

# Apolipoprotein E und verwandte Parameter im Liquor cerebrospinalis

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische  
Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Simone Ommert  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2001  
(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. J. Engels

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Fasold

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Groß

Datum der Disputation: 10.07.2001

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Groß danke ich für die Überlassung des Themas, für unzählige Stunden wissenschaftlicher Diskussionen und für viele weit darüber hinausgehende Orientierungshilfen von unschätzbarem Wert.

Besonderer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Carmen Keller-Hartmann, Frau Nicole Bouillon, Frau Bettina Wenzel, Frau Daniela Wittmann, Frau Angela Eser und Frau Christine von Hayn, ohne deren engagierte Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Eva Fisher, Herrn Michael Bender, Herrn Dr. Dieter Hofmann und Herrn PD Dr. Rüdiger Siekmeier bedanken, die mir jederzeit mit Lösungsvorschlägen und neuen Ideen zur Seite standen.

Für die Besorgung von Tumormaterial möchte ich mich bei Frau Dr. Franz (Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Klinik für Neurochirurgie) und Herrn Dr. Meurer (Stadtkrankenhaus Offenbach) bedanken. Die Versorgung mit Liquorproben verdanke ich Herrn PD Dr. Rüdiger Siekmeier (Technische Universität Dresden, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin) und Herrn Prof. Dr. Demisch (Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie).

Herrn Jörg Conte danke ich für das Einscannen der in dieser Arbeit gezeigten Fotos und Zeichnungen.

Zum Schluß möchte ich mich noch bei Frau Dr. Anne Tarrach, Herrn PD Dr. Rüdiger Siekmeier und meinem Mann, Uwe Altvater, für das unter Zeitdruck durchgeführte Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Für Uwe,  
Anita und Walter

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Lipoproteine allgemein .....	1
1.2	Apolipoprotein E .....	2
1.2.1	Aufbau des ApoE.....	2
1.2.2	Rezeptoren.....	3
1.2.3	Polymorphismus des ApoE .....	3
1.2.4	Sialisierung des ApoE .....	4
1.2.5	Katabolismus der Isoformen im Plasma .....	5
1.2.6	Auswirkung des ApoE-Polymorphismus im Blut – Hyperlipoproteinämie Typ III.....	6
1.2.7	Auswirkung des ApoE-Polymorphismus im Liquor - Morbus Alzheimer .	6
1.3	Apolipoprotein (a) .....	6
1.4	Apolipoprotein J.....	7
1.5	Apolipoproteinkomplexe im Liquor .....	8
1.6	Protein Tau.....	9
1.7	Multiple Sklerosis.....	10
2	AUFGABENSTELLUNG.....	12
3	MATERIAL UND METHODEN .....	13
3.1	Patienten .....	13
3.2	Material.....	13
3.3	Methoden .....	15
3.3.1	Zellkultur.....	15
3.3.1.1	Isolation der Zellen aus Tumorgewebe.....	15
3.3.1.2	RPMI-Medium .....	15
3.3.1.3	Hitzeinaktivierung des Kälberserums .....	16
3.3.1.4	Neural Cell Typing Set.....	16
3.3.2	Ultrazentrifugation .....	17
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	18
3.3.3.1	Stammlösungen .....	19
3.3.3.2	Trenngel .....	19
3.3.3.2.1	Leichte Lösungen .....	20
3.3.3.2.2	Schwere Lösung.....	20
3.3.3.3	Sammelgel .....	20
3.3.3.4	Probenvorbereitung.....	20
3.3.3.5	Elektrophoresebedingungen.....	21
3.3.4	Western Blot.....	21
3.3.4.1	Lösungen.....	21
3.3.4.2	Detektion des Blots.....	22
3.3.5	Lösungen.....	22
3.3.6	Proteinbestimmung mit der Biuret-Reaktion .....	23
3.3.6.1	Durchführung.....	23
3.3.6.2	Herstellung des Biuret-Reagenz.....	23
3.3.7	Stimulation der ApoE-Produktion .....	24

3.3.7.1	LDH-Bestimmung .....	24
3.3.7.2	Aktivieren von $\alpha_2$ -Makroglobulin* .....	24
3.3.7.3	ApoE-Genotypisierung .....	24
3.3.7.4	PCR-Kontroll-Agarose-Gel .....	25
3.3.7.5	Verdau .....	26
3.3.7.6	ApoE-Gel .....	26
3.3.7.6.1	Gelansatz .....	27
3.3.7.6.2	Laufbedingungen .....	27
3.3.8	Apo(a)-Phänotypisierung .....	28
3.3.8.1	Probenvorbereitung .....	28
3.3.8.2	Gelbereitung .....	28
3.3.8.3	Gellauf .....	28
3.3.8.4	Elektroblot .....	29
3.3.8.5	Blockieren .....	29
3.3.8.6	Detektion .....	29
3.3.8.7	Lösungen .....	29
3.3.9	Enzyme linked immunosorbent Assays = ELISA .....	30
3.3.9.1	ELISA-Aufbau .....	31
3.3.9.1.1	Apolipoprotein E .....	31
3.3.9.1.2	Apolipoprotein (a) .....	31
3.3.9.1.3	Apolipoprotein B .....	31
3.3.9.1.4	Apo(a)/E-Partikel .....	31
3.3.9.1.5	Apolipoprotein J .....	31
3.3.9.1.6	ApoJ/E-Partikel .....	31
3.3.9.2	ELISA-Durchführung .....	32
3.3.9.2.1	Coating und Blockieren der Platte .....	32
3.3.9.2.2	Probenauftrag und Durchführung .....	32
3.3.9.2.3	Probenauftrag beim ApoJ-Elisa .....	33
3.3.9.2.4	Auswertung .....	33
3.3.9.3	Protein Tau – Elisa .....	35
3.4	ApoE-Phänotypisierung .....	35
3.4.1	Typisierung von Plasmaproben .....	35
3.4.1.1	Probenvorbereitung .....	35
3.4.1.2	Gellauf und Blot .....	36
3.4.1.3	Detektion des Blots .....	36
3.4.2	Lösungen .....	36
3.4.3	Veränderungen für Liquorproben .....	37
3.4.4	Verdau der Proben .....	38
3.5	Kreuzimmunelektrophorese .....	39
3.5.1	Ansatz .....	39
3.5.2	Gellauf .....	39
3.5.3	Entwicklung und Färbung des Gels .....	40
3.5.4	Lösungen .....	40
3.5.5	Konzentration der Antikörper .....	40
3.6	Liquorparameter .....	41
3.6.1	Reiber-Quotienten .....	41
3.6.2	Nachweis oligoklonaler Immunglobuline im Liquor durch isoelektrische Fokussierung .....	42
3.7	Statistische Methoden .....	43
3.7.1	Chi <sup>2</sup> -Test für die CxR-Kontingenztafel .....	43
3.7.2	Haldane-Dawson-Test .....	44

3.7.3	Kruskal-Wallis.....	44
4	<b>ERGEBNIS.....</b>	<b>45</b>
4.1	Astrozyten .....	45
4.1.1	Astrozytenisolation .....	45
4.1.2	Nachweis des ApoE in den Astrozyten.....	45
4.2	Apo(a)-Typisierung in Serum und Liquor.....	49
4.3	Liquoruntersuchungen.....	51
4.3.1	ApoE-Phänotypen .....	52
4.3.2	Konzentrationsmessung einzelner Apolipoproteine im Liquor .....	53
4.3.2.1	ApoE-Konzentration .....	53
4.3.2.2	ApoJ-Konzentration .....	56
4.3.2.3	Apo(a)-Konzentration .....	58
4.3.3	Entdeckung von Apolipoprotein-Partikeln im Liquor .....	60
4.3.3.1	Der Apo(a)/E-Partikel .....	63
4.3.3.2	Der ApoJ/E-Partikel .....	63
4.3.4	Konzentrationsmessungen der Apolipoprotein-Partikel des Liquors ...	64
4.3.4.1	ApoJ/E-Konzentration.....	64
4.3.4.2	Apo(a)/E-Konzentration .....	67
4.4	Kombination verschiedener Liquorparameter.....	69
4.4.1	ApoJ gegen ApoJ/E.....	69
4.4.2	ApoE gegen ApoJ/E .....	70
4.4.3	ApoE gegen Apo(a)/E.....	71
4.4.4	Apo(a) gegen Apo(a)/E.....	72
4.4.5	ApoJ/E- und Apo(a)/E-Partikel .....	73
4.5	Tau-Protein.....	73
4.6	Serumuntersuchungen .....	76
4.6.1	ApoE-Konzentration im Serum .....	76
4.6.2	Apo(a)-Konzentration im Serum .....	77
4.7	Vergleich Liquor – Serum .....	78
4.7.1	Apolipoprotein E .....	78
4.7.2	Apolipoprotein (a) .....	80
4.8	Posttranslationale Prozessierung des Apolipoprotein E .....	80
4.9	Abbauprozesse beim Apolipoprotein E.....	83
5	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
5.1	Astrozyten .....	86
5.2	Apo(a)-Typisierung .....	87
5.3	Liquorparameter .....	87
5.3.1	ApoE-Nachweis in den Astrozyten .....	88
5.3.2	ApoE-Phänotyp .....	88
5.3.3	Konzentrationsmessung einzelner Apolipoproteine des Liquors .....	88
5.3.3.1	ApoE-Konzentration .....	88
5.3.3.2	ApoJ-Konzentration .....	89
5.3.3.3	Apo(a)-Konzentration .....	89
5.3.4	Apolipoproteinpartikel im Liquor .....	90
5.3.4.1	ApoJ/E-Konzentration.....	90
5.3.4.2	Apo(a)/E-Konzentration .....	91

5.4	Kombination verschiedener Liquorparameter .....	92
5.5	Protein Tau .....	92
5.6	Serumuntersuchungen .....	93
5.6.1	ApoE-Konzentration .....	93
5.6.2	Apo(a)-Konzentration .....	93
5.7	Vergleich Liquor – Serum .....	93
5.7.1	Apolipoprotein E .....	94
5.7.2	Apolipoprotein (a) .....	94
5.8	Posttranslationale Prozessierung des Apolipoprotein E .....	95
5.9	Abbauprozesse des Apolipoproteins E .....	95
5.10	Abschlußbetrachtung .....	96
5.10.1	Apolipoproteine des Liquors .....	96
5.10.2	Apo(a)/E- und ApoJ/E-Partikel .....	97
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	100
7	LITERATUR .....	102



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Apolipoproteine .....	1
Tabelle 2: ApoE-Phänotypen.....	4
Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der Phänotypen (Utermann 1987) .....	4
Tabelle 4: Häufigkeiten der ApoE-Allele (Utermann 1987) .....	4
Tabelle 5: Untereinheiten des ApoJ (H. de Silva et al. 1990) .....	7
Tabelle 6: Spezifität der im Neural Cell Typing Set beinhalteten monoklonalen Antikörper (Boehringer Mannheim) .....	16
Tabelle 7: Angaben zur Ultrazentrifugation .....	17
Tabelle 8: Zu erwartende Fragmente nach dem Cfo I-Verdau (Hixon et al. 1990) .....	26
Tabelle 9: Verwendete Enzyme zum Abspalten der Sialobanden des ApoE.....	38
Tabelle 10: Konzentration der Antikörper in der Kreuzimmunelektrophorese.....	40
Tabelle 11: Primärkulturen aus Tumorgewebe .....	45
Tabelle 12: ApoE-Phänotypen (Literaturwerte: Utermann 1987).....	52
Tabelle 13: Apo E – Allelverteilung (Literaturwerte: Utermann 1987) .....	52
Tabelle 14: ApoE-Konzentrationsverteilung .....	53
Tabelle 15: Statistische Auswertung der ApoE-Konzentrationsverteilung .....	54
Tabelle 16: ApoJ-Konzentrationsverteilung .....	56
Tabelle 17: Statistische Auswertung der ApoJ-Konzentrationen nach ApoE- Phänotyp sortiert.....	56
Tabelle 18: Apo(a)-Konzentrationsverteilung.....	58
Tabelle 19: Statistische Auswertung der Apo(a)-Konzentrationsverteilung .....	59
Tabelle 20: ApoJ/E-Konzentrationsverteilung.....	64
Tabelle 21: Statistische Auswertung der ApoJ/E-Konzentration nach ApoE- Phänotyp sortiert.....	65
Tabelle 22: Apo(a)/E-Konzentrationsverteilung .....	67
Tabelle 23: Statistische Auswertung der Apo(a)/E-Konzentrationsverteilung.....	68
Tabelle 24: Anthropometrische Daten und Laborwerte der untersuchten Patientengruppen.....	74
Tabelle 25: ApoE-Konzentrationsverteilung (Utermann 1987) nach ApoE-Phänotyp sortiert.....	76
Tabelle 26: Apo(a)-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert.....	77
Tabelle 27: Statistische Auswertung der Apo(a)–Konzentrationsverteilung im Serum .....	77
Tabelle 28: Statistische Auswertung des Differenzkoeffizienten zwischen Liquor und Serum .....	79
Tabelle 29: Schwankungen des Differenzkoeffizienten beim Apolipoprotein E ....	79
Tabelle 30 : Schwankungen des Differenzkoeffizienten beim Apolipoprotein (a) in Abhängigkeit von Apolipoprotein E-Phänotyp .....	80

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sekundärstruktur des ApoE (Wernette-Hammond et al. 1989).....	3
Abbildung 2: PCR-Kontrollgel .....	25
Abbildung 3: ApoE-Genotypisierung.....	27
Abbildung 4: Sandwich-ELISA: (a) symmetrisch, (b) asymmetrisch (D.M. Kemeny 1994).....	30
Abbildung 5: ELISA-Standardkurve .....	34
Abbildung 6: Blot .....	39
Abbildung 7: Liquor/Serum-Quotientendiagramm für IgG (Reiber et al. 1987) ....	42
Abbildung 8: ApoE-Lokalisierung im Astrozyten.....	46
Abbildung 9: ApoE-Genotypisierung der Astrozyten-Zelllinien .....	48
Abbildung 10: ApoE-Blot .....	49
Abbildung 11: Apo(a)-Typisierung von Serum.....	50
Abbildung 12: Konzentrationsverteilung des ApoE.....	55
Abbildung 13: ApoE-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert.....	55
Abbildung 14: Konzentrationsverteilung des ApoJ .....	57
Abbildung 15: ApoJ-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert .....	58
Abbildung 16: Apo(a)-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert....	60
Abbildung 17: Aufbau der Partikel-ELISAs .....	61
Abbildung 18: Versuchsaufbau bei der Kreuzimmunelektrophorese .....	62
Abbildung 19: Mögliches Ergebnis der Kreuzimmunelektrophorese.....	62
Abbildung 20: Kreuzimmunelektrophorese des Apo(a)/E-Partikels .....	63
Abbildung 21: Kreuzimmunelektrophorese des ApoJ/E-Partikels.....	64
Abbildung 22: ApoJ/E-Konzentrationsverteilung.....	66
Abbildung 23: ApoJ/E-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert....	66
Abbildung 24: Apo(a)/E-Konzentrationsverteilung .....	68
Abbildung 25: Apo(a)/E-Konzentrationen nach dem ApoE-Phänotyp sortiert.....	69
Abbildung 26: Konzentrationsabhängigkeit des ApoJ vom ApoJ/E .....	70
Abbildung 27: Konzentrationsabhängigkeit des ApoJ/E vom ApoE .....	71
Abbildung 28: Konzentrationsabhängigkeit zwischen ApoE und Apo(a)/E .....	72
Abbildung 29: Konzentrationsabhängigkeit zwischen Apo(a) und Apo(a)/E .....	72
Abbildung 30: Konzentrationsabhängigkeit zwischen dem ApoJ/E- und dem Apo(a)/E-Partikel.....	73
Abbildung 31: Darstellung des Differenzkoeffizienten zwischen Liquor und Serum beim Apolipoprotein E.....	78
Abbildung 32: Blot einer isoelektrischen Fokussierung des Apolipoprotein E aus Liquor und Serum mit anschließender Anti-ApoE-Detektion.....	81
Abbildung 33: Densitometerscan des Blots .....	82
Abbildung 34: Blot nach Verdau mit Tyrosin-Phosphatase bzw. Sulfatase .....	83
Abbildung 35: ApoE-Phänotypisierung mit Doppelbanden .....	84
Abbildung 36: Auftrennung der ApoE-Doppelbanden.....	84
Abbildung 37: Mögliches Aussehen des Apolipoprotein-Partikels im Liquor .....	98

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Ak	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
ApoE 2/2	ApoE-Phänotyp 2/2
ApoE 3/2	ApoE-Phänotyp 3/2
ApoE 3/3	ApoE-Phänotyp 3/3
ApoE 4/2	ApoE-Phänotyp 4/2
ApoE 4/3	ApoE-Phänoyp 4/3
ApoE 4/4	ApoE-Phänotyp 4/4
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
CSF	Cerebrospinal fluid
D	Dalton
$d_{20^{\circ}\text{C}}$	Dichte bei 20°C
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
g	Schwerkraftskonstante
GalC	Galactocerebroxid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HDL	High Density Lipoproteins
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen
HRP	Horse Radish Peroxidase
HTGL	Hepatische Triacylglycerinlipase
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kbp	Kilobasenpaare

kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LCAT	Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoproteins
Lp	Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoprotein Lipase
LRP	LDL-related protein
M	Molarität (mol/l)
mA	Milliampere
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
MS	Multiple Sklerose
MW	Molekulargewicht
N	Normalität
n	Anzahl
Na	Natrium
NaBr	Natriumbromid
NF160	Neurofilament 160 kD
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OP	Operation
OPD	1,2-Phenylendiamin
p	Wahrscheinlichkeit
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
PLG	Plasminogen
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PO	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-Alb	Liquor/Serum-Quotient Albumin
Q-IgG	Liquor/Serum-Quotient IgG
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	revolutions per minute (= Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
Sarcosyl	N-Lauroylsarcosine
SDS	Natrium-dodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris buffer-Saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thimerosal	Ethylmercurithiosalicylic acid
Thr <sup>194</sup>	Threonin an Position 194 der Aminosäurekette des Proteins
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	TBS + Tween
Tween 20	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
vs	versus
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZU	Ultrazentrifugation

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipoproteine allgemein

Lipoproteine sind wasserlösliche, makromolekulare Komplexe aus Lipiden und Proteinen. Der Lipoprotein-Metabolismus ist ein komplexer und höchst zielgerichteter Prozeß, der die Verteilung und den Transport von exogenen und endogenen Lipiden (freies und verestertes Cholesterin, Triacylglycerine und Phospholipide) zu den verschiedenen Geweben des Körpers ermöglicht.

Der Proteinanteil der Lipoproteine setzt sich aus den Apolipoproteinen zusammen. Er ist heterogen und von großer Bedeutung für die Regulation des Lipoprotein-Stoffwechsels. Neben ihrer Funktion als Strukturbestandteil der Lipoproteine vermitteln die Apolipoproteine die Aufnahme von Lipoproteinen durch spezifische Rezeptoren (siehe Tabelle 1). Desweiteren modulieren sie die Aktivitäten der am intraplasmatischen Stoffwechsel der Lipoproteine beteiligten Enzyme.

Name	MW [kD]	Syntheseort	Funktion
<b>Apo AI</b>	28,331	Darm, Leber	LCAT-Aktivierung, Rezeptorbindung
<b>Apo AII</b>	8,707	Leber	Cofaktor der HTGL und LCAT
<b>Apo AIV</b>	46,000	Darm	LCAT-Aktivierung
<b>Apo (a)</b>	350-800	Leber, Gehirn, Testes	Unbekannt, evtl. Regulation der Fibrinolyse
<b>Apo B-100</b>	550,000	Leber	Rezeptorbindung
<b>Apo B-48</b>	265,000	Darm	Strukturprotein
<b>Apo CI</b>	6,550	Leber	Cofaktor der LCAT und LPL
<b>Apo CII</b>	8,837	Leber	Aktivierung der LPL
<b>Apo CIII</b>	8,240	Leber	Inhibitor der LPL und Remnant-Clearance
<b>Apo D</b>	32,500	?	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
<b>Apo E</b>	34,145	Leber, Gehirn	Rezeptorbindung, LCAT-Aktivierung
<b>Apo J</b>	70,000	Gehirn (Neuron, Astrozyt)	Lipidtransport, Sekretion, Membranrecycling, Spermatogenese, Modulation der Komplementaktivität

Tabelle 1: Apolipoproteine

Im Gehirn sind die Apolipoproteine an degenerativen und regenerativen Prozessen des peripheren und zentralen Nervensystems sowie bei der Entwicklung des Gehirns im An- und Abtransport der benötigten Fette beteiligt. Roheim et al. zeigten bereits 1979, daß die Apolipoproteine AI, E, CII und CIII im Liquor vorhanden sind. Im Liquor sind die Apolipoproteine bevorzugt in Lipoproteinen zu finden. Bereits 1993 ist das Apo(a) im Liquor cerebrospinalis beobachtet worden (Tomlinson et al. 1989). Von Borghini et al. sind 1995 fünf Apolipoproteine (ApoAI, AIV, D, E und J) im Gehirn nachgewiesen worden.

## **1.2 Apolipoprotein E**

### **1.2.1 Aufbau des ApoE**

Das primär in der Leber, aber auch in anderen Geweben wie Nieren, Nebennieren, Milz und Gehirn synthetisierte Apolipoprotein E kommt in verschiedenen Lipoproteinen wie Chylomikronen, VLDL, IDL und HDL<sub>2</sub> vor (Groß et al. 1988). Es ist Ligand des LDL-Rezeptors und steuert so den Transport von Triglyceriden und Cholesterol von den Lipoproteinen zu den Zellen (reverser Cholesteroltransport). Das Gen für ApoE liegt auf Chromosom 19 in enger Nachbarschaft zu den Genen für ApoCI und ApoCII sowie dem Gen für den LDL-Rezeptor (Davignon et al. 1988). ApoE besitzt eine Molmasse von 34 145 D und besteht aus 299 Aminosäuren (Rall et al. 1982). Es liegt in den drei Isoformen E2, E3 und E4 vor (Boehrwinke et al. 1988; Weisgraber et al. 1981), die sich in der Primärstruktur unterscheiden. Die Sekundärstruktur von Apolipoprotein E besteht zu 62 % aus  $\alpha$ -Helix, zu 9 % aus  $\beta$ -Faltblatt, zu 11 % aus  $\beta$ -turns und zu 18 % aus random coils. Dabei sind die  $\alpha$ -helicalen Teile für die Bindung der Lipide verantwortlich (Davignon et al. 1988).

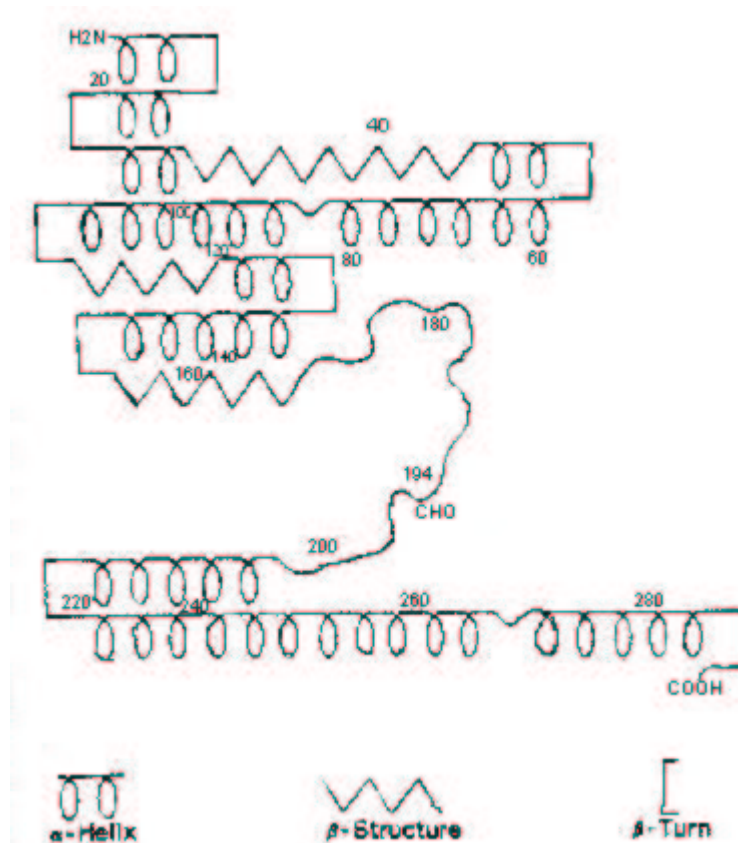


Abbildung 1: Sekundärstruktur des ApoE (Wernette-Hammond et al. 1989)

### 1.2.2 Rezeptoren

ApoE ist Ligand verschiedener endozytischer Rezeptoren aus der LDL-Rezeptor-Familie (Herz 1993), u. a. des Remnant-Rezeptors (ApoE-Rezeptor), des LDL-Rezeptors, auch B:E-Rezeptor genannt, des LRP-Rezeptors, des Glycoprotein 330-Rezeptors (Megalin) sowie den hauptsächlich im Gehirn vorkommenden Apolipoprotein E Rezeptors 2 (ApoER2) (Kim et al. 1996). Der Remnant-Rezeptor bindet Chylomikronen-Remnants und befindet sich hauptsächlich in der Leber. Der LDL-Rezeptor bindet hauptsächlich LDL, aber auch Chylomikronen, VLDL und IDL. Er kommt ebenfalls in der Leber aber auch an der Blut-Hirn-Schranke vor. Der Glycoprotein 330-Rezeptor befindet sich an der Blut-Hirn-Schranke (Martel et al. 1997). Er bindet u.a. Apolipoprotein J und ermöglicht diesem so den Transport über die Blut-Hirn-Schranke (Martel et al. 1997). Der Apolipoprotein E Rezeptor 2 ähnelt im Aufbau dem LDL-Rezeptor und dem ApoE-Rezeptor. Er kommt bevorzugt im Gehirn aber auch in der Placenta und den Testis vor (Kim et al. 1996).

### 1.2.3 Polymorphismus des ApoE

Die drei Isoformen des Apolipoprotein E, E2, E3 und E4, unterscheiden sich, wie schon oben erwähnt, in ihrer Primärstruktur. Das Apolipoprotein E2 besitzt an den Positionen 112 und 158 der Proteinkette die Aminosäure Cystein, ApoE3 an



Position 112 Cystein und an Position 158 Arginin. Während ApoE4 auf beiden Positionen Arginin besitzt. Die entsprechenden Allele werden als  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  und  $\epsilon 4$  bezeichnet (Davignon et al. 1988). Dies bedeutet, daß das Apolipoprotein E2 zwei und E3 eine freie Sulfhydrylgruppe besitzt, die in der Lage sind, mit anderen Apolipoproteinen Disulfidbrücken zu bilden (Innerarity et al. 1978).

<b>Apolipoprotein</b>	<b>Pos. 112</b>	<b>Pos. 158</b>	<b>Ladung</b>
<b>E3</b>	Cystein	Arginin	+1
<b>E2</b>	Cystein	Cystein	+2
<b>E4</b>	Arginin	Arginin	0

*Tabelle 2: ApoE-Phänotypen*

Die daraus resultierenden ApoE-Phänotypen sind in der kaukasischen Normalbevölkerung unterschiedlich häufig anzutreffen.

<b>Phänotyp</b>	<b>Häufigkeit</b>
E3/3	59,8 %
E4/3	22,9 %
E3/2	12,0 %
E4/2	1,5 %
E4/4	2,8 %
E2/2	1,0 %

*Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der Phänotypen (Utermann 1987)*

Aus dieser Häufigkeitsverteilung läßt sich die relative Häufigkeit der Allele in der kaukasischen Bevölkerung ermitteln:

$\epsilon 2$	$\epsilon 3$	$\epsilon 4$
0,077	0,773	0,150

*Tabelle 4: Häufigkeiten der ApoE-Allele (Utermann 1987)*

### 1.2.4 Sialisierung des ApoE

Das ApoE kann durch eine posttranslationale Modifikation variabel sialisert werden. Durch diese Form der Glykosilierung wird N-Acylneuraminsäure (Sialinsäure) an Kohlenhydratketten in Glykoproteinen oder Glykolipiden gehängt. Mit Hilfe einer Neuraminidase kann man die terminalen  $\alpha 2 \rightarrow 3$ ,  $\alpha 2 \rightarrow 6$  und  $\alpha 2 \rightarrow 8$  Bindungen, mit denen die N-Acylneuraminsäure an N-Acetylhexosamine und N- oder O-acetylierte Neuraminyreste in Oligosacchariden, Glykolipiden und Glykoproteinen gebunden ist, hydrolysieren. Bei der Sialisierung des ApoE treten

aber 80 bis 85 % des ApoE als Asialoform auf (Zannis et al. 1981). Die Mono- und Disialoformen sind Minorformen. Neu synthetisiertes Plasma-ApoE ist mit bis zu sechs Sialinsäuren stark sialisiert (Zannis et al. 1981b, Wernette-Hammond et al. 1989). Trotzdem sind 80 – 85% des Plasma-ApoE nicht sialisiert (Zannis et al. 1981). Das Liquor-ApoE ist im Vergleich zum Plasma-ApoE immer stärker sialisiert. Der Unterschied zwischen neusynthetisiertem und „älterem“ Plasma-ApoE deutet darauf hin, daß diese Glykosylierung eine Rolle in der zellulären Prozessierung spielt. Für die Sekretion des Apolipoprotein E ist seine Sialoform nicht entscheidend (Wernette-Hammond et al. 1989). In diese Arbeit beschrieben Wernette-Hammond und Kollegen, daß die Glykosylierung über einen O-linked Zucker an Thr<sup>194</sup> erfolgt. Dabei werden die Aminozucker Galactosamin und Glucosamin an das ApoE gebunden.

### 1.2.5 Katabolismus der Isoformen im Plasma

Die Fähigkeit der ApoE-Isoformen an Rezeptoren zu binden, ist unterschiedlich stark ausgeprägt. Man bezeichnet das Apolipoprotein E3 als die Normalform. Seine Bindungsfähigkeit an Rezeptoren und Lipoproteine ist optimal an die im Stoffwechsel herrschenden Bedingungen angepaßt. Während ApoE2 die geringste Affinität besitzt, binden ApoE3 und ApoE4 in vitro etwa gleich stark (Davignon et al. 1988, Gregg et al. 1988). Bei Apo E2 homozygoten Personen kommt es infolge der schwächeren Bindung an Leberrezeptoren zu einem Anstieg der Chylomikronen-Remnants und der IDL. In seltenen Fällen resultiert daraus eine Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson. Die LDL, das ApoB-100 und auch das Cholesterin sind bei Apo E2-Homozygoten vermindert (Davignon et al. 1988, Gregg et al. 1988). Durch die verringerte Aufnahme von Chylomikronen-Remnants und IDL in die Hepatozyten entsteht ein Defizit an intrazellulärem Cholesterin, so daß die Zahl der LDL-Rezeptoren der Leber erhöht wird. Dies wiederum führt zu einer vermehrten Aufnahme von LDL. Auch die Umwandlung von IDL in LDL ist aus unbekannten Gründen verzögert. Apo E2 wird selbst langsamer katabolisiert als die anderen Isoformen des ApoE, so daß die Serumkonzentration von ApoE am höchsten ist, wenn Apo E2 homozygot vorliegt (Davignon et al. 1988, Gregg et al. 1988).

Bei der Isoform Apo E4 wirkt sich das geänderte Bindungsverhalten anders aus. In den Leberzellen steht ausreichend Cholesterin zur Verfügung, so daß die LDL-Rezeptoren herunterreguliert sind. Es wird weniger LDL-Cholesterin aus dem Plasma aufgenommen, was zu einem Anstieg des LDL-Cholesterins und des ApoB führt. Schließlich wird durch die höhere Rezeptoraffinität das ApoE4 am schnellsten katabolisiert. Dabei ist es wichtig anzumerken, daß unter in vivo

Bedingungen Apo E4 schneller als Apo E3 katabolisiert wird. Unter in vitro Bedingungen ist kein Unterschied in der Geschwindigkeit der Metabolisierung festzustellen (Utermann et al. 1984, Assmann et al. 1984).

### **1.2.6 Auswirkung des ApoE-Polymorphismus im Blut – Hyperlipoproteinämie Typ III**

Klinisch relevant wird der ApoE-Polymorphismus bei der Entstehung der Hyperlipoproteinämie Typ III nach Fredrickson. Sie entwickelt sich ausschließlich bei Individuen, die Apo E2 homozygot sind (Davignon et al. 1988). Wegen des geringeren LDL-Cholesterins sind diese Personen sogar vor atherosklerotischen Veränderungen im Vergleich zu homozygoten Trägern des  $\epsilon$ 4-Allels geschützt (Davignon et al. 1988). Bei einem geringen Teil der Apo E2 homozygoten Personen erreichen die IDL und die Chylomikronen-Remnants extrem hohe Werte, so daß eine ausgeprägte Hypertriglyceridämie und Hypercholesterinämie entsteht (Davignon et al. 1988). Bei dieser Fehlsteuerung des Fettstoffwechsels ist die LDL-Cholesterinkonzentration aber niedrig. Ausschlaggebend für die Manifestation der Hyperlipoproteinämie vom Typ III sind neben der obligaten Anwesenheit von ApoE2 zusätzliche familiäre, genetische oder Umweltfaktoren, wobei Systemerkrankungen wie Hypothyreose, Diabetes mellitus u.ä. eine bedeutende Rolle spielen (Davignon et al. 1988, Gregg et al. 1988).

### **1.2.7 Auswirkung des ApoE-Polymorphismus im Liquor - Morbus Alzheimer**

Die Funktionen des ApoE im Gehirn sind im Vergleich zu anderen Apolipoproteinen des Gehirns bisher am besten untersucht. Es ist an den neurofibrillären Tangles beteiligt und reagiert mit dem neurofibrillären  $\beta$ -Amyloidprotein in den senilen Plaques des Morbus Alzheimer (Poirier et al. 1991; Schmechel et al. 1993). Es scheint auch eine wichtige Rolle bei der Wiederverteilung der Lipide während der Entwicklung oder nach Verletzungen des Gehirns zu spielen (Boyles et al. 1989, Mahley et al. 1988). So ist es bei diesen Prozessen an der Mobilisierung und Redistribution des Cholesterins zur Reparatur, Wachstum und zur Aufrechterhaltung von Myelin und neuronalen Membranen beteiligt. Darüberhinaus gibt es eine signifikante Assoziation zwischen ApoE4 und sporadischem Morbus Alzheimer (Hahne et al. 1997; Lehtimäki et al. 1995).

## **1.3 Apolipoprotein (a)**

Lipoprotein (a) wurde zuerst 1963 von Berg als „genetische Variante“ der LDL beschrieben. Die Struktur des Lp(a) setzt sich aus Apolipoprotein (a) und einem

dem LDL ähnlichen Lipoprotein zusammen (Fless et al. 1986; Utermann et al. 1972). Lp(a) und LDL haben einen nahezu gleich zusammengesetzten Lipidanteil (Jürgens et al. 1975). Das Lipid:Protein-Verhältnis ist im Lp(a) mit ungefähr 2:1 niedriger als im LDL (Gaubatz et al. 1983). Folglich besitzt Lp(a) eine geringfügig höhere Dichte als das LDL (Jürgens et al. 1975).

Aufgrund des hohen Neuraminsäuregehaltes (Ehnholm et al. 1972) wandert Lp(a) in Agarosegelen schneller als das LDL (=  $\beta$ -Lipoproteine). Man bezeichnete es deshalb auch als »pre- $\beta_1$ -Lipoprotein (Rider et al. 1970).

Das für das LDL typische ApoB-100 und das Apo(a) sind wahrscheinlich durch eine oder mehrere Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Armstrong et al. 1985; Gaubatz et al. 1983; Utermann et al. 1983). In diesem Molekül befindet sich Apo(a) an der Oberfläche des Lp(a) (Armstrong et al. 1985; Fless et al. 1984). Apo(a) enthält 12 bis 51 homologe Domänen zu »kringle« IV und eine weitere homologe Domäne zu »kringle« V des humanen Plasminogens (McLean et al. 1987b; Eaton et al. 1987). Daraus resultieren eine starke inter-individuelle Größenflexibilität des Apo(a) (Groß et al. 1990; März et al. 1985; McLean et al. 1987; Lackner et al. 1991), die zu bisher 34 bekannten Protein-Isoformen führt (Marcovina et al. 1993). Das Molekulargewicht schwankt zwischen 350 und 800 kD. Das Gen des Apo(a) ist auf dem langen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert (Murray et al. 1985, Murray et al. 1987, Swisshelm et al. 1985). Hauptsyntheseort ist die Leber, aber auch im Gehirn und in den Testes wird Apo(a) synthetisiert (Tomlinson et al. 1989).

#### 1.4 **Apolipoprotein J**

Apolipoprotein J (Clusterin bzw. SP-40) ist ein 70 kD großes, heterodimeres Glycoprotein. Es bestehend aus zwei disulfid-gebundenen ungefähr 40 kD großen Untereinheiten ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette). Das ApoJ $\alpha$  ist 34 bis 36 kD und das ApoJ $\beta$  36 bis 39 kD groß (Matsubara et al. 1995). Beide Untereinheiten lassen sich deglykosilieren. Dabei wurde festgestellt, daß ihre Masse zu ca. 30 % aus Kohlenhydraten besteht (siehe Tabelle 5).

Name	M (als Glykoprotein)	M (nach Deglykosylierung)
<b>ApoJ<math>\alpha</math></b>	34 bis 36 kD	24 kD
<b>ApoJ<math>\beta</math></b>	36 bis 39 kD	28 kD

Tabelle 5: Untereinheiten des ApoJ (H. de Silva et al. 1990)

Die Aminosäurezusammensetzung der beiden Untereinheiten variiert kaum. Der Unterschied der ApoJ-Untereinheiten liegt im Bereich der ersten dreißig Aminosäurereste (H. de Silva et al. 1990). Beide Untereinheiten entstehen durch posttranslationale Proteolyse zwischen Arg<sup>205</sup> und Ser<sup>206</sup> aus einem gemeinsamen 50 kD großen Translationsprodukt (Matsubara et al. 1995). Anschließend werden verschiedene Kohlenhydrate angelagert. Dies führt zu den starken Schwankungen innerhalb der Größe und des Gewichts der einzelnen Untereinheiten. ApoJ $\alpha$  und ApoJ $\beta$  haben die gleiche Aminosäurezusammensetzung, bis auf die Unterschiede im amino-terminalen Ende (de Silva et al. 1990).

Das Gen für ApoJ liegt auf Chromosom 8. In einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel lassen sich zwei Formen des ApoJ nachweisen. Das ApoJ liegt als Monomer von 70kD Größe und als Dimer von 160kD (Martel et al. 1997) vor.

ApoJ lässt sich sowohl im Plasma als auch im Liquor nachweisen. Dabei ist die Plasmakonzentration mit 35 – 105  $\mu\text{g/ml}$  ca. 15x so hoch wie die Liquorkonzentration von 1,2 - 3,6  $\mu\text{g/ml}$  (Matsubara et al. 1995).

Das ApoJ erfüllt die unterschiedlichsten Aufgaben wie Lipidtransport, Sekretion, Membranrecycling, Spermatogenese und Modulation der Komplementaktivität. Es wird in den Neuronen und den Astrozyten synthetisiert und kann die Blut-Hirn-Schranke über den Glycoprotein 330-Rezeptor passieren (Martel et al. 1997). ApoJ ist ein bedeutender Ligand für das bei Morbus Alzheimer wichtige lösliche (lösliches) Amyloid beta (= sAmyloid $\beta$ ) und dient diesem wahrscheinlich als Carrier. Freies ApoJ oder an sAmyloid $\beta$  gebundenes ApoJ kann von dem Glycoprotein 330-Rezeptor aufgenommen werden. Dabei wird gebundenes ApoJ bevorzugt. Bei Morbus Alzheimer Patienten ist die Liquor-Konzentration des ApoJ leicht erhöht (1,8 - 4,4  $\mu\text{g/ml}$ ). Diese Erhöhung ist aber nicht signifikant (Matsubara et al. 1995). Obwohl sich ApoJ mit sAmyloid $\beta$  verbinden kann, vermag es aber nicht die bereits gebildeten Aggregationen von Amyloid $\beta_{1-40}$ , die im Gehirn von Alzheimer Patienten auftreten, aufzulösen (Matsubara et al. 1995). Amyloid $\beta_{1-40}$  ist ein Spaltprodukt des Amyloid $\beta$ , das bevorzugt in den senilen Plaques bei Patienten mit Morbus Alzheimer zu finden ist.

## **1.5 Apolipoproteinkomplexe im Liquor**

Apolipoproteine treten im Körper selten als freie Einzelpartikel auf, sondern sind vielmehr Bestandteil von Lipoproteinen. Die im Serum auftretenden Lipoproteine HDL, VLDL, LDL und IDL sind Idealbeispiele für diese Partikelbildung. Ihre

Funktionen sind bereits lange bekannt. Trotzdem gibt es auch im Serum noch Lipoproteine oder auch Partikel, die Apolipoproteine enthalten, deren Aufgabe aber unbekannt ist.

Roheim et al. haben bereits 1965 postuliert, daß die Apolipoproteine im Blut nicht nur als Teil eines Lipoproteinpartikels, sondern auch als „freie“ Apolipoproteine vorkommen.

Vom Lp(a) sind im Serum zwei verschiedene Unterformen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von ApoE beschrieben worden. Dabei enthält der Lipoproteinpartikel mindestens 9 bis maximal 22 ApoE. Dies bedeutet, daß Lp(a) eine Mischung verschiedener Partikel mit unterschiedlicher Apolipoprotein-Zusammensetzung darstellt. Wahrscheinlich werden die Apo(a) enthaltenden Lipoproteine, die sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden, über unterschiedliche Synthesewege hergestellt. Da das ApoE in diesen Verbindungen die Bindungskapazität des Lipoproteins moduliert, besitzen die Subpopulationen auch unterschiedliche katalytische Wege. Ca. 20% der Apo(a) enthaltenden Lipoproteine enthalten auch ApoE (Bard et al. 1992).

Die bisher veröffentlichten Arbeiten beschreiben verschiedene Apolipoproteine im Liquor. Im Liquor liegen die Apolipoproteine AI, E, CI und CIII in Form von Lipoproteinen vor, die dem Plasma HDL ähnlich sind (Roheim et al. 1979). Borghini et al. wiesen 1995 im Liquor folgende Apolipoproteine (ApoE, ApoAI, ApoAIV, ApoD, ApoJ) nach. Auch ihr Auftreten in Partikeln wurde bereits beschrieben (Borghini et al. 1995). Doch der genaue Aufbau und die Aufgabe dieser Partikel sind bisher nicht bekannt. 1989 wurde von Tomlinson et al. das Vorkommen von Apo(a) im Liquor beschrieben.

In der Arbeit von Borghini et al. 1995 werden drei Lipoproteine in Liquor beschrieben. CSF-LpAI ( $20,1 \pm 3,8$  nm) besteht hauptsächlich aus ApoAI und enthält außerdem ApoD, E und J. CSF-LpE besitzt die gleiche Größe wie das erste Lipoprotein ( $20,1 \pm 3,8$  nm). Doch setzt es sich zum größten Teil aus ApoE zusammen. Weiter findet man noch geringe Mengen an ApoAI, AIV, D und J. Das dritte Lipoprotein des Liquors besteht zu über 62 % aus ApoAIV und ist  $32,0 \pm 6,8$  nm groß.

## **1.6 Protein Tau**

Protein Tau stellt ein neuronales Strukturprotein des axonalen mikrotubulären Netzwerks dar. Das normalerweise intrazellulär lokalisierte Protein kommt

physiologischerweise nur in geringen Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis vor; im Serum ist es nicht nachweisbar (Arai et al. 1995). Entsprechend gehen Prozesse, die zu einer Schädigung der Nervenzellen führen (z.B. Entzündungen und neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose), mit einer Zunahme der Konzentration von Protein Tau im Liquor einher. Dieser Konzentrationsanstieg ist unabhängig von der Dauer der Erkrankung, dem ApoE-Genotyp und dem klinischen Stadium der Erkrankung. Die durchschnittliche Konzentration des Protein Tau im Liquor liegt bei  $9 \pm 4,5$  pg/ml. Dieser Wert steigt mit zunehmendem Lebensalter an (Arai et al. 1995). Im Laufe dieses Alterungsprozesses oder neurodegenerativer Erkrankungen sammelt sich phosphoryliertes Protein Tau im Liquor aufgrund des fortschreitenden Absterben der Neuronen an.

## **1.7 Multiple Sklerosis**

Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata) ist eine Krankheit der gemäßigten Zonen der Erde. So ist sie in Deutschland die häufigste organische Nervenerkrankung. Es erkranken meist Erwachsene zwischen dem 20. und 45. Lebensjahr und Frauen häufiger als Männer. Eine familiäre Häufung von Erkrankungen konnte man beobachten.

Bei der Multiplen Sklerose präsentieren die Astrozyten das "basische Markscheidenprotein" des ZNS. Dadurch werden die T-Lymphozyten aktiviert, die dann die Astrozyten und danach die Markscheiden zerstören (Roche Lexikon Medizin).

Es werden verschiedene Krankheitsursachen diskutiert:

a) Virusinfektion im Kindesalter

Dabei denkt man an einen pathologischen verzögerten Infektionsablauf eines ubiquitären Virus (z.B. Masern) oder an eine spezifische Infektion nach Art einer „Slow-Virus-Infektion“.

b) Neuroallergische Hypothese

Hier vermutet man als wesentliche pathogenetische Grundlage eine Autoimmunisation. Als wirksame Antigenkomponente im Hirngewebe wird dafür ein basisches Myelinprotein angesehen. Wobei dieser demyelinisierende Antikörper aber nicht für die MS spezifisch ist, sondern auch bei anderen Erkrankungen, die mit Untergang von Hirn- und Rückenmarksgewebe einhergehen, häufig nachzuweisen ist.

c) Genetische Faktoren

Bei MS-Kranken treten bestimmte Histokompatibilitätsantigene (HLA-Antigen A3 und B7 sowie das Merkmal HLA-DW2) signifikant häufiger auf als im Kontrollkollektiv.

d) Myelinvulnerabilität

Auch eine besondere Myelinverletzbarkeit, bedingt durch eine Störung des Myelinstoffwechsels, wird als Voraussetzung für die Entstehung der MS diskutiert.

Bei Personen mit MS treten in der weißen Substanz des gesamten ZNS multiple Entmarkungsherde mit wechselnder Größe auf. Um diese Plaques finden sich anfänglich Gefäßreaktionen. Später werden die Entmarkungsherde von Glia aufgefüllt, wodurch eine Verhärtung eintritt. Innerhalb dieser sklerosierten Herde bleiben die nackten, entmarkten Nerven meist erhalten. Auch die Nervenzellen selbst werden verschont.

Bei Liquoruntersuchungen haben einige Patienten eine leicht erhöhte Gesamteiweißkonzentration. Eine Vielzahl der Patienten hat eine relative Vermehrung der Gammaglobuline. Immunoэлектроphoretisch läßt sich eine signifikante Vermehrung der IgG, IgA und IgM feststellen. Die Gesamtzellzahl ist bei nicht ganz der Hälfte der Fälle leicht erhöht, während das Vorkommen von Plasmazellen bei den meisten Fällen beobachtet wird.



## 2 Aufgabenstellung

Zu Beginn dieser Arbeit sollte nachgewiesen werden, daß die Astrozyten im Gehirn das Apolipoprotein E synthetisieren. Da dieser Nachweis aufgrund der geringen Konzentration des ApoE im Zellüberstand schwierig war, wurden die weiteren Untersuchungen mit Liquor cerebrospinalis durchgeführt. So sollten die im Liquor vorkommenden Apolipoproteine, ApoE, ApoJ sowie Apo(a), charakterisiert und funktionelle Zusammenhänge aufgezeigt werden.

Im Serum sind die Apolipoproteine Bestandteile der Lipoproteine. Ihre Konzentrationen beeinflussen somit oftmals direkt den Fettstoffwechsel und damit die Gesundheit des Menschen. Da im Liquor keine vergleichbaren Lipoproteine existieren, stellte sich die Frage nach dem Vorkommen und der Aufgabe der Apolipoproteine. Die These, ob die Apolipoproteine im Liquor ebenfalls zusammen in Partikeln vorkommen, wurde hier untersucht. Über die Konzentration oder den Phänotyp der Apolipoproteine könnten Rückschlüsse auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Multiple Sklerose gezogen werden.

Bekannt ist, daß die ApoE-Phänotypvariante 4/4 gehäuft bei Patienten mit Morbus Alzheimer und die Phänotypvariante ApoE 2/2 gehäuft bei Hundertjährigen zu finden ist. Dies zeigt, wie der Phänotyp eines Apolipoproteins eine Erkrankung bzw. einen Zustand des betreffenden Körpers beeinflussen kann.

Da sich solche Zusammenhänge erst nachweisen lassen, wenn der Normalwert des betreffenden Apolipoproteins bekannt ist, wurde in dieser Arbeit der Standardwert für die untersuchten Parameter ApoE, Apo(a), ApoJ sowie Apo(a)/E und ApoJ/E bestimmt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der diagnostischen Wertigkeit der Bestimmung von Protein Tau im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit nicht laborchemisch zu sicherndem Verdacht auf Multiple Sklerose (MS bzw. Enzephalomyelitis disseminata), laborchemisch und klinisch gesicherter MS (Nachweis oligoklonaler IgG im Liquor) und verschiedenen anderen degenerativen neuronalen Erkrankungen.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Patienten**

Die in dieser Arbeit untersuchten Blutproben stammten von Patienten, die im Labor für Angewandte Biochemie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main ein Lipidprofil erstellt bekamen. Die Liquorproben und dazugehörigen Serumproben kamen vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden sowie dem Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

Die Tumorgewebe zur Isolation der Astrozyten wurde uns von der Neurochirurgie des Universitätsklinikums Frankfurt sowie der Neurochirurgie des Offenbacher Stadtkrankenhauses zur Verfügung gestellt.

Für die Bestimmung des Protein Tau wurden Liquorproben aus Frankfurt und Dresden untersucht. Durch das Mischen dieser zwei Quellen war es erst möglich, 17 Patienten mit MS-Verdacht, jedoch ohne Synthese oligoklonaler IgG im Liquor (Reiber-Klassen: 1 und 2, in IEF kein Nachweis oligoklonaler IgG), 13 Patienten mit klinisch-chemisch gesicherter MS (Reiber-Klassen: 3 und 4, in IEF Nachweis oligoklonaler IgG) sowie 9 Patienten mit verschiedenen degenerativen ZNS-Erkrankungen (Reiber-Klassen: 1 und 2, in IEF kein Nachweis oligoklonaler IgG) zu erhalten.

#### **3.2 Material**

$\alpha_2$ -Macroglobulin\*, Sigma (M-7151), Deisenhofen

4-Chloro-1-naphthol, Sigma, Deisenhofen

AG 501-X8; BioRad, München

Anti-Apolipoprotein B-Peroxidase, human; Boehringer, Mannheim

Anti-Apolipoprotein E human, monoclonal, Maus; Quartett (0650 2054), Berlin

Anti-Apolipoprotein E Serum human, Ziege, ICI-Rolf Greiner Biochemica (404G),  
Flacht

Anti-Apolipoprotein J, Ziege; Biodesign (K59198G), Asbach

Anti-Goat-Biotin, Vector Laboratories / Camon Labor-Services, Wiesbaden

Anti-Goat-PO, BioRad, München

Anti-Human Lp(a) Antiserum; Schaf, Immuno (4845012), Heidelberg

Anti-Mouse-Ig-Peroxidase, Schaf, Boehringer, Mannheim (1047 523)

Anti-Sheep-PO, Rabbit, Vector, BA 6000, Camon, Wiesbaden  
BSA, Fraktion V; Serva (11930), Heidelberg  
Cfol, Boehringer, Mannheim  
Collagenase, Sigma (C-0130), Deisenhofen  
Dithiotreitol, Merck, Darmstadt  
DNAse, Sigma (D-4527), Deisenhofen  
FKS, PAN  
Hybond ECL, Nitrocellulose Membran; Amersham Life Science, Braunschweig  
Immobiline Dry Plates, pH 4-7; Pharmacia LKD, Freiburg  
Innotest hTau Antigen – Elisa, Innogenetics (K-1032/95 04 28)  
Leupeptin, Boehringer, Mannheim ( 1 017 101)  
Lipoprotein (a)-Standard, human, Mensch, (1410 962) Boehringer, Mannheim  
Neural Cell Typing Set, Boehringer, Mannheim (1444 638)  
Neuraminidase, (Arthrobacter ureafaciens), Boehringer, Mannheim  
Neuraminidase, (Clostridium perfringens), Sigma, Deisenhofen  
Neuraminidase, (Vibrio cholerae), Sigma, Deisenhofen  
OPD, Merck, Darmstadt  
Pefabloc SC, Boehringer, Mannheim (1 429 868)  
Penicillin/Streptomycin, Gibco (061-05145), Eggenstein  
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid), Boehringer, Mannheim (236 608)  
Polyäthylenglycol, (Quantolip HDL), Immuno AG, Heidelberg  
Polyvinylidendifluoridmembran, PVDF, Immobilon, Millipore, Neu Isenburg  
Polyvinylpyrrolidon, Merck, Darmstadt  
Protein Tyrosin-Phosphatase, Boehringer, Mannheim  
QIAamp Tissue Kit, QIAGEN, Hilden  
Quantolip HDL (HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub>), Immuno, Heidelberg  
Nitrocellulose Membran, Amersham, Braunschweig  
RPMI-Pulvermedium, Gibco (51800-035), Eggenstein  
Sarcosyl, Sigma, Deisenhofen  
Seakem Le Agarose, FMC Bio Products  
Servalyt pH 4-7, Serva, Heidelberg  
Sigma FAST (DAB Peroxidase Substrate Tablet Set), Sigma (D-4293),  
Deisenhofen  
Sulfatase, (Abalone Entrails) Typ VII, Sigma, Deisenhofen  
Taq-Polymerase, Pharmacia, Freiburg  
TC Chamber Slides, Nunc (177429), Wiesbaden  
Trasylol 100 000 KIE, Bayer, Leverkusen  
Tween 20 = Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate; Sigma (P-1379),  
Deisenhofen

Ultrapure Agarose BRL, GIBCO BRL, Eggenstein  
Ultradex, LKB, Gräfelfing  
Vectastain ABC-Kit-Peroxidase Standard, Camon, Wiesbaden  
Vectastain ABC-Peroxidase Färbekit; Camon (PK 4000), Wiesbaden  
Western Blot Chemiluminescence Reagent, NEN Life Science Products  
(NEL102), Dreieichenhain

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien kamen außer den oben aufgeführten von den Firmen Pharmacia (Freiburg), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen).

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Zellkultur**

##### **3.3.1.1 Isolation der Zellen aus Tumorgewebe**

Um eine Primärkultur von humanen Astrozyten anlegen zu können, wurden die Zellen aus einem Astrozytom isoliert. Beim Verdacht eines Astrozytoms wurde das Tumorgewebe während der OP in RPMI-Medium gegeben und möglichst steril bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Anschließend wurde das Gewebe unter sterilen Arbeitsbedingungen mit einem Skalpell zerkleinert und pro Gramm Gewebe wurden 10 ml Verdauung zugegeben.

##### Verdauung

100 ml RPMI (ohne Zusätze)  
0,14 % Collagenase  
0,01 % DNase

Der Ansatz wurde zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand durch eine Kompresse filtriert und bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Pellet enthielt die isolierten Zellen, die dann in RPMI im Inkubator bei 37°C, 95 % Feuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> in Kultur genommen wurden.

##### **3.3.1.2 RPMI-Medium**

10,42 g Pulvermedium  
2 g NaHCO<sub>3</sub>  
ad 900 ml H<sub>2</sub>O

Nachdem die Pulver vollständig gelöst waren, wurde die Flüssigkeit steril filtriert. Vor Gebrauch wurden 10 % inaktiviertes FKS (50 ml/500 ml) sowie 10.000 U/ml Penicillin und 10.000 µg/ml Streptomycin pro 500 ml Medium zugegeben.

### 3.3.1.3 Hitzeinaktivierung des Kälberserums

Das FKS wurde zum Inaktivieren im Wasserbad für 30 min auf 56°C erhitzt.

### 3.3.1.4 Neural Cell Typing Set

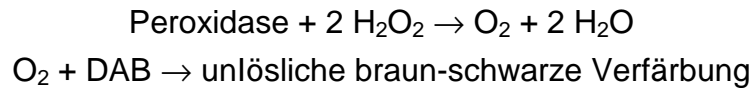
Gewebekulturen aus dem Zentralnervensystem können mit Hilfe immunzytochemischer Methoden typisiert werden. Dabei werden die Zellen, die ein typisches Epitop exprimieren, angefärbt. Das hier verwendete Neural Cell Typing Set beinhaltet die für derartige Typisierungen am häufigsten eingesetzten monoklonalen Antikörper.

Zelltyp	Antikörper gegen				
	NF160	GFAP	GalC	Vimentin	Fibronectin
Neuronen	+	-	-	-	-
Astrozyten	-	+	-	+	-
Oligodendrozyten	-	-	+	-	-
Fibroblasten	-	-	-	+	+

*Tabelle 6: Spezifität der im Neural Cell Typing Set beinhalteten monoklonalen Antikörper (Boehringer Mannheim)*

Die zu typisierenden Zellen wurden auf TC Chamber Slides (Nunc, Wiesbaden) aus TPX (Kunststoff-Copolymer) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach dem gleichmäßigen Bewachsen der Deckgläser wurden die Kulturen vorsichtig in PBS gewaschen. Zur Fixierung von Kulturen, die mit Anti-NF160, Anti-Vimentin, Anti-GFAP oder Anti-Fibronectin gefärbt werden sollten, wurden die Deckgläser 10 min bei -20°C in vorgekühltem Methanol inkubiert. Kulturen, die mit Anti-GalC gefärbt werden sollten, wurden 10 min bei -20°C in vorgekühltem Ethanol mit 5% Essigsäure (v/v) inkubiert. Anschließend wurden alle Deckgläser 3 x 3 min in PBS mit BSA, 0,1 % (w/v) gewaschen. Danach wurden je 10 µl der Antikörper-Lösungen auf die Zellen getropft, 30 min bei RT inkubiert und wiederum 3 x 3 min in PBS mit 0,1 % BSA gewaschen. Jetzt wurden die Kulturen mit dem Anti-Maus-Ig-PO-Antikörper beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde 3 x 3 min in PBS mit 0,1 % BSA gewaschen.

Die Färbung erfolgte nun über die an dem Zweitantikörper gebundene Peroxidase. Sigma Fast DAB (3,3'-Diaminobenzidine) Tabletten enthalten ein sich fest an die Zelle bindendes Substrat für den Nachweis einer Peroxidase-Aktivität.



Je eine DAB- und eine Hydrogen-Peroxid-Tablette wurden auf RT gebracht und zusammen in 5 ml Aqua dest. unter starkem Schütteln gelöst. 0,5 ml dieser Lösung wurden auf ein Deckglas gegeben. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch vorsichtiges Waschen mit PBS gestoppt.

### 3.3.2 Ultrazentrifugation

Bei der Lipoproteinultrazentrifugation erfolgt die Trennung des Probenmaterials aufgrund der Zentrifugalkraft, die dieses bei der kreisförmigen Bewegung mit konstanter Winkelgeschwindigkeit erfährt. Die dabei auftretende Beschleunigung hängt stets von der Winkelgeschwindigkeit bzw. der Umdrehungszahl und dem Radius des Rotors ab. Methodische und technische Einzelheiten zur Ultrazentrifugation von Lipoproteinen werden ausführlich in den Arbeiten von Lindgren 1975 und Kostner 1975 erörtert. Da Plasmalipoproteine eine geringere hydratisierte Dichte als die übrigen Plasmaproteine aufweisen, wird zu ihrer Trennung die Flottationsultrazentrifugation angewandt (Schumaker et al. 1986). Durch die langen Zentrifugationszeiten und die hohen Zentrifugalkräfte kommt es zu Veränderungen der Plasmalipoproteine infolge möglicher Interkonversion, Apoproteinverlust und Oxidation (Kunitake et al. 1982). Die Flottation der Lipoproteine erfolgt schneller als die Sedimentation der übrigen Plasmaproteine. Für die Ultrazentrifugation von Lipoproteinen höherer Dichte müssen zunehmend längere Zentrifugationszeiten gewählt werden, da deren Abtrennung von Serumproteinen (insbesondere Albumin) immer langsamer erfolgt (Schumaker et al. 1986). Da Dichte und Viskosität des aufzutrennenden Materials von dessen Temperatur abhängig sind, wird die Temperatur während der Zentrifugation konstant gehalten.

Die Auftrennung erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Ultrazentrifuge	Beckman L-8 (München)
Rotor	Kontron TFT 45.6 (München)
Umdrehungszahl	44 000 min <sup>-1</sup>
RZB	ca. 2,3 10 <sup>8</sup> g min
Laufzeit	18 Stunden
Rotortemperatur	15°C
Dichteeinstellung bei	20°C
Zentrifugenröhrchen aus dickwandigem Polycarbonat	

Tabelle 7: Angaben zur Ultrazentrifugation

Durch Zugabe von NaBr wurde die Dichte eines Liquor pools auf 1,23 kg/l erhöht. Die Überprüfung der Dichte erfolgte mittels eines digitalen Dichtemeßgerätes (Paar DMA 55). Dieses Gerät arbeitet nach der Biegeschwingermethode. Die Durchführung der Messung und methodische Details sind bei Kratky et al. 1973 beschrieben und werden hier nur kurz zusammengefaßt:

Grundlage dieser Methode ist ein in einer temperierbaren Kammer gelegener U-förmiger Biegeschwinger aus Glas, der elektronisch zu einer ungedämpften Schwingung angeregt wird. Die beiden Federelemente des Schwingers werden durch dessen Schenkel gebildet. Senkrecht zu deren Ebene steht die Schwingungsrichtung. Die Eigenfrequenz des Schwingers wird durch dessen Masse beeinflußt, die sich ändert, wenn sich die Probe im Schwingerrohr befindet. Ist das schwingende System mindestens bis zu dessen ruhenden Schwingknoten an den Einspannstellen gefüllt, so nimmt ein genau definiertes Probenvolumen an der Schwingung teil. Folglich kann die durch die Änderung der Masse des Systems bewirkte Änderung der Eigenfrequenz in Bezug zur Dichte der Probe gesetzt werden. Es ergibt sich folgende Gleichung mit der die Dichte der Probe berechnet werden kann:

$$d = (T^2 - B) / A$$

d = Dichte der Probe

A und B = Gerätekonstanten

T = Schwingungsdauer des Systems

Die in der Gleichung auftretenden Konstanten A und B werden durch Eichung mit Substanzen bekannter Dichte (Luft und Wasser) ermittelt und in den Gerätespeicher eingegeben. Danach errechnet das Gerät automatisch die Dichte der injizierten Lösung und gibt diese digital an.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei dieser Elektrophoresetechnik wird die Eigenladung der Proteine durch die negative Ladung der SDS (Natriumdodecylsulfat)-Moleküle maskiert. Das Massenverhältnis von SDS zu Protein ist konstant und somit auch das Verhältnis von negativer Ladung zur Masse. Die Proteine besitzen daher alle die gleiche Ladungsdichte und werden im elektrischen Feld auf ihrer Wanderungsstrecke zur Anode hin nur aufgrund ihrer Molekülgröße durch den Molekularsiebeffekt der

Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. In der homogenen Matrix ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion des dekadischen Logarithmus ihrer relativen Molekülmassen (Cooper 1981).

In dieser Arbeit fand die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) Anwendung, die sich durch eine Zweiteilung des Gels in eine großporige Sammelzone und eine feinporige Trennzone mit unterschiedlichen Puffersystemen auszeichnet. Das Trenngel kann mit einheitlicher Porengröße oder als in weiten Grenzen variierbarer, kontinuierlicher Gradient mit zunehmender Acrylamid-Konzentration in Laufrichtung gegossen werden. Um eine maximale Trennschärfe der Proteinbanden zu erreichen, wurden in dieser Arbeit Trenngele mit einem 3 - 15 %igen Gradient für die Auftrennung von Zellkulturüberständen der Astrozyten und einem 5 - 15 %igen Gradient für die Auftrennung der Doppelbanden, die beim Abbau des ApoE entstehen, verwendet. Die Zuordnung der Proteinbanden zu ihrem Molekulargewicht erfolgte mit Hilfe von Molekulargewichtstandards bzw. aufgetragenen Standards des gesuchten Proteins.

### 3.3.3.1 Stammlösungen

Acrylamid-Bis (30:0,8)	30 g Acrylamid + 0,8 g Bisacrylamid ad 100 ml H <sub>2</sub> O
1,5 % Ammoniumpersulfat (APS)	0,15 g Ammoniumpersulfat ad 10 ml H <sub>2</sub> O
10 % SDS	10 g SDS ad 100 ml H <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer	3 M Tris-HCL (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCL (pH 6,8)
10fach Kammerpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % SDS pH 8,3
1fach Kammerpuffer	10fach Kammerpuffer entsprechend verdünnen
80 % Saccharose	80 g Saccharose auf 100 ml H <sub>2</sub> O

### 3.3.3.2 Trenngel

Zur Herstellung eines Gradienten im Trenngel werden zwei Lösungen mit unterschiedlichem Gehalt an Acrylamid-Bis benötigt. Die Lösung mit dem hohen Acrylamidanteil, die schwere Lösung, enthält Saccharose als Zusatz, um den Gradienten, während des Gießvorgangs zu stabilisieren.



Da Sauerstoff die chemische Polymerisation behindert, wurden beide Lösungen im Vakuum entgast, anschließend wurden 10 µl TEMED als Initiator der Vernetzung zugegeben und das Gradientengel mit einer Flußrate von 3 ml/min gegossen.

### 3.3.3.2.1 Leichte Lösungen

#### Gellösung 5 %

Acrylamid	5 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml
10 % SDS	0,3 ml
1,5 % APS	0,7 ml
H <sub>2</sub> O	20,25 ml

#### Gellösung 3 %

Acrylamid	3 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml
10 % SDS	0,3 ml
1,5 % APS	0,7 ml
H <sub>2</sub> O	22,25 ml

### 3.3.3.2.2 Schwere Lösung

Acrylamid-Bis	12,5 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml
10 % SDS	0,3 ml
1,5 % APS	0,7 ml
Saccharose	4,5 g
H <sub>2</sub> O	12,75 ml

### 3.3.3.3 Sammelgel

Acrylamid-Bis	2,5 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
10 % SDS	0,2 ml
1,5 % APS	1 ml
H <sub>2</sub> O	11,3 ml

Nachdem die Gelmischung entgast worden war, wurden 15 µl TEMED hinzugegeben und das obere Gel gegossen.

### 3.3.3.4 Probenvorbereitung

Im allgemeinen wurden ca. 5 – 10 µg des Proteins aufgetragen, bei komplexen Proteingemischen bis zu 100 µg des Proteins. Der Probenpuffer bestand aus 2,5 ml Sammelgelpuffer, 4 ml 10 % SDS, 2,5 ml 80 % Saccharose und 0,308 g Dithiothreitol sowie 1 ml 0,04 % Bromphenolblau. Das Bromphenolblau diente als Indikator für die Wanderungsgeschwindigkeit der „schnellsten“ Proteine. Probenpuffer und Probenmaterial wurden zu gleichen Teilen gemischt. Mit einer feinen Kanüle wurden die Proben in die vormodulierten Geltaschen aufgetragen.

### 3.3.3.5 Elektrophoresebedingungen

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in der Vertikalgelkammer Protean II von Biorad, München durchgeführt. Bis der Bromphenolblaumarker die Grenze zum Trenngel erreicht hatte, wurde eine konstante Stromstärke von 15 mA/Gel angelegt. Danach betrug die Stromstärke 30 mA/Gel bis die Bromphenolblau-Lauffront das Ende des Gels fast erreicht hatte.

### 3.3.4 Western Blot

Bei dieser Technik wurden Proteine aus einem SDS-Gel durch Wanderung im elektrischen Feld auf eine immobilisierte Membran übertragen. Die Membran befand sich anodenseitig, da die mit negativer Nettoladung versehenen Proteine zur Anode wandern.

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde 30 min in dem Transferpuffer äquilibriert. Als Transfermembran diente eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm). Filterpapier und Schwämme wurden vor der Benutzung in die Pufferlösung getaucht. Beim Zusammenbau des Blot-Pakets mußte darauf geachtet werden, daß keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Das Blot-Paket wurde nach folgendem Schema zusammengesetzt:

#### **Kathodenseite**

Schwamm  
drei Lagen Filterpapier  
SDS-Gel  
Membran  
drei Lagen Filterpapier  
Schwamm

#### **Anodenseite**

Dieser Aufbau wurde in die mit Transferpuffer gefüllte Blottingkammer gehängt. Der Blottingvorgang erfolgte innerhalb von drei Stunden bei einer elektrischen Spannung von 70 V und einer Stromstärke von ca. 250 mA. Eine Wasserkühlung verhinderte die Erwärmung der Apparatur.

Nach Abschluß des Transferprozesses wurde die Membran über Nacht in die Blockierlösung gelegt, um die freien Bindungsstellen der Membran zu blockieren.

#### 3.3.4.1 Lösungen

##### Transferpuffer

10 mM TRIS

40 mM Glycin  
20 % Methanol  
ad 3 l H<sub>2</sub>O  
pH 8,3

#### Blockierlösung: 10 % BSA

50 g Rinderserumalbumin  
in 500 ml TRIS-Puffer

#### TRIS-Puffer

10 mM TRIS pH 7,5  
25 mM NaCl  
2 mM CaCl<sub>2</sub>

#### **3.3.4.2 Detektion des Blots**

An der Membran waren alle in dem Gellauf aufgetrennten Proteine gebunden. Die Membran wurde jetzt mit dem Antikörper gegen ApoE detektiert, um nachzuweisen, welche Proben ApoE enthalten hatten.

Nach zweimaligem Waschen (jeweils fünf Minuten mit TTBS-Puffer) erfolgte eine einstündige Inkubation mit einer Anti-ApoE enthaltenden Antikörperlösung (1:800 v/v). Nach erneutem zweimaligem Waschen (je 5 Minuten TTBS) wurde über 30 Minuten mit einer biotinylierten Anti-Ziege-IgG Antikörperlösung (1:250 v/v) inkubiert und danach wiederum zweimal mit TTBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte über 30 Minuten die Konjugation mit dem Avidin-Biotin-HRP-Komplex (Vectastain ABC). Anschließend erfolgte nach nochmaligem Waschen mit TTBS und Abspülen mit TBS die Farbreaktion durch Zugabe der Färbelösung 2. Bei ausreichender Intensität des sich anfärbenden Bandenmusters wurde die Farbreaktion durch Abkippen der Lösung und Abspülen mit Wasser gestoppt.

#### **3.3.5 Lösungen**

##### TBS-Puffer

20 mM Tris, pH 7,5  
0,5 M NaCl  
0,1 g/l Thimerosal

##### TTBS-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05 % v/v Tween 20

### Antikörperlösung

TTBS supplementiert mit 10 g/l Gelatine

### Avidin-Biotin-HRP-Komplex (Vectastain ABC)

40 ml Antikörperlösung

8 Tropfen Reagenz A (Avidin DH)

8 Tropfen Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)

### Färbelösung 1

20 mg 4-Chloro-1-naphthol

40 ml Methanol (eiskalt)

### Färbelösung 2

30 % w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

200 ml TBS

+

40 ml Färbelösung 1

## **3.3.6 Proteinbestimmung mit der Biuret-Reaktion**

Um die Proteinkonzentration der auf die Polyacrylamidgele aufzutragenden Proben bestimmen zu können, wurde die Proteinbestimmung nach Biuret verwendet. Sie liefert sehr schnell, aber wenig genaue Messungen. Die Struktur des Farbkomplexes ist bisher nicht exakt bekannt. Man nimmt an, daß eine Komplexierung des Kupfers mit den Peptidbindungen des Proteins und mit den Tyrosin-Resten in alkalischer Lösung stattfindet (Cooper 1981).

### **3.3.6.1 Durchführung**

Ein Milliliter der Proteinlösung bzw. 100 µl + 900 µl H<sub>2</sub>O werden mit 4 ml Biuret-Reagenzlösung versetzt und kräftig durchgemischt. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Absorption der Probe erfolgte bei der Wellenlänge 540 nm.

Nach diesem Prinzip wurden Proben mit bekannter Proteinkonzentration gemessen und aus diesen eine Eichkurve erstellt. Den Proteingehalt einer unbekannt Probe kann man nun aus dieser Eichkurve ablesen.

### **3.3.6.2 Herstellung des Biuret-Reagenz**

1,5 g CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O

6,0 g Natrium-Kalium-Tartrat

wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst. Anschließend wurden unter starken Rühren 300 ml 10 %ige NaOH (w/v) zugegeben. Die Lösung wird nun auf ein Liter mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt (Cooper 1981).

### **3.3.7 Stimulation der ApoE-Produktion**

#### **3.3.7.1 LDH-Bestimmung**

Zentrallabor Uniklinikum Frankfurt; Nephelometrische Methode

#### **3.3.7.2 Aktivieren von $\alpha_2$ -Makroglobulin\***

1 mg/ml  $\alpha_2$ -Makroglobulin\* wurde eine Stunde mit 200 mM Methylamin inkubiert und anschließend gegen PBS dialysiert und steril filtriert (Porengröße: 0,22  $\mu$ m).

#### **3.3.7.3 ApoE-Genotypisierung**

Für die Genotypisierung eines Proteins muß die Geninformation des Proteins mittels PCR vermehrt werden. Dazu synthetisiert man den Bereich, in dem sich der nachzuweisende Polymorphismus befindet. In diesem Ansatz wurden folgende Primer verwendet:

V5: upstream Primer (nach Hixon und Vernier 1990)

5'-TAA GCT TGG CAC GGC TGT CCA AGG A 3868-3885

V8: downstream Primer (nach Wenham et al. 1991)

5'-ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A 4079-4095

Mit diesen Primer kann der für den ApoE-Polymorphismus wichtige Bereich des ApoE-Gens einschließlich der Codone 112 und 158 amplifiziert werden.

Nach folgendem Rezept wurde die PCR angesetzt:

45 $\mu$ l	Mastermix
5 $\mu$ l	DNA
2	Tropfen Öl
0,5 $\mu$ l	Taq-Polymerase

Dabei setzte sich der Mastermix folgendermaßen zusammen:

1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 %	DMSO
35 %	Detergens
50 mM/dNTP	dNTP-Mix
100 ng	Primer V5
100 ng	Primer V8

in Cetus II-Puffer.

#### Cetus II-Puffer

500 mM	KCl
100 mM	Tris-HCl
pH 8,3	

Der PCR-Ansatz wurde ohne die Taq-Polymerase pipettiert, für 10 min auf 56°C erhitzt und anschließend die Taq-Polymerase zugegeben. Nach diesem Hot Start lief die PCR nach folgendem Programm weiter:

95 °C	1 min	Denaturierung	} 30 Zyklen
60 °C	1 min	Anneling	
70 °C	2 min	Extension	

#### **3.3.7.4 PCR-Kontroll-Agarose-Gel**

In der PCR wurde ein 244 bp großes Fragment synthetisiert. Dies lässt sich mit einem 2 % Agarosegel in TAE-Puffer und mit Hilfe einer 100 bp-Leiter gut nachweisen. Für das Kontrollgel wurden 8 µl PCR-Produkt mit 2 µl Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief bei 50 Volt für ca. 45 min.

#### Probenpuffer

50 mM Tris-HCl ph 7,6  
50 mM EDTA  
0,5 % SDS  
0,1 % Bromphenolblau  
40 % Saccharose

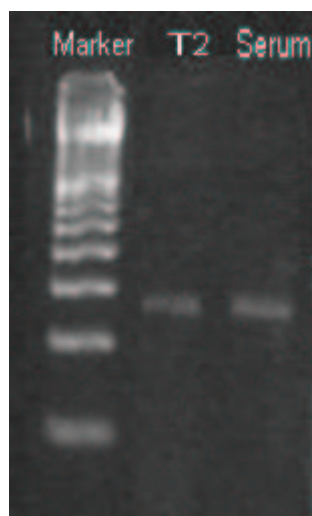


Abbildung 2: PCR-Kontrollgel

Abbildung 2 zeigt die Kontrolle der PCR einer Tumorprobe (T2) und einer Serumprobe. Der Marker ist die 100 bp-Leiter, d.h. die unterste Bahn entspricht 100 bp, die nächste 200 bp usw. Man erkennt deutlich, daß das amplifizierte Produkt zwischen der 200 bp und der 300 bp großen Bande des Markers läuft. Die Größe des Zielfragmentes betrug 244 bp. Die PCR hat folglich das richtige Produkt amplifiziert.

### 3.3.7.5 Verdau

Die erfolgreich synthetisierten ApoE-Genfragmente wurden mit Cfo I verdaut. Dieses Restriktionsenzym erkennt eine Schnittstelle an der folgenden Tetranukleotidsequenz:



Durch den Austausch von Cystein (TGC) zu Arginin (CGC) entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Cfo I. Durch dieses Einfügen von Schnittstellen ergibt sich für jeden Genotyp ein typisches Fragmentmuster:

ApoE	Fragmentgröße (bp) um Position 112	Fragmentgröße (bp) um Position 158
4/4	19 72	35 48
3/3	91	35 48
2/2	91	83
2/3	91	35 48 83
2/4	19 72 91	35 48 83
3/4	19 72 91	35 48

Tabelle 8: Zu erwartende Fragmente nach dem Cfo I-Verdau (Hixon et al. 1990)

16 µl des PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl des Enzympuffers L der Firma Boehringer Mannheim vermischt. Anschließend wurden 2 µl des Enzyms Cfo I zugegen und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.7.6 ApoE-Gel

Die durch den Cfo I-Verdau entstandenen Fragmente wurden auf einem kleinen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurde ein natives 12,5 % PAA-Gel in TBE-Puffer gegossen und 20 µl der mit 4 µl Probenpuffer versetzten Probe aufgetragen.

#### 12,5 % native PAA-Gellösung

- 25 ml 50 % Acrylamid (29 g Acrylamid + 1 g Bis ad 60 ml Wasser)
- 10 ml 10fachTBE
- 65 ml H<sub>2</sub>O

### 10fach TBE-Puffer

520 mM Tris  
140 mM Borsäure  
1 mM EDTA pH 8,0

#### **3.3.7.6.1 Gelansatz**

10 ml PAA-Gellösung  
100 µl APS  
10 µl TEMED

#### **3.3.7.6.2 Laufbedingungen**

Die Proben wurden bei ca. 110 Volt aufgetrennt und kurz bevor die Lauffront das Ende des Gel erreicht hatte, wurde der Lauf beendet.

Das Gel wurde auf dem Schüttler für 30 min in 10 % Ethidiumbromid-TBE-Lösung angefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund des Gels für 5 - 10 min in H<sub>2</sub>O leicht entfärbt.

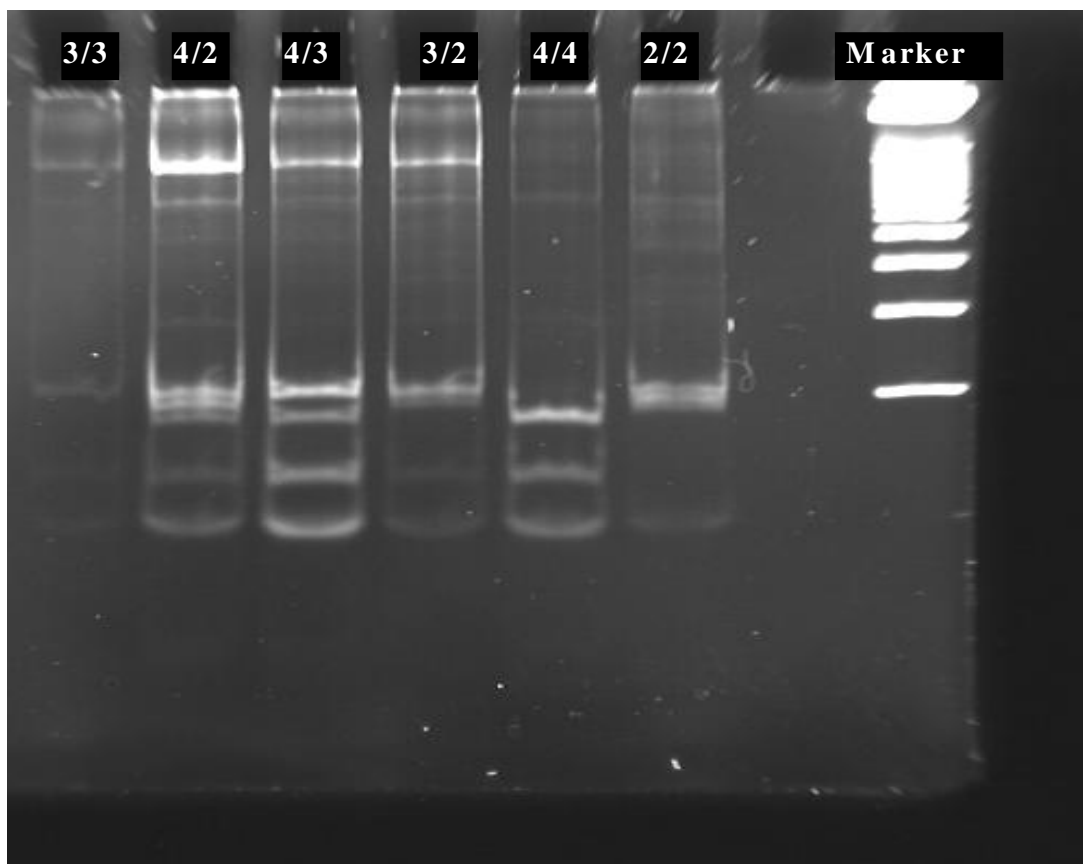


Abbildung 3: ApoE-Genotypisierung



In Abbildung 3 sind die verschiedenen existierenden ApoE-Phänotypen aufgetragen. Man erkennt deutlich das jedem Phänotyp ein individuelles Bandenmuster zuzuordnen ist.

### **3.3.8 Apo(a)-Phänotypisierung**

Nach der von Marcovina et al. 1993 und Kamboh et al. 1991 beschriebenen Methode wurde die Apo(a)-Phänotypisierung aufgebaut.

#### **3.3.8.1 Probenvorbereitung**

20 µl einer Plasma-Probe wurden mit dem 10fach Probenpuffer versetzt, fünf Minuten auf 100°C erhitzt und danach auf RT abgekühlt.

##### 10fach Probenpuffer

- 45 mM Tris, pH 8,2
- 1 mM EDTA
- 6 % SDS
- 2 % Glycerol
- 10 % β-Mercaptoethanol
- 0,2 % Bromphenolblau

#### **3.3.8.2 Gelbereitung**

Für den Gellauf wurde ein 1,5 %iges Agarose Gel (15 x 25 cm) [Ultrapure Agarose BRL] vorbereitet.

##### Gelpuffer

- 90 mM Tris
- 90 mM Borsäure
- 2 mM EDTA
- 0,1 % SDS

#### **3.3.8.3 Gellauf**

Die vorbereiteten 20 µl Probe wurden in die Geltasche pipettiert. Das Gel lief für drei Stunden bei 25 Watt und 4°C in folgendem Puffer:

##### Laufpuffer

- 45 mM Tris
- 45 mM Borsäure
- 2 mM EDTA
- 0,1 % SDS

#### **3.3.8.4 Elektroblot**

Nach beendetem Lauf wurden die Proteine mit einem Elektroblot bei 30 V für 15 Stunden auf eine Nitrocellulose Membran (Porengröße 0,45 µm) transferiert.

##### Blotting-Puffer

- 10 mM Tris
- 40 mM Glycin
- 5 % Methanol

#### **3.3.8.5 Blockieren**

Der Blot wurde für mindestens 60 min in 2 % Milchpulverlösung (in PBS) blockiert und anschließend zweimal für 5 min in Waschpuffer gewaschen.

#### **3.3.8.6 Detektion**

Der Erstantikörper wurde 1:10000 in Blockierungslösung verdünnt und der Blot eine Stunde mit diesem Antikörperansatz inkubiert. Der Blot wurde erneut zweimal gewaschen und dann für eine Stunde mit einem biotinierten Anti-Schaf-Antikörper (3:1000) versetzt. Im nächsten Schritt erfolgte über 30 Minuten die Konjugation mit dem Avidin-Biotin-HRP-Komplex (Vectastain ABC). Anschließend wurde der Blot zweimal mit Waschpuffer und einmal mit Waschpuffer ohne Tween gewaschen. Jetzt wurde die Färbelösung Western Blot Chemiluminescence Reagent für eine Minute zugegeben, abgekippt und der Blot eingeschweißt. Der Blot wurde in eine Röntgenkassette geklebt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde nach ca. 1 min, 5 min bzw. 15 min entwickelt.

#### **3.3.8.7 Lösungen**

##### Waschpuffer (PBS-Dulbecco)

- 0,15 M NaCl
- 0,3 mM KCl
- 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### Waschlösung mit Tween

- 1 % Tween 20 in Waschpuffer

##### Antikörperlösung

- 10 % Gelatine in Waschpuffer

##### Avidin-Biotin-HRP-Komplex (Vectastain ABC)

- 40 ml Antikörperlösung

8 Tropfen Reagenz A (Avidin DH)

8 Tropfen Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)

### Färbelösung Western Blot Chemiluminescence Reagent

Je nach Größe des zu detektierenden Blots wurden zwei gebrauchsfertig vorliegende Lösungen in einem in der Anleitung festgelegten Verhältnis gemischt und sofort auf den Blot gegeben.

### 3.3.9 Enzyme linked immunosorbent Assays = ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Konzentrationen verschiedener Apolipoproteine mit Hilfe von »Enzyme linked immunosorbent Assays« = ELISAs bestimmt. Für die Apolipoproteine E, B, (a) und den Apo(a)/E-Partikel handelte es sich um nicht-kompetitive Tests. Der ELISA für das Apolipoprotein (a) war ein symmetrischer, da zum Binden und Detektieren derselbe Antikörper verwendet wurde. Die ELISAs für ApoE, ApoB und Apo(a)/E waren asymmetrisch, da unterschiedliche Antikörper zum Einsatz kamen. Trotz dieses Unterschiedes und der unterschiedlichen Antikörper verliefen die ELISAs nach dem gleichen Schema, welches nachfolgend beschrieben ist.

Für das Apolipoprotein J wurde ein nicht-kompetitiver ELISA mit direkter Beschichtung aufgebaut. Dies bedeutet, daß die Platte mit der Probe beschichtet wird und dann über den Antikörper das Vorhandensein des gesuchten Proteins nachgewiesen wird.

Das Protein Tau wurde mit einem kommerziellen ELISA der Firma Innogenetics, der hier extra beschrieben ist, bestimmt.

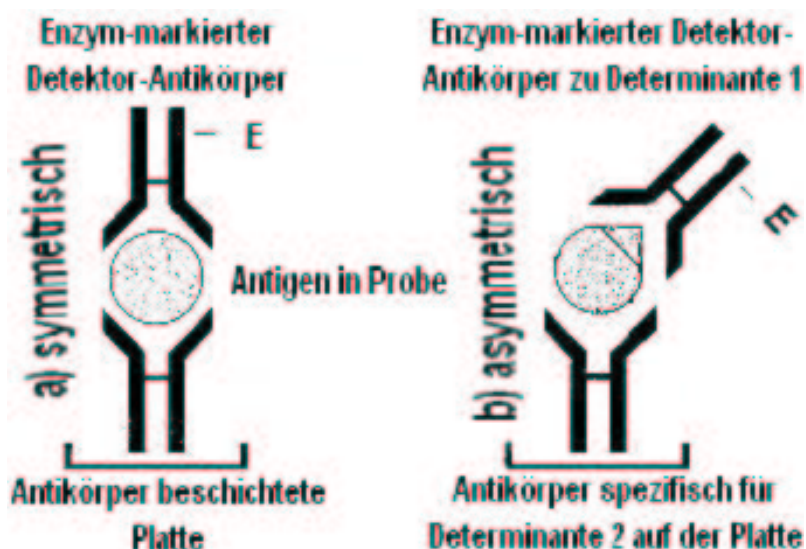


Abbildung 4: Sandwich-ELISA: (a) symmetrisch, (b) asymmetrisch (D.M. Kemeny 1994)

### 3.3.9.1 ELISA-Aufbau

#### 3.3.9.1.1 *Apolipoprotein E*

catcher antibody	Anti-Apolipoprotein E Serum, human; 1:2000 ICI-Rolf Greiner Biochemica
1. detector antibody	Anti-Apolipoprotein E human, monoclonal, Maus; 1:10000 Quartett
2. detector antibody	Anti-Maus-Ig-PO, Boehringer Mannheim, 1:750

#### 3.3.9.1.2 *Apolipoprotein (a)*

catcher antibody	Anti-Human Lp(a) Antiserum; 1:500 Immunoscientific
detector antibody	Anti-Human Lp(a) Antiserum-PO; 1:10000 Immunoscientific

#### 3.3.9.1.3 *Apolipoprotein B*

catcher antibody	Anti-Human Lp(a) Antiserum; 1:500 Immunoscientific
detector antibody	Anti-Apolipoprotein B-PO, human; 1:200 Boehringer Mannheim

#### 3.3.9.1.4 *Apo(a)/E-Partikel*

catcher antibody	Anti-Human Lp(a) Antiserum; 1:500 Immunoscientific
1. detector antibody	Anti-Apolipoprotein E human, monoclonal, Maus; 1:10000, Quartett
2. detector antibody	Anti-Maus-Ig-PO, 1:750 Boehringer Mannheim

#### 3.3.9.1.5 *Apolipoprotein J*

1. detector antibody	Anti-Apolipoprotein J, polyclonal, Ziege; 1:10000 Biodesign
2. detector antibody	Anti-Goat-PO, 1: 750 BioRad

#### 3.3.9.1.6 *ApoJ/E-Partikel*

catcher antibody	Anti-Apolipoprotein J, polyclonal, 1:2000 Biodesign
1. detector antibody	Anti-Apolipoprotein E human, monoclonal, Maus; 1:10000

- Quartett  
2. detector antibody Anti-Maus-Ig-PO, 1:750  
Boehringer Mannheim

### 3.3.9.2 ELISA-Durchführung

#### 3.3.9.2.1 Coating und Blockieren der Platte

Der Catcher-Antikörper wurde, wie in der Übersicht beschrieben, in Coating Puffer verdünnt. Je 150 µl dieser Lösung wurden in ein Well pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur einwirken lassen.

#### Coating Puffer

- 17 ml Lösung A  
8 ml Lösung B  
auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen.

#### Lösung A

- 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

#### Lösung B

- 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>

Die Flüssigkeit wurde aus der Platte entfernt, die Wells mit 200 µl Waschpuffer gefüllt und nach ca. einer Minute wieder entfernt. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurden 200 µl der Blockierungslösung in jedes Well pipettiert und bei RT zwei Stunden inkubiert.

#### Waschpuffer (PBS-Dulbecco)

- 0,15 M NaCl  
0,3 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### Blockierungslösungen

- 1 % BSA in Coating Puffer (ApoE-Elisa)

#### 3.3.9.2.2 Probenauftrag und Durchführung

Nachdem die Platte dreimal gewaschen war, wurden die nach Bedarf mit Waschpuffer vorverdünnten Proben aufgetragen.

Nach einer zweistündigen Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen und 100 µl der Detektor-Antikörper-Lösung für weitere zwei Stunden zupipettiert. Nach erneutem Waschen wurde der teilweise notwendige zweite Detektor-Antikörper zugegeben. Wenn bereits der erste Detektor-Antikörper Peroxidase markiert war, wurden 100 µl der 20 min vorher angesetzten Färbelösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde dunkel gestellt und die Reaktion nach ca. 15 min nach visueller Färbungskontrolle durch Zugabe von 100 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Anschließend wurde die Platte im ELISA-Reader Titertek Multiskan MCC/340 bzw. Microscan ELISA Reader (Bio-Rad) bei 490 und 630 nm gemessen und über das dazugehörige Auswertungsprogramm die Konzentrationen berechnet.

#### Antikörper-Lösung

Waschpuffer + 1 % Tween 20

#### Färbelösung

0,02 g OPD

20 ml NaCitrat

4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### NaCitrat

0,01M NaCitrat pH5

#### **3.3.9.2.3 Probenauftrag beim ApoJ-Elisa**

Die Proben wurden zum Binden in die Wells der Platte pipettiert und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte zweimal mit dem o.g. Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Platte mit dem Blockierpuffer mit 1 % BSA für zwei Stunden blockiert, anschließend zweimal gewaschen und der erste Detektionsantikörper (Anti-ApoJ) in der Verdünnung 1:10000 für zwei Stunden zugegeben. Erneut wurde die Platte zweimal gewaschen und dann der zweite Detektionsantikörper in der Verdünnung 1:750 aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde die Färbelösung hergestellt. Die Färbung wurde kontrolliert und nach ca. 15 min mit 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Platte konnte jetzt bei 490 und 630 nm mit dem ELISA-Reader gemessen und die Konzentrationen der Probe errechnet werden.

#### **3.3.9.2.4 Auswertung**

Für jede Platte wurde eine Standardreihe pipettiert. Aus den so erhaltenen fünf Werten bekannter Konzentration, ließ sich dann eine Standardkurve erstellen (siehe Abbildung 5), mit deren Hilfe man den Proben eine Konzentration zuordnen konnte.

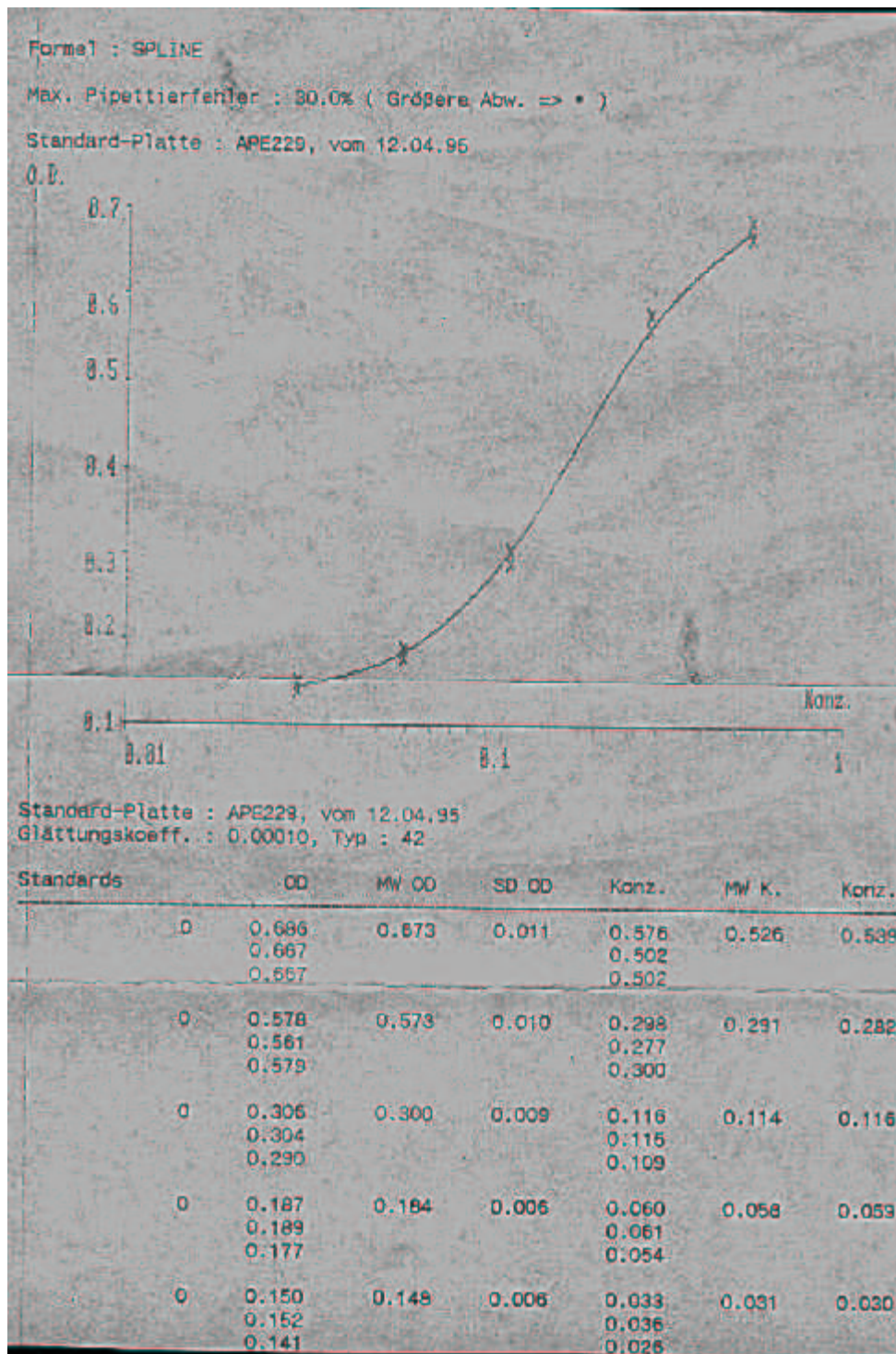


Abbildung 5: ELISA-Standardkurve

Die Proben wurden mindestens in Doppelwerten und teils auch in zwei Verdünnungen aufgetragen, um über den Durchschnitt der so erhaltenen Daten, die Konzentration zu errechnen.

### **3.3.9.3 Protein Tau – Elisa**

Die Bestimmung des Proteins Tau erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen (Firma Innogenetics) nach dem Sandwich-Prinzip aufgebauten ELISAs im Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden.

In die mit einem monoklonalen Antikörper gegen Protein Tau (AT120) beschichteten Wells wurden zunächst jeweils 25 µl der zuvor gemischten Liquorprobe (bzw. des Standards mit 75, 150, 300, 600 und 1200 pg/ml Protein Tau bzw. Probendiluent für Standardkurve bzw. Blank) und 75 µl Konjugatlösung 1 (zwei verschiedene biotinierte monoklonale Antikörper gegen Protein Tau (HT7 und BT2) je Well pipettiert und die Platten über 24 Stunden bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit je 400 µl Waschlösung je Well wurden jeweils 100 µl Konjugat 2 (Peroxidase-konjugiertes Streptavidin) zugegeben und nochmals über 30 min bei RT inkubiert. Die in dieser Zeit ablaufende Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 100 µl Stopplösung (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) je Well beendet und direkt anschließend die Extinktion des gebildeten gelben Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über die bei der Messung mitgeführte Standardkurve.

Die bei diesem ELISA verwendeten Lösungen waren als Fertiglösungen in dem Kit enthalten. Über ihre Zusammensetzung waren keine Angaben in der Anleitung enthalten.

## **3.4 ApoE-Phänotypisierung**

### **3.4.1 Typisierung von Plasmaproben**

#### **3.4.1.1 Probenvorbereitung**

Die Bestimmung des Phänotyps von ApoE erfolgte durch isoelektrische Fokussierung im immobilisierten pH-Gradienten und anschließendes Immunoblotting. Im Rahmen der Probenvorbehandlung wurden 100 µl Plasma mit 200 µl Polyäthylenglycol (Quantolip, Immuno) gefällt und der HDL-freie Überstand mit 2 ml Delipidierungslösung (Aceton:Ethanol 1:1, v/v) bei -20°C über zweimal zwei Stunden extrahiert. Anschließend erfolgte eine nochmalige Extraktion der Lipidanteile mit Diethylether über eine Stunde bei ebenfalls -20°C. Das nach Zentrifugation erhaltene Proteinpellet wurde leicht getrocknet und anschließend in 400 µl Probenpuffer aufgenommen. Im weiteren Verlauf wurden 30 µl dieser Lösung mit 10 µl einer Suspension aus 40 mg/ml Ultrodex in Servalyt pH 4-7 versetzt und davon später 20 µl auf das Gel aufgetragen.



### 3.4.1.2 Gellauf und Blot

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte unter Verwendung kommerziell erhältlicher Fertiggele (Immobiline Dry Plates, Pharmacia), die über zwei Stunden mit einer Rehydrationslösung rekonstituiert wurden. Im Rahmen der anschließenden isoelektrischen Fokussierung wurden jeweils 20 µl der mit Ultrodex/Servalyt versetzten delipidierten Probe etwa einen Zentimeter von der Kathode entfernt aufgetragen. Die Gele wurden danach unter Wasserkühlung zunächst eine Stunde bei 400 V und danach vier Stunden bei 5000 V fokussiert (Desaphor HF Elektrophoresekammer, Desantronic 6000/100 Netzteil; Desaga).

Nach Ende der Fokussierung erfolgte der Transfer der Proben durch Kapillarblot auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF). Dazu wurde das Gel zunächst für 10 Minuten äquilibriert sowie die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert und mit destilliertem Wasser äquilibriert. Danach wurde die PVDF-Membran auf das Gel aufgebracht, mit drei nassen und fünf trockenen Filterpapieren sowie einer ca. zwei Zentimeter dicken Schicht aus Papierhandtüchern und einer Glasplatte belegt und über Nacht mit einem Druck von 7 g/cm<sup>2</sup> geblottet.

### 3.4.1.3 Detektion des Blots

Vor Beginn der Immundetektion wurde die PVDF-Membran zunächst über zwei Stunden mit Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindung zu vermeiden. Nach zweimaligem Waschen (jeweils fünf Minuten mit TTBS-Puffer) erfolgte eine einstündige Inkubation mit einer Anti-ApoE (aus Ziege) enthaltenden Antikörperlösung (1:800 v/v). Nach erneutem zweimaligem Waschen (je 5 Minuten TTBS) wurde über 30 Minuten mit einer biotinylierten Anti-Ziege-IgG Antikörperlösung (1:250 v/v) inkubiert und danach wiederum zweimal mit TTBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte über 30 Minuten die Konjugation mit dem Avidin-Biotin-HRP-Komplex (Vectastain ABC). Anschließend erfolgte nach nochmaligem Waschen mit TTBS und Abspülen mit TBS die Farbreaktion durch Zugabe der Färbelösung 2. Bei ausreichender Intensität des sich anfärbenden Bandenmusters wurde die Farbreaktion durch Abkippen der Lösung und Abspülen mit Wasser gestoppt.

## 3.4.2 Lösungen

### Rehydrationslösung

- 8 M Harnstoff
- 2 mM Tris
- 50 mM Dithiotreitol
- 0,2 % w/v Servalyt pH 4-7

Äquilibration

120 mM Essigsäure  
20 % Methanol v/v

TBS-Puffer

20 mM TRIS, pH 7,5  
0,5 M NaCl  
0,1 g/l Thimerosal

TTBS-Puffer

TBS-Puffer mit 0,05 % v/v Tween 20

Probenpuffer

40 mg/ml Ultrodex in Servalyt pH 4-7

Blockierlösung

TBS-Puffer supplementiert mit 10 g/l Polyvinylpyrrolidon

Antikörperlösung

TTBS supplementiert mit 10 g/l Gelatine

Avidin-Biotin-HRP-Komplex (Vectastain ABC)

40 ml Antikörperlösung  
8 Tropfen Reagenz A (Avidin DH)  
8 Tropfen Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase)

Färbelösung 1

20 mg 4-Chloro-1-naphthol  
40 ml Methanol (eiskalt)

Färbelösung 2

30 % w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
200 ml TBS

+

40 ml Färbelösung 1

### 3.4.3 Veränderungen für Liquorproben

Die geringe Konzentration des ApoE im Liquor machte eine verstärkte Ankonzentration des Materials erforderlich. Hierzu wurden 500 µl Liquor mit 5 ml

eiskaltem Aceton versetzt, 30 Minuten im Gefrierschrank inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde danach wie eine Serumprobe nach der HDL-Fällung weiterbehandelt. Das nach der Etherfällung gewonnene Pellet wurde in 100 µl des o.g. Probenpuffers aufgenommen und der isoelektrischen Fokussierung zugeführt.

#### 3.4.4 Verdau der Proben

Bei der Untersuchung der posttranslationalen Prozessierung wurden die für die Delipidierung notwendigen Mengen Liquor (500 µl) bzw. Serum (100 µl) über Nacht bei 37°C mit 0.2 Units Neuraminidase bzw. 10 Units Tyrosin-Phosphatase oder 10 Units Sulfatase inkubiert und anschließend der jeweils für Liquor bzw. Serum notwendigen Probenvorbereitung unterworfen. Der Verdau erfolgte dabei mit folgenden Enzymen:

Neuraminidase	Clostridium perfringens; $\alpha$ 2,3-, $\alpha$ 2,6-, oder $\alpha$ 2,8- an Gal, GlcNAc, GalNAc, AcNeu, GlcNeu, Oligosaccharide, Glycolipide, Glycoproteine; Sigma
	Vibrio cholerae; $\alpha$ 2,3-2,3-, $\alpha$ 2,6-, oder $\alpha$ 2,8- an Gal, GlcNAc, GalNAc, AcNeu, GlcNeu, Oligosaccharide, Glycolipide, Glycoproteine; Sigma
	Arthrobacter ureafaciens; N- oder O-acyl-Neuraminsäuren $\alpha$ 2,3-, $\alpha$ 2,6-, oder $\alpha$ 2,8- an Gal, Hex, NAc, N- oder O-acylat Neuraminsäurereste in Oligosacchariden/Glykokonjugate oder Colominic-Säuren; Boehringer Mannheim
Protein Tyrosin Phosphatase	Yersinia enterocolitica; P-Tyr-Protein/Peptide; Boehringer Mannheim
Sulfatase	Abalone Entrails; Typ VII; Sigma

Tabelle 9: Verwendete Enzyme zum Abspalten der Sialobanden des ApoE

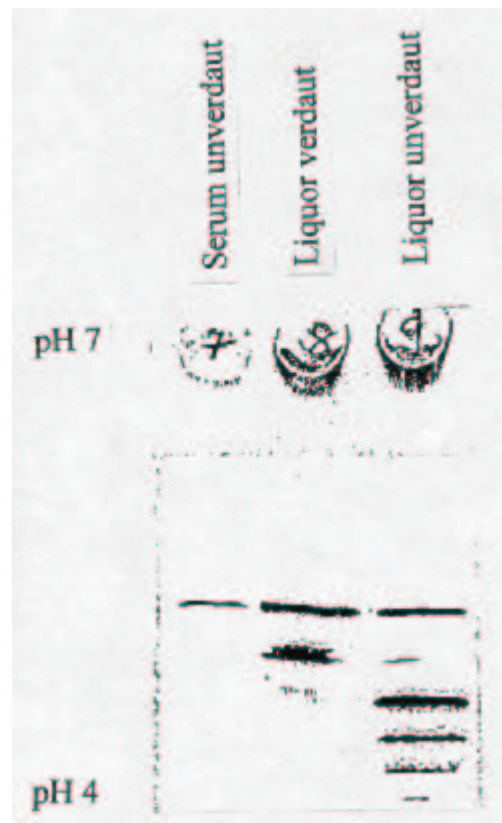


Abbildung 6: Blot

Das quantitative Verhältnis der verschiedenen Banden wurde nach dem Kopieren des Blots auf Overheadfolien durch Scannen mittels Laserdensitometer (Ultrascan XL, Pharmacia LKB) ermittelt.

### 3.5 Kreuzimmunelektrophorese

#### 3.5.1 Ansatz

4 ml eines 1 % Agarose (Seakem) und 2 % Dextran T70 haltigen Tris/Tricin-Puffers wurden 10 min auf ca. 95°C erhitzt und dann im Wasserbad auf 45°C abgekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde der erste Antikörper zugegeben. Die Antikörperlösung wurde auf eine 2 x 2 cm große Glasplatte gegossen und konnte dort unbewegt erstarren. Dieses Gel wurde nun mittig geteilt und eine Hälfte entfernt. Anschließend wurden 2 ml der zweiten Antikörperlösung nach der o.g. Methode hergestellt und an die schon erstarrte Gelhälfte mit dem Antikörper 1 gegossen.

#### 3.5.2 Gellauf

Die Gelplatten wurden in die Kammer für Immunelektrophoresen von Shandon, UK gelegt. Mit drei übereinandergelegten, befeuchteten Filterpapieren wurde eine Brücke für den Stromfluß (Elektrodenbrücke) vom Gel zum Laufmittel hergestellt.

Pro Gel konnten vier Proben in vorgestanzte Löcher aufgetragen werden. Bei 6 mA/Gel wurden die Proben unter gekühlten Bedingungen für 12 bis 18 Stunden aufgetrennt.

### 3.5.3 Entwicklung und Färbung des Gels

Nach dem Lauf wurden die Gele mit einem Gewicht von ca. 100 g beschwert und getrocknet. Danach wurden sie 60 min in 0,9 % NaCl, anschließend zwischen Papier gelegt, gepreßt und ca. 15 min getrocknet. Dieser Wasch- und Trockenvorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde das getrocknete Gel 10 bis 20 min in eine 0,2% Coomassie-Lösung gelegt. Zum Schluß wurde das gefärbte Gel für ca. 10 min in die Entfärber-Lösung gelegt.

### 3.5.4 Lösungen

1. Tris/Tricin-Puffer  
38 mM Tricin  
0,36 mM Calciumlaktat  
pH 8,6 (pH mit 1 M Tris eingestellt)
2. Laufpuffer  
Tris/Tricin-Puffer
3. 0,2 % Coomassie-Lösung  
0,2 % Coomassie R  
25 ml Methanol  
8 ml Eisessig  
67 ml Aqua dest
4. Entfärber-Lösung  
25 % Methanol  
3% Eisessig  
in H<sub>2</sub>O

### 3.5.5 Konzentration der Antikörper

Name	Konzentration	4 ml Gel	2 ml Gel
Anti-ApoE (poly) Goat	0,83 mg/ml	100 µl	50 µl
Anti-ApoJ (poly) Goat	1 mg/ml	40 µl	20 µl
Anti-Apo(a) (poly) Sheep	0,9 mg/ml	20 µl	10 µl

Tabelle 10: Konzentration der Antikörper in der Kreuzimmunelektrophorese

### 3.6 *Liquorparameter*

Die Standardparameter des Liquors wie:

Gesamtprotein	bis 0,460 g/l	(Muser 1996)
Albumin	bis 0.350 g/l	(Muser 1996)
IgG	10 - 40 mg/l	(Muser 1996)
IgA	1,5 – 6 mg/l	(Muser 1996)
IgM	<1 mg/l	(Muser 1996)
Glucose	ca. 50 – 60 % des Serumwertes	(Reiber 1988)
Zellzahl	bis 5/ $\mu$ l	(Reiber 1988)

wurden von dem jeweiligen Liquorzentrallabor bestimmt und für diese Arbeit nur als Daten übernommen. So wurde zur Berechnung des Reiber-Quotienten die Konzentration von IgG und Albumin in Liquor und Serum ermittelt (Behring Nephelometer). Der Nachweis oligoklonaler IgG im Liquor erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung und Silberfärbung (Phast-System; Pharmacia). Die Bestimmung der Zellzahl wurde manuell mit Hilfe einer Zählkammer durchgeführt.

#### 3.6.1 **Reiber-Quotienten**

Das heute wohl aussagekräftigste Verfahren zur zahlenmäßigen Erfassung von intrathekal produzierten Immunglobulinen wurde 1987 von H. Reiber am Neurochemischen Labor in Göttingen entwickelt. Die ursprünglich vorgeschlagene graphische Darstellung von  $Q_{\text{Alb}}$  gegen  $Q_{\text{IgG}}$  konnte mittels empirisch gewonnener Liquorproteindaten verfeinert werden. Mit den zugehörigen klinischen Daten und Diagnosen führt dies zu einer exakteren, mathematischen Formulierung (Gleichung 1), deren graphische Darstellung den Grenzverlauf einer lokalen Immunglobulinsynthese in Abhängigkeit vom jeweiligen Schrankenzustand beschreibt. Werte oberhalb der  $Q_{\text{lim}}$ -Kurve deuten auf eine intrathekale Immunglobulinsynthese (Muser 1996).

$$Q_{\text{lim}} = a/b (Q_{\text{Alb}}^2 + b^2)^{-2} - c \quad (\text{Gleichung 1})$$

Ein weiterer Vorteil der graphischen Darstellung liegt in einer schnelleren Übersicht über den Zustand der Schrankenfunktion und der lokalen Immunreaktion. Durch die Korrelation der Liquorresultate mit ihren klinischen Befunden konnten im Reiberschema vier, diagnostisch relevante Zonen festgelegt werden (Reiber 1988):

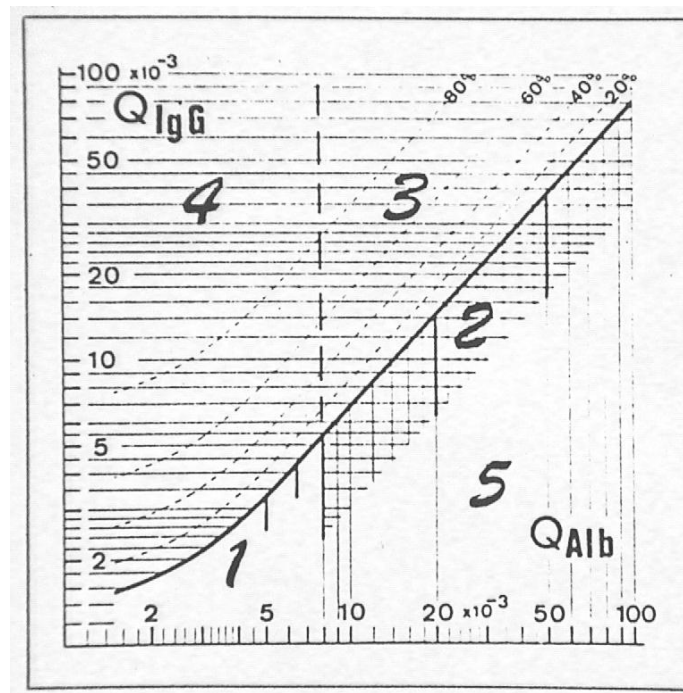


Abbildung 7: Liquor/Serum-Quotientendiagramm für IgG (Reiber et al. 1987)

- Zone 1 normaler Liquorbefund
- Zone 2 reine Schrankenfunktionsstörung
- Zone 3 kombinierte Schrankenfunktionsstörung und entzündlicher ZNS-Prozeß
- Zone 4 reine entzündliche Reaktion
- Zone 5 Entnahme- oder analytische Fehler

Das in Abbildung 7 dargestellt Liquor/Serum-Quotientendiagramm beschreibt den Grenzverlauf einer lokalen Immunglobulinsynthese in Abhängigkeit vom jeweiligen Schrankenzustand. Fälle mit lokaler IgG-Synthese im ZNS liegen oberhalb der dick gezeichneten Linie. Werte darunter kommen durch passive Diffusion von Serum-IgG in den Liquor zustande.

### 3.6.2 Nachweis oligoklonaler Immunglobuline im Liquor durch isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung wandert das zu fraktionierende Proteingemisch in einem stabilen pH-Gradienten. Dadurch wird jedes Protein an seinem isoelektrischen Punkt, an dem die Summe der Nettoladungen gleich null ist, fokussiert. Dieser Effekt bewirkt eine im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Trennverfahren unerreicht hohe Auflösungskraft und Empfindlichkeit. Infolge dieser hohen Auflösungskraft werden zahlreiche Proteine in eine große Anzahl von Untereinheiten getrennt (Stibler 1978).

In einem oligoklonalen IgG-Muster sind die Banden nach IEF mit unterschiedlichen Abständen scheinbar regellos über den gesamten pH-Bereich des IgG verteilt, wenn auch meist mit kathodischer Betonung. Unter der Voraussetzung, daß eine im Rahmen einer entzündlichen ZNS-Erkrankung ablaufende Immunglobulinproduktion nur gegen eine begrenzte Zahl von Antigenen gerichtet (also oligoklonal) ist, kann davon ausgegangen werden, daß immer oligoklonales IgG im Liquor gefunden wird, wenn quantitativ eine eindeutig lokale IgG-Produktion nachzuweisen ist (Schipper 1988).

Die IEF-Methodik erlaubt eine visuelle Gegenüberstellung von Liquor- und Serum-IgG auf demselben Gel bei sehr hoher Auflösung. Hierzu werden gleiche Mengen IgG aufgetragen. Das exklusive Auftreten zusätzlicher IgG-Banden im Liquor wird als oligoklonale Zonierung bezeichnet.

Durch die Anwendung hochempfindlicher, teilautomatisierter Mikro-IEF-Techniken und Silberfärbungen kann die erforderliche Liquormenge erheblich reduziert werden. Die Silberfärbung ist eine Methode, um Proteine auf eine Polyacrylamidgel anzufärben.

### **3.7      *Statistische Methoden***

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen wurden mit folgendem Computerprogramm durchgeführt:

BiAS Version 5.02  
Hanns Ackermann  
Epsilon-Verlag  
Hochheim-Darmstadt

Nachfolgende werden die hier verwendeten Statistikmethoden beschrieben:

#### **3.7.1      *Chi<sup>2</sup>-Test für die CxR-Kontingenztafel***

Der Test prüft die Abhängigkeit von mindestens zwei kategorialen Merkmalen.

Mit dieser Methode werden Gruppen, die sich in mindesten zwei Merkmalen unterscheiden, miteinander verglichen. Hier in dieser Arbeit wurden die Verteilung der ApoE-Phänotypen von gemessenen Proben und in der Literatur veröffentlichten Daten verglichen. Bei zu schwacher Probenzahl ist der Test nicht durchführbar, als Alternative kann der Test von Haldane und Dawson angewendet werden.



### 3.7.2 Haldane-Dawson-Test

Der Test untersucht für mehr als fünf Zeilen und Spalten die gleichen Fragestellungen wie der Chi<sup>2</sup>-Test und kann auch bei Vorliegen von zu kleinen erwarteten Häufigkeiten durchgeführt werden.

### 3.7.3 Kruskal-Wallis

Vergleich mehrerer Gruppen z.B. Behandlungsgruppen bezüglich mindestens einer ordinalskalierten Zielgröße.

Unterscheiden sich  $k = 6$  ApoE-Phänotypen bezüglich der Konzentration eines Apolipoproteins? An den Test schließen sich multiple (paarweise) Vergleiche der Gruppen nach Dunn an.

## 4 Ergebnis

### 4.1 Astrozyten

#### 4.1.1 Astrozytenisolation

Das im Gehirn bzw. im Liquor nachweisbare ApoE wird wie von Boyles et al. 1985, Pitas et al. 1987 und Poirier et al. 1993 beschrieben von den Astrozyten synthetisiert und über Vesikel in die Neuronen transportiert. Aus Tumorgewebe eines Astrozytoms wurden Zellen isoliert. Bei einer solchen Isolation werden neben Astrozyten auch andere Zellen wie Oligodendrozyten, Fibroblasten oder Neuronen gewonnen. Die isolierten Zellen wurden deshalb mit dem "Neural Cell Typing Set" typisiert. Mit diesem Test können Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Fibroblasten durch Detektion mit spezifischen Antikörper gegen NF160 (Neurofilament 160kD), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), GalC (Galactocerebroside), Vimentin und Fibronectin eindeutig voneinander unterschieden werden. Aus elf Tumoren wurden fünf Astrozyten-, fünf Oligodendrozytenlinien sowie eine Fibroblastenkultur isoliert (siehe Tabelle 11).

Tumor-Nr.	Zellart	ApoE-Genotyp
T0	Astrozyten	3/3
T1	Oligodendrozyten	3/3
T2	Astrozyten	2/2
T3	Oligodendrozyten	3/3
T4	Oligodendrozyten	4/3
T5	Astrozyten	3/3
T7	Oligodendrozyten	3/3
T8	Astrozyten	3/3
T9	Fibroblasten	-
T10	Astrozyten	3/3
T11	Oligodendrozyten	-

Tabelle 11: Primärkulturen aus Tumorgewebe

#### 4.1.2 Nachweis des ApoE in den Astrozyten

Die Astrozyten wurden mit einem Antikörper gegen ApoE angefärbt. Das ApoE konnte im Cytoplasma perinuclear im Golgi-Apparat (Pitas et al. 1986) sowie in der Zellmembran der Ausläufer nachgewiesen werden.

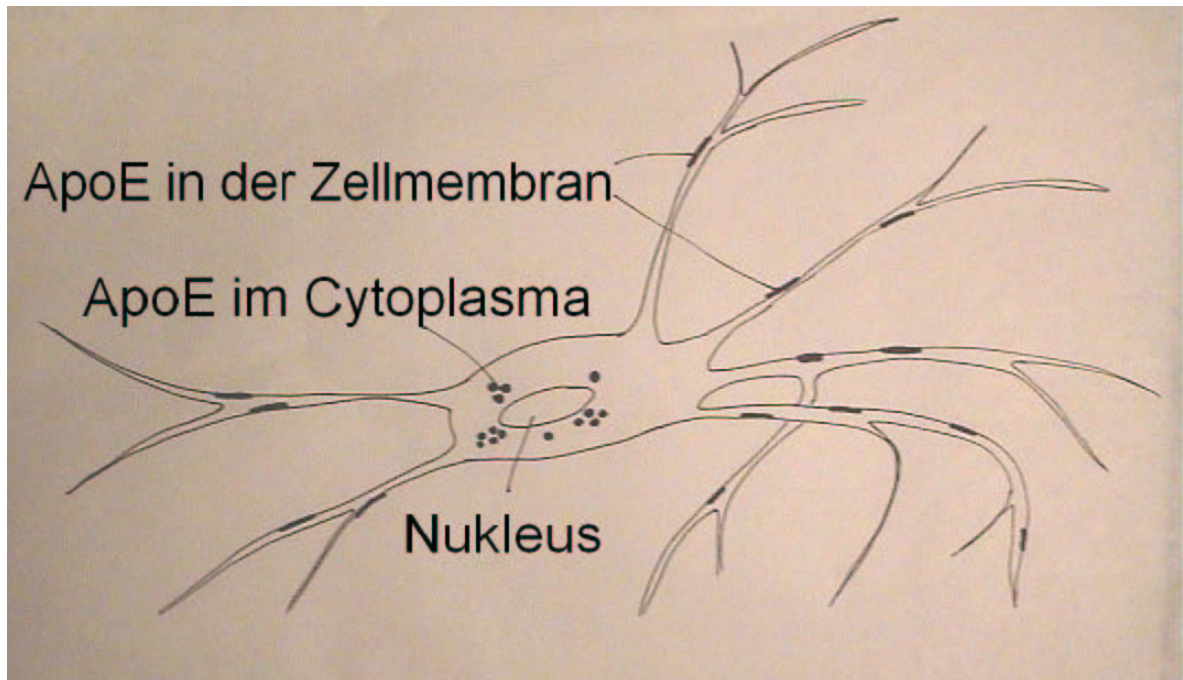


Abbildung 8: ApoE-Lokalisierung im Astrozyten

Das von den Astrozyten synthetisierte ApoE wird im Gehirn an die umgebende Flüssigkeit - den Liquor cerebrospinalis - abgegeben. Die These, daß die Astrozyten in Kultur das ApoE an das Kulturmedium abgeben, wurde in dieser Arbeit überprüft. Dazu wurde der ApoE-Gehalt des Kulturmediums mit Hilfe des ApoE-ELISAs (siehe Material und Methoden Abschnitt 3.3.5) bestimmt. Im Kulturmedium einer dichtbewachsenen Kulturflasche lies sich jedoch kein ApoE nachweisen. Nachdem in der stationären Phase kein ApoE ins Medium sezerniert wurde, sind Zellen in der Wachstumsphase untersucht worden. Aber auch in dieser Phase konnte kein ApoE im Medium nachgewiesen werden.

Da die Konzentration des ApoE in diesem Kultursystem eventuell zu gering für den ELISA war, wurden die Proteine des Kulturmediums durch alkoholische Fällung bzw. Ultrazentrifugation mit der Dichte 1,23 kg/l ankonzentriert. Bei diesen Bedingungen waren alle in der Probe enthaltenen Lipoproteine im Überstand. Auch in diesem so behandelten Kulturmediumkonzentrat war sowohl für die stationäre Phase als auch für die Wachstumsphase kein ApoE detektierbar. Bei dem ebenfalls mit dieser Ultrazentrifugationsmethode ankonzentrierten Liquorpool wies der ApoE-ELISA einen Konzentrationsanstieg von 0,4 mg/dl vor der Ultrazentrifugation auf 2,5 mg/dl nach dem UZ-Lauf nach.

Nachdem weder in der Wachstumsphase noch in der stationären Phase der Zellen ApoE im Kulturmedium zu messen war, sollte die Synthese des ApoE durch PMA (10 ng/ml und 100 ng/ml) und DMSO (100 ng/ml) stimuliert werden. Da DMSO in

höheren Konzentrationen toxisch für lebende Zellen ist, mußte der LDH-Wert im Kulturmedium bestimmt werden. In Notsituationen sezernieren Zellen in erhöhtem Masse LDH, deshalb kann man durch eine Konzentrationsmessung der LDH die Lebensqualität der Zellen kontrollieren. Die LDH-Konzentration lag bei allen Ansätzen bei 20 U/l und war damit im Normbereich, d.h. die Zellen waren gesund und nicht durch das DMSO geschädigt. Trotz der Stimulation ließ sich kein ApoE im Medium nachweisen.

Als nächstes sollte durch Zugabe von Liquor bzw. Lipofundin (200 bzw. 300 mg/dl) die ApoE-Produktion stimuliert werden. Die Zellen wuchsen sowohl nach der Zugabe von Liquor als auch nach der Zugabe von Lipofundin langsamer.

In einem weiteren Versuch wurden 2 bzw. 20 mg/ml Lipofundin nach einer Synchronisation des Zellwachstums durch 24-stündigen FKS-Entzug zugegeben. Wiederum war mit Hilfe des ApoE-ELISAs (Kapitel 3.3.9) kein ApoE meßbar.

Als weitere Erklärung für die nicht nachweisbare ApoE-Synthese wurde eine direkte Wiederaufnahme durch den LRP-Rezeptor und anschließende Weiterverarbeitung in den Zellen untersucht. Durch Zugabe von  $\alpha$ -Makroglobulin\* wurde der LRP-Rezeptor, der für die Wiederaufnahme von sezerniertem ApoE durch die Zelle verantwortlich ist, gehemmt. Die synchronisierten Zellen wurden wie in dem voranbeschriebenen Ansatz mit 2 bzw. 20 mg/dl Lipofundin stimuliert. Aber auch jetzt war kein ApoE meßbar.

Neben der zu geringen Syntheserate des ApoE oder einer direkten Wiederaufnahme durch die Zellen wurde als nächste These untersucht, ob eine sich im Medium befindliche bzw. von den Zellen selbst sezernierte Protease, das neu entstandene ApoE sofort wieder abbaut. In dem folgenden Versuch wurde eine sich eventuell im Kulturmedium bzw. von den Zellen sezernierte Protease mit 10 ng/ml PMSF gehemmt. Erneut wurde kein ApoE gefunden.

Da es keine direkte Vorstellung von der hier vielleicht arbeitenden Protease gab, wurde in dem nächsten Ansatz eine Proteaseninhibitorenmischung verwendet. Diese Mischung hemmt die meisten Proteasen. Die Proteaseninhibitorenmischung bestand aus Leupeptin (2,5  $\mu$ mol/ml), Trasylol = Aprotinin (5000 K/l) und Pefabloc SC (1 mM). Nach dieser Inkubation ließ sich ApoE im Kulturmedium nachweisen. Doch waren die ermittelten ApoE Konzentrationen von 21 ng/dl noch außerhalb des Meßbereichs des ApoE-ELISAs. Es läßt sich also auch jetzt nicht mit Bestimmtheit folgern, daß die Astrozyten unter diesen Kulturbedingungen ApoE

produzieren. Es war nicht möglich diese eventuelle Synthese durch längere Inkubation, mehr Zellen im Kulturansatz oder höhere Inhibitorenkonzentrationen zu steigern.

Anschließend wurde der Zugabezeitpunkt der oben beschriebenen Inhibitorenmischung variiert. Dabei zeigte sich, daß eine direkte Zugabe der Proteaseinhibitoren beim Aussäen das Anwachsen der Zellen an die Wand der Kulturflasche verhindert. Auch hier ließ sich kein ApoE bestimmen.

Unterschiede in der Syntheserate des ApoE könnten durch den ApoE-Genotyp verursacht werden. Um dies zu untersuchen, wurden die Primärkulturen genotypisiert. Bei den untersuchten neun Kulturen konnte dem Tumor T2 der Phänotyp ApoE 2/2, dem Tumor T4 der Phänotyp ApoE4/3 und den anderen Tumoren der Phänotyp ApoE 3/3 (siehe Tabelle 11, Kapitel 4.1.1) zugeordnet werden.

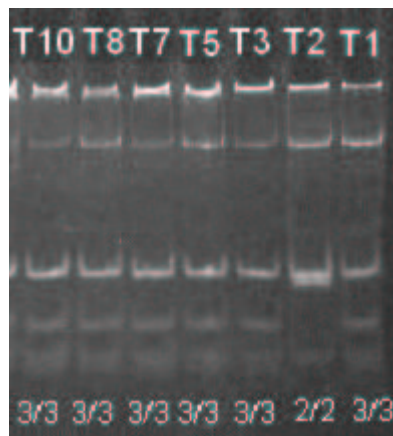


Abbildung 9: ApoE-Genotypisierung der Astrozyten-Zelllinien

Um die Meßempfindlichkeit des ApoE-ELISAs zu umgehen, wurde der Zellkulturüberstand nach Ankonzentrierung über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt, gebロットet und das ApoE detektiert. Der Kulturüberstand der Astrozyten wurde zur Ankonzentrierung einer alkoholischen Fällung unterzogen und das Pellet direkt in Polyacrylamidgelprobenpuffer aufgenommen. Diese Proben wurden in einem Polyacrylamidgel mit einem Gradienten von 3 % bis 15 % aufgetrennt (Kapitel 3.3.3). Die aufgetrennten Proben wurden mit Hilfe eines Elektroblots auf eine Nitrozellulosemembran ( Porengröße 0,45 µm) übertragen. Anschließend wurden die Proben mit dem Anti-ApoE-Antikörper detektiert. Dabei zeigte sich, daß in dem Kulturmedium der Astrozyten ApoE vorhanden ist, wohingegen in unbenutztem Medium kein humanes ApoE nachweisbar war (Abbildung 10).

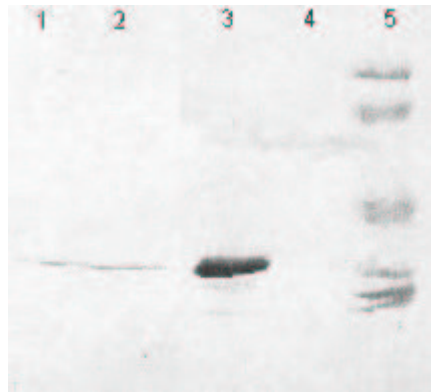


Abbildung 10: ApoE-Blot

In Bahn 1 und Bahn 2 wurde Astrozytenkulturmedium aufgetragen. Bahn 3 enthielt Liquor. Bahn 4 zeigt unbenutztes Medium und Bahn 5 einen Größenmarker.

In den Bahnen 1 und 2 kann man deutlich in der gleichen Höhe wie in Bahn 3 eine Bande erkennen. Da dieser Blot mit einem Antikörper gegen Apolipoprotein E detektiert wurde, handelt es sich bei diesen Banden um ApoE. In dem unbenutzten Medium ließ sich kein Medium nachweisen.

#### **4.2 Apo(a)-Typisierung in Serum und Liquor**

Nach der Methode von Marcovina et al. 1993 bzw. Kamboh et al. 1991 wurde das Apolipoprotein (a) des Serums typisiert. Dabei reichte die in dem Artikel von Marcovina et al. 1993 beschriebene Nachweisempfindlichkeit von 6,5 µg/µl nicht aus, um die meisten Serumproben zu typisieren. Der größte Teil der kaukasischen Bevölkerung besitzt eine Apo(a)-Serumkonzentration von ca. 10 mg/dl. Dies entspricht 0,1 µg/µl und ist damit für diese Methode zu schwach konzentriert. Es war nur möglich Proben mit hohen Serumkonzentrationen (>50 mg/dl) eindeutig auf dem Blot zu erkennen.

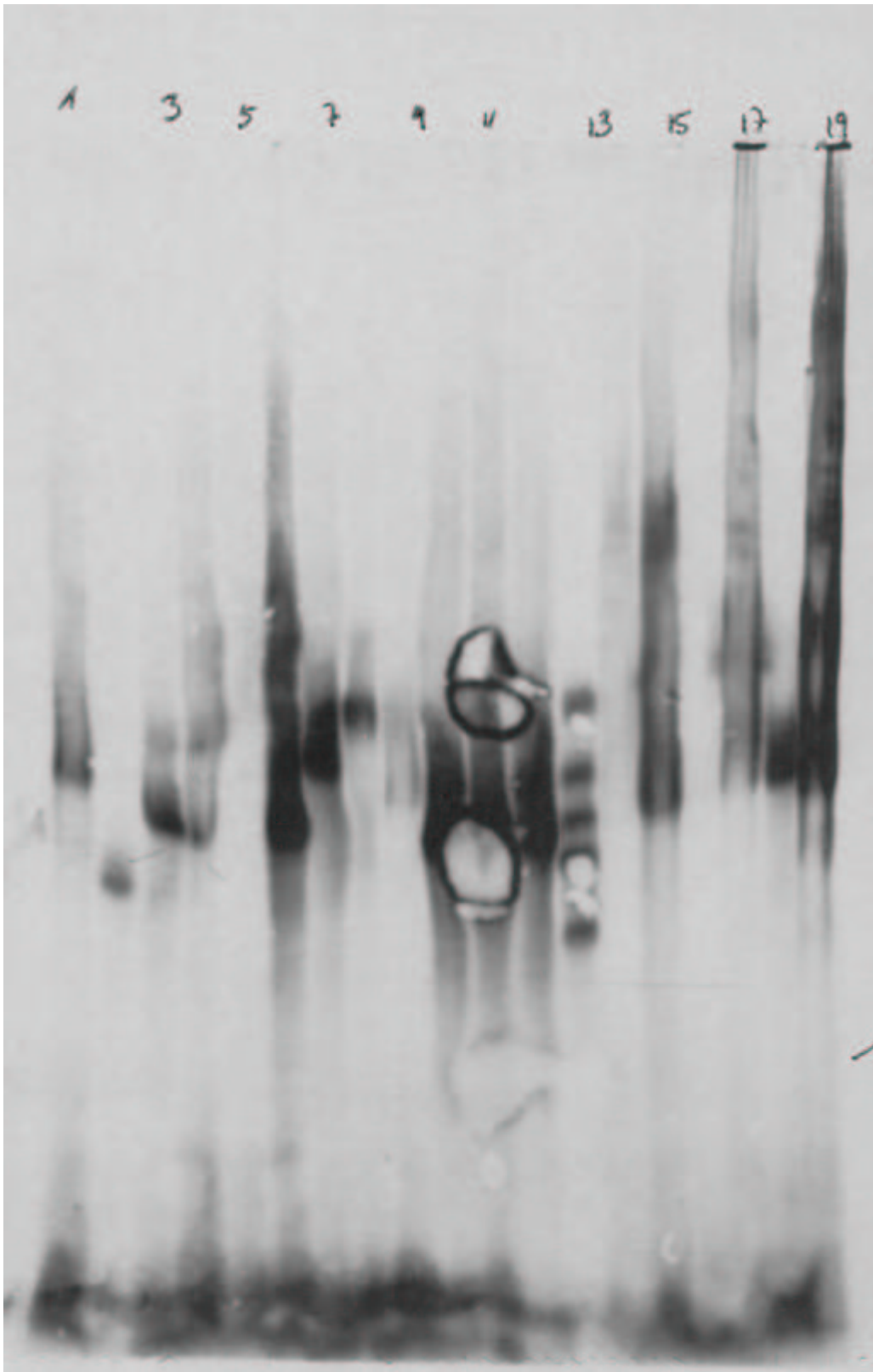


Abbildung 11: Apo(a)-Typisierung von Serum

Abbildung 11 zeigt die Apo(a)-Typisierung verschiedener Serumproben. Bahn 13 enthielt den Lp(a)-Standard mit verschiedenen Apo(a)-Isoformen.

Da es bekannt ist, daß die Liquorkonzentration von Apo(a) sehr gering ist (Tomlinson et al. 1989), war eine direkte Adaptation der obengenannten Methode nicht möglich. Die Liquorproben wurden deshalb einer alkoholischen Fällung unterzogen und anschließend direkt im Probenpuffer aufgenommen. Durch diese Ankonzentrierung war es möglich, auch Liquor nach dem obigen Verfahren zu typisieren.

Trotz der Ankonzentrierung setzte die Liquor-Apo(a)-Konzentration oftmals der Bestimmung Grenzen. Nur bei den Proben mit hohen Liquor-Apo(a)-Konzentrationen war eine Typisierung erfolgreich möglich. Die Typisierung der wenigen Proben mit hoher Apo(a)-Liquor-Konzentration führte jedoch zu keinem statistisch aussagekräftigen Ergebnis.

Bei Patienten mit Serum- und Liquorproben konnte aber bestätigt werden, daß sich Serum und Liquor im Apo(a)-Phänotyp nicht unterscheiden. Da sowohl Leber wie auch Gehirn über die gleiche genetische Information verfügen, bestätigte dieses Ergebnis die Erwartungen.

### **4.3      *Liquoruntersuchungen***

Für diese Arbeit wurden insgesamt 746 Liquorproben untersucht. 641 Proben wurden von dem Universitätsklinikum Frankfurt zur Verfügung gestellt. 105 Proben wurden von der Universität Dresden bereitgestellt. Bei 604 Proben wurde die ApoE-Konzentration, bei 357 die ApoJ-Konzentration und bei 211 die Apo(a)-Konzentration bestimmt. Von den Proben, die zur Apo(a)-Konzentrationsbestimmung eingesetzt wurden, besaßen aber nur 98 eine verwertbare Konzentration. 113 Proben hatten eine Apo(a)-Konzentration, die unter der Nachweisgrenze von 8 µg/ml des eingesetzten ELISAs lag. Die Konzentration des neu entdeckten Apo(a)/E-Partikels des Liquors wurden mit einem selbstentwickelten ELISA (Kapitel 3.3.9) in 283 Proben bestimmt. Darüberhinaus konnte bei 184 Proben mit einem ebenfalls neu aufgebauten ELISA die ApoJ/E-Konzentration ermittelt werden. Weiterhin wurde bei 500 Proben der ApoE-Phänotyp festgestellt.

Von einigen ausgesuchten Proben von Patienten mit MS, MS-Verdacht oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen wurde im Zentrallabor der Universität Dresden die Konzentration des Proteins Tau bestimmt.



### 4.3.1 ApoE-Phänotypen

ApoE-Phänotyp	2/2	3/2	4/2	3/3	4/3	4/4
Anzahl	4	131	7	277	77	4
%	0,8	26,2	1,4	55,4	15,4	0,8
Literatur %	1,0	12,0	1,5	59,8	22,9	2,8

Tabelle 12: ApoE-Phänotypen (Literaturwerte: Utermann 1987)

Patienten, die den ApoE-Phänotyp 3/3 ausprägten, waren mit 55,4 % am häufigsten. Als nächstes folgten Patienten mit ApoE 3/2 = 26,2 % und ApoE 4/3 = 15,4 %. Die Formen ApoE 4/2 (1,4 %), ApoE 2/2 und ApoE 4/4 (je 0,8 %) waren, wie der Vergleich mit den Literaturwerten von Utermann 1987 zeigte, sehr selten (siehe Tabelle 12).

Die Häufigkeit der Phänotypen 3/3, 4/2 und 2/2 stimmte mit den obengenannten Literaturwerten überein. Der ApoE-Phänotyp 3/2 war doppelt so häufig vertreten wie in der Literatur beschrieben. Wohingegen der Phänotyp 4/3 nur  $\frac{3}{4}$  und der Phänotyp 4/4 sogar nur  $\frac{1}{3}$  der in der Literatur beschriebenen Häufigkeit hatte. Zur Bestimmung der Signifikanz der Abweichung der hier bestimmten Verteilung vom Literaturwert (Utermann 1987), wurde die CxR-Kontingenztafel mit Chi<sup>2</sup>-Test zur statistischen Auswertung verwendet. Unter Vernachlässigung der Tatsache, daß mehr als  $\frac{1}{5}$  der Felder eine zu kleine Erwartungshäufigkeit für die CxR-Kontingenztafel mit Chi<sup>2</sup>-Test besaßen, ließ sich Chi<sup>2</sup> = 8,4 mit p = 0,137 ermitteln. Bei zu geringen Gruppengrößen liefert der Chi<sup>2</sup>-Test keine zuverlässigen Werte. Es wurde daher der Test von Haldane und Dawson verwendet. Dies ergab: U = 1,2 und p = 0,116. Beide Auswertmethoden zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der in dieser Arbeit nachgewiesenen Verteilung und den Literaturangaben.

Aus Tabelle 12 lies sich nun die Allelverteilung ermitteln:

ApoE-Allel	ε2	ε3	ε4
Anzahl	146	762	92
Prozent	14,6	76,2	9,2
Literatur %	7,7	77,3	15,0

Tabelle 13: Apo E – Allelverteilung (Literaturwerte: Utermann 1987)

Hierbei zeigte sich, daß das  $\epsilon$ 3-Allel mit 76 % in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten ist. Das  $\epsilon$ 2-Allel war mit 15 % wesentlich seltener aber noch deutlich häufiger als das  $\epsilon$ 4-Allel mit 9 % vertreten. Im Vergleich mit Literaturdaten ist in dem untersuchten Kollektiv das  $\epsilon$ 2-Allel doppelt so oft und dafür das  $\epsilon$ 4-Allel nur halb so oft anzutreffen. Die hier bestimmte Verteilung unterscheidet sich mit  $\text{Chi}^2 = 3,6$  und der Wahrscheinlichkeit  $p = 0,16$  aber trotzdem nicht signifikant von den Literaturwerten.

#### 4.3.2 Konzentrationsmessung einzelner Apolipoproteine im Liquor

##### 4.3.2.1 ApoE-Konzentration

Die durchschnittliche ApoE-Konzentration aller 604 untersuchten Proben lag bei 0,553 mg/dl. Anschließend wurde noch für jeden ApoE-Phänotyp der Durchschnittswert und die zu jedem ApoE-Phänotyp gehörende ApoE-Verteilung ermittelt.

ApoE-Phäno.	Gesamt	2/2	3/2	3/3	4/3	4/2	4/4	?/?
Anzahl	604	4	100	233	60	6	3	198
Konz. [mg/dl]	0,553	0,595	0,552	0,660	0,670	0,624	0,953	0,395

Tabelle 14: ApoE-Konzentrationsverteilung

Bei einer ApoE-Phänotyp-spezifischen Auswertung der ApoE-Konzentration zeigte sich, daß die Proben, die ein Apo  $\epsilon$ 4-Allel enthielten, höhere Konzentrationen aufwiesen. Die Proben mit dem Apo  $\epsilon$ 2-Allel besaßen dagegen Konzentrationen im Bereich des Durchschnittswertes von 0,553 mg/dl. Auch die Konzentration der ApoE-Proben mit dem Phänotyp 3/3 lag höher als die Durchschnittskonzentration. Auffallend ist, daß Proben mit unbestimmten ApoE-Phänotypen (??) deutlich vom Durchschnittswert abwichen. Die Konzentration der Proben mit dem Phänotyp 4/4 unterschied sich am deutlichsten von der Durchschnittskonzentration aller Proben (siehe Tabelle 14). Die Aussagekraft des ApoE-Konzentrationsdurchschnitts des ApoE-Phänotyps 4/4 ist gering, da er nur aus drei Einzelwerten ermittelt wurde.

In einem weiteren Ansatz sollte untersucht werden, ob sich die ApoE-Konzentrationen in Abhängigkeit vom ApoE-Phänotyp unterscheiden. Mit der statistischen Auswertung nach Kruskal-Wallis wurden die verschiedenen Einzelangaben gegeneinander verglichen und für jeden eine Signifikanz gesucht. Für die ApoE-Konzentrationen ergaben sich folgende p-Werte (siehe Tabelle 15):

<b>ApoE</b>	<b>2/2</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>	<b>4/4</b>
<b>3/2</b>	0,67					
<b>3/3</b>	0,64	0,0002				
<b>4/3</b>	0,69	0,01	0,85			
<b>4/2</b>	0,74	0,31	0,96	0,99		
<b>4/4</b>	0,16	0,03	0,14	0,14	0,21	
<b>?/?</b>	0,17	0,00008	0	0	0,03	0,002

*Tabelle 15: Statistische Auswertung der ApoE-Konzentrationsverteilung*

Die grau unterlegten Werte stellen Signifikanzen der Durchschnittskonzentrationen dar, die aus sehr geringen Probenanzahl ( $n = 3$ ,  $n = 4$  bzw.  $n = 6$ ) berechnet wurden. Solche geringen Probenanzahlen ergeben keinen repräsentativen Durchschnittswert. Diese Auswertung zeigt, wie schon anhand der Konzentrationen festgestellt, daß die Proben, in denen der ApoE-Phänotyp nicht bestimmt werden konnte, sich signifikant von den anderen unterscheiden mit Ausnahme der ApoE2/2. Die Proben mit dem Phänotyp 3/2 unterscheiden sich ebenfalls von den anderen Phänotypen mit Ausnahme der ApoE2/2 und ApoE4/2, die aber aufgrund der wenigen Einzelwerte keinen repräsentativen Durchschnittswert ergeben hatten. Die ApoE-Phänotypen 3/3 und 4/3 unterschieden sich signifikant von den Proben mit unbekanntem Phänotyp ( $p \leq 0,05$ ).

Aufgrund der geringen Probenanzahl kann aus diesen Daten kein Rückschluß auf eine ApoE-Phänotyp abhängige Konzentrationsverteilung gezogen werden.

In der folgenden Abbildung wurde die ApoE-Konzentration gegen die Anzahl der Proben mit der entsprechenden Konzentration aufgetragen.

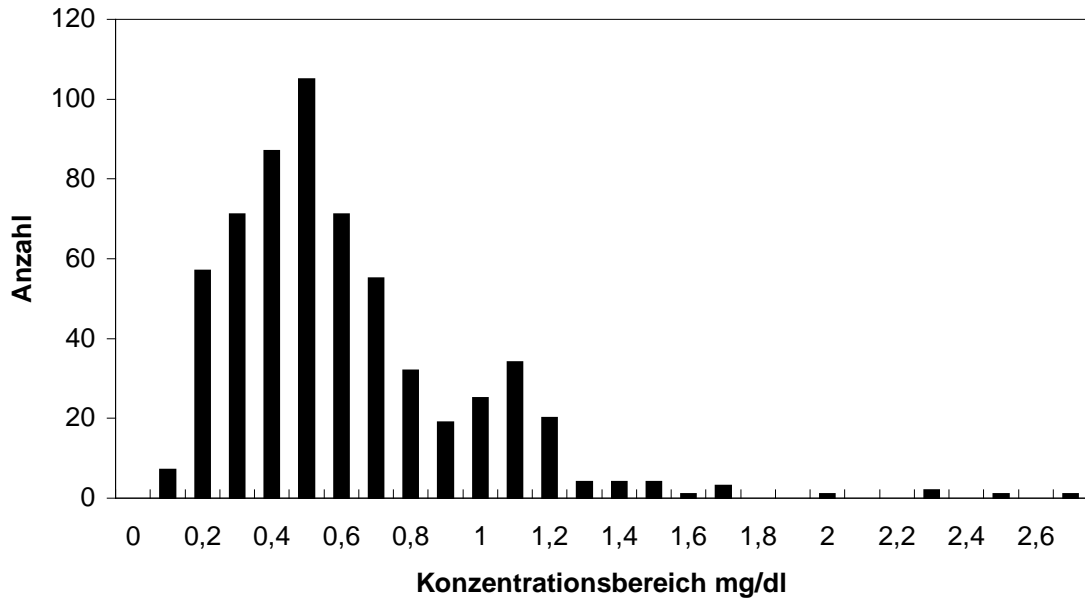


Abbildung 12: Konzentrationsverteilung des ApoE

Die meisten der hier untersuchten Proben besaßen eine ApoE-Konzentration von 0,5 mg/dl. Konzentrationen unter 0,2 mg/dl bzw. über 1,2 mg/dl traten sehr selten auf.

In Abbildung 13 ist diese Konzentrationsverteilung nach dem ApoE-Phänotyp aufgeschlüsselt worden.

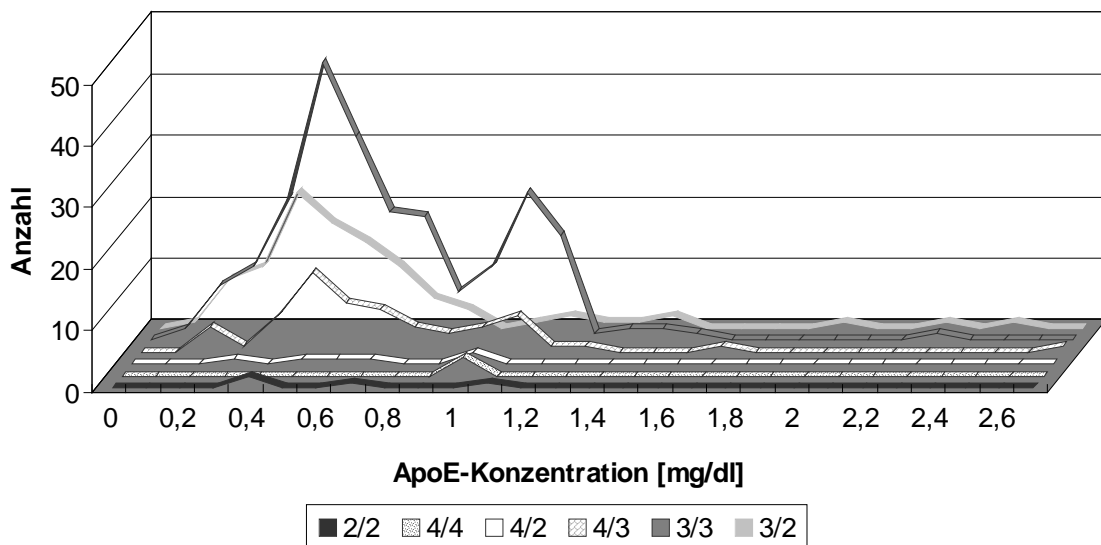


Abbildung 13: ApoE-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert

Betrachtet man die nach Phänotyp sortierten Werte, so weichen die Proben mit Phänotyp ApoE4/4 mit einem Maximum bei 1 mg/dl und die Proben mit Phänotyp ApoE3/2 mit einem zweiten Maximum bei 1,2 mg/dl deutlich von der Durchschnittsverteilung ab.

#### 4.3.2.2 ApoJ-Konzentration

Die ApoJ-Konzentration wurde im Liquor cerebrospinalis mit Hilfe eines selbstentwickelten ELISA (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.3.9) bestimmt. Da kein kommerziell erhältlicher Standard für ApoJ im Liquor verfügbar war, wurde ein Liquorpool hergestellt. Diesem wurde per Definition die Konzentration von 2,4 µg/ml zugeordnet. Diese Konzentration wurde aus den in der Literatur (Matsubara et al. 1995) veröffentlichten Angaben von 1,2 – 3,6 µg/ml errechnet. Bei der hier beschriebenen Auswertung (Tabelle 16) sollte untersucht werden, ob die Konzentration des ApoJ durch den ApoE-Phänotyp beeinflusst wird.

ApoJ	Gesamt	2/2	3/2	3/3	4/3	4/2	4/4	?/?
Anzahl	357	0	60	42	15	2	0	238
Konz. [µg/ml]	5,017	-	8,566	4,149	2,625	4,203	-	4,431

Tabelle 16: ApoJ-Konzentrationsverteilung

Der Durchschnittswert aller untersuchten Proben war deutlich höher als der Literaturwert mit 1,2 – 3,6 µg/ml (Matsubara et al. 1995). Bei den ermittelten Durchschnittswerten von ApoJ für die verschiedenen ApoE-Phänotypen zeigten sich deutliche Unterschiede. Die Proben mit dem ApoE-Phänotyp 3/2 lagen mit 8,566 µg/ml höher als der Literaturwert. Die Proben mit ApoE4/3 hatten eine Durchschnittskonzentration von 2,625 µg/ml. Dieser Wert unterschied sich nicht von dem dieser Auswertung zu Grunde liegenden Konzentrationswert des Standards (2,4 µg/ml).

Auch für diese Konzentrationsberechnung wurde wieder der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (Tabelle 17), in dem die ApoJ-Durchschnittskonzentrationswerte nach dem ApoE-Phänotyp sortiert gegeneinander ausgewertet wurden.

ApoE-Phänotyp	3/2	3/3	4/3	4/2
3/3	0,000006			
4/3	-	0,014		
4/2	0,25	0,91	0,28	
?/?	-	0,80	0,003	0,96

Tabelle 17: Statistische Auswertung der ApoJ-Konzentrationen nach ApoE-Phänotyp sortiert

Die grau unterlegten Felder zeigten Werte, die sich aus jeweils zwei Proben errechneten und daher nicht repräsentativ sind. Es zeigte sich deutlich ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit dem ApoE-Phänotyp 3/2 und dem Phänotyp 3/3, den Phänotypen 3/3 und 4/3 als auch den Phänotypen 4/3 und ?/?.

In Abbildung 14 wurde die ApoJ-Konzentration gegen Anzahl der Proben aufgetragen:

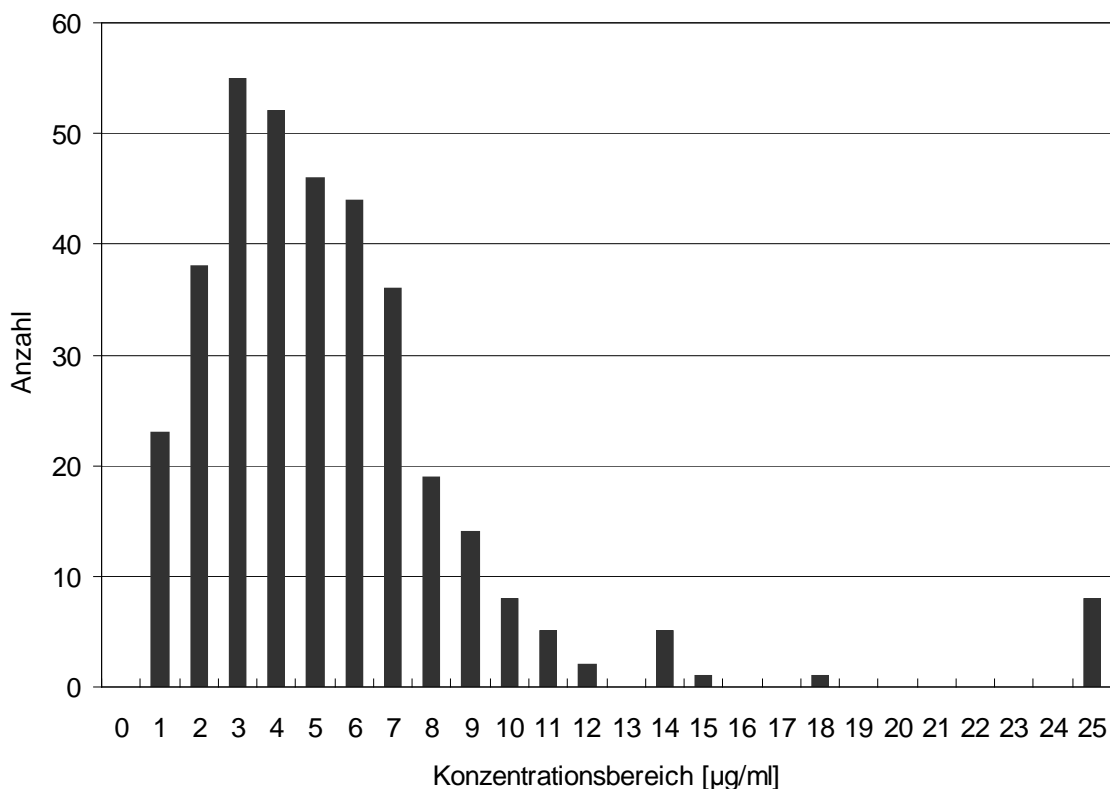


Abbildung 14: Konzentrationsverteilung des ApoJ

Die graphische Darstellung aller in dieser Arbeit bestimmten ApoJ-Konzentration hatte bei 3 µg/ml ihr Maximum. Einige Proben besaßen deutlich höhere Konzentrationen (bis zu 25 µg/ml).

Für jeden ApoE-Phänotyp wurde nochmals eine ApoJ-Konzentrationsverteilung erstellt (Abbildung 15):

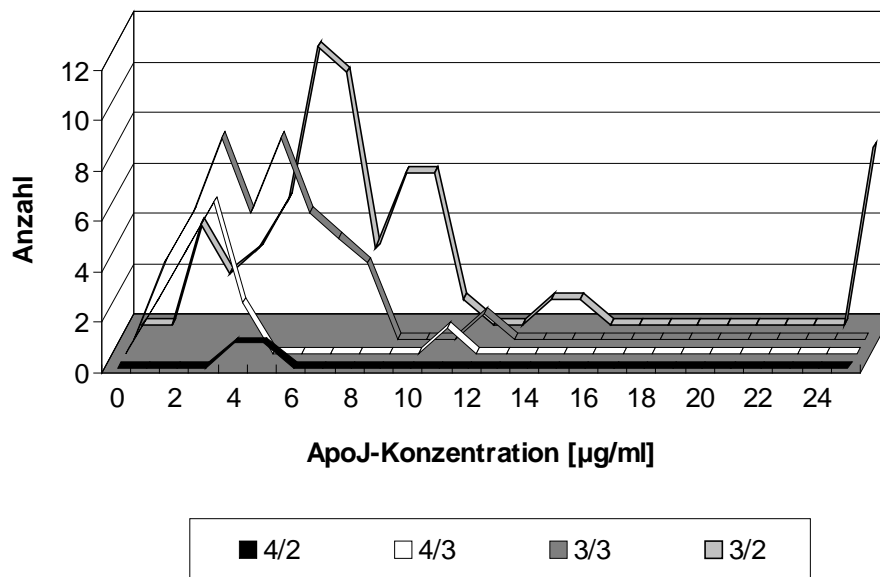


Abbildung 15: ApoJ-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert

Betrachtet man die Konzentrationswerte jetzt auf den ApoE-Phänotyp der Probe bezogen, so zeigte sich bei den Phänotypen 4/3, 3/3 und Phänotyp 3/2 deutlich ein Peak bei 3 µg/ml. Bei dem Phänotyp 4/2 lag der Peak bei 4-5 µg/ml. Beim Phänotyp 3/3 existierte ein zweiter, gleich großer Peak bei 6 µg/ml. Bei dem Phänotyp 3/2 lag der Hauptpeak bei einer Konzentration von 8 µg/ml. Ein weiterer folgte bei 16 µg/ml. Auch Proben mit dem Phänotyp 4/3 hatten einen zweiten Konzentrationspeak bei 11 µg/ml. Wohingegen die Proben mit dem Phänotyp 3/3 ein zweites Konzentrationsmaximum bei 12 µg/ml aufzeigten. Nur bei Proben mit dem Phänotyp 3/2 konnten ApoJ-Konzentrationen über 25 µg/ml gemessen werden.

#### 4.3.2.3 Apo(a)-Konzentration

Die Apo(a)-Konzentration wurde im Liquor cerebrospinalis mit Hilfe eines im Labor für Angewandte Biochemie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, entwickelten ELISA (siehe Material und Methoden, Kapitel 3.3.9) gemessen. Dieser ELISA wurde in dieser Arbeit an die geringeren Konzentrationsverhältnisse im Liquor cerebrospinalis angepaßt. Bei der in Tabelle 18 dargestellten Auswertung sollte untersucht werden, ob die Durchschnittskonzentration des Apo(a) durch den ApoE-Phänotyp beeinflusst wird.

Apo(a)	Gesamt	2/2	3/2	3/3	4/3	4/2	4/4	?/?
Anzahl	211	3	20	143	39	2	3	1
Konz. [mg/dl]	0,068	0,006	0,113	0,080	0,017	0,000	0,026	0,000

Tabelle 18: Apo(a)-Konzentrationsverteilung

Die Konzentration des Apo(a) im Liquor ist sehr gering. Der hier erzielte Durchschnittswert aller untersuchten Proben lag mit 0,068 mg/dl unerwartet hoch. Dies ergibt sich aus dem für den ApoE-Phänotyp 3/2 erhaltenen Konzentrationswert von 0,113 mg/dl und dem für ApoE 3/3 erhaltenen Wert von 0,08 mg/dl. Die für die anderen ApoE-Phänotypen bestimmten Konzentrationen sind sehr viel niedriger.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Konzentrationen wurden wiederum nach der Methode von Kruskal-Wallis statistisch ausgewertet (Tabelle 19):

<b>ApoE-Phäno.</b>	<b>2/2</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>
<b>3/2</b>	0,60				
<b>3/3</b>	0,71	0,61			
<b>4/3</b>	0,86	0,11	0,06		
<b>4/2</b>	0,48	0,19	0,22	0,46	
<b>4/4</b>	0,19	0,23	0,13	0,05	0,06

*Tabelle 19: Statistische Auswertung der Apo(a)-Konzentrationsverteilung*

Bei dieser Auswertung ergab sich nur für den Vergleich von Phänotyp 4/3 zu 4/4 ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ). Für die Proben mit dem Phänotyp 4/2 im Vergleich zu Proben mit dem Phänotyp 4/4 bestand ein deutlicher aber kein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,1$ ).

Für jeden ApoE-Phänotyp wurde graphisch die Konzentration jeder Probe gegen die Anzahl der entsprechenden Proben dargestellt. In dieser Grafik sieht man Unterschiede in der Konzentrationsverteilung der jeweiligen ApoE-Phänotypen sehr gut (Abbildung 16).



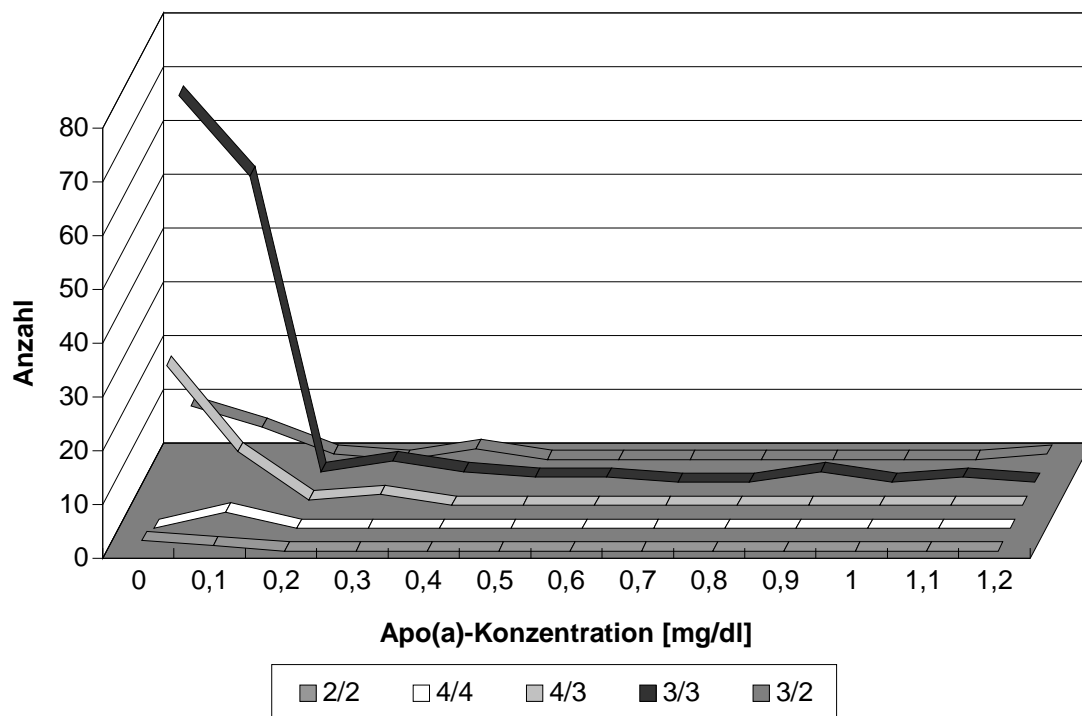


Abbildung 16: Apo(a)-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert

Ausnahmsweise wurden bei dieser Versuchsreihe auch Konzentrationen von 0 mg/dl angegeben. Wobei dies bedeutete, daß die zu messende Konzentration unter der Nachweisgrenze des ELISAs von 0,008 mg/dl lag.

Bei allen gemessenen Proben lagen 54 % der Proben unterhalb des Meßbereiches des ELISAs. Von den übrigen 98 Proben lagen unabhängig von ApoE-Phänotyp 79 % bei 0,1 mg/dl.

Bei den Apo(a)-Konzentrationen gab es keinen Unterschied in der Apo(a)-Konzentration in Abhängigkeit vom ApoE-Phänotyp.

#### 4.3.3 Entdeckung von Apolipoprotein-Partikeln im Liquor

In dem Artikel von Borghini et al. 1995 wurde beschrieben, daß zwei der hier ebenfalls untersuchten Apolipoprotein, ApoE und ApoJ, im Liquor cerebrospinalis zusammen in zwei Lipoproteinen vorkommen. Diesem Gedanken folgend, wurde die These aufgestellt, daß das ebenfalls im Liquor vorkommende Apo(a) auch mit den anderen Apolipoproteinen des Liquors komplexiert ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die in Material und Methoden (Kapitel 3.3.9) beschriebenen ELISAs kombiniert. Der Catcher-Antikörper war gegen das eine Apolipoprotein gerichtet. Der Detektor-Antikörper konnte das zweite Apolipoprotein erkennen. Mit

dem Aufbau konnten meßbare Konzentrationen in den Liquorproben ermittelt werden. Es gab keinen kommerziellen Standard für diese Apolipoprotein-Partikel. Deshalb wurden verschiedene Liquorproben gemischt und diesem „Standard“ eine Konzentration von 1 mg/dl per Definition zugeordnet. Durch eine Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt, die es ermöglichte, den untersuchten Liquorproben Konzentrationswerte zuzuordnen.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde ein ELISA gegen einen Apo(a)/E- und einen ApoJ/E-Partikel entwickelt. Mit beiden ELISAs konnten Partikel nachgewiesen werden, die aus mindestens zwei Apolipoproteinen bestehen. Bei beiden ELISAs wurde die Platte mit dem Antikörper gegen das seltener Apolipoprotein, ApoJ bzw. Apo(a) gecoated und anschließend gegen das im Liquor höher konzentrierte Apolipoprotein (ApoE) detektiert.

Versuchsweise wurde der Aufbau auch jeweils umgedreht. Es wurde also gegen das häufigere Apolipoprotein E gecoated und gegen das seltener Apo(a) bzw. ApoJ detektiert. Bei dieser Durchführung war, wie erwartet, kein meßbares Signal zu erhalten. In dieser Versuchsanordnung binden die ApoE-haltigen Teilchen, also auch solche, die das zweite nachzuweisende Apolipoprotein, Apo(a) bzw. ApoJ, nicht enthalten. Bei der anschließend erfolgenden Detektion wird das Signal des zweiten Antikörpers dadurch verdünnt (Abbildung 17). Wohingegen bei dem zuerst beschriebenen erfolgreichen Aufbau, mit dem gezielten Einsatz der Antikörper eine Verstärkung des Signals erreicht werden konnte.

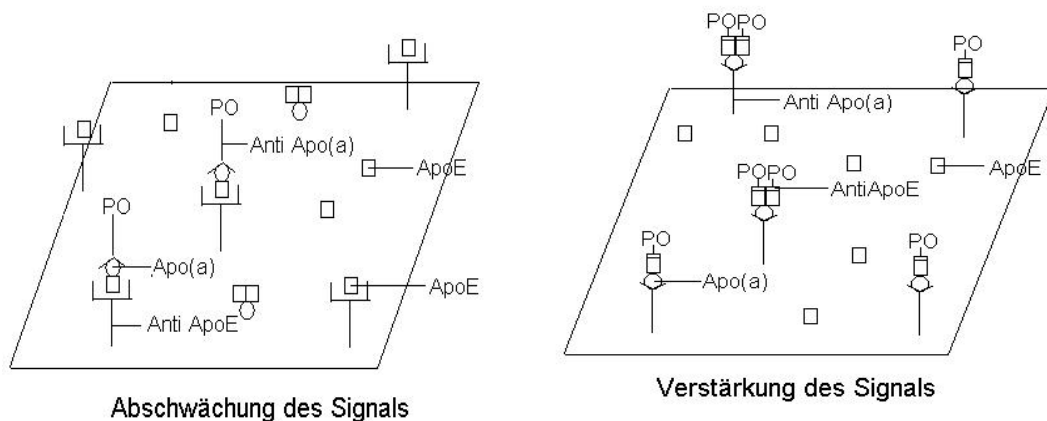


Abbildung 17: Aufbau der Partikel-ELISAs

Die in Abbildung 17 dargestellten Aufbaumöglichkeiten des Elisas zeigen, daß die linke Variante zu einer Abschwächung des Signals durch die Peroxidase führt. Wohingegen die zweite Zeichnung einen Aufbau zeigt, der zu einer Verstärkung des Signals führt. Die nicht über Antikörper an die Platte gebundenen Lipoproteine

werden in den verschiedenen Schritten des ELISAs entfernt und sind hier nur zur besseren Darstellung der Ausgangssituation aufgezeigt.

Als weiterer Nachweis, daß es sich dabei um Partikel aus beiden Apolipoproteinen handelt, wurde eine Kreuzimmunelektrophorese (siehe Kapitel 3.5) durchgeführt.

Bei dieser Methode wurde ein vertikales Gel auf eine Glasplatte gegossen. Das Gel bestand aus zwei Teilen, in die jeweils ein Antikörper eingegossen wurde. An einer Seite wurden Löcher eingestanzt, in die die Proben aufgetragen wurden (Abbildung 18).

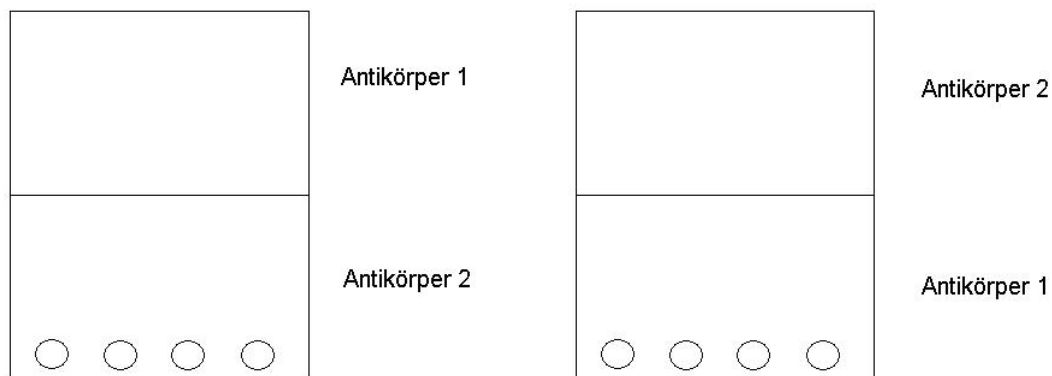


Abbildung 18: Versuchsaufbau bei der Kreuzimmunelektrophorese

Während des Gellaufes wanderten die Proben in das antikörperhaltige Gelmaterial. Dort reagierten die Proteine mit den im Gel eingegossenen Antikörpern. Proteine, die von den Antikörpern erkannt und gebunden wurden, konnten nicht weiter durch das Gel laufen und blieben an diesem Bindungsort liegen. Die restlichen Proteine wanderten weiter und gelangten in den zweiten Teil, in dem der Antikörper gegen das zweite Apolipoprotein eingegossen war. Auch dort reagierten die Proteine wieder mit den verwendeten Antikörpern.

Ein mögliches Ergebnis sah folgendermaßen aus:

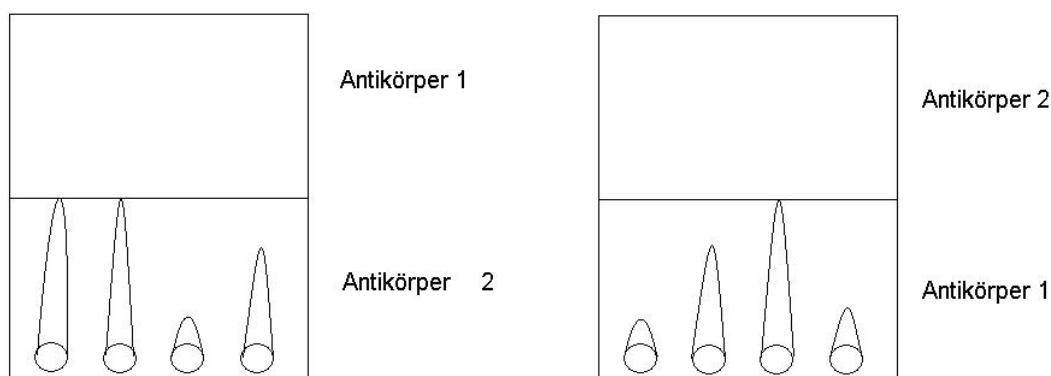


Abbildung 19: Mögliches Ergebnis der Kreuzimmunelektrophorese

Ein solches Ergebnis ließ sich erzielen, wenn beide gesuchten Proteine in der aufgetragenen Probe vorhanden waren. Bei beiden Ansätzen reagierten die Proteine bereits mit den zuerst verwendeten Antikörper. Da das Präzipitat jeweils nur mit dem ersten Antikörper zu erreichen war, bedeutet dies, daß die untersuchten Proteine fest aneinander gebunden sind. Wenn die Proteine aneinander gebunden sind, also Teil eines Partikels sind, ist die Folge, daß nach dem Binden eines der beteiligten Proteins automatisch auch das zweite mit ausfällt (Abbildung 19).

#### 4.3.3.1 Der Apo(a)/E-Partikel

Bei der Kreuzimmunelektrophorese des Apo(a)/E-Partikel waren, wie in dem obigen Beispiel erklärt, jeweils im ersten Teil der Gele Peaks zu erkennen (Abbildung 20). Daraus folgert, daß im Liquor ein Partikel existiert, der sowohl das Apolipoprotein E als auch das Apolipoprotein (a) enthält.

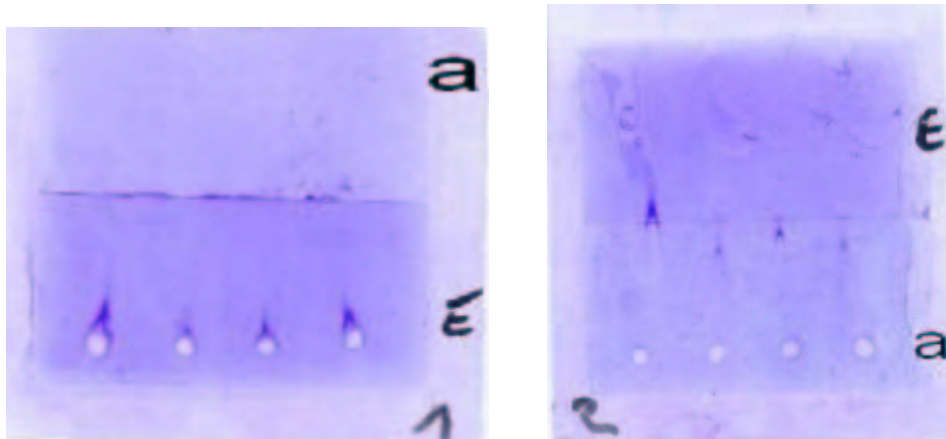


Abbildung 20: Kreuzimmunelektrophorese des Apo(a)/E-Partikels

#### 4.3.3.2 Der ApoJ/E-Partikel

Es wurde ebenfalls mit Hilfe der Kreuzimmunelektrophorese nachgewiesen, daß der bereits im ApoJ/E-ELISA gemessene Partikel wie schon von Borghini et al. 1995 postuliert, aus den Apolipoproteinen ApoJ und ApoE besteht. Auch bei diesen Kreuzimmunelektrophoresen war jeweils in dem ersten Gelbereich die Peaks zu erkennen (Abbildung 21). Dies bedeutet, daß das gesamte ApoE wie auch das gesamte ApoJ Bestandteile eines Partikels sind und nicht als freie Apolipoproteine vorkommen.

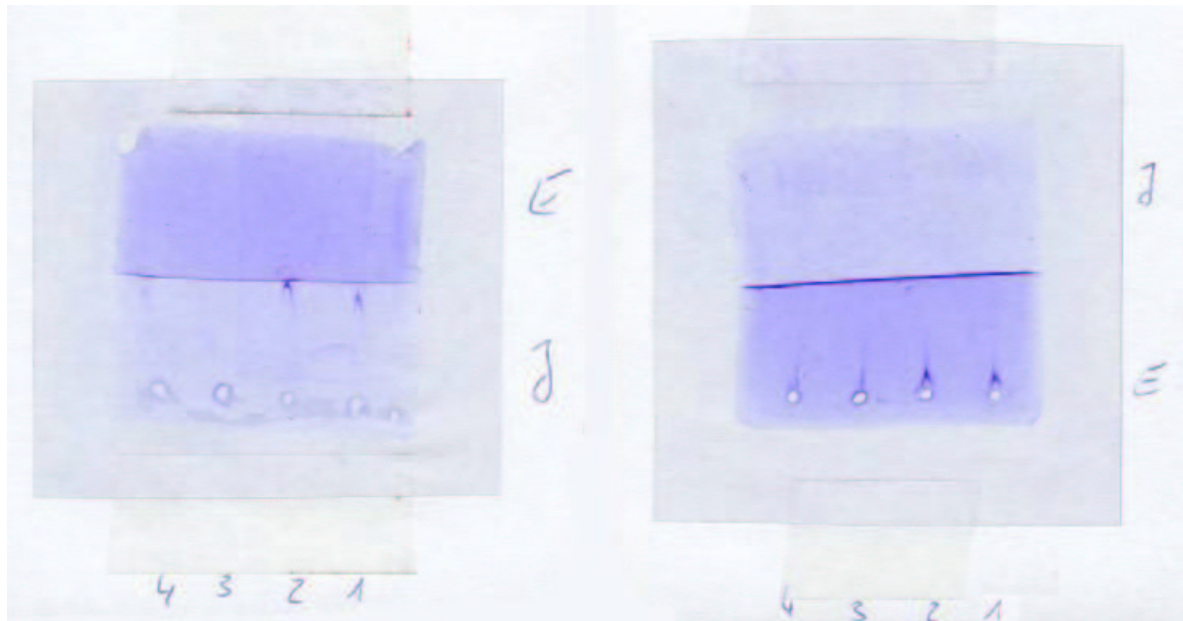


Abbildung 21: Kreuzimmunelektrophorese des ApoJ/E-Partikels

#### 4.3.4 Konzentrationsmessungen der Apolipoprotein-Partikel des Liquors

##### 4.3.4.1 ApoJ/E-Konzentration

Die Konzentration des ApoJ/E-Partikels wurde in 184 Proben bestimmt. Da für diesen Partikel kein kommerziell erhältlicher Standard verfügbar ist, wurde ein Liquorpool hergestellt, dem per Definition die Konzentration von 1 mg/dl zugeordnet wurde. Mit Hilfe dieses Standards wurden die Konzentrationen der Proben errechnet.

Jeweils die Durchschnittswerte sind in Tabelle 20 angegeben.

ApoJ/E	Gesamt	2/2	3/2	3/3	4/3	4/2	4/4	?/?
Anzahl	184	0	33	27	5	2	0	117
Konz. [mg/dl]	0,070	-	0,034	0,088	0,169	0,152	-	0,070

Tabelle 20: ApoJ/E-Konzentrationsverteilung

Der ApoJ/E-Partikel wies sehr unterschiedliche Durchschnittskonzentrationen für jeden ApoE-Phänotyp auf. Die Proben mit unbekanntem ApoE-Phänotyp entsprachen dem Durchschnitt über alle Proben. Die Proben mit dem Phänotyp 3/3 lagen nur minimal über dem in dieser Arbeit ermittelten Durchschnittswert. Proben von Patienten mit dem ApoE-Phänotyp 3/2 besaßen nur 50 % der Durchschnittskonzentration, wohingegen die Proben, die ein Apoε4-Allel aufwiesen, eine doppelt so hohe Konzentration wie der Durchschnittswert hatten.

Anhand der ermittelten Daten wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests bestimmt, ob der ApoE-Phänotyp die Durchschnittskonzentration des ApoJ/E-Partikels beeinflusst. Bei dieser Methode wird jede Gruppe mit der anderen verglichen. Damit ergaben sich für  $p$  folgende Werte:

<b>ApoE-Phäno.</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/2</b>	<b>4/3</b>
<b>3/3</b>	0,0002			
<b>4/2</b>	0,013	0,26		
<b>4/3</b>	0,000079	0,056	0,91	
<b>?/?</b>	0,002	0,099	0,096	0,005

*Tabelle 21: Statistische Auswertung der ApoJ/E-Konzentration nach ApoE-Phänotyp sortiert*

Alle Gruppen mit  $p \leq 0,05$  waren signifikant verschieden. Die Proben mit dem Phänotyp 3/2 waren signifikant von den Proben mit dem Phänotyp 3/3, 4/2, 4/3 und den Proben mit dem unbekanntem ApoE-Phänotyp (?/?) verschieden. Die Proben mit dem Phänotyp 4/3 unterschieden sich ebenfalls signifikant von den Proben mit dem unbestimmten Phänotyp. Die Proben mit Phänotyp 3/3 unterschieden sich mit  $p = 0,056$  nicht signifikant von den Proben mit dem Phänotyp 4/3, doch bestand immer noch die Tendenz, daß sie nicht gleich waren ( $p \leq 0,1$ ). Die Proben mit dem unbekanntem Phänotyp waren entweder signifikant von den anderen Probengruppen verschieden (Phänotyp 3/2 bzw. 4/3) oder sie waren nicht gleich, das heißt ( $p \leq 0,1$ ) zu den Phänotypen 3/3 und 4/2.

In der folgenden Abbildung wurden die auftretenden Konzentrationswerte gegen die Anzahl der entsprechenden Proben aufgetragen.

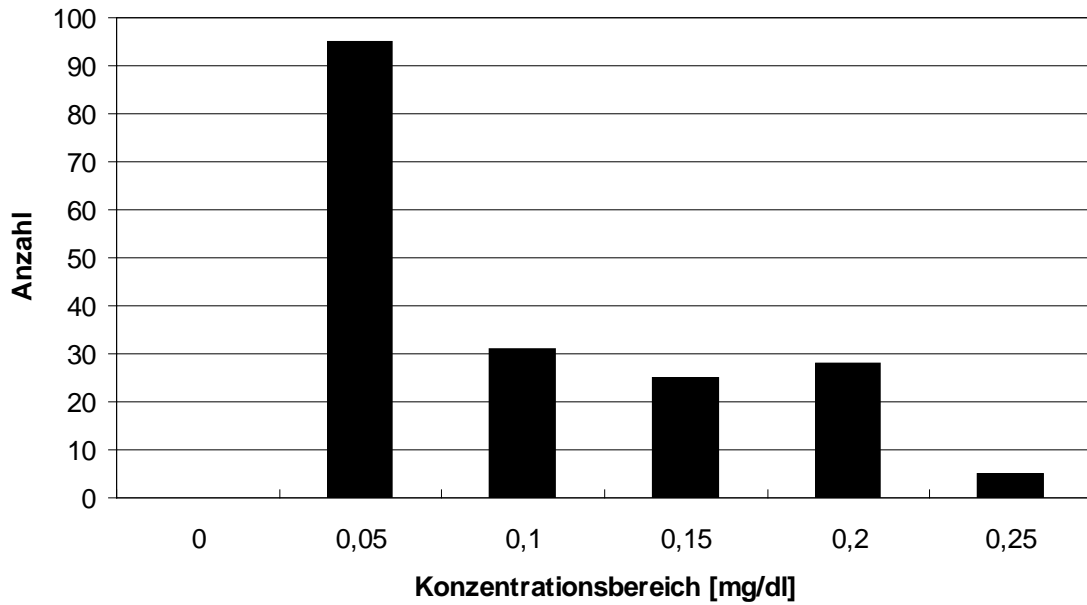


Abbildung 22: ApoJ/E-Konzentrationsverteilung

Die Durchschnittskonzentration der untersuchten Proben hatten eine Konzentration von 0,05 mg/dl. Höhere Konzentrationen traten deutlich seltener auf.

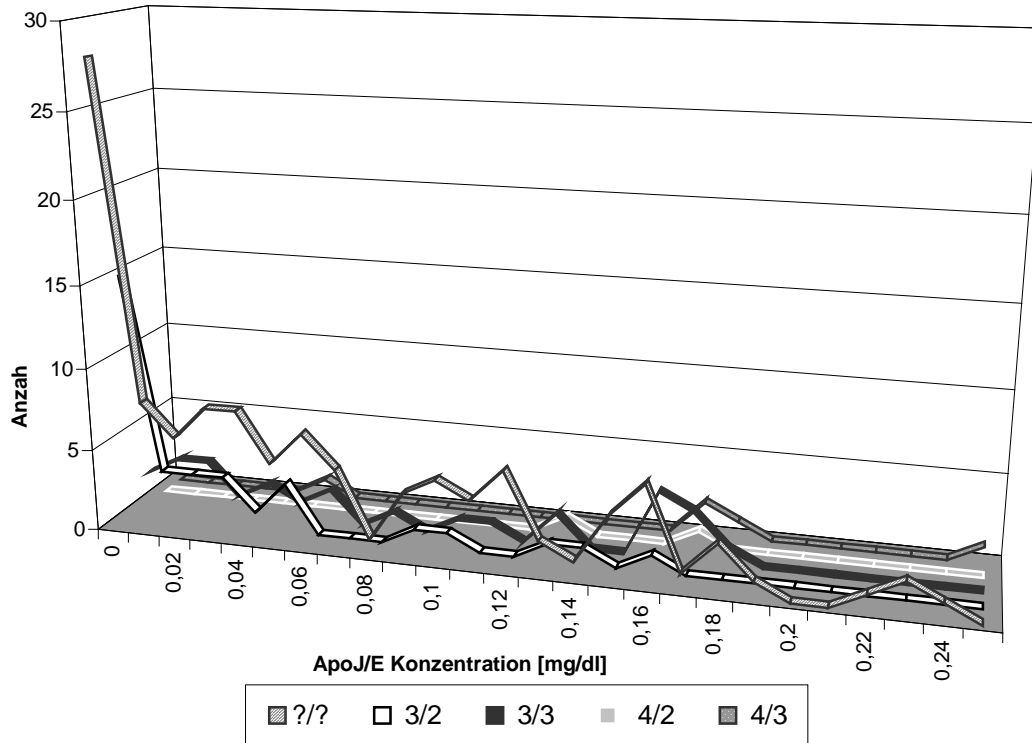


Abbildung 23: ApoJ/E-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert

In Abbildung 23 sind die Konzentrationen des ApoJ/E-Partikels gegen die Anzahl der Partikel mit dieser Konzentration, nach dem ApoE-Phänotyp der Probe sortiert, aufgetragen.

Man sieht deutlich, daß die Kurven für die dargestellten ApoE-Phänotypen sehr unterschiedlich aussehen. Die meisten der ApoE 3/2-Proben und den Proben mit unbestimmten ApoE-Phänotyp besitzen Konzentrationen bis maximal 0.05 mg/dl. Wohingegen die Proben mit dem ApoE-Phänotyp 4/3 am häufigsten Konzentrationen von 0.17 mg/dl aufweisen.

Bei dieser Auswertung muß man beachten, daß die Anzahl der jeweils dargestellten Proben sehr unterschiedlich ist (2 bis 117 Proben). Die Höhen der einzelnen Peaks können also nicht direkt miteinander verglichen werden.

#### 4.3.4.2 Apo(a)/E-Konzentration

Für den in dieser Arbeit neu beschriebenen Apo(a)/E-Partikel wurde bei 283 Proben die Konzentration bestimmt. Da für diesen neu beschriebenen Partikel kein kommerziell erhältlicher Standard verfügbar ist, wurde ein Liquorpool hergestellt, dem per Definition die Konzentration von 1 mg/dl zugeordnet wurde. Mit Hilfe dieses Standards wurden die Konzentrationen der Proben errechnet.

In der folgenden Tabelle sind die durchschnittlichen Apo(a)/E-Konzentrationen für die verschiedenen ApoE-Phänotypen aufgetragen:

<b>Apo(a)/E</b>	<b>Gesamt</b>	<b>2/2</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>	<b>4/4</b>	<b>?/?</b>
<b>Anzahl</b>	283	3	37	134	45	2	4	58
<b>Konz. [mg/dl]</b>	0,178	0,142	0,154	0,197	0,213	0,332	0,309	0,112

*Tabelle 22: Apo(a)/E-Konzentrationsverteilung*

Die Proben mit dem ApoE 3/3-Phänotyp stimmten ungefähr mit dem Durchschnittswert aller Proben überein. Die Patienten, die ein Apo  $\epsilon$ 2-Allel besaßen, hatten deutlich niedrigere Konzentrationen an Apo(a)/E-Protein, mit Ausnahme der Proben mit ApoE 4/2. Wohingegen die Proben mit einem Apo $\epsilon$ 4-Allel deutlich höhere Konzentrationen aufwiesen (siehe Tabelle 22).

Um zu ermitteln, ob die Konzentrationen nach ApoE-Phänotyp sortiert, voneinander abweichen, wurden die Konzentrationswerte mit dem Kruskal-Wallis-Test statistisch ausgewertet:



ApoE-Phäno.	2/2	3/2	3/3	4/3	4/2	4/4
3/2	0,95					
3/3	0,54	0,03				
4/3	0,31	0,004	0,16			
4/2	0,08	0,02	0,08	0,17		
4/4	0,11	0,02	0,09	0,24	0,66	
??	0,63	0,23	0,00004	0,000007	0,009	0,004

Tabelle 23: Statistische Auswertung der Apo(a)/E-Konzentrationsverteilung

Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede der Proben mit dem ApoE-Phänotyp 3/2 zu den anderen Proben mit Ausnahme der Proben mit dem Phänotyp 2/2 und den Proben mit unbestimmten Phänotyp. Die Proben mit unbekanntem Phänotyp unterschieden sich signifikant von den meisten ApoE-Phänotypen mit Ausnahme zu den Phänotypen 2/2 und 3/2.

In Abbildung 24 werden die gemessenen Apo(a)/E-Konzentrationen gegen ihre Anzahl aufgetragen.

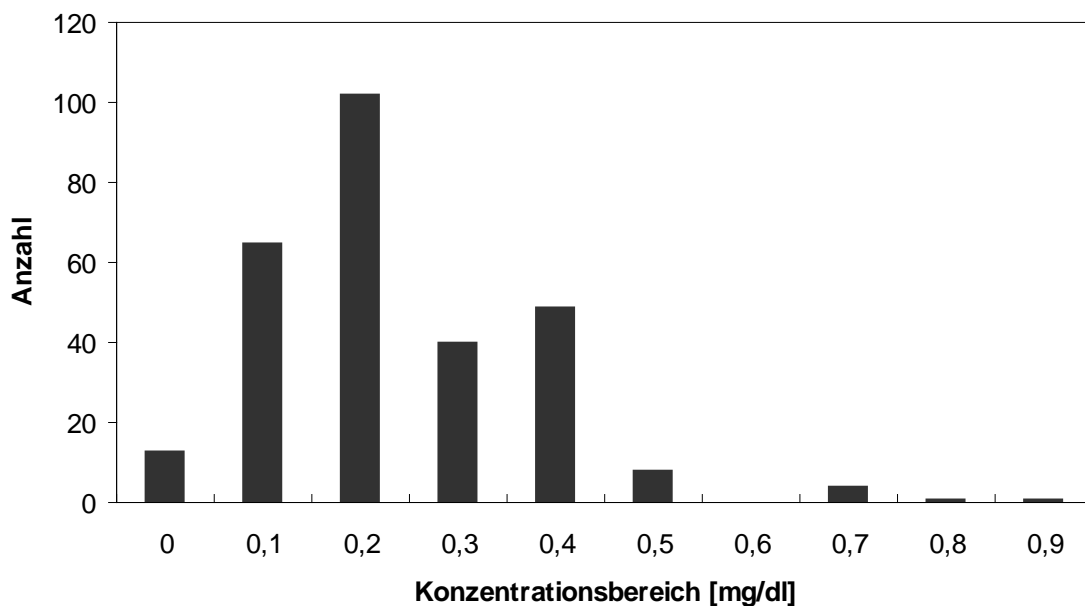


Abbildung 24: Apo(a)/E-Konzentrationsverteilung

Die Durchschnittskonzentration lag bei 0,2 mg/dl. Höhere Konzentrationen traten selten auf.

Die gemessenen Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden nachfolgend, nach dem ApoE-Phänotyp der entsprechenden Probe sortiert, aufgetragen.

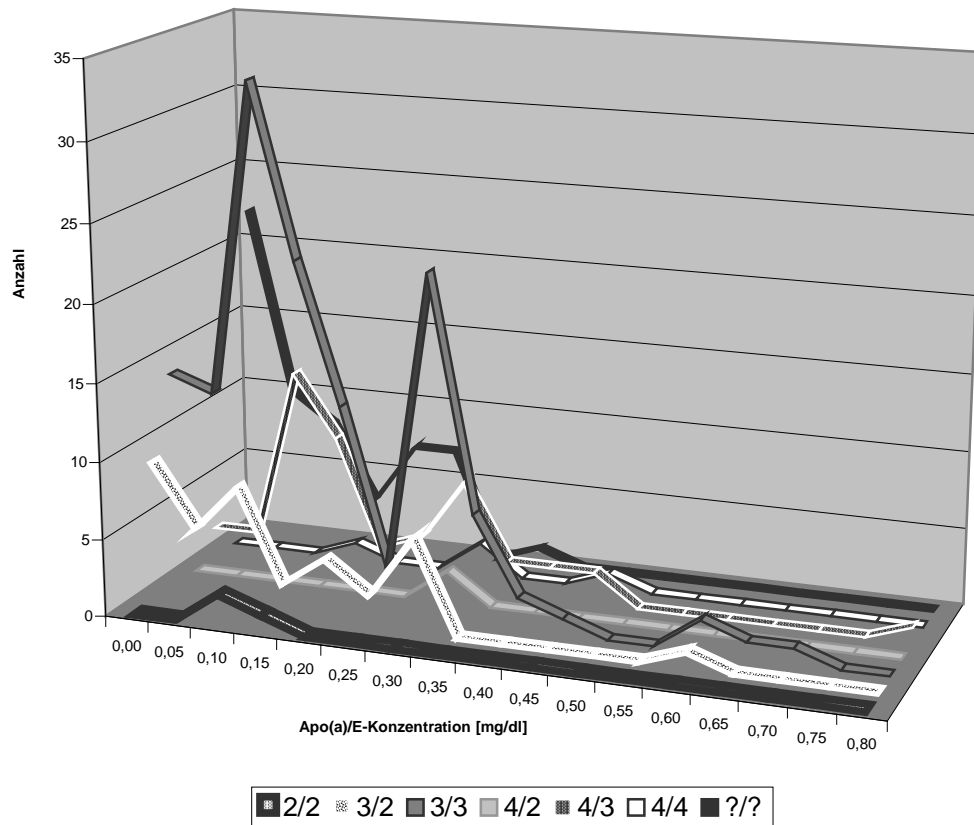


Abbildung 25: Apo(a)/E-Konzentrationen nach dem ApoE-Phänotyp sortiert

In Abbildung 25 sind die Konzentrationen des Apo(a)/E-Partikels getrennt nach ApoE-Phänotyp gegen ihre Anzahl aufgetragen.

Die meisten Proben besitzen Konzentrationen bis 0,30 mg/dl, wobei Konzentrationen von <0,2 mg/dl am häufigsten sind. Konzentrationen von 0,60 mg/dl treten bei den ApoE-Phänotypen 3/2 und 3/3 auf.

Aus der graphischen Darstellung kann man keine Abhängigkeit der Apo(a)/E-Konzentration vom ApoE-Phänotyp folgern.

#### 4.4 Kombination verschiedener Liquorparameter

##### 4.4.1 ApoJ gegen ApoJ/E

Da im Liquor sowohl freies ApoJ als auch im ApoJ/E-Partikel gebundenes ApoJ vorkommt, wurde hier die Hypothese untersucht, ob die Konzentrationen des ApoJ und die des ApoJ/E-Partikels direkt voneinander abhängen. Um dies nachzuweisen, wurde die ApoJ-Konzentration graphisch gegen die ApoJ/E-Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 26).

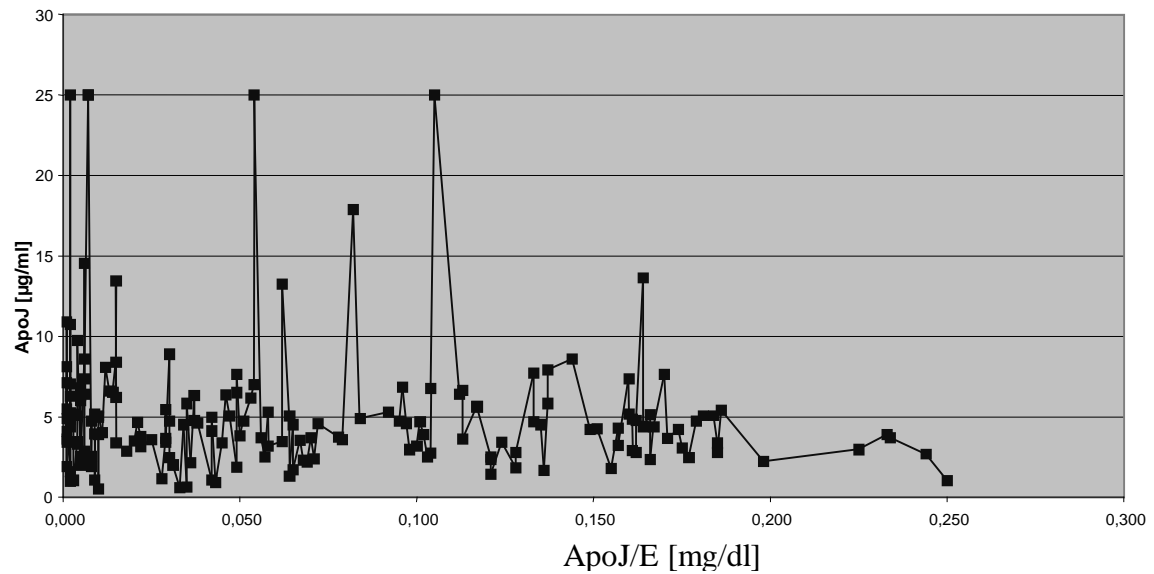


Abbildung 26: Konzentrationsabhängigkeit des ApoJ vom ApoJ/E

In dieser Graphik zeigte sich deutlich, daß kein direkter Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von ApoJ und ApoJ/E existierte.

#### 4.4.2 ApoE gegen ApoJ/E

Nachdem kein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von ApoJ und dem ApoJ/E-Partikel festgestellt wurde, wurde untersucht, ob die Konzentration des ApoJ/E-Partikels von der Konzentration des ApoE beeinflusst wird. Dazu wurden die entsprechenden Konzentrationen wieder graphisch gegeneinander aufgetragen (Abbildung 27).

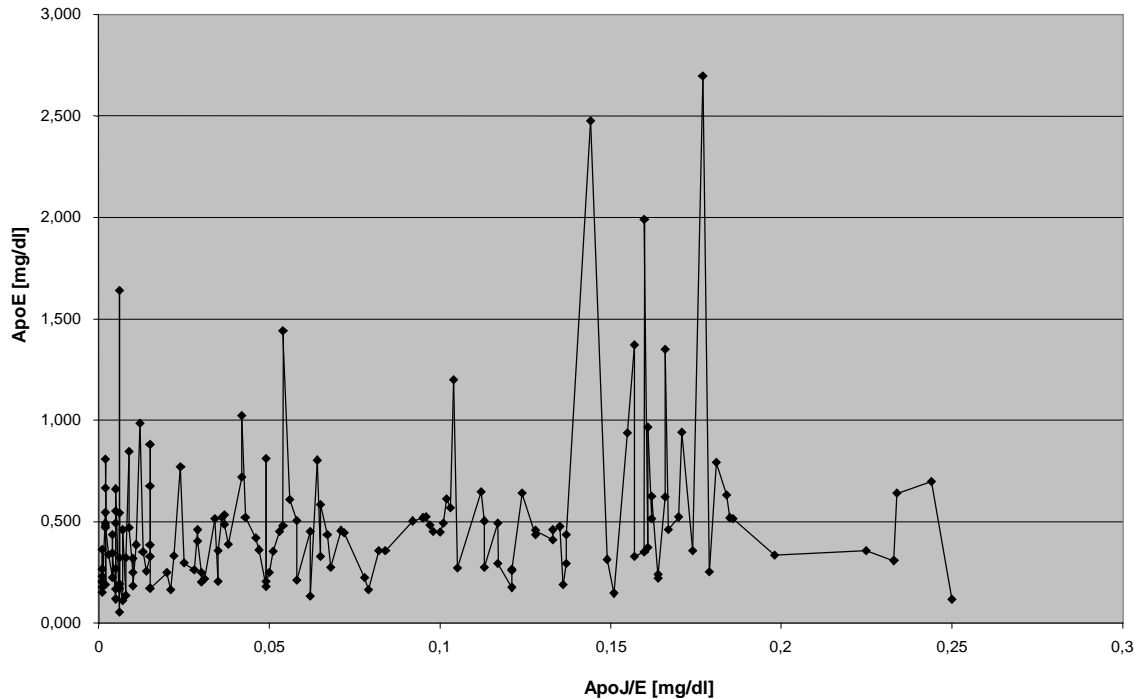


Abbildung 27: Konzentrationsabhängigkeit des ApoJ/E vom ApoE

Auch hier zeigte sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem untersuchten Apolipoprotein ApoE und den Apolipoproteinpartikel ApoJ/E.

#### 4.4.3 ApoE gegen Apo(a)/E

Auch für den Apo(a)/E Partikel wurde nach einer Abhängigkeit zwischen der Konzentration des Partikels und der des freien Apolipoproteins ApoE gesucht. Hierzu wurde, wie schon zuvor, die Konzentration des Partikels und des freien Apolipoproteins gegeneinander aufgetragen (Abbildung 28).

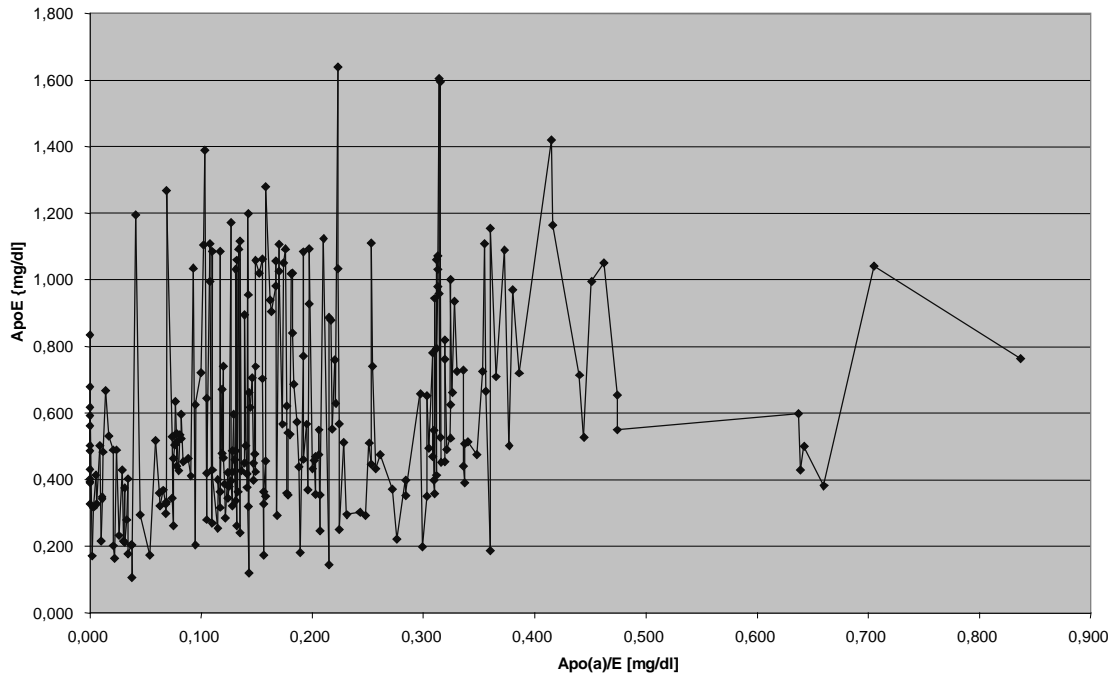


Abbildung 28: Konzentrationsabhängigkeit zwischen ApoE und Apo(a)/E

Wiederum zeigte die graphische Darstellung deutlich, daß die Konzentration des Apo(a)/E nicht von der Konzentration des im Liquor vorhandenen freien ApoE beeinflusst wird.

#### 4.4.4 Apo(a) gegen Apo(a)/E

Da die Konzentration des Apo(a)/E-Partikels auch von der Konzentration des freien Apo(a) beeinflusst sein könnte, wurde auch hier nach einem direkten Zusammenhang zwischen den Konzentrationen gesucht.

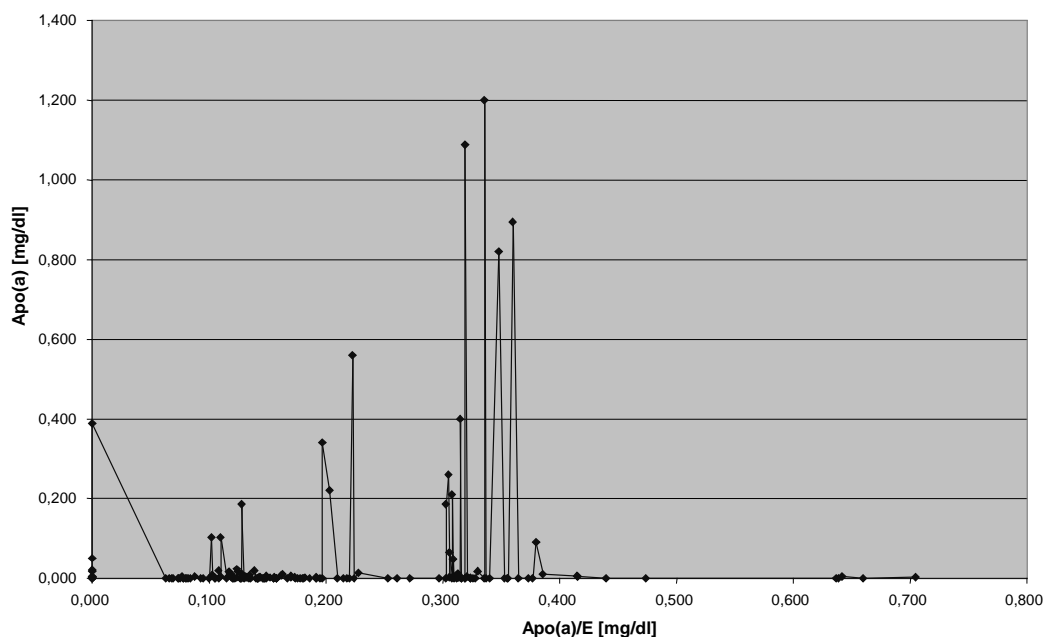


Abbildung 29: Konzentrationsabhängigkeit zwischen Apo(a) und Apo(a)/E

Es zeigte sich auch hier, daß kein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration des Apo(a)/E-Partikel und dem freien Apo(a) besteht.

#### 4.4.5 ApoJ/E- und Apo(a)/E-Partikel

Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß es sich bei dem ApoJ/E- und dem Apo(a)/E-Partikeln nicht um zwei getrennte Partikel handelt, sondern um Teilkomponenten des gleichen Partikels. Wenn es sich um einen Partikel mit einem festen Anteil der einzelnen Apolipoproteine handelt, könnten die Konzentrationen der Teilpartikel voneinander abhängig sein. Deshalb wurden die Apo(a)/E- und ApoJ/E-Partikelkonzentrationen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 30).

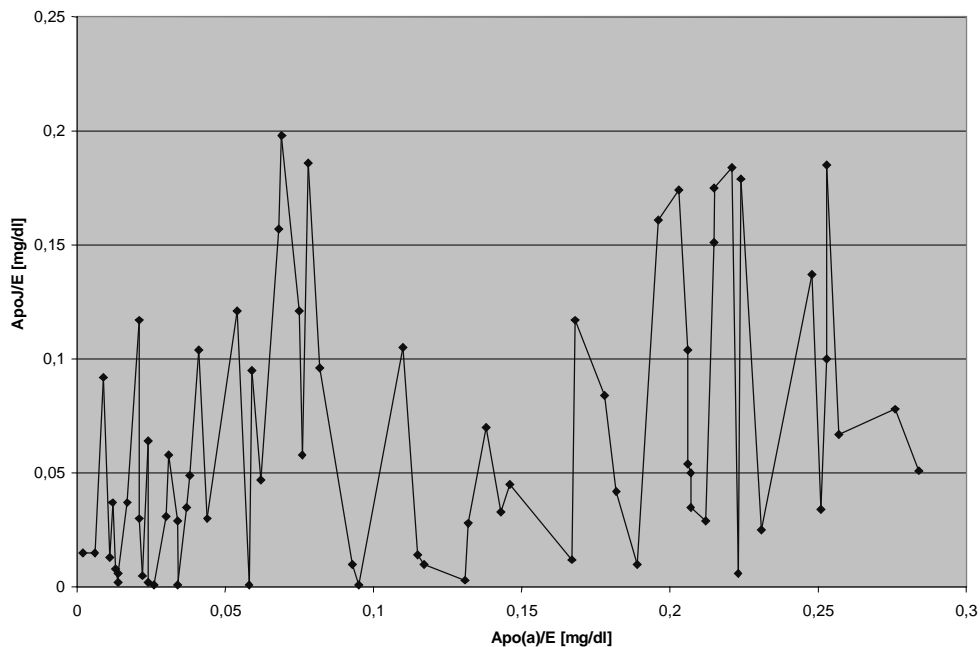


Abbildung 30: Konzentrationsabhängigkeit zwischen dem ApoJ/E- und dem Apo(a)/E-Partikel

Es ließ sich kein direkter Konzentrationszusammenhang zwischen dem ApoJ/E- und dem Apo(a)/E-Partikel aufzeigen. Folglich handelt es sich bei dem großen Gesamtpartikel nicht um ein Teilchen mit einem festen Bauplan, sondern um eine variable Ansammlung verschiedener Apolipoproteine in dem eventuell auch andere Bestandteile enthalten sein können.

#### 4.5 Tau-Protein

Der ELISA „Innotest hTAU Antigen“ von Innogenetics (siehe Material und Methoden 3.3.9.3) erlaubte die Bestimmung von Protein Tau im Liquor cerebrospinalis bei degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Ziel der hier durchgeführten Messungen war die Untersuchung der diagnostischen

Wertigkeit der Protein Tau-Bestimmung bei Patienten mit nicht laborchemischen zu sicherndem Verdacht auf Multiple Sklerose (MS), gesicherter MS (Nachweis oligoklonaler IgG im Liquor) und anderen degenerativen Nervenerkrankungen.

Die hier dargestellten Messungen wurden im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Dresden durchgeführt.

Untersucht wurden Liquorproben von 17 Patienten mit MS-Verdacht, jedoch ohne Synthese oligoklonaler IgG im Liquor, 13 Patienten mit durch Nachweis oligoklonaler Immunglobuline (IgG) gesicherter MS sowie 9 Patienten mit anderen degenerativen ZNS-Erkrankungen (siehe Tabelle 24).

	<b>Verdacht auf Multiple Sklerose</b>	<b>Multiple Sklerose</b>	<b>andere degenerative Erkrankungen.</b>
<b>Anzahl</b>	17	13	9
<b>Alter (Jahre)</b>	33,6 ± 2,3 +++	38,4 ± 3,0 ###	56,4 ± 5,8 +++,###
<b>männl./weibl.</b>	9/8	3/10	4/5
<b>Protein Tau [pg/ml]</b>	234 ± 59 +++,**	391 ± 67 **	405 ± 34 +++
<b>Liquor-Eiweiß [mg/l]</b>	549 ± 64	481 ± 52	460 ± 82
<b>Serum-Albumin [g/l]</b>	45,9 ± 1,9	44,0 ± 1,3	44,1 ± 2,2
<b>Liquor-Albumin [mg/l]</b>	286 ± 36	218 ± 24	296 ± 52
<b>Serum-IgG [g/l]</b>	12,4 ± 1,0	11,3 ± 1,0	11,2 ± 1,2
<b>Liquor-IgG [mg/l]</b>	38,9 ± 4,9 **	79,1 ± 13,9 **,###	34,9 ± 8,6 ###
<b>Q-Alb (*10<sup>-3</sup>)</b>	7,16 ± 1,60	5,05 ± 0,61	6,85 ± 1,20
<b>Q-IgG (*10<sup>-3</sup>)</b>	4,16 ± 1,21***	7,28 ± 1,10 ***,###	3,19 ± 0,60 ###
<b>Leukozyten [MPt/l]</b>	2,39 ± 0,68 **	6,36 ± 1,13 **,###	1,33 ± 0,22 ###

Tabelle 24: Anthropometrische Daten und Laborwerte der untersuchten Patientengruppen

Für die Daten in Tabelle 25 ergaben sich folgende Signifikanzen:

Verdacht Multiple Sklerose versus Multiple Sklerose:

\* :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$  \*\*\* :  $p < 0.005$

Verdacht Multiple Sklerose versus Degenerative Erkrankung:

+ :  $p < 0.05$  ++ :  $p < 0.01$  +++ :  $p < 0.005$

Multiple Sklerose versus Degenerative Erkrankung:

# :  $p < 0.05$  ## :  $p < 0.01$  ### :  $p < 0.005$

Die Konzentration des Proteins Tau lag bei Patienten mit MS deutlich über der von Patienten mit MS-Verdacht (Mittelwert:  $390,5 \pm 67,1$  pg/ml vs  $234,1 \pm 58,6$  pg/ml, Kruskal- $p < 0,001$ ). Patienten mit gesicherter MS wiesen jedoch im Vergleich zu Patienten mit anderen degenerativen Erkrankungen des ZNS praktisch gleiche Konzentrationen von Protein Tau im Liquor ( $390,5 \pm 67,1$  pg/ml vs  $404,9 \pm 34,0$  pg/ml, Kruskal  $p = 0,248$ ) auf.

Die Liquor-Konzentration von Protein Tau und IgG sowie der Liquor/Serum-Quotient für IgG (Q-IgG) und die Zahl der Leukozyten im Liquor zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit Verdacht auf Multiple Sklerose und den meist weiblichen Patienten der Gruppe mit gesicherter Multipler Sklerose. Von sämtlichen untersuchten Parametern zeigte lediglich die Protein Tau-Konzentration im Liquor einen signifikanten Unterschied zwischen denjenigen Patienten mit Verdacht auf Multiple Sklerose und solchen mit verschiedenen degenerativen Nervenerkrankungen.

Die Liquor-Konzentration von IgG und der Liquor-Serum-Quotient von IgG (Q-IgG) sowie die Konzentration von Leukozyten im Liquor wiesen signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit Multipler Sklerose und solchen mit degenerativen Nervenerkrankungen auf. Im Gegensatz dazu zeigte die Konzentration von Protein Tau keinen Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen.

Das Alter der Patienten, bei denen eine Multiple Sklerose vermutet bzw. diagnostiziert wurde, war praktisch gleich und lag deutlich unter dem von Patienten mit degenerativen ZNS-Erkrankungen. Bei Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose überwogen die weiblichen Patienten.



## 4.6 Serumuntersuchungen

Roheim et al. 1979 beschrieben einen Zusammenhang zwischen der Serum- und Liquorkonzentration der Apolipoproteine AI, E, CII und CIII. Dies sollte hier für das Apolipoprotein E und das Apolipoprotein (a) überprüft werden. Von 240 der hier untersuchten Proben gab es zusätzlich zur Liquorprobe auch eine Serumprobe. Bei diesen 240 Proben konnte in 237 die ApoE-Konzentration und in allen 240 die Apo(a)-Konzentration des Serums bestimmt werden. Mit den hier durchgeführten Analysen sollte eine Abhängigkeit der ApoE- und Apo(a)-Konzentrationen vom ApoE-Phänotyp im Serum nachgewiesen werden.

### 4.6.1 ApoE-Konzentration im Serum

In 237 Serumproben wurde der ApoE-Phänotyp und die ApoE-Konzentration gemessen und diese Werte in der nachfolgenden Tabelle 25 dargestellt:

<b>ApoE</b>	<b>Gesamt</b>	<b>2/2</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>	<b>4/4</b>
<b>Anzahl</b>	237	3	27	158	44	3	2
<b>Konz. [mg/dl]</b>	3,1	5,9	3,9	2,9	3,1	5,0	4,0
<b>Literatur [mg/dl]</b>		5,1	3,4	2,4	2,3	-	1,9

Tabelle 25: ApoE-Konzentrationsverteilung (Utermann 1987) nach ApoE-Phänotyp sortiert

Tabelle 25 zeigt die in dieser Arbeit bestimmten ApoE-Konzentrationen in Serumproben nach dem ApoE-Phänotyp sortiert. Die Proben mit dem ApoE-Phänotyp 3/3 lagen ebenso wie die Phänotypen 3/2 und 4/3 im Bereich des über alle Proben ermittelten Durchschnittswertes. Patienten, die ein Apo  $\epsilon$ 2-Allel besitzen, lagen mit ihren ApoE-Konzentrationen wesentlich höher. Die Konzentration der Proben mit einem Apo  $\epsilon$ 4-Allel lag ebenfalls über dem Gesamtdurchschnitt, mit Ausnahme des ApoE-Phänotyps 4/3, der genau die Durchschnittskonzentration aufwies. Hierbei unterschieden sich die Proben mit einem Apo  $\epsilon$ 4-Allel deutlich von den um die Hälfte niedrigeren Literaturwerten. Jedoch ergab der Chi<sup>2</sup>-Test (Material und Methoden 3.7.1) keine signifikante Abweichung ( $p = 0,43$ ) der hier bestimmten Konzentrationen von den Literaturwerten (Utermann 1987).

#### 4.6.2 Apo(a)-Konzentration im Serum

Die nachfolgende Tabelle zeigt die in Bezug zum ApoE-Phänotyp eingeteilten Konzentrationen des Apo(a) der 240 untersuchten Serumproben:

<b>Apo(a)</b>	<b>Gesamt</b>	<b>2/2</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>	<b>4/4</b>
<b>Anzahl</b>	240	4	25	160	44	3	4
<b>Konz. [mg/dl]</b>	10,4	2,5	7,6	11,6	8,0	16,0	8,9

*Tabelle 26: Apo(a)-Konzentrationsverteilung nach ApoE-Phänotyp sortiert*

Es existieren große Unterschiede zwischen den jedem ApoE-Phänotyp zugeordneten Durchschnittskonzentrationen des Apo(a) im Serum. Patienten mit dem ApoE-Phänotyp 2/2 besitzen auffallend niedrige Apo(a)-Konzentration, wohingegen die anderen Phänotypen den hier bestimmten Durchschnittswert von 10,4 mg/dl aufweisen. Der in dieser Arbeit bestimmte Durchschnittswert entspricht dem für Kaukasier in der Literatur veröffentlichten Durchschnitt von 14,1 mg/dl (Kraft et al.).

Die hier bestimmten Apo(a)-Konzentrationen wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test (siehe Kapitel 3.7.3) untereinander nach signifikanten Unterschieden untersucht (Tabelle 27):

<b>ApoE- Phänotyp</b>	<b>2/2</b>	<b>3/2</b>	<b>3/3</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>
<b>3/2</b>	0,36				
<b>3/3</b>	0,12	0,18			
<b>4/3</b>	0,13	0,22	0,90		
<b>4/2</b>	0,15	0,32	0,57	0,61	
<b>4/4</b>	0,19	0,42	0,77	0,81	0,81

*Tabelle 27: Statistische Auswertung der Apo(a)-Konzentrationsverteilung im Serum*

In Tabelle 27 sind die mit dem Kruskal-Wallis-Test bestimmten p-Werte alle größer als 0,05. Werte unter 0,05 würden einen signifikanten Unterschied nachweisen. Die hier bestimmten Serum-Konzentration des Apo(a) zeigten bei einer Auswertung nach den ApoE-Phänotypen keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.

## 4.7 Vergleich Liquor – Serum

Von 240 Patienten der Universitätsklinik Frankfurt am Main waren neben den Liquor- auch Serumproben vorhanden. In beiden Körperflüssigkeiten wurden die ApoE-Konzentration und die Apo(a)-Konzentration bestimmt (siehe 4.3.2 und 4.6). Es wurde dann nach einem genetischen Zusammenhang zwischen Liquor- und Serumkonzentration der betrachteten Apolipoproteine gesucht.

### 4.7.1 Apolipoprotein E

Von den 240 untersuchten Serumproben konnte in 237 die ApoE-Konzentration bestimmt werden. Für 196 Proben wurde sowohl im Liquor als auch im Serum die ApoE-Konzentration bestimmt. Um den Zusammenhang der Konzentrationen in Liquor und Serum bestimmen zu können, wurde der Koeffizient bestimmt, mit dem die immer niedriger liegende Liquorkonzentration multipliziert werden muß, um zur Serumkonzentration zu gelangen. Abbildung 29 zeigt eine graphische Darstellung dieses Koeffizienten. Dabei wurden die Koeffizienten auf ganze Zahlen gerundet.

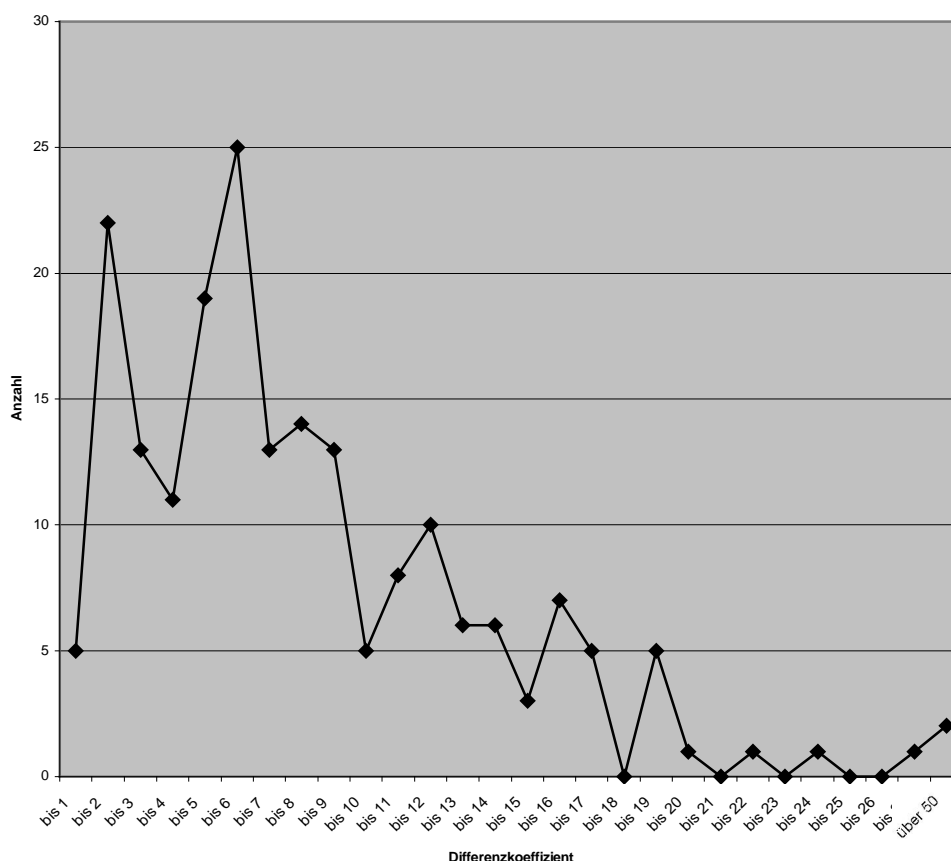


Abbildung 31: Darstellung des Differenzkoeffizienten zwischen Liquor und Serum beim Apolipoprotein E

Die Grafik zeigt, daß es keinen festen Zusammenhang zwischen Liquor- und Serumkonzentration des ApoE gibt. So gab es 25 Patienten, deren

Liquorkonzentration 1/6 der Serumkonzentration betrug. Aber es konnten auch 5 Patienten bestimmt werden, bei denen Liquor- und Serumkonzentration des ApoE um den Faktor 19 variierten.

Nach ApoE-Phänotypen sortiert, ergaben sich mit dem Kruskal-Wallis-Test folgende Signifikanzen:

<b>ApoE-Phänotyp</b>	<b>4/4</b>	<b>4/3</b>	<b>4/2</b>	<b>3/3</b>	<b>3/2</b>
<b>4/3</b>	0,31				
<b>4/2</b>	0,09	0,18			
<b>3/3</b>	0,18	0,26	0,31		
<b>3/2</b>	0,06	0,02	0,79	0,06	
<b>2/2</b>	0,13	0,27	0,86	0,45	0,98

*Tabelle 28: Statistische Auswertung des Differenzkoeffizienten zwischen Liquor und Serum*

Die Kruskal-Wallis-Statistik in Tabelle 28 zeigte, daß der Faktor um den sich Liquor und Serum unterscheiden, nicht von dem ApoE-Phänotyp abhängig ist, da sich nur bei dem Vergleich zwischen den Phänotypen 4/3 und 3/2 ein signifikanter Unterschied zeigte ( $p = 0,02$ ).

Da die Differenzkoeffizienten innerhalb der verschiedenen ApoE-Phänotyp-Gruppen sehr stark schwankten, wurden zusätzlich zu dem Medianwert die Minimal- und Maximalwerte in Tabelle 29 dargestellt:

<b>ApoE-Phänotyp</b>	<b>ApoE-Differenzkoeffizient</b>			<b>Patientenzahl</b>
	<b>Median</b>	<b>Minimun</b>	<b>Maximun</b>	<b>n</b>
<b>4/4</b>	3,4	2,8	4,0	2
<b>4/3</b>	5,6	0,4	18,9	36
<b>4/2</b>	8,4	7,1	11,7	3
<b>3/3</b>	6,3	0,7	50,0	129
<b>3/2</b>	9,0	1,3	27,0	23
<b>2/2</b>	13,2	1,1	51,4	3

*Tabelle 29: Schwankungen des Differenzkoeffizienten beim Apolipoprotein E*

Auffallend sind die starken Schwankungen der Differenzkoeffizienten, um die sich Liquor und Serum unterscheiden. Während der Bestimmung der ApoE-Konzentration von Liquor bzw. Serum, waren Proben, die stark von den in der Literatur (Pitas et al. 1987) veröffentlichten Konzentrationswerten von 5,4 mg/dl im

Serum bzw. 0,29 mg/dl im Liquor abwichen, immer nochmals nachgemessen worden. Durch dieses Vorgehen sind Meßfehler ausgeschlossen.

#### 4.7.2 Apolipoprotein (a)

Von 240 Serumproben, in denen die Apo(a)-Konzentration bestimmt worden waren, waren in 200 Proben die dazugehörigen Apo(a)-Liquorkonzentration gemessen worden. Von den 200 Proben, bei denen sowohl im Liquor als auch im Serum die Konzentration des Apo(a) bestimmt wurde, waren 107 nicht für diese Auswertung verwendbar, da mindestens eine Konzentration unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISAs von 0,008 mg/dl (Kapitel 3.3.9) lag. Es verblieben also noch 93 auswertbare Proben.

Es wurde der Differenzkoeffizient errechnet, mit dem die Liquorkonzentration multipliziert werden mußte, um den Serumwert zu erhalten. Bei den 93 untersuchten Proben, variierte der Faktor von 0,3 bis zu 20.651 (siehe Tabelle 30).

Diese Auswertung wurde noch nach den ApoE-Phänotypen aufgeschlüsselt.

ApoE-Phänotyp	Apo(a)-Differenzkoeffizient			Patientenzahl
	Median	Minimum	Maximum	n
2/2	435	-	-	1
3/2	1712	2	14061	10
3/3	2058	0,3	20651	67
4/3	1104	2	4261	12
4/4	1100	348	2392	3

Tabelle 30 : Schwankungen des Differenzkoeffizienten beim Apolipoprotein (a) in Abhängigkeit von Apolipoprotein E-Phänotyp

Diese großen Unterschiede des Differenzkoeffizienten zeigten deutlich, daß es keinen Zusammenhang zwischen der Liquor- und der Serumkonzentration des Apolipoproteins (a) gibt.

#### 4.8 Posttranslationale Prozessierung des Apolipoprotein E

Das im Liquor cerebrospinalis vorliegende ApoE weist gegenüber dem im Serum vorliegenden eine wesentlich stärkere Prozessierung in Form einer verstärkten Glykosilierung auf, die in der isoelektrischen Fokussierung mit einer Vielzahl von Banden einhergeht. Die Proben wurden mit einer Neuraminidase verdaut, um

diese Zusatzbanden, die durch das Anhängen von Neuraminsäuren entstehen (Wernette-Hammond et al. 1989), zu entfernen (siehe Abbildung 32).

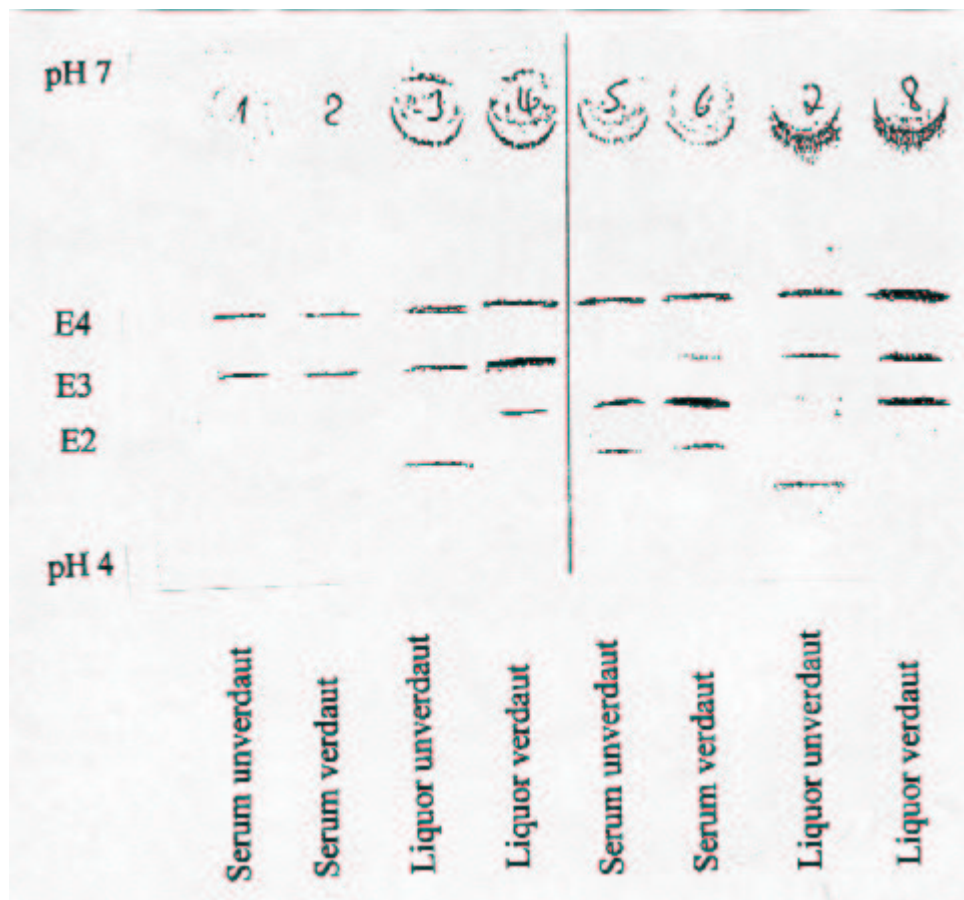


Abbildung 32: Blot einer isoelektrischen Fokussierung des Apolipoprotein E aus Liquor und Serum mit anschließender Anti-ApoE-Detektion

Abbildung 32 zeigt den Blot einer isoelektrischen Fokussierung von Liquor und Serum vor und nach dem Verdau mit einer Neuraminidase. Dieser Blot wurde anschließend mit Anti-ApoE detektiert. Im unverdauten Liquor macht die hohe Anzahl der Banden und deren Intensität eine eindeutige Typisierung des ApoE-Phänotyps unmöglich (Bahn 3 bzw. Bahn 7). Demgegenüber war die manchmal im Serum vorliegende Monosialoform (Bahn 5) eindeutig von den in hoher Konzentration vorliegenden Asialoformen abzugrenzen und störte die Phänotypisierung nicht.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden die im Blot auftretenden Bandenmuster mit einem Densitometer ausgemessen, was in Form eines Peaks Auskunft über die Intensität einer Bande gibt (siehe Abbildung 33).

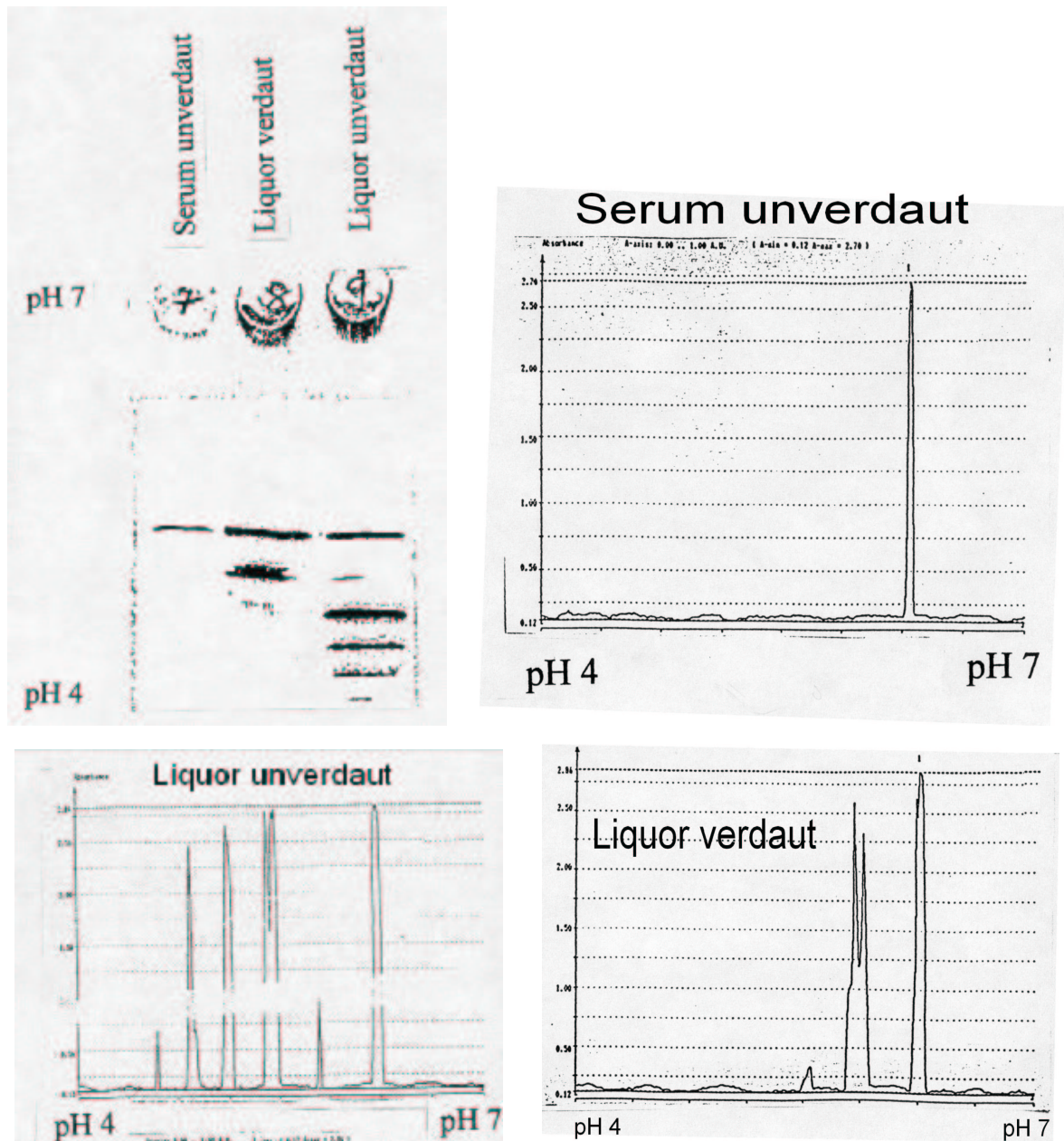


Abbildung 33: Densitometerscan des Blots

Ein Verdau mit Neuraminidase führte zum Verschwinden der Sialobanden im Serum. Im Liquor blieb jedoch auch nach dem Verdau noch eine zusätzliche Bande nachweisbar.

Diese oftmals auftretende Zusatzbande konnte nicht mit Neuraminidasen (Material und Methoden 3.4.4) entfernt werden. Folglich handelte es sich um eine andere Gruppe, die diese Zusatzbande verursachte. Phosphotyrosin bzw. Sulfat wurden als mögliche Zusatzgruppen in Erwägung gezogen. Auch ein Verdau mit einer Tyrosin-Phosphatase und / oder einer Sulfatase führte nicht zum Verschwinden dieser zusätzlichen Bande.

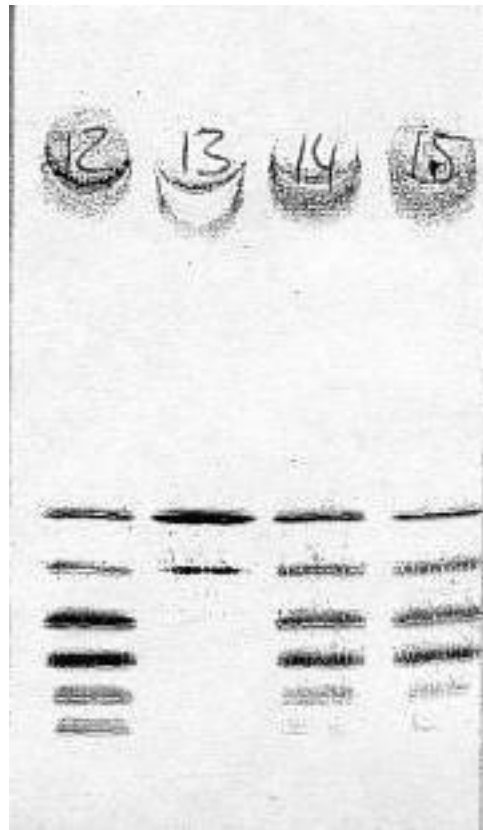


Abbildung 34: Blot nach Verdau mit Tyrosin-Phosphatase bzw. Sulfatase

Abbildung 34 zeigt den Ausschnitt eines ApoE-Phänotypisierungsblots bei dem die Proben einer enzymatischen Vorbehandlung unterworfen worden waren. Bahn 12 zeigt die unbehandelte Probe. Bahn 13 weist die gleiche Probe nach Neuraminidaseverdau auf. In Bahn 14 ist die Probe nach einem Tyrosin-Phosphatase-Verdau aufgetragen worden. In Bahn 15 lief die Probe nach einer Vorbehandlung mit einer Sulfatase mit.

Die Vorbehandlung mit einer Neuraminidase führte als einzige Methode zur Entfernung der Zusatzbanden des ApoE während der Typisierung.

#### **4.9 Abbauprozesse beim Apolipoprotein E**

Bei der Verwendung von älteren bzw. mehrfach aufgetauten Liquor- und Serumproben zeigten sich in der ApoE-Phänotypisierung (siehe Kapitel 3.4) Doppelbanden (Abbildung 35).



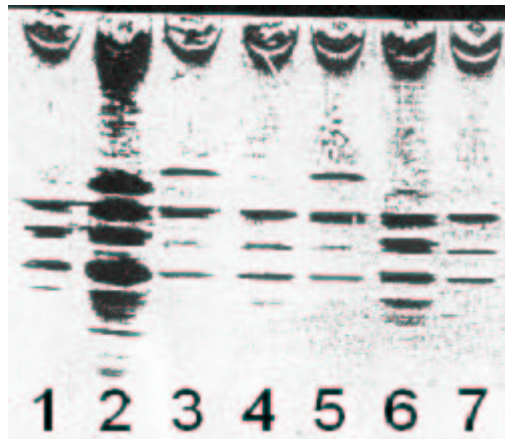


Abbildung 35: ApoE-Phänotypisierung mit Doppelbanden

Abbildung 35 zeigt verschiedene Serum- und Liquorproben, die zur Vorbehandlung vielfach eingefroren und aufgetaut wurden oder über einen Zeitraum von ca. sechs Monaten im Kühlschrank aufbewahrt worden waren. Proben, die so unvorteilhaft gelagert bzw. behandelt wurden, wiesen bei der ApoE-Phänotypisierung Doppelbanden auf.

Proben, die diese Doppelbanden aufzeigten, wurden in einem SDS-Gradientengel von 5-15 % (siehe Kapitel 3.3.3) aufgetrennt. Als Besonderheit zu der im Material und Methodenteil beschriebenen Vorgehensweise mußten die Proben, wie bei einem ApoE-Phänotypisierungsgel (Kapitel 3.4.1.1), delipidiert werden. Von den so vorbereiteten Proben wurden 50 µl + 40 µl Probenpuffer auf das Gel aufgetragen.

Nach erfolgtem Lauf wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) geblottet und dieser Blot (Abbildung 36) anschließend mit Anti-ApoE detektiert (siehe Kapitel 3.3.3).

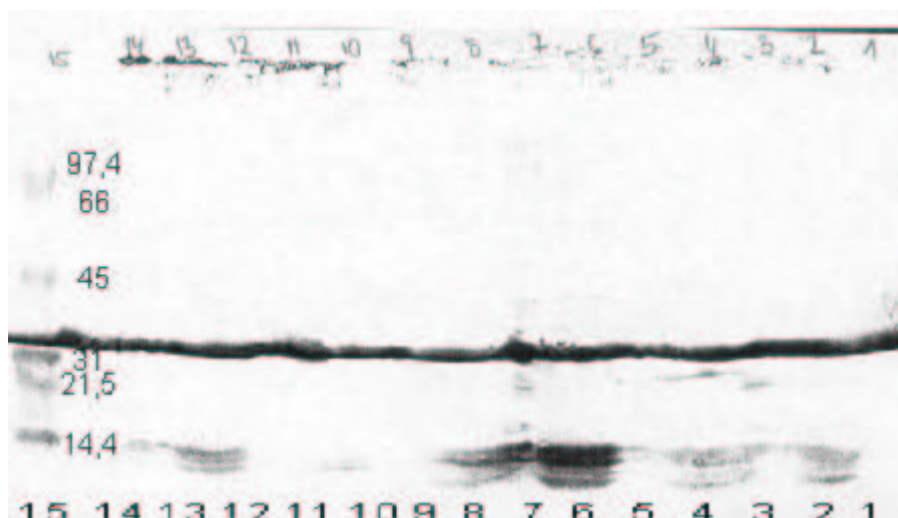


Abbildung 36: Auftrennung der ApoE-Doppelbanden

---

Abbildung 36 zeigt auf den Bahnen 1 und 14 Liquorproben. Die Bahnen 2 bis 13 enthielten verschiedene Serumproben. In Bahn 15 wurde ein Größenmarker aufgetragen, dessen Bandengrößen in das Gel eingetragen worden sind.

Die auf diesem Gel aufgetragene Proteinmenge war zu hoch. Trotzdem ist bei allen Proben deutlich eine starke Bande zu erkennen, welche die dem ApoE entsprechende Größe von 35 kD aufweist. Dies entspricht der Größe des ApoE. Weitere Zusatzbanden haben sich in dem Größenbereich von ca. 15 kD angefärbt. Die Tatsache, daß sie mit dem ApoE-Antikörper reagiert haben, zeigt, daß es sich um ein Fragment des Apolipoproteins handelte, daß die Bindungsstelle des Antikörpers noch enthielt.

Proben, in denen der Zerfall der Apolipoproteine fortschreiten konnte, konnten von den Antikörpern bei der Phänotypisierung oder Konzentrationsbestimmung nicht mehr erkannt werden. Das 15 kD große ApoE-Protein ist also ein Zwischenschritt im Abbau des Apolipoproteins E.

## 5 Diskussion

### 5.1 Astrozyten

Boyles et al. 1985, Pitas et al. 1987 und Poirier et al. 1993 haben veröffentlicht, daß Astrozyten das ApoE im Liquor synthetisieren. In dieser Arbeit sollte diese Synthese durch die Astrozyten nachgewiesen werden. Dabei sollte durch die hier eingesetzte Methode, der ApoE-ELISA (Kapitel 3.3.9), die ApoE-Produktion der Astrozyten direkt nachgewiesen werden, wohingegen in der Literatur bisher nur indirekte Methoden beschrieben worden sind (Pitas et al. 1987). Dazu wurde den Astrozyten radioaktiv markiertes [<sup>35</sup>S]-Methionin zugegeben. Die Zellen haben daraufhin dieses radioaktive Methionin in die neusynthetisierten Proteine, also auch das ApoE eingebaut. Die an das Medium abgegebenen Proteine wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Der Anteil des ApoE an diesen radioaktiv markierten Proteinen wurde ermittelt, indem das ApoE im Kulturüberstand mit Antikörpern ausgefällt wurde und anschließend die Radioaktivität gemessen wurde. Dieser Meßwert wurde in Beziehung zu dem Autoradiogramm der Gesamtproteine gesetzt (Pitas et al. 1987). Mit Hilfe eines direkten ELISAs konnte der Nachweis, daß Astrozyten ApoE synthetisieren, nicht geliefert werden (Ergebnis 4.1.2). Eine mögliche Erklärung für dieses Versagen einer gut funktionierenden Methode ist, daß die produzierten ApoE-Mengen unterhalb des Meßbereichs des ELISAs liegen. Als weiteres Problem stellte sich die Frage des ApoE-Recyclings. Da die Zellen zum Wachstum ApoE benötigen, nehmen sie natürlich im Medium befindliches ApoE auf. Da dies über mindestens drei verschiedene Rezeptoren, LRP-, ApoE- und ApoB/E,-Rezeptor erfolgen kann, läßt sich die Aufnahme nicht wirkungsvoll blockieren, und man kann den Verbrauch des ApoE nicht stoppen, um ApoE im Medium anzureichern. Als weitere Verlustmöglichkeit wurde das Vorhandensein von Proteasen untersucht. Die Zugabe von Proteaseinhibitoren (Ergebnis 4.1.2) erhöhte die ApoE-Konzentration des Zellkulturmediums im ApoE-ELISA. Diese Konzentrationszunahme war aber nicht so stark, daß die ApoE-Konzentration in den Meßbereich des ELISAs gekommen wäre. Die untere Nachweisgrenze des ApoE-ELISAs liegt bei ca. 30 ng/dl. Die von dem ELISA-Reader errechneten Konzentrationen nach Proteaseninhibitorenzugabe lagen bei 20 ng/dl. Der Einfluß der Proteasen ist unbedeutend.

Eine weitere Ursache wurde in dem ApoE-Genotyp der angezogenen Zellen gesehen. Da im Serum unterschiedliche ApoE-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Phänotyp des Apolipoproteins E vorliegen (Lehtimäki et al. 1994), wurde

dieser Ansatz auf die Syntheserate der Astrozyten übertragen. Die in dieser Arbeit isolierten Zelllinien hatten mit einer Ausnahme, die den Genotyp 2/2 besaß, den ApoE-Genotyp 3/3. Zwischen der Astrozytenzelllinie mit dem ApoE-Genotyp 2/2 und den ApoE 3/3-Linien zeigten sich keine Unterschiede in der Syntheserate. Der ApoE-Genotyp beeinflusst die Produktion des ApoE wahrscheinlich nicht entscheidend. Diese Aussage ist nicht sicher zu treffen, da von den sechs möglichen Genotypen in dieser Arbeit nur zwei untersucht werden konnten.

Um die Synthese des ApoE durch die Astrozytenkulturen nachzuweisen, wurde Zellkulturmedium ankonzentriert. Die darin enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-Gradientengels (Ergebnis 4.1.2) aufgetrennt und der dabei entstandene Blot mit Anti-ApoE detektiert. Auf diese Weise lies sich ApoE im Zellkulturmedium nachweisen.

Die Aussage von Boyles et al. 1985, Pitas et al. 1987 und Poirier et al. 1993, daß Astrozyten im Gehirn das Apolipoprotein E synthetisieren, konnte bestätigt werden.

## **5.2 Apo(a)-Typisierung**

Die Methode der Serum Apo(a)-Typisierung von Macovina et al. 1993 und Kamboh et al. 1991 wurde an die geringeren Konzentrationsverhältnisse des Apo(a) im Liquor cerebrospinalis adaptiert (Kapitel 3.3.8). Trotz der Ankonzentration durch alkoholische Fällung konnten aber nur Proben mit hohen Apo(a)-Konzentrationen typisiert werden. Das durch Chemiluminescence erhaltene Bandmuster war für eine Darstellung in dieser Arbeit zu schwach. Es ist folglich notwendig, noch stärkere Ankonzentrierungen durchzuführen, vielleicht auch kombiniert mit einem Ultrazentrifugationsschritt.

Bei dem Aufbau der Methode wurden ebenfalls Serumproben typisiert (Ergebnis 4.2). Auch bei diesen stellt sich die Konzentration des Apo(a) als Problem dar. Es war im Rahmen dieser Arbeit möglich, Proben mit einer Apo(a)-Serumkonzentration von über 10 mg/dl zu typisieren. Die in der Veröffentlichung von Marcovina et al. 1993 beschriebene Nachweisempfindlichkeit von 6,5 µg/µl konnte hier nicht erreicht werden.

## **5.3 Liquorparameter**

In den in dieser Arbeit untersuchten Liquorproben wurden verschiedene Parameter bestimmt. Für alle untersuchten Parameter wurde von einer

Abhängigkeit vom ApoE-Phänotyp ausgegangen. So wurde als erstes für alle Proben, der ApoE-Phänotyp bestimmt. Im nächsten Schritt wurden die Konzentrationen des ApoE, des Apo(a) und des ApoJ im Liquor gemessen. Diese Ergebnisse wurden jeweils in Abhängigkeit vom ApoE-Phänotyp ausgewertet. Die verschiedenen ELISAs zur Konzentrationsmessung der freien Apolipoproteine wurden kombiniert. Es konnten ApoJ/E- und Apo(a)/E-Partikel nachgewiesen werden. Da es sich dabei um Partikel handelt, wurde mit einer Kreuzimmunelektrophorese bestätigt (Ergebnis 4.3.3). Die Konzentration der Apolipoproteinpartikel im Liquor wurde mit ELISAs gemessen. Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Dresden das Protein Tau in einigen der Liquorproben gemessen. Von einigen untersuchten Patienten lagen nicht nur Liquor- sondern auch Serumproben vor. Im Serum wurden die Konzentrationen von ApoE und Apo(a) bestimmt (Ergebnis 4.6) und in Zusammenhang zu den Konzentrationen im Liquor gesetzt (Ergebnis 4.7). Die posttranslationale Prozessierung des ApoE im Liquor durch vermehrten Einbau von Sialinsäuren war ebenfalls Gegenstand einer Untersuchung (Ergebnis 4.8). Abschließend wurden noch Beobachtungen zu Abbauprozessen des ApoE gemacht (Ergebnis 4.9).

### **5.3.1 ApoE-Nachweis in den Astrozyten**

Im Ergebnisteil 4.1.2 konnte gezeigt werden, daß ApoE in den Astrozyten im Cytoplasma perinuclear im Golgi-Apparat und in der Membran der Ausläufer zu finden ist. Pitas et al. 1987 zeigte, daß sich das ApoE im Golgi-Apparat der Zelle befindet. Diese Aussage konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

### **5.3.2 ApoE-Phänotyp**

Die in dieser Arbeit ermittelten ApoE-Phänotypen (Ergebnis 4.3.1) weichen nicht von der bekannten Normalverteilung ab (Utermann 1987). Die Tatsache, daß in dieser Arbeit das Apo  $\epsilon$ 4-Allele seltener und dafür das Apo  $\epsilon$ 2-Allele häufiger gefunden wurden, ist zu vernachlässigen. Die statistische Auswertung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test stellte keinen signifikanten Unterschied zwischen der hier ermittelten ApoE-Phänotyp-Verteilung und der von Utermann 1987 veröffentlichten fest ( $p = 0,137$ ).

### **5.3.3 Konzentrationsmessung einzelner Apolipoproteine des Liquors**

#### **5.3.3.1 ApoE-Konzentration**

Die Auswertung der ApoE-Konzentrationen nach dem ApoE-Phänotyp zeigt, daß die Konzentration von dem Phänotyp beeinflusst wird (Ergebnis 4.3.2.1). So sind Proben mit einem Apo $\epsilon$ 4-Allel höher konzentriert wie Proben mit einem Apo $\epsilon$ 2-Allel. Diese Aussage läßt sich leider nicht für alle Phänotyp-Konstellationen mit

signifikanter Sicherheit nachweisen, da einige Phänotypen aufgrund ihrer statistischen Häufigkeit so selten sind, daß sie auch in einem Kollektiv mit 500 Proben kaum auftreten.

### **5.3.3.2 ApoJ-Konzentration**

Man muß bei allen Konzentrationsangaben des ApoJ in dieser Arbeit nochmals bedenken, daß es sich nicht um absolute Werte handelt, sondern immer nur um relative Konzentrationen. Diese wurden gemessen, indem einem selbsthergestellten Liquorpool eine willkürlich festgesetzte Konzentration von 2,4 µg/ml zugeordnet wurde. Dieser Standard wurde dann zur Herstellung der Standardverdünnung verwendet. Trotzdem dem Liquorpool die bekannte Durchschnittskonzentration des ApoJ im Liquor zugeordnet wurde, konnte aus der Vielzahl der gemessenen Proben nicht wieder diese Durchschnittskonzentration errechnet werden. Da es sich bei den hier untersuchten Proben meist um Liquor von Personen mit einer im Liquor nachweisbaren Erkrankung, wie Multiple Sklerose bzw. HIV handelte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die hier auftretenden ApoJ-Werte ebenfalls durch die Erkrankungen der Patienten verändert sind.

Proben mit dem ApoE-Phänotyp 3/2 hatten deutlich höhere Konzentrationen als die anderen Phänotypen. Da das ApoE-Allel  $\epsilon 4$  im Gehirn bei Patienten mit Morbus Alzheimer die Konzentration des ApoE absenkt (Utermann 1987) und hohe ApoJ-Konzentrationen die Bildung von senilen Plaques (Matsubara et al. 1995) behindert, ist die Kombination von hohen ApoJ-Spiegeln bei Patienten mit Apo  $\epsilon 2$ -Allel sinnvoll (Bertrand et al. 1995). Die Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten Proben mit einem Apo  $\epsilon 4$ -Allel liegen nicht auffallend niedrig.

Bei den hier ermittelten Daten zeigt sich eine Abhängigkeit der Konzentration des Apolipoprotein J von dem ApoE-Phänotyp (Kapitel 4.3.2.2).

### **5.3.3.3 Apo(a)-Konzentration**

Die Liquorkonzentrationen des Apo(a) sind extrem niedrig. Dies hatte zur Folge, daß mit dem verwendeten ELISA oftmals keine meßbare Konzentration mehr ermittelt werden konnte. Insgesamt lagen 54 % der untersuchten Liquorproben unterhalb der Nachweisgrenze des Apo(a)-ELISAs. Die hier gemessenen Proben sind die Proben mit den "höheren Apo(a)-Liquorkonzentrationen". Von diesen 98 Proben wiesen 79 % eine Konzentration von 0,1 mg/dl auf. In dieser Arbeit ließ sich nur ein signifikanter Unterschied der Apo(a)-Konzentration zwischen den Proben mit dem ApoE-Phänotyp 4/3 und dem Phänotyp 4/4 nachweisen. Doch ist

diese Aussage fraglich, da sich der Durchschnittswert des ApoE4/4-Phänotyps nur aus zwei Einzelwerten zusammensetzte (Ergebnis 4.3.2.3).

Zusammenfassend kann man annehmen, daß die Apo(a)-Konzentration im Liquor cerebrospinalis nicht vom ApoE-Phänotyp beeinflusst wird.

#### **5.3.4 Apolipoproteinpartikel im Liquor**

Durch eine Kombination des Apo(a)-ELISAs mit dem ApoE-ELISA wurde im Liquor ein Partikel nachgewiesen, der sowohl das ApoE als auch das Apo(a) enthielt. In der Literatur wurde bereits das Existieren solcher Partikel verschiedener Apolipoproteine dargestellt (Roheim et al. 1979, Borghini et al. 1995). Da in diesen Arbeiten aber die Existenz des Apo(a) im Liquor noch nicht bekannt war, wurden die dort gefundenen Partikel auch nicht nach dem Apo(a) untersucht. Die Coexistenz von ApoE und ApoJ in einem als LpE bezeichneten Partikel wurde 1995 von Borghini et al. beschrieben. Dies konnte in den hier vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden, da es möglich war, einen Partikel aus ApoE und ApoJ nachzuweisen und auch für diesen einen ELISA zu entwickeln. So konnten die Konzentrationen dieses Partikels gemessen werden.

Der Apo(a)/E- und der ApoJ/E-Partikel wurden über eine Kreuzimmunelektrophorese aufgetrennt. Der Partikel reagierte jeweils mit dem ersten Antikörper und gelangte nicht mehr in den zweiten Bereich des Gels, um mit dem zweiten Antikörper reagieren zu können (Ergebnis 4.3.3). Dies ist ein eindeutiger Nachweis, daß die beiden jeweils untersuchten Apolipoproteine Bestandteil eines gemeinsamen Partikels sind und nicht frei vorliegen.

##### **5.3.4.1 ApoJ/E-Konzentration**

Die Konzentration des ApoJ/E-Partikels wurde mit dem hier entwickelten ELISA (siehe Material und Methoden 3.3.9) bestimmt. Auch bei diesen Konzentrationen muß man noch beachten, daß es sich nicht um Absolutwerte handelt, sondern um relative Konzentrationen, die mit Hilfe eines willkürlich festgesetzten Standards von 1 mg/dl bestimmt worden sind. Dieser Hilfsschritt in Ermangelung eines fehlenden kommerziellen Standards beeinflusst aber nicht die Orientierung der Proben zueinander.

Bei dem ApoJ/E-Partikel zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Durchschnittskonzentration von dem ApoE-Phänotyp des Partikels. So scheint der ApoE-Phänotyp 3/3 den Normalwert zu repräsentieren. Das Auftreten eines Apoε2-Allels führt zu einem Abfall und das Apoε4-Allel zu einem Anstieg der

ApoJ/E-Konzentration. Da für die Allele Apo $\epsilon$ 2 und Apo $\epsilon$ 4 keine homozygoten Proben vorhanden waren, kann diese These nicht überprüft werden.

Bei der Konzentrationsverteilung des ApoJ/E-Partikels aller untersuchten Proben handelt es sich um eine linksschiefe Verteilungskurve. Dies bedeutet, daß die Verteilung nicht den Gesetzen der Gauß-Verteilung entspricht. Bei einer solchen Verteilungskurve liegt das Maximum der beobachteten Konzentrationswerte auf der linken Seite der Kurve. In solch einem Fall sind niedrige Konzentrationen, 0,05 mg/dl, bevorzugt. Höhere Konzentrationen treten auf, sind aber wesentlich seltener.

Bei der Konzentrationsverteilung nach dem ApoE-Phänotyp besitzen die dargestellten Kurven bei unterschiedlichen Konzentrationen Peaks. Woraus man schließen kann, daß der ApoE-Phänotyp die Konzentration des ApoJ/E-Partikels beeinflusst.

#### **5.3.4.2 Apo(a)/E-Konzentration**

Für den hier neu beschriebenen Apo(a)/E-Partikel wurde ebenfalls die Konzentration mit Hilfe eines selbsthergestellten Standards (1 mg/dl) bestimmt (Kapitel 4.3.3.2). Auch bei dieser Untersuchung zeigten sich die Proben mit dem ApoE-Phänotyp 3/3 als Normalpopulation. Das Vorliegen eines Apo $\epsilon$ 2-Allel scheint eine geringere und das Vorkommen eines Apo $\epsilon$ 4-Allel eine höhere Konzentration des Apo(a)/E-Partikels zu bewirken. In dieser Untersuchung waren auch homozygote Proben für Apo $\epsilon$ 2 und Apo $\epsilon$ 4 eingeschlossen und diese hatten, wie erwartet, die höchste bzw. die niedrigste Konzentration. Die heterozyoten Proben mit dem ApoE-Phänotyp 4/2 widersprechen aber dieser Aussage, da sie eine höhere Durchschnittskonzentration besitzen als die homozygoten Proben mit dem  $\epsilon$ 4-Allel. Doch muß dabei beachtet werden, daß die Konzentration aus zwei Proben errechnet wurde und keinen repräsentativen Durchschnitt darstellt. Bei der Ermittlung der Signifikanz der Konzentrationsunterschiede zeigten sich mit einer Ausnahme keine Unterschiede. Der ApoE-Phänotyp 3/2 hatte eine signifikant andere Konzentration wie die ApoE-Phänotypen 3/3, 4/3, 4/2 und 4/4. Eine Erklärung für dieses außergewöhnliche Ergebnis kann nicht gegeben werden.

Die graphische Darstellung aller in dieser Arbeit gemessenen Apo(a)/E-Konzentrationen gegen die Anzahl zeigte wie schon bei der Verteilung der Apo(a)-Konzentrationen eine linksschiefe Verteilungskurve. Für das Apo(a) im Serum wurde diese linksschiefe Verteilungskurve schon mehrfach beschrieben (Armstrong 1990). Anscheinend wirken auf den Apo(a)/E-Partikel die gleichen Gesetze wie auf das freie Apo(a) im Serum.



Bei der graphischen Darstellung der Apo(a)/E-Konzentrationen gegen die Anzahl nach ApoE-Phänotyp sortiert, sehen die Kurven sehr unterschiedlich aus, doch ist die Bevorzugung niedriger Konzentration bei allen ApoE-Phänotypen zu sehen.

#### **5.4 Kombination verschiedener Liquorparameter**

Bei den in dieser Arbeit nachgewiesenen Partikeln, Apo(a)/E bzw. ApoJ/E bestand für den ApoJ/E-Partikel eine Abhängigkeit vom ApoE-Phänotyp, für den Apo(a)/E-Partikel nicht (Ergebnisse 4.3.4.1 bzw. 4.3.4.2). Anschließend wurde untersucht, ob die Konzentration einzelner Apolipoproteinbestandteile die Konzentration der Partikel beeinflusst. Ein Zusammenhang der Konzentration des ApoJ und des ApoJ/E konnte nicht nachgewiesen werden. Die Konzentration des ApoJ/E-Partikel war ebenfalls nicht von der Konzentration des ApoE abhängig. Die Konzentration des Apo(a)/E-Partikels wurde weder von der Konzentration des Apo(a) noch von der Konzentration des ApoE beeinflusst. In einer abschließenden Betrachtung wurde untersucht, ob die Konzentration des einen Partikels die Konzentration des anderen beeinflusst. Aber auch hier war keine Abhängigkeit zu erkennen.

Eine Erklärung für diese unerwarteten Ergebnisse kann hier nicht gegeben werden. Wahrscheinlich existieren noch andere Faktoren, die die Konzentrationen der Partikel beeinflussen. Da auch keine Vorstellung von der Anzahl der einzelnen Apolipoproteine in diesem Partikel besteht, könnten damit Konzentrationsschwankungen erklärt werden.

#### **5.5 Protein Tau**

Das Protein Tau wurde bei Patienten mit Multipler Sklerose, mit dem Verdacht einer MS-Erkrankung sowie bei Patienten mit anderen degenerativen ZNS-Erkrankungen bestimmt (Ergebnis 4.5).

Sowohl die Multiple Sklerose als auch andere degenerative ZNS-Erkrankungen führen zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von Protein Tau im Liquor im Vergleich zur Patientengruppe mit nicht zu sichernder Multipler Sklerose. Obwohl eine ausschließliche Bestimmung der Konzentration von Protein Tau im Liquor keine Differenzierung zwischen chronisch-entzündlichen (Multiple Sklerose) und degenerativen ZNS-Erkrankungen erlaubt, ist deren Bestimmung diagnostisch wertvoll, da sie einen Aufschluß über die Aktivität der jeweiligen Erkrankung und die dabei erfolgende Beteiligung neuronaler Strukturen erlaubt.

Die Ergebnisse bestätigen die diagnostische Wertigkeit der Bestimmung von Protein Tau bei degenerativen Erkrankungen des ZNS. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen degenerativen Erkrankungen des ZNS ist jedoch nicht möglich (Arai et al. 1995).

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen ebenfalls die bei Patienten mit Multipler Sklerose vorliegende ausgeprägte intrathekale Synthese von IgG (Rifai et al. 1987).

## **5.6 Serumuntersuchungen**

Von einigen Patienten existierten Liquor- und Serumproben, in denen ebenfalls die Konzentrationen des ApoE und Apo(a) gemessen wurden. Da der ApoE-Phänotyp im ganzen Körper gleich ist, war für diese Proben bereits der ApoE-Phänotyp bestimmt worden. Beide so erhaltenen Werte konnten so in Zusammenhang zueinander gesetzt werden.

### **5.6.1 ApoE-Konzentration**

Die ApoE-Konzentration im Serum ist vom ApoE-Phänotyp abhängig (Ergebnisse 4.6.1). Das Apo $\epsilon$ 4-Allel führte zu einer Absenkung, wohingegen das Apo $\epsilon$ 2-Allel eine Erhöhung der Konzentration bewirkte. In den hier bestimmten Untersuchungen besaßen die Proben mit dem ApoE-Phänotyp 4/4 außergewöhnlich hohe Konzentrationen. Das Kollektiv setzte sich aber nur aus zwei Einzelwerten zusammen und ist somit statistisch nicht zu verwerfen. Die hier bestimmte Serumverteilung des ApoE unterscheidet sich nicht signifikant von der in der Literatur bei Utermann 1987 veröffentlichten.

### **5.6.2 Apo(a)-Konzentration**

Bei den Serumproben wurde ebenfalls die Apo(a)-Konzentration bestimmt (Kapitel 4.6.2). Bei den Serum Apo(a)-Konzentrationen ergab sich, wie schon bei den Liquorkonzentrationen bei einer Verteilung nach dem ApoE-Phänotyp, kein signifikanter Unterschied. Dies bedeutet, daß die Konzentration nicht von dem ApoE-Phänotyp beeinflusst wird.

## **5.7 Vergleich Liquor – Serum**

Da sowohl Liquor- als auch Serumkonzentration der Apolipoproteine genetisch determiniert sind, sollte sich ein Zusammenhang zwischen den beiden Kompartimenten zeigen. Dieser Fall wurde für die Apolipoproteine AI, E, CII und

CIII von Roheim et al. 1979 beschrieben. Im anderen Fall müßten die Syntheseraten in Liquor und Serum von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst werden. So wird im Serum die Synthese der Apolipoproteine von dem Fettgehalt des Blutes oder dem Fettbedarf der Leber beeinflusst. Da keine Fette im Gehirn vorkommen, ist eine derartige Steuerung nicht möglich. Bei Verletzungen des Gehirns wird vermehrt ApoE synthetisiert, da dieses an der Heilung beteiligt ist. Im Serum spielt das ApoE keine Rolle bei der Bekämpfung von Verletzungen. Schon diese unterschiedlichen Aufgaben des ApoE würden auch unterschiedliche Syntheseraten in Liquor und Serum erklären.

### **5.7.1 Apolipoprotein E**

Um einen Zusammenhang zwischen Liquor- und Serumkonzentration nachweisen zu können, wurde der Differenzkoeffizient ermittelt. Mit diesem Wert muß die Liquorkonzentration multipliziert werden, um zur Serumkonzentration zu gelangen. Für das Apolipoprotein E schwankte der Faktor von 0,4 bis 50 (Ergebnis 4.7.1). Laut Pitas et al. 1987 sollte dieser Differenzkoeffizient bei ca. 20 liegen. Der Durchschnittswert der für die verschiedenen ApoE-Phänotypen bestimmten Medianwerte mit Ausnahme des Wertes für den ApoE-Phänotyp 4/4 liegt ungefähr bei 10. Der Differenzkoeffizient für den ApoE-Phänotyp 4/4 sollte ignoriert werden, da er sich nur aus zwei Einzelwerten zusammensetzt und damit sehr fraglich ist.

Da es sich bei den hier untersuchten Proben immer um Liquor von erkrankten Personen handelt, können diese Krankheiten die Konzentration des ApoE im Liquor beeinflusst haben und so die Schwankungen des Differenzkoeffizienten verursachen.

### **5.7.2 Apolipoprotein (a)**

Für das Apo(a) konnte kein Zusammenhang zwischen Serum- und Liquorkonzentration gefunden werden. Der Faktor schwankte von 0,3 bis 20.000. Die Medianwerte für die verschiedenen ApoE-Phänotypen lagen um 1100.

Diese starken Schwankungen lassen sich mit den stark variierenden Durchschnittskonzentrationen für Liquor und Serum erklären. So variieren die Serumwerte des Apo(a) von <1 mg/dl bis >200 mg/dl. Als weitere Ursache muß noch bedacht werden, daß die hier untersuchten Proben von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen stammen. Diese Erkrankungen könnten natürlich auch die Konzentration des Apo(a) beeinflusst haben. Da es in Deutschland ethisch nicht vertretbar ist, Gesunde dem Risiko einer Rückenmarkspunktion

auszusetzen, wird diese Maßnahme nur in begründeten Fällen durchgeführt. Bei Patienten mit Multipler Sklerose oder Hirnhautentzündung sind oftmals Liquoruntersuchungen notwendig. Bei diesen beiden Erkrankungen sind verschiedene Liquorparameter oftmals verändert, z.B. eine IgG-Erhöhung bei MS. Es könnten also auch die Konzentrationen der Apolipoproteine beeinflusst sein.

### **5.8 Posttranslationale Prozessierung des Apolipoprotein E**

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung (Kapitel 4.8) zeigen, daß ApoE im Liquor cerebrospinalis einer wesentlich stärkeren posttranslationalen Prozessierung in Form einer stärkeren Glykosilierung unterliegt als im Serum. So hatten bereits Basu et al. 1982 sowie Pitas et al. 1987 beschrieben, daß neusynthetisiertes ApoE im Liquor sehr viel stärker sialisiert ist wie im Serum.

Die meisten der dabei nachweisbaren zusätzlichen Banden sind durch Bindung von Neuraminsäuren hervorgerufene Mono-, Di-, Tri- und Tetrasialoformen, die durch Verdauung mit Neuraminidase in die Asialoform überführt werden können (Ergebnis 4.8).

Eine der zusätzlichen Banden ist offensichtlich nicht Folge einer Sialinisierung, Sulfatierung oder Phosphorylierung und bleibt auch nach Behandlung mit einer Neuraminidase, Sulfatase bzw. Phosphatase nachweisbar (Ergebnis 4.8, Abbildung 34).

Es gibt noch weitere mögliche Gruppen, die diese zusätzliche Bande bei der ApoE-Phänotypisierung verursachen könnten. Es könnte sich auch um eine Sulfat- bzw. Phosphogruppe handeln, die nur von den in dieser Arbeit verwendeten Enzymen nicht abgespalten werden konnte.

Die verstärkte posttranslationale Prozessierung von ApoE im Liquor spielt wahrscheinlich eine Rolle bei dessen spezifischer Funktion im Bereich des Zentralen Nervensystems. Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung dieser verstärkten Prozessierung bleibt jedoch weiteren Studien vorbehalten.

### **5.9 Abbauprozesse des Apolipoproteins E**

Um den Einfluß von Abbauprozessen auf die ApoE-Konzentration ausschließen zu können, wurden Liquor- und Serumproben sehr lang bei 4°C gelagert oder vielfach aufgetaut und eingefroren. Bei den Lagerungsversuchen mit dem ApoE zeigte sich ein nur 15 kD großes Protein, das ebenfalls mit dem ApoE-Antikörper wechselwirken konnte (Ergebnis 4.9). In der Isoelektrischen Fokussierung zeigte

sich dieses 15 kD große Protein als zweite Bande neben dem 34 kD großen Protein. Da bei der Isoelektrischen Fokussierung die Proteine nach ihrer Ladung und nicht nach ihrer Größe aufgetrennt werden, kann daraus gefolgert werden, daß das 15 kD große Protein, den gleichen isoelektrischen Punkt wie das 34 kD große ApoE-Protein besitzen muß. Durch die Bindung des Antikörper ist nachgewiesen, daß die Bindungsstelle des Antikörpers in diesem Abbauschritt noch nicht zerstört worden ist.

Im weiteren Fortschreiten des ApoE-Abbaus wird auch die Bindungsstelle des Antikörpers zerstört. Proben die bereits so stark zerfallen waren, ließen sich nicht mehr phänotypisieren.

## **5.10 Abschlußbetrachtung**

### **5.10.1 Apolipoproteine des Liquors**

Alle hier durchgeführten Untersuchungen wurden mit Liquor und Serum von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen durchgeführt. Ein Einfluß dieser Krankheiten auf die in dieser Arbeit bestimmten Parameter ist bisher nicht bekannt, kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Um diese Unsicherheit ausschließen zu können, sollten die Messungen nochmals mit Liquor von gesunden Personen überprüft werden.

Die deutlich von den in der Literatur (Pitas et al. 1987) veröffentlichten Konzentrationswerten von 5,4 mg/dl im Serum bzw. 0,29 mg/dl im Liquor abweichenden Konzentrationen des ApoE wurden alle nochmals nachgemessen. Durch diese Kontrolle von unerwartet hohen und niedrigen Werten, konnten die ermittelten Konzentrationen bestätigt werden. Mit diesem Vorgehen können Meßfehler ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der Proteinkonzentrationen im Liquor durch eine Einblutung während der Rückenmarkspunktion wurde über die Bestimmung des nur für das Serum typischen Apolipoprotein B ausgeschlossen. Möglicherweise jedoch war die Empfindlichkeit des hier verwendeten ApoB-ELISAs nicht ausreichend genug, um wirklich jede Einblutung nachzuweisen. Ein zu niedriger Wert der ApoE-Konzentration des Liquors oder Serums könnte durch verschiedene Abbauprozesse wie auch Proteasen verursacht worden sein. Das mehrfache Einfrieren und Auftauen führte zur Beschädigung des ApoE, wie in Kapitel 4.9 gezeigt wurde.

Diese hier für die starken Schwankungen des ApoE geltenden Erklärungen können aber auch als Erklärung für schwankende Konzentrationen des Apo(a) sowie des ApoJ dienen.

### **5.10.2 Apo(a)/E- und ApoJ/E-Partikel**

Der bereits in der Literatur beschriebene ApoJ/E-Partikel (Borghini et al. 1995) und der in dieser Arbeit neu entdeckte Apo(a)/E-Partikel ließ sich in deutliche Mengen im Liquor nachweisen. Die Kreuzimmunelektrophoresegele zeigten für den ApoJ/E-Partikel und den Apo(a)/E-Partikel, daß jeweils beide beteiligten Apolipoproteine vollständig in dem Partikel gebunden sind. Da nun das gesamte ApoE immer mit dem ApoJ assoziiert ist, muß das Apo(a) ebenfalls an diesem Partikel hängen. Es handelt sich also um einen Partikel und nicht um zwei verschiedene. Da man weder über die Funktionen und Aufgaben des ApoJ noch über die des Apo(a) nähere Angaben machen kann, kann man auch keinen Grund für das Auftreten der Apolipoproteine in Form eines Partikels nennen. Aufgrund der sehr geringen Konzentrationen der Partikel im Liquor war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich genauere Informationen über den Aufbau des bzw. der Partikel zu ermitteln. Wahrscheinlich handelt es sich um eine lose Verbindung aus unterschiedlich vielen ApoJ-, ApoE- und Apo(a)-Molekülen. Ob noch weitere im Liquor vorkommende Apolipoproteine in diesen Verbund eingebaut sind, wurde hier nicht untersucht, ist aber aufgrund der bisher veröffentlichten Untersuchungen in der Literatur (Roheim et al. 1979, Borghini et al. 1995) wahrscheinlich. Abbildung 37 zeigt eine mögliche Zusammensetzung des im Liquor vorkommenden Apolipoproteinpartikels.

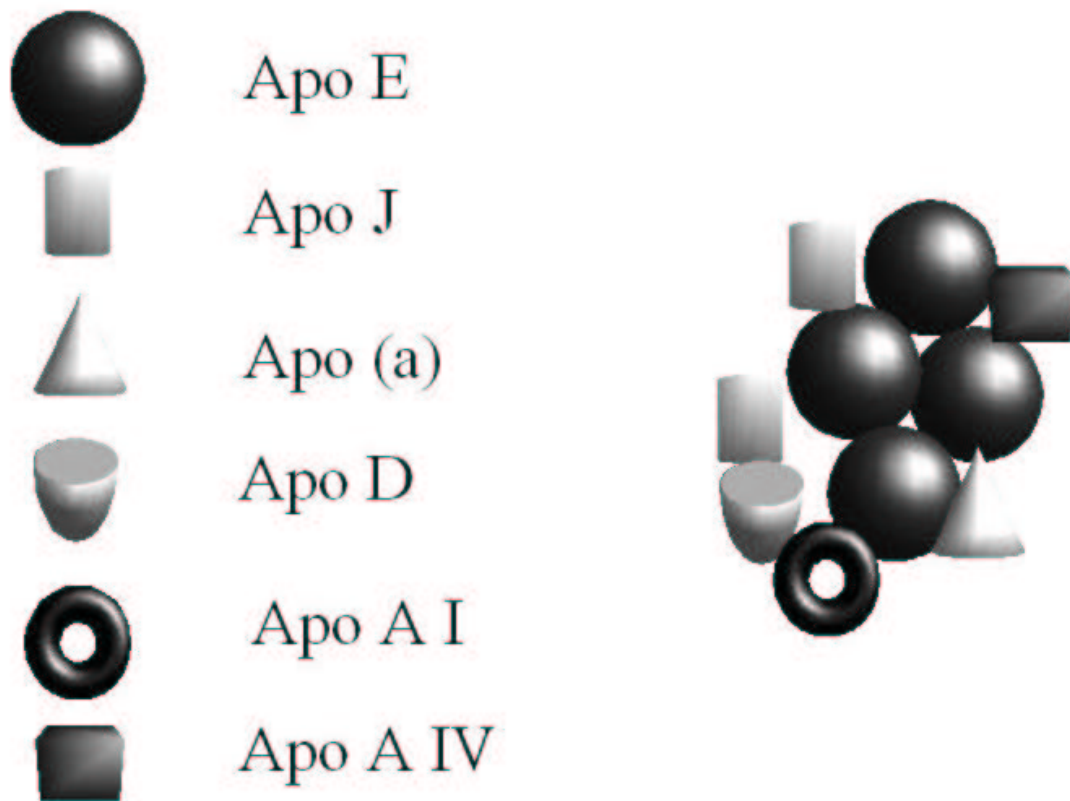


Abbildung 37: Mögliches Aussehen des Apolipoprotein-Partikels im Liquor

Abbildung 37 ist eine hypothetische Darstellung des Apolipoproteinpartikels im Liquor. Es können noch weitere Apolipoproteine an diesem Partikel beteiligt sein, deren Existenz im Liquor bisher noch nicht untersucht worden ist. Dieser Partikel wurde aus dem von Borghini et al. (1995) beschriebenen LpE-Partikel weiterentwickelt, indem das Apo(a) hinzugefügt wurde. Die Position sowie die Anzahl der einzelnen Apolipoproteinen in diesem Partikel sind hypothetisch und bisher nicht erforscht.

Lipoprotein-Partikel mit variabler Anzahl der beteiligten Apolipoproteine wurden bereits von Bard et al. 1992 für das Serum beschrieben. Bard und Kollegen haben Lp(a)-Partikel mit 9 bis 22 ApoE beschrieben. Das Lp(a) ist eine Mischung verschiedener Partikel aus den gleichen Apolipoproteinen in variablen Anteilen.

Diese Variabilität der Anzahl der einzelnen Apolipoproteine findet man sicherlich ebenfalls bei dem Apolipoprotein-Partikel des Liquors. Dies würde die starken Schwankungen der Konzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten Apolipoproteine erklären.

Dieser Partikel könnte sich mit Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Apolipoproteinen oder auch nur mit schwachen Wechselwirkungen stabilisieren. Im Liquor vorkommende Ionen könnten ebenfalls zur Stabilisierung dieses Partikels beitragen.

Der genaue Aufbau und die Zusammensetzung des Lipoproteinpartikels im Liquor sollte Gegenstand einer weiterführenden Arbeit sein.



## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Apolipoproteine des Liquors untersucht, um bestehende Zusammenhänge nachzuweisen, die eventuell später bei der Diagnose von Erkrankungen eingesetzt werden könnten.

Das ApoE aller Proben wurde phänotypisiert. Die Konzentrationen des ApoJ und Apo(a) wurden mit Hilfe selbst- bzw. in der Arbeitsgruppe entwickelter ELISAs bestimmt. Durch Kombination der existierenden ELISAs konnte der von Borghini et al. 1995 beschriebene LpE-Partikel und ein bisher nicht bekannter Apolipoprotein-Partikel aus Apo(a) und ApoE nachgewiesen werden. Die relative Konzentration dieses Apo(a)/E- und des ApoJ/E-Partikels wurde bestimmt. Mit Hilfe der Kreuzimmunelektrophorese konnte nachgewiesen werden, daß die Apolipoproteine Bestandteil eines Partikels sind. Aufgrund der gefundenen Informationen wurde die These postuliert, daß es sich bei diesen Partikeln um einen gemeinsamen Partikel aus ApoE, ApoJ und Apo(a) handelt. Detaillierte Daten über den Aufbau und die Zusammensetzung des Partikels konnten bisher nicht gewonnen werden.

Im Liquor wurden die Konzentrationen von ApoE, Apo(a) und ApoJ gemessen. Diese Konzentrationen wurden in Zusammenhang zu dem ApoE-Phänotyp der entsprechenden Probe gesetzt. Wo möglich wurde ApoE und Apo(a) auch im Serum der entsprechenden Patienten bestimmt. Auch diese Konzentrationen wurden in Beziehung zu ihrem ApoE-Phänotyp gesetzt. Zuletzt wurden für die Apolipoproteine E und (a) die Liquor- und Serumkonzentration in Beziehung zueinander gesetzt. Außer für das ApoE und den ApoJ/E-Partikel konnte für keines der untersuchten Apolipoproteine weder im Liquor noch im Serum ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Konzentration des Apolipoproteins und dem ApoE-Phänotyp gefunden werden.

Zusätzlich zu den Apolipoproteinen des Liquors wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Dresden das Tau-Protein gemessen. Die Ergebnisse bestätigen die diagnostische Wertigkeit der Bestimmung von Protein Tau bei degenerativen Erkrankungen des ZNS. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen degenerativen Erkrankungen des ZNS ist jedoch nicht möglich.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit untersuchte die Rolle des ApoE im Gehirn. Dabei zeigte sich, daß die Synthese des ApoE durch die Astrozyten ein sehr komplexer

Vorgang sein muß. Eine weitere Untersuchung des ApoE wies die stärkere Glykolisierung im Liquor im Vergleich zum Serum nach.

## 7 Literatur

Ackermann, Hanns

BiAS Version 5.02

Epsilon-Verlag, Hochheim-Darmstadt

Arai, H.; Terajima, M.; Miura, M.; Higuchi, S.; Muramatsu, T.; Machida, N.; Seki, H.; Takase, S.; Clark, CM.; Lee, VM-Y.; Trojanowski, JQ.; Sasaki, H.

Tau in cerebrospinal fluid: a potential diagnostic marker in Alzheimer's disease

Ann Neurol, 38; S. 649-652, 1995

Armstrong, V.W.

Lipoprotein(a): Charakteristik eines besonderen Lipoproteins und dessen mögliche klinische Bedeutung

Therapeutische Umschau, Band 47, Heft 6, 1990

Armstrong, V.W.; Walli, A.K.; Seidel, D.;

Isolation, characterization, and uptake in human fibroblasts of an apo(a)-free lipoprotein obtained on reduction of lipoprotein(a)

J. Lipid Res., Vol. 26, S. 1314-1323, 1985

Assmann, G.; Schmitz, G.; Menzel, H.J.; Schulte, H.

Apolipoprotein E polymorphism and hyperlipidemia

Clin. Chem. Vol, 30, S. 641-643, 1984

Basu, S.K.; Ho, Y.K.; Brown, M.S.; Bilheimer, D.W.; Anderson, R.G.W.; Goldstein, J.L.

J. Biol. Chem., Vol. 257; S. 9788-9795; 1982

Beg, O.U.; Meng, M.S.; Skarlatos, S.I.; Previato, L.; Brunzell, J.D.; Brewer, H.B.; Fojo, S.S.;

Lipoprotein lipase Bethesda: a single amino acid substitution (Ala176 -Thr) leads to abnormal heparin binding and loss of enzymic activity

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 87, p. 3474-3478, 1990

Berg, K. ;

A new serum type system in man – Lp system

Acta. Pathol. Microbiol. Scand., Vol. 59; S. 369-382; 1963

Bertrand, Philippe; Poirier, Judes; Oda, Tomiichiro; Finch, Caleb E.; Pasinetti, Giulio Maria

Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease

Molecular Brain Research, Vol. 33, S. 174-178, 1995

Boehrwinkel, E.; Utermann, G.

Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B, and cholesterol metabolism

Am. J. Hum. Genet., Vol. 42, p. 104-112, 1988

Borghini, Isabelle; Barja, Francisco; Pometta, Daniel; James, Richard W.

Characterization of Subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid

Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1255, p. 192-200, 1995

Boyles, J.K.; Pitas, R.E.; Wilson, E.; Mahley, R.W.; Taylor, J.M.

J. Clin. Invest., Vol. 76, S. 1501-1513, 1985

Boyles, J.K. ; Zoeliner, C.D. ; Anderson, L.J. et al.

A role for apolipoprotein E, Apolipoprotein A-1 and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and remyelination of rat sciatic nerve

J. Clin. Invest., Vol. 83, S. 1015-1031, 1989

Cooper, Terrance G.

übersetzt und bearbeitet von Reinhard Neumeier und H. Rainer Maurer

Biochemische Arbeitsmethoden

Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1981

Davignon, J.; Gregg, R.E.; Sing, S.F.

Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis

Atherosclerosis, Vol. 8, p. 1-21, 1988

de Silva, Harshini V.; Stuart, William D.; Park, Yong B.; Mao, Simon J.T.; Gil,

Cleris M.; Wetterau, John R.; Busch, Steven J.; Harmony, Judith A.K.;

Purification and Characterization of Apolipoprotein J

J. Biol. Chem., Vol. 265/24, p. 14292-14297, 1990

Dunn, O.J.

Multiple comparisons using rank sums

Technometrics, Vol. 6, S. 241-252; 1964

Eaton, D.L.; Fless, G.M.; Kohr, W.J.; McLean, J.W.; Xu, Q.T.; Miller, C.G.; Lawn, R.M.; Scanu, A.M.

Partial amino acid sequence of apolipoprotein (a) shows that it is homologous to plasminogen

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 84, S. 3224-3228; 1987

Ehnholm, C.; Garoff, H.; Simons, K.; Aro H.;

Protein and carbohydrate composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma

Biochemistry, Vol. 11; S. 3229-3232, 1972

Emi, M.; Hata, A.; Robertson, M.; Iverius, P.-H.; Hegele, R.; Lalouel, J.-M.

Lipoprotein lipase deficiency resulting from a nonsense mutation in exon 3 of the lipoprotein lipase gene

Am. J. Hum: Genet., Vol. 47, p. 107-111, 1990

Fless, G.M.; Rolih, C.A.; Scanu, A.M.

Heterogeneity of human plasma lipoprotein Lp(a)

J. Biol. Chem. Vol. 259, S. 11470-11478; 1984

Fless, G.M.; zum Mallen, M.; Csanu, A.M.;

Physicochemical properties of apolipoprotein(a) and lipoprotein(a-) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein(a)

J. Biol. Chem., Vol. 261, S. 8712-8718, 1986

Gaubatz, J.W.; Heidemann, C.; Gotto, A.M.; Morrisett, J.D.; Dahlén, G.H.;

Human plasma lipoprotein (a)

J. Biol. Chem. Vol. 258, S. 4582-4589, 1983

Gregg, R. E.; Brewer, H. B.;

The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans

Clin. Chem., Vol. 34, S. B28-B32, 1988

Groß, E.; März, W.; Siekmeier, R.; Scharrer, I.; Groß, W.

Preparation of lipoprotein (a) from dextran sulfate absorbers

56th Meeting of the European Atherosclerosis Society (EAS), Cagliari, 10-13. Oktober 1990

Groß, W.; Ring, K.; Lodemann, E.

Physiologische Chemie

Edition Medizin, Vol. 1, S. 166-212, 1988

Hahne, Solveig et al.

Levels of cerebrospinal fluid apolipoprotein E in patients with AD and healthy controls

Neurosci. Lett., Vol. 224; S. 99-102; 1997

Henderson, H.E.; Devlin, R.; Peterson, J.; Brunzell, J.D.; Hayden, M.R.

Frameshift mutation in exon 3 of the lipoprotein lipase gene causes a premature stop codon and lipoprotein deficiency

Mol. Biol. & Med., Vol. 7, S. 511-517, 1990

Herz, Joachim

The LDL-receptor-related protein – portrait of a multifunctional receptor

Current opinion in Lipidology, Vol. 4, S. 107-113, 1993

Hixon, J.E.; Vernier, D.T.;

Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI

J. Lipid Res., Vol. 31, S. 545-548, 1990

Holm, S.

A simple sequentially rejective multiple test procedure

Scand. J. Stat. Vol. 6, S. 65-70; 1979

Ikeda, Yasuyuki; Takagi, Atsuko; Yamamoto, Akira

Purification and characterization of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase from human postheparin plasma: production of monospecific antibody to the individual lipase

Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1003, S. 254-269, 1989

Innerarity, T. L.; Mahley, R. W.; Weisgraber, K. H.; Bersot T. P.;

Apoprotein (E-AII) complex of human plasma lipoproteins

J. Biol. Chem., Vol. 253, S. 6289-6295, 1978

Jürgens, G.; Kostner, G.M.

Studies on the structure of the Lp(a) lipoprotein: Isolation and partial characterization of the Lp(a)-specific antigen

Immunogenetics, Vol. 1, S. 560-569, 1975

Kamboh, M. Illyas; Ferrell, R.E.; Kottke, B.A.

Expressed Hypervariable Polymorphism of Apolipoprotein (a)

Am. J. Hum. Genet., Vol. 49, S. 1063-1074, 1991

Kemeny, D.M.

ELISA

Anwendung des Enzyme linked Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor

Gustav Fischer, 1994

Kim, Dong-Ho; Iijima, Hiroaki; Goto, Kaoru; Sakai, Juro; Ishii, Hirofumi; Kim, Hyoun-Ju; Suzuki, Hiroyuki; Kondo, Hisatake; Saeki, Shigeru; Yamamoto, Tokuo  
Human Apolipoprotein E Receptor 2

J. Biol. Chem., Vol. 271, No. 14; S. 8373-8380; 1996

Kirchgessner, T.G.; Chuat, J.-C.; Heinzmann, C.; Etienne, J.; Guilhot, S.; Svenson, K.; Ameis, D.; Pilon, C.; d'Auriol, L.; Andalibi, A.; et al.

Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, S. 9647-9651, 1989

Kostner, G. M.

Chemie und Struktur menschlicher Plasma- und Lymphlipoproteine

Handbuch für Innere Medizin VII/4, S. 125-127, 1976

Kraft, Hans Georg, Utermann, Gerd

Lipoprotein (a)

Kapitel 12, S. 250- 258

Kratky, O.; Leopold, H.; Stabinger, H.

The determination of the partial specific volume of proteins by the mechanical oscillator technique

Methods. Enzymol., Vol. 27, S. 48-110, 1973

Kruskal, W.H.; Wallis, W.A.

Use of ranks in one-criterion variance analysis

J. Amer. Stat. Ass., Vol. 47, S. 583-621 und S. 48 (1953), S. 907-911; 1952

Kunitake, S.T.; Kane, J.P.

Factors affecting the integrity of high density lipoproteins in the ultracentrifuge

J. Lipid. Res., Vol. 23, S. 936-940, 1982

Lackner, C.; Boerwinkle, E.; Leffert, C.; Rahming, T.; Hobbs, H.H.

J.Clin. Invest, Vol. 87, S. 2153-2161, 1991

Laemmli, U.K.;

Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4

Nature, Vol. 227, S. 680-685; 1970

Langlois, S.; Deeb, S.; Brunzell, J.D.; Kastelein, J.J.; Hayden, M.R.  
A major insertion accounts for a significant proportion of mutations underlying human lipoprotein lipase deficiency

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, S. 948-952, 1989

Lehtimäki, Terho; Pirttilä, Tuula; Mehta, Pankaj D.; Wisniewski, Henryk M.; Frey, Harry; Nikkari, Tapio

Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease

Hum. Genet.; Vol. 95; S. 39-42; 1995

Lindgren, F.T.

Preparative ultracentrifuge laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis

Perkins EG (ed) Analysis of lipids and lipoproteins

Am. Oil. Chem. Soc., Champaign IL, S. 204 – 224, 1975

Mahley, R.W.

Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology

Science, Vol. 240, S. 622-630, 1988

Marcovina, Santica M.; Zhang, Zu Hui; Gaur, Vinod P.; Albers, John J.

Identification of 34 Apolipoprotein(a) Isoforms: Differential Expression of Apolipoprotein(a) Alleles between American Blacks and Whites

Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 191 No. 3, S. 1192-1196, 1993

Martel, C.L.; Ghiso, J.; Frangione, B.; Zlokovic, B.V.

Transport of apolipoproteins E and J at the blood-brain barrier Relevance to Alzheimer's disease

S.T.P. Pharma Science, Vol. 7/1, S. 28-36, 1997

März, W.; Groß, W.

Apolipoprotein quantitation by zone immunoelectrophoresis assay

Fourth Münster Atherosclerosis Symposium, Münster, 30. September – 2. Oktober 1985



- Matsubara, Etsuro; Frangione, Blas; Ghiso, Jorge  
Characerization of Apolipoprotein J-Alzheimers's A-beta Interaction  
J. Biol. Chem., Vol. 270/13, S. 7563-7567, 1995
- McLean, J.W.; Tomlinson, J.E.; Kuang, W.J.; Eaton, D.L.; Chen, E.Y.; Fless, G.M.; Scanu, A.M.; Lawn, R.M.  
cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen  
Nature, Vol. 330, S. 132-137, 1987
- Murray, J.C.; Buetow, K.H.; Donovan, M.; Hornung, S.; Motulsky, A.G.; Distech, C.; Dyer, K.; Swisshelm, K.; Anderson, J.; Giblett, E.; Sadler, E.; Eddy, R.; Shows, T.B.  
Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27  
Am. J. Hum. Gen.; Vol. 40, S. 338-350, 1987
- Murray, J.C.; Sadler, E.; Eddy, R.L.; Shows, T.B.; Buetow, K.H.;  
Evidence for assignment of plasminogen (PLG) to chromosome6, not chromosome4  
Cytogenet. Cell Genet., Vol. 40, S. 709, 1985
- Muser, Jürgen  
Labordiagnostik des Liquor Cerebrospinalis  
LaboLife, Société Suisse de Chimie Clinique, No. 1, 1996
- Nilsson-Ehle, P.; Garfinkel, A.S.; Schotz, M.C.  
Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism  
Annu.Rev. Biochem., Vol. 49, S. 667-693, 1980
- Pitas, Robert E.; Boyles, Janet K.; Lee, Susan H.; Foss, Donna; Mahley, Robert W.  
Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins  
Biochim. Biophys. Acta, Vol. 917, S. 148-161, 1987
- Pitas, R.E.; Boyles, J.K.; Lee, S.H.; Hui, D.; Weisgraber, K.H.  
J. Biol. Chem., Vol. 262, S. 14352-14360, 1987
- Poirier, J.; Baccichet, A; Dea, D.; Gauthier, S.;  
Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats  
Neuroscience, Vol. 55, S. 81-90, 1993

- Poirier, J.; Hess, M.; May, PC; Finch, C.E.  
Apolipoprotein E- and GFAP-RNA in hippocampus during reactive  
snaptogenesis and terminal proliferation  
Mol. Brain Res., Vol, 11, S. 97-106, 1991
- Rall, Stanley C.; Weisgraber, Karl H.; Mahley, Robert W.  
Human Apolipoprotein E  
J. Biol. Chem., Vol. 257, S. 4171-4178, 1982
- Reiber, H.  
Liquordiagnostik  
Diagnose & Labor, Vol. 37, S. 63, 1987
- Reiber, H.; Felgenhauer, K.  
Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the  
humoral immune response within the cetral nervous system  
Clin. Chem. Acta, Vol. 163, Seite 319 ff., 1987
- Reiber, H.  
Untersuchung des Liquors zur Diagnose neurologischer Erkrankungen  
Labordiagnostik von Erkrankungen des Nervensystems  
Hrsg. M. Holzgraete  
perimed Fachbuch Verlagsgesellschaft; Erlangen 1988, S. 35-50
- Rider, A.K.; Levy, R.I.; Fredrickson, D.S.  
„Sinking“ pre-beta lipoprotein and the Lp Antigen  
Circulation, Vol. 42, S. III-10, 1970
- Rifai, Nader; Christenson, Robert H.; Gelman, Benjamin B.; Silverman, Lawrence  
M.  
Changes in Cerebrospinal Fluid IgG and Apolipoprotein E Indices in Patients with  
Multiple Sclerosis during Demyelination and Remyelination  
Clin.Chem. 33/7, S. 1155-1157, 1987
- Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage, Urban & Fischer
- Roheim, P.S.; Miller, L.; Eder, H.A.  
J. Biol. Chem., Vol. 240, S. 2994-3001, 1965
- Roheim, Paul S.; Carey, Michael; Forte, Trudy; Vega, Gloria L.  
Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76, No. 9, S. 4646-4649, 1979

Sachs, L.

Angewandte Statistik

Springer Verlag, Kapitel 62, 1992

Schipper, H.I.

Nachweis oligoklonaler Immunglobuline im Liquor durch isoelektrische Fokussierung

Labordiagnostik von Erkrankungen des Nervensystems

Hrsg. M. Holzgraefe

perimed Fachbuch Verlagsgesellschaft, Erlangen 1988, S. 51-56

Schmechel, D.E.; Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Crain, B.J.; Hulette, C.M.; Joo, S.H.; Pericak-Vance, M.A.; Goldgaber, D.; Roses, A.D.

Increased amyloid  $\beta$ -peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90; S. 9649-9653, 1993

Schmitz, Brigitte; Griffith, Lee S.

N-Acetylglucosaminylierung: die Alternative zur Ser/Thr-Phosphorylierung

Biospektrum, Vol. 6, S. 25-28, 1998

Schumaker, V.N.; Puppione, D.L.

Introduction to the plasma lipoproteins

Methods in Enzymology, Vol. 128

Segrest, J.P.; Albers, J.J. (eds.), Academic Press Inc., Orlando, S. 155-170; 1986

Stibler, H.

The normal cerebrospinal fluid proteins identified by means of thin-layer isoelectric focusing and crossed immunoelectrofocusing

J. Neurol. Sci., Vol. 36, S. 273 ff., 1978

Swisshelm, K.; Dyer, K.; Sadler, F.; Disteché, C.;

Localization of the plasminogen gene (PLG) to the distal portion of the long arm of human chromosome 6 by in situ hybridization

Cytogenet. Cell Genet., Vol. 40; S. 756; 1985

Tomlinson, J.E.; McLean, J.W.; Lawn, R.M.

Rhesus monkey apolipoprotein (a): Sequence, evolution, and sites of synthesis

J. Biol. Chem., Vol. 264, S. 5957-5965, 1989

Utermann, G.; Kindermann, I.; Kaffarnik, H.; Steinmetz, A.

Apolipoprotein E phenotypes and hyperlipidemia

Hum. Gen. Vol. 65, S. 232-236, 1984

Utermann, G.; Menzel, HJ.; Kraft, HG.; Duba, MC.; Kemmler, HG.; Seitz, C.

Lp(a) gp phenotypes: inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in Plasma.

Clin Invest, S. 458-465; 1987

Utermann, G.; Weber, W.

Protein composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma

FEBS Lett., Vol. 154, S. 357-361, 1983

Utermann, Gerd

Apolipoprotein E polymorphism in health and disease

American Heart Journal, Vol. 113, No. 2, Pt. 2, S. 433-440; 1987

Weisgraber, K.H.; Rall, S.C.; Mahley, R.W.

Human apoprotein E heterogeneity

J. Biol. Chem.; Vol. 256, S. 9077-9083, 1981

Wenham, Philipp R.; Price, William H.; Blundell, Gillian

Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR

Lancet, Vol. 337, S. 1158-1159, 1991

Wernette-Hammond, Mary Ellen; Lauer, Stephen J.; Corsini, Alberto; Walker, David; Taylor, John M.; Rall, Stanley C.

Glycosylation of Human Apolipoprotein E

J. Biol. Chem., Vol. 264/15, S. 9094-9101, 1989

Yamauchi, Kazuyoshi; Tozuka, Minoru; Nakabayashi, Tetsuo; Sugano, Mitsutoshi; Hidaka, Hiroya; Kondo, Yoshiyuki; Katsuyama, Tsutomu

Apolipoprotein E in Cerebrospinal Fluid: Relation to Phenotype and Plasma Apolipoprotein E Concentrations

Clin. Chem., Vol. 45/4, S. 497-504, 1999

Zannis, Vassilis I.; Breslow, Jan L.

Human Very Low Density Lipoprotein Apolipoprotein E Isoprotein Polymorphism Is Explained by Genetic Variation and Posttranslational Modification

Biochemistry, Vol. 20, S. 1033-1041, 1981

Zannis, V.I.; Breslow, J.L.; SanGiacomo, T.R.; Aden, D.P.; Knowles, B.B.  
Biochemistry, Vol. 20, S. 7089-7096, 1991b

## Curriculum Vitae

Name	Simone Ommert, Dipl.-Biochemikerin
Geburtsdatum	25.10.1967
Geburtsort	Frankfurt am Main
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Verheiratet, seit 1997
Schule	1973 – 1977 Uhlandschule 1977 – 1983 Erich Kästner-Schule 1983 – 1986 Albert-Einstein-Schule, Abschluß mit dem Abitur, Leistungskurse: Chemie und Mathematik
Ausbildung	1986 – 1988 Stenosekretärin im öffentlichen Dienst (Polizeipräsidium Frankfurt am Main)
Studium	1988 – 1990 Biologie, Vordiplom, Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main 1990 – 1993 Biochemie, Diplom Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Badenhoop, Zentrum der Inneren Medizin, Uniklinikum Frankfurt am Main
Thema der Arbeit	Nachweis von Genvariationen des HLA-Systems mittels SSCP bei Patienten mit endokrinen Erkrankungen
Promotion	1994 – 2000 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Groß am Zentrum für Biologische Chemie, Angewandte Biochemie, Uniklinikum Frankfurt am Main
Gegenwärtige Beschäftigung	Omnicare Clinical Research GmbH als Clinical Monitoring Associate

Nidderau, 12. Februar 2001

*Simone Ommert*

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, daß ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 12.02.2001



.....  
(Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über

**APOLIPOPROTEIN E UND VERWANDTE PARAMETER IM  
LIQUOR CEREBROSPINALIS**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 12.02.2001



.....  
(Unterschrift)