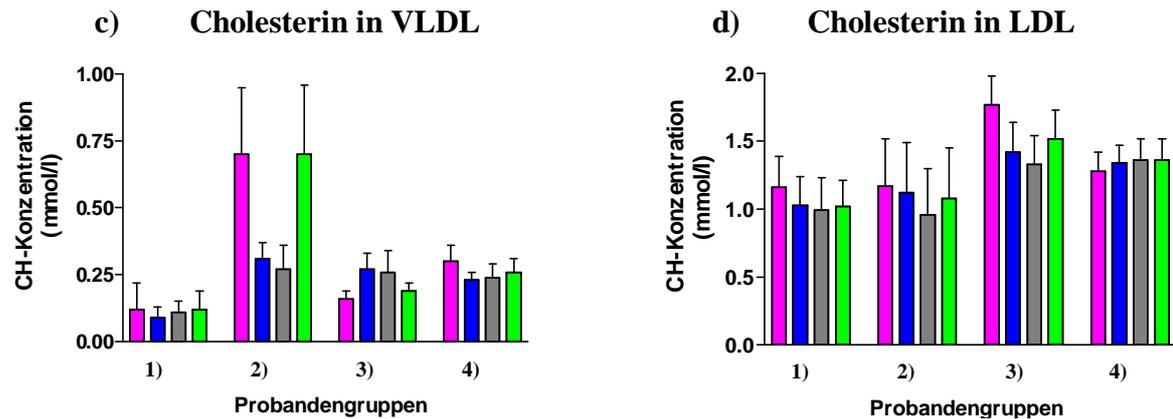


Abbildung 5: Triglycerid- a), b) und Cholesterinkonzentrationen c), d) in VLDL a), c) bzw. LDL b), d) vor und nach der jeweiligen Fällung. (Die Triglyceridkonzentrationen in LDL (Abb. 5 b)) in den Probandengruppen 2) und 3) lagen nach der Anti-C-III- und der Combi-Immunpräzipitation unter der Nachweisgrenze.)

Der Vergleich der Lipidwerte nach der jeweiligen Immunpräzipitation und anschließender Ultrazentrifugation in den Gruppen zeigt, dass die Senkung der Lipidkonzentration nach der ApoC-III- und der Combi-Immunpräzipitation in allen vier Gruppen am stärksten war. Besonders auffällig ist die Reduktion der Triglyceride in den Gruppen 2 und 4 in VLDL. Die Fällung mit ApoE-Antiserum führte weder in VLDL noch in LDL in keiner der vier Gruppen zu einer nennenswerten Senkung der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen.

Bei einer genaueren Betrachtung der Immunpräzipitationsergebnisse fallen einige Unplausibilitäten auf. Zum Beispiel: nach der Anti-C-III-, Anti-E- bzw. der Combi-Fällung ist in der Gruppe 3 keine erwartete Senkung der Cholesterinkonzentration in VLDL zu verzeichnen, es wird sogar eine höhere Cholesterinkonzentration als vor der Fällung gemessen. Der Vergleich der Cholesterinwerte in LDL vor und nach der jeweiligen Fällung in der Gruppe 4 zeigte das gleiche Ergebnis. Die möglichen Fehler, sowie die Versuche zu ihrer Beseitigung werden unter 4.1.3.1 und 4.1.3.2 ausführlich behandelt.

4.1.2.2. Relativer Lipidbeitrag der Lipoproteinsubfraktionen zu den Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in VLDL und LDL

Die Lipidkonzentrationen in LpB:C-III, LpB:E sowie LpB:C-III:E in VLDL und LDL können nicht direkt bestimmt werden, sondern müssen rechnerisch ermittelt werden. Die Berechnung basiert auf dem Umstand, dass im Nativserum alle vier Lipoproteinsubfraktionen nebeneinander vorkommen, und dass durch die Immunpräzipitation jeweils eine oder mehre-

re Partikelpopulationen alternativ entfernt werden. Durch die entsprechenden Subtraktionen können die Lipidkonzentrationen errechnet werden. Als Beispiel wird die Berechnung der Lipidwerte für LpB:C-III angeführt. Die Anti-E-Fällung führt zur Entfernung aller ApoE-haltigen Lipoproteine, so dass im Überstand der Fällung nur LpB und LpB:C-III nachzuweisen sind. Die Combi-Fällung dient zur Entfernung der LpB:E, LpB:E:C-III und LpB:C-III, damit verbleibt im Überstand nur das reine LpB. Das LpB:C-III wird also als Differenz der Lipidkonzentrationen nach der Anti-E- und der Combi-Fällung ermittelt. Die Berechnung der Werte für LpB:E und LpB:E:C-III erfolgt analog nach den Formeln:

LpB = Messung der Konzentrationen nach der Combi-Fällung

LpB:E = Messwerte nach der Immunpräzipitation mit dem ApoC-III-Antiserum minus LpB

LpB:E:C-III = Messwerte im nativen Serum minus (LpB + LpB:C-III + LpB:E).

In den Tabellen 5 und 6 werden die errechneten Anteile der Lipoproteinsubfraktionen zu den Gesamttriglycerid- und Cholesterinkonzentrationen der VLDL und LDL dargestellt.

| Gruppe | Gesamt TG in VLDL, mmol/l | Triglyceridwerte, % | | | | Gesamt CH in VLDL, mmol/l | Cholesterinwerte, % | | | |
|---------------------|---------------------------|---------------------|-----------|-------|-------------|---------------------------|---------------------|-----------|-------|-------------|
| | | LpB | LpB:C-III | LpB:E | LpB:E:C-III | | LpB | LpB:C-III | LpB:E | LpB:E:C-III |
| 1 (n = 4) | 0,26 | 61,5 | 27 | 7,7 | 3,6 | 0,12 | 91,7 | 8,3 | 0 | 0 |
| 2 (n = 3) | 1,31 | 22 | 74 | 3,9 | 0,1 | 0,7 | 38,6 | 61,4 | 5,9 | 0 |
| 3 (n = 3) | 0,19 | 63 | 53 | 0 | 0 | 0,16 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 4 (n = 4) | 0,58 | 48 | 50,3 | 12,3 | 0 | 0,3 | 80 | 6,6 | 0 | 13,4 |

Tabelle 5: Errechnete prozentuelle Verteilung der Triglyceride und des Cholesterins in den Lipoproteinsubfraktionen in VLDL. In einigen Gruppen (2, 3 und 4) errechnen sich Lipidanteile mit einer Summe > 100%. Darauf wird im Text genauer eingegangen.

Der Vergleich der Zusammensetzung der VLDL zwischen den Gruppen zeigt, dass bei den normolipämischen Probanden der Hauptteil an Lipiden von LpB transportiert wird, während bei den hypertriglyceridämischen Probanden (Gruppe 2) LpB:C-III den größten Triglyceridanteil trägt. Bei den Probanden der Gruppe 3 und 4 wird der größte Teil des Cholesterins

vom LpB getragen, während die Triglyceride sich fast zu gleichen Teilen auf LpB und LpB:C-III verteilen.

| Gruppe | Gesamt TG in LDL, mmol/l | Triglyceridwerte, % | | | | Gesamt CH in LDL, mmol/l | Cholesterinwerte, % | | | |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------|-----------|-------|-------------|-----------------------------------|---------------------|-----------|-------|-------------|
| | | LpB | LpB:C-III | LpB:E | LpB:E:C-III | | LpB | LpB:C-III | LpB:E | LpB:E:C-III |
| 1 (n = 4) | 0,12 | 66,7 | 25 | 0 | 8,3 | 1,16 | 85,3 | 2,6 | 3,4 | 8,7 |
| 2 (n = 3) | 0,37 | 0 | 81 | 0 | 19 | 1,17 | 82,1 | 10,2 | 13,6 | 0 |
| 3 (n = 3) | 0,20 | 0 | 70 | 0 | 30 | 1,77 | 75 | 10,9 | 5,2 | 8,9 |
| 4 (n = 4) | 0,21 | 90,5 | 9,5 | 4,7 | 0 | 1,28 | 106 | 0 | 0 | 0 |

Tabelle 6: Errechnete prozentuelle Verteilung der Triglyceride und des Cholesterins in den Lipoproteinsubfraktionen in LDL. Die Abweichungen der Summen der Lipidanteile von 100% werden im Text erläutert.

Die Triglyceride in LDL werden bei den normolipämischen Probanden (Gruppe 1) und bei den Probanden mit moderat erhöhten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen (Gruppe 4) zum größten Teil von LpB getragen, während bei Probanden in den Gruppen 2 und 3 das LpB:C-III den größten Teil der Triglyceride in LDL transportiert. Der Hauptteil des Cholesterins in LDL wird in allen vier Gruppen von LpB transportiert (Tab. 6).

In den beiden Tabellen sind auffällige Ergebnisse zu verzeichnen: z.B. der Cholesterinanteil der LpB in LDL in Gruppe 4 von 106 %. Diese Unplausibilität kann dadurch erklärt werden, dass, wie im Kapitel 4.1.2.1 angemerkt worden ist, nach der jeweiligen Immunpräzipitation oft höhere Lipidkonzentrationen zu messen waren als im nativen Serum. Auf die möglichen Ursachen wird ausführlich in der Diskussion (siehe 5.1.1) eingegangen.

4.1.2.3. Größenverteilung in Lipoproteinsubfraktionen nach Ultrazentrifugation und nachfolgender Immunpräzipitation

Die nach den Immunpräzipitationen und den Ultrazentrifugationen erhaltenen Lipoproteinsubfraktionen wurden nach der Größe mittels FPLC getrennt. Abbildung 6 zeigt am Beispiel eines normolipämischen Probandenserums die Größenverteilung in VLDL und im UZ-Unterstand (LDL+ HDL). Das Serum wurde zuvor mit spezifischen Antiseren präzipitiert (siehe 3.4.2).

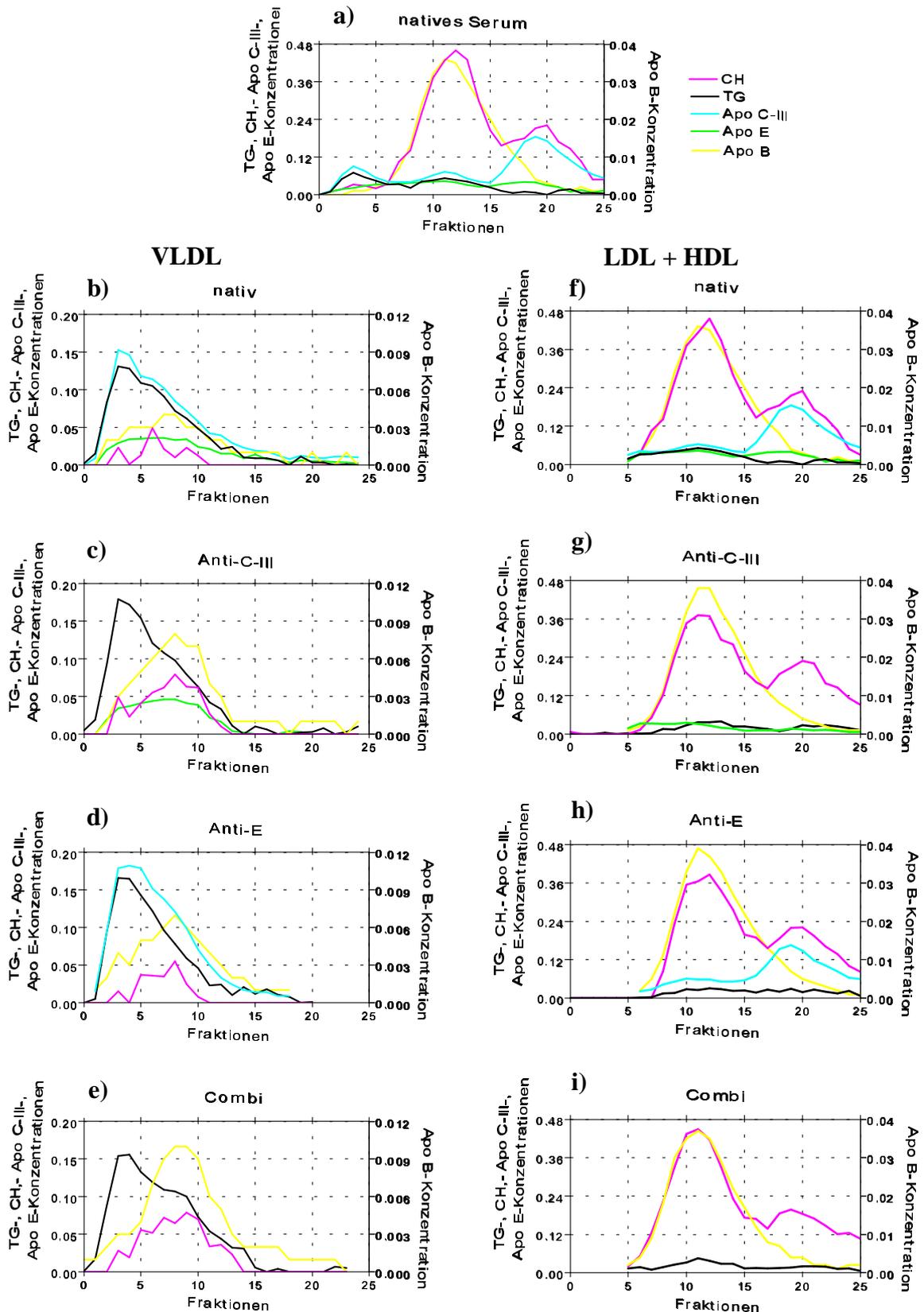


Abbildung 6: Größenverteilung von Lipoproteinsubfraktionen nach Immunpräzipitation und nachfolgender Ultrazentrifugation. a) Größenverteilung der Lipoproteine im nativen Serum. Der erste Peak (Fraktion 0-6) entspricht den VLDL-, der zweite (6-8) den IDL-, der dritte (8-16) den LDL- und der vierte (16-24) den HDL-großen Lipoproteinen. b)-e) VLDL: b) native VLDL, nachfolgende Immunpräzipitationen: c) Anti-C-III-, d) Anti-E-, e) Combi-Fällung; f)-i) native LDL + HDL (UZ-Unterstand): nachfolgende Immunpräzipitationen: f) Anti-C-III-, g) Anti-E-, h) Combi-Fällung.

Aus Abbildung 6 b) geht hervor, dass die VLDL hinsichtlich der Größe eine heterogene Gruppe von Lipoproteinen darstellen. Es können zwei Größenpopulationen unterschieden werden: die VLDL- (Fraktionen 0-5) und die IDL-großen Lipoproteine (Fraktionen 5-10). Die beiden Größenpopulationen sind verschieden in der Zusammensetzung: die VLDL-großen Lipoproteine bestehen aus ApoB- und cholesterinarmen, jedoch mit Triglyceriden angereicherten Partikeln, während die IDL-großen Lipoproteine triglyceridärmer aber cholesterin- und ApoB-reicher sind. Das ApoE verteilt sich in beiden Größenpopulationen annähernd gleich. Die ApoC-III-Verteilung ist mit der Triglyceridverteilung im ersten Peak nahezu übereinstimmend. Diese Konstellation bleibt auch in den VLDL-Subpopulationen erhalten, die nach den jeweiligen Immunpräzipitationen isoliert wurden (Abb. 6 c-e)).

Übereinstimmend mit den errechneten Ergebnissen (Tab. 6) ist der Abbildung 6 e) auch zu entnehmen, dass in VLDL-großen Lipoproteinen ein Großteil an Triglyceriden, Cholesterin und ApoB in LpB transportiert wird. Diese Beobachtung konnte nur bei normolipämischen Probanden und Probanden mit moderat erhöhten Lipiden festgestellt werden.

Im Unterstand der Ultrazentrifugation sind, wie zu erwarten, Lipoproteine nicht nur unterschiedlicher Dichte, sondern auch unterschiedlicher Größe nachzuweisen: LDL- und HDL-große Lipoproteine. Die Abbildung 6 f)-h) zeigt, dass weder durch die Immunpräzipitation mit einem Antiserum noch durch die Combi-Fällung eine relevante Senkung der Lipid- und der Apolipoproteinkonzentrationen im LDL-Größenbereich erreicht wurde. Diese Beobachtung stimmt mit den errechneten Ergebnissen überein, die besagen, dass die Masse an den Lipiden in LDL bei normolipämischen Probanden und Probanden mit moderat erhöhten bzw. stark erhöhten Cholesterinwerten vom LpB transportiert werden.

4.1.3. Unplausibilitäten im Quantifizieren der Lipide und Apolipoproteine nach Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation z.B. der ApoE-haltigen Lipoproteine mit dem ApoE-Antiserum sollte nicht nur zum Entfernen des ApoE führen, sondern auch zur Senkung anderer Bestandteile, die mit dem ApoE in einem Lipoproteinpartikel assoziiert sind. Dazu gehören die Triglyceride, Cholesterin und auch andere Apolipoproteine.

Wie oben beschrieben, führte die Bestimmung der Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen im Überstand nach Immunpräzipitation mit dem jeweiligen Antiserum in einigen Fällen jedoch nicht zu niedrigeren bzw. höchstens gleichbleibenden Lipid- und Apolipoproteinwerten. In anderen Worten: obwohl die Immunpräzipitation Lipoproteine entfernte, wurden im Immunpräzipitationsüberstand nicht niedrigere (aber bestenfalls gleichbleibende) Werte gefunden, sondern gelegentlich sogar höhere.

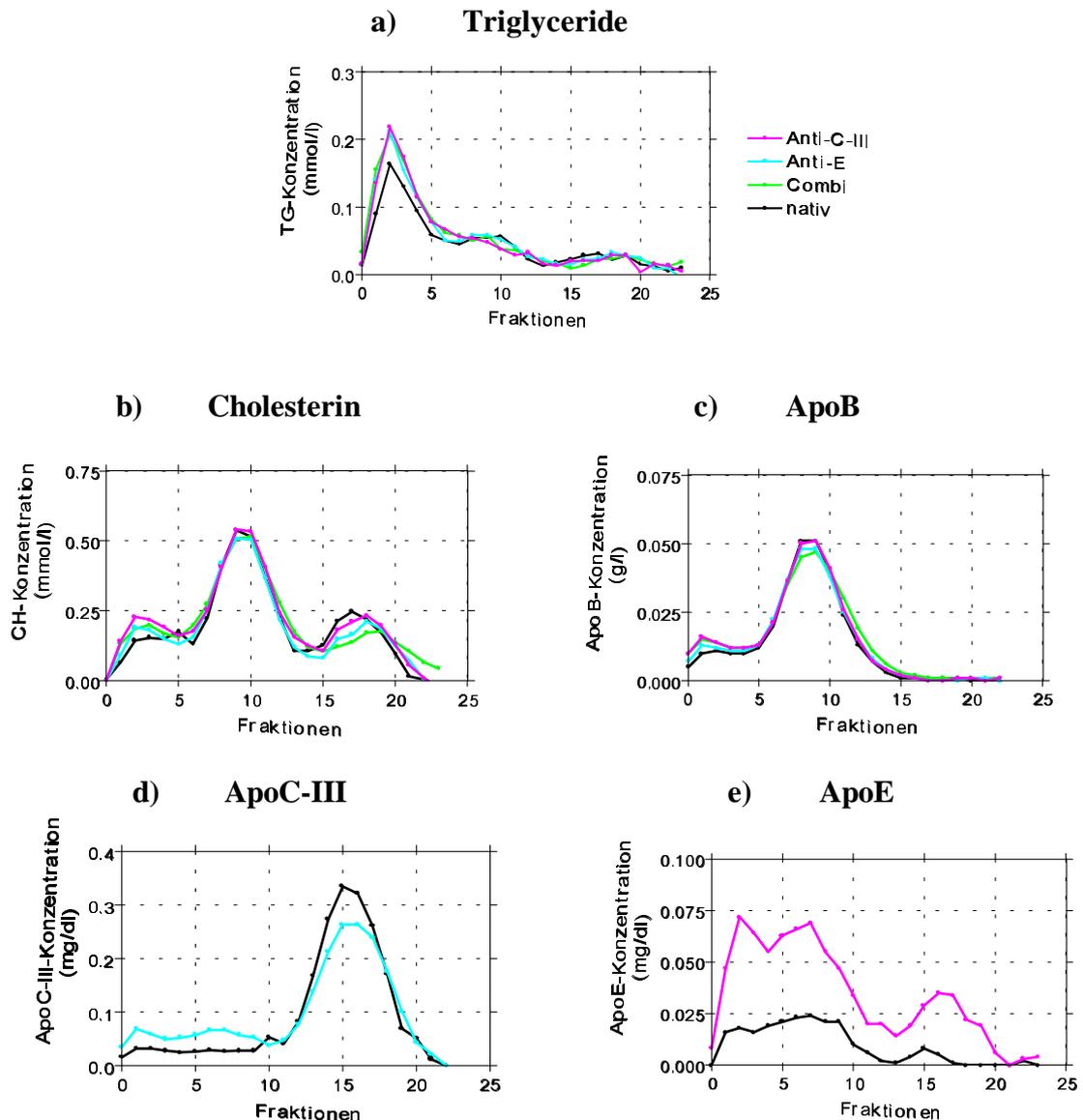


Abbildung 7: Vergleich der Lipid- bzw. Apolipoproteinkonzentrationen in den Lipoproteinen unterschiedlicher Größe vor und nach der Anti-C-III- bzw. Anti-E-Immunpräzipitation in einem Probandenserum mit Gesamtriglyceridkonzentration von 1,51 mmol/l: a) Verteilung der Triglyceride, b) des Cholesterins; c) des ApoB, d) des ApoC-III, e) des ApoE nach Größe in einzelnen Immunpräzipitationsansätzen.

An 9 Probandenserum mit Gesamtriglyceridkonzentrationen zwischen 1,5 und 8 mmol/l konnte gezeigt werden, dass diese Unplausibilitäten auch dann auftreten, wenn die Überstände der Fällungen mittels FPLC nach Größe getrennt wurden (Abb. 7 und 8). Am häufigsten wurde dieser Effekt in Probandenserum mit einer Gesamtriglyceridkonzentration < 4 mmol/l festgestellt. Abbildung 7 zeigt die Verteilung der Lipoproteine nach ihrer Größe vor und nach Immunpräzipitation mit den beiden Antiseren im Vergleich mit dem nativen Serum. Hier wurde als Beispiel ein Probandenserum mit einer Gesamtriglyceridkonzentration von 1,51 mmol/l verwendet.

Der auffällige Anstieg der Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen nach der jeweiligen Immunpräzipitation im Vergleich zum nativen Serum ist am stärksten im VLDL-Größenbereich. Im Größenbereich von LDL und HDL sind dagegen die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen entweder unverändert geblieben oder erwartungsgemäß gesenkt worden. Die ApoC-III-Konzentration wurde nur im HDL-Bereich gesenkt, die ApoE-Konzentration ist dagegen in allen Größenbereichen nach der Anti-C-III-Fällung höher als im nativen Serum.

In den Probandenserum mit Gesamtriglyceridkonzentrationen > 4 mmol/l werden die Triglycerid-, Cholesterin- und ApoE-Konzentrationen in VLDL-großen Lipoproteinen nach der Anti-C-III- und Combi-Fällung stark gesenkt (Abb. 8). Die ApoB-Konzentration wird nur nach der Combi-Fällung im VLDL-Größenbereich reduziert, in LDL-großen Lipoproteinen bleibt sie dagegen unverändert. Die ApoC-III-Verteilung im nativen Serum und nach der Anti-E-Fällung im VLDL-Größenbereich ist genau wie bei den Probandenserum mit moderat erhöhten Lipidwerten unplausibel (Abb. 7 d) und 8 d)).

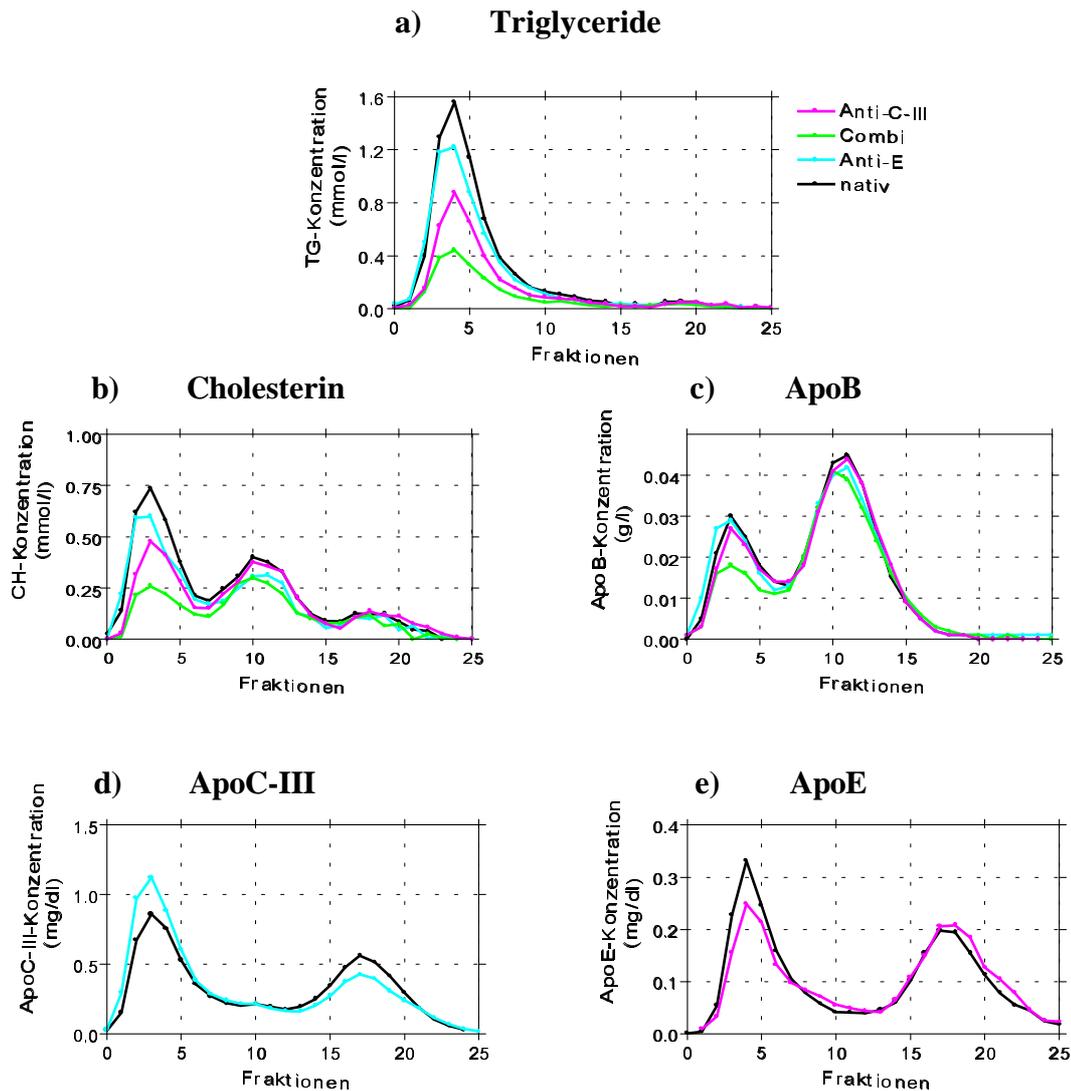


Abbildung 8: Vergleich der Lipid- bzw. Apolipoproteinkonzentrationen in den Lipoproteinen unterschiedlicher Größe vor und nach Anti-C-III-, Anti-E- und der Combi-Fällung in einem Probandenserum mit Gesamttriglyceridgehalt von 7,2 mmol/l. a) Verteilung der Triglyceride, b) des Cholesterins; c) des ApoB, d) des ApoC-III und e) des ApoE nach Größe in einzelnen Immunpräzipitationsansätzen.

Abschließend ist anzumerken, dass durch die Fällung mit den jeweiligen Antiseren keine Veränderungen in der Größe der Lipoproteinsubfraktionen zu beobachten waren. Die möglichen Ursachen der beschriebenen Unplausibilitäten werden in der Diskussion (siehe 5.1.1) detailliert behandelt. Im Kern mussten artifizielle Hinzufügungen, Matrixprobleme oder Methodenartefakte bedacht werden.

4.1.3.1. Methodenbezogene Untersuchungen zur Klärung der unplausiblen Immunpräzipitationsergebnisse

Die Tatsache, dass nach den Immunpräzipitationen die Konzentrationen an Triglyceriden, Cholesterin und Apolipoproteinen gelegentlich nicht abfallen, sondern steigen, könnte methodische Ursachen haben:

- 1) Die Lipide werden der Probe mit dem Antiserum zusätzlich zugefügt;
- 2) Die Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationsmessungen sind durch ungleiche Probenmatrices in dem nativen Serum und den Immunpräzipitationsansätzen gestört.

Daher wurden die Antiseren auf Lipoproteingehalte untersucht, diese nach Möglichkeit entfernt bzw. wurde für nicht entfernbare Anteile korrigiert. In weiteren Experimenten wurden Matrixeffekte untersucht.

4.1.3.1.1. Korrektur der Immunpräzipitationsergebnisse für die Lipidkonzentrationen in den Antiseren

Als erstes wurde versucht, die nach den Immunpräzipitationen ermittelten Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen für die in den Antiseren gemessenen und damit auch der Serumprobe zugeführten Lipid- und Apolipoproteinwerte zu korrigieren. Durch diese Maßnahme wurden die unplausiblen Werte nach der jeweiligen Immunpräzipitation zwar reduziert, das Problem höherer bzw. gleichbleibender Lipid- und Apolipoproteinwerte blieb jedoch weiterhin bestehen. Tabelle 7 zeigt am Beispiel eines Probandenserums (Gesamtriglyceridkonzentration 3,1 mmol/l), wie die Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in den Immunpräzipitationsansätzen vor und nach der Korrektur für die Lipidwerte in den jeweiligen Antiseren ausfallen. In beiden Antiseren wurden keine Apolipoproteine nachgewiesen, deshalb erübrigte sich eine Korrektur für die Apolipoproteine.

| | | TG mmol/l | CH mmol/l | ApoB g/l | ApoC-III mg/dl | ApoE mg/dl |
|--------------------|----------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|
| Nativ | | 0,49 | 0,67 | 0,19 | 2,7 | 0,85 |
| Anti-C-III- | n. korr. | 0,52 | 0,83 | 0,20 | 0 | 0,85 |
| Fällung | korr. | 0,39 | 0,74 | | | |
| Anti-E- | n. korr. | 0,50 | 0,78 | 0,20 | 3 | 0 |
| Fällung | korr. | 0,48 | 0,72 | | | |
| Combi- | n. korr. | 0,48 | 0,82 | 0,21 | 0 | 0 |
| Fällung | korr. | 0,33 | 0,66 | | | |

Tabelle 7: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen eines Probandenserums nach den drei Immunpräzipitationen („n. korr.“: nicht korrigierte Messwerte in den Überständen; „korr.“: Messwerte in den Überständen, die für die Lipidwerte in den beiden Antiseren korrigiert wurden.) Nach der jeweiligen Immunpräzipitation ansteigende Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen wurden fett gedruckt.

Tabelle 7 zeigt, dass unabhängig davon, ob die Immunpräzipitation mit einem oder beiden Antiseren durchgeführt wurde, es zu keiner Reduktion des Cholesterins und der Apolipoproteine gekommen ist. Nur die Triglyceridkonzentration wurde nach der Combi-Fällung schwach (~ 30 %) gesenkt.

Anschließend wurden die Antiserum-Lipoproteine mittels Ultrazentrifugation entfernt (siehe 3.3.2) und danach für die Immunpräzipitationen eingesetzt. Durch den Ultrazentrifugationsschritt wurde eine Konzentrierung der Antikörper und damit eine geringere Probenverdünnung im Immunpräzipitationsansatz erreicht. Im Endergebnis führte diese Maßnahme aber nicht zu einer befriedigenden Lösung des Problems unplausibel hoher Werte.

4.1.3.1.2. Einfluss der Probenmatrix auf die Bestimmung der Lipide und Apolipoproteine nach der Immunpräzipitation

Als nächstes wurde untersucht, ob die Probenmatrix eine Rolle bei der Bestimmung der Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen spielt. Dafür wurden 4 Probandenserum für die beschriebenen Immunpräzipitationsversuche verwendet. Anstelle von NaCl-Lösung wurde jedoch sowohl zum nativen Serum als auch zu den Immunpräzipitationsansätzen Ziegen-Serum zugegeben. Hiermit sollte erreicht werden, dass die zu bestimmenden Größen in allen Versuchsansätzen im gleichen Milieu vorliegen und nachgewiesen werden. Denn in den

oben beschriebenen Immunpräzipitationsansätzen wurde immer NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel verwendet, so dass das native Serum z.B. 1+5,5 mit NaCl-Lösung verdünnt wurde, während bei der Combi-Fällung gar keine NaCl-Lösung zugegeben wurde. Der Austausch der NaCl-Lösung gegen Ziegen-Serum brachte jedoch keine Veränderung in den erhaltenen Messwerten. Als Beispiel sind in der Abbildung 9 die Daten von einem der vier untersuchten Probandenseren dargestellt. Die hier ersichtlichen falsch hohen Messwerte vor allem für ApoB, Cholesterin und ApoE wurden auch in den übrigen Versuchsansätzen gefunden.

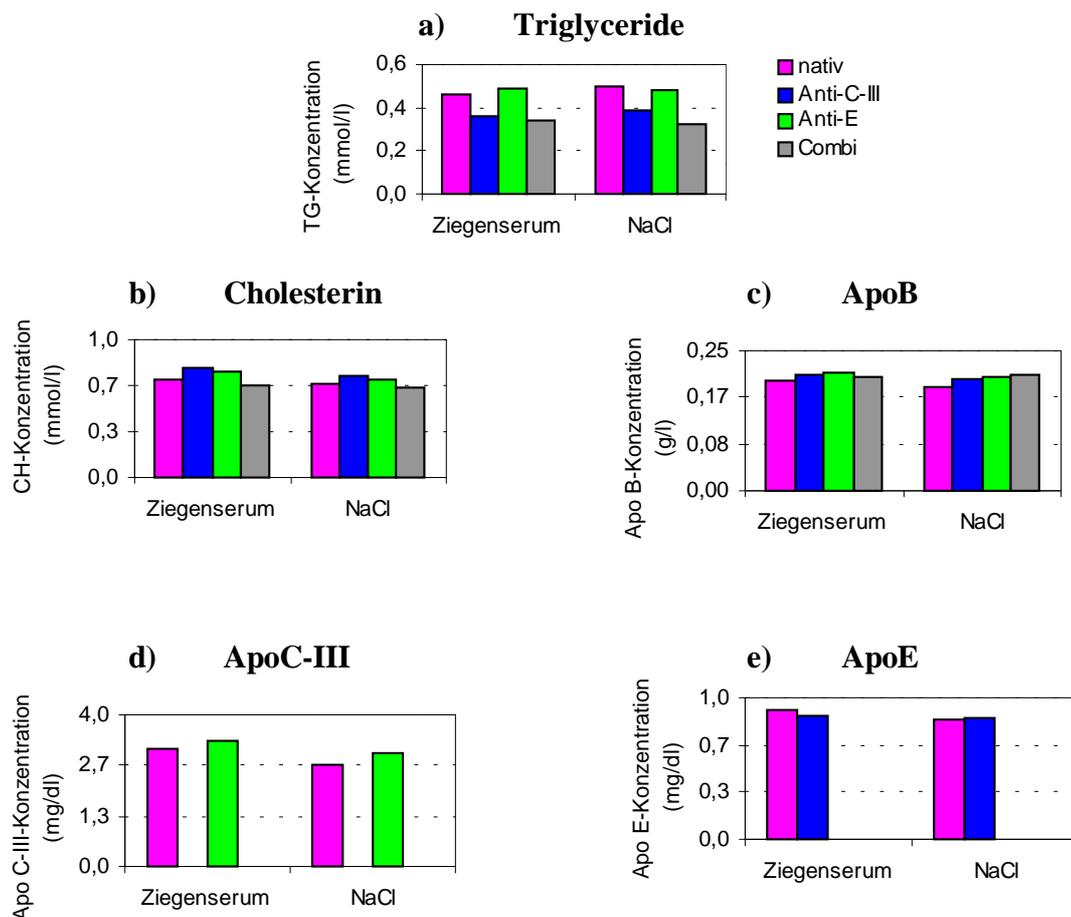


Abbildung 9: Vergleich der a) Triglycerid-, b) Cholesterin-, c) ApoB-, d) ApoC-III- und e) ApoE-Konzentrationen nach den jeweiligen Immunpräzipitationen bei Zugabe von NaCl-Lösung bzw. Ziegen-Serum. Im nativen Serum wurden folgende Werte bestimmt: Triglyceride: 3,09 mmol/l, Cholesterin 4,47 mmol/l, ApoB 1,1 g/l, ApoC-III 16,4 mg/dl, ApoE 4,8 mg/dl.

Die oben beschriebenen Unplausibilitäten konnten somit weder durch Korrektur für Lipide in den Antiseren noch durch Angleichung der Probenmatrices in den einzelnen Ansätzen behoben werden.

4.1.3.2. Biochemische Untersuchungen zur Klärung der unplausiblen Immunpräzipitationsergebnisse

Möglicherweise ist das Problem der höheren bzw. der gleichbleibenden Lipid- und Apolipoproteinwerten nach der Immunpräzipitation im Vergleich mit dem nativen Serum kein methodischbezogenes, sondern ein Problem, das zumindest teilweise durch die biochemischen Qualitäten der Lipoproteinpartikel hervorgerufen wird. Diese Vermutung wird durch die Feststellung unterstützt, dass die unplausiblen Ergebnisse in Probandenseren mit niedrigen Gesamttriglyceridkonzentrationen häufiger und deutlicher zu beobachten waren, als in Probandenseren mit hohen Gesamttriglyceridwerten. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es Unterschiede einerseits in der Zusammensetzung und andererseits in der Größe der Lipoproteine in bezug auf deren Triglyceridgehalt gibt.

4.1.3.2.1. Vergleich der Lipoproteinzusammensetzung bei Probanden mit unterschiedlich hohen Triglyceridkonzentrationen

Da die meisten der oben beschriebenen (siehe 4.1.3) unplausiblen Ergebnisse im Bereich der triglyceridreichen Lipoproteinen zu verzeichnen waren, wurde die Zusammensetzung dieser Partikel betrachtet. Abbildung 10 zeigt die Zusammensetzung der VLDL-großen Lipoproteine bei Probanden mit normalen bis schwach erhöhten (Gruppe 1), moderat erhöhten (Gruppe 2) und stark erhöhten (Gruppe 3) Gesamttriglyceridkonzentrationen. In der ersten Gruppe sind fünf Probanden mit Gesamttriglyceridwerten zwischen 1,2 und 3,4 mmol/l, in der zweiten Gruppe vier Probanden mit Triglyceridkonzentrationen zwischen 5,4 und 6,7 mmol/l und in der dritten Gruppe vier Probanden mit Werten zwischen 8,2 und 14,4 mmol/l eingeschlossen. Die Ermittlung der Molekülzahlen ist in 3.7.1 beschrieben.

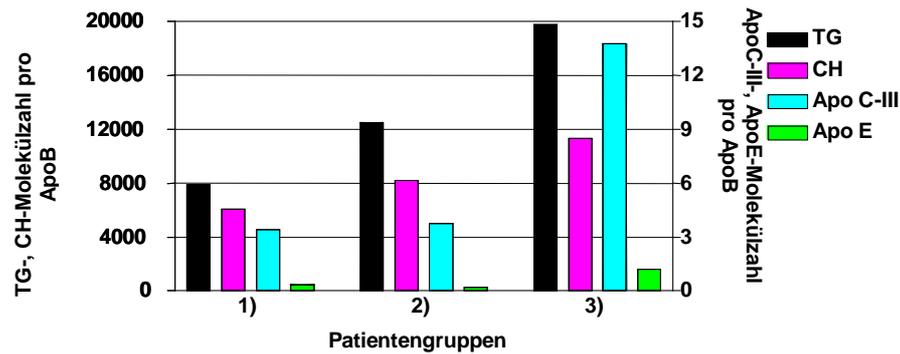


Abbildung 10: TG-, CH-, ApoC-III- und ApoE- Molekülzahl pro Partikel in VLDL-großen Lipoproteinen: 1) in Probandenseren mit Gesamttriglyceriden von 2,6 mmol/l (n = 5); 2) in Probandenseren mit Gesamttriglyceriden von 6,1 mmol/l (n = 4); 3) in Probandenseren mit Gesamttriglyceriden von 12,6 mmol/l (n = 4). Aufgetragen sind die Mittelwerte.

Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die VLDL-großen Partikel in den drei Gruppen unterschiedlich zusammengesetzt sind. Ein VLDL-großes Lipoprotein eines hypertriglyceridämischen Probanden (Gruppe 3) trägt pro ApoB-Molekül das Doppelte an Triglycerid- und Cholesterinmolekülen sowie das 4-fache an ApoC-III- und ApoE-Molekülen im Vergleich zu Lipoproteinen aus Probandenseren mit schwach erhöhten Triglyceriden (Gruppe 1).

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die erhöhten Gesamttriglyceridwerte von hypertriglyceridämischen Probanden nicht nur auf eine höhere Anzahl an triglyceridreichen Partikeln zurückzuführen sind, sondern auch darauf, dass diese Partikel triglycerid-, cholesterin-, ApoC-III- und ApoE-reicher sind als die Partikel in Probandenseren mit schwach oder moderat erhöhten Triglyceridkonzentrationen. Die Konsequenzen dieser qualitativen Unterschiede für die Immunpräzipitation werden unter 5.1.1 diskutiert.

4.1.3.2.2. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der VLDL- und LDL-großen Lipoproteine aus den normo- und hypertriglyceridämischen Probandenseren

Wie oben beschrieben, sind die Lipoproteine aus Serum eines hypertriglyceridämischen Probanden anders zusammengesetzt als die Lipoproteine aus Probandenserum mit schwach erhöhten Triglyceridkonzentrationen. Es stellte sich die Frage, ob die nach der Gelchromatographie als „VLDL-große“ eingestuft Lipoproteine dieser zwei Probandengruppen bezüglich ihrer Größe homogen sind. (Die in dieser Arbeit verwendeten Gelchromatographiesäulen ermöglichen eine gute Trennung zwischen VLDL-, LDL- und HDL-großen Lipopro-

teinen, jedoch keine ausreichende Trennung zwischen Chylomikronen-, Chylomikronen-Remnant-, VLDL- und VLDL-Remnant-großen Lipoproteinen). Zur Beantwortung dieser Frage wurden die mittels Gelchromatographie isolierten VLDL- und LDL-großen Lipoproteine aus einem hypertriglyceridämischen und einem normolipämischen Serum unter dem Elektronenmikroskop untersucht.

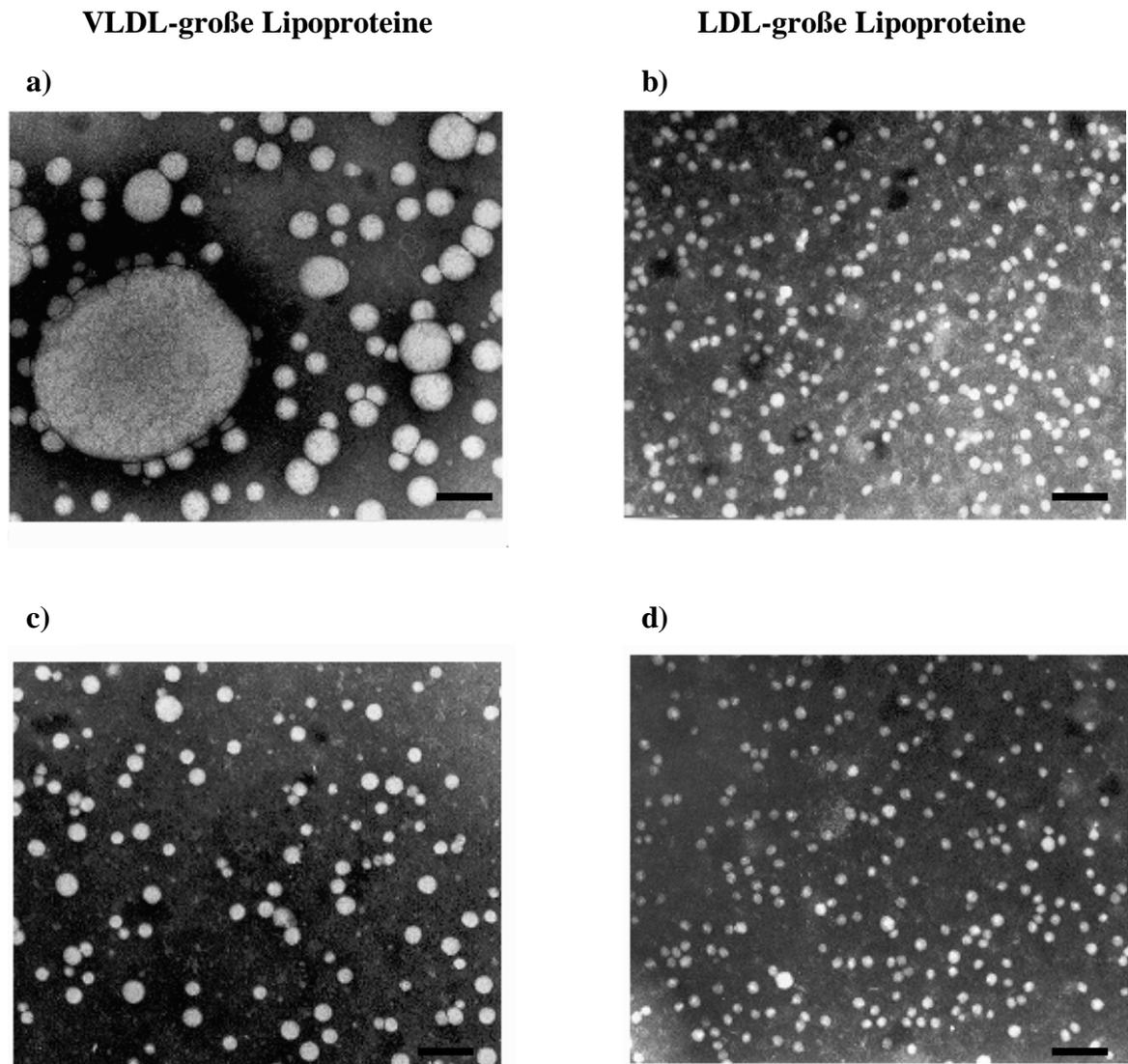


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von a) VLDL- und b) LDL- großen Lipoproteinen aus einem hypertriglyceridämischen Probandenserum (Gesamttriglyceride im Serum 7,9 mmol/l); c) VLDL- und d) LDL- große Lipoproteine aus Serum eines gesunden Probanden (Gesamttriglyceride im Serum 2,1 mmol/l). Die Lipoproteine wurden mittels Gelchromatographie isoliert. Der Balken entspricht 1000 Å.

Die Aufnahme 11 a) zeigt, dass die VLDL-großen Lipoproteine aus dem hypertriglyceridämischen Probandenserum aus mehreren Größenpopulationen bestehen. Der Größenbereich reicht von 285 Å bis zu 4000 Å. Die VLDL-großen Lipoproteine eines gesunden Probanden (Abb. 11 c)) erscheinen zwar auch als eine heterogene Gruppe, die Größenunterschiede lie-

gen jedoch nur zwischen 210 Å und 570 Å. Die LDL-großen Lipoproteine (140-180 Å) in der Abbildung 11 b) und d) stellen sich in beiden Fällen in Bezug auf ihre Größe als eine annähernd homogene Gruppe dar.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigen, dass die VLDL-großen Lipoproteine sowohl in hypertriglyceridämischen als auch in normotriglyceridämischen Seren sich hinsichtlich ihrer Größe unterscheiden. Dieser Umstand korrespondiert mit der unterschiedlichen biochemischen Komposition.

Ob die oben beschriebenen Ergebnisse nach Immunpräzipitation bei Probanden mit Triglyceriden < 4 bzw. > 4 mmol/l auf die vorstehend geschilderten Unterschiede der Lipoproteine hinsichtlich Größe und Zusammensetzung zurückgeführt werden können, wird in der Diskussion unter 5.1.1 ausführlich erläutert.

4.2. Immunabsorption

Die Immunabsorption eignet sich zur Isolierung größerer Mengen an Lipoproteinsubpopulationen bestimmter Zusammensetzung. Diese Methode beruht, auch wie die Immunpräzipitation, auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen. Der einzige Unterschied zwischen der Immunabsorption und Immunpräzipitation besteht in der Bindung der spezifischen Antikörper an die immobile Phase (Sephrose). Bei der Passage des nativen Serums durch eine Säule mit dem Immunabsorber werden bestimmte Lipoproteinpartikel zurückgehalten, während andere Lipoproteine uneingeschränkt die Säule passieren.

Für die Trennung der Lipoproteine in LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E wurden zwei Immunaффinitätssäulen verwendet: die Anti-ApoC-III-Säule (Anti-C-III-Säule) und die Anti-ApoE-Säule (Anti-E-Säule). Wie der Name besagt, sind an der Sepharose der Anti-C-III-Säule Antikörper gegen das ApoC-III gekoppelt, an der Sepharose der Anti-E-Säule Antikörper gegen das ApoE. Beim Durchlaufen des nativen Serums durch die Anti-E-Säule werden alle ApoE-haltigen Lipoproteine (LpB:E und LpB:C-III:E) an der Säule gebunden. Die Lipoproteine, die nicht von der Säule gebunden werden – die nicht retinierte Fraktion – enthalten demnach LpB und LpB:C-III. Die Trennung der LpB:E von LpB:C-III:E erfolgte durch das Auftragen der zuvor von der Anti-E-Säule erhaltenen retinierten Fraktion auf die

Anti-C-III-Säule. Die nicht retinierte Fraktion besteht nun ausschließlich aus LpB:E und die retinierte Fraktion aus LpB:C-III:E. Um LpB und LpB:C-III voneinander zu trennen, lässt man diese Lipoproteine durch die Anti-C-III-Säule passieren. Die nicht retinierte Fraktion enthält nun LpB und die retinierte Fraktion LpB:C-III. Zusammenfassend, durch die Kombination der beiden Immunitätsäulen – der Anti-C-III- und der Anti-E-Säule – wird eine Trennung der LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E erreicht.

4.2.1. Einfluss der Natriumthiocyanatkonzentration auf die Wiederfindungsrate

Bei der Passage des nativen Serums durch die Immunitätsäulen entstehen zwei Fraktionen: die nicht retinierte und die retinierte Fraktion. Alle Bestandteile des Serums, die nicht an die Antikörper der Säule binden, werden in der nicht retinierten Fraktion aufgefangen. Die von der Säule spezifisch gebundenen Lipoproteine müssen von der Immunmatrix abgelöst werden. Die Auflösung der nichtkovalenten Bindung zwischen dem Antikörper und dem Apolipoprotein kann mittels einer Salzlösung hoher Ionenstärke erfolgen. Der Literatur kann entnommen werden, dass 80%-90% des gebundenen Apolipoproteins mit 3M NaSCN-Lösung eluiert werden können [42, 47]. In dieser Arbeit konnten mit 3M NaSCN-Lösung ca. 10%-30% des gebundenen Apolipoproteins von der Säule abgelöst werden. Der Rest an gebundenen Lipoproteinen wurde mit einer hochmolaren NaSCN-Lösung (5M) von der Säule eluiert, wodurch sich die Wiederfindung auf 80%-90% verbesserte. Durch eine möglichst kurze Interaktion des Elutionsmittels mit den retinierten Lipoproteinen wurde versucht, eventuelle Alterationen der Lipoproteinstruktur durch das 5M NaSCN zu vermeiden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die retinierte Fraktion in nachfolgenden Untersuchungen in zwei Schritten von der Säule eluiert: zunächst mit 3M NaSCN und anschließend mit 5M NaSCN.

4.2.2. Charakteristika von Lipoproteinsubfraktionen nach Immunabsorption und Elution mit 3M bzw. 5M NaSCN

Der Umstand, dass mit 3M NaSCN-Lösung nur ein Teil der Lipoproteine von den beiden Immunaффinitätsäulen abgelöst werden kann, legt die Vermutung nahe, dass es entweder zwei Populationen unterschiedlich zusammengesetzter Lipoproteine gibt, oder dass es sich um ein methodisches Problem handelt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Lipoproteine, die mit Elutionsmitteln verschiedener Ionenstärke von den Immunaффinitätsäulen eluiert wurden, sich in ihrer Größe, Zusammensetzung und ihrer elektrophoretischen Eigenschaften unterscheiden.

4.2.2.1. Biochemische Charakteristika

Zur Isolierung und Charakterisierung von Lipoproteinsubfraktionen wurden Probandenserum mit erhöhten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen verwendet (Probanden mit Hyperlipoproteinämie Typ IIb nach Fredrickson).

Es wurde untersucht, ob zwischen den Fraktionen, die mit 3M- bzw. 5M NaSCN-Lösung von den Immunaффinitätsäulen isoliert wurden, Unterschiede in der Zusammensetzung und der Partikelgröße bestehen. Hierzu wurde zunächst LpB:C-III von anderen Lipoproteinsubfraktionen getrennt. Bei der erneuten Passage des LpB:C-III durch die Anti-C-III-Säule wurde das Lipoprotein vollständig von der Säule zurückgehalten und erstmalig mit 3M- (Lp-3M) und anschließend mit 5M NaSCN-Lösung (Lp-5M) eluiert.

Die Größenverteilung des Lipoproteins aus beiden Elutionen entspricht der Größenverteilung von LpB:C-III, das aus nativem Serum isoliert wurde (Abb. 12). Dies legt nahe, dass Elution mit NaSCN-Lösungen unterschiedlich hoher Ionenstärke keinen Einfluss auf die Größe der eluierten Lipoproteinpartikel hat. Die biochemische Zusammensetzung der Partikel aus den jeweiligen Elutionen ist allerdings unterschiedlich (Tab. 8).

| LpB:C-III | TG/ApoB | CH/ApoB | ApoC-III/ApoB |
|-----------|---------|---------|---------------|
| Lp-3M | 84338 | 35809 | 25 |
| Lp-5M | 100875 | 44938 | 150 |

Tabelle 8: Partikelzusammensetzung von Lp-3M und Lp-5M, die vom LpB:C-III durch Eluieren mit 3M und 5M NaSCN-Lösung isoliert worden sind. Es wurden nur die Fraktionen 3-9 berücksichtigt.

Aus der Tabelle geht hervor, dass die Lp-5M ca. 16% triglycerid-, ca. 20% cholesterin- und ca. 80% ApoC-III-reicher als die Lp-3M sind.

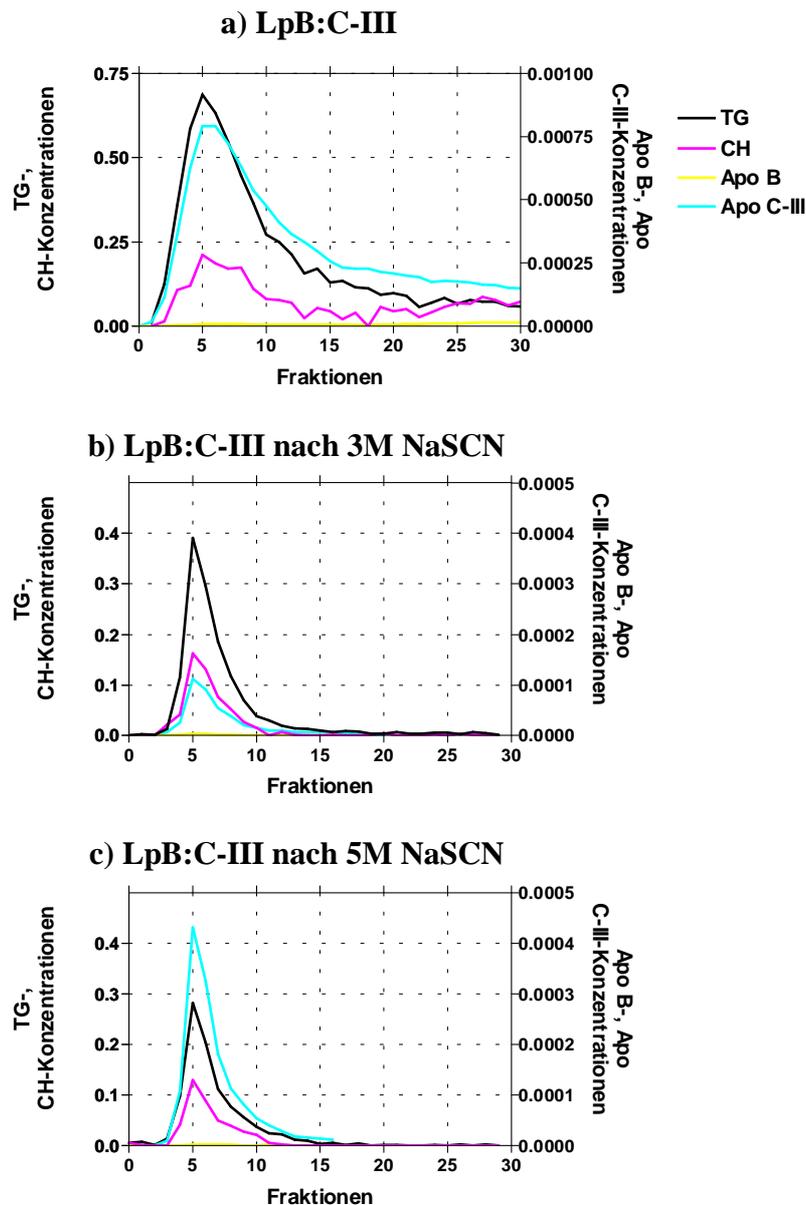


Abbildung 12: Größenverteilung von a) LpB:C-III nach Abtrennung von LpB, LpB:C-III:E und LpB:E; b) LpB:C-III nach erneutem Auftragen auf die Anti-C-III-Säule und Elution mit 3M NaSCN (Lp-3M) bzw. c) mit 5M NaSCN (Lp-5M). Die Trennung erfolgte mittels FPLC-Säule. Alle Konzentrationen sind in mmol/l angegeben.

Diese Daten legen nahe, dass die Verwendung von Elutionsmitteln unterschiedlicher Ionenstärke auch in Lipoproteinfraktionen, die eine relativ einfache Apolipoprotein-zusammensetzung aufweisen, eine Trennung in weitere Subspezies erlaubt.

4.2.2.2. Elektrophoretische Charakteristika

Auch in der elektrophoretischen Mobilität der Lp-3M und Lp-5M, die aus dem LpB:C-III isoliert wurden, konnten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 13).

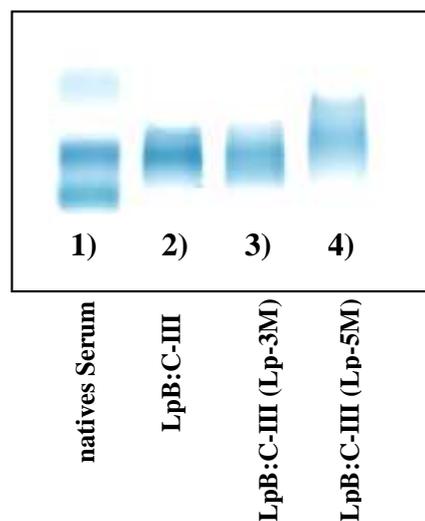


Abbildung 13: Elektrophoretische Mobilität von LpB:C-III, das mit 3M, bzw. 5M NaSCN-Lösung eluiert wurde. 1) natives Serum; 2) LpB:C-III; 3) Lp-3M von LpB:C-III und 4) Lp-5M von LpB:C-III.

Das isolierte LpB:C-III konnte zum größten Teil im VLDL-Größenbereich nachgewiesen werden (Abb. 12). Aus diesem Grund war LpB:C-III in der prä- β -Bande zu erwarten. Die Unterschiede in der Mobilität der Lp-3M und Lp-5M sind auf verschiedenartige Zusammensetzung der Subfraktionen zurückzuführen. Das größere Protein/Lipid-Verhältnis in der Lp-5M-Fraktion (Tab. 8) ist offensichtlich die Ursache für eine Veränderung der Oberflächenladung und der daraus resultierenden elektrophoretischen Mobilität von Lp-5M.

4.3. Vergleich der Immunpräzipitation mit der Immunabsorption

Die Immunpräzipitationsmethode sollte als ein schnelles analytisches Verfahren zum Untersuchen von Probandenseren auf Vorhandensein einzelner Lipoproteinsubfraktionen dienen.

Die präparative Auftrennung der LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:E:C-III für die Internalisationsstudien erfolgte jedoch mittels Immunaффinitätschromatographie. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob die beiden Verfahren übereinstimmende Ergebnisse liefern.

Abbildung 14 zeigt die Verteilung der Lipoproteine nach Größe vor und nach Immunpräzipitation mit dem jeweiligen Antiserum bzw. vor und nach der entsprechenden Immunaффinitätssäule.

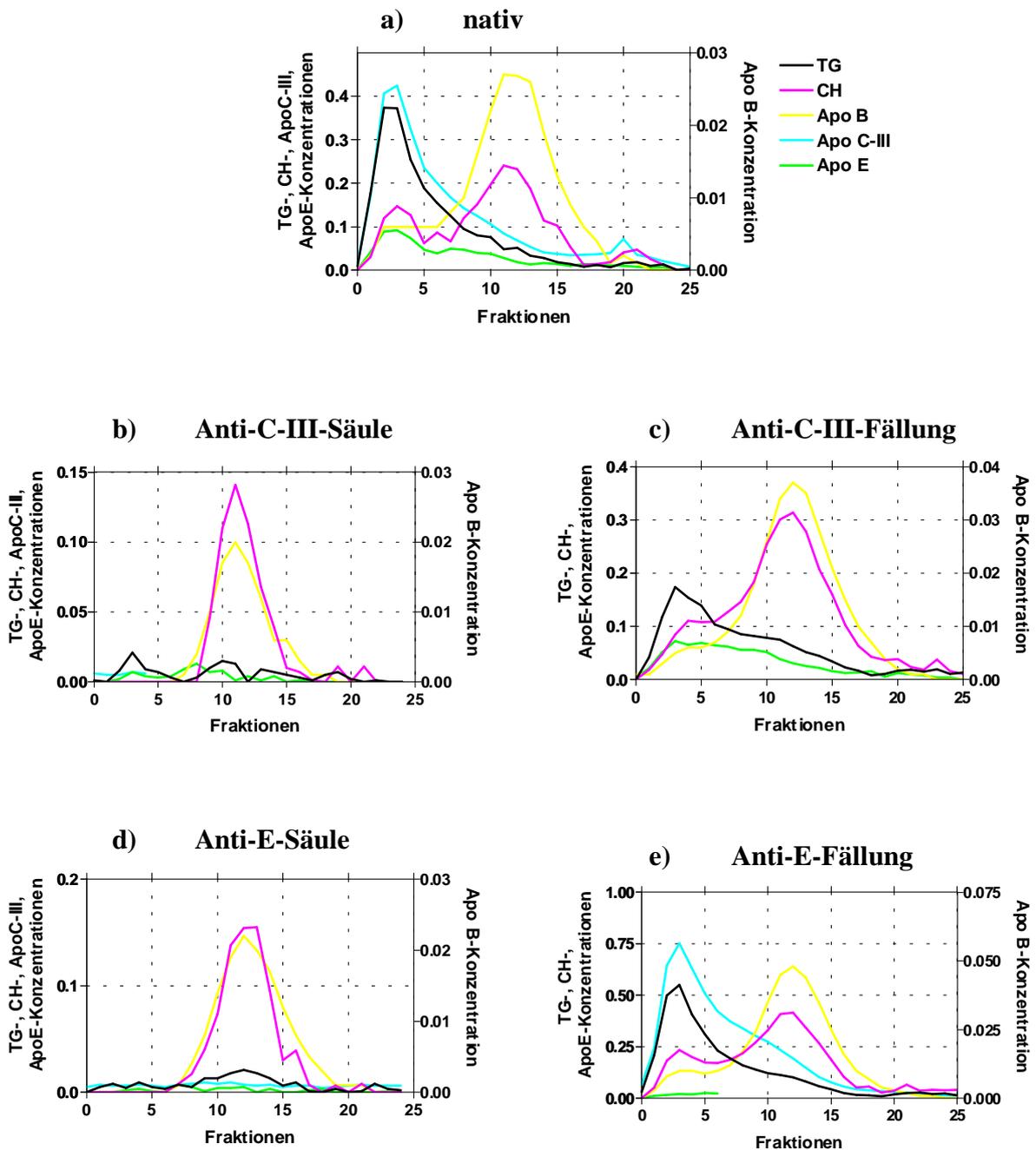


Abbildung 14: Verteilung der Lipoproteinsubfraktionen nach Größe (FPLC) a) im nativem Serum; b) in der nicht retinierten, konzentrierten Fraktion nach der Anti-C-III-Säule; c) im Überstand nach der Anti-C-III-Fällung; d) in der nicht retinierten, konzentrierten Fraktion nach der Anti-E-Säule; e) im Überstand nach der Anti-E-Fällung.

Abbildung 14 zeigt erhebliche Unstimmigkeiten zwischen den beiden Methoden, die in Wiederholungsuntersuchungen bestätigt wurden. Nach der Immunpräzipitation mit Anti-C-III konnten in dem ersten Peak sowohl Triglyceride als auch Cholesterin und ApoE, jedoch kein ApoC-III nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um LpB:E. Die Immunpräzipitation mit Anti-E führte zur Entfernung aller ApoE-haltigen Lipoproteine und somit zur Isolation von LpB:C-III. Bei Trennung der Lipoproteine mittels Anti-C-III-Säule wurde im ersten Peak mit allen Lipiden sowohl ApoC-III- als auch ApoE entfernt (Abb. 14 b)). Die Anti-E-Säule entfernte ebenfalls Lipide, ApoC-III- und ApoE (Abb. 14 d)). In beiden Fällen wurden in dem VLDL-Größenbereich praktisch alle Lipoproteine entfernt. Dies legt den Schluss nahe, dass diese großen Partikel sowohl ApoC-III, als auch ApoE enthalten, also LpB:C-III:E sind. Hätte dieser erste Peak zusätzlich LpB:C-III oder LpB:E enthalten, hätten diese als triglyzeridhaltiger Peak in den nicht retinierten Eluat nach Passage der Anti-E- respektive der Anti-C-III-Säule erscheinen müssen.

Somit wurde mit beiden Säulen LpB:C-III:E isoliert, das im zweiten Schritt des Experimentes mit den Antiseren gegen ApoE respektive ApoC-III präzipitiert werden sollte. Hierdurch wurde überprüft, ob die Immunpräzipitation vollständig abläuft, oder ob zwar das jeweilige Apolipoprotein, nicht aber das gesamte Lipoprotein präzipitiert wird. Im Falle einer unvollständigen Präzipitation müsste gefolgert werden, dass die Immunpräzipitation artifizielle Restpartikel erzeugt, die dadurch entstehen, dass die Antikörper ihr jeweiliges Apolipoprotein aus dem Lipoprotein „herausreißen“ unter Bildung eines künstlichen Lipoproteins. In anderen Worten, bei einer vollständigen Fällung durch die Immunpräzipitation wäre zu erwarten gewesen, dass die Messwerte nach Fällung von LpB:C-III:E mittels Anti-C-III respektive Anti-E gegen Null gehen müssten. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes an drei Probandenseren.

| Proband | TG mmol/l | | CH mmol/l | | ApoB g/l | | ApoC-III mg/dl | | ApoE mg/dl | |
|---------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung |
| 1 | 0,44 | 0,102 | 0,28 | 0,05 | 0,034 | 0,046 | 2,7 | 2,6 | 0,625 | 0,0 |
| 2 | 0,08 | 0,05 | 0,1 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,46 | 0,0 | 0,14 | 0,0 |
| 3 | 0,42 | 0,15 | 0,2 | 0,06 | 0,03 | 0,04 | 1,9 | 1,4 | 0,33 | 0,0 |

Tabelle 9: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in drei Probandenseren, die zuvor mit der Anti-E-Säule aufgetrennt wurden. Die retinierte Fraktion, die das LpB:C-III:E enthält, wurde anschließend mit ApoE-Antiserum präzipitiert. Nach der Immunpräzipitation ansteigende Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen wurden fett gedruckt.

Die Tabelle zeigt, dass bei den Probanden 1 und 3, dessen Gesamttriglyceridkonzentrationen bei 7,3 bzw. 10,4 mmol/l lagen, eine Reduktion der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen nach der Anti-E-Fällung zu verzeichnen war. Was die Apolipoproteine betrifft, so wurde eine Erhöhung der ApoB-Konzentration und eine Erniedrigung der ApoC-III-Konzentration verzeichnet. Im Serum des Probanden 2 (Gesamttriglyceridkonzentration 1,1 mmol/l) wurden nicht nur die Lipid- sondern auch ApoB- und ApoC-III-Konzentrationen reduziert. Offensichtlich wurde durch Anti-E-Fällung bei den beiden untersuchten Probanden mit Hypertriglyceridämie, kein ApoC-III aus dem LpB:E:C-III mitgefällt. Im Gegensatz dazu wurde im Serum des normotriglyceridemischen Probanden eine vollständige Immunpräzipitation des LpB:C-III:E mit dem ApoE-Antiserum erreicht.

Nach dem gleichen Schema wurde die Fällung der retinierten Fraktion der Anti-C-III-Säule, die das LpB:C-III:E enthält, mit ApoC-III-Antiserum durchgeführt (Tab. 10).

| Pro- band | TG mmol/l | | CH mmol/l | | ApoB g/l | | ApoC-III mg/dl | | ApoE mg/dl | |
|--------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung | vor Fällung | nach Fällung |
| 1 | 0,75 | 0,43 | 0,36 | 0,13 | 0,05 | 0,08 | 4,7 | 0,68 | 0,7 | 1,3 |
| 2 | 0,12 | 0,2 | 0,11 | 0,06 | 0,02 | 0,02 | 0,56 | 0,09 | 0,35 | 0,89 |
| 3 | 0,5 | 0,5 | 0,22 | 0,1 | 0,04 | 0,06 | 1,7 | 0,09 | 0,76 | 1,38 |

Tabelle 10: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen in drei Probandenseren, die zuvor mit der Anti-C-III-Säule aufgetrennt wurden. Die retinierte Fraktion, die das LpB:C-III:E enthält, wurde anschließend mit ApoC-III-Antiserum präzipitiert. Nach der Immunpräzipitation ansteigende Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen wurden fett gedruckt.

Die Immunpräzipitation mit ApoC-III-Antiserum führte in allen drei Seren zur Reduktion der Cholesterin- jedoch nicht der ApoE-Konzentration. Diese wurde in allen drei Fällen fast doppelt so hoch bestimmt. Die Triglyceridkonzentration wurde nur beim Proband 1 gesenkt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Immunpräzipitation nicht das gewünschte Ergebnis liefert. Als Konsequenz daraus wurde auf die Immunpräzipitation als ein schnelles Verfahren zum Untersuchen der Probandenseren auf Vorhandensein definierter Lipoprotein-subfraktionen verzichtet.

4.4. Biochemische und funktionelle Charakterisierung der Lipoproteinsubfraktionen von Probanden mit Hyperlipoproteinämie

Die Isolierung und Charakterisierung der Lipoproteinsubfraktionen erfolgte aus Probandenseren mit erhöhten Gesamttriglyceriden (Typ IV, Typ III oder Typ IIb nach Fredrickson). Im ersten Schritt wurde das Serum auf Vorhandensein von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E überprüft. Im zweiten Schritt erfolgten die Isolierung der Partikel und ihre biochemische Charakterisierung. Hierzu wurden die Größenverteilung, die Zusammensetzung und die elektrophoretische Mobilität der Lipoproteinsubfraktionen untersucht. Im dritten Schritt wurde überprüft, ob es Unterschiede zwischen den Partikeln hinsichtlich ihrer Aufnahme in menschliche Fibroblasten gibt.

4.4.1. Untersuchen der Probandenserien auf Vorhandensein definierter Lipoproteinpartikel

Die zur Untersuchung eingeladenen Probanden wurden aus dem Patientenkollektiv der Lipid-Ambulanz des Institutes für Klinische Chemie und Pathobiochemie in Magdeburg ausgewählt. Für die Untersuchung auf Vorhandensein definierter Lipoproteinsubpopulationen wurden nur die Probandenserien eingesetzt, deren Gesamttriglyceridkonzentrationen zwischen 3,3 und 14 mmol/l lagen. Eine gleichzeitige Erhöhung des Gesamtcholesterins war möglich, aber nicht obligat.

Die Suche nach LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E erfolgte mit Hilfe der Immunaффinitätssäulen (siehe 3.6.4). Das Ergebnis der Untersuchung von 14 Probanden stellt die Tabelle 11 dar.

| Nr. | TG mmol/l | CH mmol/l | ApoB g/l | ApoC-III mg/dl | ApoE mg/dl | ApoE- Pheno- typ | Typ nach Fredrick- son | nachgewiesene Lipo- proteinsubpopulationen |
|-----|--------------|--------------|-------------|-------------------|---------------|------------------------|------------------------------|---|
| 1 | 4,9 | 4,3 | 1,0 | 24,6 | 5,9 | 3/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB |
| 2 | 4,9 | 6,4 | 1,3 | 25,8 | 6,9 | 3/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB |
| 3 | 6,1 | 6,3 | 1,3 | 33,3 | 10,7 | 3/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB, LpB:C-III, LpB:E |
| 4 | 6,4 | 7,7 | 1,7 | 27,0 | 11,6 | 3/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB |
| 5 | 6,7 | 4,4 | 1,0 | 22,2 | 6,7 | 3/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB, LpB:C-III |
| 6 | 7,4 | 5,2 | 1,1 | 33,6 | 7,2 | 3/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB |
| 7 | 7,9 | 8,7 | 1,8 | 34,8 | 8,9 | 3/3 | IIb | LpB:C-III:E, LpB, LpB:C-III |
| 8 | 10,1 | 7,4 | 1,7 | 36,3 | 8,2 | 4/4 | IV | LpB:C-III:E, LpB |
| 9 | 14,0 | 10,2 | 1,5 | 55,2 | 18,7 | 2/4 | V | LpB:C-III:E, LpB, LpB:C- III, LpB:E |
| 10 | 4,9 | 5,6 | 1,3 | 18 | 8,0 | 2/3 | IV | LpB:C-III:E, LpB, LpB:C- III, LpB:E |
| 11 | 3,3 | 6,3 | 0,74 | 14,4 | 11,9 | 2/2 | III | LpB, LpB:C-III:E, LpB:E |
| 12 | 3,4 | 6,8 | 0,8 | 18,6 | 13,7 | 2/2 | III | LpB, LpB:C-III:E, LpB:E |
| 13 | 3,7 | 8,1 | 1,02 | 30,9 | 14,2 | 2/2 | III | LpB, LpB:C-III:E, LpB:E |
| 14 | 4,1 | 7,5 | 1,1 | 25,2 | 11,7 | 2/2 | III | LpB, LpB:C-III:E, LpB:E |

Tabelle 11: Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen sowie nachgewiesene Lipoproteinsubpopulationen in den untersuchten Probandenseren. Fett gedruckt sind Probandenseren, die zur Isolierung von Lipoproteinsubpopulationen verwendet und biochemisch sowie funktionell charakterisiert wurden. (Der ApoE-Phänotyp wurde mittels isoelektrischer Fokussierung nachgewiesen (siehe 3.7.4).

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass alle 14 untersuchten Probanden unabhängig von dem ApoE-Phänotyp zwei Lipoproteinsubpopulationen – LpB und LpB:C-III:E – aufweisen. In zwei Fällen der 8 geprüften Probanden, die kein ϵ 2-Allel tragen, konnten zusätzlich LpB:C-III und in einem weiteren Fall LpB:C-III und LpB:E nachgewiesen werden. Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein der Lipoproteinsubpopulationen und einem der in Tabelle 11 aufgezählten Parameter feststellen. Deutlich zu erkennen ist jedoch die Verbindung zwischen dem Auftreten des LpB:E-Partikels und dem ApoE2-Phänotyp.

Die Probandenseren, in denen die größte Vielfalt an Lipoproteinsubpopulationen nachgewiesen werden konnte (LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und in einem Fall LpB:E), wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Wegen der gestörten ApoE2-Ligandenfunktion an den Zellrezeptoren [48] wurden die Lipoproteinsubpopulationen von ϵ 2-Allel-Trägern nicht untersucht.

4.4.2. Größenverteilung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E

Aus den oben erwähnten Probandenseren wurden LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E mittels Immunaffinitätsäulen (siehe 3.6.3) isoliert. Anschließend erfolgte die Trennung jeder Lipoproteinsubpopulation nach Größe mittels Gelchromatographie (siehe 3.5.2). Abbildung 15 zeigt die Größenverteilung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in den drei untersuchten Probandenseren.

Alle drei Nativläufe (Abb. 15 a)) zeigen eine für Probanden mit Hyperlipoproteinämie charakteristische Triglycerid-, Cholesterin-, ApoB-, ApoC-III- und ApoE-Verteilung: der erste Peak trägt den Hauptanteil an Triglyceriden, ApoC-III und ApoE, das Cholesterin ist fast zu gleichen Teilen zwischen dem ersten und dem zweiten Peak verteilt, und das ApoB findet sich zum größten Teil in dem zweiten Peak. Repräsentativ für Serum hypertriglyceridämischer Probanden ist der dritte Peak, in dem minimale Anteile an Cholesterin, ApoC-III und ApoE zu finden sind.

Was das LpB (Abb. 15 b)) betrifft, so findet sich der Hauptanteil an Cholesterin und ApoB erwartungsgemäß im zweiten Peak. LpB in der VLDL-Größe konnte in allen drei Fällen nicht nachgewiesen werden.

Die Trennung des LpB:C-III nach Größe (Abb. 15 c)) ergab zwei Peaks: den ersten großen triglycerid-, cholesterin- und ApoC-III-reichen Peak und den mittleren ApoB- und cholesterinreichen Peak.

Der ApoB-Konzentrationsverlauf in der Größenverteilung von LpB:C-III:E lässt eine Trennung der Lipoproteine in drei Größen zu erkennen: VLDL-, IDL- und LDL-große Lipopro-

teine (Abb. 15 d)). Während der VLDL- große Peak triglycerid-, cholesterin- und ApoC-III-reich ist, ist der LDL-große Peak triglycerid- und cholesterinarm.

Die Größenverteilung von LpB:E (Abb. 15 e)), die nur bei einem Probanden beobachtet werden konnte, liefert nur zwei gut voneinander abgetrennte Peaks: einen triglycerid-, cholesterin- und Apo E-reichen VLDL-Größenpeak und einen ApoB-reichen LDL-Größenpeak.

Die Entscheidung, welche Fraktionen für die funktionelle Charakterisierung der VLDL- und LDL-großen Lipoproteinsubfraktionen konzentriert werden mussten, wurde für jeden der drei Probandenseren separat getroffen. Die genaue Zusammensetzung einzelner Lipoproteinsubpopulationen von VLDL- bzw. LDL-Größe wird im nächsten Kapitel erläutert.

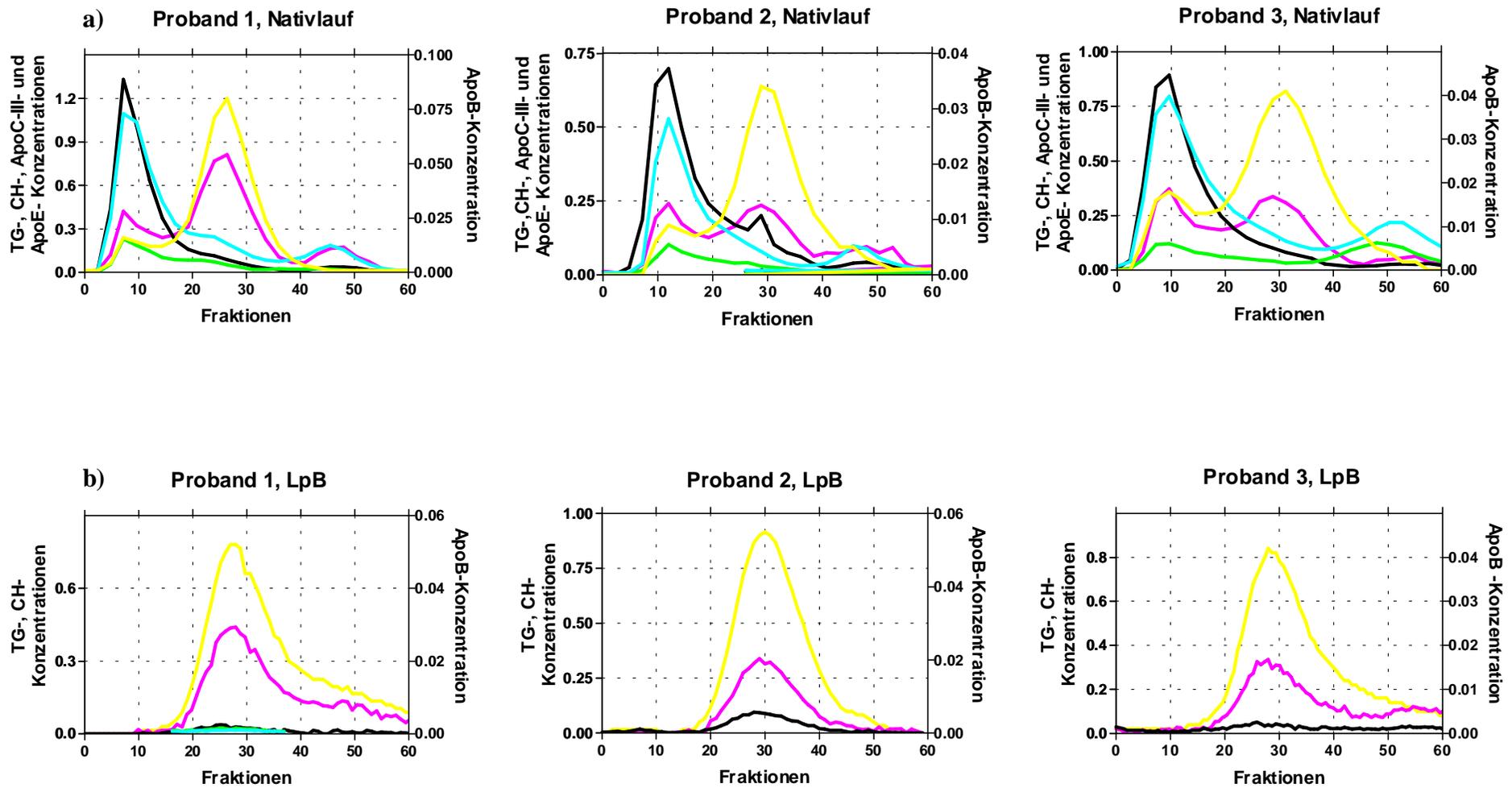
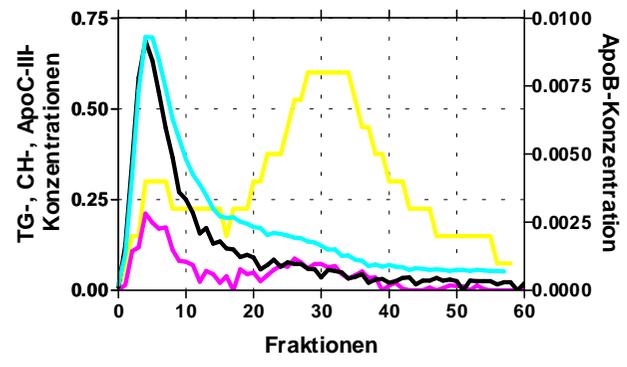
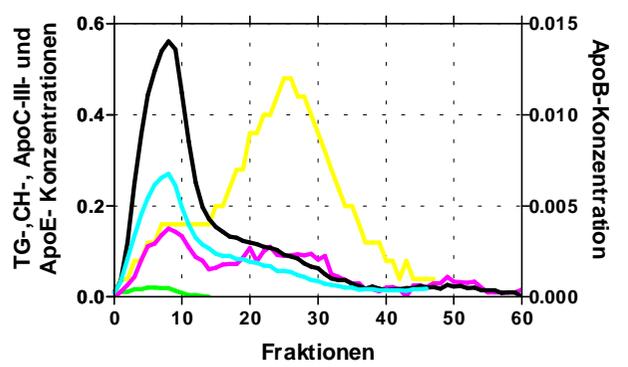


Abbildung 15: Größenverteilung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in drei untersuchten Probanden. a) Natives Serum, b) LpB, c) LpB:C-III, d) LpB:C-III:E und e) LpB:E.

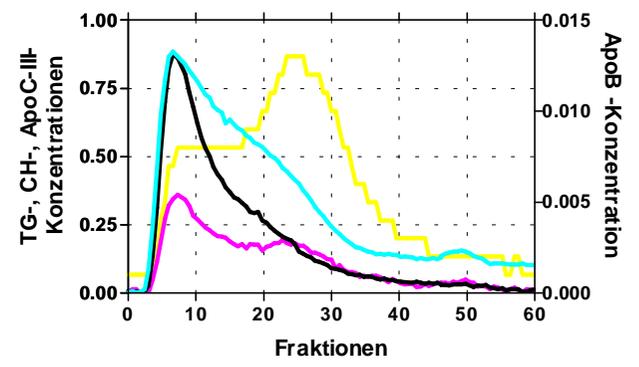
c) Proband 1, LpB:C-III



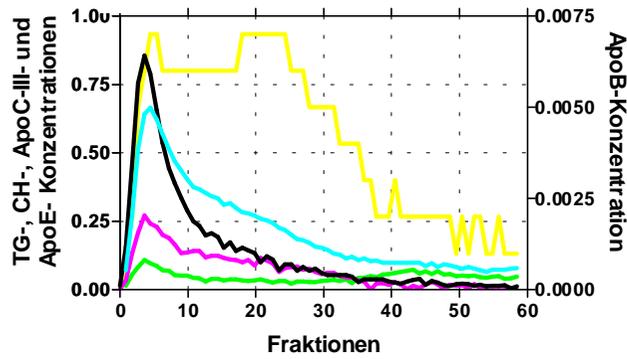
Proband 2, LpB:C-III



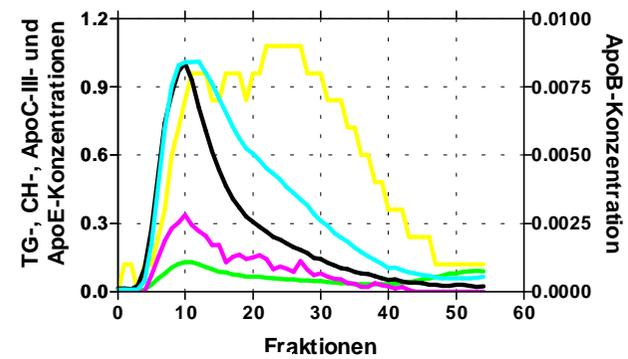
Proband 3, LpB:C-III



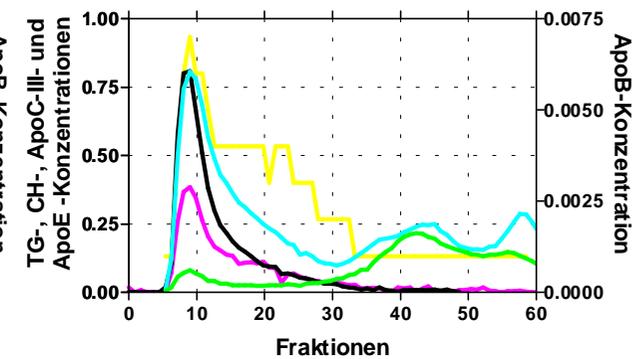
d) Proband 1, LpB:C-III:E



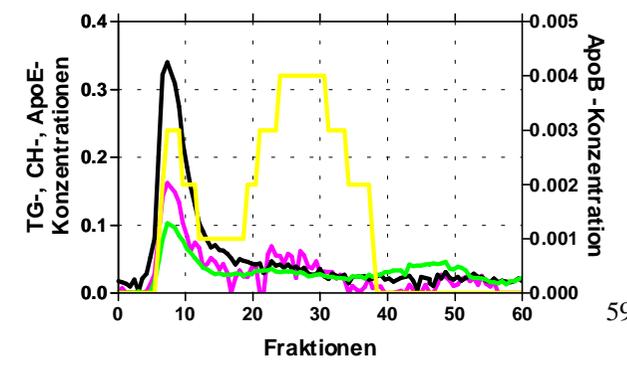
Proband 2, LpB:C-III:E



Proband 3, LpB:C-III:E



Proband 3, LpB:E



— ApoB
— ApoCIII
— ApoE
— TG
— CH

4.4.3. Zusammensetzung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E

Die molare Lipid- und Apolipoproteinzusammensetzung von VLDL- und LDL-großen LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E wurde nach dem in 3.7.1 beschriebenen Prinzip errechnet. In Abbildung 16 ist die Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteinsubpopulationen der drei untersuchten Probanden dargestellt.

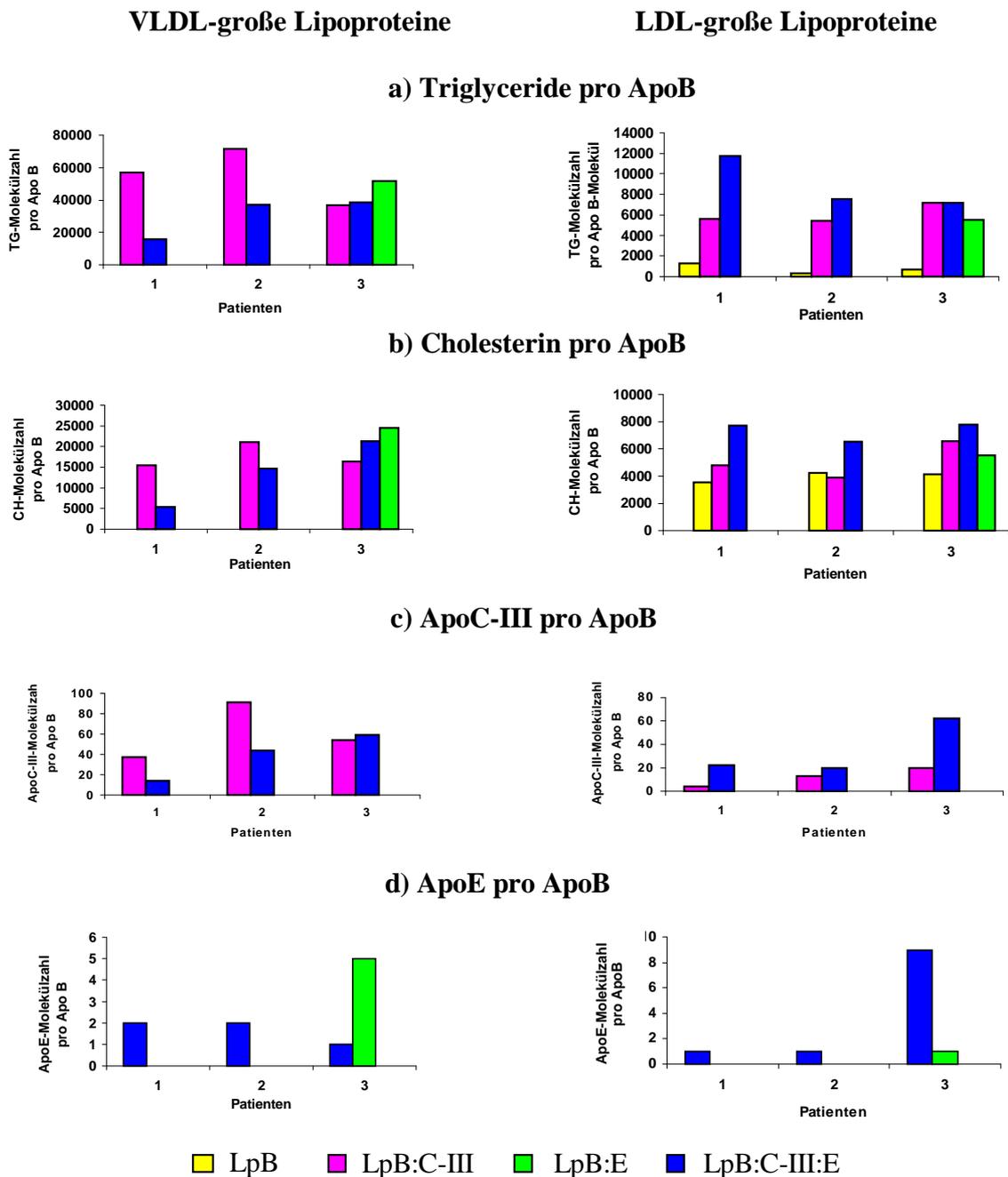


Abbildung 16: Vergleich der Zusammensetzung von VLDL- und LDL-großen LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in drei unterschiedlichen Probandenseren. Pro Lipoproteinpartikel sind angegeben: a) Triglyceridmoleküle, b) Cholesterinmoleküle, c) ApoC-III-Moleküle und e) ApoE-Moleküle.

Die Betrachtung der Triglycerid- und Cholesterinmoleküle pro Partikel zeigt, dass, bezogen auf ApoB, LpB:C-III das triglycerid- und cholesterinreichste Partikel unter den VLDL-großen Lipoproteinen ist. Das LpB:C-III:E hingegen ist unter den LDL-großen Lipoproteinen das triglycerid- und cholesterinreichste Partikel. Es ist überraschend, dass im LDL-Größenbereich nicht LpB, sondern LpB:C-III:E die größte Zahl an Cholesterinmolekülen trägt. Eine Ausnahme bildet das Probandenserum 3, in dem LpB:E die höchste Triglycerid- sowie Cholesterinmolekülzahl von allen VLDL-großen Lipoproteinen aufweist.

Auch in der Apolipoproteinzusammensetzung ergaben sich Unterschiede zwischen den VLDL- und LDL-großen Lipoproteinen: das ApoC-III dominiert in den großen Partikeln im LpB:C-III und in den mittelgroßen Lipoproteinen im LpB:C-III:E. Was das ApoE betrifft, so ist der Vergleich der ApoE-Molekülzahl in LpB:C-III:E und LpB:E nicht repräsentativ, da LpB:E nur bei einem Probanden nachgewiesen wurde. In diesem einen Fall ist LpB:E im VLDL-Größenbereich viel reicher an ApoE als LpB:C-III:E. Im LDL-Größenbereich dagegen ist bei diesem Probanden LpB:C-III:E das ApoE-reichste Lipoprotein.

4.4.4. Elektrophoretische Mobilität von LpB, LpB:C-III und LpB:C-III:E

Es wurde überprüft, ob die unterschiedlich großen Lipoproteinsubfraktionen in der Elektrophorese ein Migrationsverhalten zeigen, das mit dem konventionellen Migrationsverhalten von VLDL (prä- β -), LDL (β -) und HDL (α - Bande) vergleichbar ist.

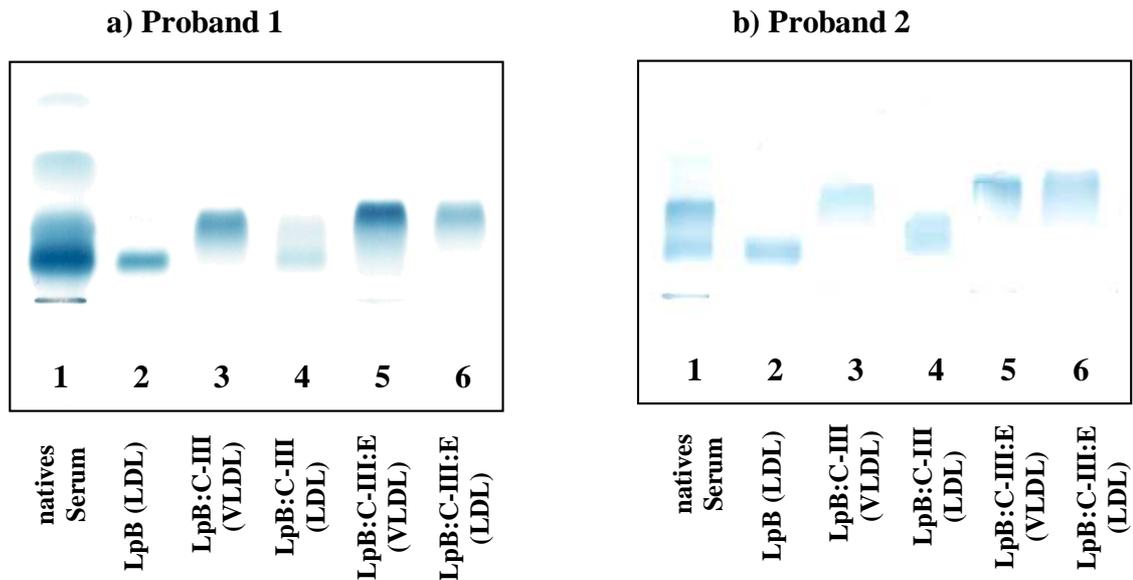


Abbildung 17: Elektrophoretische Mobilität von VLDL- und LDL-großen LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E. 1) natives Serum, 2) LpB (LDL-Größe), 3) LpB:C-III (VLDL-Größe), 4) LpB:C-III (LDL-Größe), 5) LpB:C-III:E (VLDL-Größe), 6) LpB:C-III:E (LDL-Größe).

In Abbildung 17 sind die elektrophoretischen Eigenschaften der Lipoproteinsubfraktionen von zwei Probanden abgebildet. In beiden Fällen ist im natives Serum eine prä- β -Bande (VLDL) und eine β -Bande (LDL) deutlich zu erkennen. Die α -Bande ist verhältnismäßig schwach. Mit einer Ausnahme migrieren die Lipoproteinsubpopulationen wie erwartet: LpB aus dem LDL-Größenbereich in der β -, LpB:C-III aus dem VLDL-Größenbereich in der prä- β - und LpB:C-III aus dem LDL-Größenbereich in der β -Region. LpB:C-III:E der VLDL- und LDL-Größe migrieren in beiden Fällen in der gleichen Höhe als prä- β -Lipoproteine. Mögliche Erklärungen hierfür werden in der Diskussion (siehe 5.2.1.2) geliefert.

4.4.5. Internalisation von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in humane Fibroblasten

Im letzten Schritt der Charakterisierung von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E wurden die funktionellen Eigenschaften der Lipoproteinsubfraktionen untersucht. Dafür wurden mit den nach Größe getrennten Lipoproteinsubfraktionen und humanen Fibroblasten Internalisationsstudien durchgeführt.

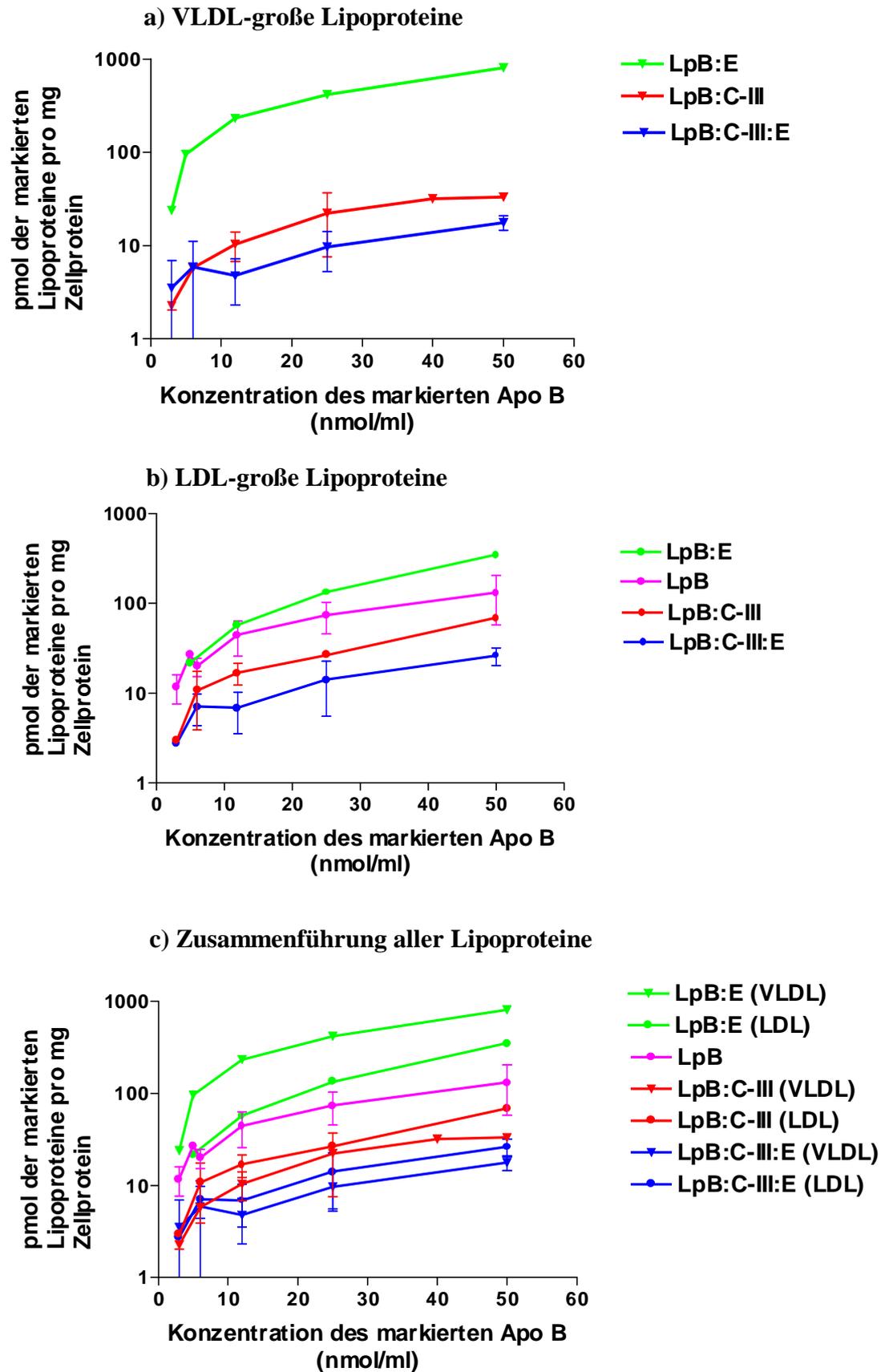


Abbildung 18: Internalisation von LpB, LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E in humane Fibroblasten. a) Internalisation der VLDL-großen Lipoproteinsubfraktionen; b) Internalisation der LDL-großen Lipoproteinsubfraktionen; d) Vergleich der Lipoproteinsubfraktionen der VLDL- und LDL-Größe.

Der Internalisationsvergleich von drei VLDL-großen Lipoproteinsubfraktionen (Abb. 18 a)) und vier LDL-großen Lipoproteinsubfraktionen (Abb. 18 b)) zeigt, dass LpB:E gefolgt vom LpB am besten von den Fibroblasten aufgenommen wird. LpB:C-III wird schlechter als LpB und LpB:E von Zellen internalisiert, jedoch besser als LpB:C-III:E. Diese Konstellation gilt sowohl für die VLDL- als auch für die LDL-großen Lipoproteinsubfraktionen.

Abbildung 18 c) stellt die Unterschiede in der Internalisation zwischen den VLDL- und LDL-großen LpB:E, LpB:C-III und LpB:C-III:E dar. Der Vergleich der Internalisation von VLDL- und LDL-großen LpB:E zeigt, dass die VLDL-großen Lipoproteine besser von den Zellen aufgenommen werden als die LDL-großen LpB:E. Im Gegensatz dazu werden VLDL-große LpB:C-III und LpB:C-III:E schlechter internalisiert als die LDL-großen LpB:C-III und LpB:C-III:E. Ob diese Unterschiede auf die Zusammensetzung der einzelnen Lipoproteinsubfraktionen oder auf deren Größe zurückzuführen sind, wird ausführlich in der Diskussion (siehe 5.3.1 und 5.3.2) erörtert.

5. Diskussion

Die Auswahl einer geeigneten Methode zur Isolierung von Lipoproteinen bestimmter Zusammensetzung sowie die Untersuchung von biochemischen und funktionellen Eigenschaften der Lipoproteinsubfraktionen stellt aus mehreren Gründen eine große Herausforderung dar. Denn einerseits muss berücksichtigt werden, dass die Wechselwirkungen zwischen den Bausteinen der Lipoproteine – den Apolipoproteinen, den Phospholipiden, den Triglyceriden, dem freien und veresterten Cholesterin - hydrophober Natur sind. Die Stabilität der hydrophoben Wechselwirkungen und damit die Stabilität der Lipoproteine hängt im großen Maße von der Umgebung ab [49]. Aus diesem Grund sollte die zur Isolierung der Lipoproteinsubfraktionen gewählte Methode nicht nur die Trennung nach Apolipoproteinkomposition ermöglichen, sondern auch die Stabilität und somit die biochemische und funktionelle Integrität der Lipoproteine nicht beeinträchtigen. Andererseits muss Klarheit darüber herrschen, dass das isolierte Spektrum an Lipoproteinsubfraktionen nur eine Momentaufnahme im Stoffwechselgeschehen repräsentiert. Die Lipoproteine befinden sich in ständigen Auf- und Abbauprozessen und stellen somit ein Kontinuum von Partikeln unterschiedlicher Größe und Zusammensetzung dar. Ob ein Lipoproteinpartikel von den Zellen der Leber oder von der Peripherie aufgenommen wird, oder ob es in der Zirkulation verweilt, hängt von der Apolipoproteinkomposition des Partikels ab. Auch die Größe des Partikels ist entscheidend für den Stoffwechselweg der Lipoproteine. Die sehr großen Partikel können das Gefäßsystem nicht verlassen und spielen hiermit keine direkte Rolle in der Atherogenese. Kleinere Lipoproteine dagegen durchdringen die Gefäßwand und können ihren Beitrag zur Entstehung von atherosklerotischen Plaques im subendothelialen Gewebe leisten. Aus diesen Gründen ist die Betrachtung der Lipoproteine hinsichtlich ihrer Größe und Apolipoproteinzusammensetzung nicht nur von akademischem Interesse, sondern auch von medizinischer Bedeutung.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- ein immunologisches Verfahren zur Trennung von Lipoproteinsubfraktionen zu entwickeln und zu optimieren, mit dem eine Isolierung von möglichst intakten Lipoproteinen bestimmter Größe mit einem definierten Apolipoproteinbesatz möglich ist.
- die isolierten Lipoproteinsubfraktionen (LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E) hinsichtlich ihrer biochemischen und funktionellen Eigenschaften zu charakterisieren.

5.1. Methodenauswahl

In der Literatur wurden mehrere immunologische Techniken zur Quantifizierung der von Alaupovic [34] definierten ApoA- und ApoB-haltigen Lipoproteinfamilien sowie deren Subfraktionen (LpB, LpB:E, LpB:C, LpB:C:E, LpA-I und LpAI:A-II) beschrieben. Dazu gehören:

- enzymatische Immunoassays (ELISA) [49-53],
- die „Rocket“- Immunelektrophorese [37, 54, 55],
- die sequentielle Immunpräzipitation [56, 57],
- die sequentielle Immunabsorption [36, 42, 47, 58-61].

Zur Quantifizierung der Lipoproteinsubfraktionen mit enzymatischen Immunoassays wird die Trägersubstanz (z.B. Mikrotiterplatte) mit einem Antikörper gegen ein Apolipoprotein beschichtet und mit einem enzymatisch markierten Antikörper gegen ein anderes Apolipoprotein nachgewiesen. Die „Rocket“-Elektrophorese ist auch wie die ELISA eine Quantifizierungsmethode, die auf elektrophoretischer Mobilität eines Antigens in einem Agarosegel basiert, in dem ein Antikörper immobilisiert ist. Wegen ihrer hohen Sensitivität und im Vergleich zu anderen Verfahren relativer Praktikabilität wurde diese Technik zur Bestimmung von Subfraktionskonzentrationen in mehreren großen Studien verwendet [37, 54, 55]. Beide Methoden erlauben Aussagen über die Konzentration der zu bestimmenden Subpopulation im Serum sowie deren Apolipoproteinzusammensetzung, jedoch keine Aussagen zur Lipid-Komposition der Lipoproteinsubfraktionen. Vorteilhaft gegenüber diesen Methoden erscheinen Immunpräzipitation und Immunabsorption. Mit diesen beiden Verfahren können die Lipoproteine isoliert und anschließend nach ihren biochemischen und funktionellen Eigenschaften untersucht werden. Aus diesem Grund wurden beide Trennverfahren in dieser Arbeit optimiert und anschließend angewandt.

5.1.1. Immunpräzipitation – Vorteile und Probleme

Sequentielle Immunpräzipitation wurde zum ersten Mal von Alaupovic *et al.* [56] als Methode zur Charakterisierung der Apolipoproteinfamilien verwendet. Hierbei handelt es sich um eine sukzessive Entfernung von Lipoproteinen, die ein bestimmtes Apolipoprotein tragen, aus dem nativen Serum bzw. aus vorher isolierten VLDL, LDL₁ und LDL₂. Dies ge-

schieht durch Zugabe eines spezifischen Antiserums. Zu den Vorteilen dieses Verfahrens zählen gute Standardisierungsmöglichkeiten, die relativ einfache Durchführung und somit die Möglichkeit zur Untersuchung größerer Probandenkollektive. Infolgedessen wurde die Immunpräzipitation in der vorliegenden Arbeit zunächst optimiert und in einer Pilot-Studie zur Charakterisierung von Lipoproteinsubpopulationen bei einem kleinen Probandenkollektiv (n = 14) eingesetzt. Im Vergleich zu den Literaturangaben (Alaupovic *et al.* [56] und Campos *et al.* [62]) lieferte diese Studie zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, obwohl die Probanden-Kollektive nahezu gleich gewählt wurden. Auf eine genaue Beschreibung dieser Diskrepanzen in den Ergebnissen der drei Studien wird an dieser Stelle aus folgenden, methodenbezogenen Gründen verzichtet.

Erstens, in den beiden Literaturangaben stimmen die Methoden zur Isolierung und Quantifizierung der Lipoproteinsubfraktionen mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kombination aus Immunpräzipitation, Ultrazentrifugation und Immunturbidimetrie nicht überein. Tabelle 13 stellt im Überblick den Methodenteil der zwei angesprochenen Arbeiten und dieser Dissertation dar.

| | Alaupovic <i>et al.</i> [56] | Campos <i>et al.</i> [62] | Dissertation |
|---|---|---|--|
| Probandengruppen | HCHOL, (N = 3) HTG, (N = 5) normolipämisch, (N = 8) | HCHOL, (N = 10) HTG, (N = 13) normolipämisch, (N = 12) | HCHOL, (N = 3) HTG, (N = 3) normolipämisch, (N = 4) |
| Material und Methode zur Separation der Lipoproteinsubfraktionen | Immunpräzipitation in VLDL, LDL ₁ und LDL ₂ | Immunabsorption im Serum, anschließende Ultrazentrifugation (VLDL, IDL, LDL) | Immunpräzipitation im Serum, anschließende Ultrazentrifugation (VLDL, LDL) |
| Quantifizierungsmethoden | für Lipide – Gaschromatographie, für Apolipoproteine – Elektroimmunoassays Messung in den Dichtefraktionen | für Lipide – Photometrie für Apolipoproteine – ELISA Messung in den Dichtefraktionen | für Lipide – Photometrie für Apolipoproteine – Immunturbidimetrie Konzentrationen rechnerisch ermittelt (siehe 3.4.2) |

Tabelle 12: Vergleich der in dieser Dissertation angewandten Methoden zur Isolierung und Quantifizierung der Lipoproteinsubfraktionen mit den von Alaupovic *et al.* [56] und Campos *et al.* [62] angegebenen Verfahren.

Zweitens, während der Durchführung der vorliegenden Arbeit wurden bei Verwendung von Immunpräzipitation auffällige Messwerte erzeugt, die die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse in Frage stellen. Es hat sich herausgestellt, dass nach einigen Präzipitationsschritten

(besonders nach der Anti-E-Fällung) nur das zu fällende Apolipoprotein (das ApoE) entfernt wurde, während die Konzentration der anderen Lipoproteinbestandteile – der Triglyceride, des Cholesterins, der anderen Apolipoproteine – nicht, wie erwartet, erniedrigt wurde, sondern unverändert blieb oder sogar höher wurde. Zur Aufklärung der möglichen Ursachen dieser Unplausibilität wurden 2 Hypothesen bearbeitet:

- sind diese unplausible Ergebnisse nach der Immunpräzipitation Messfehler?
- verändert die Immunpräzipitation die Lipoproteinstruktur?

Zur Überprüfung der ersten Hypothese wurden zwei Untersuchungen durchgeführt. In der ersten Untersuchung wurde überprüft, ob die Antiseren selbst tierische Lipide und/oder Apolipoproteine enthalten, die im Gemisch von Antiserum mit der humanen Serumprobe naturgemäß zu falsch hohen Messwerten führen würden. In beiden Antiseren konnten überraschenderweise Triglyceride und Cholesterin, jedoch keine Apolipoproteine nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die Ergebnisse nach der jeweiligen Präzipitation für die Lipidanteile in den Antiseren korrigiert, bzw. das Antiserum von den tierischen Lipoproteinen befreit.

In der zweiten Untersuchung wurde kontrolliert, ob die unterschiedlichen Probematrizes, die in den Immunpräzipitationsansätzen entstehen, einen Einfluss auf die immunturbidimetrische und photometrische Messung haben. Diese Untersuchung basierte auf dem Umstand, dass zu den Präzipitationsansätzen und dem Nativansatz unterschiedliche Mengen an Kochsalzlösung zugegeben wurden, um das Endvolumen gleich zu erhalten. Daraufhin wurde die Probenmatrix in allen Ansätzen durch Zugabe von Ziegen-Serum konform gehalten.

In beiden Fällen konnte das Problem gleichbleibender oder sogar ansteigender Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen nach der Immunpräzipitation nicht gelöst werden.

Eine mögliche Erklärung der aufgetretenen Unplausibilität in den Lipidkonzentrationen nach der Immunpräzipitation liegt eventuell in einer Beeinträchtigung der enzymatischen Messmethoden, die zur Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationsbestimmungen nach der Immunpräzipitation verwendet wurden. In beiden Methoden werden im ersten Schritt die Esterbindungen mittels testeigener Enzyme gespalten: im Falle der Triglyzeridbestimmung mit einer Lipoproteinlipase und im Falle der Cholesterinbestimmung mit einer unspezifischen Cholesterinesterase (siehe 3.2.1). Tatsache ist, dass die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL)

durch ApoC-III [63-65] und ApoE [66, 67] gehemmt wird. Ein Vergleich der Ansätze, die bei der Immunpräzipitation hergestellt wurden, liefert folgendes Bild: im Nativansatz sind 100% der ApoC-III- und ApoE-Moleküle vorhanden, während im Anti-C-III-Ansatz ein Teil des „inhibitorischen Potentials“ für die LPL, das ApoC-III, fehlt. Im Anti-E-Ansatz fehlt das ApoE, das die LPL ebenfalls hemmen kann, und in der Combi-Fällung fehlen folgerichtig beide Inhibitoren der LPL – das ApoC-III und das ApoE. In anderen Worten, die Nativansätze sind im Vergleich zu den Immunpräzipitationsansätzen reicher an Inhibitoren der LPL, was zur Folge haben könnte, dass die Präzipitationsansätze bei den Lipidmessungen aufgrund vollständigerer Lipolysen im ersten Schritt der Messverfahren falsch hohe Werte liefern.

Eine andere Überlegung – der Überschuss an Antiserum stört die Konzentrationsmessung nach der Immunpräzipitation durch Eigentrübung des zugesetzten Antiserums – kann durch folgende Beobachtung widerlegt werden. Die gleichbleibenden bzw. erhöhten Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen nach der jeweiligen Präzipitation traten auch dann auf, wenn die Lipoproteine mittels der gelchromatographischen Säulen nach Größe getrennt wurden. Die Konzentrationsmessungen in den Säulenfraktionen erfolgte anschließend im Tris-Puffer und nicht in dem mit Antiserum angereicherten Ansatz, so dass die Unplausibilität der Werte nicht durch Eigentrübung des Antiserums erklärt werden kann.

Bezüglich der Messung von Apolipoproteinkonzentrationen müssen Überlegungen anderer Art angestellt werden, weil in diesem Fall die Konzentrationsbestimmung mit immunturbidimetrischen Methoden erfolgte (siehe 3.2.2). Die beobachtete Unplausibilität für die Apolipoproteinkonzentrationen nach der Immunpräzipitation könnten erklärt werden, wenn die zweite Hypothese zuträfe, nämlich eine Veränderung der Lipoproteinstruktur durch Immunpräzipitation. Bei dieser Annahme würde folgendes ablaufen: bei der Zentrifugation des Lipoprotein-Antikörperkomplexes wirken zwei verschiedene Kräfte, nämlich der Auftrieb der Lipide gegen den Abtrieb der mit unterschiedlichen physikalischen Kräften an das Gesamtpartikel gebundenen Apolipoproteine, an die zusätzlich die Antikörper gebunden sind. Infolge dieser gegensätzlichen Kräfte könnte das Lipoproteinpartikel „zerreißen“. Das bedeutet, dass bei der Präzipitation nicht das gesamte Partikel sedimentiert, sondern nur Apolipoprotein-enthaltende Bruchteile des Partikels. Auf den so entstandenen artifiziellen Restpartikeln befänden sich weiterhin die übrigen Apolipoproteine, weshalb deren Konzentration nach Immunpräzipitation und Zentrifugation in der nachfolgenden Messung nicht erniedrigt gefunden würde. Hinzu käme eine weitere Möglichkeit: durch das Entfernen

gefunden würde. Hinzu käme eine weitere Möglichkeit: durch das Entfernen eines Apolipoproteins könnten bei den anderen (nicht präzipitierten) Apolipoproteinen zusätzliche Epitope freigelegt werden. Bei der nachfolgenden immunturbidimetrischen Bestimmung würden diese, zuvor maskierten Epitope, erkannt und damit zu „erhöhten“ Messwerten beisteuern.

Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse, die mit der Immunpräzipitation erzielt wurden, führte zu einer weiteren interessanten Beobachtung. Das Problem der gleichbleibenden oder erhöhten Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen nach der Immunpräzipitation war am auffälligsten in den Probandenseren mit Gesamtriglyceridkonzentrationen < 4 mmol/l. In hypertriglyceridämischen Seren konnte dagegen häufig eine Senkung der Lipidkonzentrationen nach der Immunpräzipitation beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte im Sinne der „Veränderung der Lipoproteinstruktur durch Immunpräzipitation“ - Hypothese („Zerreiß-Hypothese“) erklärt werden. Die Erklärung basiert auf dem Umstand, dass die Lipoproteine der hypertriglyceridämischen Probanden und der normolipämischen Probanden verschiedenartig zusammengesetzt sind. Ein VLDL-großes Lipoprotein eines hypertriglyceridämischen Probanden trägt das zwei- bis dreifache an Triglycerid-, das doppelte an Cholesterin- und das vierfache an ApoC-III-Molekülen pro Partikel im Vergleich zum gleichgroßen Lipoprotein eines normolipämischen Probanden [Ergebnisse dieser Arbeit, 62, 68]. Sollte die „Zerreiß-Hypothese“ zutreffen, kann angenommen werden, dass während der Immunpräzipitation eines Lipoproteins, z.B. in der Anti-C-III-Fällung, nicht das reine ApoC-III aus dem Partikel „herausgerissen“ wird, sondern Teile des Partikels, die mit ApoC-III auch Triglycerid- und Cholesterinmoleküle enthalten. Unabhängig davon, ob die Immunpräzipitation mit Serum eines normo- oder hypertriglyceridämischen Probanden durchgeführt wurde, dürfte dieser Vorgang analog ablaufen. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Lipoproteine der gefällte Triglycerid- und Cholesterinanteil beim hypertriglyceridämischen Probanden größer als beim normotriglyceridämischen Probanden sein könnte. Höchstwahrscheinlich werden von den 12 ApoC-III-Molekülen, die auf einem VLDL-großen Partikel eines hypertriglyceridämischen Probanden nachweisbar sind, mehr Triglycerid- und Cholesterinmoleküle durch das zugeführte Antiserum „mitgerissen“ als von den 3 ApoC-III-Molekülen eines normolipämischen Probanden. Nicht zu unterschätzen ist auch das Triglycerid-„Angebot“ auf einem VLDL-großen Lipoprotein eines hypertriglyceridämischen Probanden im Vergleich zum Lipoprotein eines normolipämischen Probanden, nämlich 20000 gegenüber 8000. Die Differenz der Lipidwerte vor und nach der Immunpräzipitation im Serum eines normolipämischen Probanden ist ver-

mutlich zu gering, um sie nachweisen zu können.

Trifft die „Zerreiß-Hypothese“ zu, bleibt noch eine andere Frage offen: warum sind die nach der Immunpräzipitation erhaltenen artifiziellen Rest-Partikel nicht kleiner als die nativen Lipoproteine (siehe Abb. 7, 8)? Möglicherweise ist die verwendete Gelchromatographiemethode nicht sensitiv genug, um eine durch Immunpräzipitation erzeugte Verkleinerung der Lipoproteine nachzuweisen. Die Schwäche dieser Methode liegt nämlich in der eingeschränkten Fähigkeit, zwischen Chylomikronen-, VLDL- und deren Remnant-großen Lipoproteinen zu unterscheiden. Wie die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen (siehe Abb. 11), ist der Größenbereich der als VLDL eingestuften großen Lipoproteine beim hypertriglyceridämischen und normolipämischen Probanden sehr unterschiedlich. Angenommen, nach der Fällung mit Anti-C-III wird die Hälfte eines VLDL-großen Lipoproteins vom hypertriglyceridämischen Probanden entfernt, dann müsste das kleinere Rest-Partikel in dem FPLC-Chromatogramm weiter rechts, verschoben zu den LDL-großen Lipoproteinen, erscheinen. Dieses wird aber nicht beobachtet, weil das Rest-Partikel immer noch so groß ist wie die als VLDL-große eingestufte Lipoproteine. Im Serum eines normolipämischen Probanden ist der Vorgang analog. Allerdings kann wegen eines niedrigeren ApoC-III-Gehaltes in einem VLDL-großen Lipoprotein die Menge der mit dem ApoC-III entfernten Lipide und somit die Größenveränderung des Lipoproteins kaum so groß sein, wie bei einem hypertriglyceridämischen Probanden. Das bedeutet, dass die Differenz in der Lipoproteingröße nur minimal ist und mit der gelchromatographischen Methode nicht nachzuweisen ist.

Zusammenfassend könnte die in dieser Arbeit beobachtete Unplausibilität nach der Immunpräzipitation nicht nur auf methodischen Aspekten, sondern auch auf biochemischen Unterschieden zwischen den Lipoproteinen beruhen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Immunpräzipitation nicht zur Isolierung und Charakterisierung der Lipoproteinsubfraktionen geeignet ist. Diese Schlußfolgerung wird durch zwei weitere Fakten unterstützt. Erstens, es gibt keine Angaben in der Literatur der letzten 15 Jahre, die die Immunpräzipitation als Methode der Wahl zur Charakterisierung der Zusammensetzung und der funktionellen Eigenschaften von Lipoproteinsubfraktionen beschreiben. Für diese Art der Untersuchungen wird hauptsächlich die Immunabsorption gewählt [36, 62, 69, 70]. Zweitens, in dieser Arbeit konnte einerseits festgestellt werden, dass Immunpräzipitation und Immunabsorption widersprüchliche Ergebnisse liefern, andererseits erbrachte die Immunabsorption einen weiteren Hinweis für das Zutreffen der „Zerreiß-Hypothese“.

5.1.2. Immunabsorption – eine Alternative zur Immunpräzipitation

Die sequentielle Immunabsorption stellt eine Alternative zur Isolierung der von Alaupovic *et al.* beschriebenen Lipoproteinsubfraktionen dar. Das Verfahren basiert auf der Reaktion eines Antigens mit einem an feste Phase (Sepharose) gekoppelten Antikörper. Die von einer Affinitätssäule gebundenen Lipoproteine werden mit Elutionsmittel hoher Ionenstärke von der Säule abgetrennt und können für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Die Kombination aus Anti-ApoA-I- [47], Anti-ApoA-II- [36, 42, 58], Anti-ApoB- [47], Anti-ApoC-III- [36, 61] und Anti-ApoE-Säulen [59, 60] erlaubt die Isolierung aller von Alaupovic *et al.* definierten Lipoproteinsubfraktionen.

Einer der Vorteile dieser Methode liegt in der preiswerten Isolierung größerer Mengen an Lipoproteinsubfraktionen, die für weitere Untersuchungen eingesetzt werden können. Vorteilhaft erscheint außerdem die schonende Art dieser Methode: die Lipoproteine passieren die Immunaффinitätssäule und werden dabei keinen zusätzlichen physikalischen Kräften wie bei der Immunpräzipitation ausgesetzt. Als nachteilig erweisen sich jedoch folgende Punkte:

- Notwendigkeit der Aufkonzentrierung der nach Immunabsorption erhaltenen Subfraktionen (dabei ist mit Verlusten zu rechnen),
- schlechte Standardisierungsmöglichkeiten wegen mehrerer Zwischenschritte sowie anschließender Konzentrierung der Proben,
- großer Zeitaufwand.

5.1.2.1. Diskrepanzen zwischen Immunabsorption und Immunpräzipitation

Im ersten Teil der Untersuchungen wurde geprüft, ob Immunabsorption und Immunpräzipitation vergleichbare Ergebnisse liefern. Wegen ihrer Praktikabilität könnte die Immunpräzipitation zum Untersuchen der Probanden auf Vorhandensein definierter Lipoproteinsubfraktionen eingesetzt werden, die anschließend mit Immunabsorption isoliert werden. Eine Voraussetzung müsste dabei erfüllt werden: Immunpräzipitation und Immunabsorption müssten übereinstimmende Ergebnisse liefern.

Die durchgeführten Untersuchungen (siehe 4.3) zeigten, dass diese Voraussetzung nicht gegeben ist. Mit der Immunpräzipitation konnten Lipoproteinsubfraktionen isoliert werden, die

mit Immunabsorption nicht nachzuweisen waren. Es stellte sich nun die Frage, welche der beiden Methoden das richtige Ergebnis liefert. Dafür wurde LpB:C-III:E mittels Immunabsorption isoliert und mit Anti-C-III respektive Anti-ApoE präzipitiert. Bei einer vollständigen Präzipitation dürften keine Lipid- und Apolipoproteinkonzentrationen im Überstand der Fällung gemessen werden. In beiden Fällen wurde zwar eine nahezu komplette Entfernung des zu fällenden Apolipoproteins beobachtet, nicht aber der anderen Lipoproteinbestandteile (siehe 4.3). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den oben beschriebenen Unplausibilitäten bei Verwendung von Immunpräzipitation und unterstützt die Richtigkeit der aufgestellten „Zerreiß-Hypothese“.

5.1.2.2. Weitere methodische Aspekte zur Isolierung der Lipoproteinsubfraktionen

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde die Immunabsorption optimiert und anschließend für die Isolierung der Lipoproteinsubfraktionen (LpB; LpB:E, LpB:C-III, LpB:C-III:E) eingesetzt. Die Optimierung der Methode umfasste mehrere Aspekte. Einerseits wurde überprüft, ob das Problem unspezifischer Bindungen an den Immunaффinitätssäulen besteht, andererseits wurde untersucht, mit welchen Elutionsmitteln, deren Menge und Durchflusssgeschwindigkeit die höchste Wiederfindungsrate der Lipoproteine erreicht wird. Außerdem wurden unterschiedliche Verfahren überprüft, die zum Konzentrieren der nach der Immunabsorption erhaltenen Fraktionen (nicht retinierte und retinierte Fraktion) von großer Bedeutung sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden nicht ausführlich in dem Resultatenteil beschrieben, weil sie als Standardmaßnahmen zur Etablierung einer Immunabsorptionmethode angesehen wurden. An dieser Stelle erfolgt eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse und deren Bewertung.

Die unspezifische Absorption wurde durch Bestimmung der Transferrinmenge im Serum vor der Passage durch eine Immunaффinitätssäule und danach in der nicht retinierten und retinierten Fraktion gemessen. Aus der Fülle der Serumproteine wurde das Transferrin gewählt, weil zur seiner Konzentrationsmessung eine besonders sensitive Methode zur Verfügung stand. Die Wiederfindungsrate vom Transferrin lag in den nicht retinierten Fraktionen der Anti-C-III- und Anti-E-Säulen zwischen 94% und 100%. Dieses Ergebnis weist auf eine sehr niedrige Wahrscheinlichkeit unspezifischer Bindungen hin.

Bei der Ermittlung des Elutionsmittels für die Trennung der gebundenen Lipoproteine von den Immunaффinitätssäulen wurde ein Problem erkannt. In der Literatur wird am häufigsten die Verwendung von 3M NaSCN-Lösung als Elutionsmittel beschrieben. Die angegebenen Daten zur Wiederfindung der gebundenen Lipoproteine schwanken zwischen 80% und 90% [42, 47]. In dieser Arbeit wurden mit 3M NaSCN-Lösung Wiederfindungsraten von 10-30% gefunden. Die Verwendung von anderen Elutionsmitteln, z.B. Glycin-HCl-Lösung oder Essigsäure [47, 61, 71], die in der Literatur beschrieben worden sind, führte auch zu keiner Steigerung der Wiederfindungsraten. 70% bis 90% der an der Anti-C-III- bzw. Anti-E-Säule gebundenen Lipoproteine konnten nur mit einer 5M NaSCN-Lösung eluiert werden. In der Literatur existiert eine einzige Angabe, die die Verwendung von 4,5 M NaSCN-Lösung beschreibt [69]. In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht, ob die mit Elutionsmitteln unterschiedlicher Ionenstärke isolierten Lipoproteine (Lp-3M und Lp-5M) sich in der Größe und Zusammensetzung unterscheiden. Wie Abbildung 12 zeigt, sind keine Unterschiede in der Größenverteilung zwischen Lp-3M und Lp-5M der Anti-C-III-Säule festzustellen. In der Zusammensetzung der beiden Subpopulationen sind jedoch deutliche Unterschiede zu beobachten. Besonders stark differierten die Lp-3M und Lp-5M in der ApoC-III-Beladung: Lp-5M sind um das 6-fache reicher an ApoC-III als Lp-3M. Auf die Überprüfung der funktionellen Eigenschaften dieser methodisch erzeugten Subpopulationen mußte wegen Mengenproblemen verzichtet werden. Bei der Isolierung der unten beschriebenen Lipoprotein-subfraktionen wurden die Lipoproteine mit 5M NaSCN-Lösung von den Säulen abgelöst.

Die Konzentrierung der nach Immunabsorption erhaltenen Fraktionen erfolgte je nach der Fragestellung mit 3 Verfahren, die auch in der Literatur beschrieben worden sind. Millipore-Konzentratoren [47, 62, 70] wurden für eine schnelle Konzentrierung kleiner Probemengen verwendet. Konzentrierung in gesättigter PEG-Lösung ($M_r = 35000$) [47] wurde dagegen bei großen Probemengen angewandt unter der Voraussetzung, dass die Probe unmittelbar für weitere Untersuchungen eingesetzt wurde. Konzentrierung in Saccharose [47], die als Konservierungstoff dient, erfolgte bei einer erforderlichen Lagerung der Lipoprotein-subfraktionen über einen längeren Zeitraum. Die letzte Konzentrierungsmethode weist zwei Nachteile auf: einerseits müssen die Proben nach der Konzentrierung zeitaufwendig dialysiert werden, zweitens besteht die Wahrscheinlichkeit nichtenzymatischer Glykierung der Lipoproteine. Diese Wahrscheinlichkeit dürfte aber gering sein, da für den Glykierungsprozess die Saccharose erst in Glukose und Fruktose gespalten werden muss. Die Spaltung der Saccharose kann entweder enzymatisch oder bei höheren Temperaturen erfolgen – beides sind Bedingungen,

die bei der Konzentrierung nicht erfüllt wurden. (Die Konzentrierung der Proben erfolgte mit allen drei Verfahren bei 4° C.) Für alle drei Konzentrierungsverfahren konnten Wiederfindungsraten von 85-95% ermittelt werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Größe und Zusammensetzung der Lipoproteine vor und nach den Konzentrierungen gleich blieben.

Als letztes muss angemerkt werden, dass alle Manipulationen, die zur Isolierung und Charakterisierung der Lipoproteine durchgeführt wurden, unter Bedingungen stattfanden, die eine mögliche Alteration der Lipoproteine gering halten sollten. Dazu gehören:

- im Puffer enthaltender Cocktail aus antioxidativen Substanzen, der die Oxidation der Lipoproteine verhindern sollte,
- Auffangen der Säulenfraktionen, Konzentrierung und Lagerung bei 4° C,
- geringe Zeitabstände zwischen Isolierung und Charakterisierung der Lipoproteine.

Zusammenfassend scheint die Immunabsorption die Methode der Wahl zu sein, um größere Mengen an Lipoproteinsubfraktionen zu isolieren und die Integrität der Lipoproteine zu erhalten.

5.2. Charakteristika der Lipoproteinsubfraktionen

Nach dem Lipoprotein-Familien-Konzept erfolgt die Trennung in ApoA-I- und ApoB-haltige Lipoproteine, die nach ihrer Apolipoproteinzusammensetzung in weitere 7 Hauptfamilien gegliedert werden. Die nicht atherogenen ApoA-I- haltigen Lipoproteine bestehen aus LpA-I und LpA-I:A-II, während die ApoB-haltigen Lipoproteine in LpB, LpB:C, LpB:E, LpB:C:E und LpA-II:B:C:D:E unterteilt werden [72]. Jede der fünf Familien der ApoB-haltigen Lipoproteine stellt ein polydisperses System von Lipoproteinen dar, das hinsichtlich der Größe, Dichte und dem Lipid/Protein-Verhältnis heterogen ist. Obwohl die exakten chemischen Daten der Lipoproteinpartikel noch nicht festgelegt worden sind, deutet vieles darauf hin, dass die Größe und besondere strukturelle Anordnung der Lipid- und Apolipoproteinbestandteile die Hauptfaktoren für diese pathophysiologische Eigenschaft der ApoB-haltigen Lipoproteine sind [35]. Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Zusammensetzung, der Größe und der funktionellen Eigenschaften von LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E. Diese Daten sollten Aussagen über die mögliche Atherogenität dieser Partikel erlauben.

5.2.1. Biochemische Charakteristika

Die in dieser Arbeit untersuchten Lipoproteine LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E wurden aus dem Serum von drei Probanden mit Hyperlipoproteinämie Typ IV nach Fredrickson mittels sequentieller Immunabsorption isoliert. Die biochemischen Charakteristika der Lipoproteinsubfraktionen umfassten die Lipidzusammensetzung, elektrophoretisches Migrationsverhalten und die Größenverteilung. Im Folgenden wird ein Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit Literaturangaben vorgenommen.

5.2.1.1. Lipidzusammensetzung

In den Pionier-Arbeiten zur Charakterisierung von Lipoproteinsubfraktionen von Alaupovic *et al.* wurden unterschiedliche Methoden verwendet: Immundiffusion, Immunelektrophorese und Polyacrylamidgelelektrophorese. Diese Methoden erlaubten die Aussage über die Verteilung von LpA-, LpB- und LpC-Familien in den konventionellen Dichtefractionen [34]. Auf der nächsten Etappe zur Charakterisierung der Lipoproteinsubfraktionen in Lipoproteinfamilien (z.B. LpB:C-III:E in der LpB-Familie) wurde von Alaupovic *et al.* eine Kombination aus Immunpräzipitation und Ultrazentrifugation verwendet [56-58, 72]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten hinsichtlich der Dichte und der Zusammensetzung der ApoB-haltigen Lipoproteine sind in der Tabelle 14 im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zusammengefasst. Die Zusammensetzung der Lipoproteinsubfraktionen wurde als prozentuelle Triglycerid- und Cholesterinangabe dargestellt.

| Lipoprotein-subfraktionen | | VLDL, bzw. VLDL-große Lp | | LDL, bzw. LDL-große Lp | |
|---------------------------|----|--------------------------|--------------|---------------------------|--------------|
| | | Alaupovic <i>et al.</i> | Dissertation | Alaupovic <i>et al.</i> * | Dissertation |
| LpB | TG | 26 % | - | 5 % | 16 % |
| | CH | 74 % | - | 95 % | 84 % |
| LpB:C** | TG | 78 % | 70% | 35 % | 54 % |
| | CH | 22 % | 30 % | 65 % | 45 % |
| LpB:C:E*** | TG | 73 % | 67 % | 60 % | 55 % |
| | CH | 27 % | 33 % | 40 % | 45 % |

Tabelle 13: Charakteristika der ApoB-haltigen Lipoproteine – Vergleich der Arbeiten von Alaupovic *et al.* und der vorliegenden Arbeit.

* In den Arbeiten von Alaupovic *et al.* wurden LDL in zwei Dichtesubfraktionen isoliert – LDL₁ und LDL₂. In der Tabelle sind nur die Werte für LDL₂ angegeben.

- ** In der Lipoprotein-Klassifikation von Alaupovic *et al.* werden die Lipoproteinsubpopulationen als LpB:C und LpB:C:E bezeichnet, weil alle drei ApoCs berücksichtigt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bezeichnung LpB:C-III und LpB:C-III:E benutzt, weil nur das ApoC-III in den ApoC-III-haltigen Lipoproteinen bestimmt wurde.
- *** LpB:C:E umfasst in der Lipoprotein-Klassifikation von Alaupovic *et al.* nicht nur LpB:C:E, sondern auch LpB:E.

Aus der Tabelle geht hervor, dass beide Arbeiten zu weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen gekommen sind:

- LpB:C-III und LpB:C-III:E sind in unterschiedlichen Dichte- bzw. Größenfraktionen nachweisbar,
- die ApoC-III-haltigen Lipoproteine gehören im VLDL- und im LDL- Dichte- bzw. Größenbereichen zu den triglyceridreichen Partikeln,
- LpB in LDL bzw. im LDL-Größenbereich trägt im Vergleich zu den anderen Lipoproteinsubfraktionen den größten Cholesterinanteil.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Khoo *et al.* [70] und Campos *et al.* [62] präsentiert, die zur Isolierung der Lipoproteinsubfraktionen eine Kombination aus Immunabsorption und Ultrazentrifugation verwendet haben. Den beiden Publikationen ist zu entnehmen, dass unabhängig davon, ob hypertriglyceridämische, hypercholesterinämische oder normolipämische Probanden untersucht wurden, die höchsten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in VLDL in LpB:C-III und LpB:C-III:E nachzuweisen waren. In LDL wurde die höchste Cholesterinkonzentration in LpB gemessen. Bezüglich der Dichte konnten auch hier die Lipoproteinsubfraktionen in VLDL und LDL nachgewiesen werden: LpB hauptsächlich in LDL, LpB:C-III und LpB:C-III:E überwiegend in VLDL, LpB:E hauptsächlich in VLDL.

Wie in den Arbeiten von Campos *et al.* und Khoo *et al.* als auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Lipid-Zusammensetzung eines Lipoproteinpartikels als Triglycerid- und Cholesterinmolekülzahl pro 1 Mol ApoB dargestellt. Diese Darstellung basiert auf dem Umstand, dass jedes ApoB-haltige Lipoprotein nur ein ApoB-Molekül trägt. Auf 1 Mol ApoB-bezogene Daten ergeben die Information über die Zusammensetzung einer Partikelspezies. Die nach diesem Prinzip ermittelten Ergebnisse liefern sowohl in dieser Arbeit als auch in den beiden Publikationen ein abweichendes Bild zur Zusammensetzung der Lipoproteinsubfraktionen im Vergleich zu der oben beschriebenen Darstellung. Es konnte z.B. übereinstimmend in allen drei Arbeiten festgestellt werden, dass nicht das LpB, sondern das LpB:C-III:E in LDL bzw. LDL-großen Lipoproteinen das cholesterinreichste Lipoprotein ist. Es darf jedoch nicht vernachlässigt werden, dass die LDL eines hypertriglyceridämischen

Probanden zu 97% aus LpB, nur zu 1% aus LpB:C-III:E, zu 2% aus LpB:C-III und zu 0,2% aus LpB:E bestehen [62]. In der Arbeit von Alaupovic *et al.* [58] wurde ein anderes Verhältnis der Lipoproteinsubfraktionen in LDL von hypertriglyceridämischen Probanden ermittelt. LpB: 52% bis 68%, LpB:C-III:E: 22% bis 27%, LpB:C-III: 10% bis 21 %. Die Zahlenunterschiede in den beiden Arbeiten beruhen möglicherweise auf Verwendung unterschiedlicher Methoden und der Heterogenität der untersuchten Probandenkollektive. Abgesehen von den Unterschieden zeigen diese Zahlen sehr deutlich, dass bei der Bewertung der möglichen Atherogenität eines Partikels nicht nur auf seine Zusammensetzung, sondern auch auf dessen Konzentration geachtet werden soll.

5.2.1.2. Migrationsverhalten in der Elektrophorese

Eine andere interessante Beobachtung lieferte die Untersuchung des Migrationsverhaltens der Lipoproteinsubfraktionen unterschiedlicher Größe in der Elektrophorese. Die VLDL-großen LpB:C-III und LpB:C-III:E sind, wie erwartet, in die prä- β -Position, die LDL-großen LpB und LpB:C-III in die β -Position gewandert. Die LDL-großen LpB:C-III:E dagegen legten die gleiche Strecke zurück wie die VLDL-großen LpB:C-III:E. Die Erklärung dafür liegt offensichtlich in der Zusammensetzung der Partikel: LpB:C-III:E ist unter den LDL-großen Lipoproteinsubfraktionen das Lipid-reichste Partikel. Für das Migrationsverhalten eines Lipoproteinpartikels in der Lipidelektrophorese ist nicht nur die Größe des Partikels, sondern auch seine elektrische Ladung verantwortlich. Aus diesem Grund könnte das größere Lipid/Protein-Verhältnis in LpB:C-III:E zu einer verminderten Oberflächenladung im Vergleich zu LpB und LpB:C-III führen und hiermit zur Veränderung der elektrophoretischen Mobilität.

5.2.1.3. Größenverteilung

In bezug auf die Partikelgröße konnten im Einklang mit Literaturangaben für jede Lipoproteinsubfraktion, mit Ausnahme von LpB, zwei Größensubpopulationen isoliert werden – die VLDL und die LDL-großen Lipoproteine. LpB wurde nur im LDL-Größenbereich nachgewiesen. Laut Literaturangaben [73, 74] existiert das LpB auch im VLDL-Größenbereich, jedoch in sehr niedrigen Konzentrationen (ApoB = 0,001 mg/dl). In der vorliegenden Arbeit

konnten diese Konzentrationen nicht nachgewiesen werden, weil die Nachweisgrenze für die ApoB-Konzentrationsbestimmung bei 0,1 mg/dl lag. Auch in den Arbeiten von Campos *et al.* und Khoo *et al.* wurde LpB in VLDL nachgewiesen. An dieser Stelle ist eine kritische Betrachtung der beiden Arbeiten notwendig. Campos *et al.* beschreibt, dass 11% vom ApoE und 20 % vom ApoC-III des nativen Serums nach der Passage der jeweiligen Säulen – Anti-E- und Anti-C-III-Säule – nicht gebunden worden waren. Das bedeutet, dass diese Apolipoproteine in den nicht retinierten Fraktionen nachzuweisen waren. Zur Isolierung des LpB (siehe Abb. 2) werden immer nur die nicht retinierten Fraktionen verwendet, so dass die von der Säule nicht zurückgehaltenen ApoC-III- und ApoE-Mengen in der LpB-Fraktion zu erwarten sind. Mit anderen Worten, die von Campos *et al.* als LpB isolierte Lipoprotein-subfraktion stellt in Wirklichkeit höchstwahrscheinlich kein reines LpB, sondern eine Mischung aus LpB:C-III, LpB:E, LpB:C-III:E und möglicherweise LpB dar. In der vorliegenden Arbeit wurde Wert auf einen hohen Reinheitsgrad der Lipoprotein-subfraktionen gelegt, da nicht nur biochemische, sondern auch funktionelle Eigenschaften der Lipoprotein-subfraktionen charakterisiert werden sollten. Eine Lipoprotein-subfraktion wurde erst dann als gereinigt angesehen, wenn von dem unerwünschten Apolipoprotein weniger als 5% der Ausgangskonzentration nachzuweisen war.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass obwohl zwischen der Ultrazentrifugation und der Gelchromatographie eine gute Korrelation beschrieben worden ist [75, 76], Unterschiede zwischen VLDL und VLDL-großen Lipoproteinen festgestellt werden konnten. Abbildung 6 zeigt, dass die mit der Ultrazentrifugation isolierten VLDL in ihrer Größe inhomogen sind. Diese Größenunterschiede sind festzustellen trotz der eingeschränkten Fähigkeit der FPLC, zwischen großen Lipoproteinen zu unterscheiden (siehe oben). Aus diesem Grund dürfen die in dieser Arbeit mittels Gelchromatographie erzielten Ergebnisse nicht uneingeschränkt mit den Literaturangaben nach UZ-Einsatz verglichen werden.

Zusammengefaßt lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der biochemischen Eigenschaften der Lipoprotein-subfraktionen wie folgt darstellen:

- LpB:C-III, LpB:C-III:E und LpB:E sind in VLDL- und LDL-Größe nachzuweisen, während LpB nur in LDL-Größe,
- in den VLDL-großen Lipoproteinen wird der Hauptlipidanteil von LpB:C-III getragen,
- LpB:C-III:E ist das lipidreichste Partikel der LDL-großen Lipoproteine.

5.2.2. Vorkommen der Lipoproteinsubfraktionen beim Menschen

In den Arbeiten von Alaupovic *et al.* [57, 58], Campos *et al.* [62] und Khoo *et al.* [70], die im Kapitel 5.2.1 diskutiert wurden, wird nicht nur die Zusammensetzung der Lipoproteinsubfraktionen beschrieben, sondern auch deren Quantität bei verschiedenen Erkrankungen analysiert. Abbildung 19 stellt eine Zusammenfassung dieser Arbeiten dar.

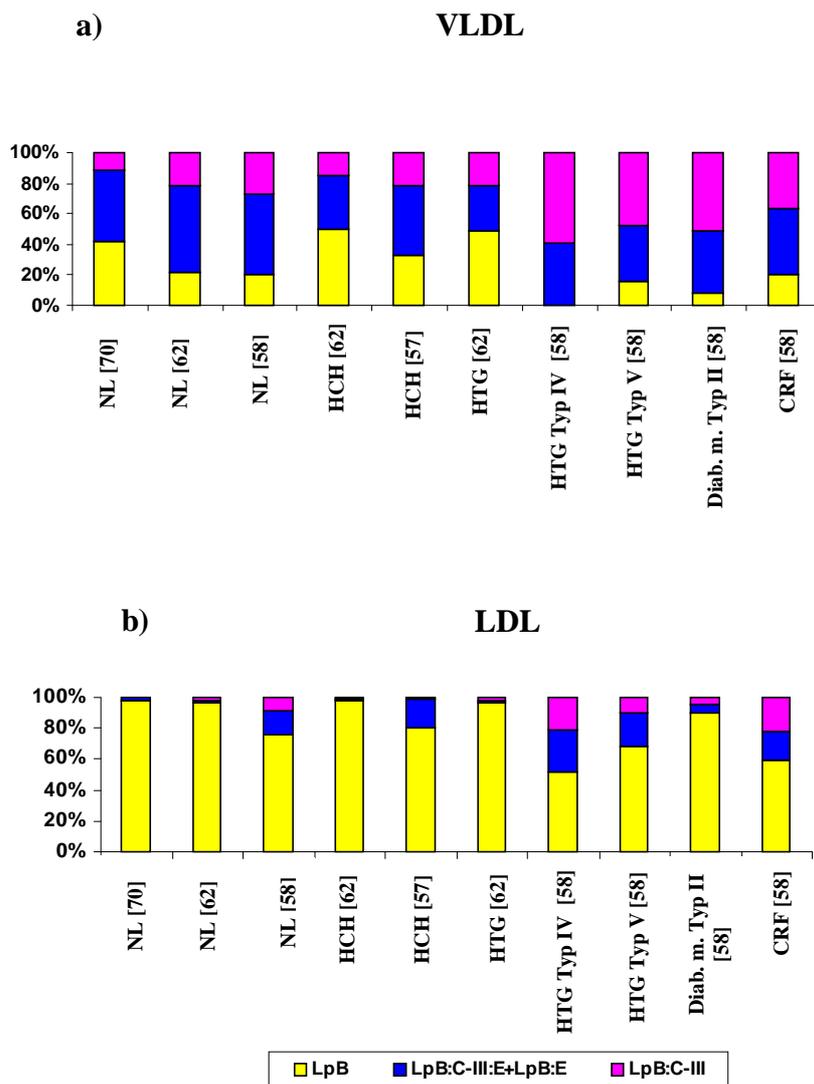


Abbildung 19: Zusammenfassung der Literaturangaben zur Lipoproteinzusammensetzung bei verschiedener Pathogenese. (NL – normolipämische Probanden, HCH – Probanden mit Hypercholesterinämie, HTG – Probanden mit Hypertriglyceridämie, Diab. m. – Probanden mit Diabetes mellitus, CRF – Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz).

Die Arbeiten von Alaupovic *et al.* zeigten, dass

- sowohl bei hypertriglyceridämischen Probanden als auch bei normotriglyceridämischen Probanden mit Diabetes mellitus Typ II und bei Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz erhöhte %-Anteile an LpB:C-III und LpB:C-III:E im Vergleich zu normolipämi-

schen Probanden nachweisbar sind,

- bei hypercholesterinämischen sowie normolipämischen Probanden im Vergleich zu den anderen Probandengruppen höhere Konzentrationen an cholesterinreichen Lipoproteinen (LpB) ermittelt werden.

Im zweiten Punkt stimmen die Arbeiten von Campos *et al.* und von Alaupovic *et al.* überein, nicht jedoch in dem ersten Punkt. Campos *et al.* zeigten, dass bei den hypertriglyceridämischen Probanden das Verhältnis zwischen LpB und den ApoC-III-haltigen Lipoproteinen in VLDL fast gleich ist. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können an dieser Stelle nur eingeschränkt mit den Literaturangaben verglichen werden, da keine quantitative Untersuchungen durchgeführt wurden. Abweichend zu den Literaturangaben konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass:

- LpB:C-III nur bei drei von den acht untersuchten hypertriglyceridämischen Probanden mit ApoE-Phenotyp 3/3 nachgewiesen werden konnte, LpB:C-III:E dagegen bei allen Probanden,
- LpB:E mit einer Ausnahme nur bei hypertriglyceridämischen Probanden mit $\epsilon 2$ -Allel festgestellt werden konnte.

In den Arbeiten von Alaupovic *et al.* und Campos *et al.* sind sowohl LpB:C-III als auch LpB:E nicht nur bei allen untersuchten hypertriglyceridämischen Probanden, sondern auch bei den normolipämischen und hypercholesterinämischen Probanden beschrieben. Was das LpB:E betrifft, so finden die Autoren der beiden Publikationen zwar nicht bei allen Probanden diese Lipoproteinsubfraktion, jedoch bei der Mehrheit. In der Arbeit von Campos *et al.* sind die ermittelten Konzentrationen an LpB:E minimal und könnten unter die Nachweisgrenzen fallen.

Der Grund für die abweichenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Literaturangaben könnte in der Verwendung unterschiedlicher Methoden-Kombinationen bzw. in den Methodendiskrepanzen liegen. Denn in der vorliegenden Arbeit konnte einerseits gezeigt werden, dass die Immunpräzipitation und Immunabsorption keine vergleichbaren Ergebnisse liefern (siehe 5.1.1 und 5.1.2), andererseits sind in der Arbeit von Campos *et al.* Ungenauigkeiten in der Immunabsorption angegeben, auf die unter 5.2.1.3 hingewiesen wurde. Die Frage, welche der drei erwähnten Arbeiten ein richtiges Ergebnis liefert, bleibt bis zur Entwicklung einer Referenzmethode zur quantitativen Bestimmung der Lipoprotein-

subfraktionen offen.

Sowohl die hohen Konzentrationen an LpB:C-III und LpB:C-III:E bei hypertriglyceridämischen Probanden als auch die geringen Konzentrationen an LpB:E bei allen Probanden mit ApoE-Phenotyp 3/3 haben physiologische Ursachen. Diese werden ausführlich unter 5.4 diskutiert.

5.3. Lipoproteinsubfraktionen im Zellversuch

Die Betrachtung der funktionellen Eigenschaften von Lipoproteinsubfraktionen scheint von großer Bedeutung zu sein. Denn bei der Beurteilung der möglichen Atherogenität einer Lipoproteinsubfraktion spielen nicht nur die Konzentration, die Lipid-Beladung und die Größe eine wichtige Rolle, sondern auch die Verweildauer des Lipoproteins in der Zirkulation.

Die Elimination der zirkulierenden Lipoproteine erfolgt zum größten Teil auf einem rezeptorvermittelten Weg. Der am besten charakterisierte Lipoprotein-Rezeptor wurde in den siebziger Jahren von Brown und Goldstein beschrieben und als LDL-Rezeptor bezeichnet [77]. Dieser Rezeptor kommt in unterschiedlicher Zahl auf fast allen Zelltypen vor. Fibroblasten besitzen zwischen 15000 und 70000 Rezeptoren pro Zelle [44] und eignen sich somit sehr gut für Bindungs- und Internalisationsstudien. Die Expression des LDL-Rezeptors unterliegt einer Feedback-Regulation durch den zellulären Cholesteringehalt. ApoB-100, ApoE [78], womöglich LPL [79] und das *receptor associated protein* (RAP) sind die Liganden des LDL-Rezeptors. Inzwischen sind weitere Rezeptoren bekannt geworden, die homolog zum LDL-Rezeptor sind und ein breites Spektrum an Liganden besitzen: *LDL-receptor related protein* (LRP) [80], das Megalin (gp330) [81], der VLDL-Rezeptor [82], der ApoE-Rezeptor 2 [83] und LR 11 [84].

Der Rezeptor-unabhängige Weg zur Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen erfolgt durch die Bindung der Lipoproteine an die Heparansulfatproteoglykane (HSPG) [85, 86] und deren anschließende Endozytose [87]. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass HSPG eine besonders große Rolle bei der Bindung und der Aufnahme der ApoE-haltigen Lipoproteine spielen [88]. Durch das ApoC-III wird diese Bindung jedoch gehemmt [64].

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss einerseits die Apolipopro-

teinkomposition und andererseits die Größe der Lipoproteine auf die Internalisation in humane Fibroblasten hat. Auf die Darstellung der Ergebnisse der Bindungsstudien wurde in der vorliegenden Arbeit aus folgenden Gründen verzichtet:

- Die Bestimmung der Signalintensität in dem Ansatz sowohl für die Gesamt-Bindung als auch für die unspezifische Bindung der Lipoproteinsubfraktionen an die Zellen (außer LpB) war kaum von dem Lipoprotein-freien Ansatz zu unterscheiden. Der Grund dafür liegt offensichtlich in der verwendeten Methode zur Markierung der Lipoproteine: die Bestimmung der Fluoreszenz der mit DiI-markierten Lipoproteinen ist weniger sensitiv als die Bestimmung der Radioaktivität in den mit ¹²⁵I-markierten Lipoproteinen. (In den Literaturangaben wird überwiegend die Markierung der Lipoproteine mit ¹²⁵I (NaI) angegeben). Das Problem der niedrigen Fluoreszenzsignale könnte behoben werden, wenn die Konzentrationen an den zugegebenen markierten Lipoproteinen gesteigert worden wären. Wegen der sehr niedrigen ApoB-Konzentrationen in den Lipoproteinsubpopulationen LpB:C-III und LpB:C-III:E im Vergleich zu ApoC-III und ApoE sowie einer eingeschränkten Kapazität der beiden Immunaффinitätssäulen konnte das Mengenproblem nicht zufriedenstellend gelöst werden.
- Rückschlüsse zur möglichen Atherogenität einer Lipoproteinsubfraktion können anhand ihrer eingeschränkten Internalisation in die Zelle genauso wie anhand ihrer Bindungseigenschaften gemacht werden.

5.3.1. Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in Abhängigkeit von der Apolipoproteinzusammensetzung

Die Bindung der Lipoproteine an die Rezeptoren der Zelle, bzw. an die HSPG wird durch die Apolipoproteine vermittelt. ApoB, ApoC-III und ApoE spielen bei der Interaktion der Lipoproteine mit den Rezeptoren unterschiedliche Rollen. Während ApoE ein Ligand sowohl für den LDL- [89, 90] als auch für den LRP-Rezeptor [91] ist, wird ApoB nur von dem LDL-Rezeptor gebunden. Was das ApoC-III betrifft, so inhibiert dieses Apolipoprotein die Bindung und damit auch die Internalisation der ApoB-haltigen Lipoproteine in die Zelle. ApoC-III inhibiert die Bindung der Lipoproteine nicht nur an die LDL- und LRP-Rezeptoren [92-94], sondern auch an die HSPG [64]. Als mögliche Ursachen werden folgende Mechanismen diskutiert:

- ApoC-III maskiert die bindende Domäne von Apo B [74],

- ApoC-III beeinflusst die Konformation vom ApoE und beeinträchtigt damit seine Bindung an den Rezeptoren [92],
- Verdrängung des ApoE durch Erhöhung der ApoC-III-Konzentration [95],
- direkte Inhibition der ApoE-vermittelten Internalisation durch das ApoC-III [92].

Welcher dieser Mechanismen zutrifft, ist noch unbekannt.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass die meisten Untersuchungen zur Bindung von Lipoproteinen an Rezeptoren nicht mit einzelnen Lipoproteinsubfraktionen (LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E) durchgeführt wurden, sondern mit VLDL bzw. mit Lipidemulsionen, die mit exogenem ApoE oder ApoC-III angereichert wurden. Der Nachteil dieser Untersuchungen liegt darin, dass das ApoE- oder ApoC-III/Partikel-Verhältnis häufig nicht den in vivo-Verhältnissen entspricht. Die Ergebnisse dieser Arbeiten lassen sich zu folgenden Aussagen zusammenfassen: je höher der ApoE-Gehalt der VLDL, desto besser binden die Lipoproteine an die Zellen, mit zunehmender Konzentration des ApoC-III dagegen wird die Bindung konzentrationsabhängig inhibiert [92, 95-99]. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Lipoproteinsubfraktionen bestimmter Zusammensetzung und Größe, die aus nativem Serum isoliert worden waren, für die Internalisationsversuche eingesetzt. In der Literatur findet sich nur eine Arbeit von Agnani *et al.* [74], die die Interaktion von nativen LpB, LpB:E, LpB:C-III und LpB:C-III:E mit Zellen beschreibt.

Agnani *et al.* [74] zeigten, dass in der Reihe LpB < LpB:E < LpB:C-III:E < LpB:C-III das LpB die niedrigste Dissoziationskonstante hatte und somit am besten von den Zellen gebunden wurde. Übereinstimmend mit dieser Arbeit konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass LpB:E und LpB am besten und die ApoC-III-haltigen Lipoproteine am schlechtesten von den Zellen internalisiert werden (Abb. 18).

Es ist bekannt, dass obwohl die ApoE-haltigen Lipoproteine eine zwanzigfach höhere Affinität zum LDL-Rezeptor als LpB haben [100, 101], die Bindungskapazität dieser Lipoproteine nur etwa ein Viertel so groß ist [102]. Erklärt wird dies dadurch, dass LpB nur eine Bindungsstelle zum LDL-Rezeptor aufweist, während ApoE-haltige Lipoproteine, die mehrere Moleküle ApoE pro Lipoprotein tragen, mehrere multiple Bindungsstellen eines und desselben Rezeptors absättigen [103]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass LpB:E besser als LpB von den Fibroblasten aufgenommen wird. Dieses könnte mehrere Gründe haben:

- Fibroblasten exprimieren nicht nur den LDL- sondern auch den LRP-Rezeptor [104-106], so dass LpB:E im Vergleich zu LpB mehrere Chancen hat, von einem der Rezeptoren gebunden zu werden,
- LpB:E kann zusätzlich von HSPG gebunden werden und gelangt mittels Endozytose in die Zelle [87, 88, 96],
- VLDL der hypertriglyceridämischen Probanden werden an dem LDL-Rezeptor durch das ApoE und nicht durch das ApoB gebunden [107, 108].

An dieser Stelle sollte daran erinnert werden, dass von den acht untersuchten Probanden mit Hypertriglyceridämie nur bei einem Probanden LpB:E isoliert werden konnte. Offensichtlich werden LpB:E sehr schnell metabolisiert. Warum bei diesem einen Probanden LpB:E nachgewiesen wurde, ist unklar. Eine mögliche Erklärung könnte in einer unbekanntem Rezeptor-Mutation liegen, die zum Rezeptor-Defekt führt, so dass LpB:E nur eingeschränkt von den Leber-Rezeptoren aufgenommen wurde. In der Fibroblasten-Zellkultur ist die Internalisation von LpB:E nicht beeinträchtigt, da die Fibroblasten von einem anderen Spender stammen. Die Frage, wie repräsentativ die Ergebnisse für einen Internalisationsversuch mit LpB:E sind, bleibt jedoch offen.

Die Internalisationsstudien von LpB:C-III und LpB:C-III:E führten zu einem überraschenden Ergebnis: LpB:C-III wurde von den Fibroblasten besser internalisiert als LpB:C-III:E. In der Literatur finden sich zwei gegensätzliche Angaben zu dieser Beobachtung. Einerseits zeigte Agnani *et al.*, dass ein großer ApoE/ApoC-III-Quotient in LpB:C-III:E mit einer erhöhten Bindungsaffinität dieses Partikels zu den Zellen verbunden ist. Andererseits konnte in der Arbeit von Kowal *et al.* festgestellt werden, dass der inhibitorische Effekt vom ApoC-III nicht durch eine Steigerung der ApoE-Konzentration vermindert bzw. aufgehoben werden konnte [98].

Über die möglichen Mechanismen kann nur spekuliert werden.

- Es könnte sein, dass das ApoC-III das ApoE von dem LpB:C-III:E verdrängt und somit seine Oberfläche verändert. Dieses könnte zur Beeinträchtigung der ApoB-Konformation führen und damit zur schwächeren Bindung im Vergleich zu LpB:C-III.
- Wenn das kleine ApoC-III-Molekül das ApoE nicht verdrängt, sondern lediglich seine Konformation und damit seine Bindungseigenschaften verändert, kann es nicht ausgeschlossen werden, dass das in seiner Konformation veränderte ApoE seinerseits die Kon-

formation von ApoB beeinflusst. Es könnte sein, dass das Vorhandensein einer großen Menge an kleineren Molekülen, wie das ApoC-III ($M_r = 8,8$ kDa) in LpB:C-III die Konformation von ApoB ($M_r = 512$ kDa) weniger beeinflusst als das in seiner Konformation veränderte ApoE ($M_r = 34$ kDa) in LpB:C-III:E.

- Mehrere Arbeiten konnten zeigen, dass ApoC-I ein wirksamer Inhibitor der Bindung von Lipoproteinen an dem LRP- [93, 94] und dem LDL-Rezeptor [109] ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die ApoC-I-Konzentration in den Lipoproteinsubfraktionen nicht ermittelt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass LpB:C-III:E ein höheres ApoC-I/Partikel-Verhältnis aufweisen könnte als LpB:C-III und damit auch ein höheres inhibitorisches Potential.

Die funktionellen Eigenschaften der Lipoproteine bei der Interaktion mit Fibroblasten sind zum größten Teil mit ihrer Apolipoproteinkomposition zu erklären, jedoch nicht vollständig. Denn die Größe der Lipoproteine stellt eine wichtige Determinante bei der Wechselwirkung der Lipoproteine mit den Zellrezeptoren dar.

5.3.2. Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in Abhängigkeit von der Größe

Die Internalisationsstudien haben gezeigt, dass mit einer Ausnahme die Lipoproteinsubfraktionen (LpB:C-III und LpB:C-III:E) in der LDL-Größe besser als die VLDL-großen Lipoproteine internalisiert werden. Die Ausnahme bilden die VLDL-großen LpB:E (Abb. 18 a)).

Die Bindung der großen Lipoproteine an die LDL- und LRP-Rezeptoren ist höchstwahrscheinlich durch die Bildung der sogenannten „*coated pits*“ limitiert. Die meisten LDL-Rezeptoren sind an der cytoplasmatischen Seite der Zelle mit Clathrin assoziiert [110, 111], dessen Zusammenlagerung vermutlich die treibende Kraft zur Einstülpung der „*coated pits*“ darstellt. Clathrin bildet etwa 30 nm große hexagonale Strukturen auf der cytoplasmatischen Seite der Zelle, die mehrere LDL-Rezeptoren verbinden [112]. Damit können auch die sterischen Hindernisse bei der Bindung der großen Partikel erklärt werden. Es wurde auch beschrieben, dass der LDL-Rezeptor bevorzugt Lipoproteine bindet, die kleiner als 50 nm im Durchmesser sind [113] und somit zum größten Teil im LDL-Größenbereich nachzuweisen sind. In vivo werden die VLDL- und IDL- großen Lipoproteine jedoch zum größten Teil durch die LDL- bzw. LRP-Rezeptoren in die Zelle aufgenommen. Im Unterschied zu den Fibroblasten

sind die Rezeptoren der hepatischen Zellen diffus auf der Oberfläche verteilt und nicht in den „*coated pits*“ konzentriert [114], so dass bei der Bindung der Lipoproteine kein sterisches Problem entstehen kann.

Der andere Grund, warum die LDL-großen Lipoproteinsubpopulationen besser von den Fibroblasten aufgenommen werden, liegt darin, dass das ApoB beim Übergang von VLDL zu LDL seine Konformation ändert und zunehmend besser an den LDL-Rezeptor bindet [102].

Die bessere Internalisation der VLDL-großen LpB:E im Vergleich zu LDL-großen Lipoproteinen basiert höchstwahrscheinlich auf dem Umstand, dass VLDL eines hypertriglyceridämischen Probanden nicht über das ApoB an den LDL-Rezeptor gebunden werden, sondern über das ApoE. [107, 108]. Auf den IDL und LDL konnte die für die Bindung erforderliche ApoE-Konformation nicht festgestellt werden [107]. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass LpB:E im VLDL-Größenbereich im Vergleich zu LDL-großen Lipoproteinen das 5fache an ApoE-Molekülen pro Partikel trägt (Abb. 16).

Zusammengefasst lassen sich die Ergebnisse zur Internalisation der Lipoproteinsubfraktionen in die humanen Fibroblasten wie folgt darstellen:

- nicht nur die Apolipoproteinenzusammensetzung, sondern auch die Größe der Lipoproteine ist für die Aufnahme in die Zelle von großer Bedeutung,
- VLDL-große Lipoproteinsubfraktionen werden mit einer Ausnahme (LpB:E) schlechter von den Fibroblasten internalisiert als LDL-große Partikel.
- sowohl unter den VLDL-großen als auch unter den LDL-großen Lipoproteinen wird das LpB:E am besten und das LpB:C-III:E am schlechtesten von humanen Fibroblasten internalisiert.

5.4. Überlegungen zur medizinischen Relevanz der Lipoproteinsubfraktionen

Dank der Vielzahl von prospektiven Studien sind viele der Faktoren bekannt geworden, die mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit (KHK) assoziiert sind. Zum Beispiel erhöhtes Cholesterin, erhöhte Triglyceride, erniedrigtes HDL. In der letzten Zeit wird der Untersuchung von Lipoproteinsubfraktionen vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt. Das spiegelt sich in mehreren großen Studien wider, die zur Risiko-Abschätzung für die KHK

auch die Apolipoproteine in unterschiedlichen Lipoproteinfraktionen zusätzlich zu den konventionellen Lipid-Parametern einbeziehen. An dieser Stelle sind die ECTIM-Studie (Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde) [37], BIGPRO1-Studie (The Biguanides and the Prevention of the Risk of Obesity) [122], CLAS-Studie (Cholesterol Lowering Atherosclerosis Study) [124], MARS-Studie (Monitored Atherosclerosis Regression Study) [125] und CARE-Studie (Cholesterol and Recurrent Events) [126] zu nennen. Das Interesse für die Apolipoproteinkomposition in den ApoB-haltigen Lipoproteinen wird verständlich, wenn man bedenkt, dass das Schicksal sowohl der nicht atherogenen als auch der proatherogenen Lipoproteine zum größten Teil durch ihre Apolipoproteinzusammensetzung determiniert wird. Welche Lipoproteinspezies das höchste atherogene Potential trägt, unter welchen Umständen die potentiell atherogenen Lipoproteine entstehen, ob die Konzentration von diesen Partikeln medikamentös beeinflusst werden kann – es sind Fragen, auf die es zur Zeit keine befriedigende Antwort gibt. An dieser Stelle können nur Spekulationen angestellt werden.

5.4.1. Potentieller Metabolismus einzelner Lipoproteinsubfraktionen

LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E konnten von mehreren Arbeitsgruppen sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Probanden mit verschiedenen Stoffwechselstörungen nachgewiesen und charakterisiert werden (siehe 5.2.2). Es stellt sich nun die Frage, wie und wo diese Partikel entstehen. Ein möglicher Metabolismus ist in Abbildung 20 dargestellt.

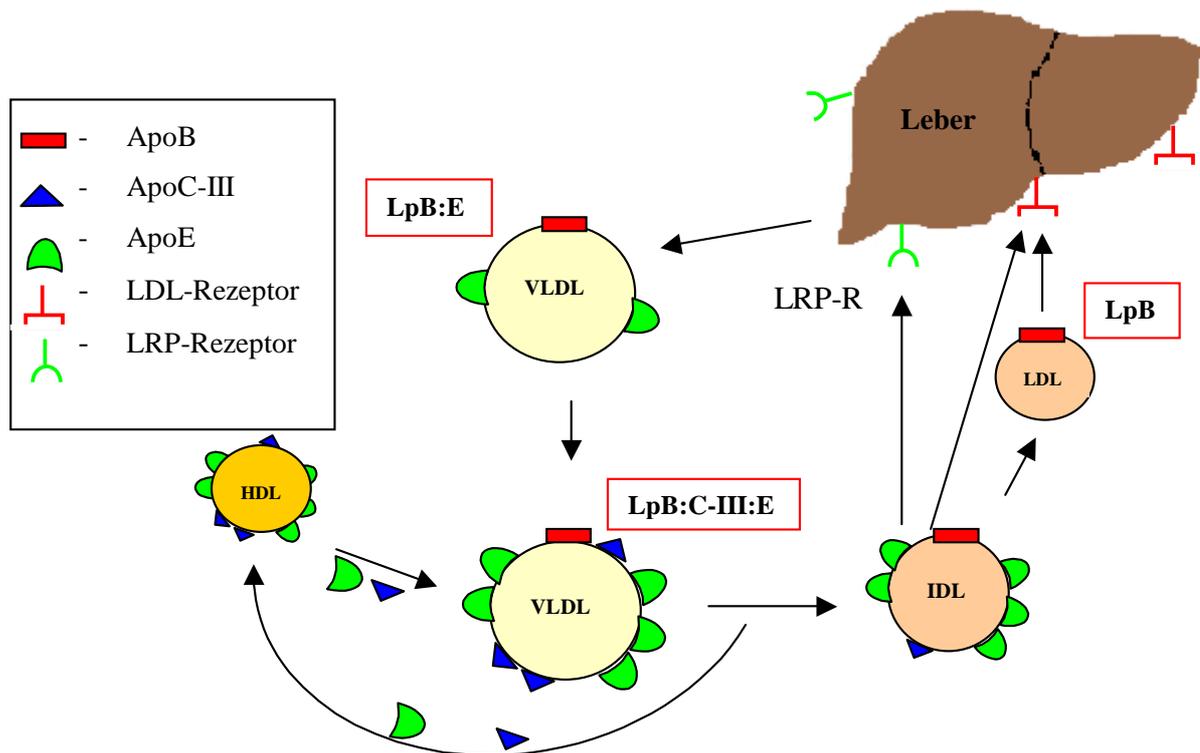


Abbildung 20: Möglicher Metabolismus von LpB, LpB:E und LpB:C-III:E beim gesunden Probanden.

Bei gesunden Probanden werden die naszierenden VLDL in der Leber produziert und enthalten neben dem ApoB auch das ApoE. Sie stellen somit eine Mischung aus LpB und LpB:E dar [115]. Sobald diese Partikel in die Zirkulation gelangen, nehmen die VLDL nicht nur das ApoC-III und das ApoE aus den HDL auf, sondern im Austausch gegen Phospholipide auch Cholesterin und werden zu LpB:C-III:E. Durch die ApoC-III-Aufnahme wird vermieden, dass die VLDL vorzeitig von der Leber aufgenommen werden. In der Zirkulation werden bis zu 90% der Triglyceride in VLDL von der Lipoproteinlipase hydrolysiert. Dabei wird der größte Teil an ApoC-III und ein Teil des freien Cholesterins erneut auf die HDL transferiert. Nach der Hydrolyse verbleiben kleine, mit ApoE- und Cholesterin-angereicherte Lipoproteine, die als VLDL-Remnants bezeichnet werden. Ein Teil dieser Partikel wird direkt über LDL- und LRP-Rezeptoren in die Leber aufgenommen und der andere Teil wird zu LDL hydrolysiert [102]. Die Entscheidung, welches Partikel wie metabolisiert wird, hängt höchstwahrscheinlich von dem ApoE- und ApoC-III-Besatz ab. Vermutlich werden die IDL, die den größten ApoE/ApoC-III-Quotient aufweisen, direkt von der Leber aufgenommen. Die ApoC-III-reicheren IDL werden dagegen durch die LPL zu LDL hydrolysiert, das ApoC-III wird dabei auf die HDL übertragen und es entstehen LpB.

Zusammengefasst scheinen zwei Prozesse im Metabolismus der LpB, LpB:C-III:E und LpB:E eine große Rolle zu spielen: einerseits die Lipolyse der triglyceridreichen Lipoproteine, andererseits der Transfer von ApoE und ApoC-III von HDL zu VLDL und umgekehrt.

In Abbildung 20 wurde LpB:C-III nicht erwähnt, weil dieses Partikel bei gesunden Probanden entweder in sehr niedrigen Konzentrationen oder vermutlich überhaupt nicht vorkommt. Bei den Probanden mit Hyperlipoproteinämie oder anderen Stoffwechselstörungen erwiesen sich 20% bis 60% der VLDL als LpB:C-III (siehe Abb. 19). LpB:C-III wurde größtenteils in VLDL, aber auch in IDL und LDL nachgewiesen. Der Synthesort dieses Partikels ist noch unklar. Möglicherweise wird LpB:C-III von der Leber als naszierendes VLDL sezerniert. Sollten die VLDL mit ApoC-III assoziieren, müßte in der Leber eines Hypertriglyceridämikers die Synthese-Rate von ApoC-III erhöht sein. Das ist nicht unwahrscheinlich, da bekannt ist, dass einerseits die Hypertriglyceridämie häufig mit Insulinresistenz assoziiert ist [119] und andererseits die Expression des ApoC-III-Gens z.B. durch Insulin unterdrückt wird [116-118]. Bei einer Insulinresistenz wirkt Insulin unzureichend an den Rezeptoren der Leber-, Muskel- und Fettzellen, so dass die Unterdrückung der Expression des ApoC-III-Gens ausbleibt. Durch den Wegfall der Hemmwirkung des Insulins auf die Lipase im Fettgewebe kommt es zur gesteigerten Lipolyse der Triglyceride und somit zur Konzentrationserhöhung der freien Fettsäuren und des Glycerins im Blut. Glycerin kann nur in der Leber zur Triglyceridsynthese verwendet werden. Es kommt zur gesteigerten VLDL-Synthese, oder genauer formuliert zur gesteigerten Synthese von ApoC-III-reichen VLDL. Die im Blut zirkulierenden freien Fettsäuren aktivieren das CETP (Cholesterin Ester Transfer Protein) [120], das den Transfer von den Cholesterinester aus HDL und LDL auf die VLDL im Austausch gegen die Triglyceride fördert. Durch den Verlust der Core-Lipide scheinen die triglyceridreichen HDL instabil zu werden und werden schnell metabolisiert [121]. Damit wird der Transfer von ApoC-III und ApoE von VLDL auf die HDL, der während der Lipolyse stattfindet, beeinträchtigt. Es kommt zur Anreicherung von LpB:C-III und LpB:C-III:E.

Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der BIGPRO-Studie [122] unterstützt. An 265 Probanden mit Insulinresistenz konnte gezeigt werden, dass nur bei den hypertriglyceridämischen Probanden ($TG > 1,7$ mmol/l) Insulin positiv mit ApoC-III-haltigen LpB und ApoE-haltigen LpB korreliert. Die Akkumulation von triglyceridreichen Partikeln und/oder deren divergierende Zusammensetzung könnten die Ursache der Hypertriglyceridämie bei Insulinresistenz sein.

LpB:E scheint ein Partikel zu sein, das schnell metabolisiert wird. Einerseits wird LpB:E mit hoher Affinität an die Zellrezeptoren und HSPG gebunden, andererseits wird es durch den Transport von ApoC-III zu LpB:C-III:E umgewandelt. Diese Überlegungen stehen auch im Einklang mit der Beobachtung, dass dieses Lipoprotein nur in geringen Konzentrationen sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Probanden mit Hyperlipoproteinämien, ausgenommen bei Typ-III-Probanden, nachzuweisen ist. Die Typ-III-Hyperlipoproteinämie ist nicht nur durch erhöhte Cholesterin- und Triglycerid-Konzentrationen gekennzeichnet, sondern auch durch erhöhte ApoE-Spiegel. Der Grunddefekt dieser Erkrankung liegt im ApoE2, das Cystein sowohl in Position 112 als auch 158 der Aminosäuresequenz aufweist. Der Aminosäureaustausch Cystein für Arginin verändert die ApoE-Konformation und hebt hiermit die Eigenschaft des ApoE auf, an den LDL- und LRP-Rezeptoren zu binden [48]. Die verzögerte Clearance von VLDL und IDL ist jedoch nicht nur auf die gestörte Bindung zurückzuführen, sondern auch auf die beeinträchtigte Lipolyse dieser Lipoproteine. Es ist bekannt, dass ApoE einerseits die VLDL-Produktion fördert und andererseits die LPL hemmt [123].

5.4.2. ApoB-haltige Lipoproteinsubfraktionen und Atherogenese

Die Bestimmung der Lipoproteinsubpopulationen bei Dyslipoproteinämien hat gezeigt, dass Lipidstoffwechselstörungen weniger durch qualitative als vielmehr durch quantitative Unterschiede in den fünf wichtigsten ApoB-haltigen Lipoproteinen gekennzeichnet sind. Während bei hypercholesterinämischen Probanden hauptsächlich LpB und LpB:E nachzuweisen sind, werden bei Hypertriglyceridämien überwiegend LpB:C, LpB:C:E, LpB und LpA-II-Komplex-Partikel festgestellt [72]. Die ApoB-haltigen Lipoproteinsubfraktionen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Zusammensetzung, sondern auch in ihren metabolischen Eigenschaften. Es stellt sich nun die Frage, ob es auch Anzeichen in Bezug auf unterschiedliches atherogenes Potential unter den Lipoproteinsubfraktionen gibt. Da es keine direkte Methode zur Bestimmung der relativen Atherogenität der verschiedenen Lipoproteinpartikel gibt, wird diese Frage anhand publizierter Studien diskutiert.

Zum ersten Mal konnte der Zusammenhang zwischen den triglyceridreichen Lipoproteinsubfraktionen und der Atherosklerose in einem kleinen Probandenkollektiv der CLAS-Studie [124] gezeigt werden. Bei Probanden mit fortgeschrittener Atherosklerose oder vorausge-

gangener Bypass-Operation wurde der Einfluss der Cholesterin-senkenden Medikamente auf die ApoB-haltigen Lipoproteine untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass nur die LpB-Partikel signifikant gesenkt wurden, während der LpB:C-, LpB:C:E- und LpA-II:B-Komplex-Spiegel unbeeinflusst blieb. Die Ergebnisse deuten auf ein atherogenes Potential der LpB hin, da in der Placebo-Gruppe die Zahl der „Progressors“ (fortschreitende Läsionen) anstieg. Bei den Probanden der Verum-Gruppe mit erhöhten LpB:C- und LpB:C:E- Spiegeln konnten verminderte Konzentrationen an ApoC-III in HDL und erhöhte Konzentrationen in VLDL+LDL (erniedrigte ApoC-III-Ratio) festgestellt werden. Diese Probanden zeigten auch ein Fortschreiten der atherosklerotischen Läsionen, obwohl der LpB-Spiegel gesenkt wurde [35].

Diese Ergebnisse konnten von der MARS-Studie [125] bestätigt werden. Bei 270 Probanden konnte mit einem Cholesterin-senkenden Präparat (Lovastatin) eine signifikante Reduktion der LpB erzielt werden, während die Konzentration der triglyceridreichen ApoB-haltigen Lipoproteinsubfraktionen kaum beeinflusst wurde. Die Bestimmung der ApoB-haltigen Lipoproteinsubfraktionen bei 63 Probanden aus der MARS-Studie führte zur Feststellung, dass erhöhte Konzentrationen der triglyceridreichen Lipoproteinsubfraktionen insgesamt, sowie des LpA-II:B-Komplexes, statistisch signifikant mit dem Fortschreiten der Läsionen in koronaren Arterien assoziiert sind [36].

Übereinstimmend mit den CLAS- und MARS-Ergebnissen konnte auch in der ECTIM-Studie [37] gezeigt werden, dass der Quotient ApoC-III in HDL/ApoC-III in VLDL+LDL signifikant niedriger bei den „Progressors“ bzw. den Patienten mit Myokardinfarkt war als bei den Kontrollen. In der univariaten Analyse konnte außerdem festgestellt werden, dass die Konzentration an ApoC-III-haltigen LpB bei Patienten signifikant höher war als bei den Kontrollen. Eine andere Studie, in der 188 Probanden mit Diabetes Typ II untersucht wurden, führte zu einem ähnlichen Ergebnis: die ApoC-III-haltigen LpB stellen ein unabhängiges Risiko für die kardiovaskulären Erkrankungen dar [54].

Die CARE-Studie [126] konnte zeigen, dass erhöhte ApoB-Konzentration in VLDL, ApoC-III-Konzentration in VLDL+LDL sowie ApoE-Konzentration in HDL unabhängige Faktoren für ein wiederholtes kardiovaskuläres Ereignis darstellen. Es wurde auch festgestellt, dass die ApoE-Konzentration im Plasma oder in VLDL+LDL mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist. Dennoch verschwindet diese Assoziation in der multivariaten

Analyse. Höchstwahrscheinlich ist ApoE nur ein Marker für das ApoC-III in VLDL+LDL und kein direkter Verursacher der Atherosklerose.

Alle diese Studien zeigen den Zusammenhang zwischen den triglyceridreichen ApoB-haltigen Lipoproteinsubfraktionen und der Atherosklerose. Welche Eigenschaften der einzelnen Lipoproteinsubfraktionen zur erhöhten Atherogenität beisteuern und wie das atherogene Potential einzelner Partikel ausfällt, muss jedoch in weiteren, möglichst prospektiven Studien, geklärt werden. Tabelle 15 stellt eine Zusammenfassung der bisher bekannten Eigenschaften der Lipoproteinsubfraktionen und ihrer möglichen Atherogenität dar.

| Lipoproteinsubfraktion | Biochemische und metabolische Eigenschaften, die zur Atherogenität beitragen | Abschätzung der möglichen Atherogenität |
|--|---|--|
| LpB | <ul style="list-style-type: none"> • das cholesterinreichste Partikel • hauptsächlich in LDL-Größe nachweisbar | +++ |
| LpB:C-III | <ul style="list-style-type: none"> • triglycerid- und cholesterinreich • in der VLDL-, IDL- und LDL-Größe nachweisbar • verzögerte Clearance (hemmende Wirkung des ApoC-III auf die LPL und auf die Aufnahme in die Zelle) | +++ |
| LpB:C-III:E | <ul style="list-style-type: none"> • triglycerid- und cholesterinreich • in der VLDL-, IDL- und LDL-Größe nachweisbar • verzögerte Clearance (hemmende Wirkung des ApoE und ApoC-III auf die LPL und inhibitorische Funktion des ApoC-III auf die Aufnahme in die Zelle) • in der Reihe LpB:C:E – LpB:C – LpA-II-B-Komplex bessere Aufnahme von Makrophagen [127] • Nachweis von ApoE-angereicherten VLDL+IDL in atherosklerotischen Plaques [128] | ++++ |
| LpB:E(3/3) LpB:E(2/2) | <ul style="list-style-type: none"> • cholesterin- und triglyceridreich • hauptsächlich nur beim ApoE2-Phenotyp nachweisbar • in der VLDL-, IDL- und LDL-Größe nachweisbar • verzögerte Clearance (durch verminderte Bindung des ApoE2 an die Zellrezeptoren) | --- ++ |

Tabelle 14: Zusammenfassung der biochemischen und metabolischen Eigenschaften der Lipoproteinsubfraktionen in Hinsicht auf ihre mögliche Atherogenität.

5.4.3. Pro und contra: „family concept“

Das Lipoproteinfamilien-Konzept wurde in den 70er Jahren von Alaupovic *et al.* [34] als eine Alternativklassifikation für die Lipoproteine vorgeschlagen: alle Lipoproteine werden in LpA-I, LpA-I:A-II, LpB, LpB:C, LpB:C:E und LpA-II:B-Komplex eingeteilt. Die Einteilung der Lipoproteine nach der Apolipoproteinzusammensetzung und nicht nach der Dichte oder

der elektrophoretischen Mobilität sollte mehr Verständnis über die Funktion der einzelnen Lipoproteinpartikel im Stoffwechsel erbringen. Die Apolipoproteine und nicht die Lipide sind die Bestandteile der Lipoproteine, die für die Stabilität, den Transport, die Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen und auch für die Aktivierung bzw. Inhibierung bestimmter Enzyme verantwortlich sind. Mit anderen Worten, in der Zirkulation wird das Schicksal eines Lipoproteins nicht durch die Lipidzusammensetzung, sondern durch die Apolipoproteinzusammensetzung determiniert. Aus diesem Grund erlaubt die Kenntnis der Apolipoproteinzusammensetzung potentielle Störungen im Lipidtransport oder auch andere metabolische Defekte zu entdecken und besser zu verstehen. Auch für die Abschätzung der möglichen Atherogenität eines Lipoproteins und hiermit für eine gezielte medikamentöse Therapie ist die Kenntnis der Apolipoproteinzusammensetzung von großer Bedeutung [129].

Allerdings weist das Lipoproteinfamilien-Konzept einige Nachteile auf: es wird weder die Größe der Lipoproteine - einer der wichtigsten Faktoren zur Beurteilung der Atherogenität - berücksichtigt noch der Austausch von Apolipoproteinen unter den Lipoproteinen. Als ein weiterer Contra-Argument gegen das *family-concept* könnte auch der Erfolg mehrerer großer Therapie-Studien aufgefasst werden. Diese haben gezeigt, dass die Senkung des LDL-Cholesterins und/oder die Senkung der Triglyceride mit gleichzeitiger Erhöhung des HDL-Cholesterins zur Senkung des Atherosklerose-Risikos führt (siehe Einleitung). Würde die Bestimmung der Lipoproteinsubfraktionen das Ergebnis verändern oder gar verbessern? Die Antwort lautet höchstwahrscheinlich „nein“. Denn die LDL-Cholesterin-Senkung wäre mit der Senkung der LpB vergleichbar, die Triglycerid-Senkung mit der Senkung der LpB:C, LpB:C:E und des LpA-II:B-Komplexes und die HDL-Erhöhung mit der Erhöhung der LpA-I und LpA-I:A-II. Warum sollten diese Lipoproteinsubfraktionen überhaupt bestimmt werden? Mehrere medizinische Fragestellungen sind denkbar, die solchen Untersuchungen Sinn verleihen:

- Bei welcher Erkrankung werden welche Lipoproteinsubfraktionen vermehrt produziert und warum?
- Warum weisen Probanden mit gleicher Pathogenese differierende Lipoproteinsubfraktionen-Muster auf?
- Werden die Lipoproteinsubfraktionen gleichsinnig von den Medikamenten beeinflusst?

Diese Fragen können zur Zeit nur teilweise beantwortet werden. Die Bestimmung der Lipoproteinsubfraktionen in großen prospektiven Studien könnte mehr Klarheit verschaffen, ist jedoch wegen des Fehlens einer standardisierten Methode schwer zu realisieren.

Werden die Pro- und Contra-Argumente zu dem *family-concept* in Erwägung gezogen, so scheint eine Kombination aus der konventionellen Einteilung der Lipoproteine (in VLDL, LDL und HDL) und der alternativen Klassifikation nach Apolipoproteinzusammensetzung vorteilhaft zu sein. Die Bestimmung der VLDL, LDL und HDL erlaubt eine grobe, aber meistens ausreichende Abschätzung des koronaren Risikos für einen Patienten. Die Einteilung nach Apolipoproteinzusammensetzung erlaubt dagegen, die Ursachen für die Entstehung dieses Risikos zu verstehen. In anderen Worten: für eine gute Behandlung der Patienten ist ein Arzt mit der Kenntnis von VLDL-, LDL- und HDL-Konzentrationen gut beraten, ein Wissenschaftler dagegen, der die biochemischen Ursachen z.B. der erhöhten VLDL-Konzentrationen verstehen möchte, sollte sich mit den Lipoproteinsubfraktionen befassen.

5.4.4. Ausblick

Die Darstellung der Vor- und Nachteile zur Charakterisierung und Quantifizierung von Lipoproteinsubfraktionen legt nahe, dass diese Untersuchungen einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis sowohl des Lipoproteinstoffwechsels als auch der Pathogenese von Hyperlipoproteinämien leisten könnten. Dafür sollte allerdings eine gut standardisierbare Methode entwickelt werden, die die Messung großer Probenserien erlaubt. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass weder die Immunpräzipitation noch die Immunabsorption sich uneingeschränkt für diese Aufgabe eignen: die Immunpräzipitation wegen der aufgedeckten und diskutierten Unplausibilitäten, die Immunabsorption wegen schlechter Standardisierbarkeit und hohem Zeitaufwand. Eine Möglichkeit bestünde in der Herstellung einer mit Antikörper hochbeladenen Sepharose, die nur in kleinen Mengen zu der Probe zugeführt werden müsste. Nach einer bestimmten Reaktionszeit würde die Trennung der Probe von der Sepharose erfolgen. Mit drei Sepharose-Sorten: Anti-C-III, Anti-E und Anti-C-III-E sowie einem rechnerischen Algorithmus, könnten alle vier Lipoproteinsorten – LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E – ermittelt werden. Diese Methode hätte mehrere Vorteile: einerseits entfällt der Zentrifugationsschritt, der bei der Immunpräzipitation notwendig war, andererseits kann der kostenintensive Immunabsorber wieder verwendet werden. Unter Verwendung die-

ser Methode in Kombination mit Ultrazentrifugation oder FPLC wäre die Durchführung von prospektiven Studien denkbar. In solchen Studien könnte nicht nur die Frage der möglichen Atherogenität eines Partikels, sondern auch die Wirkung eines Medikamentes auf bestimmte Lipoproteinsubfraktion analysiert werden.

Die Charakterisierung funktioneller Eigenschaften von Lipoproteinsubfraktionen kann als ein weiteres interessantes Objekt der Forschung angesehen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte an drei Probanden gezeigt werden, dass LpB:C-III:E vermutlich das höchste atherogene Potential trägt, weil dieses Partikel einerseits cholesterin- und triglyceridreich ist, in Partikel-Größen vorkommt, die die Passage durch das Endothel erlauben und andererseits am schlechtesten von den Zellen internalisiert wird. Diese Eigenschaften von LpB:C-III:E müssten an einer größeren Anzahl von Probanden bestätigt werden. Von großer Bedeutung wären auch Internalisationsstudien an humanen Monocyten/Makrophagen, den Zellen, die bei der Entwicklung der Atherosklerose wichtigere Rolle als Fibroblasten spielen.

Angesicht der Tatsache, dass die Atherogenese und Inflammation eng miteinander verbunden sind, wäre es interessant zu erforschen, ob die Lipoproteinsubfraktionen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Bildung von pro- oder anti-inflammatorischen Faktoren haben. Es ist z.B. gezeigt worden, dass VLDL einen inhibitorischen Einfluss auf den IL-2-Rezeptor und eine aktivierende Wirkung auf die IL-2-Synthese haben und damit die Zellteilung von Lymphozyten inhibieren [130].

Es kann gesagt werden, dass die Erforschung von Lipoproteinsubfraktionen viele wichtige Erkenntnisse erwarten lässt, die unser Verständnis über das komplizierte Ereignis der Atherogenese erweitern könnten.

6. Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen den triglyceridreichen Lipoproteinsubfraktionen und der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen konnte sowohl durch die Ergebnisse der Grundlagenforschung als auch durch mehrere epidemiologische Studien gezeigt werden. Zu den atherogenen Eigenschaften eines Lipoproteins zählt nicht nur seine Lipidzusammensetzung, sondern auch die Verweildauer in der Zirkulation und seine Größe. Bei der konventionellen Einteilung der Lipoproteine in VLDL, IDL, LDL und HDL werden diese Eigenschaften nur zum Teil berücksichtigt. Aus diesem Grund wurden die Lipoproteine nach ihrem Apolipoproteinbesatz in LpA-I und LpA-I:A-II, LpB, LpB:C, LpB:E, LpB:C:E und LpA-II:B:C:D:E klassifiziert.

Ziel dieser Arbeit war, die ApoB-haltigen Lipoproteinsubfraktionen (LpB, LpB:C-III, LpB:E, LpB:C-III:E) zu isolieren und zu charakterisieren. Im ersten Teil der Arbeit wurden zwei immunologische Verfahren – die Immunpräzipitation und die Immunabsorption – für die Isolierung der Lipoproteinsubfraktionen eingesetzt und miteinander verglichen. Der Ansatz der Immunpräzipitation führte zur Alteration der Lipoproteine und erwies sich als ungeeignet. Die Lipoproteinsubfraktionen wurden mittels Immunabsorption nach der Apolipoproteinkomposition und anschließend mittels Gelchromatographie nach Größe isoliert. Biochemische und funktionelle Charakterisierung der VLDL- und LDL-großen LpB, LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E führte zu folgenden Ergebnissen:

- LpB:C-III, LpB:E und LpB:C-III:E wurden wie in VLDL- als auch in LDL-Größe nachgewiesen, LpB dagegen nur in der LDL-Größe;
- im VLDL-Größenbereich ist LpB:C-III das triglycerid- und cholesterinreichste Partikel, im LDL-Größenbereich ist es dagegen das LpB:C-III:E;
- sowohl unter den VLDL-großen als auch unter den LDL-großen Lipoproteinen wird das LpB:E am besten und das LpB:C-III:E am schlechtesten von humanen Fibroblasten internalisiert;
- VLDL-große Lipoproteinsubfraktionen werden mit einer Ausnahme (LpB:E) schlechter von den Fibroblasten internalisiert als LDL-große Partikel.

Diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass LpB:C-III:E vermutlich das höchste atherogene Potential trägt. Um diesen Verdacht zu bekräftigen, sind weitere Untersuchungen notwendig, die nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aspekte in Betracht ziehen und auch den Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des LpB:C-III:E und den klinischen Ereignissen erforschen.

7. Literaturverzeichnis

1. Hanefeld M. Statine: Neue Perspektiven der Behandlung von Fettstoffwechselstörungen und Prävention der Atherosklerose. 1 Auflage. UNI-MED-Verlag 1999; pp. 32.
2. American Heart Association. 1998 Heart and stroke statistical update. Dallas/Texas: American Heart Association 1997.
3. Drawer TR, Meadors GF, Moore FE: Epidemiological approaches to heart disease: The Framingham Study. *Am. J. Pub. Health.* 1951; 41:279.
4. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP: Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983; 67:968-977.
5. Five-year findings of the hypertension detection and follow-up program. I. Reduction in mortality of persons with high blood pressure, including mild hypertension. Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *JAMA.* 1979; 242: 2562-2571.
6. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA.* 1984; 251:351-364.
7. Multiple risk factor intervention trial. Risk factor changes and mortality results. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *JAMA.* 1982; 248:1465-1477.
8. Assmann G, Cullen P, Schulte H: The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur. Heart J. Suppl. A.* 1998; A2-A11.
9. Windler E. Therapie von Fettstoffwechselstörungen bei Risikopatienten. 1 Auflage. UNI-MED-Verlag 2002; pp. 15.
10. Gotto AM, Farmer J. Störungen des Lipoproteinstoffwechsels und ihre Auswirkungen bei Atherosclerose. In: P. Schwandt, W. O. Richter, K. G. Parhofer: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen.* 2. Auflage. Schattauer Verlag Stuttgart 2000; pp. 645-666.
11. MAAS Investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS) *Lancet.* 1994; 344:633-638.
12. Jukema JW, Bruschke AV, van Boven AJ, Reiber JH, Bal ET, Zwinderman AH, Jansen H, Boerma GJ, van Rappard FM, Lie KI, *et al.* Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation.* 1995; 91:2528-2540.
13. Herd JA, Ballantyne CM, Farmer JA, Ferguson JJ 3rd, Jones PH, West MS, Gould KL, Gotto AM Jr. Effects of fluvastatin on coronary atherosclerosis in patients with mild to moderate cholesterol elevations (Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study [LCAS]). *Am J Cardiol.* 1997; 80:278-286.

14. Hunninghake DB. Is aggressive cholesterol control justified? Review of the post-coronary artery bypass graft trial. *Am J Cardiol.* 1998; 82:45-48.
15. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med.* 1995; 333:1301-1307.
16. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA.* 1998; 279:1615-1622.
17. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) *Lancet.* 1994; 344:1383-1389.
18. LIPID Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease. *N Engl J Med.* 1998; 339:1349-1357.
19. Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, East C, Goldman S, Nash DT, Rouleau JR, Rouleau JL, Sussex BA, Theroux P, Vanden Belt RJ, Braunwald E. Influence of baseline lipids on effectiveness of pravastatin in the CARE Trial. *Cholesterol And Recurrent Events. J Am Coll Cardiol.* 1999; 33:125-130.
20. Tomono S, Kawazu S, Kato N, Ono T, Ishii C, Ito Y, Shimizu M, Shimoyama M, Nakano T, Nakajima K. Uptake of remnant like particles (RLP) in diabetic patients from mouse peritoneal macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 1994; 1:98-102.
21. Knofler R, Nakano T, Nakajima K, Takada Y, Takada A. Remnant-like lipoproteins stimulate whole blood platelet aggregation in vitro. *Thromb Res.* 1995; 78:161-171.
22. Roche HM, Gibney MJ. The impact of postprandial lipemia in accelerating atherothrombosis. *J Cardiovasc Risk* 2000; 7:317-324.
23. Grundy, S.M., and G. Vega. Two different views of the relationship of hypertriglyceridemia to coronary heart disease. *Arch. Intern. Med.* 1992; 152:28-134.
24. Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, Soejima H, Misumi K, Kawano H, Nakagawa O, Yoshimura M, Ogawa H, Matsumura T, Sugiyama S, Nakano T, Nakajima K, Yasue H. Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation.* 1998; 97:2519-2526.
25. Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, Kottie L, Kunitake ST, Havel RJ, Kane JP. Triglycerid-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14:1767-1774.

26. Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Mortensen A, Hansen BF, Hansen JF, Ibsen P, Kjeldsen K. Intermediate density lipoprotein cholesterol as the best lipoprotein predictor of atherosclerosis severity in the Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis* 1997; 132:119-122.
27. Masucci-Magoulas L, Goldberg IJ, Bisgaier CL, Serajuddin H, Francole OL, Breslow JL, Tall AR. A mouse model with features of familial combined hyperlipidemia. *Science* 1997; 275:391-394.
28. Frick MH, Syvanne M, Nieminen MS, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, Kesaniemi YA, Pasternack A, Taskinen MR. Prevention of the angiographic progression of coronary and vein-graft atherosclerosis by gemfibrozil after coronary bypass surgery in men with low levels of HDL cholesterol. Lipid Coronary Angiography Trial (LOCAT) Study Group. *Circulation*. 1997; 96:2137-2143.
29. Papademetriou V, Narayan P, Rubins H, Collins D, Robins S. Influence of risk factors on peripheral and cerebrovascular disease in men with coronary artery disease, low high-density lipoprotein cholesterol levels, and desirable low-density lipoprotein cholesterol levels. HIT Investigators. Department of Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Am Heart J*. 1998; 136:734-740.
30. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, Manninen V, et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1987; 317:1237-1245.
31. WHO cooperative trial on primary prevention of ischaemic heart disease with clofibrate to lower serum cholesterol: final mortality follow-up. Report of the Committee of Principal Investigators. *Lancet*. 1984; 2:600-604.
32. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 1998; 81:7B-12B.
33. Luley C, Klör HU. *Lexikon Lipoproteine und Atherosklerose*. Aesopus Verlag GmbH. 1993; pp. 57.
34. Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ. Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1972; 260:689-707.
35. Alaupovic P, Blankenhorn DH. Determination of potentially atherogenic triglyceride-rich lipoprotein particles *Klin Wochenschr*. 1990; Suppl 22:38-42.
36. Alaupovic P, Mack WJ, Knight-Gibson C, Hodis HN. The role of triglyceride-rich lipoprotein families in the progression of atherosclerotic lesions as determined by sequential coronary angiography from a controlled clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:715-722.

37. Luc G, Fievet C, Arveiler D, Evans AE, Bard JM, Cambien F, Fruchart JC, Ducimetiere P. Apolipoproteins C-III and E in apoB- and non-apoB-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. *Etude Cas Temoins sur l'Infarctus du Myocarde. J Lipid Res.* 1996; 37:508-517.
38. Porsch-Oezueruemezs, M., S. Westphal, C. Luley: Measurement of low apolipoprotein concentrations by optimized immunoturbidimetric applications: *Clin. Chem.* 2001; 47:594-597.
39. Bach-Ngohou K, Giraud F, Krempf M, Bard JM. Influence of remnant accumulation markers on plasma concentrations of two lipoprotein(a) subspecies (containing or free of apoE). *Metabolism.* 2001; 50:277-282.
40. März W, Groß W: Analyses of plasma lipoproteins by ultracentrifugation in a new fixed angle rotor: evaluation of a phosphotungstic acid/MgCl₂ acid and a quantitative lipoprotein electrophoresis assay. *Clin. Chim. Acta.* 1986; 160:1-18.
41. Burstein, M., H. R. Scholnick, R. Morfin: Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J. Lipid Res.* 1970; 11:583-595.
42. Alaupovic P, Knight-Gibson C, Wang CS, Downs D, Koren E, Brewer HB Jr, Gregg RE. Isolation and characterization of an apoA-II-containing lipoprotein (LP-A-II:B complex) from plasma very low density lipoproteins of patients with Tangier disease and type V hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res.* 1991; 32:9-19.
43. Forte TM, Nordhausen RW. Electron microscopy of negatively stained lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1986; 128:442-457.
44. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Lipoprotein-receptor interactions. *Methods Enzymol.* 1986; 129:542-565.
45. Stephan ZF, Yurachek EC. Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res.* 1993; 34:325-330.
46. Teupser D, Thiery J, Walli AK, Seidel D. Determination of LDL- and scavenger-receptor activity in adherent and non-adherent cultured cells with a new single-step fluorometric assay. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1303:193-198.
47. McConathy WJ, Koren E, Wieland H, Campos EM, Lee DM, Kloer HU, Alaupovic P. Evaluation of immunoaffinity chromatography for isolating human lipoproteins containing apolipoprotein B. *J Chromatogr.* 1985; 342:46-66.
48. Steinmetz A, Kaffarnik H. Familiäre Dysbetalipoproteinämie (Typ-III-Hyperlipoproteinämie). In: P. Schwandt, W. O. Richter, K. G. Parhofer: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen.* 2. Auflage. Schattauer Verlag Stuttgart 2000; pp. 92-103.
49. Stryer L. *Biochemie.* 3 Auflage. Spektrum Akad. Verlag 1994; pp.11.
50. Koren E, Puchois P, Alaupovic P, Fesmire J, Kandoussi A, Fruchart JC. Quantification of two different types of apolipoprotein A-I containing lipoprotein particles in plasma

- by enzyme-linked differential-antibody immunosorbent assay. *Clin Chem.* 1987; 33:38-43.
51. Kandoussi A, Cachera C, Parsy D, Bard JM, Fruchart JC. Quantitative determination of different apolipoprotein B containing lipoproteins by an enzyme linked immunosorbent assay: apo B with apo C-III and apo B with apo E. *J Immunoassay.* 1991; 12:305-323.
 52. Vu Dac N, Mezdour H, Parra HJ, Luc G, Luyeye I, Fruchart JC. A selective bi-site immunoenzymatic procedure for human Lp[a] lipoprotein quantification using monoclonal antibodies against apo[a] and apoB. *J Lipid Res.* 1989; 30:1437-1443.
 53. Alaupovic P, Beckaert ED, Koren E: Isolation, characterization and quantification of subclasses of plasma lipoproteins defined by their apolipoprotein composition. In *Bio-technology of Dyslipoproteinemias: clinical applications in diagnosis and control, Atherosclerosis reviews.* New York: Raven Press. 1990; 69:179-188.
 54. Gervaise N, Garrigue MA, Lasfargues G, Lecomte P. Triglycerides, apo C3 and Lp B:C3 and cardiovascular risk in type II diabetes. *Diabetologia.* 2000; 43:703-708.
 55. Alaupovic P, Fesmire JD, Hunnighake D, Domanski M, Forman S, Knatterud GL, Forrester J, Herd JA, Hoogwerf B, Campeau L, Gobel FL. The effect of aggressive and moderate lowering of LDL-cholesterol and low dose anticoagulation on plasma lipids, apolipoproteins and lipoprotein families in post coronary artery bypass graft trial. *Atherosclerosis.* 1999; 146:369-379.
 56. Alaupovic P, Tavella M, Fesmire J. Separation and identification of apo-B-containing lipoprotein particles in normolipidemic subjects and patients with hyperlipoproteinemias. *Adv Exp Med Biol.* 1987; 210:7-14.
 57. Alaupovic P, McConathy WJ, Fesmire J, Tavella M, Bard JM. Profiles of apolipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoprotein particles in dyslipoproteinemias. *Clin Chem.* 1988; 34:B13-27.
 58. Alaupovic P, Tavella M, Bard JM, Wang CS, Attman PO, Koren E, Corder C, Knight-Gibson C, Downs D. Lipoprotein particles in hypertriglyceridemic states. *Adv Exp Med Biol.* 1988; 243:289-297.
 59. Gibson JC, Rubinstein A, Ngai N, Ginsberg HN, Le NA, Gordon RE, Goldberg IJ, Brown WV. Immunoaffinity isolation of apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 835:113-123.
 60. Gibson JC, Rubinstein A, Ginsberg HN, Brown WV. Isolation of apolipoprotein E-containing lipoproteins by immunoaffinity chromatography. *Methods Enzymol.* 1986; 129:186-198.
 61. Le NA, Bukberg PR, Ginsberg HN, Gibson JC, Brown WV. Direct determination of apolipoprotein C-III specific activity using immunoaffinity chromatography. *Methods Enzymol.* 1986; 129:457-469.

62. Campos H, Perlov D, Khoo C, Sacks FM. Distinct patterns of lipoproteins with apoB defined by presence of apoE or apoC-III in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia . *J Lipid Res.* 2001; 42:1239-1249.
63. Ginsberg HN, Le NA, Goldberg IJ, Gibson JC, Rubinstein A, Wang-Iverson P, Norum R, Brown WV. Apolipoprotein B metabolism in subjects with deficiency of apolipoproteins CIII and AI. Evidence that apolipoprotein CIII inhibits catabolism of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase in vivo. *J Clin Invest.* 1986; 78:1287-1295.
64. Mann CJ, Troussard AA, Yen FT, Hannouche N, Najib J, Fruchart JC, Lotteau V, Andre P, Bihain BE. Inhibitory effects of specific apolipoprotein C-III isoforms on the binding of triglyceride-rich lipoproteins to the lipolysis-stimulated receptor. *J Biol Chem.* 1997; 272:31348-31354.
65. Jong MC, Hofker MH, Havekes LM. Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:472-484.
66. van Dijk KW, van Vlijmen BJ, van't Hof HB, van der Zee A, Santamarina-Fojo S, van Berkel TJ, Havekes LM, Hofker MH. In LDL receptor-deficient mice, catabolism of remnant lipoproteins requires a high level of apoE but is inhibited by excess apoE. *J Lipid Res.* 1999; 40:336-344.
67. Huang Y, Liu XQ, Rall SC Jr, Taylor JM, von Eckardstein A, Assmann G, Mahley RW. Overexpression and accumulation of apolipoprotein E as a cause of hypertriglyceridemia. *J Biol Chem.* 1998; 273:26388-26393.
68. Marcoux C, Tremblay M, Nakajima K, Davignon J, Cohn JS. Characterization of remnant-like particles isolated by immunoaffinity gel from the plasma of type III and type IV hyperlipoproteinemic patients. *J Lipid Res.* 1999; 40:636-647.
69. Lee DM, Knight-Gibson C, Samuelsson O, Attman PO, Wang CS, Alaupovic P. Lipoprotein particle abnormalities and the impaired lipolysis in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2002; 61:209-218.
70. Khoo C, Campos H, Judge H, Sacks FM. Effects of estrogenic oral contraceptives on the lipoprotein B particle system defined by apolipoproteins E and C-III content. *J Lipid Res.* 1999; 40:202-212.
71. Barbagallo CM, Levine GA, Blanche PJ, Ishida BY, Krauss RM. Influence of apoE content on receptor binding of large, buoyant LDL in subjects with different LDL subclass phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:466-472.
72. Alaupovic P, Blackenhorn DH, Knight-Gibson C, Tavella M, Bard JM, Shafer D, Lee ET, Brasuell J. ApoB-containing lipoprotein particles as risk factors for coronary artery disease. Plenum Press, New York, 1990; 299-309.
73. Bard JM, Candelier L, Agnani G, Clavey V, Torpier G, Steinmetz A, Fruchart JC. Isolation and characterization of human Lp-B lipoprotein containing apolipoprotein B as the sole apolipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1082:170-176.

74. Agnani G, Bard JM, Candelier L, Delattre S, Fruchart JC, Clavey V. Interaction of LpB, LpB:E, LpB:C-III, and LpB:C-III:E lipoproteins with the low density lipoprotein receptor of HeLa cells. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11:1021-1029.
75. März W, Siekmeier R, Scharnagl H, Seiffert UB, Gross W. Fast lipoprotein chromatography: new method of analysis for plasma lipoproteins. *Clin Chem*. 1993; 39:2276-2281.
76. Innis-Whitehouse W, Li X, Brown WV, Le NA. An efficient chromatographic system for lipoprotein fractionation using whole plasma. *J Lipid Res*. 1998; 39:679-690.
77. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986; 232:34-47.
78. Südhof TC, Russell DW, Goldstein JL, Brown MS, Sanchez-Pescador R, Bell GI. Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science*. 1985; 228:893-895.
79. Medh JD, Bowen SL, Fry GL, Ruben S, Andracki M, Inoue I, Lalouel JM, Strickland DK, Chappell DA. Lipoprotein lipase binds to low density lipoprotein receptors and induces receptor-mediated catabolism of very low density lipoproteins in vitro. *J Biol Chem*. 1996; 271:17073-17080.
80. Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J*. 1988; 7:4119-4127.
81. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:9725-9729.
82. Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:9252-9256.
83. Novak S, Hiesberger T, Schneider WJ, Nimpf J. A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J. Biol Chem*. 1996; 271:11732-11736.
84. Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y. Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem*. 1996; 271:24761-24768.
85. Rumsey SC, Obunike JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase-mediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblasts and macrophages. *J Clin Invest*. 1992; 90:1504-1512.

86. Sehayek E, Wang XX, Vlodavsky I, Avner R, Levkovitz H, Olivecrona T, Olivecrona G, Willnow TE, Herz J, Eisenberg S. Heparan sulfate-dependent and low density lipoprotein receptor-related protein-dependent catabolic pathways for lipoprotein lipase in mouse embryonic fibroblasts. *Isr J Med Sci.* 1996; 32:449-454.
87. Uhlin-Hansen L, Yanagishita M, Brefeldin A inhibits the endocytosis of plasma-membrane-associated heparan sulphate proteoglycans of cultured rat ovarian granulosa cells. *Biochem J.* 1995; 310:271-278.
88. Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL, Mahley RW. Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem.* 1993; 268:10160-10167.
89. Esser V, Limbird LE, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 1988; 263:13282-13290.
90. Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. Different combinations of cysteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins. *J Biol Chem.* 1989; 264:21682-21688.
91. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature.* 1989; 341:162-164.
92. Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, Bard JM, Fruchart JC. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15:963-971.
93. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 265:10771-10779.
94. Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Brown MS. Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 265:22453-22459.
95. Breyer ED, Le NA, Li X, Martinson D, Brown WV. Apolipoprotein C-III displacement of apolipoprotein E from VLDL: effect of particle size. *J Lipid Res.* 1999; 40:1875-1882.
96. Ji ZS, Pitas RE, Mahley RW. Differential cellular accumulation/retention of apolipoprotein E mediated by cell surface heparan sulfate proteoglycans. Apolipoproteins E3 and E2 greater than e4. *J Biol Chem.* 1998; 273:13452-13460.
97. Granot E, Schwiegelshohn B, Tabas I, Gorecki M, Vogel T, Carpentier YA, Deckelbaum RJ. Effects of particle size on cell uptake of model triglyceride-rich particles with and without apoprotein E. *Biochemistry.* 1994; 33:15190-15197.

98. Kowal RC, Herz J, Weisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 1990; 265:10771-10779.
99. Rensen PC, Herijgers N, Netscher MH, Meskers SC, van Eck M, van Berkel TJ. Particle size determines the specificity of apolipoprotein E-containing triglyceride-rich emulsions for the LDL receptor versus hepatic remnant receptor in vivo. *J Lipid Res.* 1997; 38:1070-1084.
100. Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1983; 737:197-222.
101. Mahley RW. Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer's disease. *Isr J Med Sci.* 1996; 32:414-429.
102. Kostner GM, März W. Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine. In: P. Schwandt, W. O. Richter, K. G. Parhofer: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen.* 2. Auflage. Schattauer Verlag Stuttgart 2000; pp. 4-58.
103. Innerarity TL, Kempner ES, Hui DY, Mahley RW. Functional unit of the low density lipoprotein receptor of fibroblasts: a 100,000-dalton structure with multiple binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78:4378-4382.
104. Brown MS, Herz J, Kowal RC, Goldstein. The LDL receptor-related protein (LRP): double agent or decoy? *Curr. Opin. Lipidol.* 1991; 2:65-72.
105. Giroux LM, Cohn JS, LaMarre J, Davignon J. Pseudo type III dyslipoproteinemia is associated with normal fibroblast lipoprotein receptor activity. *Atherosclerosis.* 1997; 132:85-94.
106. Birkenmeier G, Heidrich K, Glaser C, Handschug K, Fabricius EM, Frank R, Reissig D. Different expression of the alpha2-macroglobulin receptor/low-density lipoprotein receptor-related protein in human keratinocytes and fibroblasts. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290:561-568.
107. Bradley WA, Hwang SL, Karlin JB, Lin AH, Prasad SC, Gotto AM Jr, Gianturco SH. Low-density lipoprotein receptor binding determinants switch from apolipoprotein E to apolipoprotein B during conversion of hypertriglyceridemic very-low-density lipoprotein to low-density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1984; 259:14728-14735.
108. Gianturco SH, Gotto AM Jr, Bradley WA. Hypertriglyceridemia: lipoprotein receptors and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 1985; 183:47-71.
109. Sehayek E, Eisenberg S. Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem.* 1991; 266:18259-18267.
110. Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1977; 46:897-930.

111. Orci L, Carpentier JL, Perrelet A, Anderson RG, Goldstein JL, Brown MS. Occurrence of low density lipoprotein receptors within large pits on the surface of human fibroblasts as demonstrated by freeze-etching. *Exp Cell Res.* 1978; 113:1-13.
112. Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Berns JJ. Ligand size as a determinant for catabolism by the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway. A lattice model for LDL binding. *J Biol Chem.* 1991; 266:19296-19302.
113. Rensen PC, Herijgers N, Netscher MH, Meskers SC, van Eck M, van Berkel TJ. Particle size determines the specificity of apolipoprotein E-containing triglyceride-rich emulsions for the LDL receptor versus hepatic remnant receptor in vivo. *J Lipid Res.* 1997; 38:1070-1084.
114. McKeone BJ, Patsch JR, Pownall HJ. Plasma triglycerides determine low density lipoprotein composition, physical properties, and cell-specific binding in cultured cells. *J Clin Invest.* 1993; 91:1926-1933.
115. Alaupovic P. Significance of apolipoproteins for structure, function, and classification of plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1996; 263:32-60.
116. Li, W. W., M. M. Dammerman, J. D. Smith, S. Metzger, J. L. Breslow, T. Leff: Common genetic variation in the promotor of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J. Clin. Invest.* 1995; 96:2601-2605.
117. Dallinga-Thie, G. M., M. Groenendijk, R. N. Blom, T. W. De Bruin, E. De Kant: Genetic heterogeneity in the apolipoprotein C-III promoter and effects of insulin. *J. Lipid Res.* 2001; 42:1450-1456.
118. Chen, M., J. L. Breslow, W. Li, T. Leff: Transcriptional regulation of apoC-III gene by insulin in diabetic mice: Correlation with changes in plasma triglycerides levels. *J. Lipid Res.* 1994; 35:1918-1924.
119. Hanefeld, M., S. Fischer, U. Julius: Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow up. *Diabetologia.* 1996; 39:1577-1583.
120. Sammett D, Tall AR. Mechanisms of enhancement of cholesteryl ester transfer protein activity by lipolysis. *J Biol Chem.* 1985; 260:6687-6697.
121. Murdoch SJ, Breckenridge WC. Effect of lipid transfer proteins on lipoprotein lipase induced transformation of VLDL and HDL. *Biochim Biophys Acta.* 1996; 1303:222-232.
122. Bard JM, Charles MA, Juhan-Vague I, Vague P, Andre P, Safar M, Fruchart JC, Eschwege E. Accumulation of triglyceride-rich lipoprotein in subjects with abdominal obesity: the biguanides and the prevention of the risk of obesity (BIGPRO) 1 study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:407-414.

123. Mahley RW, Huang Y, Rall SC Jr. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia (dysbetalipoproteinemia). Questions, quandaries, and paradoxes. *J Lipid Res.* 1999; 40:1933-1949.
124. Blankenhorn DH, Alaupovic P, Wickham E, Chin HP, Azen SP. Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts. Lipid and nonlipid factors. *Circulation.* 1990; 81:470-476.
125. Hodis, H. N., W. J. Mack, S. P. Azen, P. Alaupovic, J. M. Pogoda, L. LaBree, L. C. Hemphill, D. M. Krams, D. H. Blankenhorn: Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation.* 1994; 90:42-49.
126. Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA, Braunwald E. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation.* 2000; 102:1886-1892.
127. Koren E, Koscec M, Corder C, Knight-Gibson C, Lee DM, Alaupovic P. Differential atherogenicity of complex apoB-containing lipoprotein particles. *Atherosclerosis.* 1994; 109:217-218.
128. Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, Kotite L, Kunitake ST, Havel RJ, Kane JP. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14:1767-1774.
129. Alaupovic P. The lipoprotein family concept and its clinical significance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 1992; 2:52-54.
130. Sampedro MC, Motran C, Gruppi A, Kivatinitz SC. VLDL modulates the cytokine secretion profile to a proinflammatory pattern. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285:393-399.
131. ASTRA-Gruppe. What's what. Leitfaden der Herz-Kreislauf-Prüfungen. 4 Auflage. Astra GmbH 1999.

8. Anhang

| Apolipo- protein | Masse kDa | Funktion | Vorkommen |
|-----------------------------|----------------------|--|---|
| A-I | 28,5 | Strukturprotein, Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptoren | HDL |
| A-II | 17 | Aktivierung der hepatischen Lipase - ? | HDL |
| A-IV | 46 | Triglyzeridstoffwechsel, Aktivierung der LCAT | Chylomikronen, HDL |
| B-100 | 550 | Sekretion von Triglyzeriden und Cholesterin aus Leber und Dünndarm, Strukturprotein, Bindung an den LDL-Rezeptor | VLDL, LDL |
| B48 | 265 | Resorption von Lipiden und lipidlöslichen Vitaminen aus der Nahrung | Chylomikronen, Chyl.-Remnants |
| C-I | 6,5 | Unterdrückung der Bindung von naszierenden Lipoproteinen an den LDL - und an LRP- Rezeptor, Aktivierung der LCAT | VLDL, HDL |
| C-II | 8,8 | Aktivierung der LPL | VLDL, HDL |
| C-III | 8,9 | Inhibierung der LPL und der Bindung an den LDL und LRP-Rezeptor | VLDL, HDL |
| D | 29 | Aktivierung und Stabilisierung der LCAT | HDL |
| E | 34 | Ligand für den LDL- und den LRP-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterin aus peripheren Zellen | Chylomikronen, Chyl.-und VLDL – Remnants, VLDL, HDL |
| F-J | | Unbekannt | HDL |
| a | 350-900 | unbekannte Funktion bei der Fibrinolyse und Blutgerinnung | Lp(a) |

Tabelle A: Funktion der bekannten Apolipoproteine und deren Vorkommen in den Lipoproteinen [102].

| Bezeichnung | Organ, Zelle | Ligand | Funktion |
|---|---|---|--|
| LDL-R | alle Zellen | ApoE, ApoB-100, LPL-? | Aufnahme und Katabolismus von LDL Regulation der zellulären Cholesterinhomöostase |
| LRP (LDL-receptor related protein) | Leber, Neuronen, Astrozyten und viele andere | ApoE, LPL, HTGL, ApoB-100, Apo(a), Lactorferrin, Vitellogenin, Thrombospondine, Saponine, Viren, α_2 -Makroglobulin u.s.w. | Katabolismus von Chylomikronen-Remnants und anderer ApoE-haltiger Lipoproteine |
| HDL-R | Makrophagen, Schaumzellen, Endothelzellen, Adipozyten, Fibroblasten | HDL | Ausschleusung von Cholesterin aus Zellen und Geweben (reverser Cholesterintransport) |
| Scavenger-R (sechs Klassen A-F) | Makrophagen, Kupffer-Zellen, Schaumzellen, Endothelzellen | modifizierte Lipoproteine (z.B. oxidierte oder enzymatisch veränderte LDL, β -VLDL) | „Aufräumfunktion“: Katabolismus von modifizierten Lipoproteinen |

Tabelle B: Überblick über die Lipoproteinrezeptoren und deren Funktion [102].

| Lipoprotein | Dichte g/ml | Masse MDa | Größe nm | elektrophor. Mobilität | Protein % | Lipide % | FC % | CE % | TG % |
|------------------------|-------------|-----------|-------------------|------------------------|-----------|----------|------|------|------|
| Chylomikronen | < 0,95 | > 150 | < 10 ⁴ | Auftragsstelle | 2 | 5 | 1 | 2 | 90 |
| VLDL | < 1,006 | 5-130 | 50 | prä- β -Bande | 10 | 16 | 7 | 13 | 54 |
| IDL | 1,006-1,019 | 3,5-2,5 | 30 | | 17 | 20 | 9 | 34 | 20 |
| LDL | 1,019-1,063 | 2,5 | 21 | β -Bande | 23 | 21 | 11 | 41 | 4 |
| HDL₁ | 1,055-1,085 | 0,5 | 12 | α -Bande | 35 | 34 | 10 | 20 | 1 |
| HDL₂ | 1,085-1,125 | 0,36 | 10 | | 42 | 35 | 5 | 13 | 5 |
| HDL₃ | 1,125-1,21 | 0,2 | 8 | | 56 | 23 | 3 | 15 | 3 |
| VHDL | 1,21-1,25 | 0,15 | 7 | | 72 | 20 | 2 | 5 | 1 |

Tabelle C: Physiko-chemische Eigenschaften der Lipoprotein-Dichtefraktionen [102].

| | Studien | Krankengut | Follow-up | Therapie | Ergebnisse | |
|--------------------------------------|---|--|-----------|------------------------------------|---|--|
| | | | | | Lipide und Lp | Endpunkte / angiographische Untersuchungen |
| angiographisch kontrollierte Studien | MAAS [11] (Multicenter Anti-Atheroma Study) | n = 381 (30-67 Jahre) Nachweis von zwei Koronarsegmenten mit Lumenverminderung TC: 5,5-8 mmol/l, TG: <4 mmol/l | 5 Jahre | 20 mg/Tag Simvastatin oder Diät | TC ↓ 23% TG ↓ 18 % LDL-C ↓ 31% HDL-C ↑ 9% | Reduktion der Progressionsrate |
| | REGRESS [12] (Regression Growth Evaluation Statin Study) | n = 885 (40-70 Jahre) Nachweis von mindestens 50%iger Stenose TC: 155-310 mg/dl | 2 Jahre | 40 mg Pravastatin/Tag oder Placebo | TC ↓ 20% TG ↓ 7% LDL-C ↓ 29% HDL-C ↑ 10% | Reduktion der Progressionsrate (Abnahme des Lumens um 0,06mm gegenüber 0,10 mm in der Kontrollgruppe) |
| | LCAS [13] (Lipoprotein und Coronary Atherosclerosis Study) | n = 429 Nachweis von mindestens einer Koronarstenose LDL-C: 115-190 mg/dl | 2,5 Jahre | 40 mg/Tag Fluvastatin oder Diät | TC ↓ 18% TG ↓ 10% LDL-C ↓ 26,5% HDL-C ↑ 5,5% | Progression der Läsionen signifikant verzögert; Abnahme der kardial-tödlichen Ereignisse um 32,8% |
| | Post-CABG [14] (Post-Coronary Artery Bypass Graft) | n = 1351 Revaskularisation der Bypassgefäße LDL-C: 130-175 mg/dl | 4,3 Jahre | 4 oder 80 mg/Tag Lovastatin | LDL-C: 93-97 mg/dl | 31%ige Reduktion der durchschnittlichen Progressionsrate in den Bypassgefäßen |
| Primärpräventionsstudien | WOSCOPS [15] (West of Scotland Prevention Study) | n = 6595 (45-64 Jahre) ohne Vorgeschichte LDL-C: 155 mg/dl | 5 Jahre | 40 mg/Tag Pravastatin oder Placebo | TC ↓ 20% LDL-C ↓ 26% | 31%ige Reduktion beim primären Endpunkt (nicht tödlicher Myokardinfarkt oder KHK-assoziiertes Tod) Gesamtmortalität nicht gesenkt |
| | AFCAPS/TexCAPS [16] (Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study) | n = 6605 keine KHK LDL-C: 150 mg/dl TC: 221 mg/dl | 5,2 Jahre | 20 mg/Tag Lovastatin oder Diät | TC ↓ 18,4% TG ↓ 15% LDL-C ↓ 25% HDL-C ↑ 6% | Reduktion des primären Endpunktes um 36% (Angina pectoris, nicht tödlicher Herzinfarkt und plötzlicher Herztod) |

Tabelle D: Überblick über klinische Studien, die den Zusammenhang zwischen Dyslipoproteinämien und KHK widersprechen [10,131].

| | Studien | Krankengut | Follow-up | Therapie | Ergebnisse | |
|----------------------------|--|--|---------------------|--|---------------------------------------|--|
| | | | | | Lipide und Lp | Endpunkte / angiographische Untersuchungen |
| Sekundärpräventionsstudien | 4S [17] (Scandinavian Simvastatin Survival Study) | n = 4444 (35-69 Jahre) Vorgeschichte: Angina pectoris oder Myokardinfarkt TC: 5,5-8,0 mmol/l nach 8wöchiger Diät | im Mittel 5,4 Jahre | 20mg/Tag Simvastatin, nach 6-8 Wochen Dosisanpassung auf 40 mg, um Zielwerte von TC: 3,0-5,2 mmol/l zu erreichen | TC ↓ 28% LDL-C ↓ 38% HDL-C ↑ 8% | Reduktion des relativen Risikos für Gesamtmortalität von 30 % durch eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität |
| | LIPID [18] (Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease) | n = 9014 (31-75 Jahre) Vorgeschichte: Angina pectoris (n = 3260) oder Myokardinfarkt (n = 5754) | 5 Jahre | 40 mg/Tag Pravastatin oder Diät | | Reduktion der KHK-assoziierten Mortalität um 24 % |
| | CARE [19] (Cholesterol and Recurrent Events) | n = 4159 (21-75 Jahre) Vorgeschichte: Myokardinfarkt vor 3-20 Monate TC: < 240 mg/dl LDL-C: 115-174 mg/dl TG: <350 mg/dl | >5 Jahre | 40 mg/Tag Pravastatin oder Diät | | Reduktion des primären Endpunktes (tödlicher oder nicht tödlicher Myokardinfarkt) um 35% bei Patienten mit dem höchsten LDL-C, in der Gruppe mit dem niedrigsten LDL-C (<125 mg/dl) - kein Benefit |

Tabelle D: Überblick über klinische Studien, die den Zusammenhang zwischen Dyslipoproteinämien und KHK widerspiegeln [10,131] (Fortsetzung).

| Studien | Krankengut | Follow-up | Therapie | Ergebnisse | |
|---|--|------------|---------------------------------|---|---|
| | | | | Lipide und Lp | Endpunkte / angiographische Untersuchungen |
| LOCAT [28] (Lipid Coronary Angiography Trial) | n = 395 Vorgeschichte: Bypassoperation HDL-C: <1,1 mmol/l LDL-C: <4,5 mmol/l TG: <4 mmol/l | 2 Jahre | 1,2 g/Tag Gemfibrozil oder Diät | TG ↓ 36% TC ↓ 5,5% LDL-C ↓ 4,5% HDL-C ↑ 21% | angiographische Verbesserung der nativen Gefäße |
| HIT [29] (Veterans Administration HDL Intervention Trial) | n = 2500 (<73 Jahre) Vorgeschichte: gesicherte KHK HDL-C: <40 mg/dl LDL-C: <140 mg/dl TG: <300 mg/dl | 5-7 Jahre | 1,6 g/Tag Gemfibrozil oder Diät | TG ↓ 25% LDL-C ↓ n.s. HDL-C ↑ 7,5% | Reduktion des primären Endpunktes (Herzinfarkt) um 22 %, zusätzliche Reduktion von Schlaganfällen und TIAs |
| PROCAM [8] (Prospektive Cardiovascular Münster Study) | n = 4849 (40-64 Jahre) ohne vorherigen Myokardinfarkt | 8 Jahre | | Bei Patienten mit erhöhten TG (>2,3 mmol/l) und LDL-C (>4,9 mmol/l) ist die Prävalenz an kardiovaskulären Ereignissen doppelt so hoch wie bei Patienten mit niedrigen TG (<2,3 mmol/l) und hohen LDL-C. | |
| HHS [30] (Helsinki Heart Study) | n = 4081 (40-55 Jahre) | 5 Jahre | 1,2 g/Tag Gemfibrozil | TG ↓ 43% TC ↓ 11% LDL-C ↓ 10% HDL-C ↑ 10% | Gesamtreduktion der kardialen Endpunkte lag bei 34 % |
| WHO [31] (Clofibrate Primary Prevention Study) | n = 15745 (30-59 Jahre) | 13,2 Jahre | 1,6 g/Tag Clofibrat | TC ↓ 9% | Reduktion der KHK-Prävalenz um 20% (gegenüber der Kontrollgruppe mit hohen Cholesterin-Werten); Gesamtmortalität unter Verum signifikant erhöht gegenüber Placebo |

Tabelle E : Überblick über klinische Studien, die den Zusammenhang zwischen den triglyceridreichen Lipoproteinen und der Atherogenese widerspiegeln [10,131].

Wissenschaftliche Leistungen

Publikationen

1. U. Pfitzner, A. Odenwald, T. Ostermann, L. Weingard, B. Ludwig, O.-M. H. Richter. Cytochrom c oxidase (heme aa₃) from *paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 1998; 30:89-97.
2. S. Westphal, L. Wiens, K. Güttler, J. Dierkes, C. Luley. Chylomicron remnants of various sizes are lowered more effectively by fenofibrate than by atorvastatin in patients with combined hyperlipidemia. Atherosclerosis, 2003 in press.

Poster

1. S. Westphal, L. Wiens, U.-L. Müller, C. Luley. Effects of treatment with atorvastatin on lipoprotein subspecies defined by apolipoprotein composition. 5. International symposium: "Multiple risk factors in cardiovascular disease: global assessment and intervention", Venedig, 28.-31. Oktober 1999.
2. U.-L. Müller, L. Wiens, S. Westphal, C. Luley. Effects of treatment with fenofibrate on lipoprotein subspecies defined by their apolipoprotein composition. 5. International symposium: "Multiple risk factors in cardiovascular disease: global assessment and intervention", Venedig, 28.-31. Oktober 1999.
3. L. Wiens, C. Luley. Einfluss von Größe und Apolipoproteinzusammensetzung von Lipoproteinen auf Bindung und Internalisation durch Fibroblasten. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Blaubeuren, 29.-31. März 2001.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation mit dem Thema:

„Lipoproteinsubfraktionen: Isolierung und Messmethoden, biochemische Charakterisierung und funktionelle Eigenschaften“

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 29.10.2003

Lebenslauf

Zur Person

Lilli Wiens (geb. Weingard)
geboren am 28.04.1970 in Almaty, Kasachstan
deutsche Staatsangehörigkeit
verheiratet, 2 Kinder

Schulausbildung

1977 - 1987

Mittelschule in Almaty

Studium

1987 - 1991

S. M. Kirow Universität in Almaty
Fachrichtung: Biologie
ohne Abschluss

Ausreise in die BRD

am 10.08.1991

Dez. 1991 - Mai 1992

Intensivsprachkurs in Deutsch bei der GfBA in Bonn

Studium

J. W. Goethe Universität, Frankfurt am Main

Okt. 1992 - Juli 1994

Grundstudium der Biologie

Okt. 1994 - Dez. 1996

Hauptstudium der Biochemie

Jan. 1997 - Juli 1997

Diplomarbeit im Institut für Molekulare Genetik

Dissertation

Jan.1998 - Jan.2003

Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Nov.1999 - März 2000

Erziehungsurlaub mit dem 1. Kind

seit Jan. 2003

Erziehungsurlaub mit dem 2. Kind

Magdeburg, den 29.10.2003