

Tanja Keiper

Dr.sc.hum.

**Analysen zur Struktur-Funktions-Beziehung und Atherogenität von humaner
Lipoproteinlipase und Hepatischer Lipase**

Geboren am 31.07.1968 in Rockenhausen

Reifeprüfung am 22.06.1987 in Winnweiler

Studiengang der Fachrichtung Biologie-Diplom vom WS 1990/91 bis SS 1996

Vordiplom am 04.06.1993 an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

Diplom am 27.08.1996 an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg.

Promotionsfach : Innere Medizin

Doktorvater : Priv.-Doz. Dr. med. K. A. Dugi

Lipoproteinlipase (LPL) und Hepatische Lipase (HL) spielen durch die Hydrolyse von Triglyzeriden und Phospholipiden in zirkulierenden Lipoproteinen eine zentrale Rolle im menschlichen Fettstoffwechsel. Der genaue Mechanismus, wie LPL und HL mit ihren wasserunlöslichen Lipidsubstraten interagieren, ist weitgehend unbekannt. Trotz ihrer wichtigen Rolle im Lipidstoffwechsel ist ebenfalls nicht geklärt, ob LPL und HL eher pro- oder eher anti-atherogen wirksam sind. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die weitere Aufklärung der Funktion von LPL und HL durch die Identifikation von Regionen, die in der Interaktion mit lipophilen Substraten eine Rolle spielen könnten, durch die Messung der Lipaseaktivitäten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und durch die Untersuchung von Patienten mit angeborener Lipase-Defizienz.

Die carboxyterminale Domäne LPL415-438, die neben zwei konservierten hydrophoben Regionen über eine nach der publizierten 3D-Struktur der homologen Pankreatischen Lipase nach außen orientierte Schleifenstruktur verfügt, wurde untersucht. Neun, mittels zielgerichteter Mutagenese erstellte mutante Lipasen wurden in humanen embryonalen Nierenzellen (hek293-Zellen) exprimiert und hinsichtlich ihrer Sekretionsrate, Stabilität und Enzymaktivität gegenüber wasserlöslichen- und unlöslichen Substraten analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Deletion, ein Austausch der Schleifenregion zwischen LPL und HL sowie spezifische Mutationen in diesem Bereich zu einer selektiven Reduktion der Fähigkeit der Lipasen führten, wasserunlösliche Substrate zu hydrolysieren. Der Region 415-438 scheint daher eine wichtige Funktion in der Interaktion mit Lipidsubstraten zuzukommen. Mutationen, die in zwei Regionen mit überwiegend hydrophoben Aminosäuren eingebracht wurden, zeigten überraschenderweise keine selektive Reduktion der Lipaseaktivität, sondern entweder eine erniedrigte oder erhöhte („gain-of-function“) Aktivität sowohl gegen wasser- als auch gegen lipidlösliche Substrate. Man kann daher postulieren, dass den hydrophoben Regionen keine Rolle in der Interaktion mit Substraten, sondern in der Stabilität des Dimers zukommt. Dies konnte dadurch belegt werden, dass die „gain-of-function“-Mutante bei 37°C annähernd viermal stabiler war als Wildtyp-LPL. Um den Einfluss der Region auf die Lipoproteinsubstratspezifität weiter untersuchen zu können, wurden „His-Tags“ verwendet, mit deren Hilfe die Lipasen isoliert wurden. Nicht-aufgereinigte His-LPL war enzymatisch aktiv, allerdings resultierten die Aufreinigungsbedingungen in der Inaktivierung des Enzyms, was möglicherweise auch auf die Dissoziation des Dimers in seine inaktiven Monomere zurückzuführen war. Die Isolierung enzymatisch aktiven Proteins war daher nicht möglich.

Bei 200 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) konnte nachgewiesen werden, dass eine erniedrigte HL-Aktivität mit einem größeren Ausmaß der KHK assoziiert ist, d.h. HL ist als anti-atherogen anzusehen. Die Messung der HL-Aktivität könnte daher bei der

Risikostratifizierung eine Rolle spielen und möglicherweise ein attraktives pharmakologisches Ziel in der Prävention und Therapie atherosklerotisch bedingter Krankheiten sein.

Bei Geschwistern mit kompletter LPL-Defizienz konnte eine neue Mutation nachgewiesen werden. Der ungewöhnlich ausgeprägte Phänotyp der untersuchten Kinder kann evt. auf das auf nur 13 Aminosäuren verkürzte Protein, dem sowohl das katalytische Zentrum als auch Lipidbindestellen fehlen, zurückgeführt werden. Eine 18 Basenpaar umfassende HL-Duplikationsmutation mit interner Punktmutation, welche bei einer Patientin heterozygot vorlag, führte *in vitro* zu einer stark eingeschränkten Enzymaktivität. Da die HL-Aktivität *in vivo* normal war, legen die Daten nahe, dass die Aktivität der HL neben genetischen Einflüssen sehr starken anderen Faktoren unterworfen ist.

Insgesamt führen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu einem besseren Verständnis der molekularen Wirkweise von Lipasen und ihrer Rolle und Funktion in Lipidstoffwechsel und Arteriosklerose.

