

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

Klinik für Kardiologie

Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch

In-vivo-Kinetik der Apolipoproteine B-100 und A-I bei Patienten  
mit Hyperlipidämie unter dem Einfluss des Lipidsenkens Lifibrol

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Alexander Markus Sattler  
aus Biedenkopf

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 12.12.2002  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: PD Dr. med. J.R. Schaefer

Korreferent: Prof. Dr. H. W. Seyberth

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	ATHEROSKLEROSE UND KORONARE HERZERKRANKUNG	1
1.1.1	<i>Bedeutung der Atherosklerose</i>	1
1.1.2	<i>Konzept der Risikofaktoren</i>	1
1.1.3	<i>Bedeutung von Fettstoffwechselstörungen als Risikofaktor</i>	2
1.2	STOFFWECHSEL DER LIPOPROTEINE UND APOLIPOPROTEINE	4
1.2.1	<i>Allgemeines</i>	4
1.2.2	<i>Einteilung und chemische Struktur der Lipoproteine</i>	4
1.2.3	<i>Apolipoproteine</i>	6
1.2.4	<i>Enzyme und Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels</i>	8
1.2.5	<i>Stoffwechsel der Lipoproteine</i>	10
1.3	STÖRUNGEN DES LIPOPROTEINSTOFFWECHSELS	16
1.3.1	<i>Störungen mit bekannten genetischen Defekten</i>	17
1.3.2	<i>Familiäre kombinierte Hyperlipidämie</i>	18
1.3.3	<i>Hyper-Lipoprotein (a)</i>	19
1.4	LIPIDSENKENDE MEDIKAMENTE	20
1.4.1	<i>HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffe</i>	20
1.4.2	<i>Fibrinsäurederivate</i>	22
1.4.3	<i>Nikotinsäure und Nikotinsäurederivate</i>	23
1.4.4	<i>Gallensäureaustauscherharze</i>	24
1.4.5	<i>Lifibrol</i>	25
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>30</b>
2.1	STUDIENDESIGN	30
2.1.1	<i>Allgemeines</i>	30
2.1.2	<i>Einschlusskriterien</i>	30
2.1.3	<i>Probanden</i>	31
2.1.4	<i>Isotopenauswahl</i>	32
2.1.5	<i>Studienprotokoll</i>	33
2.2	GEWINNUNG DES PLASMAS	34
2.3	ISOLIERUNG DER FREIEN PLASMAAMINOSÄUREN	35

2.4	TRENNUNG DER LIPOPROTEINFRAKTIONEN	36
2.4.1	<i>Prinzip</i>	36
2.4.2	<i>VLDL-Gewinnung</i>	37
2.4.3	<i>IDL-Gewinnung</i>	38
2.4.4	<i>LDL-Gewinnung</i>	38
2.4.5	<i>HDL-Gewinnung</i>	39
2.5	BESTIMMUNG WICHTIGER KOMPONENTEN DER LIPOPROTEINE	40
2.5.1	<i>Cholesterinbestimmung</i>	40
2.5.2	<i>Triglyzeridbestimmung</i>	40
2.5.3	<i>ApoA-I und ApoB-Bestimmung</i>	41
2.5.4	<i>Proteinbestimmung</i>	42
2.6	ENTSALZUNG DURCH DIALYSE	43
2.7	DELIPIDIEREN	44
2.7.1	<i>Delipidieren von HDL</i>	45
2.7.2	<i>Delipidieren von LDL</i>	46
2.7.3	<i>Delipidieren von IDL</i>	47
2.7.4	<i>Delipidieren von VLDL</i>	47
2.8	TRENNUNG DER PROTEINE DURCH ELEKTROPHORESE	48
2.9	IMMUNOBLOT	54
2.10	PROTEINHYDROLYSE	56
2.11	ISOLIERUNG DER AMINOSÄUREN	58
2.12	DERIVATISIEREN DER AMINOSÄUREN	59
2.13	GASCHROMATOGRAPHIE/MASSENSPEKTROMETRIE	60
2.13.1	<i>Probenauftrennung mittels Gaschromatographie</i>	61
2.13.2	<i>Massenspektrometrie</i>	62
2.13.3	<i>Datenauswertung</i>	65
2.14	STATISTISCHE ANALYSE	68
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>69</b>
3.1	ALLGEMEINES	69
3.2	LIPIDPROFIL	69
3.3	APOB-100-KINETIK	71
3.4	APOA-I-KINETIK	73

---

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
4.1	APOB-100-KINETIK	77
4.2	APOA-I-KINETIK	82
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>109</b>
7.1	ERGÄNZENDE TABELLEN	109
7.2	ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN	112
7.3	ABKÜRZUNGEN	119
7.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	122
7.5	VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER	124
7.6	DANKSAGUNG	125

# 1 Einleitung

## 1.1 *Atherosklerose und koronare Herzerkrankung*

### 1.1.1 **Bedeutung der Atherosklerose**

Die Atherosklerose und ihre Folgeschäden sind trotz aller Fortschritte in der Diagnostik und Therapie weiterhin die Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen [101]. Die Atherosklerose kann sich in vielen Formen manifestieren. Zahlenmässig am bedeutendsten sind die kardiale Manifestation in Form der koronaren Herzerkrankung (KHK) und die zerebrovaskuläre Manifestation (Schlaganfall). Etwa 30 % aller Todesfälle in Deutschland beruhen auf einer KHK, wobei fast die Hälfte der Betroffenen im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes zu Tode kommen, während die andere Hälfte durch die chronischen Folgen der KHK versterben [85,101].

### 1.1.2 **Konzept der Risikofaktoren**

Für den Entwurf eines Risikofaktorenkonzepts der koronaren Herzerkrankung waren großangelegte epidemiologische Studien von entscheidender Bedeutung [101]. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Framingham-Studie, die seit 1948 in einer amerikanischen Kleinstadt durchgeführt wird und prospektiv begünstigende Faktoren für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht. Über 5000 Männer und Frauen im Alter von 30 bis 62 Jahren wurden über Jahrzehnte hinweg beobachtet. Hierdurch konnten folgende kardiovaskuläre Risikofaktoren identifiziert werden [23,24]: männliches Geschlecht, hohes Lebensalter, familiäre KHK-Belastung, Hypercholesterinämie, niedriger HDL-Cholesterinwert, Zigarettenrauchen, hoher Blutdruck, Diabetes mellitus, körperliche Inaktivität und Übergewicht. Die seit 1979 von Assmann et al. in Münster geleitetete "Prospektive Cardiovasculäre Münster (PROCAM-)"-Studie an über 18000 Personen konnte eindrücklich den potenzierenden Effekt von Einzelrisikofaktoren darstellen, wenn diese bei einem Patienten kombiniert vorkommen [7,9]: So beträgt die

Inzidenz eines Herzinfarktes in 4 Jahren bei alleinigem Vorliegen einer Hypertonie 14/1000 Personen, bei alleinigem Vorliegen eines Diabetes mellitus 15/1000 Personen, und bei der Kombination Diabetes mellitus und Hypertonie 48/1000 Personen. Das alleinige Vorliegen einer Hyperlipidämie resultiert in einer Inzidenz von 96/1000 Personen in 4 Jahren, kommt eine Hypertonie und/oder ein Diabetes mellitus hinzu, erhöht sich diese Inzidenz auf 114/1000 Personen.

### **1.1.3 Bedeutung von Fettstoffwechselstörungen als Risikofaktor**

Die Hyperlipidämie ist einer der herausragendsten kardiovaskulären Risikofaktoren [102,103]. Alleine schon die am Ende des vergangenen Abschnitts genannten Zahlen zur Herzinfarktinzidenz, die der PROCAM-Studie entstammen, verdeutlichen diese Position: die Inzidenz eines Herzinfarktes innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 4 Jahren ist bei alleinigem Vorliegen einer Hyperlipidämie etwa 6-7mal höher als bei alleinigem Vorliegen einer Hypertonie bzw. eines Diabetes mellitus [8]. Eine lineare Beziehung zwischen der Höhe des Cholesterins im Serum und der Herz-Kreislauf-Sterblichkeit konnte in der "Multiple Risk Factor Intervention Trial" (MRFIT) in den Jahren 1973 bis 1981 an 350000 Männern im Alter von 35 bis 57 Jahren nachgewiesen werden: das relative Risiko (RR) eines Todes an Herz-Kreislauf-Erkrankungen stieg alterskorrigiert von 1,0 in der untersten Quintile der Serumcholesterinkonzentrationen kontinuierlich an und erreichte in der 4. Quintile 2,2 und in der 5. Quintile 3,4 [121].

Auch die Theorie der Atherosklerosebildung beinhaltet als wesentlichen Faktor die Ablagerung von Cholesterin in der Gefäßwand, die über das Stadium des "fatty streak" zur Bildung eines Atheroms führt und letztlich über eine Plaqueruptur zur Gerinnungsaktivierung und so zum thrombotischen Verschluss des Gefäßes führen kann [122]. Die zentrale Rolle in diesem Modell der Atherogenese spielen die Lipoproteine geringer Dichte (LDL), die abhängig von ihrer Plasmakonzentration in den subendothelialen Raum eindringen und dort oxidativ modifiziert werden [123-125]. Dieses oxidativ modifizierte LDL wird nun von Makrophagen über den sogenannten Scavenger-Rezeptor A

aufgenommen. Diese Makrophagen transformieren bei LDL-Überladung zu sog. Schaumzellen, die über verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) zu einer Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen führen. So kommt es, ausgehend von der primär reversiblen Läsion des "fatty streak", zur Bildung von fortgeschrittenen und komplizierten Plaques [122].

Nicht nur für die primäre Ätiologie der Atherosklerose und somit auch der KHK stellt die Hyperlipidämie einen zentralen Faktor dar, auch für den Verlauf einer bereits manifesten Erkrankung ist der Lipidstoffwechsel bzw. die Einflussnahme auf denselben von entscheidender Bedeutung. Vor allem einer Vielzahl von großangelegten Interventionsstudien ist es zu verdanken, dass hierüber mittlerweile gesicherte Daten vorliegen. Hier seien nur exemplarisch einige der Wichtigsten erwähnt. In der sog. "Scandinavian Simvastatin Survival Study" (4S-Studie) konnte an 4444 Patienten mit KHK und Hypercholesterinämie in einer mittleren Beobachtungsdauer von 5,4 Jahren gezeigt werden, dass der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (vgl. Abschnitt 1.4.1) Simvastatin nicht nur zu einer signifikanten Senkung des LDL-Cholesterins führt, sondern auch die Gesamtmortalität und die KHK-Mortalität im Vergleich zu Placebo signifikant senken kann (-30% bzw. -42%) [90,91,139]. Ähnliche Ergebnisse erbrachte die "Cholesterol and Recurrent Event" (CARE)-Studie, wobei hier der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Pravastatin versus Placebo eingesetzt wurde. Der interessanteste Aspekt an der CARE-Studie ist, dass hier erstmals normolipämische Patienten in der Sekundärprävention der KHK mit einem Lipidsenker behandelt wurden und dennoch eine signifikante Reduktion der Häufigkeit eines nichttödlichen oder tödlichen Myokardinfarktes (-24%) sowie der Interventionsnotwendigkeit (PTCA bzw. ACVB-Operation -23% bzw. -26%) in einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren gezeigt wurden [98]. Als letztes Beispiel sei hier noch die "West of Scotland Coronary Prevention Study" (WOSCOPS) aufgeführt. In diese Studie wurden über 6500 koronargesunde Männer im Rahmen der Primärprävention mit 40 mg Pravastatin versus Placebo behandelt und über durchschnittlich 4,9 Jahre beobachtet. Beeindruckenderweise kam es nicht nur zur erwarteten Absenkung des LDL-Cholesterins um 26 % in der Verum-Gruppe, sondern auch zu einer



signifikanten Reduktion der Häufigkeit eines tödlichen oder nichttödlichen Myokardinfarktes (-28% bzw. -31%) und der Gesamtmortalität (-22%) [74,128].

## **1.2 Stoffwechsel der Lipoproteine und Apolipoproteine**

### **1.2.1 Allgemeines**

Lipide sind wasserunlöslich und müssen daher zum Transport im wässrigen Milieu des Plasmas entweder als Einzelmoleküle an spezielle Transportmoleküle gebunden werden oder mit Proteinen mizellare Komplexe bilden. Solche Komplexe, die das Transportmedium für Triglyzeride und Cholesterinester darstellen, werden als Lipoproteine bezeichnet. In diesen Lipoproteinen sind die Cholesterinester und Triglyzeride im Kernbereich angeordnet und werden von Phospholipiden und freiem Cholesterin umgeben. Die Lipoproteine enthalten als weitere Komponente Proteine, die Bestandteil der Oberfläche sind und als Apolipoproteine (Apo) bezeichnet werden. Sie geben den Lipidmizellen zusätzliche Stabilität und spielen eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel der Lipide [62].

### **1.2.2 Einteilung und chemische Struktur der Lipoproteine**

Die im menschlichen Plasma vorhandenen Lipoproteine lassen sich in verschiedene Fraktionen auftrennen, wobei hier ihre unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften zum Tragen kommen. Zum einen kann eine Auftrennung in der präparativen Ultrazentrifuge in vordefinierten Dichtebereichen erfolgen, wobei man so Lipoproteinfraktionen mit unterschiedlicher Dichte erhält [43,61]. Die hieraus resultierenden Fraktionen werden VLDL (= very low density lipoproteins, Lipoproteine sehr geringer Dichte), IDL (= intermediate density lipoproteins, Lipoproteine mittlerer Dichte), LDL (= low density lipoproteins, Lipoproteine geringer Dichte) und HDL (= high density lipoproteins, Lipoproteine hoher Dichte) genannt. Des Weiteren ist eine Auftrennung aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität in der Elektrophorese möglich [39,84]. Eine Übersicht über die verschiedenen durch diese

Auftrennungsverfahren gewonnenen Lipoproteinfraktionen gibt Tabelle 1 wieder.

**Tabelle 1: Einteilung der Lipoproteine anhand verschiedener Auftrennungsverfahren (adaptiert nach [62])**

Elektrophorese	Ultrazentrifuge	Hauptapoproteine	Dichte (g/ml)
keine Mobilität	Chylomikronen	A-I, A-IV, B-48	< 0.95
prä-beta	VLDL	B-100, C-I, C-II, C-III, E	0.95-1.006
	IDL	B-100, C-III, E	1.006-1.019
Beta	LDL	B-100	1.019-1.063
Alpha	HDL	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E	1.063-1.21

Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der verschiedenen Lipoproteine gibt Tabelle 2 wieder, wobei sich diese Aufteilung auf die Fraktionierung in der Ultrazentrifuge bezieht, da sich nur durch diese Methode größere Mengen Lipoproteine zur quantitativen Auswertung gewinnen lassen [62].

**Tabelle 2: Komposition der verschiedenen Lipoproteinfraktionen**

Chylo = Chylomikronen, PL = Phospholipide, FC = Freies Cholesterin, CE = Cholesterinester, TG = Triglyzeride

Lipo-protein	Größe (nm)	Masse (MDa)	Zusammensetzung (in % der Lipoproteinmasse)				
			Protein	PL	FC	CE	TG
Chylo	< 104	>150	2	5	1	2	90
VLDL	50	5-130	10	16	7	13	54
IDL	30	3.5	17	20	9	34	20
LDL	21	2.5	23	21	11	41	4
HDL	10	0.36	42	35	5	13	5

### 1.2.3 Apolipoproteine

Der funktionell wichtigste Bestandteil aller Lipoproteine sind die Apolipoproteine. Nach einem erstmals von Alaupovic vorgestellten Konzept [5,6] kann eine Aufteilung der Lipoproteine in Familien mit unterschiedlichen Apolipoproteinen erfolgen, wobei dieses zunächst sehr statische Konzept zunehmend modifiziert wurde [62]. Ein Lipoprotein enthält demnach nicht nur ein Apolipoprotein, sondern meist eine Reihe verschiedener Apolipoproteine in unterschiedlichen Anteilen. Diese Zusammensetzung von Apolipoproteinen ist jedoch für die jeweiligen Lipoproteinpartikel spezifisch und definiert diese (vgl. Tabelle 1). Die Benennung der Apolipoproteine erfolgte alphabetisch. Eine Übersicht über die wichtigsten Apolipoproteine gibt Tabelle 3 wieder:

**Tabelle 3: Wichtige Apolipoproteine des menschlichen Plasmas  
(adaptiert nach [62] und [101])**

<b>Apo</b>	<b>Dichteklassen</b>	<b>Masse (kDa)</b>	<b>Konzentration (mg/l)</b>	<b>Funktion</b>
A-I	HDL	28.5	1200-1400	Aktivierung der LCAT, Bindung an HDL-Rezeptor, Strukturprotein
A-II	HDL	17	350-500	Aktivierung der hepatischen Lipase ?
A-IV	Chylo, HDL	46	<50	Aktivierung der LCAT, putativer Sättigungsfaktor
A-V	HDL	39	?	Noch unbekannte Rolle im Stoffwechsel triglyzeridreicher Lipoproteine [92,132]
B-100	VLDL, IDL	550	700-900	Bindung an LDL-Rezeptor, Strukturprotein
B-48	Chylo, VLDL	265	<50	Strukturprotein der Chylo
C-I	Chylo, VLDL	6.5	50-80	Aktivierung der LCAT
C-II	Chylo, VLDL	8.8	30-70	Aktivierung der LPL
C-III	Chylo, VLDL	8.9	100-120	Inhibitor der LPL
D	HDL	29	80-100	Aktivierung und Stabilisierung der LCAT
E	Chylo, VLDL, HDL	34	30-50	Ligand für LDL-Rezeptor und LRP
J	HDL	80	ca. 100	„Clusterin“ unbekannte Funktion im HDL-Stoffwechsel; Rolle in der Apoptose [22,81]
a	Lp(a)	350-900	Variabel	Unbekannte Funktion in Blutgerinnung und Fibrinolyse

#### **1.2.4 Enzyme und Rezeptoren des Lipoproteinstoffwechsels**

Neben den Apolipoproteinen haben für den Stoffwechsel der Lipoproteine noch verschiedene plasmatische Enzyme sowie Rezeptoren an den Zelloberflächen eine entscheidende Bedeutung. Auf ihre genaue Rolle im Lipidstoffwechsel wird in den einzelnen Abschnitten näher eingegangen. Zur Übersicht sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 auf der folgenden Seite die jeweils wichtigsten Vertreter kurz charakterisiert:

**Tabelle 4: Enzyme des Lipoproteinstoffwechsels im Blut  
(adaptiert nach [62])**

<b>Enzym</b>	<b>Funktion</b>
Lipoproteinlipase (LPL)	Hydrolyse exogener Triglyzeride in Chylomikronen
Hepatische Triglyzeridlipase (HTGL)	Hydrolyse von Triglyzeriden und Phospholipiden in IDL und HDL
Endotheliale Lipase (EL)	Noch unbekannte Rolle in Lipoproteinmetabolismus; wird von Endothelzellen produziert [55]
Lezithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT)	Bereitstellung von >80% der Cholesterinester aus freiem Cholesterin und Lezithin
Cholesterinester-transferprotein (CETP)	Austausch von Cholesterinestern der HDL gegen Triglyzeride der VLDL; Austausch und Transfer von Kern-Lipiden

**Tabelle 5: Lipoproteinrezeptoren menschlicher Zellen  
(adaptiert nach [62])**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Organ, Zelle</b>	<b>Funktion</b>
LDL-Rezeptor (Apo B, E-Rezeptor)	Alle Zellen (Leber)	Aufnahme und Katabolismus ApoB- und ApoE-haltiger Lipoproteine
LDL-Rezeptor related protein (LRP)	Leber	Katabolismus der Chylomikronen-Remnants und anderer ApoE-haltiger Lipoproteine
ATP-bindender Kassettentransporter 1 (ABC1)	Makrophagen, Schaumzellen, periphere Zellen	Ausschleussung von Cholesterin aus Zellen und Geweben
Scavenger-Rezeptor A	Makrophagen, Kupfferzellen, Schaumzellen	Katabolismus von modifizierten und oxidierten LDL
Scavenger-Rezeptor B-1	Leberzellen	Aufnahme von HDL in die Leber

### 1.2.5 Stoffwechsel der Lipoproteine

Betrachtet man den Stoffwechsel der Lipoproteine im menschlichen Plasma, so lassen sich drei wesentliche Systeme unterscheiden:

- das exogene Lipidtransportsystem:  
Transport von mit der Nahrung aufgenommener Lipide
- das endogene Lipidtransportsystem:  
Transport von Lipoproteinen hepatischen Ursprungs
- das reverse Cholesterintransportsystem:  
Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber.

Im folgenden werden die einzelnen Systeme näher dargestellt.

#### 1.2.5.1 Exogenes Lipidtransportsystem: Chylomikronenstoffwechsel

Der Transport exogener, aus der Nahrung aufgenommener Lipide wird durch Chylomikronen vermittelt. In der Mukosa des proximalen Dünndarms erfolgt nach der intraluminalen Aufspaltung und anschließenden Resorption der Nahrungslipide die Synthese der Chylomikronen aus Triglyzeriden, Cholesterin und den wesentlichen Apolipoproteinen ApoA-I, ApoB-48 und ApoA-IV. Die Enterozyten geben die so synthetisierten Chylomikronen dann an die Lymphe ab. So gelangen die Partikel unter Umgehung der Leber über den Ductus thoracicus in die Blutbahn. Nach ihrer Sekretion nehmen die Chylomikronen Apo C-II von der HDL-Fraktion auf, welches als Kofaktor der endothelialen Lipoproteinlipase (LPL) dient ( vgl. Tabelle 4). Die LPL katalysiert vor allem im Fett-, Muskel- und Lungengewebe die Aufspaltung der im Kern der Chylomikronen vorhandenen Triglyzeride in freie Fettsäuren und  $\beta$ -Monoglyzerid, welche dann in die Gewebe aufgenommen werden können. Im Verlauf dieses lipolytischen Prozesses nehmen die Chylomikronen ApoE von HDL-Partikeln auf, während Phospholipide und ApoA-I und A-IV als sogenannte "surface remnants" an den HDL-Pool abgegeben werden. Als Endprodukt dieser Umbauprozesse entstehen so die relativ ApoE-reichen Chylomikronen-Remnants, die rasch in die Leber aufgenommen werden. Diese Aufnahme

erfolgt über den sogenannten Chylomikronen-Remnant-Rezeptor, dessen Ligand das ApoE ist. Bei dem Rezeptor handelt es sich strukturell am ehesten um das sog. LDL-receptor related protein (LRP) [15,31,33,140]. Ebenfalls beteiligt an der Aufnahme der Chylomikronen-Remnants in die Leber ist die hepatische Triglyzeridlipase (HTGL) und die Lipoproteinlipase (LPL), für die Bindungsstellen am LRP existieren. Die Bindung des C-terminalen Endes der LPL und evtl. der HTGL an LRP scheint die Bindung und Aufnahme der Chylomikronen-Remnants zu ermöglichen. Diese komplexe Interaktion kommt wahrscheinlich aufgrund der hohen Affinität von Apo E, LPL und HTGL zu den Heparansulfaten der Zellmembran zustande, die eine Bindung der Chylomikronen-Remnants auf der Zelloberfläche ermöglicht und so das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren unterstützt [75,145].

#### 1.2.5.2 Endogenes Lipidtransportsystem: VLDL-, IDL- und LDL-Stoffwechsel

Triglyzeridreiche VLDL-Partikel werden in der Leber gebildet und haben als Hauptaufgabe den Transport endogen synthetisierter Lipide von dort in die Peripherie. Die Hauptapolipoproteinkomponenten der VLDL sind neben ApoB-100, welches die integrale Proteinkomponente darstellt, noch ApoC-I, C-II, C-III sowie ApoE, wobei die letzteren Apoproteine zum Teil erst nach der Sekretion der VLDL aus dem HDL-Pool übernommen werden. Katalysiert durch die ApoC-II-stimulierte LPL kommt es in den VLDL zur Hydrolyse der Triglyzeride. Während der Hydrolyse dissoziieren vor allem die ApoC von den VLDL und werden auf die HDL-Fraktion übertragen. Es entstehen so ApoB-100 und ApoE enthaltende, cholesterinreiche, kleinere Lipoproteine, die sogenannten VLDL-Remnants. Für diese Partikel stehen grundsätzlich zwei Stoffwechselwege zur Verfügung, die jeweils von ca. 50% der VLDL-Remnants durchlaufen werden:

- Ein Teil des VLDL-Pools wird über die Zwischenstufe der Bildung von IDL in Lipoproteine geringer Dichte, die LDL, umgewandelt, wobei die Apoproteine E und C-I bis C-III nahezu komplett in die HDL-Fraktion übertragen werden. Die letztlich entstehenden LDL-Partikel enthalten als Proteinkomponente daher nahezu ausschließlich ApoB-100.



- Ein anderer Teil der VLDL-Remnants wird durch den LDL-(Apo B, E-) Rezeptor in die Leber aufgenommen und katabolisiert. Die Affinität der VLDL-Remnants zum LDL-Rezeptor ist dabei höher als die der LDL, welches im zusätzlichen ApoE-Anteil der Partikel begründet ist.

Zusätzlich existieren Hinweise auf das Vorhandensein eines spezifischen VLDL-Rezeptors, dessen Ligand ApoE ist und der hauptsächlich im Herz- und Skelettmuskel exprimiert wird. Desweiteren kann VLDL auch ähnlich den Chylomikronen-Remnants über den LRP katabolisiert werden. Die größte Bedeutung für den VLDL-Katabolismus kommt aber der Verstoffwechslung über den LDL-Rezeptor-Weg zu [59].

Die zentrale Rolle für den LDL-Stoffwechsel hat die Leber, die nicht nur über die VLDL-Produktion die LDL-Bildung bestimmt, sondern über die Expression von LDL-Rezeptoren den zahlenmäßig bedeutendsten Anteil des LDL katabolisiert. Etwa 60% des in der Zirkulation befindlichen LDL-Pools werden beim Stoffwechselgesunden über die Leber metabolisiert, und ein geringerer Anteil wird ebenfalls über LDL-Rezeptoren in periphere Gewebe aufgenommen, wo das Cholesterin als Membranbaustein und als Präkursor zur Synthese von Steroidhormonen dient.

Ein Teil des LDL, beim gesunden Menschen immerhin etwa ein Drittel des Gesamtpools, wird LDL-Rezeptor-unabhängig metabolisiert. Man bezeichnet diesen Stoffwechselweg auch als sog. "scavenger pathway". Der "scavenger pathway" ist im Gegensatz zum LDL-Rezeptor-Weg nicht sättigbar und gewinnt vor allem bei pathologischen Stoffwechselsituation mit erhöhten LDL-Serum-Konzentrationen zunehmend an Bedeutung. Die zugrundeliegenden Mechanismen der LDL-Aufnahme sind verschieden:

- Aufnahme modifizierter oxidiertes LDL über den Scavengerrezeptor A (SR-A)
- Adsorptive Endozytose über niedrigaffine Rezeptoren
- Pinozytose

Bei erhöhten LDL-Cholesterinspiegeln können LDL-Partikel vermehrt in den subendothelialen Raum eindringen. Dort kommt es zur oxidativen Modifizierung dieser Partikel, die eine erhöhte Affinität für die Scavengerrezeptoren der Makrophagen zur Folge hat (zur genauen Pathophysiologie der Atheroskleroseentstehung siehe bitte Abschnitt 1.1.3).

#### 1.2.5.3 Reverser Cholesterintransport: HDL-Stoffwechsel

Das einzige Organ im menschlichen Organismus, das überschüssiges Cholesterin ausscheiden kann, ist die Leber. Dieses geschieht über die Galle, und zwar entweder direkt oder nach Umwandlung in Gallensalze. Es ist also notwendig, überschüssiges Cholesterin aus der Peripherie zurück in die Leber zu transportieren. Die zentrale Rolle in diesem Stoffwechselweg des reversen Cholesterintransportes spielen die Lipoproteine hoher Dichte, die HDL.

HDL ist eine heterogene Lipoproteinklasse, deren Gemeinsamkeit eine hohe Dichte und ein kleiner Durchmesser ist. Die Mehrzahl des HDL enthält als Hauptapolipoprotein ApoA-I. Die verschiedenen HDL-Subfraktionen unterscheiden sich anhand ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung aus Lipiden, Apolipoproteinen, Enzymen und Lipidtransferproteinen voneinander.

In der Lipidelektrophorese weist der Großteil des HDL  $\alpha$ -Mobilität auf und wird daher auch als  $\alpha$ -HDL bezeichnet. Ein kleinerer Teil ApoA-I-haltiger Lipoproteine zeigt aber auch prä- $\beta$ -Mobilität (prä- $\beta$ -HDL, etwa 5-15%). Diese Fraktion kann durch weitere elektrophoretische Trennung noch in prä- $\beta_1$ -HDL, prä- $\beta_2$ -HDL und prä- $\beta_3$ -HDL differenziert werden. Den kleinsten Partikel hiervon stellt das prä- $\beta_1$ -HDL dar. Hierbei handelt es sich um diskoide Partikel, die entweder aus lipidfreiem oder mit wenigen Molekülen Sphingomyelin und Phosphatidylcholin assoziiertem ApoA-I bestehen. Sie werden als Vorstufe der HDL entweder in Darm und Leber gebildet oder entstehen als sogenannte

“surface remnants” im Katabolismus triglyzeridreicher Lipoproteine (vgl. Abschnitt 1.2.5.1). Strukturell ähnliche lipidarme HDL-Partikel enthalten als einziges Apolipoprotein ApoE und werden dann als HDL<sub>E</sub> bezeichnet [138].

Mittels Ultrazentrifugation lassen sich aus der  $\alpha$ -HDL-Fraktion zwei weitere Subfraktionen gewinnen:

- HDL<sub>2</sub>: Dichte 1.063-1.125 mg/ml
- HDL<sub>3</sub>: Dichte 1.125-1.21 mg/ml

Die kleineren, dichteren HDL<sub>3</sub>-Partikel enthalten relativ wenig freies Cholesterin. Diese Partikel haben daher die Potenz zur Aufnahme von Cholesterin, z. B. aus peripheren Zellen. Durch Veresterung dieses Cholesterins unter katalytischer Einwirkung von LCAT entstehen dann aus den HDL<sub>3</sub> die größeren, weniger dichten HDL<sub>2</sub>.

Die Aufnahme von Cholesterin aus peripheren Zellen in die HDL kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen. Es existieren sowohl unspezifische, passive als auch spezifische, aktive Prozesse [17,138]. Nahezu alle Zelltypen sind in der Lage, selbst an Apolipoprotein-freie Partikel langsam und nicht sättigbar Cholesterin aus der Zellmembran, nicht aber aus dem Zytosol abzugeben. Diese Interaktion ist rein physikalisch und bedarf keiner spezifischen Rezeptoren. Im Gegensatz hierzu sind apolipoproteininhaltige, lipidarme Partikel (wie prä- $\beta_1$ -HDL) in der Lage, spezifisch, schnell, nicht sättigbar und effektiv Cholesterin und Phospholipide aus bestimmten Zelltypen aufzunehmen. Auf zellulärer Seite ist hierfür der ATP-bindende Kassettentransporter 1 (ABC-1) verantwortlich. Mittels dieses Transportweges können auch zytosolisch deponierte Cholesterinester mobilisiert und aus der Zelle transportiert werden. Mengenmäßig handelt es sich bei dem ABC-1-vermittelten Transport um den für den reversen Cholesteroltransport entscheidenden Weg [138].

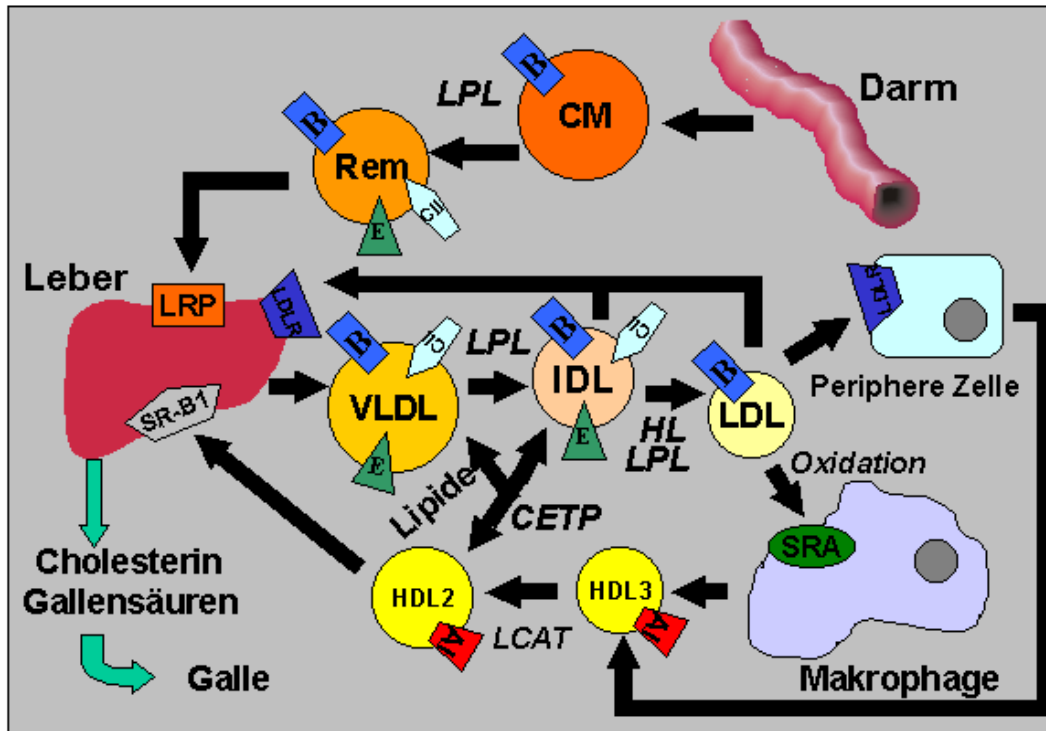
Nach dem Transfer des freien Cholesterins in die HDL wird dieses unter Einwirkung des Enzyms LCAT verestert, was zum Einbau der neu

entstandenen, eher hydrophoben Cholesterinester in den Kern ("Core") der HDL-Partikel führt. Wie oben beschrieben entstehen so die größeren HDL<sub>2</sub>-Partikel.

Für den weiteren Transport des in den HDL<sub>2</sub>-Partikeln veresterten Cholesterins stehen zwei Wege zur Verfügung. Zum einen sind diese HDL<sub>2</sub>-Partikel in der Lage, unter Vermittlung des Cholesterinester-Transferproteins (CETP) die Cholesterinester im Austausch gegen Triglyzeride an triglyzeridreiche, ApoB enthaltende Lipoproteine abzugeben, die dann via LDL-Rezeptor aus der Zirkulation entfernt werden. Die von den HDL<sub>2</sub>-Partikeln übernommenen Triglyzeride können durch die HTGL hydrolysiert werden, was letztlich wieder zur Bildung kleiner, dichter HDL-Partikel führt (Umwandlung von HDL<sub>2</sub> in HDL<sub>3</sub>), die für die Cholesterinaufnahme erneut zur Verfügung stehen.

Die HDL<sub>2</sub>-Partikel können aber auch direkt über den sogenannten Scavengerrezeptor B1 (SR-B1) in die Leber aufgenommen werden. Im Gegensatz z.B. zu den LDL-Rezeptoren, die mittels membranständiger Ligand-Rezeptor-Interaktion zu einer „coated pit“-vermittelten endosomalen Internalisierung der kompletten LDL-Partikel führen, handelt es sich bei der SR-B1-vermittelten HDL-Aufnahme um einen nicht-endosomalen Prozeß, der zur isolierten Aufnahme der Cholesterinester ohne die Apoproteinkomponenten führt. In der Zellmembran ist SR-B1 vor allem im Bereich der Caveolae lokalisiert. Der genaue Mechanismus, mittels dem SR-B1 zu einer Dissoziation der Lipid- und Proteinkomponenten und zur Aufnahme der Cholesterinester in die Zellen führt, ist noch nicht geklärt. Neben der Hypothese einer SR-B1 induzierten Bildung hydrophober Membrankanäle wird auch die Mitwirkung enzymatischer Kofaktoren wie z.B. der hepatischen Lipase diskutiert [138]. Letztlich erfolgt dann die Ausscheidung des Cholesterins über die Galle.

Zum besserem Verständnis ist in Abbildung 1 ein vereinfachtes Schema des menschlichen Lipoproteinstoffwechsels wiedergegeben.



### Abbildung 1: Der menschliche Lipoprotein-Stoffwechsel.

Zur genauen Erläuterung der Stoffwechselwege vergleiche den obenstehenden Text (Abschnitt 1.2.5).

Abkürzungen: CM = Chylomikronen, Rem = Chylomikronenremnants, LPL = Lipoproteinlipase, LRP = LDL-Rezeptor related Protein, LDLR = LDL-Rezeptor, SRA = Scavengerrezeptor A, SR-B1 = Scavengerrezeptor B-I, HL = hepatische Lipase, CETP = Cholesterinestertransferprotein, LCAT = Lezithin-Cholesterin-Acetyltransferase, B = Apolipoprotein B, E = Apolipoprotein E, CII = Apolipoprotein CII, AI = Apolipoprotein A-I.

### 1.3 Störungen des Lipoprotein-Stoffwechsels

Die Hyperlipoproteinämie gehört mit dem Bluthochdruck, dem Rauchen, der Adipositas und dem Diabetes mellitus zu den etablierten Risikofaktoren der Atherosklerose im allgemeinen und der koronaren Herzkrankheit im speziellen [101]. Es handelt sich bei den Hyperlipoproteinämien um eine heterogene Gruppe von Stoffwechselstörungen, sowohl was die Ätiologie als auch was die phänotypische Ausprägung betrifft. Eine erste Klassifizierung von Hyperlipoproteinämien erstellte Fredrickson [39]. Dieses allein auf phänotypische Beschreibung beruhende System konnte die damals noch nicht bekannten unterschiedlichen genetischen Ursachen natürlich nicht

berücksichtigen. Dennoch hat diese Einteilung eine große praktische Bedeutung erlangt, erlaubt sie doch die Einteilung allein anhand der Höhe der Serumspiegel von Cholesterin und Triglyzeriden. Die sog. Fredrickson-Klassifikation ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

**Tabelle 6: Klassifizierung der Lipidstoffwechselstörungen nach Fredrickson [101]**

Typ	Vermehrte Lipidklasse	Phänotyp
Typ I	Chylomikronen	Massive Triglyziderhöhung durch Erhöhung der Chylomikronen
Typ IIa	LDL	Isolierte Erhöhung des Cholesterins
Typ IIb	VLDL und LDL	Triglyzeride und Cholesterin erhöht
Typ III	$\beta$ -VLDL (VLDL-Remnants)	Ratio:VLDL-Cholesterin/Triglyzeride >0.3
Typ IV	VLDL	Isolierte Erhöhung der Triglyzeride
Typ V	Chylomikronen und VLDL	Massive Erhöhung der Triglyzeride durch Erhöhung der Chylomikronen und VLDL

### 1.3.1 Störungen mit bekannten genetischen Defekten

Mittlerweile konnte die Ätiologie einiger Fettstoffwechselstörungen aufgeklärt werden. So konnten zum Beispiel Brown und Goldstein in ihren Arbeiten [19,20,45] Defekte des LDL-Rezeptors als Ursache für schwere Fälle von familiärer Hypercholesterinämie nachweisen. Ihre Arbeit wurde 1985 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt. Ein weiterer aufgeklärter Mechanismus, der zu einer Hyperlipoproteinämie vom Typ II nach Fredrikson führt, betrifft das Gen des Apolipoproteins B: durch eine Mutation hier entsteht das sogenannte familiäre defekte Apolipoprotein B (FDB) mit der Folge einer gestörten Ligand-Rezeptor-Interaktion des LDL am LDL-Rezeptor und entsprechenden Veränderungen des LDL-Katabolismus [54,118]. Utermann et al. gelang während seiner Tätigkeit in Marburg der Nachweis verschiedener Phänotypen

des Apolipoproteins E (E2, E3,E4) und der Assoziation des Phänotyps E2/2 mit der Typ III-Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson [120,129]. Als eine genetisch determinierte Ursache der Hyperchylomikronämie konnten mittlerweile Defekte im Gen der Lipoproteinlipase sowie im Gen des Apolipoproteins C-II nachgewiesen werden [12,36].

Zahlreiche weitere seltene Defekte sind beschrieben. Eine ausführliche Erläuterung würde den Rahmen dieser Arbeit allerdings überschreiten.

Zusammenfassend seien die wesentlichen kurz erwähnt:

- Fish eye disease: Defekte im Gen der Lecithin-Cholesterin-Azyl-Transferase mit der Folge niedriger HDL-Spiegel und Hornhauttrübungen [30,67]
- Tangier disease: Defekt im ABC1-Gen mit der Folge von stark erniedrigten HDL-Spiegeln [86]
- Hypobetalipoproteinämie: Mutationen des ApoB-Gens mit niedrigen Spiegel ApoB-haltiger Lipoproteine [112]
- Sitosterolämie: Mutationen im Gen von ABC5 und ABC8 mit der Folge einer gesteigerten intestinalen Resorption von Sterolen [68]
- ApoE-Mutationen mit Assoziation zu Hypertriglyzeridämien, z.B. ApoE1-Freiburg [87], ApoE4-Baden [51]

Andere Formen der Hyperlipidämie sind entweder genetisch noch nicht definiert, oder sie stellen polygene Störungen ohne eindeutig nachweisbaren Defekt dar. Zur letzteren Gruppe gehört auch die im folgenden dargestellte familiäre kombinierte Hyperlipidämie.

### **1.3.2 Familiäre kombinierte Hyperlipidämie**

Erstmals als Entität beschrieben wurde die familiäre kombinierte Hyperlipidämie 1973 durch Goldstein et al., die auch die Assoziation mit frühzeitiger Koronarsklerose zeigen konnten [46]. Ihre Häufigkeit wird in der Literatur mit 1:300 angegeben [101]. Bei dieser Fettstoffwechselstörung lassen sich nicht nur innerhalb einer betroffenen Familie unterschiedliche Phänotypen beobachten, ein wesentliches Charakteristikum dieser Erkrankung ist auch das Auftreten unterschiedlicher Phänotypen im gleichen Individuum bei zeitlich

weiter auseinanderliegenden Blutentnahmen (z.B. einmal VLDL-Erhöhung (Typ IV nach Fredrickson), bei späterer Abnahme LDL-Erhöhung (Typ IIa) oder LDL- und VLDL-Erhöhung (Typ IIb)). Die Manifestation der Erkrankung erfolgt nahezu ausschließlich im Erwachsenenalter. Ihr Ansprechen auf diätetische und medikamentöse Maßnahmen ist im Gegensatz zur familiären Hypercholesterinämie vergleichsweise gut. Pathophysiologisch liegt die Ursache der Erkrankung in einer Überproduktion von ApoB-100-haltigen Lipoproteinen, wie durch in-vivo-Kinetik-Studien gezeigt werden konnte [127]. Es werden vermehrt VLDL-Partikel von der Leber sezerniert, was wiederum zu einer vermehrten Bildung von LDL-Partikeln führt. Jedes LDL-Partikel enthält ein Molekül ApoB. Bei sämtlichen Formen der familiären Hyperlipidämie lässt sich unabhängig vom sonstigen Phänotyp eine Erhöhung der ApoB-Konzentration im Serum zeigen, die sehr gut mit der LDL-ApoB-Konzentration korreliert, da über 90 % des ApoB in Form von LDL-ApoB vorliegt. Daher befürworten manche Autoren auch die Bezeichnung "Hyper-ApoB" für diese Störung [117].

### 1.3.3 Hyper-Lipoprotein (a)

Erhöhte Plasmaspiegel von Lipoprotein (a) gelten als unabhängiger Risikofaktor der koronaren Herzerkrankung [32,82]. Lipoprotein (a) besitzt eine dem LDL sehr ähnliche Struktur, die mit Apo(a) ein zusätzliches Protein enthält, welches über eine Disulfidbrücke mit ApoB-100 verbunden ist. Apo(a) ist ein Glykoprotein mit einem variablen Molekulargewicht von 300-700 kDa, welches in seiner Struktur eine hohe Homologie (ca. 80%) zu Plasminogen aufweist [79]. Es sind mittlerweile über 34 verschiedene Apo(a)-Isoformen beschrieben worden [101], die sich in Größe und Masse hauptsächlich aufgrund der Anzahl der Wiederholungen eines bestimmten Strukturmotives, nämlich des sog. Kringel-IV, unterscheiden [130,131]. Erhöhte Lipoprotein (a)-Spiegel über 30 mg/dl werden als unabhängiger Risikofaktor für eine KHK angesehen [101]. Problematisch stellt sich die Behandlung erhöhter Lipoprotein (a)-Spiegel dar. Diätetisch wurde bis jetzt noch kein Ansatzpunkt zur Beeinflussung gefunden [63,101], selbst eine Nulldiät über 21 Tage führte zu keiner Absenkung der



Lipoprotein (a)-Konzentration im Plasma [60]. Auch existiert bis jetzt keine wirksame medikamentöse Therapie bei erhöhter Lipoprotein (a)-Konzentration, weder die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren noch die Fibrate senken Lp(a) erfolgreich [101]. Einzelberichte zeigen eine Absenkung unter hohen Nikotinsäuredosierungen, einen geringen Effekt von Östrogenen und dem anabolen Hormon Stanozol sowie eine Absenkung unter hohen Dosen von N-Acetylcystein, ohne dass sich hieraus generelle Therapieansätze ableiten lassen [63]. Des Weiteren findet sich unter chronischem Alkoholkonsum ein Absinken erhöhter Lp(a)-Spiegel. Als derzeit einziger erfolgversprechender Therapieansatz existiert die Möglichkeit der maschinellen Absenkung der Lp(a)-Konzentration mittels Lipidapherese. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich eine Absenkung der Lp(a)-Konzentration erzielen, die in ihrer Größenordnung etwa der Absenkung der LDL-Konzentration entspricht [101].

#### **1.4 Lipidsenkende Medikamente**

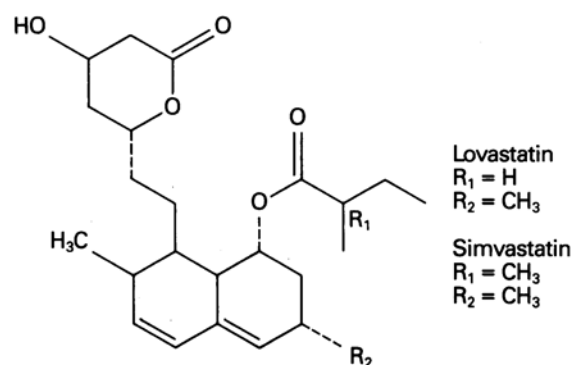
Der humane Lipidstoffwechsel kann von verschiedenen Medikamentengruppen therapeutisch beeinflusst werden, die an unterschiedlichen Punkten angreifen und sich daher auch in ihrer Wirkung unterscheiden.

Im Bereich der Primär- und Sekundärprävention der Atherosklerose und ihrer Folgeerkrankungen ist das Ziel der therapeutischen Intervention in erster Linie ein Absenken erhöhter Serumspiegel des LDL-Cholesterins. Des Weiteren sollten erhöhte Triglyzeridspiegel gesenkt und erniedrigte HDL-Cholesterinspiegel angehoben werden.

##### **1.4.1 HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffe**

Ein potentieller Mechanismus zum Absenken des LDL-Cholesterins besteht in einer Hochregulation der LDL-Rezeptor-Synthese durch Erniedrigung des intrazellulären Cholesterinpools vor allem in der Leber [94]. Diese Erniedrigung des Cholesterinpools wird derzeit am effektivsten durch die Hemmstoffe der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (im weiteren HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren abgekürzt) erreicht. Die Stoffe dieser Substanzgruppe,

auch unter dem Namen Statine oder CSE-Hemmer (Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer) geläufig, reduzieren durch eine Hemmung des Schlüsselenzyms 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase die de-novo-Synthese des Cholesterins [94]. Gängige Vertreter dieser Substanzgruppe sind Simvastatin, Fluvastatin, Cerivastatin, Lovastatin, Atorvastatin und Pravastatin (zur chemischen Struktur vgl. Abbildung 2), wobei der Wirkstoff Cerivatstatin (Handelsname Lipobay®) im August 2001 vom Hersteller (Bayer Vital AG) aus dem Handel zurückgezogen wurde.



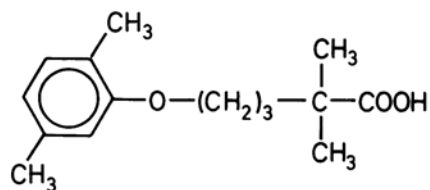
**Abbildung 2: Chemische Struktur der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren: beispielhaft sind hier Lovastatin und Simvastatin dargestellt.**

Die einzelnen Substanzen unterscheiden sich hauptsächlich im Ausmaß der relativen Senkung der Serumspiegel von LDL-Cholesterin und Triglyzeriden [101]. Der Effekt ist für die jeweiligen Substanzen dosisabhängig und beträgt z.B. für Lovastatin in der maximalen Dosierung von 80 mg täglich 40% Reduktion des LDL-Cholesterins und 19% Reduktion der Triglyzeride [103]. Der HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoff Pravastatin erzielte in Studien mit einer Dosierung von 20 mg täglich ein mittleres Absinken des LDL-Cholesterinspiegels um 25%, des Triglyzeridspiegels um 11% und ein Anstieg des HDL-Cholesterins um 16% der Ausgangswerte [97]. Unabhängig vom Ausmaß der Senkung des LDL-Cholesterins haben große Langzeitstudien gezeigt, dass die HMG-CoA-Reduktase-Hemmstoffe die Prognose von Patienten nach Myokardinfarkt deutlich positiv beeinflussen [101]. So konnte

z. B. in der CARE-Studie für die Behandlung mit 40 mg Pravastatin täglich im Vergleich zu Placebo Risikoreduktion für tödliche und nichttödliche Myokardinfarkte um 24% gezeigt werden [97]. Auch die Anzahl von Koronarangioplastien (-23%) und ACVB-Operationen (-26%) war in der Verumgruppe signifikant niedriger als in der placebobehandelten Gruppe. Bemerkenswert ist daran vor allem, dass es sich bei den im Rahmen dieser Studie behandelten Patienten um formal normolipämische Menschen handelte (Cholesterin bei Einschluss <240 mg/dl) [98].

#### 1.4.2 Fibrinsäurederivate

Handelsübliche Vertreter dieser Substanzgruppe sind z.B. Clofibrat, Bezafibrat, Fenofibrat und Gemfibrozil (zur Struktur vgl. Abbildung 3).



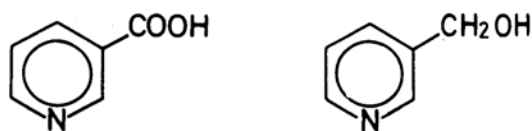
**Abbildung 3: Chemische Struktur von Gemfibrozil als Beispiel für Fibrinsäurederivate.**

Die Fibrinsäurederivate wirken auf andere Art als die HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren auf den Lipidstoffwechsel. Sie bewirken vor allem ein deutliches Absenken des Triglyzeridspiegels und eine Erhöhung der Plasmaspiegel von HDL-Cholesterin und HDL-ApoA-I [94]. Die Reduktion erhöhter Triglyzeride wird im Wesentlichen durch zwei Mechanismen erzielt: zum einen bewirken Fibrinsäurederivate eine verminderte hepatische VLDL-Synthese. Zum anderen wird über eine Erhöhung der Lipoproteinlipaseaktivität auch der VLDL-Katabolismus verstärkt [50]. Dieses erreichen sie zum einen durch eine Erhöhung der Lipoproteinlipase-Aktivität, also einem verstärkten VLDL-Katabolismus [50]. Zum anderen bewirken Fibrinsäurederivate auch eine

Verminderung der Synthese und Sekretion triglyzeridreicher Lipoproteine (VLDL) in der Leber [94]. Die Erhöhung des HDL, die in der Größenordnung 15-20% liegt, wird im wesentlichen über eine direkte Steigerung der ApoA-I-Synthese erreicht. Mittlerweile konnte auch der genaue Wirkmechanismus der Fibrate geklärt werden: sie stellen Liganden des Peroxisomalen Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) dar, eines spezifischen Transkriptionsfaktors, der in aktivierter Form die Transkription wesentlicher Schlüsselgene des Triglyzerid- und HDL-Stoffwechsels (wie ApoA-I, ApoA-II, SR-BI, ABC-1 und Lipoproteinlipase) steuert [11,40,113]. Der Effekt der Fibrinsäurederivate auf den LDL-Cholesterin-Serumspiegel hängt von der zugrundeliegenden Fettstoffwechselstörung ab: bei LDL-Hypercholesterinämie kommt es zu einer Absenkung der initial erhöhten LDL-Konzentration in der Größenordnung 10-20% , während bei Hypertriglyzeridämie sogar ein Anstieg des LDL-Apolipoproteins B beobachtet wird [94].

Die Effektivität von Fibrinsäurederivaten in der Sekundärprävention der KHK konnte auch in einer großen plazebokontrollierten klinischen Endpunktstudie, der „Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial“ (VA-HIT), gezeigt werden: Patienten mit KHK und niedrigem HDL wiesen unter Therapie mit 1200 mg Gemfibrozil pro Tag über eine Beobachtungszeit von im Mittel 5 Jahren eine Reduktion der Mortalität und der Inzidenz erneuter Myokardinfarkte um 22% auf [96].

#### 1.4.3 Nikotinsäure und Nikotinsäurederivate

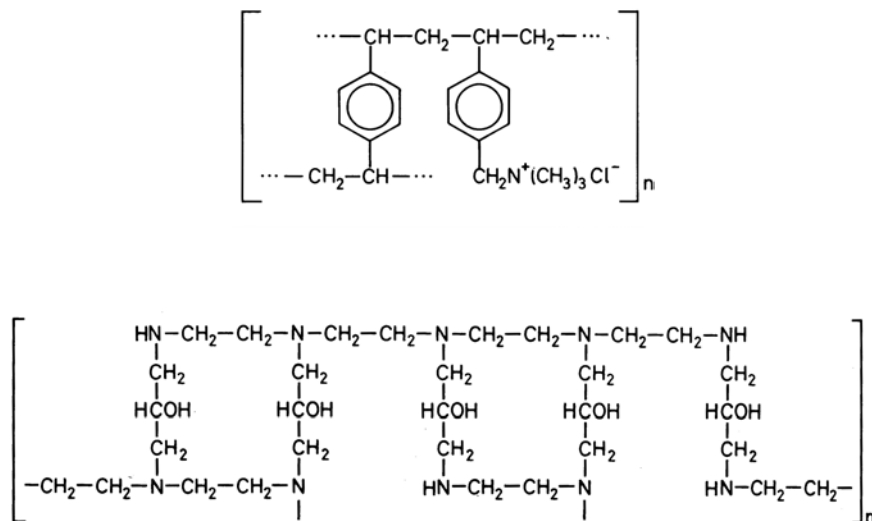


**Abbildung 4: Strukturformeln von Nikotinsäure (links) und Nikotinsäurealkohol (rechts).**

Die Wirkung dieser Substanzgruppe (Strukturformeln vgl. Abbildung 4) ähnelt der der oben beschriebenen Fibrinsäurederivate [101]. Es kommt unter dem Einfluss von Nikotinsäure bzw. ihren Derivaten über eine Hemmung der Lipolyse im peripheren Fettgewebe zu einem verminderten Zustrom von freien Fettsäuren in die Leber, was eine verringerte Produktion und Sekretion triglyzeridreicher VLDL-Partikel zur Folge hat [47,94]. Die hierdurch erzielbare Absenkung der VLDL-Triglyzeridkonzentration bei hypertriglyzeridämischen Patienten liegt in der Größenordnung von 40% [47]. Der Effekt auf das LDL-Cholesterin ist nicht sehr ausgeprägt [94].

#### 1.4.4 Gallensäureaustauscherharze

Bei diese Substanzgruppe handelt es sich um die einzigen nichtresorbierbaren lipidsenkenden Medikamente. Die in Deutschland im Handel befindlichen Substanzen dieser Gruppe sind Colestyramin und Colestipol (zur chemischen Struktur vgl. Abbildung 5).

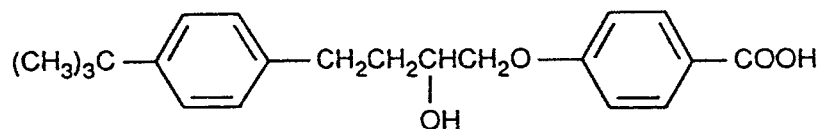


**Abbildung 5: Strukturformeln von Colestyramin (oben) und Colestipol (unten). Beide Substanzen sind Polymere**

Ihr Wirkmechanismus beruht auf der irreversiblen Bindung von Gallensäuren im Darm, die so dem enterohepatischen Kreislauf entzogen und mit dem Stuhl

ausgeschieden werden [94]. Die Austauschharze selbst passieren den Darm ohne jegliche Verstoffwechslung und Resorption [35]. Durch die so erzielte Verminderung der Gallensäurekonzentration in der Leber kommt es über eine Aktivierung der Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase zu einer vermehrten Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren [25,83,119]. Der dadurch erhöhte Cholesterinbedarf wird durch eine vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren an der Leberzelloberfläche und eine erhöhte Neusynthese von LDL in der Leber gedeckt [116]. Der erzielbare Effekt auf das LDL-Cholesterin ist nicht streng linear dosisabhängig und bewirkt im mittleren Dosisbereich ein Absinken von maximal 15-25% [94]. Bei initial normalen Serumtriglyzeridkonzentrationen kommt es zu einem Anstieg der Triglyzeridwerte in der Größenordnung von 5-25%, während bei hypertriglyzeridämischen Patienten mit einem erheblich stärkeren Anstieg zu rechnen ist [126]. Gallensäureaustauscherharze lassen sich sehr gut mit den anderen lipidsenkenden Medikamenten kombinieren [94,101,126].

#### 1.4.5 Lifibrol



**Abbildung 6: Strukturformel von Lofibrol  
(4-(4'-tert-butylphenyl)-1-(4'-carboxyphenoxy)-2-butanol)**

Lofibrol (4-(4'-tert-butylphenyl)-1-(4'-carboxyphenoxy)-2-butanol) ist ein Wirkstoff, dessen lipidsenkende Aktivität bei Tieren erstmals 1989 beschrieben wurde [109]. Die Strukturformel von Lofibrol ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Seine Sicherheit in der Langzeitanwendung konnte in 1990 an Meerschweinchen gezeigt werden [110]. Selbst hohe Dosen wurden gut vertragen und konnten eine maximale Senkung der Cholesterinkonzentration im Serum von über 70% erzielen, die hauptsächlich auf einer Senkung des LDL-Cholesterins beruhte.

1991 konnte dann die lipidsenkende Wirkung von Lofibrol am Menschen demonstriert werden [48], wobei das Medikament gut vertragen wurde. Es erzielte eine dosisabhängige Senkung von Gesamt- und LDL-Cholesterin von max. 26% bzw. 32% unter einer Dosierung von 900 mg/Tag bei gesunden Probanden, wobei auch schon mit niedrigeren Dosierungen signifikante Effekte beobachtet wurden. Im Jahre 1994 zeigten Schwandt et al. dann die Wirkung auf den Lipidstoffwechsel von Patienten mit Hypercholesterinämie [114]. Neben einer guten Absenkung der erhöhten LDL-Cholesterinkonzentrationen (-35% mit einer Dosierung von 450 mg/Tag) konnten die Autoren zeigen, dass das HDL-Cholesterin praktisch unverändert blieb und andere proatherogene Faktoren ebenfalls eine Absenkung erfuhren. So zeigte sich z.B. eine signifikante Absenkung der Fibrinogenkonzentration sowie eine tendenzielle Absenkung erhöhter Lp(a)-Spiegel. Diese Effekte konnten in ähnlicher Ausprägung in einer größer angelegten Studie durch Locker et al. in 1995 bestätigt werden [71]. Hier wurden 155 Patienten über 4 Wochen und 336 Patienten über 12 Wochen mit verschiedenen Dosierungen von Lofibrol behandelt. Beobachtet wurden Absenkungen des LDL-Cholesterins um mehr als 40% in den mit 450 mg, 600 mg und 900 mg Lofibrol behandelten Patientengruppen sowohl in der vierwöchigen als auch in der zwölfwöchigen Therapiegruppe, wobei die Unterschiede zwischen diesen drei Dosierungen in der 4-Wochen-Studie vernachlässigbar waren. In der 12-Wochen-Studie kam es jedoch auch bei diesen Dosierungsgrößen zu signifikanten Wirkungsunterschieden, wobei höhere Dosierungen auch zu stärkeren Absenkungen des LDL-Cholesterins führten. Dieser Effekt war in ähnlicher Art auch auf das Gesamtcholesterin und die Konzentration des Apolipoproteins B zu verzeichnen, wobei die relative Reduktion hier geringer als beim LDL-Cholesterin ausfiel (Reduktion des Gesamtcholesterins um ca. 30% und der ApoB-Konzentration um ca. 33%). Ebenfalls beobachtet wurde eine Absenkung der Triglyzeridspiegel um 15-23% sowie eine statistisch nicht signifikante Absenkung des Lp(a)-Spiegels in der 4-Wochen-Studie in den Dosierungsgruppen mit 300-900 mg. Diese Veränderung war in der 12-Wochen-Studie bei den Dosierungsgruppen mit 300 mg und 600 mg signifikant und betrug 19% bzw. 31%. Die Verträglichkeit von Lofibrol war

auch in diesen Studien sehr gut, es kam zu keinen schwerwiegenden medizinischen Zwischenfällen. Als einzige relevante Nebenwirkung wurde ein makulopapulöser Hautausschlag beschrieben, der bei 13% der in die 4-Wochen-Studie eingeschlossenen Patienten und 9% der in die 12-Wochen-Studie eingeschlossenen Patienten auftrat und bei 9% (n=12) bzw. 4% (n=11) den Ausschluss von der Studie zur Folge hatte. Bei den Patienten, die nach dem Auftreten des Hautausschlags weiter an der Studie teilnahmen, kam es nach wenigen Tagen zu einer kompletten Rückbildung der Erscheinungen. Weitere beobachtete unerwünschte Wirkungen waren gastrointestinale Unverträglichkeitsreaktionen (4% der Patienten (n=5) in der 4-Wochen-Studie) sowie Transaminasenanstieg auf das mehr als 2- bis 3-fache der Basiswerte (3,9% der Patienten (n=10) in der 12-Wochen-Studie).

Der potentielle Wirkungsmechanismus von Lifibrol wird seit der ersten Vorstellung der Substanz intensiv in der Literatur diskutiert [64,71,110,114,137] und ist bis heute noch nicht definitiv geklärt [142]. Vor allem die Abgrenzung des Wirkungsmechanismus gegenüber den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wird kontrovers gesehen. Die lipidsenkende Potenz von Lifibrol entspricht der der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren [137], wobei der Wirkungsbeginn bei der Therapie mit Lifibrol schneller einsetzt und auch die maximale Wirkung früher erreicht wird als bei der Therapie mit der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren oder anderen lipidsenkenden Medikamenten (2 Wochen vs. 4-8 Wochen bzw. 4 Wochen vs. 4-8 Wochen) [71]. Daten aus in-vitro-Studien weisen auf eine Hemmung der Cholesterinsynthese als Hauptmechanismus von Lifibrol hin [109], wobei es hier auch widersprüchliche Ergebnisse gibt, die im Gegensatz dazu eine Erhöhung der Cholesterinsynthese unter Einfluss von Lifibrol zeigen [16]. Scharnagl et al. konnten zeigen, dass Lifibrol die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase in der Zellkultur nicht nennenswert beeinflusst, während die Enzymaktivität durch den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin dosisabhängig fast vollständig supprimiert werden kann [107]. In der gleichen Arbeit zeigte sich eine Reduktion der HMG-CoA-Synthase-Aktivität unter



Einfluss von Lifibrol, wobei die Größenordnung dieser Enzymaktivitätsabnahme *in vitro* die starke Wirkung von Lifibrol *in vivo* nicht hinreichend erklärt.

In einer weiteren Untersuchung zeigten Scharnagl et al. die Wirkung von Lifibrol auf die LDL-Rezeptor-Aktivität in menschlichen Fibroblasten *in vitro* [108].

Lifibrol bewirkte eine dosisabhängige Zunahme der Rezeptor vermittelten LDL-Endozytose von bis zu 50%, während im Vergleich hierzu Lovastatin in vergleichbarer Konzentration einen Anstieg um max. 20% erreichte. In diesen verwendeten Konzentrationen erreicht Lovastatin bereits eine maximale Suppression der Cholesterin-de novo-Synthese, während der Effekt von Lifibrol hierauf deutlich weniger effektiv ist [107,108]. Dennoch kann Lifibrol die LDL-Rezeptor-Aktivität in größerem Ausmaß steigern als Lovastatin. Diese Tatsache weist darauf hin, dass Lifibrol die Steigerung der LDL-Rezeptor-Expression nicht primär über die Hemmung der Cholesterin-Synthese erreicht, sondern auch eine anders geartete Aktivierung von LDL-Rezeptoren stattfinden muss.

Die Cholesterin-de-novo-Synthese wird von Lifibrol weniger beeinflusst. Vega et al. konnten an zwei Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie ohne messbare LDL-Rezeptoraktivität zeigen, dass eine Therapie mit Lifibrol in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht/Tag über 4 Wochen keinen Einfluss auf die Höhe des LDL-ApoB100-Spiegels hat [137].

Bei 2 weiteren Patienten mit Restaktivität des LDL-Rezeptors konnte in der gleichen Untersuchung eine geringe aber signifikante Reduktion des LDL-ApoB100-Spiegels unter der Therapie mit Lifibrol gezeigt werden [137]. Hieraus lässt sich schließen, dass die Wirkung von Lifibrol auch *in vivo* über den LDL-Rezeptor-Weg verläuft. Die selbe Arbeitsgruppe führte zeitgleich zu uns eine Studie zur *in-vivo*-Kinetik des LDL-ApoB100 unter dem Einfluss von Lifibrol durch [137].

Zur Anwendung kam hier im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine Studie mit radioaktiven Isotopen: autologes LDL-ApoB wurde *ex vivo* mit radioaktivem Jod-125 markiert und reinfundiert. Durch die Bestimmung der radioaktiven Aktivität in der isolierten LDL-Fraktion zu verschiedenen Zeitpunkten wurden dann die wesentlichen Kinetikparameter berechnet. Insgesamt nahmen 11 männliche Probanden an dieser Untersuchung teil. Das LDL-Cholesterin lag vor Studienbeginn zwischen 160 und 210 mg/dl. Die Teilnehmer erhielten

doppelblind und randomisiert zunächst für 8 Wochen 600 mg Lifibrol pro Tag oder Plazebo; nach 8 Wochen wurde die Behandlung dann je nach Randomisierungssequenz auf Plazebo oder Lifibrol für weitere 8 Wochen gewechselt. Jeweils in der letzten Woche der Behandlungssequenzen wurden bei den Patienten Kinetikstudien durchgeführt. Im Vergleich zu Plazebo konnte durch Lifibrol eine statistisch signifikante Absenkung von Gesamtcholesterin, Triglyzeriden, LDL-Cholesterin und LDL-ApoB um 29,8%, 32%, 35,5% bzw. 29% erzielt werden. Das HDL-Cholesterin blieb nahezu unverändert. Seitens der Kinetikparameter fand sich ein statistisch signifikanter Anstieg der fraktionellen Katabolismusrate des LDL-ApoB um 20% von  $0,25 \pm 0,05$  auf  $0,30 \pm 0,04$  Pools pro Tag, während die Produktionsrate tendenziell leicht abnahm ( $10,5 \pm 2,9$  mg/kg/Tag unter Plazebo,  $9,3 \pm 2,4$  mg/kg/Tag unter Lifibrol, nicht signifikant). Auch dieses Ergebnis weist auf den LDL-Rezeptor-Weg als Hauptort der Lifibrol-Wirkung hin. Über die Probleme bei der Interpretation von mittels radioaktiven Tracern ermittelten Daten soll in der Diskussion allerdings noch weiter eingegangen werden.

Der Wirkmechanismus von Lifibrol wurde in zahlreichen Tiermodellen sowie in vitro-Studien und klinischen Studien untersucht. Die bisher vorliegenden Ergebnisse sind jedoch zum Teil widersprüchlich und lassen keine eindeutige Aussage zum Wirkmechanismus von Lifibrol zu. Alles weist darauf hin, dass Lifibrol verschiedene Mechanismen in sich vereint, so z. B. eine vergleichsweise geringe Hemmung der Cholesterin-Synthese, eine direkte Aktivierung von LDL-Rezeptoren und eine Hemmung der Cholesterin-Absorption im Darm [71]. Somit unterscheidet sich das Wirkungsprofil von Lifibrol von allen anderen bisher bekannten lipidsenkenden Medikamenten. Aussagekräftige Daten zur in vivo Kinetik von Lipoproteinen unter Einfluss von Lifibrol lagen vor Abschluss unserer Arbeit noch nicht vor. In dieser Arbeit wird mittels stabiler Isotopen-Technik die Lipoproteinkinetik in Patienten mit Hypercholesterinämie ohne und unter Einfluss von Lifibrol verglichen. Hierdurch sollen weitere Aspekte erarbeitet werden, die dazu beitragen, den Wirkungsmechanismus von Lifibrol deutlicher zu charakterisieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

#### 2.1.1 Allgemeines

Es handelt sich um eine offene, zweizentrische klinische Phase II – Studie, die an den Universitätskliniken Marburg und Freiburg durchgeführt wurde. Das Studienprotokoll wurde den zuständigen Ethikkommissionen zur Begutachtung vorgelegt und genehmigt. Jeder Teilnehmer wurde im Sinne eines “informed consense” ausführlich über Sinn und Zweck der Untersuchung aufgeklärt und dokumentierte seine Teilnahmebereitschaft schriftlich. Die Studie selbst wurde entsprechend den GCP-Richtlinien durchgeführt und von einem Studienmonitor begleitet und überprüft.

#### 2.1.2 Einschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden männliche Probanden mit primärer Hyperlipidämie. Eine Gruppe umfasst Probanden mit reiner Hypercholesterinämie (Typ IIa nach Fredrickson), die zweite Gruppe umfasst Probanden mit kombinierter Hyperlipidämie (Typ IIb nach Fredrickson). Die nach Absetzen sämtlicher lipidsenkender Therapie für mindestens sechs Wochen erforderlichen Lipidwerte sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

**Tabelle 7: Einschlusskriterien mind. 6 Wochen nach Absetzen der lipidsenkenden Therapie (Blutentnahme nüchtern)**

Probandengruppe	LDL-Cholesterin	Triglyzeride
Typ IIa	> 155 mg/dl	< 200 mg/dl
Typ IIb	> 155 mg/dl	200-1000 mg/dl

Die Probanden durften aktuell keine Zeichen akuter kardiovaskulärer Erkrankungen aufweisen. Die Ein- und Ausschlusskriterien wurden an zwei Zeitpunkten 4-12 Wochen vor der initialen Kinetikstudie überprüft. Sicherheitslaborparameter wurden zu den Screeningzeitpunkten sowie zu jeder Kinetikstudie überprüft und umfassten Differentialblutbild, Fibrinogen, Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin, GOT, GPT,  $\gamma$ -GT und CK. Während der Zeitdauer der Medikamentengabe wurden die Compliance, die Medikamentenverträglichkeit sowie das Auftreten unerwünschter Ereignisse überprüft und dokumentiert.

### 2.1.3 Probanden

In die Studie eingeschlossen wurden fünf Personen mit Hyperlipidämie Typ IIa und fünf Personen mit Hyperlipidämie Typ IIb. Alle Probanden unterzogen sich frühestens 6 Wochen nach Aussetzen einer zuvor bestehenden medikamentösen oder apparativen lipidsenkenden Therapie einer initialen Kinetik-Studie (Zeitpunkt 0). Anschließend erhielten sie 450 mg Lifibrol täglich für 4 (Typ IIa) bzw. 12 (Typ IIb) Wochen, dann wurde eine erneute Kinetik-Studie durchgeführt (Zeitpunkt 2). Weitere Charakteristika der Probanden sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

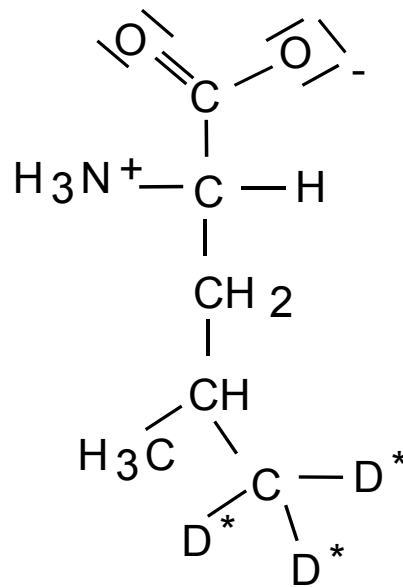
**Tabelle 8: Charakteristika der Probanden**

Patient	Hyperlipidämie Typ	Alter (Jahre)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
GL	IIa	26	20,8
WM	IIa	37	28,0
LW	IIa	31	26,8
HS	IIa	54	22,1
WH	IIa	52	28,1
SG	IIb	35	24,5
WS	IIb	43	30,0
CL	IIb	27	24,7
GS	IIb	45	20,9
DS	IIb	50	26,1

Zwei der Probanden (DS und WH) unterzogen sich etwa 14tägig einer LDL-Apherese-Behandlung in der Klinik für Innere Medizin - Kardiologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg. 6 Wochen vor Beginn der Studie und während der Studiendauer wurde diese Behandlung ausgesetzt.

#### 2.1.4 Isotopenauswahl

Die Probanden erhielten als Tracersubstanz eine mit stabilen Isotopen markierte Aminosäure infundiert. Zur Verwendung kommt hier Deuterium, das stabile, nicht radioaktive Isotop von Wasserstoff. In dieser Arbeit kommt ausschließlich die Aminosäure L-Leuzin zum Einsatz, die an ihrem Kohlenstoffatom in Position 5 dreifach mit Deuterium ( $^2\text{H}_3$ ) markiert wurde (Fa. MSD, USA). Die Aminosäure L-Leuzin erfüllt wichtige Anforderungen, die an solche Tracersubstanzen gestellt werden. Mit ihrer vergleichsweise hohen Anreicherung in den untersuchten Apolipoproteinen (z.B. ca. 11,6% im Apolipoprotein B-100; im Vergleich dazu beträgt dieser Wert für Phenylalanin ca. 5% und für Zystein ca. 0,6%) [65] lässt sich auch bei geringen Gesamtproteinmengen eine hohe Sensitivität im Tracer-Nachweis erzielen. Da es sich bei L-Leuzin um eine der 10 essentiellen Aminosäuren handelt, ist ihre Plasmakonzentration unabhängig von endogenen Synthesewegen und ihre Zufuhr kann einfach über die Nahrung kontrolliert werden. Desweiteren liegt L-Leuzin als essentielle Aminosäure in relativ niedrigem Plasmaspiegel vor, was aufgrund der geringen Poolgröße eine reduzierte Tracergabe im Vergleich zur Verwendung von nicht-essentiellen Aminosäuren ermöglicht. Die dreifache Markierung der Aminosäure L-Leuzin mit Deuterium ist chemisch stabil und hat sich bereits in anderen Arbeiten bewährt [28,70,105].



**Abbildung 7: Strukturformel von [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-L-Leuzin.**  
D\* markiert die Positionen, an denen die Wasserstoffatome des Leuzins gegen Deuterium ausgetauscht sind.

Nach Qualitätskontrolle (Reinheit >99,9%) wurden die markierten Aminosäuren durch die Klinikumsapotheke der Philipps-Universität in physiologischer Kochsalz-Lösung aufgenommen, steril filtriert und autoklaviert. Nach abschließender Testung auf Sterilität und Pyrogenfreiheit wurden sie zur Injektion verwendet.

### 2.1.5 Studienprotokoll

Alle Probanden wurden darüber instruiert, drei Tage vor Studienbeginn eine Diät in Form einer isokalorischen Standardkost einzuhalten. Diese Standardkost enthält 30 kcal pro kg KG und setzt sich zusammen aus 20% Eiweiß, 30% Fett, 50% Kohlenhydraten und max. 300 mg Cholesterin pro Tag. Der Studientag selbst verlief unter Fastenbedingungen, wobei jedoch Trinkwasser in beliebiger Menge konsumiert werden konnte. In den rechten und linken Unterarm wurde jeweils eine Venenverweilkanüle gelegt, wobei über die eine Kanüle die Blutentnahmen, über die andere die Infusion der

Tracer-Aminosäure erfolgte. Die Probanden waren in einem Studienraum mit Liegemöglichkeit untergebracht. Dort standen sie unter ständiger Betreuung und hatten die Möglichkeit zur Bewegung.

Zu Studienbeginn erhielten die Probanden einen Bolus [5,5,5-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Leuzin (10 µmol /kg KG), dem eine konstante Infusion mittels Infusomat (10 µmol/kg KG und Stunde) für die gesamte Studiendauer folgte [28].

Die Studien begannen jeweils gegen 8.00 Uhr morgens. Während der Studiendauer von 12 Stunden wurden in festgelegten Zeitabständen über eine Venenverweilkanüle Blutentnahmen durchgeführt:

- zum Zeitpunkt 0 vor Injektion des “primed bolus”,
- in den ersten 40 Minuten alle 10 Minuten,
- nach 60 und 90 Minuten und
- ab der 2. Stunde beginnend jeweils stündlich sowie
- an den drei auf den Studientag folgenden Tagen jeweils morgens.

Von jedem Probanden wurden so zu 21 Zeitpunkten Blutproben gewonnen. Pro Blutentnahme wurden 18 ml in jeweils zwei 9 ml Monovetten KE (mit Kalium-EDTA als Gerinnungshemmer, Fa. SARSTEDT; Best.-Nr.:02.1066.501) entnommen. Das Blut wurde gleich im Anschluss an die Abnahme weiterverarbeitet (siehe Abschnitt 2.2).

## **2.2 Gewinnung des Plasmas**

Die Proben werden direkt im Anschluss an die Probenentnahme bei 4000 UpM und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert (Laborfuge GL, Fa. Heraeus Christ). Die korpuskulären Blutbestandteile sedimentieren hierbei und das Plasma kann abpipettiert werden. Nach Überführung in 15 ml Probenröhrchen mit Schraubverschluss (Fa. Sarstedt; Best.-Nr.: 62.554.502) wird dem Plasma ein Konservator nach Alaupovic zugesetzt, um eine bessere Haltbarkeit der Proben zu erreichen. Die Zusammensetzung des Konservators ist in Tabelle 9 wiedergegeben.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des Konservators nach Alaupovic**

Chemikalien	Menge
reduziertes Glutathion	5 g
6-Amino-Hexansäure	13 g
EDTA (Ethylendiamontetraacetat)	2,5 g
Chloramphenicol	0,2 g
<u>Zubereitung:</u> 6-Amino-Hexanäure in 90 ml Aqua dest. lösen, Chloramphenicol in 10 ml Ethanol absolut lösen, mischen, übrige Chemikalien zugeben.	

Zu 1 ml Plasma wird 1  $\mu$ l des Konservators gegeben. Anschließend wird jeweils 1 ml jeder Probe entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt (Fa. Eppendorf, Best.-Nr.: 0030 102.002). Hieraus erfolgt die Bestimmung der Konzentrationen von Cholesterin, Triglyzeriden, Apolipoprotein A-I und Apolipoprotein B (siehe 2.5). Aus weiteren 750  $\mu$ l jeder Probe erfolgt die Isolierung der freien Plasmaamino­säuren (siehe 2.3). 6 ml jeder Probe werden zur Trennung der Lipoproteinfraktionen eingesetzt (siehe 2.4). Das restliche Plasma wird tiefgefroren.

### **2.3 Isolierung der freien Plasmaamino­säuren**

Zur Berechnung der Kinetik ist die Kenntnis der Poolgröße, also der Menge an freien Plasmaamino­säuren zu jedem Messzeitpunkt, entscheidend. Hierzu müssen diese freien Aminosäuren aus dem Plasma isoliert werden, um sie anschließend einer quantitativen Bestimmung mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (siehe 2.13) zuzuführen.

Jeweils 750  $\mu$ l des Probenplasmas werden mit 1,5 ml 50%iger Essigsäure gründlich gemischt und anschließend über Kationenaustauschersäulen gegeben (siehe 2.11). Die so gewonnenen Proben werden dann wie im Abschnitt 2.12 näher beschrieben derivatisiert. Die quantitative Bestimmung der



Isotopenanreicherung erfolgt schließlich mit Hilfe der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (siehe 2.13).

## **2.4 Trennung der Lipoproteinfraktionen**

### **2.4.1 Prinzip**

Die Auftrennung in die einzelnen Lipoproteinklassen erfolgt mittels sequentieller präparativer Ultrazentrifugation [44,49]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf den unterschiedlichen Sedimentations- bzw. Fluktuationseigenschaften der verschiedenen Plasmabestandteile im Schwerfeld der Zentrifuge. Die Plasmalipoproteine, die im jeweiligen Zentrifugationsschritt eine geringere Dichte besitzen als das übrige Plasma, flottieren an der Oberfläche und können so gewonnen werden. Die Dichte der Probe wird im Anschluss an jeden Zentrifugationsschritt durch Zugabe einer definierten Menge von Kaliumbromidlösung (Dichte 1,35 g/ml) so variiert, dass schrittweise die verschiedenen Lipoproteinklassen isoliert werden können.

Die verschiedenen Dichtefraktionen der Lipoproteine sind in Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10: Dichtefraktionen der Lipoproteine**

<b>Dichtebereich in Gramm/Liter</b>	<b>Lipoproteinfraktionen</b>
< 1,006	VLDL, Chylomikronen
1,006-1,019	IDL
1,019-1,063	LDL
1,063-1,210	HDL

Zur Anwendung kommt eine Ultrazentrifuge der Firma Beckmann (Modell L8-55M) mit entsprechendem Rotor (Fa. Beckmann, Modell 50.3 TI bzw. 50.4 TI). Als Probengefäße kommt das passende Beckmann Quickseal System (Best.Nr. 344619) sowie die entsprechende Schneidevorrichtung (tube slicer, Best.Nr. 303811) zum Einsatz. Die Zentrifugation erfolgt bei jeweils 49000

Umdrehungen pro Minute und einer Temperatur von konstant 4° Celsius unter Hochvakuum.

#### **2.4.2 VLDL-Gewinnung**

Mit Hilfe einer Spritzenadel (Mikrolance 2, 19 G 1 ½; Best.Nr. 301500) werden jeweils exakt 5 ml des Plasmas in die Zentrifugenröhrchen einpipettiert. Auf die Öffnung der Röhrchen werden dann Metallkappen (Seal former; Fa. Beckmann; Best.Nr. 342421) gesetzt, die mit Hilfe eines Gerätes (Quick-Seal tube sealer; Fa. Beckmann; Best.Nr. 342429) erhitzt werden und so den Kunststoff zum Schmelzen bringen. So erfolgt ein luftdichter Verschluss der Röhrchen, die anschließend in den Ultrazentrifugen-Rotor eingesetzt werden. Zur Stabilisierung der Röhrchen während der Ultrazentrifugation dienen noch aufgesetzte Kunststoffkappen (Quick-seal tube spacers; Fa. Beckmann; Best.Nr. 344389).

Die Zentrifugation der Proben erfolgt dann für 18 Stunden entsprechend den oben angegebenen Bedingungen. Anschließend werden die Probenröhrchen vorsichtig aus dem Rotor entfernt. Der VLDL-Überstand kann visuell identifiziert werden. Es wird eine entsprechende Schnitthöhe so gewählt, dass das oben aufgeschwommene VLDL eindeutig von dem Rest der Probe getrennt ist. Dann werden die Zentrifugenröhrchen mit Hilfe der entsprechenden Schneidevorrichtung durchtrennt. Der Überstand mit der VLDL-Schicht wird mit einer Spritzenadel in ein 15 ml Probenröhrchen mit Schraubverschluss (Fa. Sarstedt; Best.-Nr.: 62.554.502) überführt, auf 5 ml Gesamtvolumen gebracht und bei 4° Celsius gekühlt. 500 µl des Überstands aus jeder 2. Probe wird separat in Eppendorf-Hütchen pipettiert. Hieraus erfolgt zur Analyse der Zusammensetzung der Lipoproteine die Bestimmung von Apolipoprotein B, Triglyzeriden und Cholesterin.

Der Unterstand wird zur Gewinnung der IDL-Fraktion eingesetzt.

### 2.4.3 IDL-Gewinnung

Der Unterstand aus dem Zentrifugationsschritt zur VLDL-Gewinnung wird ebenfalls mit einer Spritzennadel aus dem unteren Teil des Zentrifugenröhrchens gewonnen. Anschließend wird das Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung (Dichte 1,006 g/ml) gespült. Unterstand und Spüllösung werden dann in ein neues Zentrifugenröhrchen transferiert, welches mit 1,006 g/ml Dichtelösung auf ein Gesamtvolumen von 5 ml gebracht wird. Anschließend werden 188,6 µl einer Kaliumbromidlösung mit einer Dichte von 1,35 g/ml in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Dies führt zu einer Erhöhung der Dichte der Probe auf 1,019 g/ml. Bei dieser Dichte flotiert IDL im Überstand. Mit einer Kaliumbromidlösung der Dichte 1,019 g/ml werden dann die Zentrifugenröhrchen auf identisches Volumen aufgefüllt. Die Röhrchen werden nach der oben erwähnten Methode verschlossen und 18 Stunden in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entfernung der Zentrifugenröhrchen aus dem Rotor erfolgt die Durchtrennung mittels der Schneideapparatur. Mittels einer Spritzenadel wird der Überstand mit der IDL-Fraktion in ein 15 ml Probenröhrchen mit Schraubverschluss (Fa. Sarstedt; Best.-Nr.: 62.554.502) überführt und bei 4° Celsius gekühlt. 500 µl des Überstands aus jeder 2. Probe werden separat in Eppendorf-Hütchen pipettiert. Hieraus erfolgt wiederum Analyse die Bestimmung von Apolipoprotein B, Triglyzeriden und Cholesterin. Der Unterstand wird zur LDL-Gewinnung weiterverarbeitet.

### 2.4.4 LDL-Gewinnung

Der Unterstand aus der IDL-Zentrifugation wird unter Nachspülung mit Kaliumbromidlösung der Dichte 1,019 g/ml in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Die Erhöhung der Dichte auf 1,063 g/ml für die Isolation der LDL-Fraktion erfolgt durch Zugabe von 740,8 µl einer Kaliumbromidlösung der

Dichte 1,35 g/ml. Die Röhren werden anschließend mit Kaliumbromidlösung der Dichte 1,063 g/ml auf gleiches Volumen aufgefüllt und 24 Stunden ultrazentrifugiert. Wiederum werden die Röhren mittels der Schneideapparatur durchtrennt, der Überstand mit der LDL-Fraktion in 15 ml Probenröhren mit Schraubverschluss (Fa. Sarstedt; Best.-Nr.: 62.554.502) überführt und bei 4° Celsius gekühlt. Die Bestimmung von Cholesterin, Triglyzeriden und Apolipoprotein B erfolgt aus 500 µl jeder zweiten Probe. Aus dem Unterstand erfolgt dann die Isolation der HDL-Fraktion.

#### **2.4.5 HDL-Gewinnung**

Im letzten Zentrifugationsschritt erfolgt die Trennung des HDL von Albumin und anderen die Gelelektrophorese störenden Plasmaproteinen. Hierzu ist ein Dichtewechsel auf 1,21 g/ml notwendig. Nach Überführung des Unterstands in einen 5 ml Messzylinder mit geeichter Skala (Fa. Brand, Wertheim, Best. Nr. 32105) und Nachspülung mit Kaliumbromidlösung der Dichte 1,063 g/ml wird das Volumen durch Zugabe dieser Lösung auf genau 5 ml gebracht. Nun wird 1,18 g festes Kaliumbromid zugegeben und durch vorsichtiges Schütteln in Lösung gebracht. Die Probe, die nun eine Dichte von 1,21 g/ml aufweist, wird in Zentrifugenröhren überführt, welche dann mit Kaliumbromidlösung der Dichte 1,21 g/ml aufgefüllt und verschlossen werden. Anschließend erfolgt die Ultrazentrifugation für 48 Stunden. Nach diesem letzten Zentrifugationsdurchgang werden die Röhren wieder geschnitten. Der HDL-haltige Überstand wird in 15 ml Probenröhren mit Schraubverschluss (Fa. Sarstedt; Best.-Nr.: 62.554.502) überführt, ebenso der Unterstand. Dieser wird tiefgefroren. Aus jeder zweiten Probe der HDL-Fraktion werden 500 µl entnommen und eine Bestimmung von HDL-Cholesterin und Apolipoprotein AI durchgeführt. Das restliche Probenvolumen wird bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4° Celsius gekühlt.

## **2.5 Bestimmung wichtiger Komponenten der Lipoproteine**

### **2.5.1 Cholesterinbestimmung**

Die Cholesterinbestimmung im Plasma und den einzelnen Lipoproteinfraktionen erfolgt enzymatisch nach der CHOD-PAP-Methode [10] (Monotest, Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.:236691).

#### Prinzip

Die in der Probe vorliegenden Cholesterinester werden bei dieser Methode zunächst durch das Enzym Cholesterin-Esterase zu Cholesterin und Fettsäuren hydrolysiert. Das Cholesterin wird dann durch die Cholesterin-Oxidase zu  $\Delta^4$ -Cholestenon und  $H_2O_2$  umgesetzt. Das  $H_2O_2$  reagiert nun mit 4-Aminophenazon und Phenol katalysiert durch Peroxidase zu dem Farbstoff 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon. Die Menge an so entstandenem Farbstoff ist direkt proportional zur Cholesterinkonzentration in der Probe.

#### Durchführung

Zur Bestimmung werden 10  $\mu$ l Probandenserum eingesetzt. Um den Cholesteringehalt in den einzelnen Lipoproteinfraktionen zu messen, werden jeweils 100  $\mu$ l VLDL und IDL bzw. jeweils 20  $\mu$ l LDL und HDL eingesetzt. Das entsprechende Probenvolumen wird mit 1 ml Reagenzlösung versetzt und mindestens 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Extinktion der Probe im Photometer (Photometer 1101 M, Fa. Eppendorf) gegen den Reagenzien-Leerwert. Durch Multiplikation mit einem Faktor, der durch die vorhergehenden Messungen von Seren mit bekanntem Cholesteringehalt (Precinorm L, Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 781827) ermittelt wird, kann dann aus der Extinktion die Cholesterinkonzentration in mg/dl berechnet werden.

### **2.5.2 Triglyzeridbestimmung**

Die Bestimmung der Triglyzeridkonzentrationen im Serum und den einzelnen Lipoproteinfraktionen erfolgt enzymatisch nach der GPO-PAP-Methode [77] (Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 701912).

#### Prinzip

Das Enzym Lipase hydrolysiert die Triglyzeride in Glycerin und Fettsäuren. Das Glycerin wird dann durch die Enzyme Glycerokinase und Glycerinphosphatoxidase so umgesetzt, dass letztlich Dihydroxyacetonphosphat und  $H_2O_2$  entstehen. Das entstehende  $H_2O_2$  reagiert nun unter Einwirkung von Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol zu dem Farbstoff 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon, dessen entstandene Menge direkt proportional zur Triglyzeridkonzentration in der Probe ist.

#### Durchführung

Das eingesetzte Probenvolumen beträgt 10  $\mu$ l (Serum), 50  $\mu$ l (VLDL) bzw. 100  $\mu$ l (IDL, LDL, HDL). Das Probevolumen wird mit 1 ml Reagenzlösung versetzt und mind. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Extinktion der Probe im Photometer (Photometer 1101 M, Fa. Eppendorf) gegen den Reagenzien-Leerwert. Durch Multiplikation mit einem Faktor, der durch die vorhergehenden Messungen von Seren mit bekanntem Triglyzeridgehalt (Precinorm L, Fa. Boehringer Mannheim, Best.-Nr.: 781827) ermittelt wird, kann dann aus der Extinktion die Triglyzeridkonzentration in mg/dl berechnet werden.

### 2.5.3 ApoA-I und ApoB-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung von ApoA-I und ApoB erfolgt mit der Methode der kinetischen Nephelometrie [69,72,80].

#### Prinzip

Gibt man zu einer Probe, die ApoA-I bzw. ApoB als Antigen enthält, gegen das jeweilige Apolipoprotein gerichtete spezifische Antikörper im Überschuss, so

bilden sich Antigen-Antikörper-Immunkomplexe, die zu einer von der Antigenkonzentration abhängigen Trübung der Probe führen. Diese Trübung wird nun durch die Nephelometrie quantifiziert: man schickt einen Lichtstrahl durch die zu analysierende Probe und bestimmt mit einer Photozelle die Intensität des Streulichtes. So kann aus der Stärke der Lichtstreuung auf die Apolipoproteinmenge in der Probe zurückgeschlossen werden.

#### Durchführung

Die Messungen werden mit dem Behring Nephelometer 100 (Fa. Behring) durchgeführt. Eingesetzt werden 200 µl Probenvolumen. Durch den Vergleich mit einer zuvor aus Kontrollseren mit bekanntem ApoA-I-bzw. ApoB-Gehalt erstellten Eichgeraden ermittelt das Nephelometer vollautomatisch den ApoA-I-Gehalt der HDL-Proben bzw. den ApoB-Gehalt der IDL-, LDL- und VLDL-Proben.

### **2.5.4 Proteinbestimmung**

Aus den gewonnenen Lipoproteinfraktionen (VLDL, IDL, LDL und HDL) wurden von jeweils drei Proben pro Teilnehmer und Studienzeitpunkt Bestimmungen der Gesamtproteinmenge durchgeführt, um Informationen über den Proteingehalt der einzelnen Fraktionen zu gewinnen.

Zum Einsatz kommt hierzu das Protein Assay der Fa. Bio-Rad (Best.-Nr. 500-0001).

#### Prinzip

Der Assay basiert auf einer zur Proteinkonzentration in der Probe proportionalen Änderung des Färbungsverhaltens einer Lösung durch Bindung von Protein an einen Farbstoff (Coomassie Brilliant Blau G-250). Durch diese Bindung kommt es zum Wechsel des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm.

### Durchführung

Standardlösung, Leerwert ("blank"), Kontrollserum und die Proben werden auf Microtiterplatten aufgetragen. Zunächst wird von der Standardlösung (lyophilisiertes Schweinealbumin) eine Verdünnungsreihe hergestellt, aus der eine Standardkurve vermessen wird. Als Kontrollserum kommt Kontrollserum LP (lyophilisiertes Humanserum für die Richtigkeitskontrolle, Fa. Behring, Best.-Nr. OTSB) zum Einsatz.

Danach werden die Proben einpipettiert und es wird die Reagenzlösung hinzugegeben. Dieses wird vermischt, nach frühestens 5 min erfolgt die Messung der Absorption bei 595 nm gegen den "blank". Bei dem eingesetzten Gerät handelt es sich um den MILENIA<sup>TM</sup> Kinetic Analyzer, an welchen ein Personal Computer mit entsprechender Software angeschlossen ist.

## **2.6 Entsalzung durch Dialyse**

Durch die präparative Ultrazentrifugation zur Isolierung der einzelnen Lipoproteinfraktion und den damit verbundenen Dichtewechseln kommt es zu einem hohen Salzgehalt der einzelnen Proben, der letztlich die Trennung der Apolipoproteine mittels Gelelektrophorese stören würde. Daher werden die Proben mittels der nachfolgend beschriebenen Methode der Dialyse entsalzt.

### Prinzip

Bei der Dialyse trennt eine semipermeable Membran zwei Lösungen. Diese Membran ist nur für Moleküle bis zu einer bestimmten Molekülgröße durchlässig, während größere Moleküle nicht durch die Poren der Membran diffundieren können. Treibende Kraft bei diesem physikalischen Verfahren ist ein Konzentrationsgefälle zwischen den beiden getrennten Lösungen. Die Proteine werden hierbei aufgrund ihrer Größe von der Membran zurückgehalten, während die gelösten Salze und weitere kontaminierenden Substanzen durch die semipermeable Membran in die andere Lösung, das Dialysat, diffundieren.



### Durchführung

Als Dialysat dient eine Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung. Es wird eine 1 molare Stammlösung angesetzt, entsprechend einer  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Konzentration von 79,06 g/l. Diese wird zur Dialyse im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Proben werden in Dialyseschläuche (Spectra/Por; molecularporous membrane tubing; MWCO(molecular weight cut off) 6000-8000; Durchmesser: 14,6 mm; Fa. SERVA; Best.-Nr.: 132650) eingefüllt, die mit entsprechenden Klemmen (Spectra/Por Closures; Fa. Spectrum medical industries; Best.-Nr.: 132734) verschlossen werden. Es kommen jeweils 5 l der 0,01 molaren Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zur Dialyse von 8 Proben zum Einsatz. Die Dialyse findet für 24 Stunden unter ständiger Durchmischung des Dialysats mittels eines Magnetrührers im Kühlraum bei kontinuierlichen 4° Celsius statt. Während dieser Zeit wird das Dialysat dreimal ausgetauscht, um ein ständiges Konzentrationsgefälle zu gewährleisten. Nachdem durch diesen Präparationsschritt die Proben weitgehend von den zugesetzten Salzen gereinigt sind, werden die Proben wieder in 15 ml Probenröhrchen mit Schraubverschluss (Fa. Sarstedt; Best.-Nr.: 62.554.502) überführt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° Celsius gelagert.

## **2.7 Delipidieren**

Verschiedene Faktoren können die Auftrennung der einzelnen Proteine in der Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.8) stören. Von besonderer Wichtigkeit sind hierbei zum einen die Salze (vgl. Abschnitt 2.6), zum anderen die in den einzelnen Lipoproteinfraktionen enthaltenen Fette. Eine möglichst vollständige Entfernung dieser Lipide ist für eine gute Auftrennung der Apolipoproteine entscheidend. Hierbei muss jedoch auch beachtet werden, dass ein solches Reinigungsverfahren vor allem bei den Apolipoprotein B-haltigen Lipoproteinen VLDL, IDL und LDL wegen der großen Empfindlichkeit dieses Apolipoproteins gegenüber denaturierenden Substanzen zu Schwierigkeiten führen kann. Das eingesetzte Delipidierungsverfahren muss außerdem gewährleisten, dass die

delipidierten Lipoproteine im Anschluss gut im Probenpuffer auflösbar sind und der starken Tendenz der Apolipoprotein B-Molekülen zur Konglomeratbildung und Lösungsproblemen auf dem Gel entgegengewirkt wird. Es kommt daher die im folgenden beschriebene Delipidierungsmethode zum Einsatz. Nach der Delipidierung werden die Proben jeweils in Probenpuffer aufgenommen, dessen Zusammensetzung Tabelle 11 wiedergibt.

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Probenpuffers**

<b>Probenpuffer</b>	
0,5 M Tris pH 6.8	6 ml
4 % SDS	7 ml
Saccharose	2,4 g
Bromphenolblau	0,03 g
Aqua bidest.	10,8 ml
DTT	0,3 g

### 2.7.1 Delipidieren von HDL

Jeweils 1 ml der zuvor dialysierten HDL-Proben werden mit 3 ml Ether-Ethanol-Gemisch (Volumenverhältnis 1:3; bestehend aus Diethylether > 99,5%, Fa. Roth., Best.Nr. 3942 und Ethanol p.a.) versetzt. Als Probengefäß dienen Spitzröhrchen mit Eindrückdeckel (Fa. Sarstedt; Reagenzröhrchen aus Polypropylen, 4,5 ml; Best.- Nr. 57.512 PP mit Eindrückstopfen aus Polyethylen, Best.- Nr. 65.809.003). Dieses Gemisch wird für 18 bis 20 Stunden bei -20° Celsius gelagert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten bei 4° Celsius (Laborfuge <sup>GL</sup>, Fa. Heraeus Christ). Diese Zentrifugation wird im folgenden als Kühlzentrifugation bezeichnet. Hierbei setzt sich der Proteinanteil in Form eines Pellets im Boden des Spitzröhrchens ab. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wird der flüssige

Überstand abgesaugt, so dass nur das Pellet zurückbleibt. Zu diesem Pellet werden dann 3 ml Diethylether hinzugegeben, dieses wird dann auf einem Rüttler vermischt. Dann erfolgt die Lagerung bei  $-20^{\circ}$  Celsius für 1 Stunde. Anschließend wird wieder eine Kühlzentrifugation durchgeführt. Nach diesem abschließenden Delipidierungsschritt wird der Überstand aus den Probenröhrchen abgesaugt und zu jedem Pellet 170  $\mu$ l Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) zugegeben, die Probe gründlich geschüttelt und dann zur Entfernung eventuell noch vorhandener Reste der organischen Lösungsmittel unter dem Abzug 20 Minuten lang mit Stickstoff begast. Diese Lösungsmittel könnten sonst zum Aufsteigen der Proben aus den Probenaschen des Gels und so zum Proteinverlust und zu einer Verunreinigung der Gele führen (vgl. Abschnitt 2.8). Durch den kontinuierlich über die Probe strömenden Stickstoff ( $N_2$ ) und zwischenzeitliches Aufschütteln der Probe kommt es zu einer ausreichenden Verdunstung des Restethers. Die so in Lösung gebrachte HDL-Probe wird anschließend gemäß Abschnitt 2.8 der Gelelektrophorese zugeführt.

### 2.7.2 Delipidieren von LDL

Jeweils 0,5 ml der LDL-Proben werden in 3,5 ml Ether-Ethanol-Gemisch bei  $-20^{\circ}$  Celsius über 18 bis 20 Stunden gelagert. Anschließend erfolgt die Kühlzentrifugation (4000 Umdrehungen pro Minute bei  $4^{\circ}$  Celsius für 20 Minuten in der Laborfuge <sup>GL</sup>, Fa. Heraeus Christ). Die Absaugung des Überstandes erfolgt mit einer Wasserstrahlpumpe. Das im Boden des Spitzröhrchen verbleibende Protein-Pellet wird dann in einem aus Methanol und Trockeneis bestehenden Kältebad kurz gefroren und mit Hilfe eines Homogenisator-Stempels zerkleinert. Dieser Delipidierungsschritt mit 3,5 ml Ether-Ethanol-Gemisch wird noch zweimalig wiederholt (die Lagerungsdauer bei  $-20^{\circ}$  Celsius beträgt hier jeweils 1 Stunde). Als letzter Schritt schließt sich die Zugabe von 3 ml Diethylether an. Analog zu den zuvor beschriebenen Verfahrensweisen erfolgt die Lagerung für 1 Stunde bei  $-20^{\circ}$  Celsius,

anschließend wird die Kühlzentrifugation durchgeführt und der Überstand abgesaugt. Nach Zugabe von 170 µl Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) und guter Durchmischung erfolgt anschließend die Bedampfung der Proben mit Stickstoff für 20 Minuten, um das Verdunsten des Restethers zu beschleunigen. Dann können die Proben zur Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 2.8) eingesetzt werden.

### **2.7.3 Delipidieren von IDL**

Das Delipidieren der IDL-Fractionen erfolgt nach den selben Verfahrensweisen wie das der LDL-Fractionen (vgl. Abschnitt 2.7.2).

### **2.7.4 Delipidieren von VLDL**

Aufgrund des relativ niedrigen Proteingehaltes der VLDL-Proben müssten große Probenvolumen eingesetzt werden, um eine ausreichende Menge an Proteinen für die Gelelektrophorese zu gewinnen. Dieses stellt aufgrund des begrenzten Fassungsvermögens der verwendeten Probengefäße ein Problem dar. Deshalb werden die VLDL-Proben in einem sogenannten SpeedVac-Konzentrator – bestehend aus Tischzentrifuge mit Heizblock in Verbindung mit einer Vakuumpumpe – eingeengt. Es kommt ein Anfangsvolumen von 3,5 ml VLDL-Fraktion zum Einsatz, welches über 12 Stunden bei mittlerer Trocknungstemperatur auf ein Volumen von circa 1 ml konzentriert wird. Anschließend werden zu jeder Probe 3 ml des Ether-Ethanol-Gemisches (Volumenverhältnis 1:3) hinzugefügt und für 18 bis 20 Stunden bei -20° Celsius gelagert. Danach erfolgt die Kühlzentrifugation bei 4° Celsius und 4000 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten. Der Überstand wird abgesaugt, und das zurückgebliebene Pellet in einem Kältebad aus Methanol und Trockeneis gefroren und mit einem Homogenisatorstempel zerkleinert. Es schließt sich ein weiterer Delipidierungsschritt mit 3,5 ml Ether-Ethanol-Gemisch (Lagerungsdauer bei -20° Celsius jetzt 1 Stunde) an, auf den abschließend ein Delipidierungsschritt mit 3 ml Diethylether (Lagerungsdauer bei -20° Celsius

ebenfalls 1 Stunde) folgt. Im Anschluss an die Kühlzentrifugation wird auch hier der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Zu dem im Kältebad zerkleinerten Protein-Pellet werden 170 µl des Probenpuffers (Zusammensetzung siehe Tabelle 11) gegeben und auf einem Rüttler gut vermischt. Zur Eliminierung des Restethers erfolgt die zwanzigminütige Begasung mit Stickstoff unter dem Abzug. Die Proben werden dann der Gelelektrophorese zugeführt.

## **2.8 Trennung der Proteine durch Elektrophorese**

### Prinzip

Ziel dieses Arbeitsschrittes ist die Isolierung bestimmter Apolipoproteine aus den vorbereiteten Lipoprotein-Fractionen. Zur Anwendung kommt eine Elektrophorese mittels SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE). Die Polyacrylamidgele bilden hierbei eine Art Netz aus, dessen Porengröße vom Polyacrylamidgehalt abhängig ist. Das anionische Detergenz SDS ("sodium dodecyl sulphate", Natriumdodecylsulfat) hat die Aufgabe, die Ladung der verschiedenen Proteine möglichst zu vereinheitlichen, damit dieser Faktor keinen Einfluss auf die Laufstrecke der Proteine im Gel hat. Beim Einsatz eines Gradientengels stellt sich im vertikalen Verlauf des Gels eine zunehmende Vernetzung des Polyacrylamids ein, so dass sich im elektrischen Feld letztlich eine gute Auftrennung der Proteine unterschiedlicher Größe (etwa 10000 bis 500000 Dalton) ergibt, wobei Proteine mit höherem Molekulargewicht eine kürzere Wanderungsstrecke aufweisen als solche mit niedrigem Molekulargewicht. Die für diese Arbeit interessanten Proteine haben Molekulargewichte von 28100 Dalton (Apolipoprotein AI), 34200 Dalton (Apolipoprotein E), 513000 Dalton (Apolipoprotein B-100) und zwischen 400000 und 700000 Dalton (Apolipoprotein a, je nach Phänotyp). In dieser Arbeit kommt ein vereinfachtes Gradientengel zum Einsatz, welches eine ausreichende Proteinauftrennung bei erheblich geringerem Zeitaufwand im Vergleich zur Herstellung eines kontinuierlichen Gradientengels gewährleistet.

## Durchführung

Zum Gießen der Gele sowie zur anschließenden Elektrophorese kommt das System Protein II xi Vertical Electrophoresis Cell der Firma BIORAD zum Einsatz. Hierbei werden die Acrylamidlösungen zwischen zwei Glasplatten eingebracht, die seitlich von jeweils einer "Sandwich"-Klammer zusammengehalten werden. Dieses System ermöglicht durch das Einsetzen von verschiedenen Platzhaltern ("Spacer") die Herstellung von Gelen unterschiedlicher Dicken. In dieser Arbeit werden ausschließlich 1,5 mm dicke Gele verwendet. Zu den verwendeten Chemikalien und der Zusammensetzung der Gele vergleiche Tabelle 12 und Tabelle 13.

**Tabelle 12: Zur Gelherstellung verwendete Chemikalien**

Kurzbezeichnung	Konzentration	Herstellung
Acrylamid	45% Acrylamid	225 g auf 500 ml Aqua bidest.
Bisacrylamid	1,6% Bisacrylamid	2,4 g auf 150 ml Aqua bidest.
Tris	1,5 M Tris pH 8,8	90,86 g auf 500 ml Aqua bidest. <sup>1</sup>
	0,5 M Tris pH 6,8	6,06 g auf 100 ml Aqua bidest. <sup>1</sup>
SDS <sup>2</sup>	4% SDS	4 g auf 100 ml Aqua bidest.

<sup>1</sup>: pH-Wert-Einstellung mit konzentrierter Salzsäure unter kontinuierlicher pH-Wert-Kontrolle

<sup>2</sup>: Natriumdodecylsulfat

**Tabelle 13: Verwendete Mengen zur Herstellung von 2 Gelen a 1,5 mm Dicke**

	Vorlauf-Gel	Trenn-Gel	
	3%	5%	15%
<b>45% Acrylamid</b>	1,4 ml	3,5 ml	20,8 ml

<b>1,6% Bisacrylamid</b>	1,4 ml	2,1 ml	3,2 ml
<b>0,5 M Tris pH 6,8</b>	5 ml		
<b>1,5M Tris pH 8,8</b>		7,0 ml	15 ml
<b>4% SDS</b>	1 ml	1,4 ml	1,6 ml
<b>Aqua bidest.</b>	10,8 ml	14 ml	16,2 ml
<b>Temed</b>	30 ml	50 ml	80 ml
<b>0,56% Persulfat</b>	1,4 ml	2,1 ml	3,2 ml

Das Laufgel setzt sich aus einer 5% und einer 15% Polyacrylamidlösung zusammen. Hierzu werden die Glasplatten in die entsprechende Vorrichtung zum Herstellen der Gele eingesetzt und das System durch das Einfüllen von destilliertem Wasser auf Dichtigkeit überprüft. Anschließend wird die 15% Acrylamidlösung entsprechend den Angaben in Tabelle 13 hergestellt und mittels einer Glaspipette bis zu einer Höhe von 9 cm in das System eingefüllt. Über diese wird dann sofort die 5% Acrylamidlösung vorsichtig bis zu einer Höhe von 12,5 cm eingefüllt. Dadurch kommt es in der Übergangszone dieser beiden Lösungen zu einer Vermischung und so zur Ausbildung eines Dichtegradienten, der auf technische einfache Art eine gute Trennung der Proteine ermöglicht. Nachdem diese Lösungen polymerisiert sind, überschichtet man das Gel bis zu einer Höhe von 15 cm mit der 3% Acrylamidlösung. Hier wird dann vor der Polymerisation ein "Kamm" eingeführt, der die Taschen zum späteren Einfüllen der Proben erzeugt. Dieser wird nach der Polymerisation des 3% Startgels vorsichtig entfernt. Nun können die beiden Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Das hieran angeschlossene Kühlsystem wird zur Vermeidung einer Überwärmung der Gele durch den Stromfluss auf +8° Celsius eingestellt. Die Gelkammer wird dann mit SDS-Laufpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 14) gefüllt, welcher Anode und Kathode umspült.

**Tabelle 14: Zusammensetzung des Laufpuffers**

Laufpuffer	
Tris	30 g

Glycin	144 g
SDS	5 g
Aqua bidest. ad 5000 ml	

Als nächster Schritt erfolgt die Einbringung der delipidierten und in Probenpuffer gelösten Proben in die Taschen des Gels mittels einer 500 µl Hamilton-Spritze. Hierbei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen mit der Spritze in die Probentaschen eingebracht werden, da ansonsten durch Aufsteigen dieser Luftblasen eine Verunreinigung des Laufpuffers möglich ist. Zusätzlich werden zur Identifizierung der einzelnen Apolipoproteine auf jedes Gel Lösungen mit definierten Proteinen aufgetragen, die als Molekulargewichts- bzw. Protein-Standards dienen. Die verwendeten Standards sind in Tabelle 15 wiedergegeben.



**Tabelle 15: Zusammensetzung der für die SDS-Elektrophorese eingesetzten Proteinstandards (MG = Molekulargewicht)**

<b>HDL- und LDL-Gele</b>		
<b>Standard</b>	<b>Protein</b>	<b>MG (kD)</b>
High Range Standard	Myosin	205
	$\beta$ -Galaktosidase	118
	BSA	85
	Ovalbumin	47
Apo AI-Standard	Apo AI	28,5
<b>VLDL-Gele</b>		
<b>Standard</b>	<b>Protein</b>	<b>MG (kD)</b>
High Range Standard	siehe oben	
Apo E-Standard	Apo E	34,2

Die elektrischen Laufparameter bei den Elektrophoresen lauten bei 2 Gelen von je 1,5 mm Dicke jeweils:

Spannung 600 V

Stromstärke 60 mA

Leistung ca. 60 W

Die Dauer eines Gellaufes liegt zwischen 15 und 18 Stunden.

#### Beenden des Gellaufes

Um einen Verlust von niedermolekularen Apolipoproteinen (z.B. Apolipoprotein A-I) am unteren Gelrand zu vermeiden, wird der Gellauf beendet, wenn die mit Bromphenolblau markierte Probenpufferfront gerade das untere Gelende erreicht hat. Anschließend wird kurzzeitig eine Nitrocellulosemembran zur Anfertigung eines "Touch-Blotts" auf das Gel aufgelegt (vgl. Abschnitt 2.9), um bei Bedarf eine Proteinidentifizierung mittels "Western-Blotting" durchzuführen.

### Färben der Gele

Die Gele werden mittels einer speziellen Proteinfärbelösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 16) gefärbt. Hierzu werden sie für 1 Stunde in der Färbelösung aufbewahrt, anschließend mit Aqua bidest. gespült und in Essigsäure/Ethanol-Lösung (siehe Tabelle 17) entfärbt. Der Entfärber wird innerhalb von 6-8 Stunden zwei- bis dreimal ausgetauscht. Beendet wird die Entfärbung, wenn sich die blauen Proteinbanden gut auf dem hellen Geluntergrund abgrenzen lassen. Die Gele werden dann in 7,5% Essigsäure aufbewahrt.

**Tabelle 16: Zusammensetzung der Färbelösung**

Färbelösung	
Methanol	500 ml
Aqua bidest.	400 ml
Coomasie Blue-R250 1%	1 g
Essigsäure	50 ml
Aqua bidest. ad 1000 ml	

**Tabelle 17: Zusammensetzung der Entfärbelösung**

Entfärber	
Ethanol 96% vergällt	1250 ml
Essigsäure 100%	500 ml
Aqua bidest. ad 5000 ml	

Zur Dokumentation werden die einzelnen Gele fotografiert bzw. gescannt. Zur weiteren Bearbeitung werden dann definierte Banden mittels eines Skalpell aus den Gelen ausgeschnitten und in Neo-Lab vials (Fa. neo Lab, Vials Typ I mit Schraubverschluss und Teflondichtung, temperaturbeständig bis 150°C, Best.-Nr. 120127231) eingebracht.

In dieser Arbeit wurden folgende Proteinbanden isoliert:

- HDL-Gele: Apo(a), ApoA-I
- LDL-Gele: ApoB-100
- IDL-Gele: ApoB-100
- VLDL-Gele: ApoB-48, ApoB-100, ApoE

Zusätzlich wird pro Gel stets ein "proteinfreies" Gelstück als Leerwert ("Blank") mit ausgeschnitten, um etwaige Verunreinigungen der Gelmatrix mit Leuzin zu erfassen und in der Analyse rechnerisch zu berücksichtigen. Zur Vorbereitung der weiteren Aufarbeitung (Hydrolyse, vgl. Abschnitt 2.10) werden die Gelbanden für 1-2 Tage bei +60°C im Trockenschrank aufbewahrt.

## **2.9 Immunoblot**

Noch vor dem Färben wird von jedem Gel ein sog. "Touch-Blot" angefertigt.

### Prinzip

Unter dem Begriff "Blotting" versteht man eine Methode, bei der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden und auf dieser so eine "Kopie" des Bandenmusters auf dem Gel erzeugt wird. Grundsätzlich gibt es hierzu zwei verschiedene Methoden. Bei dem "Elektro-Blotting" werden die Proteine durch einen zweiten Gellauf senkrecht zum ersten auf die Membran übertragen, während bei dem in dieser Arbeit verwendeten "Touch-Blotting" die Übertragung von geringen Spurenmengen durch einfaches Aufdrücken der Zellulosemembran auf die Geloberfläche stattfindet.

Einzelne Proteine können dann jederzeit selektiv durch spezifische Antikörper markiert und diese mittels enzymatischen Reaktionen oder Anfärben dargestellt werden ("Western-Blotting"). Aufgrund der extrem hohen Sensitivität dieses Verfahrens reicht der minimale Proteintransfer zum qualitativen Nachweis aus.

### Durchführung

Zunächst erfolgt die Vorbereitung der Nitrocellulosemembran (Fa. Millipore, Best.-Nr. IPUH 00010). Diese wird hierzu einige Sekunden mit Methanol benetzt, anschließend mit Aqua bidest. gespült und mit Blotting-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 18) benetzt. Hierdurch werden die Poren der Membran zur optimalen Proteinabsorption vorbereitet. Die so präparierte Membran wird dann auf das aus der Elektrophoresevorrichtung entfernte Gel aufgelegt und ohne Einschluss von Luftblasen kurz aufgedrückt. Mittels eines Skalpell erfolgt die Markierung der rechten unteren Ecke sowie der 10 Probenauftragstaschen, um eine zweifelsfreie Zuordnung von Membran und Gel und damit auch der einzelnen Proteinbanden zu ermöglichen. Die Nitrocellulosemembran wird dann direkt in eine Schale mit Abblottpuffer (Herstellung siehe Tabelle 19) gegeben und darin für 1 Stunde geschüttelt. Das in dem Abblottpuffer enthaltene Polyvinylpyrrolidon (PVP) blockiert an der Membran alle noch nicht besetzten Bindungsstellen. Hierdurch wird eine Verunreinigung der Membran durch Fremdproteine und eine konsekutive unspezifische Antikörperbindung vermieden und so die eindeutige Identifizierung im "Western-Blott" ermöglicht. Die Membran wird anschließend über Nacht getrocknet, in Folie eingeschweißt und tiefgefroren.

**Tabelle 18: Herstellung des Blotting-Puffers**

<b>Blotting-Puffer</b>	
Tris ultrapure (Fa. USB, Best.-Nr. 22643)	0,97 g
Glycin (Fa. Roth Karlsruhe, Best.-Nr. 3908.2)	4,50 g
⇒ in 400 ml Aqua bidest. lösen	
⇒ mit 100 ml Methanol auffüllen	

**Tabelle 19: Herstellung von Abblotpuffer-Stammlösung  
sowie Abblott-Lösung**

<b>Abblott-Puffer</b>	
Tris ultrapure (Fa. USB, Best.-Nr. 22643)	500 mMol = 60,57 g
NaCl	900 mMol = 52,6 g
⇒ in 1l Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 8,0 einstellen	
⇒ zur Anwendung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen sowie 1 g Polyvinylpyrrolidon (PVP von Sigma Chemical Co. St.Louis USA, Best.-Nr. 9003-39-8) pro 100 ml Stockpuffer (1% Lösung) unter Rühren hinzugeben	

### **2.10 Proteinhydrolyse**

Nach der Isolierung der einzelnen Proteine müssen diese zur weiteren Analytik mittels Hydrolyse in die einzelnen Aminosäuren überführt werden. Dieser Schritt ist aus zweierlei Gründen notwendig:

1. Im weiteren Verlauf der Analyse kommt in dieser Arbeit ein Gaschromatographie-Massenspektrometriegerät zum Einsatz, welches für die Analyse hochmolekularer Bestandteile nicht geeignet ist.
2. Die Aufnahme von Tracer-Aminosäuren ist in Relation zur Gesamtproteinmasse gering und kann zu Konzentrationen führen, die unterhalb der Nachweisgrenze für die markierten Aminosäuren im Gesamtprotein liegen. Nach der Protein-Hydrolyse lässt sich jedoch das Verhältnis von markierter zu nicht markierter Aminosäure betrachten, welches erheblich größer ist. Hierdurch kommt es zu einer Steigerung der Sensitivität.

#### **Prinzip**

Die Peptidbindungen der Proteine werden in 6 normaler Salzsäurelösung (6 N HCl) gespalten. Als Resultat erhält man die einzelnen Aminosäuren.

### Durchführung

Es wird zunächst durch 1:2-Verdünnung eine 6 N HCl-Lösung aus konzentrierter (12 N) HCl (rauchend, 37%, Selectipure, Firma Merck, Best.- Nr. 3212500) angesetzt. Pro 10 ml dieser 6 N HCl-Lösung werden 5 µl β-Mercaptoethanol hinzugegeben.

Jeweils 3 ml des so hergestellten Salzsäure/β-Mercaptoethanol-Gemisches werden zu den getrockneten Banden in die Neo Lab-Vials (Fa. neo Lab, Vials Typ I mit Schraubverschluss und Teflondichtung, temperaturbeständig bis 150°C, Best.-Nr. 120127231) gegeben. Anschließend werden die Proben kurz mit Stickstoff bedampft, um den Sauerstoff zu entfernen. Die Vials werden dann mit speziellen Teflon-beschichteten Deckeln verschlossen. Dieses ist wichtig, da durch eine Teflon-Dichtung zum einen die Dichtigkeit des Gefäßes sichergestellt ist, zum andern die Teflon-Beschichtung der Deckelinnenseite einen hohen Korrosionsschutz gegen die aggressive Salzsäure bietet.

Die so vorbereiteten Proben werden nun für etwa 24 Stunden bei +110°C in einen Heizblock gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt die Abkühlung der Probengefäße bei Raumluft. Daran anschließend werden die Proben kurz abzentrifugiert, so dass sich die Gelmatrix am Boden der Probengefäße absetzt. Mittels einer Glas-Pasteur-Pipette wird das Hydrolysat dann in ein Spitzröhrchen (Fa. Sarstedt; Reagenzröhrchen aus Polypropylen, 4,5 ml; Best.- Nr. 57.512) überführt, die Gelmatrix wird verworfen. Das so gewonnene Hydrolysat wird dann über 14 bis 18 Stunden in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac, bestehend aus: dem Konzentrator Speed-Vac SVC 100 mit dem Rotor Modell RH 24-18, der Kühlfalle "Refrigerated Condensation Trap RT 100" und der Drehschieber-Vakuumpumpe vacubrand Typ RD-4 der Fa. Brand) eingetrocknet und so vom Salzsäureüberstand befreit. Während des gesamten Prozesses ist jegliche Proteinverunreinigung zu vermeiden, da bereits kleinste Kontaminationen (z.B. Blut bei Bagatellverletzungen) zu starken Verfälschungen der Ergebnisse führen können.

### **2.11 Isolierung der Aminosäuren**

#### Prinzip

Neben den Aminosäuren enthält das eingetrocknete Hydrolysat noch Gelanteile und andere Verunreinigungen, die vor der massenspektrometrischen Analyse entfernt werden müssen, um eine genaue Analytik zu gewährleisten. Dieses geschieht mittels des Prinzips der Ionenaustauschchromatographie. Hierdurch können die protonierte Aminosäuren isoliert und von Anionen und neutral geladenen Molekülen separiert werden.

Es kommen Kationenaustauschersäulen zur Anwendung [37]. Diese sind mit einer Matrix aus Kunstharz gefüllt, an die Sulfonsäurereste gekoppelt sind ( $R-SO_3^-H^+$ ). Gibt man die in Essigsäure gelösten Aminosäuren über diese Säulen, so findet ein Austausch zwischen den Protonen und den Aminosäuren statt, da diese eine stärkere Affinität zu den  $SO_3^-$ -Gruppen besitzen. Die Aminosäuren können anschließend durch Spülung der Lösung mit wässriger Ammoniaklösung eluiert werden [1, 143].

#### Durchführung

Zunächst erfolgt die Herstellung einer 50% Essigsäurelösung durch 1:2-Verdünnung von 100% Essigsäure mit Aqua bidest. sowie die Herstellung von verdünnter Ammoniaklösung durch 1:4-Verdünnung von reinstem 32% Ammoniak mit Aqua bidest..

Die in der Vakuum-Zentrifuge eingetrockneten Hydrolysate werden in jeweils 3 ml 50 % Essigsäure aufgenommen und vollständig in Lösung gebracht. Um jegliche Kontamination der Proben durch eventuell in den Säulen befindliche Aminosäuren auszuschließen, werden die Ionenaustauschsäulen (AG-50W-X8, Fa. Bio-Rad) in einem ersten Schritt vorbehandelt: zuerst Eluierung der Säulen mit je 4 ml verdünnter Ammoniaklösung, dann Spülung mit je 10 ml Aqua bidest., anschließend Spülung mit je 4 ml 50% Essigsäure zur Beladung mit Protonen. Nach diesem Reinigungsschritt werden die in Essigsäure gelösten Proben über die Säulen gegeben. Als nächstes erfolgt die Spülung mit je 10 ml Aqua bidest., welches etwaige Verunreinigungen (z.B. Reste der Gelmatrix)

entfernt. Die an die  $\text{SO}_3^-$ -Gruppen der Ionenaustauschsäulen gebundenen Aminosäuren werden dann mit je 4 ml verdünnter Ammoniaklösung eluiert, das Eluat wird in Neo Lab-Vials aufgefangen. Diese werden mit teflonbeschichteten Deckeln (vgl. 2.10) verschlossen und bis zur weiteren Aufarbeitung (Derivatisierung, siehe 2.12) bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

### **2.12 Derivatisieren der Aminosäuren**

#### Prinzip

Ziel dieses Arbeitsschrittes ist es, die Aminosäuren in eine flüchtige Form zu überführen und so ihre Messbarkeit durch die Gaschromatographie-Massenspektrometrie herzustellen. Besonders für aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin hat sich hierzu die Umwandlung zu N-Heptafluorobutyryl-Isobutyl-Estern durch Reaktion ihrer funktionellen Gruppen bewährt [37,73], und auch für Leuzin stellt dieses Verfahren eine sehr geeignete Methode dar [144]. Die so entstehenden Derivate weisen gegenüber ihren Ursprungssubstanzen verschiedene Vorteile auf, die sie besonders gut zur Messung in der kombinierten Gaschromatographie-Massenspektrometrie geeignet machen: erhöhte Stabilität und Flüchtigkeit, verbesserte chromatographische Eigenschaften, spezifische Massenverschiebung, Rückschlüsse auf funktionelle Gruppen und Steuerung der Fragmentierungsrichtung.

#### Durchführung

Die in Ammoniak gelösten, gereinigten Aminosäuren (siehe Abschnitt 2.11) werden in der Vakuum-Zentrifuge (vgl. Abschnitt 2.10) über 12 Stunden eingetrocknet. Die zur Derivatisierung benötigten Reagenzien stehen als gebrauchsfertiges Kit zur Verfügung (HFB-IBA amino acid derivatization kit, Fa. Alltech Ass., Best.-Nr.18094). Zunächst wird aus den Reagenzien Isobutanol und Acetylchlorid die Chemikalie Isobutanol-HCl hergestellt, indem unter Kühlung jeweils eine Ampulle Isobutanol (5 ml) zu einer Ampulle Acetylchlorid (1,25 ml) pipettiert wird. Jeder Probe werden dann 400  $\mu\text{l}$  Isobutanol-HCl hinzugegeben, dieses Gemisch wird für 1 Stunde bei  $110^\circ\text{C}$  auf dem Heizblock



("Reacti-Therm III Heating Module"(Modell 18840) unter Benutzung des Aluminiumblockes "Reacti-Block B-1"(Modell 18802) der Fa. Pierce) unter dem Abzug erwärmt, dann im Kühlschrank abgekühlt und für 30 Minuten in der Vakuum-Zentrifuge eingetrocknet. Als nächstes erfolgt die Zugabe von 200 µl Ethylacetat (mind. 99,8 % ;Best.-Nr.: 3799.0200; Fa. Merck) und 150µl HFBA (Heptafluorobuttersäure) je Probe, anschließend werden die Proben 10 Minuten lang bei 150°C erhitzt. Die danach im Kühlschrank abgekühlten Proben werden wiederum für 30 Minuten in der Vakuum-Zentrifuge eingetrocknet.

Abschließend wird der am Boden der Reaktionsgefäße befindliche Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Menge des eingesetzten Ethylacetats richtet sich nach der zu erwartenden Konzentration der markierten Aminosäure in der entsprechenden Lipoproteinkonzentration und beträgt für die aus der VLDL-Fraktion gewonnenen Proteine 30 µl, für die aus der LDL-, IDL- und HDL-Fraktion gewonnenen Proteine 50 µl. Die Proben werden dann in speziell für die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung vorgesehene Probengefäße (Combo-Pack; 1000 Stück; Fa. Ass-Chem; Best.-Nr.: 074082) überführt und mit den entsprechenden gummierten Metalldeckeln versiegelt. Bis zur Durchführung der Gaschromatographie-Massenspektrometrie werden die Proben gekühlt. Sollte ein längerer Zeitraum bis zur Analyse vergehen, können die Proben auch bis dahin tiefgefroren werden.

### **2.13 Gaschromatographie/Massenspektrometrie**

Die Isotopenanreicherung in den einzelnen Proben wird unter Verwendung einer Kombination aus Gaschromatographie (GC) und Triple-Stage-Quadrupole-Massenspektrometrie (MS) bestimmt (GC/MS-MS) [115]. Hierbei kommt als Unterscheidungsmerkmal zwischen markierter und unmarkierter Aminosäure die zusätzliche Masse des Tracers [5,5,5- $^2\text{H}^3$ ]-L-Leuzin im Vergleich zur unmarkierten Normalform zum Tragen. In einer Vortrenneinheit (in dieser Studie eine Gaschromatographiesäule) erfolgt die Vortrennung komplexer organischer Gemische, die allein durch ihr Verhalten im Massenspektrometer nicht zu unterscheiden wären. Anschließend erfolgt die

Ionisierung der Moleküle und die massenspektrometrische Analyse der bekannten Zielionen. Dieses Verfahren hat eine sehr hohe Sensitivität und eignet sich problemlos auch zur Bestimmung kleinster Anreicherungen des Tracers. Die Traceraminosäure war in Verdünnungsstudien bis in einen Bereich von 5-10 pg aus einer Masse von 20 ng unmarkierter Aminosäure gut nachweisbar [115]. Dieses ist für die Analyse der Kinetik von Proteinen wie LDL-Apolipoprotein B-100 und HDL-Apolipoprotein A-I sehr wichtig, da es sich um Proteine mit einem langsamen Turnover handelt und die Aufnahme der Traceraminosäure daher in der Dimension kleiner 1% liegt.

Ziel der Messung mittels GC/MS-MS ist die Quantifizierung des Verhältnisses Traceraminosäure zu unmarkierte Aminosäure (Tracer/Tracee-ratio, [5,5,5- $^2\text{H}^3$ ]-L-Leuzin/ L-Leuzin), die man vereinfacht auch als "Anreicherung" bezeichnen kann [144].

Zum Einsatz kam ein Finnigan MAT TSQ 700 Gas Chromatograph/Tandem-Massenspektrometer.

### 2.13.1 Probenauffrennung mittels Gaschromatographie

Das Prinzip der Chromatographie ist die Auftrennung eines Stoffgemisches (mobile Phase) aufgrund unterschiedlicher Absorption an einem Trägermaterial (stationäre Phase). Im Falle der Gaschromatographie (GC) ist das aufzutrennende Stoffgemisch als mobile Phase gasförmig und wird mittels eines indifferenten Trägergases durch die stationäre Phase geleitet, welche aus einem mit einer nicht flüchtigen Flüssigkeit getränktem porösem Feststoff besteht (gas-liquid-chromatographie, GLC). Es kommt so zur Lösung der Gase in der Flüssigkeit. Die Geschwindigkeit des Transportes hängt dabei davon ab, wie groß die Löslichkeit des Gases in der Flüssigkeit ist. Anschließend erfolgt die Messung durch Detektoren [1].

Als Trennsäulen kommen hochauflösende Gaskapillarsysteme zum Einsatz, die mit einer Länge von bis zu 15 m eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität bei der Auftrennung aufweisen. Diese Säulen befinden sich in einem

temperaturkontrollierten Ofen, der durch ein Aufwärmprogramm das individuelle Elutionsprofil der zu untersuchenden Proben noch weiter optimiert. Aufgrund der unterschiedlichen Retention der Gase in der Trennsäule erreichen die einzelnen Substanzen nacheinander das Säulenende, wo sie von einem Detektor erfasst und als Peak aufgezeichnet werden. Als Detektionsmethode kommt entweder die hochsensitive Flammenionisationsdetektoren (FID) oder Elektronen-Einfang-Detektoren (ECD) zum Einsatz. Es gelingt so eine Separation weitgehend reiner Einzelsubstanzen, die direkt in der angeschlossenen Ionisationskammer durch Elektronenbeschuss geladen und massenspektrometrisch analysiert werden können.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen gelten die in Tabelle 20 wiedergegebenen Merkmale:

**Tabelle 20: Gaschromatographieparameter**

Gaschromatographie	
Quarzkapillarsäule (J&W-DB5, Fa. Analyt, Mühlheim)	- Länge 15m - Innendurchmesser 0,25 mm - Filmdicke 0,25 mm
Trägergas	Helium
Gasdruck	70 kPa
Injektionstemperatur	240°C
Temperaturprogramm	Anfangstemperatur 90°C für 1 min, Erhöhung um 10°C/min bis 180°C, dann um 30°C/min auf 280°C, diese Temp. wird für 2 min gehalten

Die eingesetzte Probenmenge betrug je nach Art des zu untersuchenden Proteins zwischen 0,5 und 2 µl.

### 2.13.2 Massenspektrometrie

Durch die Massenspektrometrie werden Ionen entsprechend ihres spezifischen Verhältnisses von Masse ( $m$ ) zu Ladung ( $z$ ) aufgetrennt. Die wesentlichen Elemente eines Massenspektrometers sind:

1. Ionenquelle
2. Analysator (Trennvorrichtung) und
3. Auffänger (Detektor).

ad 1.: Direkt nach der gaschromatographischen Auftrennung werden die zu analysierenden Moleküle über einen drucktrennenden Gasseparator in die Ionisationskammer geleitet.

Zur Ionisierung der Proben bei Studien mit stabilen Isotopen stehen grundsätzlich zwei Verfahren zur Verfügung: die "electron impact" Ionisierung und die chemische Ionisierung.

Bei der "electron impact" Ionisierung werden die zu ionisierenden Moleküle direkt durch einen hochenergetischen Elektronenstrahl geführt, welcher von einem glühfadenähnlichen Filament ausgeht. Hierdurch kommt es zu einer Ionisierung der Muttersubstanz, aber auch zur Zerschlagung eines Großteils der Muttersubstanz in typische Fragmente, die dann oft in erheblich größerer Menge vorhanden sind als das Muttermolekül selbst. Dieses ist auf der einen Seite für bestimmte Fragestellungen von Vorteil, da über diese typische Fragmentbildung auch unbekannte Moleküle identifiziert werden können. Auf der anderen Seite ist diese Fragmentierung allerdings auch mit einem Sensitivitätsverlust verbunden, der besonders bei geringen Probenmengen zum Tragen kommt. Hier kann nämlich ein eventuell gerade noch erfassbares Signal der Muttersubstanz durch die Zerschlagung in kleinere, nicht mehr sicher nachweisbare Einzelfragmente verloren gehen.

Bei der chemischen Ionisierung handelt es sich um ein schonenderes Verfahren, bei dem Hilfsgase (z.B. Methan) ionisiert werden, die dann in einem weiteren Schritt durch Ladungsaustausch oder Ionen-Molekül-Reaktionen die Probenmoleküle ionisieren. Durch den Einsatz von im Vergleich zur "electron impact" Ionisierung relativ geringeren Energiemengen kommt es bei diesem Verfahren nur zu minimalen Fragmentierungen und so zu einer erheblichen

Verbesserung der Gerätesensitivität. Bei der chemischen Ionisierung handelt es sich daher um die bei Tracerstudien bevorzugte Methode [41,143,144]. In dieser Arbeit kam zur Bestimmung der Anreicherung ein Verfahren der chemischen Ionisation zum Einsatz, bei dem negativ geladene Ionen entstehen (negative-ion chemical ionization, NICI).

ad 2.: Als Analysator dient ein Quadrupole-System, welches aus vier in den Eckpunkten eines Quadrates parallel angeordneten, etwa 20 cm langen Metallstäben besteht. Die jeweils gegenüberliegenden Stabelektroden sind miteinander elektrisch verbunden. An sie wird eine konstante Gleichspannung angelegt, die von einem oszillierenden Wechselstromfeld überlagert wird. Hieraus resultiert ein Hochfrequenzfeld, welches die aus der Ionenquelle kommenden Ionen auf eine oszillierende Flugbahn zwischen den Stabelektroden zwingt. Die elektromagnetischen Wechselfelder führen zu einer schraubenförmigen Flugbewegung der Ionen, die nur Ionen eines bestimmten Massen-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) eine Passage des Quadrupoles erlaubt. Alle anderen prallen auf die Stabelektroden und werden so eliminiert. Durch Variation der Gleich- und Wechselstromfelder lassen sich mit dieser Technik Ionen eines bestimmten Massen-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) gezielt herausfiltern. Die entsprechenden Parameter der für diese Arbeit relevanten Moleküle lauten für das Mutterion des markierten Leuzins  $m/z=366$  und für das Mutterion des unmarkierten Leuzins  $m/z=363$ .

Nach Durchlaufen der ersten Quadrupole-Einheit werden die Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Bereiches in eine Argon-Kollisions-Zelle geleitet, in der sie dem Verfahren der "collision-induced-dissociation" (CID) unterzogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit kommt es hierbei zur Kollision der Mutterionen des markierten und unmarkierten L-Leuzins mit dem Stoßgas Argon und so zur Aufspaltung in gemeinsame Fragmentationen mit  $m/z=280,1$ . Es erfolgt die Weiterleitung in eine zweite Quadrupole-Einheit und die Registrierung in einem Auffänger. Die Zuordnung der Fragmentationen zu dem entsprechenden Mutterion kann anhand des Entstehungszeitpunktes vorgenommen werden.

Mittels dieses zweiten MS-Schrittes lässt sich die Spezifität der Methode nochmals erhöhen: etwaige Verunreinigungen, die aufgrund eines identischem  $m/z$ -Verhältnisses mit einem der Zielionen nach Auftrennung in der ersten Quadrupole-Einheit noch mitgemessen würden, werden durch ein differentes Fragmentierungsmuster in der CID im Rahmen der zweiten Quadrupole-Einheit eliminiert.

ad 3.: Die Registrierung der Ionen erfolgt mittels eines Sekundärionenvervielfachers, der die Ionenströme über eine Verstärkungseinheit an einen Oszillographen weiterleitet. Die von diesem angezeigten Peaks werden von einer Recheneinheit ausgewertet.

Die genauen Bedingungen der Massenspektrometrie in der Probenauswertung dieser Arbeit lauteten (Tabelle 21):

**Tabelle 21: Massenspektrometrie-Parameter**

<b>Massenspektrometriebedingungen</b>	
Temperatur der Ionenquelle	150°C
Elektronenenergie	70 eV
Ionenstromstärke	0,4 mA
Sekundärelektronenvervielfacher	1400 V
Gasdruck des Methans	50 Pa
Kollisionsgasdruck (Argon)	1 mTorr
Kollisionsenergie	10 eV

### 2.13.3 Datenauswertung

Als Ergebnis der GC/MS-MS-Messung wird ein computererstelltes Diagramm ausgegeben, aus dem das Verhältnis von markiertem Leuzin (Tracer) zu unmarkiertem Leuzin (Tracee) in der jeweiligen Probe ermittelt wird.

Die Anreicherung von stabilen Isotopen wird entweder als einfache Isotopenanreicherung E, oder korrekter als Tracer/Tracee Verhältnis angegeben [26,27]. Die Isotopenanreicherung E gibt die relative Anreicherung des stabilen Isotopes über dem der natürlicherweise vorkommenden Anreicherung wieder. Die Anreicherung E ist definiert als:

$$E = q/(Q+q) - q_N/(Q_N+q_N)$$

wobei Q der Masse des ("unmarkierten") Hauptisotopes (z.B.  $^1\text{H}$ ) und q der Masse des Tracerisotopes (z.B.  $^2\text{H}$ ) entspricht.  $q_N/(Q_N+q_N)$  entspricht der als "natural abundance" natürlicherweise vorkommenden Isotopenanreicherung (vor Tracergabe).

Bei der massenspektrometrischen Messung der Isotopenverhältnisse ("Isotope Ratio") wird üblicherweise direkt das Verhältnis (R) von Tracer zu Tracee als

$$R = q/Q$$

angeben, so dass die obige Gleichung für E umgeschrieben werden kann in:

$$E = R/(1+R) - R_N/(1+R_N)$$

Cobelli et al. weisen darauf hin, dass bei den stabilen Isotopenverfahren im Gegensatz zu den Studien mit radioaktivem Tracermaterial zum Teil nicht unerhebliche Stoffmengen als Tracermaterial in das zu untersuchende System eingebracht werden. Daher schlagen mehrere Arbeitsgruppen [27,29] vor, die Isotopenanreicherung E durch die Angabe der tatsächlichen Massenverhältnisse von Tracer gegen Tracee (=Z) zu ersetzen. Hierfür gilt:

$$\text{Tracermasse/Traceemasse} = (Q_I(t)+q_I(t)) / (Q_N(t)+q_N(t)) = Z(t)$$

Das Verhältnis  $Z(t)$  von Tracer/Tracee kann unter Kenntnis der Isotopenanreicherungen  $E$  auch folgendermaßen bestimmt werden:

$$Z(t) = E(t) / (E_I - E(t))$$

$E_I$  entspricht der stabilen Isotopenanreicherung des infundierten Tracermaterials über der "natural abundance" und liegt bei der in dieser Arbeit genutzten Traceraminoäure 3D-Leuzin im Bereich von 99,5%. Obige Gleichung wird bei den in dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Berechnung der Tracer/Tracee Werte genutzt. Die im folgenden vereinfachend als "Anreicherungen" beschriebenen Daten entsprechen dem Verhältnis aus Tracer/Tracee [144].

Die Tracer/Tracee-Werte wurden für das jeweilige Protein ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Mittels linearer Regression wurde die Steigung der Kurve berechnet.

Als weiterführender Kinetikparameter wurde für das jeweilige Zielprotein die mittlere Verweildauer (Resident Time, RT) berechnet, die dem Quotienten aus der Plateauanreicherung des Präkursors und der berechneten Steigung der Tracer/Tracee-Kurve entspricht. Die fraktionelle Katabolismusrate (FCR) ergibt sich dann als Kehrwert der so ermittelten mittleren Verweildauer.

Geht man von dem Vorliegen konstanter Plasmaspiegel der Zielproteine, dem sog. "Steady State", aus, so wird pro Zeiteinheit ein bestimmter Teil des Plasmapools katabolisiert, der in äquivalenter Menge durch eine entsprechende Syntheseleistung pro Zeiteinheit ersetzt wird. Das bedeutet, dass im "Steady State" fraktionelle Katabolismusrate (FCR) und fraktionelle Syntheserate (FSR) gleich groß sind.



Die Produktionsrate (PR) als weiterer essentieller Kinetikparameter lässt sich anhand der folgenden Formel berechnen:

$$PR = (FSR \times C \times V) / KG,$$

wobei FSR der fraktionellen Katabolismusrate, C der Plasmakonzentration des Zielproteins, V dem Plasmavolumen und KG dem Körpergewicht entspricht [144]. Das Plasmavolumen wurde mit 4% des Körpergewichtes angenommen.

### **2.14 Statistische Analyse**

Die Daten wurden mit einem parametrischen t-Test für verbundene Stichproben bzw. einem nichtparametrischen Wilcoxon Rangtest analysiert. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert kleiner 0,05 angenommen. Diese Analysen wurden mittels der Software SPSS für Windows durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeines

Das Alter der Probanden lag zwischen 26 und 54 Jahren. Der BMI der Probanden lag zwischen 20,8 und 30 kg/m<sup>2</sup>. Die Werte für die einzelnen Probanden sind in Tabelle 8 dargestellt.

Lifibrol wurde von den Studienteilnehmern gut vertragen. Es kam unter der Einnahme von Lifibrol bei keinem der Probanden zu schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen und auch zu keinen klinisch relevanten Änderungen der Sicherheitslaborparameter, die Therapie musste bei keinem Patienten abgebrochen werden.

Die Daten für die ApoB-100-Kinetik des Probanden WH waren wegen technischer Probleme nicht auswertbar. Die Auswertung der ApoB-100-Kinetik bezieht sich daher auf insgesamt 9 Probanden, während die Auswertung der Apo-A-I-Kinetik alle 10 Probanden einschließt.

### 3.2 Lipidprofil

Die Konzentrationen der Serumlipide und der Apolipoproteine vor und während der Einnahme von Lifibrol sind in Tabelle 22 für die beiden Probandengruppen sowie für alle Teilnehmer zusammengefasst dargestellt. Im Anhang (Tabelle 27) sind in die entsprechenden Werte für die einzelnen Studienteilnehmer aufgeführt. Unter der Therapie mit Lifibrol kam es insgesamt zu einem Absinken des Gesamtcholesterins um 16% (von 346 ± 83 mg/dl auf 297 ± 88 mg/dl, p = 0,019). In der Gruppe der Probanden mit Hyperlipidämie IIa stieg die Serumkonzentration der Triglyzeride um 4% an (von 132 ± 39 mg/dl auf 137 ± 14 mg/dl, nicht signifikant), während es in der Gruppe der Probanden mit Hyperlipidämie Typ IIb zu einem Absinken der Triglyzeridkonzentration um 34% kam (von 271 ± 98 mg/dl auf 179 ± 62 mg/dl, nicht signifikant). Die mittlere Konzentration des LDL-Cholesterins sank unter Lifibrol-Einnahme bei allen

Patienten um 17% (von  $284 \pm 85$  mg/dl auf  $235 \pm 91$  mg/dl,  $p=0,010$ ). Die mittlere Konzentration des HDL-Cholesterins blieb weitgehend unverändert (nicht signifikanter Anstieg um 4% von  $38,7 \pm 11,2$  mg/dl auf  $40,4 \pm 10,1$  mg/dl).

**Tabelle 22: Zusammenfassung des Lipidprofils für die beiden Gruppen der Probanden mit Hyperlipidämie IIa bzw. IIb sowie Gesamtauswertung aller Probanden.** Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung. Die mit einem Sternchen (\*) markierten Veränderungen sind signifikant ( $p<0,05$ ). Abkürzungen: Vor = vor Therapie mit Lifibrol, Während = unter Therapie mit 450 mg/d Lifibrol, %  $\Delta$  = prozentuale Veränderung.

Parameter	Zeitpunkt	HLP-Typ nach Fredrickson		Alle
		IIa	IIb	
Gesamtcholesterin (mg/dl)	Vor	$344 \pm 99$	$359 \pm 72$	$346 \pm 83$
	Während	$304 \pm 90$	$297 \pm 95$	$297 \pm 88$
	% $\Delta$	-9	-19	-14*
Triglyzeride (mg/dl)	Vor	$132 \pm 39$	$271 \pm 98$	$201 \pm 102$
	Während	$137 \pm 14$	$179 \pm 62$	$158 \pm 48$
	% $\Delta$	+4	-34	-21
LDL-Cholesterin (mg/dl)	Vor	$270 \pm 102$	$269 \pm 92$	$270 \pm 91$
	Während	$235 \pm 97$	$217 \pm 96$	$226 \pm 91$
	% $\Delta$	-13	-19	-16*
HDL-Cholesterin (mg/dl)	Vor	$39,8 \pm 11,9$	$37,6 \pm 11,8$	$38,7 \pm 11,2$
	Während	$44,8 \pm 7,8$	$36,0 \pm 11,0$	$40,4 \pm 10,1$
	% $\Delta$	+13	-4	+4

### 3.3 ApoB-100-Kinetik

Die Apo-B-100-Kinetikdaten des Probanden WH waren aus technischen Gründen nicht auswertbar. Daher bezieht sich diese Auswertung nur auf die übrigen neun Probanden.

Unter der Therapie mit Lifibrol kam es zu einer Reduktion des Gesamtcholesterins um 16% ( $p=0,012$ ). Die Triglyzeridkonzentration stieg in der Gruppe der Probanden mit Hyperlipidämie Typ IIa um 11% an (nicht signifikant), während es in der Gruppe der Probanden mit Hyperlipidämie Typ IIb zu einem Absinken um 34% kam (nicht signifikant). Die Konzentration des HDL-Cholesterins blieb nahezu unverändert (+4%, nicht signifikant). Die Konzentration des LDL-ApoB-100 sank unter dem Einfluss von Lifibrol um 19% ( $p=0,011$ ). In Tabelle 23 sind die berechneten Kinetik-Parameter für alle Probanden und die beiden Untergruppen dargestellt. Die Ergebnisse der einzelnen Probanden sind im Anhang (Tabelle 28, Tabelle 29, Tabelle 30) dargestellt. Insgesamt betrachtet kam es zu keinen signifikanten Veränderungen der Produktionsraten (PR) und fraktionellen Katabolismusraten (FCR) des VLDL-ApoB-100 sowie der PR des IDL-ApoB-100. In der Subgruppenanalyse zeigte sich aber bei den Probanden mit Hyperlipidämie Typ IIb ein hochsignifikanter Anstieg der FCR des IDL-ApoB-100. Hierdurch bedingt zeigte sich in der Analyse der Daten aller Patienten ein Anstieg der FCR des IDL-ApoB-100 um 28%, der jedoch das Signifikanzniveau von 0,05 verfehlte ( $p=0,091$ ).

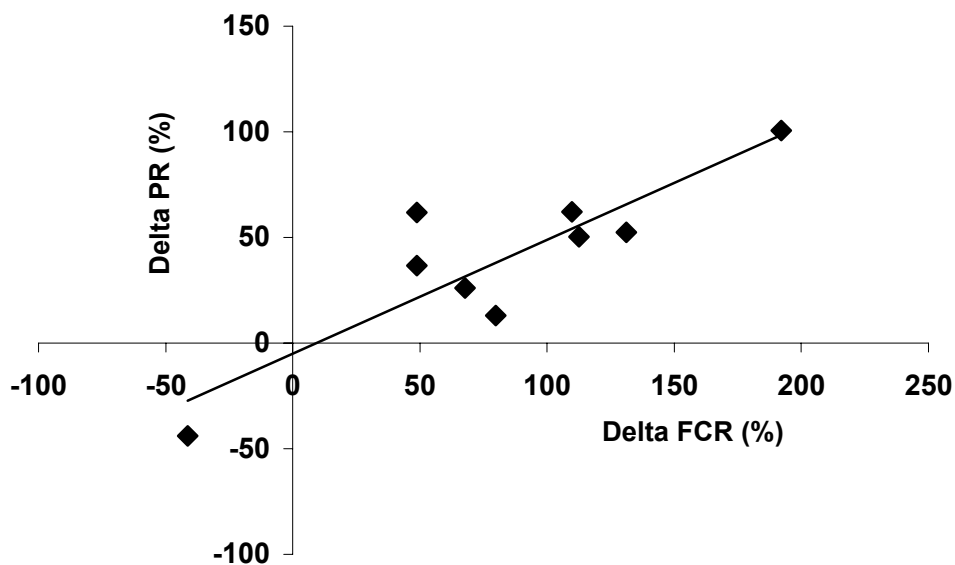
Die FCR des LDL-ApoB-100 stieg im Durchschnitt aller Probanden um 75% während der Behandlung mit Lifibrol an. Dieser Anstieg war statistisch hochsignifikant ( $p=0,006$ ). Einer der neun Probanden zeigte allerdings ein Absinken der LDL-ApoB-100-FCR unter Lifibrol-Therapie (Proband GL). Dieser Proband war, wie eine Analyse des Plasmaspiegels von Lifibrol zeigte, compliant. Die PR des LDL-ApoB-100 stieg im Durchschnitt aller Probanden unter Lifibrol-Therapie um 33% an, auch diese Veränderung war statistisch signifikant ( $p=0,041$ ). Auch hier zeigte der Proband GL entgegen dem generellen Trend ein Absinken der LDL-ApoB-100-PR.

**Tabelle 23: Zusammenstellung der Kinetik-Parameter für die VLDL-, IDL- und LDL-ApoB-100-Kinetik.** Statistisch Signifikante Ergebnisse sind mit (\*) gekennzeichnet. Abkürzungen: SD = Standardabweichung, h = Stunde, Vor = vor Therapie mit Lifibrol, Während = unter Therapie mit Lifibrol, %  $\Delta$  = Abweichung in Prozent.

Parameter	Zeitpunkt	HLP-Typ nach Fredrickson		Alle
		Ila	Iib	
VLDL-FCR ± SD (pools/h)	Vor	0.316 ± 0.104	0.152 ± 0.069	0.225 ± 0.018
	Während	0.250 ± 0.120	0.171 ± 0.074	0.206 ± 0.099
	% $\Delta$	-21	+13	+8
VLDL-PR ± SD (mg/kg/h)	Vor	0.994 ± 0.368	0.837 ± 0.294	0.907 ± 0.317
	Während	0.788 ± 0.270	1.298 ± 0.675	1.071 ± 0.572
	% $\Delta$	-21	+55	+18
IDL-FCR ± SD (pools/h)	Vor	0.102 ± 0.099	0.092 ± 0.353	0.097 ± 0.066
	Während	0.102 ± 0.062	0.142 ± 0.026	0.124 ± 0.047
	% $\Delta$	±0	+54	+28
IDL-PR ± SD (mg/kg/h)	Vor	39.8 ± 11.9	37.6 ± 11.8	38.7 ± 11.2
	Während	44.8 ± 7.8	36.0 ± 11.0	40.4 ± 10.1
	% $\Delta$	+13	-4	+4
LDL-FCR ± SD (pools/Tag)	Vor	0.165 ± 0.097	0.141 ± 0.02	0.151 ± 0.062
	Während	0.259 ± 0.193	0.271 ± 0.05	0.265 ± 0.123
	% $\Delta$	+57	+92	+75*
LDL-PR ± SD (mg/kg/Tag)	Vor	10.1 ± 4.13	9.89 ± 4.25	9.97 ± 3.93
	Während	11.5 ± 4.58	14.61 ± 5.65	13.23 ± 5.15
	% $\Delta$	+14	+48	+33*

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen den prozentualen Veränderungen der PR und FCR des LDL-ApoB-100, so zeigt sich eine hohe

Korrelation. Mittels linearer Regressionsanalyse lässt sich ein Korrelationskoeffizient von  $r=0,873$  berechnen (vgl. Abbildung 8).



**Abbildung 8: Graphische Darstellung des Zusammenhangs der prozentualen Veränderungen der LDL-ApoB-100-PR (=Delta PR (%)) und der LDL-ApoB-100-FCR (Delta FCR (%)) bei den einzelnen Probanden. Die lineare Regressionsanalyse zeigt eine positive Korrelation ( $r=0,873$ ), die Regressionsgerade ist mit angezeigt.**

### 3.4 ApoA-I-Kinetik

Zur Auswertung der ApoA-I-Kinetik konnten die Daten aller 10 Probanden herangezogen werden. Insgesamt betrachtet kam es unter der Therapie mit Lifibrol zu einem Ansinken des Gesamtcholesterins um 14% ( $p=0,019$ ). Die Triglyzeridkonzentration sank in der Gruppe der Probanden mit Hyperlipidämie Typ IIb um 34% (nicht signifikant), während sie in der Gruppe der Probanden mit Hyperlipidämie Typ IIa nahezu unverändert blieb (+4%, nicht signifikant). Die LDL-Cholesterin-Konzentration sank um 16% ( $p=0,01$ ). Die Konzentration

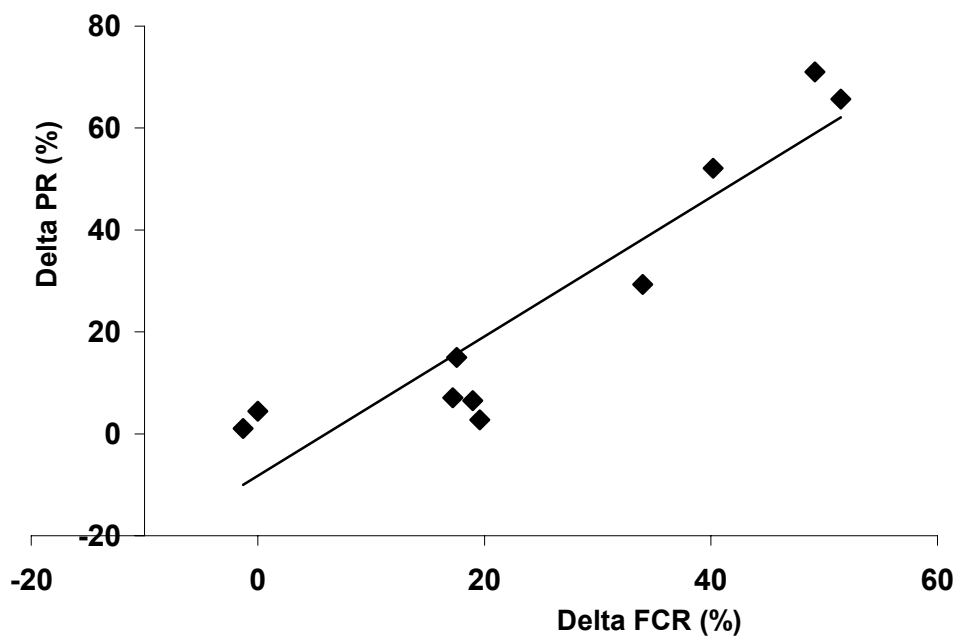
des HDL-Cholesterins blieb unter Lifibrol-Therapie nahezu unverändert (+2%, nicht signifikant).

Die Ergebnisse der Kinetik-Analyse für HDL-ApoA-I sind in Tabelle 24 wiedergegeben. Die Ergebnisse der einzelnen Probanden finden sich im Anhang in Tabelle 31. Ebenfalls im Anhang sind in Abbildung 14 die Werte der fraktionellen Katabolismusrate für die einzelnen Patienten vor und während Therapie mit Lifibrol grafisch veranschaulicht, Abbildung 15 zeigt die gleiche Darstellung für die HDL-ApoA-I-Produktionsraten. Im Durchschnitt aller Probanden zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg sowohl der Produktionsrate (PR) des HDL-ApoA-I (+23%,  $p=0,002$ ) als auch der fraktionellen Katabolismusrate (FCR) des HDL-ApoA-I (+22%,  $p=0,004$ ).

**Tabelle 24: Zusammenstellung der Kinetik-Parameter für die HDL-ApoA-I-Kinetik.** Statistisch Signifikante Ergebnisse sind mit (\*) gekennzeichnet. Abkürzungen: SD = Standardabweichung, Vor = vor Therapie mit Lifibrol, Während = unter Therapie mit Lifibrol, %  $\Delta$  = Abweichung in Prozent

Parameter	Zeitpunkt	HLP-Typ nach Fredrickson		Alle
		Ila	Iib	
HDL-FCR ± SD (pools/Tag)	Vor	0.148 ± 0.02	0.182 ± 0.05	0.165 ± 0.04
	Während	0.177 ± 0.02	0.225 ± 0.07	0.201 ± 0.05
	% $\Delta$	+20	+24	+22*
HDL-PR ± SD (mg/kg/Tag)	Vor	8.04 ± 1.76	9.51 ± 2.63	8.78 ± 2.25
	Während	9.53 ± 1.61	12.01 ± 3.22	10.8 ± 2.73
	% $\Delta$	+19	+26	+23*

Betrachtet man den Zusammenhang der prozentualen Veränderung der FCR und der PR des HDL-ApoA-I mittels linearer Regressionsanalyse, so zeigt sich eine hohe positive Korrelation dieser Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,942$  (vgl. Abbildung 9).



**Abbildung 9: Graphische Darstellung der Abhängigkeit prozentualen Veränderungen der ApoA-I PR (Delta PR(%)) und der ApoA-I FCR (Delta FCR (%)) bei den einzelnen Probanden. Die lineare Regressionsanalyse ergibt einen Korrelationskoeffizienten von  $r=0,948$ , die Regressionsgerade ist mit angezeigt.**



## 4 Diskussion

Lifibrol ist ein neuartiger Wirkstoff mit lipidsenkender Wirkung. In zahlreichen Voruntersuchungen konnte die effektive Reduktion des Cholesterins, des LDL-Cholesterins und des ApoB bei gesunden Individuen [48] und bei Patienten mit verschiedenen Arten von Hyperlipidämien [71,114,137] gezeigt werden.

Der genaue Wirkmechanismus von Lifibrol ist bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt [142]. Scharnagl et al. konnten zeigen, dass Lifibrol ein eher schwacher Inhibitor der HMG-CoA-Synthase ist [108]. Dieses Enzym kontrolliert einen der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Mevalonat-Synthese. Es wurde auch die Wirkung von Lifibrol auf ein weiteres Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, untersucht [107]. Auch hier zeigte sich eine nur schwache Suppression der Enzymaktivität, so dass die hemmende Wirkung von Lifibrol auf die zelluläre Cholesterinbiosynthese im ganzen die deutliche Senkung des Cholesterins nicht erklären kann. Das Ausmaß der Stimulation der Expression von LDL-Rezeptoren unter dem Einfluss von Lifibrol ist erheblich größer, als es durch die Hemmung der Cholesterinbiosynthese zu erwarten wäre [108,142].

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um zwei Fragen nachzugehen:

1. Ist die Hauptwirkung von Lifibrol durch eine erhöhte in-vivo-clearance von LDL aus dem Plasma zu erklären?
2. Welche Effekte hat Lifibrol auf den in-vivo-Stoffwechsel von HDL, und sind hierdurch ergänzende positive Effekte hinsichtlich der antiatherogenen Potenz zu postulieren?

Lifibrol wurde in einer Dosierung von 450 mg täglich verabreicht. In die Untersuchung eingeschlossen wurden Patienten mit einer Hyperlipidämie vom Typ IIa und IIb nach Fredrickson. In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Lifibrol die Serumtriglyzeride bei Patienten mit Ausgangskonzentrationen von mehr als 200 mg/dl um 10-20% senkt, während

die Senkung bei Patienten mit Ausgangskonzentrationen über 200 mg/dl mit 20-30% deutlich höher ausfällt. Bei diesen Patienten mit Hyperlipidämie Typ IIb wurde die maximale Absenkung nach 10 Wochen erreicht, während bei Patienten mit Hyperlipidämie IIa bereits nach vierwöchiger Therapie alle Lipidparameter auf stabile Werte abgesunken waren [71]. Angesichts dieser Ergebnisse wurde die Therapiedauer für diese Untersuchung auf 4 Wochen für Patienten mit Typ IIa Hyperlipidämie und 12 Wochen für Patienten mit Typ IIb Hyperlipidämie festgelegt.

Die in dieser Untersuchung beobachteten Veränderungen der absoluten Konzentrationen von Gesamtcholesterin (-16%), LDL-Cholesterin (-17%) und Apolipoprotein B (-19%) sind in ihrer Größenordnung mit den Ergebnissen von früheren Studien vergleichbar. In der Gruppe der Patienten mit Hyperlipidämie Typ IIa kam es erwartungsgemäß zu keinen nennenswerten Veränderungen der initial schon niedrigen Triglyzeridkonzentration, während es in der Gruppe der Patienten mit Hyperlipidämie IIb zu einer durchschnittlichen Reduktion um 34% kam.

#### **4.1 ApoB-100-Kinetik**

Eine der entscheidendsten Beobachtungen in dieser Untersuchung ist der Anstieg der fraktionellen Katabolismusrate von ApoB-100 unter Lifibrol-Therapie um 75%. Um auszuschließen, dass diese Veränderung durch die Verwendung eines ungeeigneten Modells zur Interpretation der Isotopenanreicherung und Berechnung der Kinetikparameter vorgetäuscht wird, wurden die Daten unter der Verwendung von verschiedenen in der Literatur beschriebenen Modellen [3,66,78,88] analysiert. Hier zeigte sich, dass die unterschiedlichen Modelle gleiche Ergebnisse lieferten und der Einfluss von Lifibrol auf die FCR von ApoB-100 in sämtlichen verwendeten Modellen gleich stark ausgeprägt ist.

Vergleicht man das Ergebnis dieser Untersuchung mit den Effekten anderer lipidsenkender Medikamente auf den Stoffwechsel ApoB-haltiger Lipoproteine,

so zeigen sich teilweise klare Differenzen, aber auch einige Gemeinsamkeiten. Die Wirkung von Lifibrol läßt sich eindeutig von der Wirkung des Fibrinsäurederivats Gemfibrozil bei Patienten mit Typ IV Hyperlipidämie unterscheiden, wo eine Erniedrigung der FCR des LDL-ApoB-100 ( $0,58 \pm 0,05$  vs.  $0,38 \pm 0,06$  Pools/Tag, -35%,  $p=0,001$ ) und der Produktionsrate ( $22,1 \pm 2,0$  vs.  $16,7 \pm 1,1$  mg/kg/Tag, -23%,  $p=0,012$ ) beobachtet wurde [133]. Vega et al. untersuchten mittels radioaktivem Tracer in zwei Studien den Einfluss der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren Lovastatin [134] und Pravastatin [136] auf den Lipidstoffwechsel von Patienten mit nephrotischem Syndrom bzw. mittelschwerer Hypercholesterinämie. In diesen beiden Untersuchungen zeigte sich übereinstimmend eine Reduktion des LDL-Cholesterins, die bei nahezu unveränderter LDL ApoB-100-FCR ( $0,28 \pm 0,06$  vs.  $0,26 \pm 0,02$  Pools pro Tag [134] bzw.  $0,26 \pm 0,4$  vs.  $0,30 \pm 0,04$  Pools pro Tag [136]) hauptsächlich auf einer Reduktion der LDL ApoB-100-Produktion beruhte ( $18,6 \pm 6,1$  vs.  $12,6 \pm 6,7$  mg/kg/Tag, -32% [134], bzw.  $12,2 \pm 6,1$  vs.  $10,5 \pm 2,6$  mg/kg/Tag, -14% [136]). Aguilar-Salinas et al. konnten ähnliche Ergebnisse mit stabilen Isotopen zeigen [2]: Bei Patienten mit nephrotischem Syndrom kam es unter Therapie mit Lovastatin zu einem deutlichen Abfall des LDL-Cholesterins, der hauptsächlich auf einer Inhibition der LDL-ApoB-100-Produktion aus VLDL beruhte ( $25,7 \pm 7,3$  vs.  $16,5 \pm 4,8$  mg/kg/Tag, -35%), während die Abbaurrate des LDL sich kaum veränderte ( $0,526 \pm 0,21$  vs.  $0,428 \pm 0,22$  Pools pro Tag). Gaw et al. untersuchten den Effekt von Simvastatin auf den Stoffwechsel des ApoB bei Patienten mit mittelschwerer Hypercholesterinämie mittels radioaktiver Tracersubstanz [42]. Sie konnten zeigen, dass die Verminderung des LDL ApoB durch eine reduzierte Synthese (direkte LDL-Synthese  $161 \pm 41$  vs.  $139 \pm 31$  mg/Tag) kombiniert mit einem verstärkten Katabolismus (LDL-ApoB-FCR  $0,24 \pm 0,02$  vs.  $0,32 \pm 0,06$  Pools/Tag) zustande kommt, wobei die verminderte Synthese den Hauptfaktor darstellte.

Alle bisher aufgeführten Studien mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren stellen somit die erniedrigte LDL ApoB-100-Produktionsrate als Hauptmechanismus für

die verminderte LDL-Konzentration unter Therapie dar. Zwei andere Studien liefern jedoch gegensätzliche Ergebnisse und zeigen unter Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren einen gesteigerten LDL-Katabolismus als Ursache für erniedrigte LDL-Konzentrationen. In einer Untersuchung bei Patienten mit kombinierter Hyperlipidämie konnte mittels radioaktiver Tracertechnik unter Therapie mit Lovastatin ein Anstieg der FCR des LDL ApoB um 34% gezeigt werden ( $0,44 \pm 0,04$  vs.  $0,59 \pm 0,05$  Pools/Tag,  $p < 0,001$ ), während die Produktionsrate des LDL ApoB sich nicht veränderte ( $19,9 \pm 2,2$  vs.  $18,4 \pm 1,8$  mg/kg/Tag, -7,5%, nicht signifikant) [135]. Parhofer et al. beobachteten bei vergleichbaren Patienten unter Pravastatin-Therapie mittels stabiler Isotopentechnik ähnliche Ergebnisse [89]: Die LDL ApoB-FCR stieg um 24% an ( $0,37 \pm 0,09$  vs.  $0,46 \pm 0,10$  Pools/Tag,  $p < 0,01$ ), während die LDL-Produktionsrate unverändert blieb ( $35,2 \pm 11,9$  vs.  $25,8 \pm 8,7$  mg/kg/Tag, nicht signifikant).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit konnten von Vega et al. bei Patienten mit Hyperlipidämie mittels radioaktiver in-vivo-Kinetik-Technik teilweise bestätigt werden [137]. Vega et al. untersuchten 11 Patienten mit moderater Hypercholesterinämie in einem crossover-Design mit jeweils 8 Wochen mit 600 mg Lifibrol täglich oder Plazebo. Im Anschluss daran erfolgte die 8wöchige Behandlung mit Plazebo oder Lifibrol je nach Randomisierungssequenz. Die Probanden wurden jeweils am Ende der jeweiligen Behandlungssequenz einer radioaktiven in-vivo-Kinetik-Untersuchung unterzogen. Hierzu wurde den Probanden Blut entnommen, die LDL-Fraktion isoliert und durch Zugabe von radioaktivem Jod-125 markiert. Nach Waschung und steriler Aufbereitung erfolgte dann die Reinfusion dieses exogen markierten autologen LDL. Vega et al. zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg der LDL-ApoB100-FCR unter Lifibroltherapie um 20% von  $0,25 \pm 0,05$  auf  $0,30 \pm 0,04$  Pools pro Tag, wobei diese Änderung deutlich unter den von uns gemessenen Werten lag. Die Produktionsrate für LDL-ApoB beträgt bei Vega et al. unter Plazebo  $10,5 \pm 2,9$  mg/kg/Tag und sinkt unter Therapie mit Lifibrol um 11,4% auf  $9,3 \pm 2,4$  mg/kg/Tag ab, was im Gegensatz

zu den Ergebnissen unserer Arbeit statistisch nicht signifikant ist. Eine mögliche Ursache dieser divergenten Ergebnisse ist auf die unterschiedlichen zur Anwendung kommenden Techniken hinzuweisen. Die Bestimmung der in-vivo-Kinetik-Parameter mittels radioaktiver Isotope wird in der Literatur kontrovers diskutiert [34,104], wobei jedoch insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen radioaktiven Tracerstudien und simultan durchgeführten stabilen Isotopenstudien gesehen wurde [53]. Möglicherweise liegt die wesentliche Ursache für den Unterschied zwischen den von Vega et al. erhobenen und unseren eigenen Daten in den unterschiedlichen Studienprotokollen. So betrug die Dosierung von Lifibrol in unserer Studie 450 mg über 4 bzw. 12 Wochen gegenüber 600 mg über 8 Wochen bei Vega et al.. Es ist vorstellbar, dass die Therapiedauer in der Studie von Vega et al. mit 8 Wochen zumindest für einen Teil der Patienten noch zu kurz war und keine maximale Senkung erzielt wurde. Des Weiteren wurden unsere Daten unter Fastenbedingungen erhoben, während Vega et al. die Patienten im „fed state“ untersuchten. Möglicherweise wird die von uns beobachtete drastische Hochregulation der LDL-Rezeptoraktivität (ausgedrückt durch den starken Anstieg der FCR) durch exogen zugeführte Nahrungslipide effektiv gedrosselt, was dann zu einer Abbauverzögerung führt und sich in der Studie von Vega et al. in der nur tendenziell erhöhten FCR und dem geringeren Anstieg der PR widerspiegelt.

Zur Übersicht sind in der folgenden Tabelle die unterschiedlichen Studien anhand ihrer Ergebnisse für FCR und PR des LDL-ApoB-100 gegenübergestellt:

**Tabelle 25: Zusammenstellung der Ergebnisse verschiedener in-vivo-Untersuchungen für die Kinetikparameter des LDL-ApoB unter Therapie.**

HLP = Hyperlipoproteinämie, PR = Produktionsrate, FCR = fraktionelle Katabolismusrate, R = exogene Markierung mit radioaktivem Tracer, S = endogene Markierung mit stabilen Isotopen, ↓ = signifikantes Absinken, ↔ = unverändert, ↑ = signifikanter Anstieg.

Medikament	Probanden	Methode	LDL-ApoB	
			PR	FCR
Gemfibrozil [133]	HLP Typ IV	R	↓	↓
Lovastatin [134]	Nephrotisches Syndrom	R	↓	↔
Pravastatin [136]	Mittelschwere HLP	R	↓	↔
Lovastatin [2]	Nephrotisches Syndrom	S	↓	↔
Simvastatin [42]	Mittelschwere HLP	R	↓	↑
Lovastatin [135]	Kombinierte HLP	R	↔	↑
Pravastatin [89]	Kombinierte HLP	S	↔	↑
Lifibrol [137]	Mittelschwere HLP	R	↔	↑
Lifibrol (eigene Daten)	Mittelschwere HLP	S	↑	↑

Der in der vorliegenden Untersuchung beobachtete deutlich verstärkte LDL-Katabolismus unterstützt die durch in-vitro-Daten aufgestellte Hypothese, dass Lifibrol die Expression von LDL-Rezeptoren stimuliert [107]. Es konnte aber bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass der Effekt von Lifibrol auf die endogene Cholesterinbiosynthese verglichen mit dem der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren gering ist [107]. Hieraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass Lifibrol die LDL-Rezeptor-Expression durch eine direktere Stimulation erhöht, als es die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren tun.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, dass die Veränderung der LDL ApoB-100-FCR um einen deutlich höheren Prozentsatz ansteigt, als durch die alleinige Konzentrationsabnahme des LDL ApoB zu erwarten gewesen wäre. Die Erklärung hierfür lässt sich in dem beobachteten Anstieg der LDL ApoB-100-PR um 33% finden. Betrachtet man die einzelnen Patienten, so korreliert dieser

kompensatorische Anstieg der LDL ApoB-100 Produktion eng mit dem Anstieg der LDL ApoB-100-FCR ( $r=0,873$ , vgl. Abbildung 8). Dieser Effekt ist jedoch nicht nur auf Lifibrol beschränkt. In einer anderen Untersuchung konnte bei Patienten mit familiärer kombinierter Hyperlipidämie unter Therapie mit Pravastatin mittels stabiler Isotopentechnik ein vergleichbares Ergebnis beobachtet werden [4]: Es kam zu einem Anstieg der LDL-FCR um 79%, die durch einen Anstieg der LDL-PR um 32% teilkompensiert wurde.

Diese Untersuchung zeigt, dass Lifibrol einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel ApoB-haltiger Lipoproteine hat. Die Veränderungen der Stoffwechselkinetik sind dabei größer, als sich aus den Veränderungen der Plasmaspiegel alleine vermuten lässt. Es ist aus zahlreichen Untersuchungen bekannt, dass die Atherogenität der LDL-Partikel maßgeblich durch oxidative Modifizierung hervorgerufen wird [58]. Das Maß dieser Modifizierung hängt hierbei wesentlich von der Verweildauer der LDL-Partikel im Plasma ab [101]. Es lässt sich daher die Hypothese aufstellen, dass Lifibrol durch die ausgeprägte Veränderung der Stoffwechselfparameter eine stärkere anti-atherogene Potenz besitzt, als man alleine aufgrund der Senkung des absoluten LDL-Cholesterin-Plasmaspiegels vermutet. Der Wirkansatz, dabei die fraktionelle Katabolismusrate zu steigern – anstelle die Produktion zu drosseln – , wäre nach unserem heutigen Verständnis extrem sinnvoll und hocheffektiv zur Reduktion oxidativ modifizierter LDL-Partikel.

#### **4.2 ApoA-I-Kinetik**

Während der Behandlung mit Lifibrol kam es in keiner der beiden Therapiegruppen zu signifikanten Veränderungen der Serumkonzentrationen von HDL-Cholesterin und HDL ApoA-I. Betrachtet man allerdings die Kinetik-Parameter des HDL ApoA-I, so sieht man einen Anstieg der FCR um 22% und einen Anstieg der PR um 23%. Dieser Effekt ist in beiden Therapiegruppen vergleichbar stark ausgeprägt. Da sich die beiden Gruppen mit Ausnahme der Triglyzeridspiegel und deren Veränderung unter Therapie in keinem der übrigen Lipidparameter unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass die

gemeinsame Betrachtung von Patienten mit Typ IIa und Typ IIb Hyperlipidämie keinen Einfluss auf die Interpretation der Veränderung des HDL-Metabolismus hat.

Vergleicht man den Effekt von Lifibrol auf den HDL-Metabolismus mit den Effekten anderer lipidsenkender Medikamente, so zeigen sich einige interessante Aspekte. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die grundsätzliche Regulation der ApoA-I-Plasmakonzentration hauptsächlich über Veränderungen der Katabolismusrate erfolgt [18,100]: Brinton et al. verglichen bei Patienten mit erniedrigtem und normalem HDL-Cholesterin die in-vivo-Kinetik für HDL-ApoA-I [18]. Die Probanden mit niedrigem HDL-Cholesterin hatten signifikant erhöhte Werte für die HDL-ApoA-I-FCR ( $0,313 \pm 0,052$  vs.  $0,245 \pm 0,043$  Pools/Tag), während die HDL-ApoA-I-Produktionsraten vergleichbar waren ( $2,15 \pm 0,57$  vs.  $1,83 \pm 0,48$  mg/kg/Tag). Schaefer et al. zeigten in ihrer Arbeit [100], dass bei gesunden Probanden die Höhe des HDL-ApoA-I im Plasma mit der fraktionellen Katabolismusrate negativ korrelierte, nicht aber mit der Produktionsrate. Im Gegensatz hierzu zeigten Saku et al. bei 6 Patienten mit primärer Hyperchylomikronämie (Hyperlipidämie Typ V), dass es unter Therapie mit Gemfibrozil zu einem Anstieg der ApoA-I-PR um 27% kommt ( $12,07 \pm 0,40$  vs.  $15,24 \pm 0,49$  mg/kg/Tag), während die ApoA-I-FCR unverändert bleibt ( $0,384 \pm 0,019$  vs.  $0,377 \pm 0,020$  Pools/Tag) [99]. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in vitro eine Stabilisierung von ApoA-I mRNA unter dem Einfluss von Gemfibrozil zeigen, was als Resultat eine Steigerung der Produktion von HDL ApoA-I bewirkte [56]. Ähnliche Beobachtungen machten Kayshyap et al. bei sechs Patienten mit HDL-Defizienz bei Hypertriglyzeridämie [57]: Unter Therapie mit Gemfibrozil kam es zu einem signifikanten Anstieg der ApoA-I-PR um 27% ( $11,12$  mg/kg/Tag vs.  $15,23$  mg/kg/Tag), während die ApoA-I-FCR unverändert blieb. Unter der Therapie mit Fenofibrat beobachteten Malmendier et al. allerdings etwas andere Effekte [76]. Bei 5 Patienten mit heterozygotem LDL-Rezeptordefekt kam es unter Fenofibrat zu einem signifikanten Anstieg der HDL ApoA-I-Konzentration um 20%. Als Ursache hierfür konnte in der Kinetik-Analyse ein Anstieg der HDL ApoA-I-Produktionsrate um 49% nachgewiesen



werden ( $13,2 \pm 1,8$  vs.  $19,7 \pm 2,1$  mg/kg/Tag), der durch einen Anstieg der HDL ApoA-I-FCR um 26% ( $0,222 \pm 0,031$  vs.  $0,272 \pm 0,016$  Pools/Tag)

teilkompensiert wurde. Eine Untersuchung unserer eigenen Arbeitsgruppe

zeigte unter dem Einfluss von Pravastatin bei gesunden Probanden und einem KHK-Patienten ebenfalls einen Anstieg der HDL ApoA-I-PR (Gesunde

Probanden:  $10,8 \pm 2,1$  vs.  $12,5 \pm 1,5$  mg/kg/Tag, KHK-Patient 10,6 vs. 13,1

mg/kg/Tag) sowie der HDL ApoA-I-FCR (Gesunde Probanden:  $0,194 \pm 0,02$  vs.  $0,204 \pm 0,02$  Pools/Tag, KHK-Patient 0,219 vs. 0,267 Pools/Tag) [106].

Zur besseren Übersicht sind in der folgenden Tabelle alle o.g. Studien

nochmals hinsichtlich der Veränderung von HDL-ApoA-I-PR und -FSR einander gegenübergestellt:

**Tabelle 26: Zusammenstellung der Ergebnisse verschiedener in-vivo-Untersuchungen für die Kinetikparameter des HDL-ApoA-I unter Therapie.**

HLP = Hyperlipoproteinämie, PR = Produktionsrate, FCR = fraktionelle Katabolismusrate, FH = familiäre Hypercholesterinämie, R = exogene Markierung mit radioaktivem Tracer, S = endogene Markierung mit stabilen Isotopen, ↓ = Absinken, ↔ = unverändert, ↑ = Anstieg.

Medikament	Probanden	Methode	HDL-ApoA-I	
			PR	FCR
Pravastatin [106]	Gesunde / KHK	S	↑	(↑)
Gemfibrozil [99]	HLP Typ V	R	↑	↔
Gemfibrozil [57]	HLP Typ IV	R	↑	↔
Fenofibrat [76]	Heterozygote FH	R	↑	↑
Lifibrol (eigene Daten)	Mittelschwere HLP	S	↑	↑

Der in dieser Untersuchung unter dem Einfluss von Lifibrol beobachtete Anstieg der HDL ApoA-I-FCR findet sich nicht in einer Veränderung der HDL ApoA-I-Plasmakonzentration wieder, da der verstärkte Katabolismus durch einen Anstieg der HDL ApoA-I-Produktionsrate nahezu komplett kompensiert wird. Betrachtet man die Veränderung der Kinetik-Parameter bei den einzelnen Studienteilnehmern, so fällt eine hohe Korrelation zwischen der prozentualen Veränderung der FCR und der PR des HDL ApoA-I auf ( $r=0,948$ , vgl. Abbildung

9). Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchung ist daher, dass Lifibrol deutliche Effekte auf den Stoffwechsel der ApoA-I-haltigen Lipoproteine hat, die sich bei alleiniger Betrachtung der Plasmaspiegel von Apo A-I der Beobachtung entziehen.

In zahlreichen Untersuchungen konnte die Rolle des HDL als Effektor des reversen Cholesterintransportes und sein daraus resultierender protektiver Effekt gegen die Atherosklerose gezeigt werden (Übersichten bei [17,111]). Die Plasmaspiegel von HDL-Cholesterin und ApoA-I werden hauptsächlich über die Abbaurate des ApoA-I reguliert [93]. Man kann daher von diesem Punkt ausgehend vermuten, dass nicht die absoluten Plasmaspiegel von HDL-Cholesterin und ApoA-I, sondern vielmehr die Stoffwechselfynamik des HDL die Rolle dieses Partikels im reversen Cholesteroltransport und so letztlich auch seine protektive Potenz gegen die Atherosklerose und ihre Folgen bestimmt. Hierzu passen auch die Beobachtungen, die bei Patienten mit genetischen Defekten des HDL-Metabolismus gemacht wurden [21,38,52]. Mutationen des ApoA-I, die als Folge eine gestörte Synthese des ApoA-I haben, sind mit dem erhöhten Risiko einer Atherosklerose assoziiert [111]. Im Gegensatz dazu wurde bei Mutationen mit verstärktem Katabolismus des ApoA-I keine gehäufte Ausbildung einer Atherosklerose beobachtet [141]. Diese Beobachtungen werden durch die Ergebnisse von tierexperimentellen Studien unterstützt. So konnte am Kaninchen gezeigt werden, dass die Infusion von autologem HDL im Hypercholesterinämiemodell die Entstehung der Atherosklerose verzögert bzw. deren Ausmaß verringert [13,14]. In transgenen Mäusen mit einer Überexpression von humanem ApoA-I-Gen und dadurch stark erhöhten HDL-Plasmaspiegeln ist die Empfindlichkeit zur Entwicklung einer Atherosklerose erheblich reduziert [95]. Eine Erhöhung der Synthese des HDL bzw. ApoA-I, ob durch exogene Zufuhr oder durch erhöhte endogene Synthese, kann also in bestimmten Modellen das Atheroskleroserisiko reduzieren.

Diese aktuelle Untersuchung zeigt, dass Lifibrol zu einer verstärkten Produktion und zu einem gesteigerten Abbau des ApoA-I führt, ohne die absoluten Plasmaspiegel zu verändern. Aus den oben genannten Beobachtungen lässt sich die Hypothese ableiten, dass dieser verstärkte Umsatz von ApoA-I einen

weiteren protektiven Faktor gegen die Entstehung einer Atherosklerose darstellen könnte. Diese Hypothese muss zwar in weiteren Studien sowie an größeren Kollektiven noch bestätigt werden, ist nach unserem heutigen Verständnis jedoch recht attraktiv und könnte in der Entwicklung zukünftiger antiatherogen wirksamer Pharmaka einen zentralen Ansatzpunkt darstellen. Weiterhin sollten die Ergebnisse dieser Arbeit die Frage zur Diskussion stellen, inwieweit heute die alleinige Betrachtung der Änderung der Plasmaspiegel von Zielgrößen einen ausreichenden Einblick in die in vivo-Aktivität eines den Stoffwechsel beeinflussenden Pharmakons gibt. Auch hier bleibt die letztliche Antwort weiteren Studien vorbehalten.

## 5 Zusammenfassung

Lifibrol stellt einen Wirkstoff dar, der seine lipidsenkende Wirkung bereits in mehreren großen Studien unter Beweis gestellt hat [71,114,137]. Die Behandlung mit Lifibrol führt zu einer effektiven Absenkung von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Apolipoprotein B. Das Ausmaß seiner Wirkung ist mit dem der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren vergleichbar [142]. Der genaue Wirkmechanismus von Lifibrol konnte bisher noch nicht geklärt werden [142].

In dieser Untersuchung wurde die Auswirkung von Lifibrol auf die in-vivo-Kinetik des ApoB-100 und des ApoA-I bei 10 Patienten mit Hyperlipidämie vom Typ IIa bzw. IIb nach Fredrickson mittels der stabilen Isotopen-Technik untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Lifibrol vor allem die fraktionelle Katabolismusrate des LDL ApoB deutlich steigert (+75%). Kompensatorisch kommt es zu einem Anstieg der Produktionsrate des LDL ApoB, so dass der absolute Plasmaspiegel von LDL ApoB insgesamt um nur 19% reduziert wird.

Die Plasmaspiegel von HDL und ApoA-I bleiben unter Lifibrol nahezu unverändert, obwohl nachgewiesen werden konnte, dass sich der Stoffwechsel des HDL ApoA-I nachhaltig verändert. So steigt die fraktionelle Katabolismusrate des HDL ApoA-I um 22% an. Dieses wird durch einen Anstieg der Produktionsrate des HDL ApoA-I um 23% jedoch nahezu komplett kompensiert.

Wie diese Ergebnisse zeigen, handelt es sich bei Lifibrol um einen potenten lipidsenkenden Wirkstoff. Diese Untersuchung zeigt, dass Lifibrol seine LDL-senkende Wirkung hauptsächlich über einen Anstieg des LDL-Katabolismus bewirkt und nicht über eine Reduktion der hepatischen LDL-Synthese. Die Stimulation der LDL-Rezeptoren scheint hierbei, wie Beobachtungen aus anderen Untersuchungen nahelegen [16,108], nicht wie bei den HMG-CoA-

Reduktase-Inhibitoren über eine Verminderung der Cholesterinbiosynthese zu erfolgen, sondern durch eine eher direkte Aktivierung zustande zu kommen. Wie dieser Mechanismus im einzelnen funktioniert, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Die Tatsache, dass die Veränderung des LDL-Stoffwechsels durch die alleinige Betrachtung der Plasmaspiegel von LDL-Cholesterin und ApoB in seinem gesamten Ausmaß nicht erfasst wird, demonstriert nachhaltig den Stellenwert von in-vivo-Kinetik-Untersuchungen in der Analyse komplexer Stoffwechselfvorgänge. Noch deutlicher wird dieser Aspekt bei der Betrachtung des HDL-Metabolismus. Hier ist nur durch die Kinetik-Analyse der Nachweis erbracht worden, dass Lofibrol den Umsatz von HDL-Partikeln deutlich erhöht, ohne dass sich dies in den Plasmakonzentrationen von HDL und ApoA-I widerspiegelt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adams RF: Determination of amino acid profiles in biological samples by gas chromatography. *J Chromatogr* 1974;95:189-212.

2. Aguilar-Salinas CA, Barrett PH, Kelber J, Delmez J, Schonfeld G: Physiologic mechanisms of action of lovastatin in nephrotic syndrome.

*J Lipid Res* 1995;36:188-199.

3. Aguilar-Salinas CA, Barrett PH, Parhofer KG, Young SG, Tessereau D, Bateman J, Quinn C, Schonfeld G: Apoprotein B-100 production is decreased in subjects heterozygous for truncations of apoprotein B.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:71-80.

4. Aguilar-Salinas CA, Hugh P, Barrett R, Pulai J, Zhu XL, Schonfeld G: A familial combined hyperlipidemic kindred with impaired apolipoprotein B catabolism. Kinetics of apolipoprotein B during placebo and pravastatin therapy.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:72-82.

5. Alaupovic P: Apolipoproteins and lipoproteins.

*Atherosclerosis* 1971;13:141-146.

6. Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ: Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins.

*Biochim Biophys Acta* 1972;260:689-707.

7. Assmann G, Cullen P, Schulte H: The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl A:A2-A11.

8. Assmann G, Schulte H: The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease.

*Am Heart J* 1988;116:1713-1724.

9. Assmann G, Schulte H, Cullen P: New and classical risk factors - the Munster heart study (PROCAM). *Eur J Med Res* 1997;2:237-242.

10. Aufenanger J, Haux P, Weber U, Kattermann R: A specific method for the direct determination of lipoprotein cholesterol in electrophoretic patterns.

*Clin Chim Acta* 1988;177:197-207.

11. Auwerx J, Schoonjans K, Fruchart JC, Staels B: Transcriptional control of triglyceride metabolism: fibrates and fatty acids change the expression of the LPL and apo C-III genes by activating the nuclear receptor PPAR.

*Atherosclerosis* 1996;124 Suppl:S29-S37.

12. Auwerx JH, Babirak SP, Fujimoto WY, Iverius PH, Brunzell JD: Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency.

*Eur J Clin Invest* 1989;19:433-437.

13. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V: Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit.

*J Clin Invest* 1990;85:1234-1241.

14. Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V: High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits.

*Lab Invest* 1989;60:455-461.

15. Beisiegel U, Ameis D, Will H, Greten H: Hypertriglyceridemia and arteriosclerosis. Physiology and pathophysiology of chylomicron catabolism.

*Internist (Berl)* 1995;36:357-361.

16. Bell FP, St John LC: Action of the new hypolipidemic agent lifestatol (K12.148) on lipid homeostasis in normal rats: plasma lipids, hepatic sterogenesis, and the fate of injected [<sup>14</sup>C]acetate.

*Lipids* 1993;28:1079-1085.

17. Breslow JL: Familial disorders of high-density lipoprotein metabolism, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. 1995, pp 2031-2052.

18. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL: Increased apo A-I and apo A-II fractional catabolic rate in patients with low high density lipoprotein-cholesterol levels with or without hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 1991;87:536-544.

19. Brown MS, Goldstein JL: Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:788-792.

20. Brown MS, Goldstein JL: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.

21. Calabresi L, Franceschini G: High density lipoprotein and coronary heart disease: insights from mutations leading to low high density lipoprotein.

*Curr Opin Lipidol* 1997;8:219-224.

22. Calero M, Tokuda T, Rostagno A, Kumar A, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J: Functional and structural properties of lipid-associated apolipoprotein J (clusterin). *Biochem J* 1999;344 Pt 2:375-383.



23. Castelli WP, Anderson K: A population at risk. Prevalence of high cholesterol levels in hypertensive patients in the Framingham Study. *Am J Med* 1986;80:23-32.
24. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB: Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 1986;256:2835-2838.
25. Chiang JY, Miller WF, Lin GM: Regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase in the liver. Purification of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and the immunochemical evidence for the induction of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by cholestyramine and circadian rhythm. *J Biol Chem* 1990;265:3889-3897.
26. Cobelli C, Toffolo G, Bier DM, Nosadini R: Models to interpret kinetic data in stable isotope tracer studies. *Am J Physiol* 1987;253:E551-E564.
27. Cobelli C, Toffolo G, Foster DM: Tracer-to-tracee ratio for analysis of stable isotope tracer data: link with radioactive kinetic formalism. *Am J Physiol* 1992;262:E968-E975.
28. Cohn JS, Wagner DA, Cohn SD, Millar JS, Schaefer EJ: Measurement of very low density and low density lipoprotein apolipoprotein (Apo) B-100 and high density lipoprotein Apo A-I production in human subjects using deuterated leucine. Effect of fasting and feeding. *J Clin Invest* 1990;85:804-811.
29. Colby BN, McCaman MW: A comparison of calculation procedures for isotope dilution determinations using gas chromatography mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1979;6:225-230.
30. Contacos C, Sullivan DR, Rye KA, Funke H, Assmann G: A new molecular defect in the lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) gene associated with fish eye disease. *J Lipid Res* 1996;37:35-44.

31. Cooper AD: Hepatic uptake of chylomicron remnants.  
*J Lipid Res* 1997;38:2173-2192.
32. Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM, Jr.  
Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography.  
*Circulation* 1986;74:758-765.
33. de Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD: Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and hepatic lipase in chylomicron remnant removal by the liver. *J Lipid Res* 1996;37:197-209.
34. Demant T, Packard CJ: Studies of apolipoprotein B-100 metabolism using radiotracers and stable isotopes. *Eur J Pediatr* 1997;156 Suppl 1:S75-S77.
35. Fallon HJ, Woods JW: Response of hyperlipoproteinemia to cholestyramine resin. *JAMA* 1968;204:1161-1164.
36. Fojo SS, Beg O, Dichek H, Brewer HB, Jr. The molecular defects in lipoprotein lipase deficient patients. *Eur J Epidemiol* 1992;8 Suppl 1:59-63.
37. Ford GC, Cheng KN, Halliday D: Analysis of (1-<sup>13</sup>C)leucine and (13C)KIC in plasma by capillary gas chromatography/mass spectrometry in protein turnover studies. *Biomed Mass Spectrom* 1985;12:432-436.
38. Franceschini G: Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. *Eur J Clin Invest* 1996;26:733-746.
39. Frederickson DS, Levy RI, Lees RS: Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders.  
*New Engl J Med* 1967;276:32-44.

40. Fruchart JC: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  Activation and High-Density Lipoprotein Metabolism. *Am J Cardiol* 2001;88:24N-29N.
41. Garland WA, Muccino RR, Min BH, Cupano J, Fann WE: A method for the determination of amitriptyline and its metabolites nortriptyline, 10-hydroxyamitriptyline, and 10-hydroxynortriptyline in human plasma using stable isotope dilution and gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry (GC-CIMS). *Clin Pharmacol Ther* 1979;25:844-856.
42. Gaw A, Packard CJ, Murray EF, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Vallance BD, Lorimer AR, Shepherd J: Effects of simvastatin on apob metabolism and ldl subfraction distribution. *Arterioscler Thromb* 1993;13:170-189.
43. Gofman JW, DeLalla O, Glazier F, Freeman NK, Lindgren FT, Nichols AV, Strisower B, Tamplin AR: The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary heart disease. *Plasma (milano)* 1954;2:413-428.
44. Gofman JW, Lindgren FT, Elliot H: Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* 1949;179:973-978.
45. Goldstein JL, Brown MS: Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 1974;249:5153-5162.
46. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG: Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544-1568.

47. Grundy SM, Mok HY, Zech L, Berman M: Influence of nicotinic acid on metabolism of cholesterol and triglycerides in man. *J Lipid Res* 1981;22:24-36.
48. Hasibeder H, Staab HJ, Seibel K, Heibel B, Schmidle G, Marz W: Clinical pharmacology of the hypocholesterolemic agent K 12.148 (lifibrol) in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40 Suppl 1:S91-S94.
49. Havel RJ, Eder H, Bragdon JH: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-1350.
50. Heller F, Harvengt C: Effects of clofibrate, bezafibrate, fenofibrate and probucol on plasma lipolytic enzymes in normolipaemic subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1983;25:57-63.
51. Hoffmann MM, Scharnagl H, Koster W, Winkler K, Wieland H, Marz W: Apolipoprotein E1 Baden (Arg(180)-->Cys). A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia. *Clin Chim Acta* 2001;303:41-48.
52. Holvoet P, Zhao Z, Deridder E, Dhoest A, Collen D: Effects of deletion of the carboxyl-terminal domain of ApoA-I or of its substitution with helices of ApoA-II on in vitro and in vivo lipoprotein association. *J Biol Chem* 1996;271:19395-19401.
53. Ikewaki K, Rader DJ, Schaefer JR, Fairwell T, Zech LA, Brewer HB, Jr. Evaluation of apoA-I kinetics in humans using simultaneous endogenous stable isotope and exogenous radiotracer methods. *J Lipid Res* 1993;34:2207-2215.

54. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, Mahley RW, Krauss RM, Vega GL, Grundy SM: Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6919-6923.
55. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ: A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999;21:424-428.
56. Jin FY, Kamanna VS, Chuang MY, Morgan K, Kashyap ML: Gemfibrozil stimulates apolipoprotein A-I synthesis and secretion by stabilization of mRNA transcripts in human hepatoblastoma cell line (Hep G2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1052-1062.
57. Kashyap ML, Saku K: HDL metabolism in HDL deficiency associated with familial hypertriglyceridemia: effect of treatment with gemfibrozil. *Adv Exp Med Biol* 1991;285:233-236.
58. Keller C, Zoellner N: Hypercholesterinämien, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart - New York, 1995, pp 145-167.
59. Koo C, Wernette-Hammond ME, Garcia Z, Malloy MJ, Uauy R, East C, Bilheimer DW, Mahley RW, Innerarity TL: Uptake of cholesterol-rich remnant lipoproteins by human monocyte-derived macrophages is mediated by low density lipoprotein receptors. *J Clin Invest* 1988;81:1332-1340.
60. Kostner GM, Klein G, Krempler F: Can serum Lp (a) concentration be lowered by drugs and / or by diet? in Carlson LA, Olsson AG (eds): *Treatment of hyperlipoproteinemia*. Raven:New York, 1984, pp 151-156.

61. Kostner GM, Laggner P: Chemical and physical properties of lipoproteins, in Fruchart JC, Sheperd J (eds): *Human Plasma Lipoproteins*. Walter de Gruyter:Berlin - New York, 1989, pp 23-54.

62. Kostner GM, Maerz W: Zusammensetzung und Stoffwechsel der Lipoproteine, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer Verlag:Stuttgart - New York, 1995, pp 4-41.

63. Kraft HG, Utermann G: Lipoprotein (a), in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart - New York, 1995, pp 250-258.

64. Krause BR, Bousley R, Kieft K, Robertson D, Stanfield R, Urda E, Newton RS: Comparison of lifestrol to other lipid-regulating agents in experimental animals. *Pharmacol Res* 1994;29:345-357.

65. Kroon PA, DeMartino JA, Thompson GM, Chao YS: Molecular cloning of partial cDNAs for rabbit liver apolipoprotein B and the regulation of its mRNA levels by dietary cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:5071-5075.

66. Krul ES, Parhofer KG, Barrett PH, Wagner RD, Schonfeld G: ApoB-75, a truncation of apolipoprotein B associated with familial hypobetalipoproteinemia: genetic and kinetic studies. *J Lipid Res* 1992;33:1037-1050.

67. Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J: The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 1997;38:191-205.

68. Lee MH, Lu K, Patel SB: Genetic basis of sitosterolemia. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:141-149.

69. Levinson SS, Wagner SG: Immunonephelometric/turbidimetric apolipoprotein B assays for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 1993;223:31-42.
70. Lichtenstein AH, Cohn JS, Hachey DL, Millar JS, Ordovas JM, Schaefer EJ: Comparison of deuterated leucine, valine, and lysine in the measurement of human apolipoprotein A-I and B-100 kinetics. *J Lipid Res* 1990;31:1693-1701.
71. Locker PK, Jungbluth GL, Francom SF, Hughes GS, Jr.: Lofibrol: a novel lipid-lowering drug for the therapy of hypercholesterolemia. Lofibrol Study Group. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:73-88.
72. Lopes-Virella MF, Virella G, Evans G, Malenkos SB, Colwell JA: Immunonephelometric assay of human apolipoprotein AI. *Clin Chem* 1980;26:1205-1208.
73. MacKenzie SL, Tenaschuk D: Gas-liquid chromatography of N-heptafluorobutyryl isobutyl esters of amino acids. *J Chromatogr* 1974;97:19-24.
74. Maher V, Sinfuego J, Chao P, Parekh J: Primary prevention of coronary heart disease. What has WOSCOPS told us and what questions remain? West Of Scotland Coronary Prevention Study. *Drugs* 1997;54:1-8.
75. Mahley RW, Ji ZS: Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1999;40:1-16.
76. Malmendier CL, Delcroix C: Effects of fenofibrate on high and low density lipoprotein metabolism in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1985;55:161-169.

77. Marzo A, Ghirardi P, Sardini D, Meroni G: Simplified measurement of monoglycerides, diglycerides, triglycerides, and free fatty acids in biological samples. *Clin Chem* 1971;17:145-147.
78. Maugeais C, Braschi S, Ouguerram K, Maugeais P, Mahot P, Jacotot B, Darmaun D, Magot T, Krempf M: Lipoprotein kinetics in patients with analbuminemia. Evidence for the role of serum albumin in controlling lipoprotein metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1369-1375.
79. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM: cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;330:132-137.
80. Meuffels MT, Hindmarsh JT: Comparison of methods for the measurement of apoproteins A1 and B in serum. *Clin Biochem* 1989;22:339-344.
81. Morrissey C, Lakins J, Moquin A, Hussain M, Tenniswood M: An antigen capture assay for the measurement of serum clusterin concentrations. *J Biochem Biophys Methods* 2001;48:13-21.
82. Murai A, Miyahara T, Fujimoto N, Matsuda M, Kameyama M: Lp(a) lipoprotein as a risk factor for coronary heart disease and cerebral infarction. *Atherosclerosis* 1986;59:199-204.
83. Myant NB, Mitropoulos KA: Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *J Lipid Res* 1977;18:135-153.
84. Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Mueller P, Baggiok G, Seidel D: Improved assessments of lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin Chem* 1977;23:1296-1300.



85. Niederstadt C, Stierle U: Koronare Herzkrankheit, in Stierle U, Niederstadt C (eds): *Klinikleitfaden Kardiologie*. 2nd ed. Urban & Fischer:München - Jena, 1999, pp 195-256.
86. Oram JF: Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:321-330.
87. Orth M, Weng W, Funke H, Steinmetz A, Assmann G, Nauck M, Dierkes J, Ambrosch A, Weisgraber KH, Mahley RW, Wieland H, Luley C: Effects of a frequent apolipoprotein E isoform, ApoE4Freiburg (Leu28-->Pro), on lipoproteins and the prevalence of coronary artery disease in whites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1306-1315.
88. Parhofer KG, Barrett PH, Bier DM, Schonfeld G: Lipoproteins containing the truncated apolipoprotein, Apo B-89, are cleared from human plasma more rapidly than Apo B-100-containing lipoproteins in vivo. *J Clin Invest* 1992;89:1931-1937.
89. Parhofer KG, Barrett PH, Dunn J, Schonfeld G: Effect of pravastatin on metabolic parameters of apolipoprotein B in patients with mixed hyperlipoproteinemia. *Clin Investig* 1993;71:939-946.
90. Pedersen TR, Olsson AG, Faergeman O, Kjekshus J, Wedel H, Berg K, Wilhelmsen L, Haghfelt T, Thorgeirsson G, Pyorala K, Miettinen T, Christophersen B, Tobert JA, Musliner TA, Cook TJ: Lipoprotein changes and reduction in the incidence of major coronary heart disease events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 1998;97:1453-1460.

91. Pedersen TR, Wilhelmsen L, Faergeman O, Strandberg TE, Thorgeirsson G, Troedsson L, Kristianson J, Berg K, Cook TJ, Haghfelt T, Kjekshus J, Miettinen T, Olsson AG, Pyorala K, Wedel H: Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol* 2000;86:257-262.
92. Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, Cohen JC, Cox DR, Fruchart JC, Krauss RM, Rubin EM: An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 2001;294:169-173.
93. Rader DJ, Ikwaki K: Unravelling high density lipoprotein-apolipoprotein metabolism in human mutants and animal models. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:117-123.
94. Richter WO, Schwandt P: Medikamentöse Therapie von Fettstoffwechselstörungen, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart - New York, 1995, pp 599-681.
95. Rubin EM, Krauss RM, Spangler EA, Verstuyft JG, Clift SM: Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI. *Nature* 1991;353:265-267.
96. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J: Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* 1999;341:410-418.

97. Sacks FM, Moye LA, Davis BR, Cole TG, Rouleau JL, Nash DT, Pfeffer MA, Braunwald E: Relationship between plasma LDL concentrations during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial. *Circulation* 1998;97:1446-1452.

98. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E: The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996;335:1001-1009.

99. Saku K, Gartside PS, Hynd BA, Kashyap ML: Mechanism of action of gemfibrozil on lipoprotein metabolism. *J Clin Invest* 1985;75:1702-1712.

100. Schaefer EJ, Zech LA, Jenkins LL, Bronzert TJ, Rubalcaba EA, Lindgren FT, Aamodt RL, Brewer HB, Jr.: Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism. *J Lipid Res* 1982;23:850-862.

101. Schaefer JR: *Präventive Kardiologie. Prophylaxe der koronaren Herzkrankheit*, Schattauer:Stuttgart - New York, 1998.

102. Schaefer JR, Herzum M: Arteriosclerosis and coronary heart disease - strengths and weaknesses in the classical risk factor concept. *Herz* 1998;23:153-162.

103. Schaefer JR, Herzum M, Maisch B: Prevention of coronary heart disease - "evidence-based medicine" of antilipemic therapy. *Herz* 1999;24:3-12.

104. Schaefer JR, Rader DJ, Gregg RE, Fairwell T, Zech LA, Kindt MR, Benson MD, Brewer HB, Jr.: In vivo protein metabolism utilizing stable isotopes and mass spectrometry: a new approach to the study of mutant proteins in humans. *Trans Assoc Am Physicians* 1990;103:187-194.

105. Schaefer JR, Scharnagl H, Baumstark MW, Schweer H, Zech LA, Seyberth H, Winkler K, Steinmetz A, Marz W: Homozygous familial defective apolipoprotein B-100. Enhanced removal of apolipoprotein E-containing VLDLs and decreased production of LDLs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:348-353.
106. Schaefer JR, Schweer H, Ikewaki K, Stracke H, Seyberth HJ, Kaffarnik H, Maisch B, Steinmetz A: Metabolic basis of high density lipoproteins and apolipoprotein A-I increase by HMG-CoA reductase inhibition in healthy subjects and a patient with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1999;144:177-184.
107. Scharnagl H, Maerz W, Wieland H: Lifibrol: first member of a new class of lipid-lowering drugs? *Exp Opin Invest Drugs* 1997;6:583-591.
108. Scharnagl H, Schliack M, Loser R, Nauck M, Gierens H, Jeck N, Wieland H, Gross W, Marz W: The effects of lifibrol (K12.148) on the cholesterol metabolism of cultured cells: evidence for sterol independent stimulation of the LDL receptor pathway. *Atherosclerosis* 2000;153:69-80.
109. Schliack M, Loser R, Seibel K, Blay KH: Hypolipemic activity of K12.148 in rats, marmosets and pigs. *Artery* 1989;16:90-104.
110. Schliack M, Loser R, Seibel K, Rattel B, Lang G: The hypolipidemic effect of lifibrol during a long term treatment of pigs. *Artery* 1990;18:1-15.
111. Schmitz G, Lackner KJ: High-density-Lipoproteine und Arteriosklerose, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart - New York, 1995, pp 119-144.

112. Schonfeld G: The hypobetalipoproteinemias. *Annu Rev Nutr* 1995;15:23-34.
113. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J: Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* 1996;37:907-925.
114. Schwandt P, Elsasser R, Schmidt C, Gertz B, Heil M, Augustin J, Seibel K: Safety and efficacy of lifibrol upon four-week administration to patients with primary hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Pharmacol* 1994;47:133-138.
115. Schweer H, Watzer B, Seyberth HW, Steinmetz A, Schaefer JR: Determination of isotopic ratios of L-leucine and L-phenylalanine and their stable isotope labeled analogues in biological samples by gas chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1996;31:727-734.
116. Shepherd J, Packard CJ, Bicker S, Lawrie TD, Morgan HG: Effect of cholestyramine on low-density lipoproteins. *N Engl J Med* 1980;303:943-944.
117. Sniderman AD, Cianflone K: Hyper-Apo-B und familiäre kombinierte Hyperlipidämie, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart - New York, 1995, pp 182-200.
118. Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ: Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:587-591.

119. Stahlberg D, Reihner E, Rudling M, Berglund L, Einarsson K, Angelin B: Influence of bezafibrate on hepatic cholesterol metabolism in gallstone patients: reduced activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase.

*Hepatology* 1995;21:1025-1030.

120. Stalenhoef AF, Casparie AF, Demacker PN, Stouten JT, Lutterman JA, van 't Laar A: Combined deficiency of apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase in familial hyperchylomicronemia. *Metabolism* 1981;30:919-926.

121. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD: Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA* 1986;256:2823-2828.

122. Strydom HC: Pathologie der Atherosklerose, in Schwandt P, Richter WO (eds): *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. 11th ed. Schattauer:Stuttgart - New York, 1995, pp 48-64.

123. Steinberg D: Underlying mechanisms in atherosclerosis. *J Pathol* 1981;133:75-87.

124. Steinberg D: Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* 1987;76:508-514.

125. Steinberg D: Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J Intern Med* 1993;233:227-232.

126. Steinmetz A, Schaefer JR, Schneider J: *Lipidtherapie*, Schattauer:Stuttgart - New York, 1994.

127. Teng B, Sniderman AD, Soutar AK, Thompson GR: Metabolic basis of hyperapobetalipoproteinemia. Turnover of apolipoprotein B in low density lipoprotein and its precursors and subfractions compared with normal and familial hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1986;77:663-672.
128. The WOSCOPS-Investigators: Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440-1445.
129. Utermann G: Apolipoprotein E mutants, hyperlipidemia and arteriosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 1985;183:173-188.
130. Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C: Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest* 1987;80:458-465.
131. van der Hoek YY, Wittekoek ME, Beisiegel U, Kastelein JJ, Koschinsky ML: The apolipoprotein(a) kringle IV repeats which differ from the major repeat kringle are present in variably-sized isoforms. *Hum Mol Genet* 1993;2:361-366.
132. van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, Levels JH, Reitsma PH, Boers W, Chamuleau RA: Apolipoprotein A-V: a novel lipoprotein associated with an early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 2001;276:44512-44520.
133. Vega GL, Grundy SM: Gemfibrozil therapy in primary hypertriglyceridemia associated with coronary heart disease. Effects on metabolism of low-density lipoproteins. *JAMA* 1985;253:2398-2403.
134. Vega GL, Grundy SM: Lovastatin therapy in nephrotic hyperlipidemia: Effects on lipoprotein metabolism. *Kidney Int* 1988;33:1160-1168.

135. Vega GL, Grundy SM: Influence of lovastatin therapy on metabolism of low density lipoproteins in mixed hyperlipidemia.

*J Intern Med* 1991;230:341-349.

136. Vega GL, Krauss RM, Grundy SM: Pravastatin therapy in primary moderate hypercholesterolaemia: changes in metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Intern Med* 1990;227:81-94.

137. Vega GL, von Bergmann K, Grundy SM, Blumenschein S, Carter NB, Laeis P, Lindenthal B, von Bergmann J, Simatupang A, Lutjohann D, Adams-Huet B: Effect of lifestatin on the metabolism of low density lipoproteins and cholesterol. *J Intern Med* 1999;246:1-9.

138. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G: High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:13-27.

139. Wilhelmsen L, Pyorala K, Wedel H, Cook T, Pedersen T, Kjekshus J: Risk factors for a major coronary event after myocardial infarction in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Impact of predicted risk on the benefit of cholesterol-lowering treatment. *Eur Heart J* 2000;22:1119-1127.

140. Willnow TE: Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance. *Diabet Med* 1997;14 Suppl 3:S75-S80.

141. Winkler K, Schaefer JR, Klima B, Nuber C, Friedrich I, Koster W, Gierens H, Scharnagl H, Soufi M, Wieland H, Maerz W: HDL steady state levels are not affected, but HDL apoA-I turnover is enhanced by Lifestatin in patients with hypercholesterolemia and mixed hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2000;150:113-120.



142. Winkler K, Schaefer JR, Klima B, Nuber C, Sattler A, Friedrich I, Koster W, Steinmetz A, Wieland H, Maerz W: Lofibrol enhances the low density lipoprotein apolipoprotein B-100 turnover in patients with hypercholesterolemia and mixed hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1999;144:167-175.

143. Wolfe RR: *Tracers in Metabolic Research. Radioisotope and Stable Isotope - Mass Spectrometry Methods*, Liss,A.R.: New York, 1984.

144. Wolfe RR: *Radioactive and Stable Isotope Tracers in Biomedicine. Principles and Practice of Kinetic Analysis*, Wiley-Liss: New York, 1992.

145. Zeng BJ, Mortimer BC, Martins IJ, Seydel U, Redgrave TG: Chylomicron remnant uptake is regulated by the expression and function of heparan sulfate proteoglycan in hepatocytes. *J Lipid Res* 1998;39:845-860.

## 7 Anhang

### 7.1 Ergänzende Tabellen

**Tabelle 27: Lipidprofil der einzelnen Probanden vor und während der Therapie mit Lifibrol.** Abkürzungen: CH = Gesamtcholesterin, TGL = Triglyzeride, LDL = LDL-Cholesterin, HDL = HDL-Cholesterin, V = vor Therapie mit Lifibrol, W = während Therapie mit Lifibrol, % = prozentuale Veränderung, Prob = Probandeninitialien.

Prob	CH (mg/dl)			TGL (mg/dl)			LDL (mg/dl)			HDL (mg/dl)		
	V	W	%	V	W	%	V	W	%	V	W	%
<b>Typ IIa: 450 mg Lifibrol für 4 Wochen</b>												
GL	400	392	-2	101	129	+28	340	317	-7	59	57	-3
WM	249	155	-22	81	130	+60	176	126	-28	43	44	+2
LW	414	336	-19	143	147	+3	334	246	-21	34	41	+21
HS	402	347	-7	158	121	-23	357	329	-8	29	36	+24
WH	206	223	+8	175	156	-11	144	139	-3	34	46	+35
<b>Typ IIb: 450 mg Lifibrol für 12 Wochen</b>												
SG	295	215	-27	444	244	-45	152	128	-16	37	43	+16
WS	404	262	-35	246	135	-45	319	208	-35	30	28	-7
CL	267	209	-22	210	156	-26	189	137	-28	58	52	-10
DS	402	438	+9	234	246	+5	337	364	+8	29	28	-3
GS	425	328	-23	220	115	-48	350	246	-30	34	29	-14

**Tabelle 28: Parameter der VLDL ApoB-100 Kinetik der einzelnen Probanden**

Proband	VLDL-FCR $\pm$ SD (pools/h)		VLDL-PR (mg/kg/h)	
	Vor	Während	Vor	während
<b>Typ IIa: 450 mg Lifibrol für 4 Wochen</b>				
GL	0.393 $\pm$ 0.011	0.391 $\pm$ 0.019	0.974	0.970
WM	0.394 $\pm$ 0.118	0.307 $\pm$ 0.004	0.899	1.061
LW	0.174 $\pm$ 0.017	0.155 $\pm$ 0.014	0.611	0.500
HS	0.302 $\pm$ 0.030	0.145 $\pm$ 0.005	1.494	0.621
<b>Typ IIb: 450 mg Lifibrol für 12 Wochen</b>				
SG	0.064 $\pm$ 0.006	0.292 $\pm$ 0.008	0.862	2.348
WS	0.110 $\pm$ 0.012	0.101 $\pm$ 0.003	0.565	1.234
CL	0.157 $\pm$ 0.014	0.137 $\pm$ 0.009	0.515	0.473
DS	0.191 $\pm$ 0.040	0.182 $\pm$ 0.046	1.069	1.115
GS	0.240 $\pm$ 0.058	0.141 $\pm$ 0.014	1.173	1.318

**Tabelle 29: Parameter der IDL ApoB-100 Kinetik der einzelnen Probanden**

Proband	IDL-FCR $\pm$ SD (pools/h)		IDL-PR (mg/kg/h)	
	Vor	Während	Vor	während
<b>Typ IIa: 450 mg Lifibrol für 4 Wochen</b>				
GL	0.133 $\pm$ 0.011	0.083 $\pm$ 0.085	0.630	0.180
WM	0.229 $\pm$ 0.078	0.192 $\pm$ 0.005	0.519	0.708
LW	0.027 $\pm$ 0.001	0.051 $\pm$ 0.001	0.136	0.161
HS	0.019 $\pm$ 0.001	0.083 $\pm$ 0.002	0.137	0.525
<b>Typ IIb: 450 mg Lifibrol für 12 Wochen</b>				
SG	0.066 $\pm$ 0.084	0.133 $\pm$ 0.003	0.404	0.418
WS	0.046 $\pm$ 0.001	0.100 $\pm$ 0.001	0.233	0.587
CL	0.101 $\pm$ 0.003	0.161 $\pm$ 0.055	0.119	0.339
DS	0.124 $\pm$ 0.352	0.164 $\pm$ 0.257	0.238	0.498
GS	0.125 $\pm$ 0.233	0.152 $\pm$ 0.005	0.480	0.293

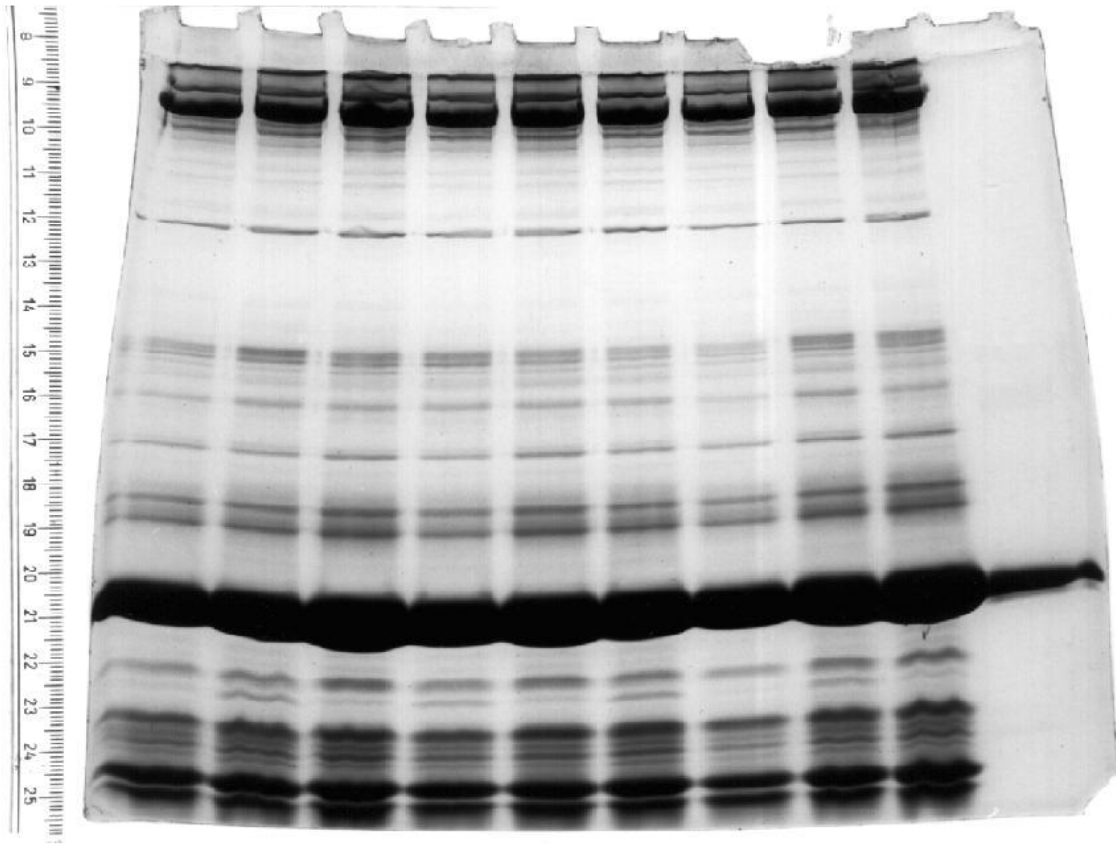
Tabelle 30: Parameter der LDL ApoB-100 Kinetik der einzelnen Probanden

Proband	LDL-FCR $\pm$ SD (pools/Tag)		LDL-PR (mg/kg/Tag)	
	Vor	Während	Vor	während
<b>Typ IIa: 450 mg Lifibrol für 4 Wochen</b>				
GL	0.182 $\pm$ 0.036	0.107 $\pm$ 0.035	13.00	7.28
WM	0.295 $\pm$ 0.030	0.530 $\pm$ 0.005	14.16	16.02
LW	0.092 $\pm$ 0.005	0.137 $\pm$ 0.006	5.74	7.84
HS	0.089 $\pm$ 0.006	0.260 $\pm$ 0.007	7.41	14.87
<b>Typ IIb: 450 mg Lifibrol für 12 Wochen</b>				
SG	0.159 $\pm$ 0.168	0.338 $\pm$ 0.006	6.93	10.41
WS	0.109 $\pm$ 0.005	0.252 $\pm$ 0.005	8.20	12.50
CL	0.142 $\pm$ 0.006	0.298 $\pm$ 0.043	5.55	9.00
DS	0.139 $\pm$ 0.084	0.207 $\pm$ 0.081	13.51	21.88
GS	0.155 $\pm$ 0.112	0.260 $\pm$ 0.009	15.25	19.24

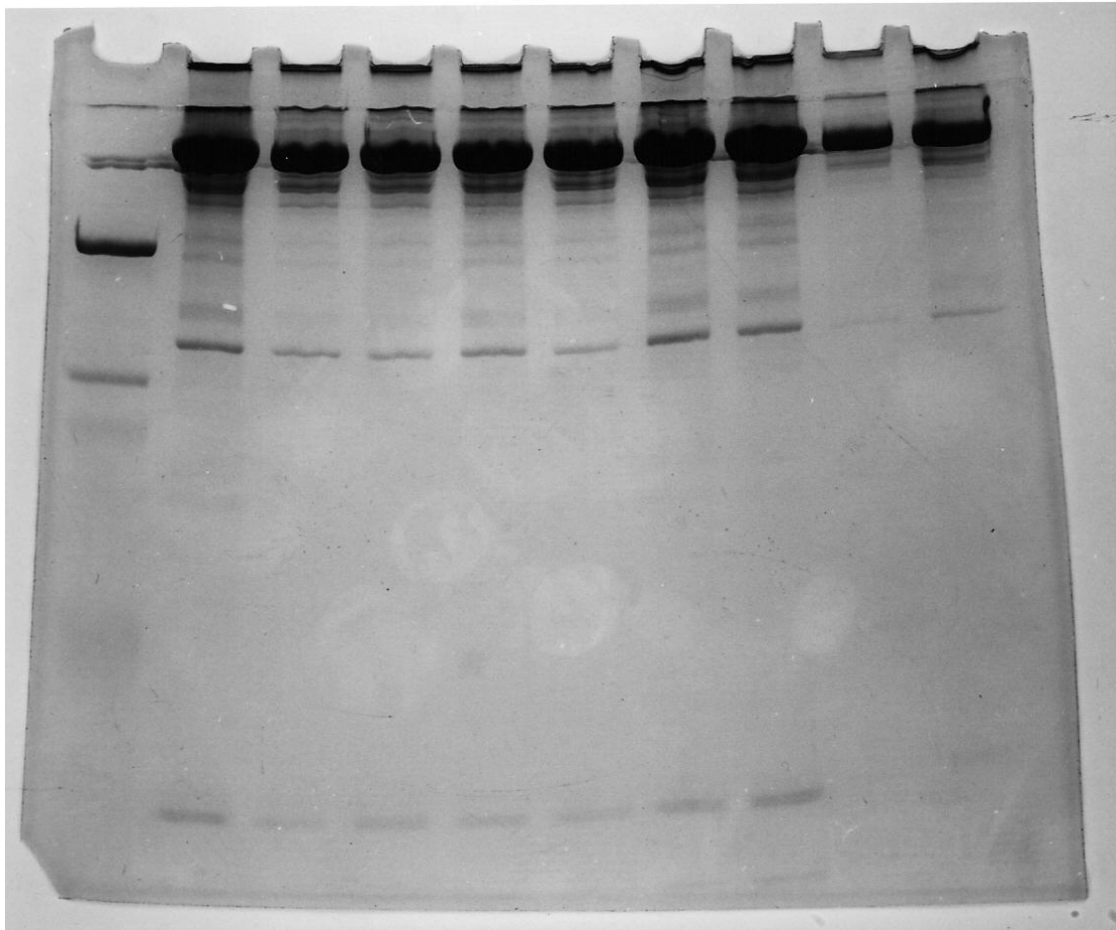
Tabelle 31: Parameter der HDL ApoA-I Kinetik der einzelnen Probanden

Proband	HDL-ApoA-I FCR (pools/Tag)		HDL-ApoA-I PR (mg/kg/Tag)	
	Vor	Während	Vor	während
<b>Typ IIa: 450 mg Lifibrol für 4 Wochen</b>				
GL	0.156	0.154	9.73	9.83
WM	0.156	0.209	9.05	11.70
LW	0.122	0.182	5.63	9.63
HS	0.137	0.163	6.74	7.18
WH	0.173	0.175	9.06	9.31
<b>Typ IIb: 450 mg Lifibrol für 12 Wochen</b>				
SG	0.168	0.168	9.27	9.68
WS	0.180	0.211	8.21	8.79
CL	0.103	0.156	6.44	10.67
DS	0.214	0.300	10.1	15.36
GS	0.245	0.288	13.52	15.55

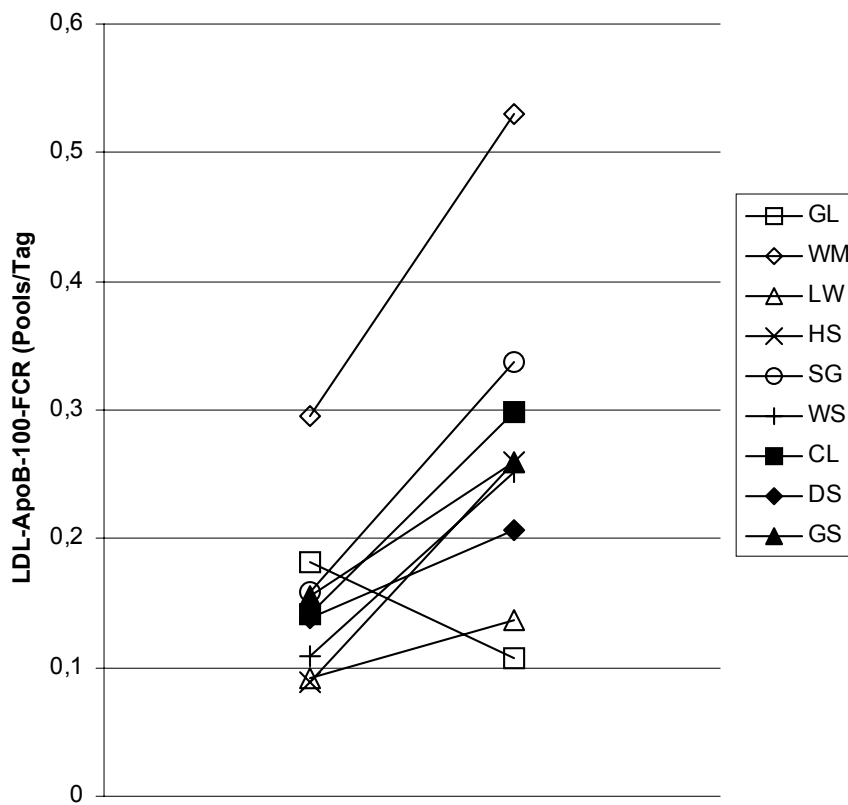
## 7.2 Ergänzende Abbildungen



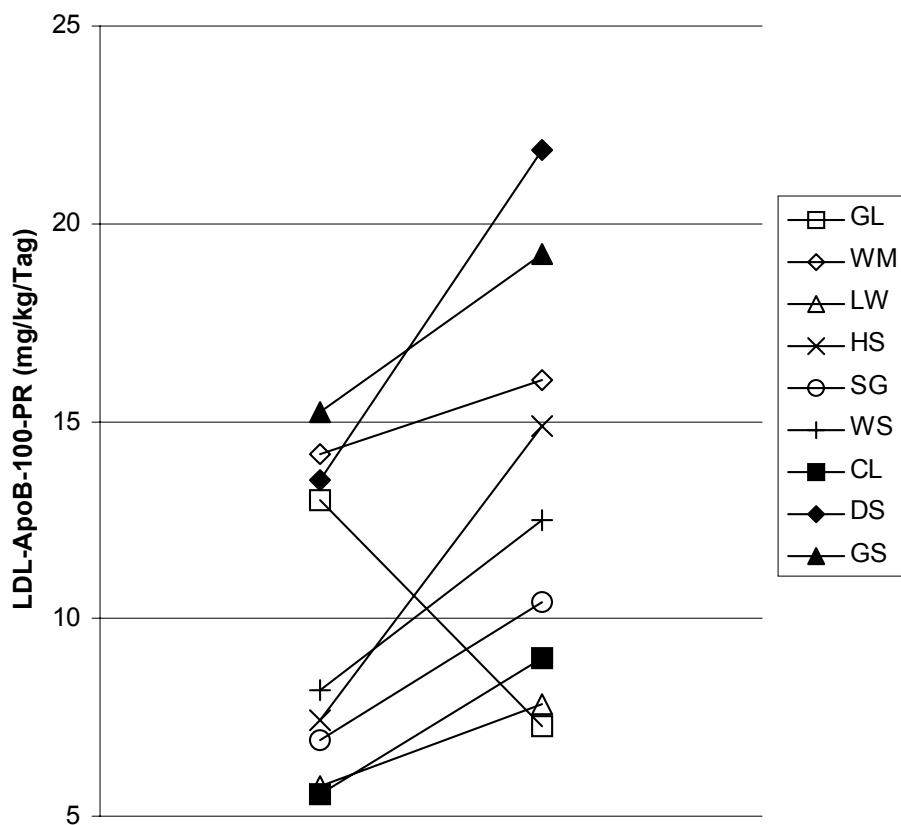
**Abbildung 10: SDS-Gelelektrophorese. Beispiel für ein HDL-Gel (Proband WH).** In der Bahn ganz rechts außen ist ApoA-I-Standard aufgetragen, durch den das ApoA-I in den anderen Bahnen genau identifiziert werden kann. In den übrigen Bahnen sind die Proben von verschiedenen Zeitpunkten der Studie aufgetragen.



**Abbildung 11: SDS-Gelelektrophorese: Beispiel für ein LDL-Gel (Proband GS).** In der Bahn links außen ist Molekulargewichts-Standard aufgetragen. Die übrigen Bahnen enthalten LDL-Proben von verschiedenen Studienzeitpunkten. Das ApoB-100 lässt sich als hochmolekulares Protein und quantitativem Hauptbestandteil der LDL gut im oberen Gelabschnitt identifizieren.

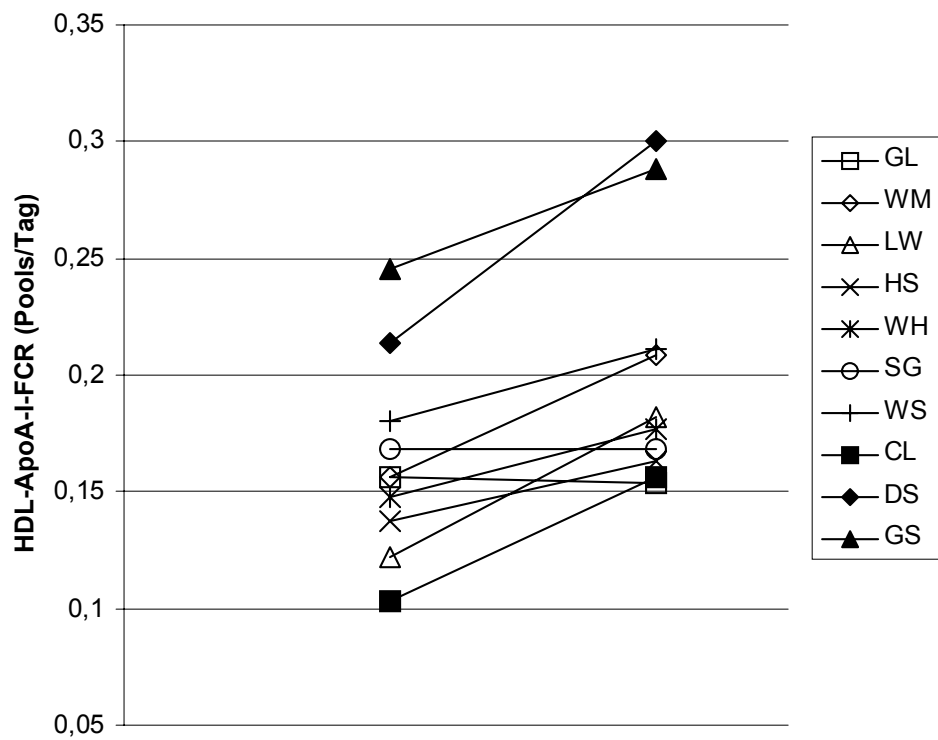


**Abbildung 12:** Darstellung der fraktionellen Katabolismusraten des LDL-ApoB-100 (LDL-ApoB-100-FCR) vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden.



**Abbildung 13: Darstellung der Produktionsraten des LDL-ApoB-100 (LDL-ApoB-100-PR) vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden.**





**Abbildung 14:** Darstellung der fraktionellen Katabolismusraten des HDL-ApoA-I (HDL-ApoA-I-FCR) vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden.

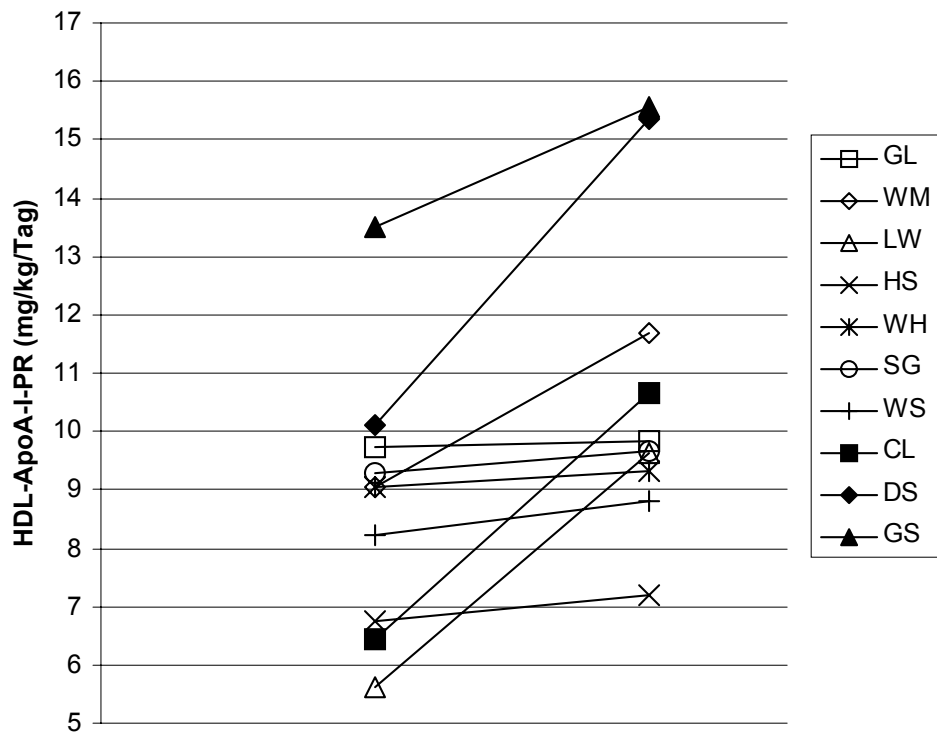


Abbildung 15: Darstellung der HDL-ApoA-I-Produktionsraten (HDL-ApoA-I-PR) vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden.

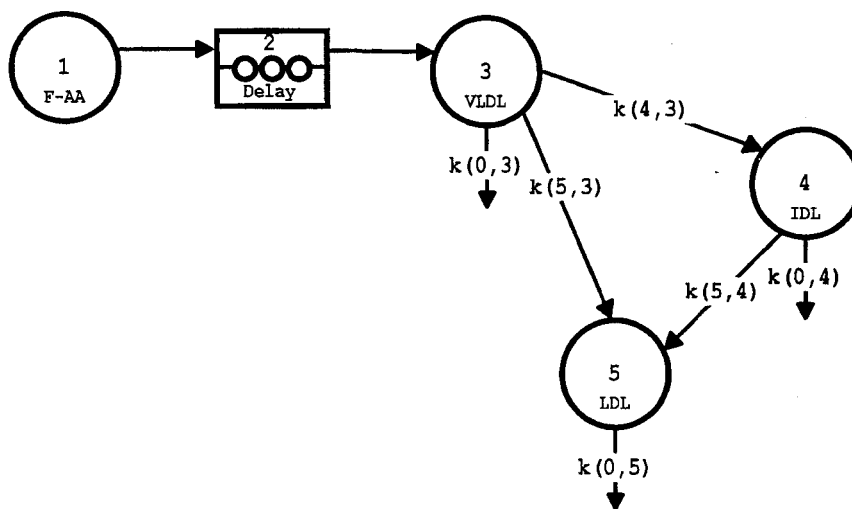
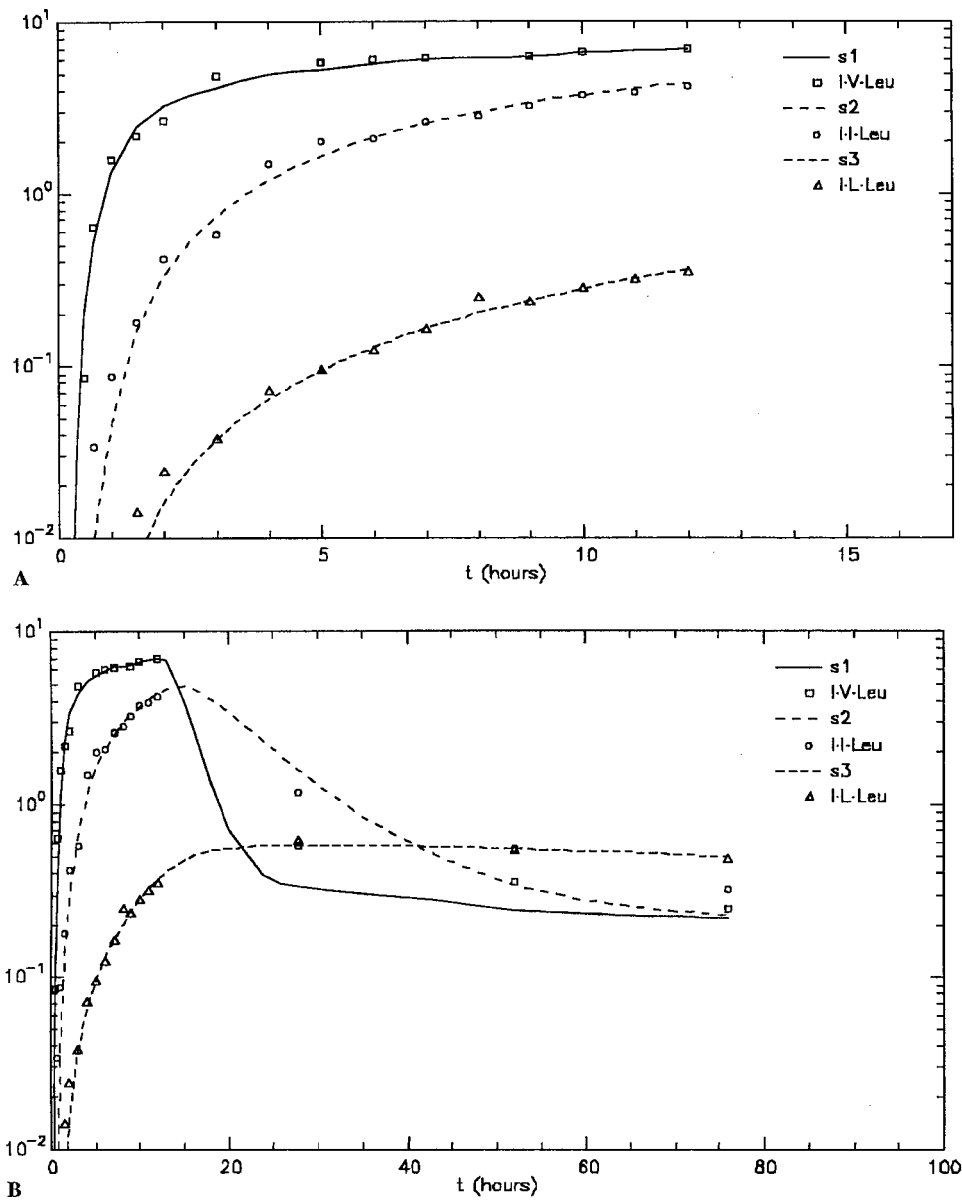


Abbildung 16: Schema des Modells zur Bestimmung der ApoB-100-Kinetik [142].



**Abbildung 17: Darstellung der Tracer/Tracee-Kurven am Beispiel der ApoB-100-Kinetik des Probanden GL (Blutentnahmen bis 76 h nach Beginn der Infusion).** Teil A zeigt die Anpassung für 12 h Studiendauer, Teil B die Anpassung für 76 h Studiendauer. Die Punkte zeigen jeweils die gemessenen Tracer/Tracee-Verhältnisse, während die Linien die Regressionskurven darstellen [142].

### 7.3 Abkürzungen

$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
4S-Studie	Scandinavian Simvastatin Survival Study
ABC1	ATP-bindender Kassettentransporter 1
ACVB- Operation	Aortokoronarvenöse Bypass-Operation
Apo	Apolipoprotein
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
CARE-Studie	“Cholesterol And Recurrent Events” – Studie
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CID	collision-induced-dissociation, kollisionsinduzierte Dissoziation
CK	Kreatininkinase
CM	Chylomikronen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL	Endotheliale Lipase
FCR	Fraktionelle Katabolismusrate (Pools/Tag)
FDB	Familiär defektes Apolipoprotein B
GC/MS-MS	Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie

---

GCP	Good Clinical Practice
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDL	High density Lipoprotein, Lipoproteine hoher Dichte
HFBA	Heptafluorobuttersäure
HLP	Hyperlipoproteinämie
HMG-CoA- Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HTGL	Hepatische Triglyzeridlipase
IDL	Intermediate density lipoprotein, Lipoproteine intermediärer Dichte
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
LCAT	Lezithin-Cholesterin-Acyl-Transferase
LDL	Low density Lipoprotein, Lipoproteine niedriger Dichte
Lp	Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoprotein-Lipase

---

LRP	LDL-receptor related protein
MRFIT	Multiple Risk Factor Intervention Trial
PR	Produktionsrate (mg/kg KG/Tag)
PROCAM-Studie	Prospektive Cardiovasculäre Münster – Studie
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PVP	Polyvinylpyrolidon
RT	Residenttime
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
SR-A	Scavengerrezeptor A
SR-BI	Scavengerrezeptor B-I
Temed	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	Very low density lipoprotein, Lipoproteine sehr niedriger Dichte

#### 7.4 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1: Der menschliche Lipoproteinstoffwechsel.....	16
Abbildung 2: Chemische Struktur der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren.....	21
Abbildung 3: Chemische Struktur von Gemfibrozil als Beispiel für Fibrinsäurederivate.....	22
Abbildung 4: Strukturformeln von Nikotinsäure und Nikotinsäurealkohol. ....	23
Abbildung 5: Strukturformeln von Colestyramin und Colestipol.....	24
Abbildung 6: Strukturformel von Lofibrol (4-4'-tert-butylphenyl)-1-(4'- carboxyphenoxy)-2-butanol).....	25
Abbildung 7: Strukturformel von [5,5,5- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-L-Leuzin. ....	33
Abbildung 8: Graphische Darstellung des Zusammenhangs der prozentualen Veränderungen der LDL-ApoB-100-PR und der LDL-ApoB-100-FCR bei den einzelnen Probanden.....	73
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Abhängigkeit prozentualen Veränderungen der ApoA-I PR und der ApoA-I FCR bei den einzelnen Probanden.....	75
Abbildung 10: SDS-Gelelektrophorese. Beispiel für ein HDL-Gel. ....	112
Abbildung 11: SDS-Gelelektrophorese: Beispiel für ein LDL-Gel. ....	113
Abbildung 12: Darstellung der fraktionellen Katabolismusraten des LDL- ApoB-100 vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden.....	114

- Abbildung 13: Darstellung der Produktionsraten des LDL-ApoB-100 vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden. ....115
- Abbildung 14: Darstellung der fraktionellen Katabolismusraten des HDL-ApoA-I vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden. ....116
- Abbildung 15: Darstellung der HDL-ApoA-I-Produktionsraten vor und während Therapie mit Lofibrol für die einzelnen Probanden. ....117
- Abbildung 16: Schema des Modells zur Bestimmung der ApoB-100-Kinetik.....117
- Abbildung 17: Darstellung der Tracer/Tracee-Kurven am Beispiel der ApoB-100-Kinetik des Probanden GL .....118



### **7.5 Verzeichnis akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Professoren:

Amon, Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Beato, Berndt, Doss, Engel, Eschenbach, Fruhstorfer, Fuhrmann, Ganz, Geus, Golenhofen, Gotzen, Gressner, Griss, Grzeschik, Habermehl, Happle, Havemann, Huffmann, Joseph, Kaffarnik, Kern, Kleinsasser, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lange, Lennartz, Maisch, Mannheim, Mennel, Moosdorf, Netter, Pfab, Pohlen, Prinz, Remschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmitz-Moormann, Schneider, Schüffel, Seitz, Schulz, Siegrist, Slenczka, Thomas, Uniscker, Vogt, von Wichert, Zelder.

### **7.6. Danksagung**

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung und Begleitung zahlreicher Menschen. Mein Dank gilt hierbei ganz besonders:

- Meinem Vater Dietrich Sattler und meiner leider viel zu früh verstorbenen Mutter Heidrun Sattler geb. Erdel, die mein Leben von der Geburt an geprägt und mir meine Schulbildung und das Studium ermöglicht haben. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.
- Meinen Großeltern Elisabeth und Karl Erdel sowie Ernestine und Ernst Sattler, die mich seit meiner Geburt liebevoll begleitet haben.
- Herrn PD Dr. Jürgen R. Schäfer, der mir das Thema dieser Arbeit gestellt hat und mir bei allen Problemen und Fragen geduldig und kompetent zur Seite stand.
- Herrn Prof. Dr. Bernhard Maisch für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und die unermüdlichen Ermutigungen und Anregungen.
- Meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. Hans Kaffarnik, der in vielfältigen Diskussionen mein Interesse am Gebiet der Fettstoffwechsel- und Arterioskleroseforschung geweckt und aufrechterhalten hat.
- Frau Sabine Motzny, Frau Daniela Forge und Herrn Muhidien Soufi für die Unterstützung und die immer gute Atmosphäre im Labor.
- Herrn Dr. Karl Winkler und Herrn PD Dr. Winfried März, Freiburg für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Durchführung und Auswertung dieser Studie.
- Herrn Dr. Horst Schweer und Herrn Prof. Dr. Hannsjörg W. Seyberth, Universitätskinderklinik Marburg für die hervorragende Vermessung der messtechnisch zum Teil sehr anspruchsvollen Proben.
- Den Teilnehmern an der Studie, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.