

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Klinische Chemie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann

Plasma-Cholesterin-Aufnahme-Kapazität –  
Entwicklung und Evaluation eines zellfreien  
Cholesterin-Efflux-Assays zur Bestimmung einer  
anti-atherogenen Plasma-Eigenschaft

Dissertation

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Stefan Sondermann

aus Bocholt

2006

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: PD Dr. J. Roch Nofer

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. A. von Eckardstein

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Klinische Chemie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann  
Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Roch Nofer  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. A. von Eckardstein

### **Zusammenfassung**

Plasma-Cholesterin-Aufnahme-Kapazität –  
Entwicklung und Evaluation eines zellfreien  
Cholesterin-Efflux-Assays zur Bestimmung einer  
anti-atherogenen Plasma-Eigenschaft

Stefan Sondermann

Ergebnisse von epidemiologischen Studien, genetischen Tiermodellen und In-vitro-Versuchen sprechen für eine protektive Rolle der HDL in der Atherosklerose. Im Zuge der Entschlüsselung dieser „antiatherogenen“ Rolle von HDL wurde die zentrale Bedeutung des Cholesterinefflux aus Zellen im Rahmen des Reversen Cholesterintransportes hervorgehoben.

Da die Bestimmung des Cholesterinefflux aus Zellen bisher stets die aufwendige Kultivierung von Zellen erforderte, sollte in dieser Arbeit ein neues Verfahren zur Cholesterinefflux-Messung entwickelt werden, in dem die Zellen durch ein Silikat als künstlichen Cholesterindonor ersetzt werden. Hiermit sollte das Potential von Plasmen gemessen werden, radioaktiv markiertes Cholesterin aus dem Silikat aufzunehmen: die Cholesterinaufnahme-Kapazität (CAK). Der in dieser Arbeit entwickelte Test zeigte eine gute Reproduzierbarkeit. Die CAK war abhängig von der Verdünnung der eingesetzten Plasmen und der Inkubationszeit.

Plasmen von Probanden mit unterschiedlichen HDL-Defizienzen zeigten CAK-Werte, die unter denen von Kontrollplasmen lagen.

In einer großen Patientenstudie wurden Wechselbeziehungen zwischen der CAK und verschiedenen Parametern des Cholesterin- und Lipoproteinstoffwechsels einschließlich des Cholesterinefflux aus zwei verschiedenen Zellarten untersucht, ohne dass aussagekräftige signifikante Korrelationen gefunden wurden.

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob starke Schwankungen der LDL-Konzentration des Plasmas (durch LDL-Apherese) ein limitierender Faktor der CAK sind, ebenfalls ohne dass sich eine Beeinflussung abzeichnete.

Trotz einfacher Handhabung und guter Reproduzierbarkeit sprechen die gesammelten Erkenntnisse gegen eine klinische oder wissenschaftliche Einsetzbarkeit des neuen Testverfahrens.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2006

Gewidmet meinen Eltern,  
die mir alles ermöglicht haben.

## **Inhalt:**

<b>Kapitel:</b>	<b>Seite:</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Struktur und Zusammensetzung von Plasma-Lipoproteinen	1
1.2. Regulation der zellulären Cholesterin-Homöostase	1
1.3. Risikofaktoren der Arteriosklerose	3
1.4. Bedeutung des reversen Cholesterintransportes (RCT)	4
1.5. High-Density Lipoprotein (HDL)-Unterklassen	4
1.6. HDL: Metabolismus und Katabolismus	5
1.7. Mechanismen des Cholesterineffluxes	7
1.7.1. Einfache Diffusion	7
1.7.2. Erleichterte Diffusion	8
1.7.3. Aktiver Transport	9
1.7.4. Komplexe (multimolekulare) Mechanismen	11
1.8. Enzyme und Transferproteine des HDL-Metabolismus	11
1.8.1. Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT)	11
1.8.2. Phospholipid-Transferprotein (PLTP)	12
1.8.3. Cholesterinester-Transferprotein (CETP)	13
1.8.4. Hepatische Lipase (HL) und Endotheliale Lipase (EL)	14
1.9. Experimentelle „Messbarkeit“ der antiatherogenen Funktionen von HDL	14
1.10. Cholesterinaufnahme Kapazität (CAK) des Plasmas	16
<b>2. Fragestellung</b>	<b>18</b>
<b>3. Patienten</b>	<b>19</b>
3.1. Patienten mit HDL-Defizienz	19
3.2. LDL-Apherese-Patienten	19
3.3. Klinisches Kollektiv	20
<b>4. Methoden</b>	<b>22</b>

4.1. Blutentnahmebedingungen	22
4.2. Quantifizierung von Lipiden, Lipoproteinen, Apolipoproteinen und HDL-Subklassen	22
4.3. Quantifizierung von lipolytischen Enzymen und Lipid-Transferproteinen	24
4.4. Bestimmung der Cholesterinefflux-Kapazität aus Zellen	24
4.5. Bestimmung der Cholesterinaufnahme-Kapazität des Plasmas	27
<b>5. Ergebnis</b>	<b>30</b>
5.1. Vorversuche zur Optimierung des Testverfahrens	30
5.2. Vergleich HDL-defizienter Plasmaproben mit Kontrollproben bezüglich der Cholesterinaufnahme-Kapazität (CAK)	36
5.3. Apherese studie	36
5.4. Korrelation von Cholesterinaufnahme-Kapazitäten von Plasmen mit Parametern des Lipoproteinstoffwechsels	37
<b>6. Diskussion</b>	<b>44</b>
6.1. Notwendigkeit der CAK als neuer Cholesterin-Efflux-Assay	44
6.2. Technische Qualität des neuen CAK-Assays	46
6.3. Biologische Qualität des neuen Assays	48
6.3.1. Rolle von HDL-Subklassen und Lipidtransferenzymen	48
6.3.2. Auswirkung von HDL-Defizienzen auf die CAK	51
6.3.3. Auswirkungen von LDL-Apherese auf die CAK	53
6.4. Einsetzbarkeit des Testverfahrens	54
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>57</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>78</b>





## **1. Einleitung:**

### **1.1. Struktur und Zusammensetzung von Plasma-Lipoproteinen**

Da Lipide nicht wasserlöslich sind, müssen sie im Plasma nicht-kovalente Verbindungen mit bestimmten Proteinen, den Apolipoproteinen, eingehen. Apolipoproteine nehmen in Gegenwart von Phosphoglycerinen eine räumliche Konformation an, die zum großen Teil aus amphiphilen  $\alpha$ -Helices besteht. Die im Plasma vorkommenden Lipoproteine werden nach unterschiedlichen Kriterien eingeteilt. Entsprechend ihrer Dichte in der Ultrazentrifuge kann man die besonders lipidreichen Chylomikronen, Very Low-Density Lipoproteine (VLDL) (0,93-1,006g/ml), Low-Density Lipoproteine (LDL) (1,019-1,063g/ml) und High-Density Lipoproteine (HDL)(1,063-1,21), deren Dichte noch unter der der VLDL liegt ( $\leq$  0,93g/ml), durch Ultrazentrifugation trennen. Die Dichteunterschiede der Lipoproteine sind bedingt durch Unterschiede im Lipid- und Protein- als auch Apolipoproteingehalt (siehe hierzu Tabelle 1) (100;146).

### **1.2. Regulation der zellulären Cholesterin-Homöostase**

Als ein essentieller Baustein der Zellmembran und als Vorläufer für Gallensäuren und Steroidhormone ist Cholesterin ein lebenswichtiges Molekül in tierischen Zellen. Die meisten Säugetierzellen synthetisieren einerseits Cholesterin und importieren es andererseits von Plasma-Lipoproteinen. Als ein bedeutender enzymatischer Schritt zur Regulation der Cholesterinsynthese wurde bereits in den 1960er Jahren das im Endoplasmatischen Reticulum (ER) lokalisierte Enzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) identifiziert, welches HMG-CoA in Mevalonsäure verwandelt (30;137). 1985 erhielten M.S. Brown und J.L. Goldstein den Nobelpreis in Medizin für die Entdeckung und genaue Charakterisierung der Rezeptor-vermittelten Aufnahme von Low Density Lipoprotein (LDL)-Partikeln und die Aufdeckung des Zusammenhanges zwischen der Familiären Hypercholesterinämie (FH) und vererbaren Defekten im LDL-Rezeptor-Gen (28).

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Lipoproteine (% nach relativen Massen)**

	<b>Chylo- mikronen</b>	<b>VLDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
<b>Protein</b>	1,5-2,5 %	5-10 %	20-25 %	40-55 %
<b>Triglyceride</b>	84-89 %	50-65 %	7-10 %	3-5 %
<b>Phospholipide</b>	7-9 %	15-20 %	15-20 %	20-35 %
<b>Cholesterin</b>	1-3 %	5-10 %	7-10 %	3-4 %
<b>Cholesterin- ester</b>	3-5 %	10-15 %	35-40 %	12 %
<b>Apolipo- proteine</b>	A-I, A-II, A- IV, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C- II, C-III, E	B-100	A-I, A-II, A- IV, C-I, C-II, C-III, D, E

Die Entdeckung und die Erforschung von Membran-gebundenen Transkriptionsfaktoren, genannt „sterol regulatory element binding proteins“ (SREBPs), hat geholfen, die Regulation der Cholesterinbiosynthese auf molekularer Ebene zu erklären (29;40). Bei niedriger zellulärer Cholesterin-Konzentration wird SRBP1c durch Proteasen von einem Vorläuferprotein freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo es die Transkription z. B. der Gene für den LDL-Rezeptor und die HMG-CoA-Reduktase induziert. Bei hoher zellulärer Cholesterinkonzentration wird die Proteolyse des SREBP und damit auch die Transkription dieser Gene gehemmt. Im Ergebnis wird also ebenfalls die Cholesterinaufnahme gehemmt.

Die durch Cholesterin nicht regulierte Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen in Makrophagen (speziell durch Typ-A-Scavenger-Rezeptoren) spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose, da eine Ansammlung von Lipiden die Makrophagen in aktivierte Schaumzellen verwandelt, welche durch Freisetzung

verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokine und Proteasen die Entstehung und Progression der Atherosklerose beeinflussen.

### **1.3. Risikofaktoren der Arteriosklerose**

Das Risiko, Arteriosklerose und hiermit verbundene Krankheiten wie z.B. Koronare Herzkrankheit (KHK) zu entwickeln, hängt von verschiedenen Determinanten ab, von denen einige mit dem Lebensstil verbunden sind. In großen prospektiven epidemiologischen Studien wie der Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Studie in Europa (5) oder der Framingham Studie in den Vereinigten Staaten (161) wurden eine Vielzahl von KHK-Risikofaktoren entdeckt. Das Gesamt-Risiko hängt von der Summe der Risikofaktoren ab, die ein Individuum aufweist. Neben Faktoren wie Rauchen, steigendes Alter, Herzinfarkte in der Familienanamnese und Bluthochdruck deckten die Framingham Studie und die PROCAM Studie auch erniedrigtes HDL-Cholesterin, erhöhtes LDL-Cholesterin und erhöhte Triglyceride als Risikofaktoren auf. Bereits in den 60er Jahren wurden aufgrund von Daten der Framingham Studie positive Zusammenhänge zwischen Serum-Cholesterinwerten und Koronarer Herzkrankheit hergestellt (88). Epidemiologische Ergebnisse verschiedenster Studien deckten die bedeutende Rolle von LDL-Cholesterin als wichtiger KHK-Risikofaktor auf (96). Ebenso wurden Daten erbracht, die zeigen, dass eine postprandiale Lipämie, die durch ein Übermaß triglyzeridreicher Lipoproteinpartikel charakterisiert ist, das KHK-Risiko steigert (165). Erhöhte Serum-Triglyzerid-Konzentrationen wurden in verschiedenen Studien als kardiovaskulärer Risikofaktor identifiziert (127;136).

Die inverse Korrelation von HDL-Cholesterinwerten und der Entstehung von KHK wurde ebenfalls in mehreren Studien belegt (64;148). Ein HDL-C-Schwellenwert von 35 mg/dl unterschied in der PROCAM-Studie zwischen hohem und niedrigem mittlerem Risiko (148). In verschiedenen randomisierten Placebo-Kontroll-Studien wird derzeit der Effekt von medikamentös gesteigerten HDL-Cholesterinwerten auf kardiovaskuläre Ereignisse überprüft (18;148).

#### **1.4. Bedeutung des reversen Cholesterintransportes (RCT)**

Um ein Gleichgewicht des zellulären Cholesterinspiegels zu erzielen und eine Überladung zu vermeiden, müssen Zellen überschüssiges Cholesterin ausschleusen bzw. exportieren.

Durch ihre einzigartige Fähigkeit, Gallensäuren zu bilden und Cholesterin in die Galle zu transportieren, ist die Leber das einzige quantitativ signifikante Sammelbecken für überschüssiges Cholesterin.

Der reverse Cholesterintransport (RCT) beschreibt den durch High Density Lipoproteine (HDL) vermittelten Efflux von Cholesterin aus nichthepatischen Zellen und dessen nachfolgende Beförderung zur Leber und Steroidhormon-bildenden Organen, wo es zur Bildung von Lipoproteinen, Gallensäuren, Steroidhormonen und Vitamin D gebraucht wird (46). Abgesehen von den in Kapitel 1.2. beschriebenen Mechanismen der Regulation der Cholesterinaufnahme und -synthese scheint der reverse Cholesterintransport eine entscheidende Rolle in der Cholesterinhomöostase zu spielen und für einige der protektiven Effekte von HDL gegen Arteriosklerose verantwortlich zu sein.

#### **1.5. High-Density Lipoprotein (HDL)-Unterklassen**

HDL umfassen eine Klasse strukturell und funktionell unterschiedlicher Partikel, denen eine hohe Dichte ( $>1.063$  g/ml) sowie eine geringe Größe (Stoke's Durchmesser 5 bis 17 nm) gemeinsam ist. Anhand von Unterschieden in Größe, Form, hydratisierter Dichte, Ladung und Antigenität können HDL in Unterklassen eingeteilt werden (152), welche einen unterschiedlichen Gehalt an Lipiden, Phospholipiden, Apolipoproteinen, Enzymen und Lipid-Transfer-Proteinen haben.

Der Großteil der HDL enthält Apolipoprotein-A-I (126). Nach Agarose-Gel-Elektrophorese des Plasmas und Anti-ApoA-I-Immunoblotting findet sich dieser zumeist in einer Fraktion mit elektrophoretischer  $\alpha$ -Mobilität und wird als  $\alpha$ -LpA-I bezeichnet. Diese Fraktion umfasst jenes Cholesterin, welches im Routine-Labor als HDL-Cholesterin gemessen wird. 5%-15% des im menschlichen Plasma enthaltenen ApoA-I ist mit Teilchen verbunden, welche elektrophoretische prä- $\beta$ -Mobilität haben.

Die kleinsten dieser durch Elektrophorese getrennten HDL-Partikel enthalten 2 Moleküle ApoA-I in Verbindung mit Phospholipiden (Sphingomyelin und Phosphatidylcholin) und haben ein Molekulargewicht von ~80 kDa (31). Durch weitere Auftrennung des Plasmas konnten kleinere lipidarme HDL (~40 kDa) mit einem einzelnen ApoA-I-Molekül identifiziert werden (8).

Es konnten in anderen Studien (43;77;154) dem prä- $\beta$ -LpA-I ähnliche lipidarme Lipoproteine, die als Apolipoproteine nur ApoE (wegen seiner elektrophoretischen  $\gamma$ -Mobilität als  $\gamma$ -LpE bezeichnet) bzw. nur ApoA-IV (LpA-IV) enthielten, nachgewiesen werden.

Die lipidreichen  $\alpha$ -HDL können durch Ultrazentrifugation ihrer Dichte entsprechend in HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>, durch nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese nach der Größe oder durch Immun-Affinitäts-Chromatographie nach ihrer Apolipoprotein-Zusammensetzung (z.B. in LpA-I/A-II und LpA-I) getrennt werden (152).

In extravasalen Kompartimenten (z.B. in der Lymphe, wo in vivo der RCT eingeleitet wird,) ist die Konzentration der lipidarmen prä- $\beta$ -HDL im Vergleich zu lipidreichen  $\alpha$ -HDL erhöht (9;46;111).

### **1.6. HDL: Metabolismus und Katabolismus**

Aus lipidarmen discoidalen prä- $\beta$ -HDL oder lipidfreien ApoA-I-Partikeln entstehen lipidreiche sphärische  $\alpha$ -HDL. Jene lipidarmen HDL-Vorläufer werden entweder von der Leber (67) und der intestinalen Mukosa (37) sezerniert (51), beim Abbau Triglycerid-reicher Lipoproteine (Chylomikronen und Very Low Density Lipoproteinen (VLDL)) durch Lipoproteinlipase (LPL) gebildet (110), oder sie entstehen beim stetigen Umbau von HDL-Partikeln unterschiedlicher Dichte (HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>), an dem Cholesterinester-Transferprotein (CETP, s.u.) (57), Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP, s.u.) (155), Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT, s.u.) und Hepatische Lipase (HL, s.u.) (13) beteiligt sind.

Lipidfreie oder -arme Partikel erhalten nichtverestertes Cholesterin und Phospholipide von hepatischen und nicht-hepatischen Zellen. Ob die Lipidanreicherung intrazellulär und / oder extrazellulär stattfindet, ist nicht eindeutig geklärt. Einerseits deuten Studien, die einen durch lipidfreie Apolipoproteine angeregten Efflux von Lipiden aus Zellen

nachweisen (52), auf eine extrazelluläre Anreicherung hin. Andererseits wurde gezeigt, dass u.a. Makrophagen lipidfreie Apolipoproteine in sich aufnehmen und entstehende Lipoproteinpartikel wieder sezernieren (139). Dieser Prozess, der als Retroendozytose bezeichnet wurde, ist bei Tangier-Krankheit als defekt erkannt worden (131). Bei der Tangier-Krankheit behindern Mutationen des ATP-bindenden Cassetten-Transporter 1 (ABCA1, s.u.) den zellulären Lipidefflux und führen zur Abwesenheit lipidreicher  $\alpha$ -HDL im Plasma (27). Da ABCA1 in vielen Zellen (u.a. auch Hepatozyten und Enterozyten) gebildet wird, spielt dieses Protein wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der hepatischen und intestinalen Entstehung von HDL.

Die initialen Produkte der Lipidanreicherung sind kleine HDL<sub>3</sub>-Partikel, die in Folge einer durch Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT)-vermittelten Veresterung von Cholesterin (42) und der durch Phospholipid-Transferprotein (PLTP) vermittelten Fusion von HDL<sub>3</sub> untereinander oder mit Oberflächen-Remnants Triglycerid-reicher Lipoproteine zu größeren HDL<sub>2</sub>-Partikeln (102) werden.

Lipide und Apolipoproteine können von den lipidreichen  $\alpha$ -HDL-Partikeln wieder entfernt und so die großen HDL<sub>2</sub> wiederum in kleinere HDL<sub>3</sub>-Partikel verwandelt werden. Hierzu sind direkte und indirekte Wege bekannt: Auf direktem Wege können einerseits durch den Scavenger Rezeptor B1 (SR-B1, s.u.) selektiv Lipide (92) und andererseits durch hepatische ApoE-Rezeptoren (LDL-Rezeptoren und LDL-Rezeptor-verbundene Proteine) gesamte Partikel (35) aufgenommen werden. Auf indirektem Wege spielen die Aktivitäten von CETP, HL und Endothelialer Lipase (EL, s.u.) eine Rolle (119;142).

Weitere potentielle Mechanismen des Abbaus von HDL-Gesamtpartikeln und Lipid-freien Apolipoproteinen sind Endozytose in Leber- und Nierenzellen sowie während der Schwangerschaft in der Plazenta und dem Dottersack. Ein für diesen Prozess zentrales Protein ist offensichtlich der Rezeptor für den Intrinsischen Faktor/Vitamin B12-Komplex, Cubilin, der als Bindungsstelle für HDL/ApoA-I in epithelialen Zellen des proximalen Tubulus der Niere und des Dottersacks identifiziert wurde (108). Kleine HDL-Partikel mit einer Größe  $<8$  nm und lipidfreie ApoA-I, die im Nieren-Glomerulum frei filtriert werden, können so aus dem Primärharn zurückresorbiert werden. Da Cubilin selbst keine Transmembranöse Domäne hat, kann es seine Liganden nicht ohne Hilfe von Korezeptoren in die Zelle schleusen: Diese Aufgabe scheint in der Niere und

im Dottersack von Megalin, einem Mitglied der LDL-Rezeptor-Genfamilie, erfüllt zu werden (108). Nach der Aufnahme werden die ApoA-I-Partikel zum Abbau zu Lysosomen geschleust (108).

## **1.7. Mechanismen des Cholesterineffluxes**

Cholesterinefflux aus Zellen geschieht durch verschiedene Mechanismen, wobei die meisten Autoren zwischen den folgenden Mechanismen unterscheiden (48;162):

1) einfache Diffusion, 2) erleichterte Diffusion, 3) aktiver Transport und 4) komplexe (multimolekulare) Mechanismen.

### **1.7.1. Einfache Diffusion**

Die einfache oder wässrige Diffusion folgt dem Fick'schen Diffusionsgesetz, welches den Fluss freier gelöster Moleküle unter dem Einfluss Brown'scher Molekularbewegungen definiert. Die Diffusionsrate ist direkt proportional zur Konzentration des gelösten Stoffes und antiproportional zur Molekülgröße und Diffusionsstrecke. Dieser Efflux-Mechanismus beschreibt die Diffusion nicht-veresterten / freien Cholesterins (FC) von der Plasma-Membran zu lipidreichen Lipoproteinen und Albumin. Er ist nicht-kompetitiv zwischen verschiedenen gelösten Stoffen und unabhängig von jeglicher Rezeptor-Aktivität oder ATP-Verfügbarkeit. Der Netto-Transport (Efflux $\leftrightarrow$ Influx) findet nur entlang eines vorbestehenden Konzentrationsgradienten statt. Dieser kann aber unbegrenzt aufrechterhalten werden, wenn der transportierte Stoff gespalten oder metabolisiert wird. Der Gradient zwischen zellulärem FC und FC des Plasmas wird aufrechterhalten, indem das freie Cholesterin durch LCAT extrazellulär in Cholesterinester (CE) verwandelt wird (36). Faktoren, die diese Diffusionsrate hemmend beeinflussen, sind einerseits die Verteilung des FC in der Plasmamembran, wovon sich 95% in dem zytoplasmatischen Teil des Bilayers befinden und so der Diffusion primär unzugänglich sind (47), und andererseits die Konstitution der Zelloberfläche, die von einem „gleichmäßigen Wasserfilm“ umgeben wird, welcher durch mit Zellproteinen verbundenen Oligosaccharidketten stabilisiert wird (117). Hierdurch entsteht eine beträchtliche Diffusionsbarriere. Folglich führt dieser

Effluxmechanismus zu keiner bedeutenden Reduktion des zellulären Cholesterinester-Pools.

### **1.7.2. Erleichterte Diffusion**

Wie die einfache Diffusion ist dieser Transportmechanismus ATP-unabhängig und benötigt als „Antrieb“ einen vorbestehenden Konzentrationsgradienten. Da hier der Transport durch ein Carrierprotein vermittelt wird, liegen für unterschiedliche gelöste Stoffe kompetitive Verhältnisse vor. Der durch den Scavenger Rezeptor, Klasse B, Typ 1 (SR-B1) vermittelt Lipidtransport hat zum Teil für erleichterte Diffusion typische Eigenschaften. SR-B1 wurde ursprünglich als Membranprotein der Zelloberfläche identifiziert, welches die Bindung chemisch modifizierter Lipoproteine (z.B. azetyliertes LDL oder oxidiertes LDL) vermittelt (siehe auch Kapitel 1.2.), und erst später als HDL-Rezeptor. Durch Mechanismen, welche bisher unzureichend geklärt sind, vermittelt SR-B1 Cholesterinefflux aus Zellen, falls ein günstiger Cholesteringradient besteht (85). Da von Rothblat et al. gezeigt wurde, dass der Scavenger Rezeptor, Klasse B, Typ CD36 HDL mit einer höheren Affinität bindet als SR-B1, jedoch nur der letztere einen signifikanten Cholesterinefflux bewirkt (99), ist offenbar der durch SR-B1 bewirkte Cholesterinefflux unabhängig von der HDL-Bindung. Anscheinend löst SR-B1 eine Umverteilung des Cholesterins in der Plasmamembran und damit eine bessere Zugänglichkeit zu extrazellulären Cholesterinrezeptoren aus (89). Alternativ hierzu wurde auf der Basis von Studien ein anderes Modell entwickelt, nach welchem Cholesterinefflux eine Bindung von HDL an SR-B1 erfordert (66).

Ursprünglich wurde SR-B1, welcher sich innerhalb FC-reicher Domänen der Plasmamembran (Caveolae) befindet (12), als Rezeptor entdeckt, der die selektive Lipidaufnahme von HDL-Cholesterinestern in Hepatozyten und Steroidhormon-bildende Zellen vermittelt (2).

Folglich ist SR-B1 Vermittler eines bidirektionalen Cholesterinflusses zwischen Zellen und Lipoproteinen.

Übermäßige Expression von SR-B1 in Mäusen erniedrigte die Arterioskleroseentwicklung trotz ebenfalls erniedrigter HDL-C-Konzentration (91) und



der Knockout des SR-B1-Gens erhöhte die Arteriosklerose trotz Verdopplung der HDL-C-Konzentrationen (143).

### 1.7.3. Aktiver Transport

Dieser Transportmechanismus wird durch den Verbrauch von ATP angetrieben, er arbeitet aber im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mechanismen auch gegen einen vorbestehenden Konzentrationsgradienten. Hierfür muss das Carrier-Protein neben Ligandenbindungsstellen auch über eine Bindungsstelle für ATP verfügen. Wie erleichterte Diffusion ist aktiver Transport kompetitiv und sättigbar. Der Multidrug-Transporter MDR-1, welcher zur Familie der ATP-bindenden Kassetten (ABC)-Transmembrantransportern gehört, trägt neben seinem ATP-abhängigen Transport kleiner amphipathischer gelöster Stoffe (145) auch zum Efflux von freiem Cholesterin aus Säugetierzellen bei (98). Ein anderes Mitglied der ABC-Transporterfamilie, ABCA1, spielt ebenfalls im Efflux von Phospholipiden und freiem Cholesterin eine entscheidendere Rolle (26;27). Neuere Studien haben jedoch ergeben, dass ABCA1 zwar ATP-bindet, jedoch keine ATPase-Aktivität hat (138), das Zusammenspiel von Lipoproteinpartikeln und ABCA1 im Lipidefflux scheint komplex zu sein und wird daher genauer beschrieben:

Dieser Effluxmechanismus wurde in der Literatur auch als Apolipoprotein-vermittelter Efflux beschrieben (97;113;158). Er spiegelt den Transfer von Phospholipiden und freiem Cholesterin zu Lipid-freiem ApoA-I wieder, wobei der ABCA1-Transporter eine zentrale Rolle spielt (11;61). Dieser Mechanismus ist sättigbar, unidirektional und er vermindert den zellulären Pool an Cholesterinestern. Beeinflussende Faktoren, welche den Efflux vermindern, sind Proteolyse der Zellwand, Abwesenheit intakter ABCA1-Transporter (Tangier-Krankheit), Beeinflussung der Golgi-Apparat-Funktion [des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN) z.B. durch Brefeldin A] und Inhibition der Proteinkinase C und der Adenylylcyclase (74;105;106;121). Aktivierung der Proteinkinase C und cAMP erhöhen den Apolipoprotein-induzierten Efflux (106;129). In anderen Studien wiederum wurde gezeigt, dass cAMP in Makrophagen die Transkription von ABCA1 stimuliert (21).

Aus diesen Zusammenhängen wurden verschiedene Theorien über den Apolipoprotein-vermittelten Efflux entwickelt: Gemeinsam ist ihnen, dass Apolipoprotein-Bindung an einen bisher nicht eindeutig charakterisierten Membranrezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, welche zu einer Umschichtung des zellulären Lipidpools führt und an der das Cytoskelett und der Golgi-Apparat beteiligt sind, so dass sich letztendlich Phospholipide und freies Cholesterin zusammen mit Lipid-freien Apolipoproteinen vereinigen können [und prä- $\beta$ -HDL bilden] . Welche Rolle hier dem ABC1-Transporter zukommt, ist nicht eindeutig geklärt. Sehr wahrscheinlich scheint seine Relevanz für die Bildung von Prä- $\beta$ -HDL zu sein (48). Eine Theorie besagt, dass nicht freies Cholesterin sondern Phospholipid das primäre Substrat von ABCA1 sei, wobei im Extrazellulärraum mit lipidfreien Apolipoproteinen komplexierte Phospholipide ein Sammelbecken für freies Cholesterin bildet. Das FC, welches sich hauptsächlich in Cholesterin-reichen Domänen der Plasmamembran befindet, reagiert mit jenen ApoA-I/PL-Komplexen (prae- $\beta$ -HDL)(11;48). Gemäß einer anderen Theorie (97) hat ABCA1 eine Art „Lotsenfunktion“ für das „Sortieren und Verpacken“ verschiedenster Fracht in Transportvesikel, welche dann entweder für Exozytose, Endozytose oder Phagozytose bestimmt sind. (Diese Theorie beruht auf der Tatsache, dass ABCA1 bei der Sekretion von ApoE und Interleukin-1 $\beta$  mitwirkt (4;156) als auch unter anderem bei der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt ist (68).) Apolipoproteinbindung an Zellen vermittelt hier eine ABCA1-abhängige Kosekretion von Phospholipiden und Cholesterin in  $\beta$ -COP-haltigen Vesikeln ( $\beta$ -COP, eine von 7 Untereinheiten des „coatamer complexe“, der unter anderem für die Bildung und den Transport von Vesikeln durch den Golgi-Apparat wichtig ist, wurde im Kulturmedium in Verbindung mit Plasma-HDL gefunden). Faktoren, die die Expression von ABC1-Genen beeinflussen, sind als Transkriptionsfaktoren der Leber-X-Rezeptor sowie der Retinoid-X-Rezeptor, deren Liganden (Oxysterole bzw. Retinoide) die ABCA1-Expression induzieren (34).

Wie in Kapitel 1.6. bereits beschrieben, verursacht ABCA1-Defizienz bei Patienten mit Tangier-Krankheit die Abwesenheit lipidreicher  $\alpha$ -HDL im Plasma (27) sowie einen Defekt im zellulären Lipidefflux (95). Als Konsequenz häufen Tangier-Kranke und ABCA1-defiziente Mäuse Schaumzellen in verschiedenen Organen, speziell in denen

des Reticuloendothelialen Systems, an (7;104). Dennoch leiden nur einige und nicht alle Tangier-Patienten an vorzeitiger Entwicklung einer KHK (7;135).

#### **1.7.4. Komplexe (multimolekulare) Mechanismen**

Im Zusammenhang mit dem Apolipoprotein-vermittelten Efflux findet man in der Literatur auch den Terminus "Mikrosolubilisierung" (60;61): Unter Mikrosolubilisierung versteht man die spontane Assoziation von Phospholipiden der Zellmembran mit freien Apolipoproteinen. Ob zelluläre Rezeptoren oder Transporter (wie ABCA1) bei diesem Mechanismus eine Rolle spielen, ist unklar. Wesentliche Voraussetzung ist das extrazelluläre Vorliegen amphipathischer  $\alpha$ -Helices. Diese sind in den wasserlöslichen Apolipoproteinen A-I, A-II und E mehrfach vorhanden.

### **1.8. Enzyme und Transferproteine des HDL-Metabolismus**

Im Kapitel 1.4. wurden verschiedene Enzyme und Transferproteine erwähnt, die alle eine entscheidende Rolle im HDL-Metabolismus spielen. Im folgenden Kapitel soll auf diese Proteine genauer eingegangen werden.

#### **1.8.1. Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT)**

Die Pionierarbeit von Glomset (62;63) zeigte, dass das Plasmaenzym LCAT den Transfer einer freien Fettsäure von Phosphatidylcholin (PC, Lecithin) zu Cholesterin katalysiert, und so Cholesterinester bildet. Da Cholesterinester im Gegensatz zu Cholesterin nicht amphipatisch sind, können sie von der Oberfläche discoidaler HDL-Partikel ins Innere wandern, so dass sich sphärische  $\alpha$ -HDL bilden. Die initialen Produkte, kleine HDL<sub>3</sub>-Partikel, reifen durch fortlaufende Cholesterin-Veresterung zu größeren HDL<sub>2</sub>-Partikeln heran (42). Dies ermöglicht dem Partikel, eine beträchtliche Menge an Cholesterin aufzunehmen. Der Knockout des LCAT-Gens verursachte bei Mäusen HDL-Defizienz (128). Die übermäßige Expression von LCAT erhöhte bei Mäusen und bei Kaninchen die Plasma-HDL-Konzentration (16;73). Beim Menschen führt LCAT-Defizienz ebenfalls zu HDL-Defizienz. Bei bestimmten Mutationen ist

diese nur mit Trübungen der Kornea verknüpft (Fischaugenkrankheit), bei anderen zusätzlich mit Niereninsuffizienz und Anämie (93). Bei dieser speziellen Form der LCAT-Defizienz vermag LCAT kein Cholesterin in HDL, wohl aber in ApoB-haltigen Lipoproteinen zu verestern, so dass also ein selektiver Verlust von  $\alpha$ -LCAT besteht (59). Trotz offensichtlicher HDL-Defizienz ist die LCAT-Defizienz weder bei Patienten mit LCAT-Defizienz oder Fischaugenkrankheit noch bei Mäusen mit Knockout des LCAT-Gens mit vorzeitiger Entwicklung von Arteriosklerose assoziiert (130). Obwohl die übermäßige Expression von LCAT-Genen sowohl bei Mäusen als auch Kaninchen die HDL-C-Konzentrationen erhöhte, wirkte sich dies bei Kaninchen antiatherogen und bei Mäusen proatherogen aus (16;73). Diese Unstimmigkeit wird teilweise durch das Fehlen von CETP bei Mäusen erklärt: Ko-Expression von CETP und LCAT reduziert in transgenen Mäusen sowohl die HDL-C-Konzentrationen als auch die Entwicklung von Arteriosklerose (49). Folglich scheinen LCAT und CETP zu einem exakt eingestellten Regulationssystem beizutragen, wohingegen exzessive LCAT-Aktivität nur zur Plasma-Anreicherung lipidreicher aber dysfunktionaler HDL führt.

### **1.8.2. Phospholipid-Transferprotein (PLTP)**

Ebenso wie LCAT ist auch PLTP wichtig für die Generation von HDL-Partikeln (11). Die Oberfläche Triglyzerid-reicher Lipoproteine (VLDL und Chylomicronen) besteht aus einem Phospholipid-Monolayer, von dem bei der Lipolyse ein Großteil frei wird. Aus dieser Phospholipidquelle werden mit Hilfe von PLTP prä- $\beta$ -HDL gebildet (140). Ebenso vermittelt PLTP die Verschmelzung kleinerer HDL<sub>3</sub>-Partikeln sowohl untereinander als auch mit jenen Oberflächen-Überbleibseln lipolysierter Triglyzerid-reicher Lipoproteine (sogenannten „Remnants“), so dass größere HDL<sub>2</sub>-Partikel entstehen (102). Studien an Tiermodellen haben ergeben, dass mäßige Über-Expression von PLTP die HDL-C-Konzentrationen im Plasma erhöht. Sowohl gesteigerte Über-Expression als auch der Knockout des PLTP-Gens hingegen erniedrigen die HDL-Konzentration. Dies spiegelt wider, dass PLTP einerseits die Bildung großer HDL aber auch die Freisetzung kleiner HDL vermittelt (86;87). Übermäßige Expression von PLTP erhöht auch die Fähigkeit des Plasmas, Cholesterin aus Zellen freizusetzen (144). Eine mögliche Erklärung dieser Tatsache ist, dass PLTP zu einer gesteigerten Bildung von

prä- $\beta$ -HDL beiträgt, die als initiale Akzeptoren von in Zellen entstandenem Cholesterin dienen.

### 1.8.3. Cholesterinester-Transferprotein (CETP)

CETP ist (im Gegensatz zu PLTP) an der Konversion größerer HDL<sub>2</sub> Partikel in kleinere HDL<sub>3</sub> Partikel beteiligt (158). Dies geschieht durch den CETP-vermittelten Austausch von Cholesterinestern großer HDL<sub>2</sub> und Triglyzeriden der VLDL, IDL (Intermediate Density Lipoproteinen) und LDL. CETP ist auch für den Austausch von Cholesterinestern zwischen LDL und VLDL verantwortlich. Dieser Transfer wird durch ApoF gehemmt, der Austausch zwischen HDL und VLDL wird jedoch durch ApoF aktiviert (109;160).

In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen ist bei Individuen mit CETP-Defizienz der HDL-Katabolismus beeinträchtigt, so dass die HDL-C- Konzentration erhöht ist (80). Bei Patienten mit (postprandialer) Hypertriglyzeridämie ist hingegen die Cholesterinester-Transferaktivität erhöht (unabhängig von der CETP-Masse), was zu niedrigen HDL-Cholesterinwerten führt, da CETP LDL mit Cholesterin anreichert und HDL von Cholesterin befreit (50).

Die CETP-Expression wird gesteigert durch die Aktivierung des Sterol Regulatory Element Binding Protein durch Cholesterin (33) und des Leber-X-Rezeptors / Retinoid-X-Rezeptors durch Oxysterole bzw. Retinoide (101).

Obwohl sie mit erhöhten HDL-C-Konzentrationen verbunden waren, waren verschiedene Strukturvarianten von CETP beim Menschen mit erhöhten KHK-Ereignissen assoziiert (3;141). Im Gegensatz hierzu war ein Taq-1-Polymorphismus des CETP-Gens mit einer erhöhten HDL-C-Konzentration und einem erniedrigten KHK-Risiko assoziiert (114). Immunisierung von Kaninchen mit CETP hemmte die CETP-Aktivität, erhöhte die HDL-C-Konzentrationen und reduzierte die Entwicklung von Arteriosklerose (122). Übermäßige Expression von CETP-Genen vom Menschen oder vom Affen führte bei Mäusen zu erniedrigten HDL-C-Werten und in einigen Fällen zu erhöhter Arterioskleroseentwicklung (49;69;103;141).

Ob CETP-Hemmung die Entwicklung von Arteriosklerose verhindert oder fördert, scheint vom Vorhandensein oder der Abwesenheit anderer Dyslipidämien abhängig zu

sein. CETP scheint bei vorliegender Hypercholesterinämie proatherogen und bei Hypertriglyceridämie und Hyperalphalipoproteinämie antiatherogen zu sein (81).

#### **1.8.4. Hepatische Lipase (HL) und Endotheliale Lipase (EL)**

Gemeinsam mit CETP vermittelt die Hepatische Lipase die Konversion Cholesterinester-reicher HDL<sub>2</sub> in kleinere HDL<sub>3</sub> (142). HL katalysiert dabei die Hydrolyse von Phospholipiden in den HDL<sub>2</sub>-Partikeln, und CETP tauscht, wie oben beschrieben, in Gegenwart von Triglyzerid-reichen Lipoproteinen deren Triglyzeride mit den Cholesterinestern der HDL-Partikel. Die entstandenen Triglyzerid-reichen HDL sind wiederum Substrat der Hepatischen Lipase, die nun (durch ihre breite Substratspezifität) deren Triglyzeride und Phospholipide hydrolysiert und sie so in kleinere HDL<sub>3</sub> verwandelt. Indem HL die selektive Lipidaufnahme in Hepatozyten durch den SR-B1 (s. Kapitel 1.5.2.) direkt fördert (94), trägt sie ebenso zur Konversion von HDL-Partikeln bei. HL-Defizienz führt beim Menschen zu erhöhten Konzentrationen großer HDL-Partikel und Lipoprotein-Remnants (70). In Tiermodellen erniedrigt übermäßige Expression des HL-Gens die Konzentrationen von HDL- und Lipoprotein-Remnants (25;45).

Im Unterschied zur HL ist die Endotheliale Lipase eine reine Phospholipase (119). Es wird angenommen, dass sie eine regulative Rolle im HDL-Metabolismus spielt, da EL bei übermäßiger Expression in Mäusen sowohl HDL-Cholesterin- als auch ApoA-I-Spiegel deutlich senkt (83).

### **1.9. Experimentelle „Messbarkeit“ der antiatherogenen Funktionen von HDL**

Ein hoher HDL-Cholesterinwert schützt nicht zwangsläufig vor der Entwicklung einer Arteriosklerose, sondern ist unter bestimmten metabolischen Verhältnissen eher mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert. Hypertriglyzeridämische Teilnehmer mit hohen HDL-C-Werten hatten in der Copenhagen City Heart Studie und in der PROCAM Studie ein höheres KHK-Risiko als hypertriglyzeridämische Probanden mit mittleren HDL-Werten (84;159).

Verschiedene Argumente sprechen gegen einen kausalen Zusammenhang von KHK und HDL-Cholesterin (158): Erstens ist die Verbindung zwischen HDL-C und Sterblichkeit aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse eher U-förmig als linear. Das heißt, dass kardiovaskuläre Todesraten bei Individuen mit sehr hohen HDL-C-Konzentrationen höher sind als bei solchen mit mittleren HDL-C-Konzentrationen (38). Zweitens erklärten in ökologischen Studien beträchtliche Unterschiede in den HDL-C-Konzentration zwischen ethnischen Populationen nicht die Unterschiede in kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität (17). Drittens wird eine niedrige HDL-C-Konzentration in einigen Populationen als Komponente des metabolischen Syndroms gefunden (zusammen mit Hypertriglyzeridämie, pathologischer Glukosetoleranz bzw. Typ 2-Diabetes, Hyperurikämie, Hypertonie und stammbetonter Adipositas) (71). Insulinresistenz scheint bei diesen kardiovaskulären Risikofaktoren eine gemeinsame Ursache zu sein. Als Konsequenz kann man hieraus einerseits schlussfolgern, dass Patienten mit dem metabolischen Syndrom, bei denen eine niedrige HDL-C-Konzentration mit vielen zusätzlichen Risikofaktoren für Koronarereignisse verknüpft ist, von den Patienten unterschieden werden müssen, die eine niedrige HDL-C-Konzentration als isolierten Risikofaktor aufweisen (148). Andererseits liegt bei Patienten mit dem metabolischen Syndrom der inversen Beziehung von HDL-C und dem kardiovaskulären Risiko eher die Insulinresistenz und/oder die proatherogenen Anteile des metabolischen Syndroms zugrunde als die antiatherogenen Funktionen von HDL (41). Viertens dient niedriges HDL-C (als negatives Akute-Phase-Protein) als ein Surrogat-Marker für systemische Entzündungen, die Arteriosklerose verursachen oder verschlimmern können (z.B. chronische Infektionen), sowie als Marker für lokale Entzündung, besonders in unstablen Plaques (44). In der European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities (ECAT)-Angina Pectoris-Studie, in der niedrige HDL-C- und ApoA-I-Konzentrationen als wichtigster biochemischer Risikofaktor für Koronarereignisse bei Patienten mit angiographisch gesicherter KHK identifiziert wurde, hatte HDL-C keine Verbindung mit Koronarereignissen, wenn die Plasmakonzentrationen von C-reaktivem Protein (CRP) oder Fibrinogen als Vertreter der positiven Akute-Phase-Proteine niedrig waren (20). Fünftens ist die medikamentöse Steigerung von HDL-C durch Statine, Fibrate oder Östrogene in einigen Studien mit

einer Verminderung von KHK korreliert (18;148), in anderen Studien hingegen gibt es keine diesbezüglichen Korrelationen (1;65).

Ein erhöhtes koronares Risiko in Verbindung mit niedrigen HDL-Cholesterinkonzentrationen deuten also nicht zwangsläufig auf ein defektes antiatherogenes Reparatursystem, ebensowenig wie therapeutisch hervorgerufene Änderungen der HDL-C-Konzentration immer zu den erwarteten klinischen Ergebnissen führen. Aus den in den vorangehenden Kapiteln und in diesem Abschnitt zusammengefassten klinischen und tierexperimentellen Daten bisheriger Studien soll deutlich werden, dass aufgrund der Komplexität der verschiedenen antiatherogenen Funktionen der HDL diese im Einzelnen messbar gemacht werden müssen, um so ihre Bedeutung in der Verhinderung der Entstehung von Arteriosklerose einschätzen und gewichten zu können. So wurde in früheren Studien die Fähigkeit des Plasmas bestimmt, radioaktiv markiertes Cholesterin aus Fibroblasten oder Leberzellen freizusetzen (39;76;78), um so auf die antiatherogene Funktion des Plasmas schließen zu können.

Da diese Versuche aufgrund der hierzu notwendigen Kultivierung von Zellen langwierig und aufwendig waren, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Zellen durch künstliche Cholesterin-Trägerstoffe zu ersetzen, um so ein praktikables Verfahren zu entwickeln, um eine wichtige antiatherogene Funktionen des Plasmas messen zu können.

### **1.10. Cholesterinaufnahme-Kapazität (CAK) des Plasmas**

Die Cholesterinaufnahme-Kapazität des Plasmas wird definiert als die Fähigkeit des Plasmas, von einem künstlichen Cholesterinträger während einer bestimmten Inkubationszeit mit diesem Trägerstoff möglichst viel Cholesterin zu akzeptieren.

In dieser Studie wurde als Trägerstoff ein Silikat mit  $^3\text{H}$ -Cholesterin angereichert, um dann mit Plasmen inkubiert zu werden. Wie schon im letzten Kapitel (1.9.) erwähnt, gab es zuvor diverse experimentelle Modelle, in denen Zellen als Cholesterinquelle eingesetzt wurden, um die Cholesterinefflux-Kapazität zu testen: So wurden, um den Cholesterinefflux aus Zellen und die anschließende Cholesterinverteilung im Plasma sowie den verschiedenen Plasmaproteinen zu untersuchen, Versuche mit radioaktiv markiertem Cholesterin (oder anderen markierten Sterolen) angereicherten Fibroblasten



durchgeführt (31;74-78;106;134;153-155). In vergleichbaren Versuchen wurden Makrophagen (36;85;129;139) oder auch spezielle Hepatozyten (Fu5AH-Zellen) (10;39;164) als Cholesterinquelle eingesetzt. Im Unterschied zu den Versuchen mit Zellen ist einerseits die Handhabung mit einem Silikat praktikabler, andererseits ist offensichtlich, dass dem Silikat wichtige Eigenschaften, wie eine Plasma-Membran oder Rezeptoren, zur Interaktion mit Lipoproteinen und anderen Plasmafaktoren fehlen. Wie entscheidend diese Unterschiede zwischen dem Silikat und Zellen als Cholesterinquelle sind bzw. ob es statistische Übereinstimmungen oder Vergleichbarkeiten gibt, soll unter anderem in dieser Arbeit dargestellt werden.

## **2. Fragestellung:**

In dieser Arbeit sollte ein Testverfahren validiert werden, bei dem die Kapazität des Plasmas bestimmt wird,  $^3\text{H}$ -Cholesterin aus einem Silikat zu lösen und aufzunehmen. Hierfür wurden Vorversuche mit Plasmen sowohl klinisch gesunder Probanden als auch von Patienten mit unterschiedlichen HDL-Defizienzen durchgeführt, um Reproduzierbarkeit und Plausibilität zu prüfen.

Es wurde außerdem geprüft, ob die Fähigkeit des Plasmas, Cholesterin aus dem Silikat zu lösen und aufzunehmen (CAK) mit der Plasma-Fähigkeit, Cholesterin aus Zellen freizusetzen (Cholesterin-Efflux), und / oder auch mit anderen Parametern des Lipidstoffwechsels korreliert. Um diese Zusammenhänge zu untersuchen, wurden bei einem großen Patientenkollektiv Korrelationen zwischen der CAK und Lipidkonzentrationen, Aktivitäten der am HDL-Metabolismus beteiligten Enzyme sowie messtechnisch ermittelter Cholesterin-Efflux-Daten angestellt.

Ebenso wurde untersucht, ob sich die Plasma-Cholesterinaufnahme-Kapazität bei Patienten mit bekannter familiärer Hypercholesterinämie (FH) in Abhängigkeit der bei diesen Patienten durchgeführten LDL-Apherese signifikant veränderte.

### **3. Patienten:**

#### **3.1 Patienten mit HDL-Defizienz**

Der Einfluss von HDL auf die Cholesterinaufnahme-Kapazität wurde mir Hilfe von Plasmen von Patienten mit HDL-Defizienzen unterschiedlicher Ursache (s. Tabelle 2) untersucht. Alle hier aufgeführten Fälle von HDL-Defizienz werden autosomal rezessiv vererbt. Im Falle von Tangier-Krankheit ist die Mutation homozygot (19;125). Für die Apo A-I-Defizienz sind die Patienten gemischt heterozygot für ein Null-Allel und eine Missense-Mutation (107). Bei der Fischaugenkrankheit sind die Patienten wiederum homozygot für die Mutation (59).

**Tabelle 2: Übersicht über verschiedene Ursachen der HDL-Defizienz**

<b>Krankheit</b>	<b>Genprodukt (/defekt)</b>	<b>Referenz</b>
Tangier-Krankheit	ABCA1 (N875S)	(19;125)
Apo A-I-Defizienz	Apo A-I (L141R) <sub>PISA</sub> Apo A-I (5fs) <sub>PISA</sub>	(107)
Fischaugenkrankheit	LCAT (T123I)	(59)

#### **3.2. LDL-Apherese-Patienten**

3 Patientinnen, die wegen einer ausgeprägten, therapieresistenten Hypercholesterinämie mit LDL-Apherese behandelt wurden, wurden Blutproben unmittelbar vor der Behandlung, unmittelbar nach der Behandlung sowie zu mehreren Zeitpunkten zwischen 2 Behandlungen entnommen. Als Kontrollen wurde jeder Patientin ein gesunder Proband zugeordnet, dem zu jeweils vergleichbaren Zeitpunkten Blut entnommen wurde. In allen Fällen der Apherese wurde das DALI-Verfahren der Firma

Fresenius (Fresenius, St. Wendel, Deutschland) eingesetzt (23). Zusätzlich nahmen die Patientinnen HMG-CoA-Reduktase-Hemmer zur medikamentösen Behandlung der Hypercholesterinämie ein. Die Patientinnen hatten der Teilnahme an dieser Studie nach eingehender Aufklärung zugestimmt.

### **3.3. Klinisches Kollektiv**

68 postmenopausale Frauen im Alter von 45 bis 60 Jahren mit einem body mass index (BMI) von 20-28 kg/qm nahmen an einer randomisierten, Plazebo-kontrollierten Doppel-Blind-Studie teil (149). Postmenopausaler Status wurde definiert auf der Basis von entweder vorher stattgefundenener Ovariectomie oder einem vergangenen Zeitraum von 12 Monaten seit der letzten Regelblutung, Serum-Werte von FSH (Follikelstimulierendem Hormon) > 50 IU/l und Serum-Werte von Estradiol < 70 pmol/l. Ausgeschlossen wurden alle Frauen, die innerhalb der letzten drei Monate Hormone oder lipidsenkende Medikamente eingenommen hatten, die eine klinisch signifikante Krankheit hatten, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie (Plasma-Gesamtcholesterin > 8 mmol/l), Hypertriglyzeridämie (Nüchtern-Plasma-Triglyzeride > 4 mmol/l), die in ihrer Vergangenheit Alkohol- oder Drogenmissbrauch betrieben hatten, die eine positive Hepatitis- oder HIV-Serologie hatten oder die mehr als 10 Zigaretten pro Tag rauchten.

Der klinische Teil der Studie wurde am IPHAR Institut für Klinische Pharmakologie GmbH (Höhenkirchen-Siegeretsbrunn, Deutschland) durchgeführt. Die Frauen nahmen an Screening-Untersuchungen an den Tagen -52 bis -10 vor dem Start der Medikamentenbehandlung teil. Den Frauen, welche die Teilnahmebedingungen erfüllten, wurde an den Tagen -10 bis -6 ('baseline A') und -1 ('baseline B') und an den Tagen 68 bis 80 ('cycle 3 visit A') und den Tagen 77 bis 85 ('cycle 3 visit B') Blut abgenommen, sie wurden befragt und untersucht. Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Standards der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Bayerischen Ärztekammer genehmigt. Die Teilnahme an der Studie war freiwillig.

34 randomisierte Frauen erhielten 2,5 mg Tibolon pro Tag ('Livial', NV Organon, Oss, Niederlande) und 34 Frauen erhielten Plazebo-Tabletten. Der Behandlungszeitraum umfasste 84 Tage.

## **4. Methoden:**

### **4.1 Blutentnahmebedingungen**

Den Patient(inn)en wurde Blut abgenommen, nachdem sie vorher mindestens die Nacht lang nüchtern geblieben sein mussten. Streptokinase-antikoaguliertes Blut (100 IU/ml) wurde abgenommen für die Bestimmung der Cholesterin-Efflux-Kapazität, Serum-Blut für die Quantifizierung von Lipiden, Lipoproteinen, Apolipoproteinen und HDL-Unterklassen und EDTA-Blut für die Bestimmung der Plasma-Aktivitäten von ApoA-IV, prae $\beta$ -LpA-I,  $\alpha$ -LpA-I, LCAT, CETP und PLTP (149). Bei baseline visit B und cycle 3 visit B folgte der Gewinnung dieser Blutproben eine sofortige intravenöse Injektion von 70 IU Heparin pro kg Körpergewicht. Das EDTA-Blut wurde nach 15 Minuten gewonnen für die Bestimmung der lipolytischen Enzyme. Antikoaguliertes Blut wurde sofort auf Eis gekühlt. Die Plasmen und Seren wurden durch Zentrifugation bei 4°C (2000 U/min, 15 Minuten) gewonnen, in Aliquots aufgeteilt und bei -70°C eingefroren. Die in München gewonnen Proben der Tibolonstudie wurden auf Trockeneis zu den beteiligten Laboratorien in London (Department of Cardiovascular Biochemistry, St. Bartholomew`s and the Royal School of Medicine and Dentistry, Charterhouse Square, London, UK; prae $\beta$ -LpA-I,  $\alpha$ -LpA-I und Hepatozyten-Cholesterin-Efflux), Innsbruck (Institut für Medizinische Biologie und Genetik, Innsbruck, Österreich; apoA-IV) und Münster (Deutschland; Cholesterin-Efflux-Kapazität, CETP, PLTP, LCAT, Lipide, Lipoproteine, Apolipoproteine und HDL-Unterklassen) transportiert.

### **4.2 Quantifizierung von Lipiden, Lipoproteinen, Apolipoproteinen und HDL-Subklassen**

Ein Hitachi 917 Autoanalysator und Tests der Firma Roche diagnostics (Mannheim, Deutschland) wurden für die enzymatische Quantifizierung der Serum-Konzentration von Triglyzeriden, Gesamtcholesterin und HDL-Cholesterin im Institut für Klinische Chemie und Labormedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

(Direktor: Prof. Dr. med. G. Assmann) verwendet. Die LDL-Cholesterin-Konzentration wurde nach der Friedewald-Formel errechnet (Friedewaldformel: LDL-Cholesterin = Gesamtcholesterin – HDL-Cholesterin – 0,2 x Triglyceride (58)). Die Intra- und Interassay-Variationen (cv- coefficients of variation) waren geringer als 5%.

Die Konzentrationen von Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SPM) im Serum und im Serum-HDL wurden unter der Verwendung von Reagenzien der Firma Roche diagnostics und einem Cobas Mira Autoanalysator (Roche, Basel, Schweiz) enzymatisch bestimmt (132;133). Hierbei wurde nach folgendem Testprinzip vorgegangen:

1. Phosphocholin wurde aus PC durch Phospholipase C bzw. aus SPM durch Sphingomyelinase enzymatisch abgespalten.
2. Cholin wurde aus Phosphocholin durch Phosphatase enzymatisch abgespalten.
3. Cholin wurde durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert, in einer Farbreaktion sichtbar gemacht und Photometrisch gemessen.

Für die Bestimmung von PC und SPM in HDL wurde HDL durch Präzipitation ApoB-haltiger Lipoproteine durch magnetische Beads gemäß des Herstellerprotokolls der Präzipitationsreagenz (Reference diagnostics, Bedford, MA, USA) gewonnen. Die Intra- und Interassay-Variationen waren geringer als 15%.

Zur Bestimmung der Konzentration von Lipoprotein(a), ApoA-I, ApoA-II und ApoB wurden Immun-Trübungstests verwendet (Lp(a): Immuno, Wien; ApoA-I, ApoA-II und ApoB: Roche diagnostics). Die Variationen für diese Tests waren kleiner als 7%.

Die Konzentrationen von ApoA-IV und ApoE wurden wie bereits beschrieben (76;123) mit Hilfe von Enzymimmunoassays gemessen. Für die Bestimmung von ApoE in HDL wurden ApoB-haltige Lipoproteine durch Phospho-Wolframsäure/MgCl<sub>2</sub> (Roche diagnostics) gefällt und ApoE im Überstand mittels ELISA bestimmt (6). Die Konzentration der HDL-Unterklasse LpA-I wurde durch einen differentiellen Elektroimmunodiffusionsassay (Hydragel LpA-I, Sebia, Frankreich) bestimmt. Die Intra- und Interassay-Variationen waren kleiner als 10%.

Die Konzentration von HDL-Unterklasse LpA-I/A-II wurde als Differenz zwischen der Gesamt-ApoA-I-Konzentration und der LpA-I-Konzentration berechnet (118).

Zur Bestimmung der prä-β-LpA-I- und der α-LpA-I-Konzentration wurde die zweidimensionale Immunelektrophorese verwendet (112). Kurz zusammengefasst

wurde nach Agarose-Gel-Elektrophorese in der ersten Dimension senkrecht zu deren elektrischer Feldachse eine zweite Elektrophorese durchgeführt, deren Agarose-Gel Antikörper gegen menschliches ApoA-I enthält. Nach Anfärben mit Coomassie-Blau wurden die entsprechenden Bereiche der Antigen-Antikörper-Komplexe mit Praeß-Mobilität („Praeß-LpA-I“) und alpha-Mobilität („ $\alpha$ -LpA-I“) quantifiziert, absolute Konzentrationen wurden dann errechnet durch Multiplikation dieser entsprechenden Bereiche mit der ApoA-I-Serumkonzentration. Die Intraassay-Variation war kleiner als 11%.

### **4.3. Quantifizierung von lipolytischen Enzymen und Lipid-Transferproteinen**

Die Konzentration von Lipoproteinlipase (LPL) im Post-Heparin-Plasma wurde mittels des Markit-F Immunoassay (Immundiagnostik GmbH, Bensheim, Deutschland) bestimmt (79). Die Aktivität der Hepatischen Lipase im Post-Heparin-Plasma wurde bereits mit einem kommerziellen fluorimetrischen Assay (WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland) gemessen (163). Die LCAT-Aktivität (Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase) wurde bestimmt als die Fähigkeit des Plasmas, radioaktiv markiertes Cholesterin in exogen hergestelltem HDL zu verestern (150). Die CETP-Aktivität (Cholesterin-Ester-Transfer-Protein) wurde bestimmt als die Fähigkeit des Plasmas, radioaktiv markiertes Cholesterin von exogen hergestelltem HDL zu LDL zu transferieren (150). PLTP-Aktivität (Phospholipid-Transfer-Protein) wurde bestimmt als der Transfer radioaktiv markierten Phosphatidylcholins von künstlich hergestellten Phospholipid-Vesikeln zu HDL<sub>3</sub> (82) Alle genannten Tests wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Intraassay-Variationen waren für alle Tests kleiner als 8%.

### **4.4. Bestimmung der Cholesterinefflux-Kapazität aus Zellen**

Die Cholesterinefflux-Kapazität des Plasmas wurde bestimmt als die Fähigkeit des Plasmas, radioaktiv markiertes Cholesterin entweder aus kultivierten Haut-Fibroblasten (76;78) oder einer transformierten Ratten-Hepatoma-Zelllinie (Fu5AH) (10;39;164) freizusetzen.



1) Cholesterinefflux aus Fibroblasten: Die aus einem Hautbiopsat eines Menschen gewonnenen Fibroblasten wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> (T 75) mit 15 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Serva, Heidelberg), incl. 10% fetales Kälberserum (FCS, PAA, Cölbe) und 1% Antibiotikum (AB, Ciprobay) kultiviert. Die Zellen wuchsen bis zur Konfluenz, wobei sie dreimal wöchentlich mit PBS gewaschen wurden und ihr Medium gewechselt wurde. Zur Passagierung der Zellen wurde 10% Trypsin/EDTA verwendet, nachdem sie zuvor mit PBS gewaschen worden waren. Um eine optimale Einwirkzeit zu bestimmen, wurde der Trypsinisierungsprozeß unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Durch Zusatz von DMEM/10% FCS/1%AB wurde der Trypsinisierungsvorgang gestoppt, da der Serumzusatz für eine Trypsin-Inaktivierung verantwortlich ist. Das gesamte Gemisch wurde abzentrifugiert, um das zytotoxische Trypsin/EDTA Gemisch zu entfernen. Das dadurch erhaltene Zell-Pellet wurde mit DMEM/10% FCS/1% AB resuspendiert und die Zellzahl wurde mittels Casy-1 Zellzählgerät (Schärfe-System, Reutlingen) ermittelt.

Für die eigentlichen Versuche wurden  $1 \times 10^5$  Fibroblasten in DMEM, welches 10% FCS enthielt, in 2 cm durchmessenden Dishes von 4-well-Platten angezchtet. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen mit 0,05 mCi (1,2-<sup>3</sup>H)-Cholesterin (New England Nuclear, Boston, MA, USA, 51,7 Ci/mmol) pro Vertiefung beladen. Die benötigte Menge an (1,2-<sup>3</sup>H)-Cholesterin wurde unter Stickstoff abgedampft und mit FCS für 4 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das FCS steril filtriert und zu serumfreien DMEM hinzugegeben, so dass das Medium eine FCS-Endkonzentration von 10% hatte. Die Platten wurden zur Radio-Markierung der Zellen für 48 Stunden bei 37°C und CO<sub>2</sub>-Begasung in den Brutschrank gestellt. Nach der Radio-Markierung wurden die Fibroblasten sechsmal mit Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten mit 0,5 ml DMEM, welches 50 µl des Streptokinaseplasma enthielt, inkubiert. Nach einer Minute wurde ein Aliquot von 50 µl abgenommen und in 150 µl 0,15M NaCl suspendiert. Die Inkubation der Zellen mit dem verbleibenden Medium wurde für weitere 59 Minuten fortgesetzt. Danach wurde das Medium abgenommen und in Eppendorfhütchen überführt, auf Eis gelegt und mit 50 µl 2mM DTNB (Dithionitrobenzol) zur Inaktivierung der LCAT versetzt. Um eventuellen Zelldetritus aus den Medien zu beseitigen, wurden diese durch Zentrifugation bei 3000 U/min für 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände

wurden nach der Zentrifugation abgenommen. Von dem Überstand nach einer Minute wurden 100 µl und von dem Überstand nach 60 Minuten wurden 25 µl zur Bestimmung der Radioaktivität in die Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Zellen wurden mittels 0,5 ml 0,1 mol/l NaOH unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst und mittels Ultraschall homogenisiert. Von dieser Suspension wurden 25 µl in Szintillationsflüssigkeit gegeben, um deren Radioaktivität zu bestimmen. Nach intensivem Vortexen wurden die Radioaktivität der Proben im Szintillationsspektrometer gemessen.

Der Fraktionelle Cholesterinefflux wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Fraktionelle Cholesterineffluxrate} &= \text{cpm}_{\text{Medium}} / (\text{cpm}_{\text{Medium}} + \text{cpm}_{\text{Zellen}}) \times 100\% \\ \text{nach 1 Minute} &= \text{cpm}_{\text{Medium}1} / (\text{cpm}_{\text{Medium}1} + \text{cpm}_{\text{Medium}60} + \text{cpm}_{\text{Zellen}}) \times 100\% \\ \text{nach 1 Stunde} &= \text{cpm}_{\text{Medium}60} / (\text{cpm}_{\text{Medium}1} + \text{cpm}_{\text{Medium}60} + \text{cpm}_{\text{Zellen}}) \times 100\% \end{aligned}$$

Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen in Serien von 9 Proben plus 2 Kontrollplasmen durchgeführt; Ergebnisse wurden akzeptiert, wenn die jeweiligen Doppelbestimmungen nicht mehr als 20% voneinander abweichen. Mit Hilfe eines Pool-Plasmas (Kontrolle), welches bei -70°C gelagert wurde, wurde die Unpräzision von Serie zu Serie ermittelt. Mögliche Abweichungen der Patientenproben wurden um die Abweichungen von diesem Pool-Plasmas korrigiert.

2) Cholesterinefflux aus Fu5AH-Zellen: Die Zellen wurden in Plastik-Flaschen (Costar T75), welche Eagle's minimal essential medium (MEM; Gibco BRL) versetzt mit 5% Kälberserum (KS) enthielten, kultiviert. Gentamicin (Sigma Chemicals Co) war in allen Medien enthalten. Für die Versuche wurden die Zellen in Costar 6-well-Platten (35 mm Durchmesser pro Vertiefung) angezchtet, wobei 100 000 bis 200 000 Zellen pro Vertiefung in MEM / 5% KS für 2 Tage bei 37°C in befeuchteter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wuchsen. Radioaktiv-markiertes Cholesterin ([1,2-<sup>3</sup>H]-Cholesterin, New England Nuclear) wurde den Zellen hinzugefügt (1 bis 2 µCi / Vertiefung in einer Endkonzentration von 0,1% Ethanol versetzt mit 25% KS in MEM, welches dann zu einer Endkonzentration von 5% in MEM verdünnt wurde). Die Zellen wuchsen für weitere 2 Tage in Gegenwart des Markers, um konfluierende Monolayer zu erhalten. Während dieser Zeit wechselte radioaktiv markiertes Cholesterin in alle Zell-Pools. Um

sicherzustellen, dass der Marker gleichmäßig unter den Zell-Pools verteilt wurde, wurde das Marker-Medium durch MEM, welches 1% Rinderserum-Albumin (RSA) enthielt, ersetzt, und die Zellen wurden im albuminhaltigen Medium für 18 bis 20 Stunden inkubiert. Das Efflux-Potential des Serums wurde getestet, indem die individuellen Proben der Patienten-Sera bei 37°C mit den markierten Zellen inkubiert wurden und anschließend die Dosis an radioaktiv markiertem Cholesterin, die an das serumhaltige Medium freigesetzt wurde, quantifiziert wurde. In den meisten Tests wurden Serum-Proben bei einer Konzentration von 5% verwendet und die Zellen wurden für 4 Stunden dem Akzeptor-Serum ausgesetzt. 3 Vertiefungen mit Zellen wurden mit jeder Serum-Probe inkubiert. Serum-Proben wurden bei -70°C gelagert und dann schnell aufgetaut, gründlich gemixt und mit MEM verdünnt, direkt bevor sie den Zellen hinzugefügt wurden. Die Freisetzung des radioaktiv markierten Cholesterins wurde gemessen in einem Aliquot des Mediums anhand von Standard Liquid Scintillation Counting. Die Efflux-Phase wurde beendet, indem das serumhaltige Medium aus der entsprechenden (die Zellen enthaltenden) Vertiefung entfernt wurde. Das Medium wurde in einem Eisbad gekühlte Tubes gefüllt und für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert, um eventuelle Zellreste zu entfernen. Das zellfreie Medium wurde bei 0°C gehalten, bevor es bei -70°C für weitere Analysen eingefroren wurde. Am Ende der Efflux-Periode wurden die Zellen mit Phosphat-Puffer (PBS) gewaschen. Die zellulären Lipide wurden durch eine nächtliche Inkubation mit Isopropanol bei Raumtemperatur extrahiert, zelluläre Radioaktivität wurde in einem Aliquot des Extraktes bestimmt. Der Fraktionelle Efflux wurde bestimmt als der Anteil des Markers, der an das Medium freigesetzt wurde, dividiert durch den totalen Marker in jeder Vertiefung (s.o.).

#### **4.5. Bestimmung der Cholesterinaufnahme-Kapazität des Plasmas**

Für die Durchführung der Bestimmung wurden folgende Materialien verwendet:

- 1) Streptokinase: Produkt der Firma SIGMA, Katalog-Nr. S 3134 (SIGMA, D-82024, Taufkirchen)
- 2) Trisichol: Silikat mit Tritium-Cholesterol gekoppelt. Da Trisichol Teil eines patentierten Verfahrens ist, waren genauere Angaben von Seiten des Herstellers

nicht angegeben worden. (Hersteller: Dr. med. Stefan Csögör, D-38524 Sassenburg/Triangel)

- 3) Szintillationsflüssigkeit: Instant Scint-Gel II Plus der Firma Packard, Katalog-Nr. 6013068 (Canberra-Packard GmbH, D-63303 Dreieich)
- 4) Beta-Counter: 1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter (LKB Wallac, FIN-20101 Turku)

Bevor die Efflux-Kapazität der Patientenplasmen bestimmt wurde, wurden diverse Vorversuche mit verschiedenen Probensera durchgeführt, in denen die Effekte von Inkubationszeit, Lagerungszeit des Plasmas, Zusatz von DTNB, Antikoagulanzen, Trisichol-Masse usw. variiert wurden. Die Resultate dieser Vorversuche werden im Ergebnisteil dargestellt. Für die Untersuchung von Patientenplasmen wurden letztlich folgende Bedingungen gewählt:

- 1) Das aus Streptokinase-antikoagolierem Blut (100 IU/ml) durch Zentrifugation gewonnene Plasma wurde mit Phosphatpuffer (PBS) verdünnt (100 µl Plasma / 400 µl PBS) und im Vortexer vermischt, so dass 20%iges Plasma für die Versuche zur Verfügung stand.
- 2) Je ein Eppendorf-Hütchen wurden 100mg Trisichol gefüllt
- 3) Das verdünnte Plasma wurde in die mit Trisichol präparierten Eppendorf-Hütchen pipettiert und im Vortexer verschüttelt.
- 4) Direkt im Anschluss inkubierte das Plasma für 1 Stunde im Schüttler.
- 5) Das Plasma wurde in einer Zentrifuge bei 10 000 U/min (für 10 Minuten) vom Silikat getrennt.
- 6) Aus dem Plasma-Überstand wurden 100 µl in ein Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und für 1 Stunde im Überkopftaumler verschüttelt.
- 7) Die Radioaktivität wurde im Beta-Counter bestimmt.

Es wurde in Serien gemessen, wobei die Serien nie mehr als sechs Patientenproben pro Serie umfassten und sowohl direkt vor als auch nach jeder Serie eine Kontroll-Probe aus

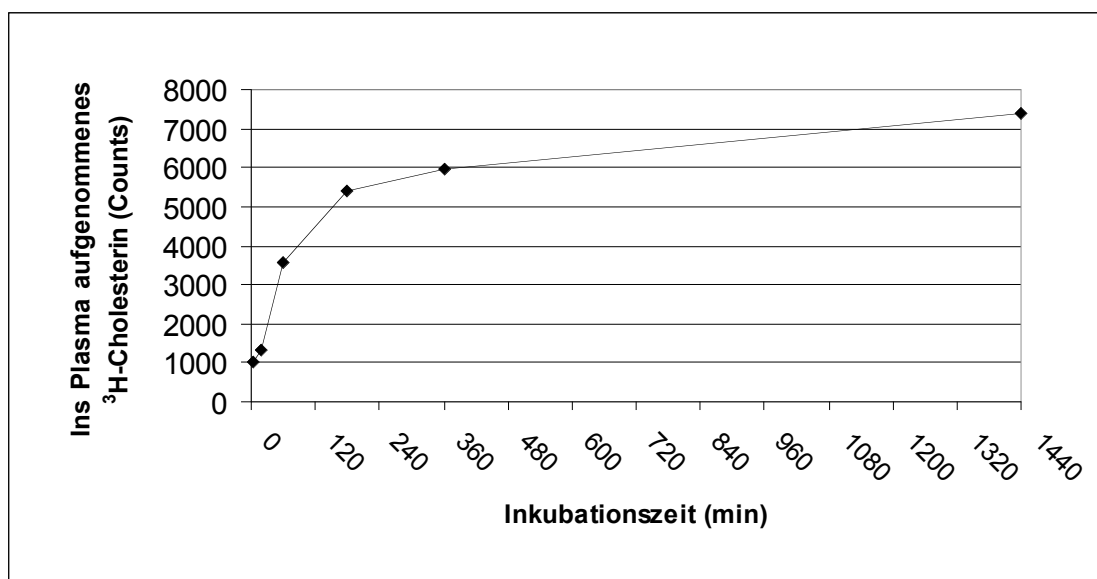
einem Plasma-Pool mitgemessen wurde. Ebenso wurde bei jeder Serie ein Leerwert (reiner Phosphatpuffer anstelle des verdünnten Plasmas) mitgemessen. Jede Messung (Patientenprobe, Kontrolle, Leerwert) wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

## 5. Ergebnisse:

### 5.1. Vorversuche zur Optimierung des Testverfahrens

Um optimale Versuchsbedingungen zu ermitteln, wurden die verschiedenen Bedingungen des Testverfahrens in unterschiedlichen Versuchen variiert.

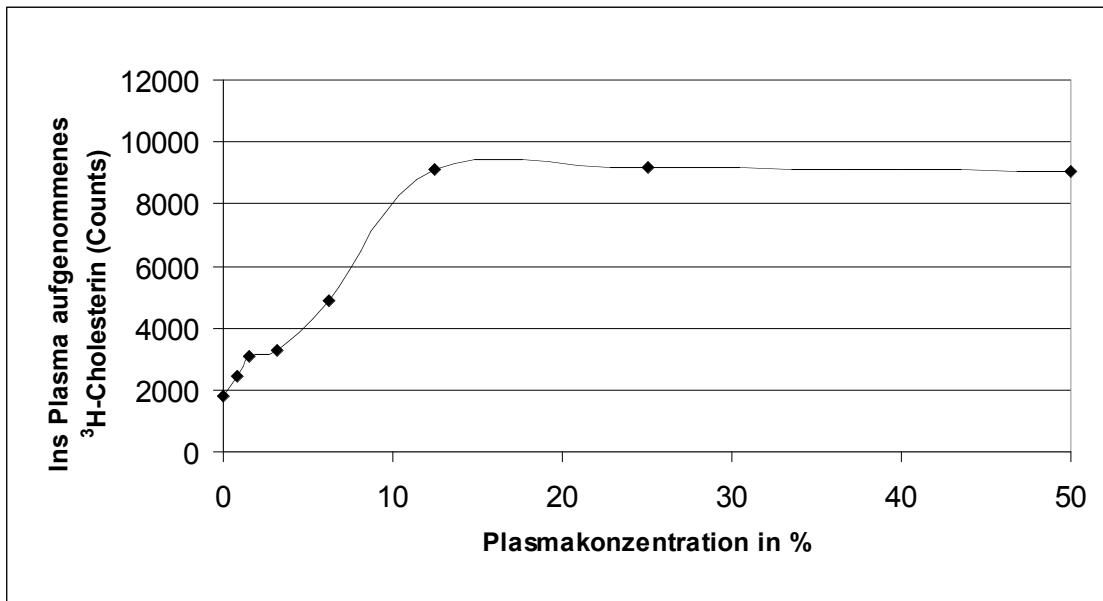
Abbildung 1 zeigt die Cholesterinaufnahme-Kapazität (CAK) bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten des Plasmas mit Trisichol.



**Abbildung 1: Zeitkinetik der CAK**

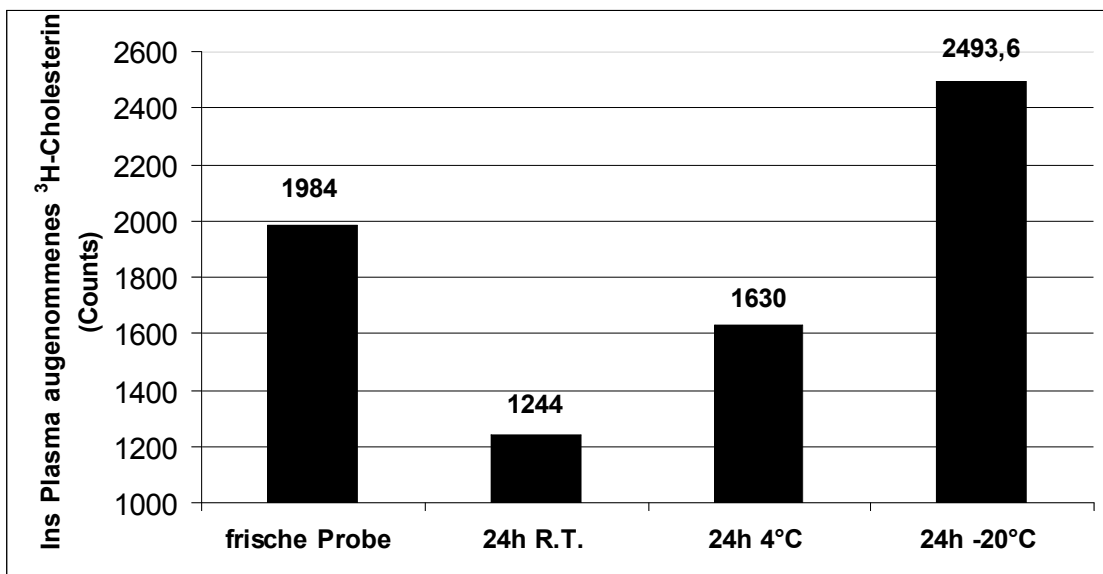
Nach Plasmagewinnung durch Zentrifugation wurden 500µl 20%-EDTA-Plasma mit 50mg Trisichol bei Raumtemperatur inkubiert. Erläuterungen im Text.

Bei 6 Stunden Inkubation wird nahezu ein Maximum an Cholesterin-Efflux erreicht. Nach 60 Minuten Inkubation ist die Cholesterinaufnahmekapazität etwa halbmaximal. Deswegen wurde für die nachfolgenden Versuche eine Inkubationszeit von 60 Minuten festgelegt, da hierbei der Assay am empfindlichsten auf andere Einflüsse reagieren würde. Abbildung 2 zeigt die CAK unterschiedlich verdünnter Plasmaproben. Bei einer Verdünnung von 20% war die Aufnahmekapazität maximal.



**Abbildung 2: Effekte der Plasmaverdünnung auf die CAK des Plasmas**

Das EDTA-Plasma wurde nach Blutgewinnung und Zentrifugation mit [BSA (30mg/ml) in PBS] verdünnt. 200 $\mu$ l verdünntes Plasma wurden mit 50mg Trisichol 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

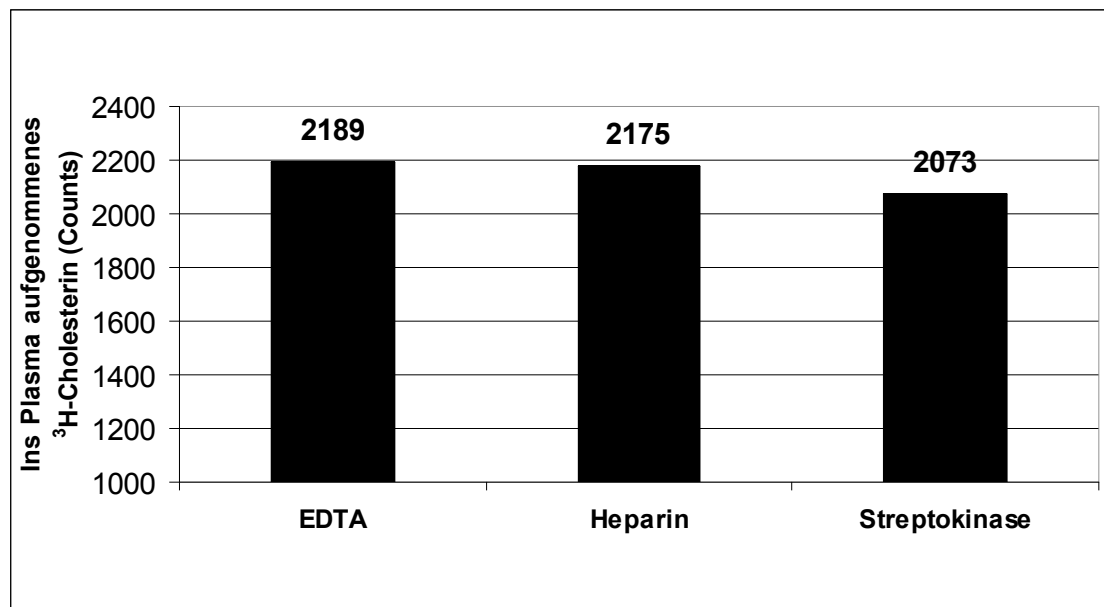


**Abbildung 3: Effekte der Lagerungstemperatur auf die CAK des Plasmas**

EDTA-Plasma wurde nach Blutgewinnung und Zentrifugation für jeweils 24 Stunden bei Raumtemperatur (R.T.), 4°C und -20°C gelagert, die frische Vergleichsprobe direkt nach Entnahme bei 4°C zentrifugiert. Das Plasma wurde mit PBS verdünnt und 500 $\mu$ l 5%-EDTA-Plasma wurden mit 50mg Trisichol 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils 5-fach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

In Abbildung 3 ist der Einfluss der Temperatur bei der Lagerung des Plasmas auf die CAK dargestellt. Die CAK des Plasmas sank, wenn nach der Blutentnahme das Blut nicht auf Eis, sondern bei Raumtemperatur gehalten wurde. Nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur sank die CAK weiter. Bei einer Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  blieb die CAK stabil.

Abbildung 4 zeigt die Effekte unterschiedlicher gerinnungshemmender Zusätze auf die CAK. Da sich hinsichtlich der CAK keine deutlichen Unterschiede ergaben, wurde in allen weiteren Versuchen Streptokinase zur Gerinnungshemmung eingesetzt, um die Ergebnisse mit Versuchen vergleichbar zu machen, in denen die Fähigkeit von Streptokinase-Plasmen untersucht wurde, Cholesterinefflux aus Zellen auszulösen.



**Abbildung 4: Effekte verschiedener gerinnungshemmender Plasmazusätze auf die CAK des Plasmas**

Die Plasmaproben wurden 24 h Stunden lang bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Plasma wurde mit PBS verdünnt. 500  $\mu\text{l}$  20%-Plasma wurden mit 100 mg Trisichol® 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse wurden gemittelt.

Abkürzungen:

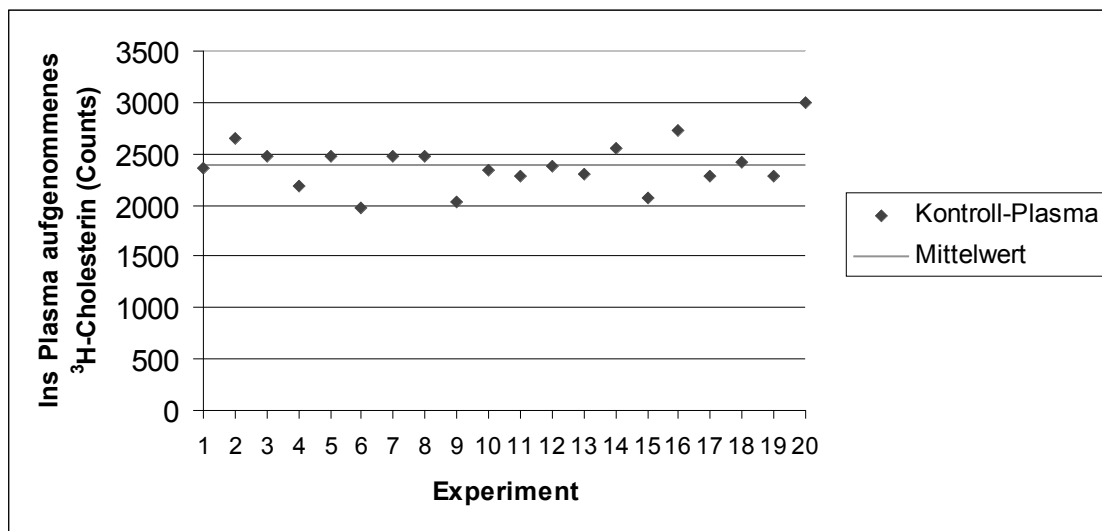
EDTA: EDTA-Plasma

Heparin: Heparin-Plasma

Streptokinase: Streptokinase-Plasma (100 IU Streptokinase pro ml Blut)



Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit des Verfahrens wurde die CAK eines Kontrollplasmas in 20 unabhängigen Experimenten bestimmt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Kontrollen lagen bei 2385,06 bzw. 240,73 (s. Abbildung 5). Damit betrug der Variationskoeffizient 10,1%. Es wurden innerhalb jedes Experimentes Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient dieser Dreifachbestimmungen betrug im Mittel  $5,3 \pm 2,5\%$ .

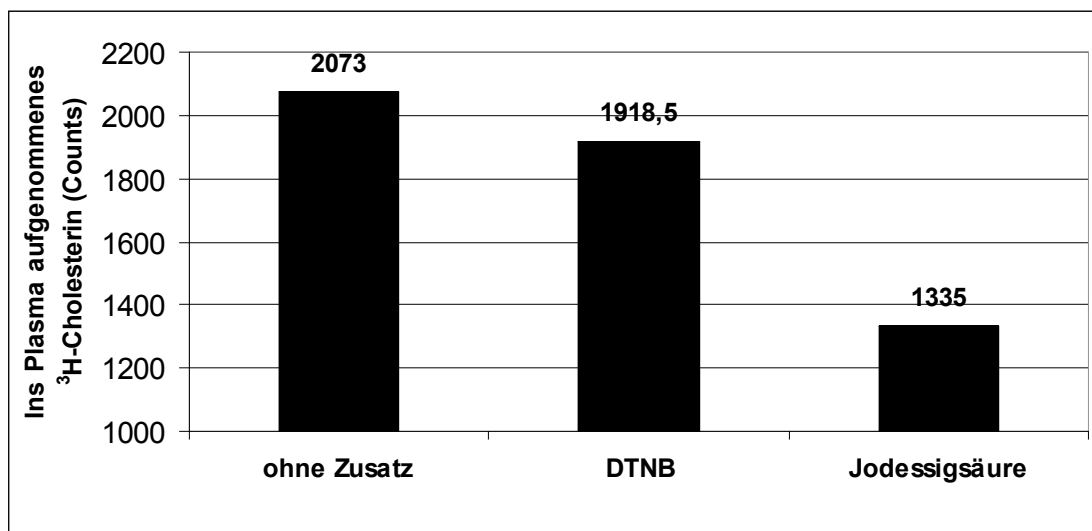


**Abbildung 5: Variation der CAK eines Kontrollplasmas in voneinander unabhängigen Experimenten**

Streptokinaseplasma (100 IU Streptokinase pro ml Blut) wurde mit PBS verdünnt. 500 µl 20%-Plasma wurden mit 100 mg Trisichol® 60 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden jeweils 3-fach-Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden gemittelt.

Kontroll-Plasma: CAK des Kontrollplasmas des jeweiligen Experiments.

Um die Effekte von LCAT und CETP auf die Cholesterinaufnahmekapazität abzuschätzen, wurden die Plasmen mit 5,5'-Dithio-Bi[2-Nitrobenzoesäure] (DTNB) als LCAT-Hemmer oder Jodsäure als LCAT- und CETP-Inhibitor vorinkubiert. Nach Vorinkubation der Plasmen mit DTNB oder Jodsäure war die CAK um 7% bzw. 35% erniedrigt (s. Abbildung 6). Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass die Plasmaaktivitäten von LCAT und CETP die CAK beeinflussen. Zudem verminderten steigende Konzentrationen von Jodsäure im Plasma die CAK deutlicher (s. Abbildung 7).

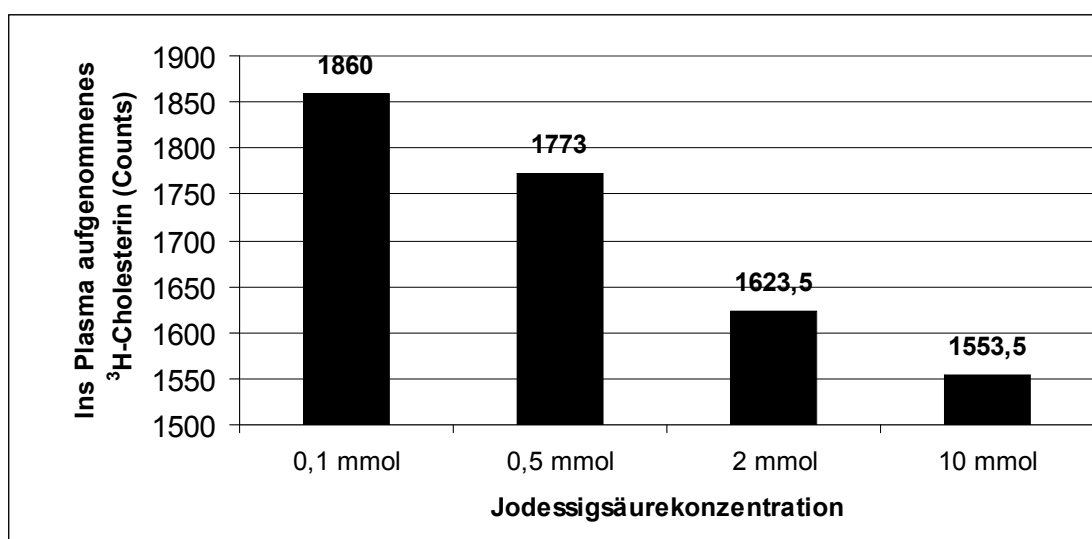


**Abbildung 6: Effekte der Hemmung von LCAT und CETP auf die CAK**

Das Streptokinaseplasma wurde zusätzlich mit DTNB [10 µl (40 mg DTNB + 50 mg NaHCO<sub>3</sub> ad 1 ml H<sub>2</sub>O) auf 1 ml Blut] oder Jodessigsäure (20 mmol) vor inkubiert.

500 µl 20%-Plasma wurden mit 100 mg Trisichol® 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse wurden gemittelt.



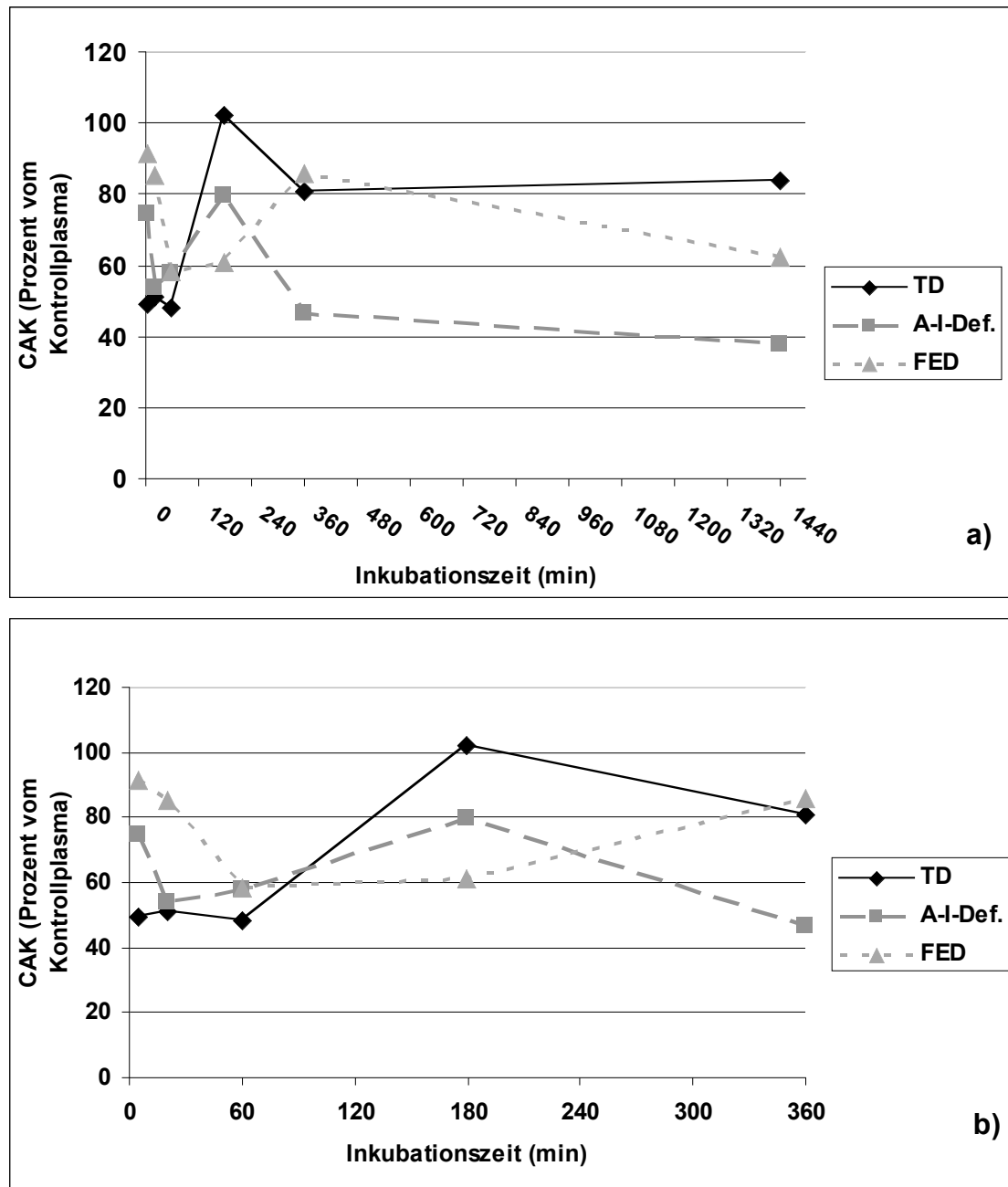
**Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Hemmung der CAK durch Jodsäure**

Streptokinaseplasma wurde mit verschiedenen Jodessigsäurekonzentrationen (10mmol, 2mmol, 0,5mmol und 0,1mmol) vorinkubiert.

Die Plasmaproben wurden 24 Stunden lang bei -70°C gelagert.

500µl 20%-Plasma wurden mit 100mg Trisichol® 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse wurden gemittelt.



**Abbildung 8a) und b): Vergleich: Cholesterinaufnahme-Kapazität-HDL-defizienter Plasmen**

Abb. 8b) ist ein Zeitfenster aus Abbildung 8a). Es wurde jeweils 500 µl 20%-EDTA-Plasma mit 50 mg Trisichol® bei Raumtemperatur inkubiert.

Abkürzungen:

TD: Tangier disease, Tangier-Krankheit

A-I-Def.: Apo-A-I-Defizienz

FED: Fisheye-disease, Fischaugenkrankheit

## **5.2. Vergleich HDL-defizienter Plasmaproben mit Kontrollproben bezüglich der Cholesterinaufnahme-Kapazität (CAK)**

Um den Einfluss von HDL auf die Cholesterinaufnahme-Kapazität abzuschätzen, wurde die CAK von Plasmaproben HDL-defizienter Patienten mit Tangierkrankheit, ApoA-I-Defizienz und Fischaugenkrankheit (Fisheye-Disease [FED]) mit der CAK von Plasmaproben gesunder Probanden verglichen.

Die Abbildungen 8a) und 8b) zeigen die Cholesterinaufnahme-Kapazität 20%ig verdünnter HDL-defizienter Plasmen im Vergleich zu normalen Kontrollplasmen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Die Cholesterinaufnahme-Kapazität von Plasmen ApoA-I- bzw. LCAT-defizienter und Tangier-Patienten ist niedriger als die des normalen Kontrollplasmas, solange die Inkubationen 60 Minuten oder kürzer dauerten. Längere Inkubationszeiten führten zu inkonsistenten Ergebnissen.

## **5.3. Apherese studie**

In einer weiteren Studie wurde untersucht, wie die abrupte Entfernung von LDL die CAK beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden bei hypercholesterinämischen Patientinnen, die durch LDL-Apherese behandelt wurden, vor und nach Apherese sowie zwischen den Apheresen Blutproben gewonnen, um die Plasmen bezüglich ihrer CAK zu untersuchen. Parallel wurden im gleichen zeitlichen Rhythmus Proben gesunder Kontrollpersonen gewonnen und untersucht. Die Abbildungen 9a)-c) zeigen die Änderungen der CAK im Zeitverlauf. Es wird deutlich, dass die CAK intraindividuell sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen variiert. Es fanden sich keine Abhängigkeiten von der Behandlung.

Zur Verdeutlichung zeigt Tabelle 3 die durchschnittliche intraindividuelle (biologische)Variation der CAK der Patientinnen und der Kontrollen. Die intraindividuelle Variation liegt bei den Patientinnen zwischen 5 und 9 Prozent, bei den Kontrollen ungefähr zwischen 2,5 und 5 Prozent.

**Tabelle 3: Intraindividuelle (biologische) Variation der CAK**

	Mittelwert	SD	VK
<b>Patientin 1</b>	2393,77	218,71	0,091
<b>Patientin 2</b>	2555,51	204,11	0,08
<b>Patientin 3</b>	2279,11	114,45	0,05
<b>Kontrolle 1</b>	2336,52	112,26	0,048
<b>Kontrolle 2</b>	2691,51	106,93	0,04
<b>Kontrolle 3</b>	2643,78	64,73	0,024

Die Mittelwerte wurden bestimmt aus allen CAK-Messungen der jeweiligen Patientin bzw.

Kontrolle

Abkürzungen:

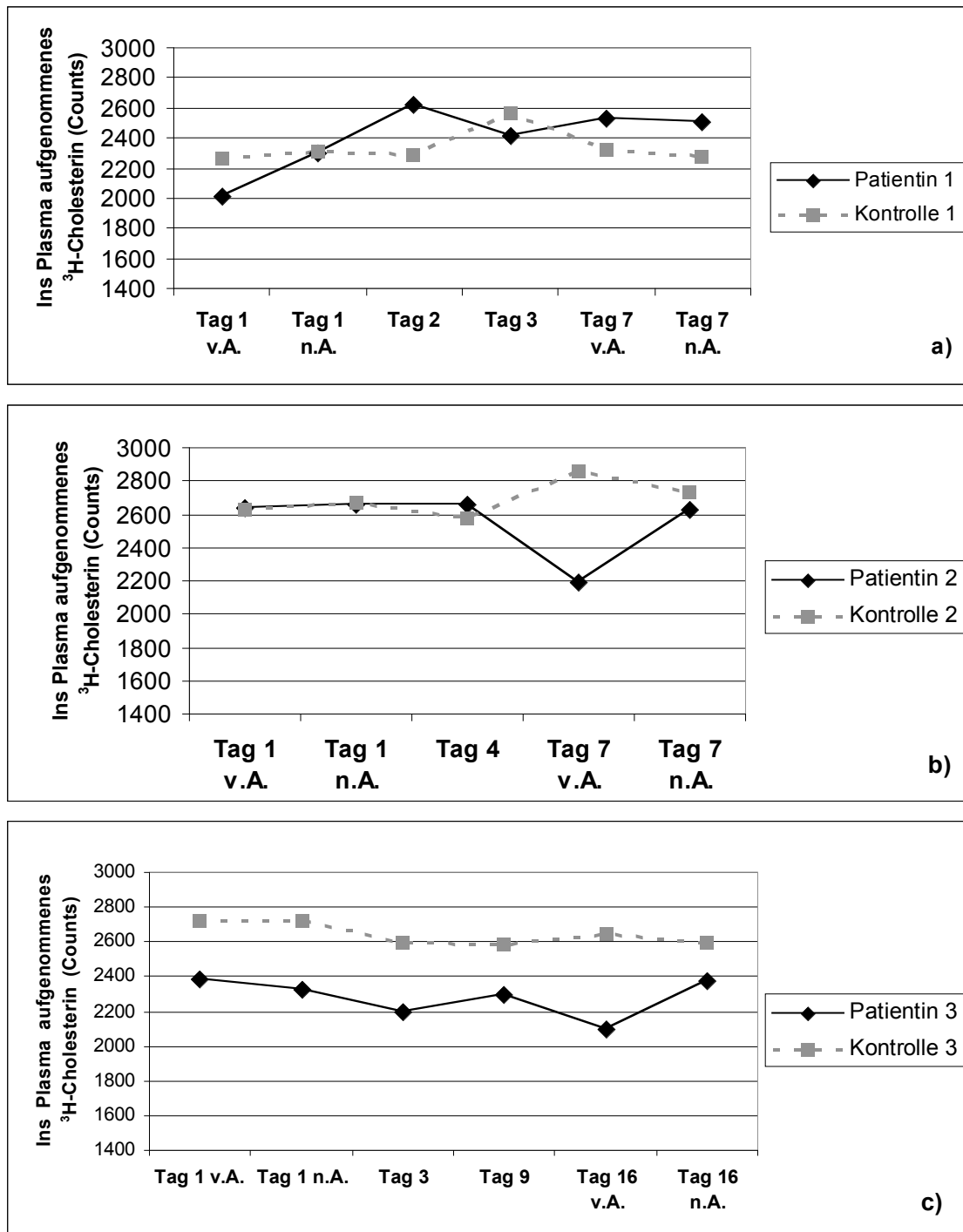
SD: Standardabweichung

VK: Variationskoeffizient

#### **5.4. Korrelation von Cholesterinaufnahme-Kapazitäten von Plasmen mit Parametern des Lipoproteinstoffwechsels**

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob die CAK statistisch signifikante Korrelationen zu Parametern des Lipoproteinstoffwechsels aufweist. Zu diesem Zweck wurde die CAK der Plasmaproben von 65 postmenopausalen Frauen untersucht, die an einer Studie zu den Auswirkungen einer Therapie mit Tibolon auf den Lipoproteinstoffwechsel teilgenommen hatten (149).

Tabelle 4 fasst die demographischen und biochemischen baseline-Daten in den zwei Gruppen zusammen. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Frauen der Tibolon-Gruppe und der Plazebo-Gruppe (s. Tabelle 4).



### Abbildung 9a), b) und c): Apherese Studien 1, 2 und 3

Die Apheresen fanden am Tag 1 und Tag 7 (Studie 1 und 2) sowie am Tag 1 und Tag 16 (Studie 3) statt. Es wurde den Patientinnen unmittelbar vor und nach der Apherese sowie an bestimmten Tagen (s. Abb.) zwischen den Apheresetagen Blut abgenommen.

Abkürzungen:

v.A.: vor Apherese

n.A.: nach Apherese

**Tabelle 4: Baseline-Daten in Abhängigkeit von der Behandlung mit Tibolon oder Plazebo**

	<b>Tibolon (N = 34)</b>	<b>Plazebo (N = 31)</b>
<b>Alter (in Jahren)</b>	54.5 ± 3.7	53.5 ± 3.7
<b>Body Mass Index (kg/m<sup>2</sup>)</b>	24.5 ± 2.5	23.7 ± 2.7
<b>Zeit seit der Menopause (in Monaten)</b>	89.6 ± 66.1	86.5 ± 68.5
<b>vorherige Hormonsubstitution (N)</b>	14	11
<b>hysterektomiert (N)</b>	10	12
<b>Cholesterin (mg/dl)</b>	250 ± 37	255 ± 45
<b>Triglyzeride (mg/dl)</b>	79 ± 27	90 ± 40
<b>Phosphatylcholin (mg/dl)</b>	185 ± 30	182 ± 34
<b>Sphingomyelin (mg/dl)</b>	47 ± 8	46 ± 8
<b>HDL-Cholesterin (mg/dl)</b>	64 ± 14	66 ± 17
<b>HDL-Phosphatylcholin I (mg/dl)</b>	95 ± 17	95 ± 19
<b>HDL-Sphingomyelin (mg/dl)</b>	21 ± 5	20 ± 5
<b>Verhältnis HDL-Sphingomyelin zu HDL-Phosphatidylcholin</b>	0.23 ± 0,07	0.22 ± 0,06
<b>LDL-Cholesterin (mg/dl)</b>	170 ± 36	171 ± 44
<b>Lp(a) mg/dl)</b>	27 ± 32	27 ± 34
<b>ApoA-I (mg/dl)</b>	151 ± 18	157 ± 25

**Tabelle 4 (Fortsetzung): Baseline-Daten in Abhängigkeit von der Behandlung mit Tibolon oder Plazebo:**

<b>ApoA-II (mg/dl)</b>	43 ± 8	42 ± 6
<b>ApoA-IV (mg/dl) *</b>	11 ± 3	11 ± 2
<b>ApoB (mg/dl)</b>	112 ± 26	112 ± 29
<b>ApoE (mg/dl)</b>	15 ± 4	14 ± 4
<b>LpA-I (mg/dl)</b>	65 ± 17	71 ± 19
<b>LpA-I/A-II (mg/dl)</b>	86 ± 11	86 ± 13
<b>HDL-apoE (mg/dl)</b>	2.2 ± 1.2	1.8 ± 0.9
<b>pre<math>\beta</math>-LpA-I (mg/dl)</b>	7.7 ± 2.7	7.7 ± 3.0
<b><math>\alpha</math>-LpA-I (mg/dl)</b>	143.0 ± 17.7	149.3 ± 23.3
<b>LPL (ng/ml) *</b>	575 ± 193	490 ± 147
<b>HL (pmol/ml/min) *</b>	22 ± 8	21 ± 9
<b>LCAT (nmol/ml/h) *</b>	21.4 ± 2.3	21.7 ± 2.1
<b>CETP (nmol/ml/h)</b>	102 ± 11	104 ± 11
<b>PLTP (nmol/ml/h)</b>	1172 ± 166	1213 ± 126
<b>1 min Efflux aus Fibroblasten (% zelluläres <sup>3</sup>H-Cholesterin)</b>	2.04 ± 1.69	1.84 ± 1.20
<b>1 h Efflux aus Fibroblasten (% zelluläres <sup>3</sup>H-Cholesterin)</b>	13.8 ± 5.2	14.8 ± 5.1
<b>4 h Efflux aus Fu5AH-Zellen (% zelluläres <sup>3</sup>H-Cholesterin)</b>	28.5 ± 8.7	24.1 ± 7.4

Die Daten der biochemischen Parameter wurden errechnet aus Mittelwerten der Messungen von 2 baseline-Besuchen A und B. Von Parametern, die mit einem \* markiert sind, wurden die Daten erhoben auf der Basis von Analysen der Proben, die beim Besuch B gewonnen wurden. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichungen.



Aufgrund des größeren Patientenkollektivs können anhand dieser Studie Aussagen über die interindividuelle Variation der Cholesterinaufnahme-Kapazität getroffen werden. Hierzu zeigt Tabelle 5 den CAK-Mittelwert aller Patientinnen mit Standardabweichung. Die interindividuelle Variation liegt bei 9,6 Prozent.

**Tabelle 5: Interindividuelle Variation der CAK**

	<b>Mittelwert</b>	<b>SA</b>	<b>VK</b>
<b>CAK</b>	2291,27	219,47	0,096

Der Mittelwert der CAK wurde ermittelt aus Messungen des baseline-Besuches B

Abkürzungen:

CAK: Cholesterinaufnahme-Kapazität

SA: Standardabweichung

VK: Variationskoeffizient

Die Tabellen 6, 7 und 8 beschreiben die univariate nichtparametrische Korrelationen nach Spearman-Rho zwischen der Cholesterinaufnahme-Kapazität und Serumkonzentrationen von Lipiden, Lipo-/Apolipoproteinen und HDL-Subklassen (Tabelle 6), Plasmaaktivitäten von lipolytischen Enzymen und Lipid-Transfer-Proteinen (Tabelle 7) sowie der Kapazität der Plasmen, Cholesterin aus Zellen freizusetzen.(Tabelle 8). Vor den statistischen Korrelationen wurde die CAK der Patientenplasmen um die CAK des Kontrollplasmas der jeweiligen Messserie korrigiert. Sowohl beim Baseline-Besuch als auch beim Cycle 3-Besuch hatte die CAK statistisch signifikante positive Korrelationen mit der Serum-Triglycerid-Konzentration ( $P < 0,05$ , Tabelle 6). Zudem korrelierte die CAK invers mit dem 1 h-Cholesterin-Efflux aus Fibroblasten bei Cycle 3 signifikant ( $P < 0,001$ , Tabelle 8). Darüberhinaus gab es keine statistisch signifikanten Korrelationen.

**Tabelle 6: Univariate Korrelationen der Cholesterinaufnahme-Kapazität mit Serum-Konzentrationen von Lipiden, Lipoproteinen, Apolipoproteinen und HDL-Subklassen**

	<b>Baseline</b>	<b>Cycle 3</b>
<b>Triglyceride</b>	0,324 *	0,267 *
<b>Cholesterin</b>	-0,090	0,068
<b>HDL-Cholesterin</b>	-0,021	0,008
<b>LDL-Cholesterin</b>	-0,169	0,035
<b>Phosphocholin (PC)</b>	-0,053	0,076
<b>Sphingomyelin (SPM)</b>	-0,010	0,152
<b>HDL-PC</b>	0,088	0,107
<b>HDL-SPM</b>	-0,050	0,029
<b>Lp(a)</b>	-0,131	-0,160
<b>ApoA-I</b>	0,028	0,061
<b>ApoA-II</b>	0,123	-0,012
<b>ApoA-IV</b>	0,076	0,055
<b>ApoB</b>	-0,184	0,002
<b>ApoE</b>	-0,015	0,217
<b>HDL-ApoE</b>	-0,013	0,216
<b>LpA-I</b>	0,045	0,113
<b>LpA-I/A-II</b>	0,077	0,004
<b>Praeβ-LpA-I (proz. zu HDL)</b>	-0,140	-0,104
<b>praeβ-LpA-I (absolute Konz.)</b>	-0,126	-0,071
<b>α-LpA-I</b>	0,046	0,042

Nichtparametrische Korrelationen nach Spearman-Rho; \*: Signifikanz (2-seitig) P < 0,05

Abkürzungen:

proz.: prozentual

Konz.: Konzentration

**Tabelle 7: Nichtparametrische Korrelationen der Cholesterinaufnahme-Kapazität mit den Aktivitäten von Lipolytischen Enzymen und Lipid-Transfer-Proteinen**

	Baseline	Cycle 3
LPL	-0,232	-0,014
HL	0,014	0,005
LCAT	-0,029	0,083
CETP	-0,015	-0,172
PLTP	0,092	0,164

Nichtparametrische Korrelationen nach Spearman-Rho

**Tabelle 8: Nichtparametrische Korrelationen der Cholesterinaufnahme-Kapazität mit den Plasmaaktivitäten, Cholesterin-Efflux aus Fibroblasten und Fu5AH-Zellen auszulösen**

	Baseline	Cycle 3
Efflux aus Fibroblasten (1 min)	0,100	-0,230
Efflux aus Fibroblasten (1 h)	-0,117	-0,460***
Efflux aus Fu5AH-Zellen	0,072	0,157

Nichtparametrische Korrelationen nach Spearman-Rho; \*\*\*: Signifikanz (2-seitig)  $P < 0.001$

## **6. Diskussion:**

### **6.1. Notwendigkeit der CAK als neuer Cholesterin-Efflux-Assay**

Wie bereits im Kapitel 1.3. beschrieben, wurde in verschiedenen epidemiologischen Studien eine inverse Korrelation von HDL-Cholesterinwerten und der Entstehung von KHK belegt (64;148), so dass diesem Lipoprotein eine „antiatherogene“ Funktion im Cholesterinstoffwechsel zugesprochen wird. Diese Funktion jedoch muss differenzierter betrachtet werden, da in manchen Studien gezeigt wurde, dass ein hoher HDL-C-Wert unter bestimmten metabolischen Verhältnissen – z.B. bei hypertriglyzeridämischen Patienten – eher mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert ist (84;159). Ebenso sprechen – wie in Kapitel 1.9. ausführlich erläutert – verschiedene Argumente gegen einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen HDL-Cholesterin und der Entstehung von KHK (158): Um nur einige zu nennen muss z.B. bei der Einschätzung von HDL-Cholesterin als KHK-Risikofaktor zwischen verschiedenen ethnischen Populationen unterschieden werden (17); desgleichen muss unterschieden werden, ob es sich bei einem erniedrigten HDL-C-Wert um einen isolierten Risikofaktor handelt oder ob dieser Risikofaktor – wie z.B. bei Patienten mit dem metabolischen Syndrom – mit verschiedenen anderen kardiovaskulären Risikofaktoren verknüpft ist (41;71;148). Ähnlich kann ein erniedrigter HDL-C-Wert – im Sinne eines negativen Akute-Phase-Proteins – das Vorhandensein einer systemischen Entzündung, welche die Entstehung von Arteriosklerose fördert, oder auch einer lokalen Entzündung (z.B. in unstablen Plaques) anzeigen (20;44).

Folglich lässt die Assoziation eines erhöhten koronaren Risikos mit einem erniedrigten HDL-C-Wert nicht zwangsläufig auf ein defektes antiatherogenes Reparatursystem schließen. Viele Ergebnisse aus genetischen Analysen und vor allem aus Tierexperimenten sprechen dafür, dass HDL die Entwicklung der Atherosklerose hemmen und sogar die Rückbildung vorhandener Läsionen induzieren kann. Allerdings sind HDL eine strukturell sehr heterogene Klasse von Lipoproteinen, die sich qualitativ und quantitativ durch den Gehalt biologisch aktiver und potentiell antiatherogener Proteine und Lipide unterscheiden. Außerdem haben HDL diverse potentiell

antiatherogene Funktionen (72;151): Sie fördern Cholesterinefflux aus Zellen, hemmen die Oxidation von Lipiden, die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, die Apoptose von vaskulärem Endothel und glatten Muskelzellen, Plättchenaggregation und die Gerinnung. Es ist nicht klar, welche dieser Funktionen für die Atherosklerosehemmung die größte Bedeutung hat.

Da also die Bestimmung der Serum-HDL-Cholesterin-Konzentration allein noch keinen Aufschluss über die antiatherogenen Funktionen von HDL gibt, werden Verfahren und Biomarker gesucht, diese antiatherogenen Funktionen zu messen. Im Rahmen dieser antiatherogenen Funktionen ist der Reverse Cholesterintransport von zentraler Bedeutung (46;157;158), welcher wiederum Cholesterinefflux aus Zellen voraussetzt (s. Kapitel 1.4. und 1.7.).

Um diese Funktion in klinischen Studien zu monitorisieren, wurde von verschiedenen Forschergruppen die Fähigkeit des Plasmas bestimmt, radioaktiv markiertes Cholesterin aus Zellen freizusetzen, wobei unterschiedliche Zellarten eingesetzt und untersucht wurden:

So wurde der Efflux aus Zellen einer transformierten Ratten-Hepatoma-Zelllinie, den Fu5AH-Zellen (s. Kapitel 4.4.) (10;39;164), aus kultivierten Haut-Fibroblasten (s. Kapitel 4.4.) (76;78;153), sowie aus speziellen Mäuse-Makrophagen, den J774-Zellen (54;129), untersucht. Bei der letzten Zellart wurde durch die Beifügung von cAMP einerseits die Transkription von ABCA1 (s. Kapitel 1.7.3.) stimuliert und andererseits ein Anstieg des Cholesterinefflux induziert (21;56).

In Studien, in denen zwei dieser eben genannten verschiedenen Zelllinien verglichen wurden, konnte ein unterschiedliches Efflux-Verhalten der verschiedenen Zellarten beobachtet werden (21;56;149). Dies reflektiert Unterschiede in der Plasmamembranzusammensetzung, insbesondere was das Vorhandensein von Cholesterinefflux-vermittelnden Proteinen anbelangt. So exprimieren Fu5AH-Zellen SR-B1, aber wenig ABCA1, während der Gehalt an ABCA1 in stimulierten J774-Zellen hoch ist.

All diesen Cholesterinefflux-Assays gemein ist, dass sie die technisch aufwendige und schlecht zu standardisierende Kultivierung von Zellen erfordern. Außerdem sind – wie die gerade aufgeführten Beispiele zeigen – die Ergebnisse stark von der eingesetzten Zellart beeinflusst.

Um ein praktikableres Verfahren für den klinischen Einsatz zu erreichen, wurde in dieser Arbeit ein neuer Assay entwickelt, in dem ein Silikat als künstlicher Cholesterinträgerstoff (Trisichol®) eingesetzt wird. Es wurde erwartet, dass die Cholesterinaufnahme des Plasmas nach Inkubation mit dem Trägerstoff mit anderen gemessenen Plasma-Parametern, insbesondere dem Cholesterinefflux einiger Zelltypen, korreliert.

## **6.2. Technische Qualität des neuen CAK-Assays**

Im folgenden Abschnitt werden die technischen Grundlagen des neuen Testverfahrens erläutert und die analytische Qualität wie die Verdünnungsexakte und Reproduzierbarkeit des Assays diskutiert.

Der materielle Aufwand zur Bestimmung der Cholesterin-Aufnahme-Kapazität ist begrenzt, da sie im Gegensatz zur Cholesterin-Efflux-Messung keine Kultivierung von Zellen erfordert:

Zentraler Bestandteil ist Trisichol®, das mit Tritium-Cholesterin gekoppelte Silikat, welches als künstlicher Cholesterinträgersubstanz anstelle von Zellen verwendet wird. Ferner wird nur eine gerinnungshemmende Substanz – in diesem Assay Streptokinase – sowie eine Szintillationsflüssigkeit (zum Einsatz im Beta-Counter) benötigt.

Zur Plasmaverdünnung wurde ein üblicher Phosphatpuffer (PBS) verwendet.

An Apparaturen werden im Labor übliche Schüttler (Vortexer) und Überkopftaumler verwendet. Zur Bestimmung der Radioaktivität wird ein Beta-Counter benötigt. Gearbeitet wird in speziell abgeschirmten und gekennzeichneten Labor-Bereichen, da es sich beim Tritium-Cholesterin um eine radioaktive Tracer-Substanz handelt. Zusätzlich muss das Labor-Personal in Strahlenschutzkunde unterwiesen werden.

Hinsichtlich der Praktikabilität des Verfahrens der CAK-Bestimmung an sich (s. auch Kapitel 4.5.) sprechen die wesentlich einfachere Handhabung mit dem Silikat (im Gegensatz zu z.B. Zellkulturen) für das Verfahren. Andererseits gibt es Schwachstellen im Verfahren:

Das Silikat neigt natürlicherweise dazu, statisch aufgeladenen Gegenständen (z.B. dem Aufbewahrungsbehälter, den Latex-Handschuhen des benutzenden Laborpersonals oder auch den zum Abwiegen und Abfüllen benutzten Eppendorf-Hütchen) stark anzuhaften

und so die Handhabung (vor allen beim Abwiegen) erheblich zu erschweren und damit zu einer nicht unerheblichen potentiellen Ungenauigkeits- und Fehlerquelle zu werden. Von diesem Standpunkt aus betrachtet wäre eine Flüssigkeit, welche selbst mit radioaktiv markiertem Cholesterin angereichert ist, geeigneter als ein Silikat. Die Flüssigkeit jedoch müsste sich nach der Inkubation mit den zu untersuchenden Plasmen von diesen durch ein physikalisches (oder eventuell auch chemisches) Verfahren wieder vollständig trennen lassen, was bei dem verwendeten Trennverfahren der Zentrifugierung nicht gegeben war. Das Silikat hingegen ließ sich durch das Zentrifugieren vollständig vom Plasma trennen. Es wurden zudem Versuche mit einer (Silikat-Wasser-) Suspension durchgeführt, um die oben erwähnte Problematik der Oberflächenspannung zu vermeiden. Bei diesen Versuchen traten jedoch erhebliche Schwierigkeiten beim Pipettieren (sowie auch Abwiegen) der Suspension auf, so dass äußerst uneinheitliche Ergebnisse erzielt wurden, die in dieser Arbeit deshalb nicht weiter dargestellt wurden.

Letztendlich wurde im Testverfahren das Silikat (Trisichol®) in Reinform eingesetzt, da es einerseits als am praktikabelsten und andererseits als am wenigsten fehlerträchtig erachtet wurde.

Bei unterschiedlich langen Inkubationszeiten des Plasmas mit dem Silikat (Trisichol®) ergab sich beim Auftragen der (nach Inkubation) im Beta-Counter gemessenen Radioaktivität des Plasmas gegen die Inkubationszeit eine Sättigungskurve (s. Abbildung 1). Nach ungefähr 6-stündiger Inkubation stellte sich eine Sättigung ein, nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten war die Cholesterinaufnahme-Kapazität etwa halbmaximal. Für alle weiteren Versuche wurde die Inkubationszeit auf 60 Minuten festgelegt, da bei halbmaximaler Sättigung das Testverfahren am empfindlichsten auf Einflüsse reagiert.

Bei steigender Verdünnung des Plasmas vor Inkubation fiel die CAK bei  $\leq 10\%$  Verdünnung deutlich ab (s. Abbildung 2). Um in den folgenden Versuchsreihen mit einer möglichst effektiven Plasmaverdünnung zu arbeiten, ohne die CAK zu reduzieren, wurde die Plasmaverdünnung auf 20% festgelegt.

Nach Lagerung von Plasmen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde die CAK nicht beeinflusst (s. Abbildung 3). Plasma-Lagerung bei Raumtemperatur hingegen vermindert die CAK erheblich, möglicherweise infolge des Verlustes von Lipidtransferenzymaktivitäten oder des

Umbaus von HDL-Subklassen. Diese Beobachtungen decken sich mit denen, die in Experimenten zur Bestimmung der CAK von Plasmen in Anwesenheit von Zellen gemacht wurden (153). In den folgenden Versuchsreihen wurden die Patienten- und Kontroll-Plasmen daher zur Lagerung eingefroren. Bei Verwendung unterschiedlicher gerinnungshemmender Plasmazusätze ergaben sich nur geringfügige Unterschiede bei der CAK-Bestimmung (s. Abbildung 4). Die Verwendung von EDTA bzw. Heparin erhöhten die CAK im Unterschied zu Streptokinase nur geringfügig (um jeweils ca. 5%). Da bei der Bestimmung der Fähigkeit des Plasmas, Cholesterinefflux aus Zellen (Fibroblasten) auszulösen, Streptokinase zur Plasma-Gerinnungshemmung verwendet wurde (149), wurde zur Vergleichbarkeit der Messverfahren bei der CAK-Bestimmung ebenfalls mit Streptokinase antikoaguliertes Plasma verwendet.

Die Ermittlung der Reproduzierbarkeit ergab in 20 voneinander unabhängigen Experimenten mit demselben Kontrollplasma eine Variation von 10,1 % (s. Abbildung 5). In den Versuchsreihen, in denen Proben in mehreren unabhängigen Serien gemessen wurde, wurde die Variation der CAK der Patientenplasmen an die entsprechende Variation des Kontrollplasmas der jeweiligen Versuchsreihe angeglichen.

### **6.3. Biologische Qualität des neuen Assays**

Um die biologische Qualität und Plausibilität des neuen Testverfahrens zu beurteilen, müssen die erzielten Ergebnisse im Kontext biochemisch-physiologischer Grundlagen (über den Cholesterinstoffwechsels) und im Vergleich zu bisher erzielten (Studien-) Ergebnissen über den Cholesterin- und Lipoproteinstoffwechsel überprüft werden. Hierzu sollen im folgenden Abschnitt anhand der Ergebnisse der Vorversuche sowie der Patientenstudie Zusammenhänge zwischen der CAK und den verschiedenen Parametern des Lipoproteinstoffwechsels erläutert werden.

#### **6.3.1. Rolle von HDL-Subklassen und Lipidtransferenzymen**

In den Vorversuchen zeigte sich eine dosisabhängige Erniedrigung der CAK durch eine Hemmung der am HDL-Metabolismus beteiligten Enzyme LCAT und CETP durch Jodessigsäure (s. Abbildung 6). Allerdings hatte die Inhibition von LCAT durch DTNB



keinen signifikanten Effekt auf die CAK. Wie auch aus der Plasmamembran von Zellen, kann aus dem Silikat Cholesterin offenbar durch Diffusion freigesetzt und durch extrazelluläre Cholesterin-Akzeptoren aufgenommen werden. Lipidreiche  $\alpha$ -HDL sind besonders effektive Akzeptoren, da die in diesen Partikeln stattfindende LCAT-vermittelte Veresterung das aufgenommene Cholesterin in den Partikelkern befördert und so eine Rückdiffusion verhindert (63;124;158). Ebenso wurde bisher in Experimenten gezeigt, dass aus Zellen stammendes unverestertes Cholesterin außer in lipidreichen HDL auch in anderen Lipoproteinen (wie auch LDL) verestert wird (14;15;32;90;120;153). Jodessigsäure erniedrigte die CAK um 35%, steigende Jodsäurekonzentrationen im Plasma verminderten die CAK zunehmend (s. Abbildung 7). Durch die Umwandlungen von HDL durch die Plasmaenzyme PLTP, CETP und HL werden prä- $\beta$ -HDL freigesetzt (57;158), die als initiale Plasma-Akzeptoren von Cholesterin eine wichtige Rolle spielen (31;162). Ebenso vermittelt CETP den Austausch von Cholesterinestern großer HDL<sub>2</sub> und Triglyceriden von VLDL, IDL und LDL, sowie den Transfer von Cholesterinestern zwischen LDL und VLDL (109;126;158).

Die unerhebliche CAK-Reduktion von 7% bei LCAT-Hemmung durch DTNB spricht gegen die Bedeutung von LCAT als wichtige Determinante der CAK. Im Gegensatz dazu fanden wir bei LCAT-defizienten Plasmen von FED-Patienten eine verringerte CAK (siehe Abbildung 8, siehe auch weiter unten). Im Vergleich hierzu fällt bei Hemmung von CETP und LCAT durch Jodsäure die Reduktion der CAK mit 35% deutlicher aus. Diese Ergebnisse werden durch die zunehmende CAK-Reduktion bei steigender Jodsäurekonzentration im Plasma bestätigt. Möglicherweise sind durch CETP-Aktivität freigesetzte prä- $\beta$ -HDL potentere Akzeptoren des aus dem Silikat freigesetzten Cholesterins. Allerdings fand sich später keine Korrelation zwischen der CAK und der Konzentration von prä- $\beta$ -Lp-A-I (s. Tabelle 6). Zudem wäre die Abhängigkeit der CAK von prä- $\beta$ -LpA-I unerwartet, da prä- $\beta$ -LpA-I eher für den ABCA1-vermittelten Efflux (s. Kapitel 1.7.3.) entscheidend sind. Von den verschiedenen Varianten des Cholesterinefflux aus Zellen wie freie Diffusion, erleichterte Diffusion, aktivem Transport und Apolipoprotein-vermitteltem Efflux (48) sollte beim Efflux aus dem Silikat, welches im Unterschied zu Zellen weder über Rezeptoren noch über Transporter verfügt, die freie Diffusion erwartungsgemäß die

größte Rolle spielen (105;115;116;124;162). Das durch diesen Transportmechanismus beförderte Cholesterin unterliegt möglicherweise einem komplexen Zusammenspiel, in dem sowohl die Veresterung durch LCAT als auch Cholesterinesteraustausch zwischen Lipoproteinen durch CETP entscheidend sind.

Offensichtlich ist, dass sich Interaktionen mit den Enzymen des HDL- bzw. LDL-Metabolismus auf die Cholesterinaufnahme-Kapazität des Plasmas auswirken, was eine Lipoproteinbeteiligung an der Determination der Plasma-CAK wahrscheinlich macht. Im Widerspruch hierzu fanden sich jedoch in späteren Versuchen, in denen die Plasmen eines größeren Patientenkollektivs untersucht wurden, keine direkten Korrelationen der CAK mit CETP- oder LCAT-Aktivität (s. Tabelle 7).

Ebenso fanden sich im Rahmen der Patientenstudie keine direkten Korrelationen der CAK mit Lipoproteinen oder Apolipoproteinen (s. Tabelle 6).

Ferner fanden sich keine signifikanten (oder auch nicht signifikanten) Korrelationen der ermittelten Cholesterinaufnahme-Kapazitäten mit den verschiedenen gemessenen Lipidwerten des Patientenkollektivs (s. Tabelle 6, Kapitel 5.4.) abgesehen von einer mäßigen Korrelation der Plasma-CAK mit Triglyceriden (Baseline: 0,324 und Cycle 3: 0,267, Signifikanz  $P$  jeweils  $< 0,05$ ; s. auch Tabelle 6). Im Vergleich hierzu wurden in Studien von Fournier et al. positive Korrelationen zwischen ABCA1-vermitteltem Cholesterinefflux und Serum-Triglycerid-Konzentrationen nachgewiesen (56). Diese Erkenntnisse wurden in Versuchsreihen mit J774-Makrophagen gewonnen, in denen die Transkription von ABCA1 durch cAMP stimuliert wird. Zugleich wurden positive Korrelationen zwischen cAMP-stimuliertem Efflux und prä- $\beta$ -HDL (, die initialen Cholesterin-Akzeptoren des ABCA1-vermitteltem Efflux,) sowie zwischen Triglycerid-Konzentrationen und prä- $\beta$ -HDL-Werten nachgewiesen (56). Ähnliche Ergebnisse wurden in Versuchen mit Plasmen von Mäusen gefunden, die für menschliches Apolipoprotein AII (hApoA-II) transgen waren, wodurch eine ausgeprägte Hypertriglyceridämie hervorgerufen wurde: Durch cAMP-Stimulation war (im Vergleich zum normolipidämischen Kontrollplasma) ein deutlicher Anstieg des Cholesterinefflux in hApoA-II-transgenes (hypertriglyceridämisches) Plasma zu verzeichnen (55).

In Versuchen mit Fu5AH-Zellen war die relative Cholesterinefflux-Kapazität des Serums von hypertriglyceridämischen und normolipidämischen Probanden im

Durchschnitt identisch, was auf das höhere Phospholipid/Cholesterin-Verhältnis der HDL-Partikel hypertriglyzeridämischer Seren zurückgeführt wurde (53).

Die in dieser Arbeit gefundene Korrelationen der Serum-Triglyzerid-Konzentrationen mit der CAK ist soweit nicht mit den in Zellkulturstudien gefundenen Zusammenhängen vergleichbar. Eine mögliche Erklärung ist, dass die triglyzeridreichen Lipoproteine besonders gut mit der Silikat-Matrix interagieren, z.B. aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen, und dadurch effizient Cholesterin aufnehmen.

### **6.3.2. Auswirkung von HDL-Defizienzen auf die CAK**

Falls HDL als Akzeptor des aus dem Silikat freigesetzten Cholesterins eine entscheidende Rolle spielt, müssten Plasmen HDL-defizienter Patienten im Vergleich zu Kontroll-Plasmen gesunder Probanden durch eine deutliche Minderung der CAK gekennzeichnet sein. Um die erzielten Ergebnisse der Cholesterinaufnahme-Kapazität in diesem Versuch zu überprüfen, sollen im folgenden Abschnitt zum Vergleich Studien herangezogen, in denen die Cholesterinefflux-Kapazität (, also die Kapazität des Plasmas, radioaktiv markiertes Cholesterin aus zuvor angereicherten Zellen aufzunehmen,) vergleichbarer Patientenplasmen mit HDL-Defizienzen untersucht wurde (78;153). Zur besseren Übersicht werden in Tabelle 9 die bereits in Kapitel 5.2. veranschaulichten CAK-Ergebnisse der HDL-defizienten Plasmen dem in einer von von Eckardstein et al. veröffentlichten Studie (153) gemessenen Netto-Cholesterinefflux aus Fibroblasten gegenübergestellt.

Die HDL-Defizienzen der hier untersuchten Plasmen lassen sich jeweils auf unterschiedliche Ursachen zurückführen und gehen mit typischen Defizienzen für bestimmte HDL-Subklassen einher (s. Tabelle 2, Kapitel 3.1.).

Plasmen von Tangier-Patienten verfügen aufgrund einer ABCA1-Defizienz über kein lipidreiches  $\alpha$ -HDL (27;134;147;153). Als Cholesterin-Akzeptor verfügt das Tangier-Plasma über ApoE-haltige HDL,  $\gamma$ -LpE eingeschlossen, sowie LpA-IV und prä- $\beta$ <sub>1</sub>-LpA-I.

Im ApoA-I-defizienten Plasma fehlen alle ApoA-I-haltigen Akzeptoren, also  $\alpha$ -HDL und prä- $\beta$ -HDL, lediglich ApoE oder ApoA-IV-haltige HDL-Partikel liegen als Cholesterin-Akzeptoren vor (153). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass

**Tabelle 9: Vergleich der CAK mit dem Cholesterinflux HDL-defizienter Plasmen**

	CAK (1 h)	Netto-Cholesterinefflux (2 h) (153)
<b>Tangier</b>	48 %	78 %
<b>ApoA-I-Defizienz</b>	58 %	53 %
<b>FED</b>	58 %	56 %

Angaben in Prozent vom normalen Kontrollplasma

Die Zeitangaben beziehen sich auf die Inkubationszeiten der Plasmen mit dem Silikat bzw. mit den mit <sup>3</sup>H-Cholesterin angereicherten Fibroblasten

ApoE Cholesterinefflux aus Zellen auslöst (77). Zusätzlich zu den in Tabelle 9 dargestellten Ergebnissen zeigte eine Studie von Huang et al., dass die Cholesterinefflux-Kapazität aus Fibroblasten nach einstündiger Inkubation in das Plasma ApoA-I-defizienter Mäuse im Vergleich zum Plasma normaler Mäuse um 34% erniedrigt ist (78).

Als Cholesterin-Akzeptoren fehlen dem Fischeaugenkrankheit (FED)-Plasma große  $\alpha$ -LpA-I, im Unterschied zum ApoA-I-defizienten Plasma und zum Tangier-Plasma verfügt das FED-Plasma über einige kleine  $\alpha$ -LpA-I-Partikel (153).

Die prozentuale Abweichung der CAK HDL-defizienter Plasmen schwankte stark in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Mit Ausnahme eines Zeitpunktes beim Tangier-Plasma war die CAK der HDL-defizienten Plasmen zu fast jedem Meßzeitpunkt mindestens 20% niedriger als die der normolipidämischen Kontrollplasmen. Solange die Inkubationszeiten mit dem Silikat kürzer als 60 Minuten sind, liegen die CAKs der HDL-defizienten Plasmen sämtlich unter denen des Kontrollplasmas, wie es auch zuvor stattgefundene Versuche zur Bestimmung der Cholesterinefflux-Kapazitäten erwarten ließen (78;134;147;153). Bei der Standardinkubationszeit von einer Stunde betrug die Verminderung 40-50%.

Unbefriedigend sind die inkonsistenten Ergebnisse bei längerer Inkubation mit dem Silikat (s. Kapitel 5.2.). Die Versuche mit HDL-defizienten Patientenplasmen fanden jedoch im Rahmen von Vorversuchen statt, bei denen lediglich ein orientierender

Vergleich der CAK HDL-defizienter Plasmen mit einem Kontrollplasma erfolgen sollte. Im Zuge der Fehleranalyse soll hier daher darauf hingewiesen werden, dass zur Ermittlung der CAK der HDL-defizienten Plasmen jeweils keine Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, wie es bei den Plasmen der Patientinnen aus der LDL-Apherese-Studie sowie aus dem Patientinnenkollektiv der Tibolon-Studie der Fall war. Dennoch zeichnet sich eine klare Tendenz der Unterschiede in der CAK von HDL-defizienten Plasmen von der CAK des Kontrollplasmas ab. Widersprüchlich zu diesen Ergebnissen sind die Ergebnisse aus der größeren Patientenstudie: Es fanden sich weder direkte Korrelationen der CAK mit HDL selbst oder auch mit HDL-Subklassen (s. Tabelle 6). Möglicherweise spiegelt dies aber auch ein Schwellenwertproblem wider: Unter Umständen wird bereits bei relativ niedrigen HDL-Cholesterin-Konzentrationen ein Plateau erreicht, bei dem die CAK maximal ist.

Interessanterweise korrelierte die CAK, wie oben bereits erwähnt, auch nicht mit den gemessenen Cholesterinefflux-Werten aus Fibroblasten oder Fu5AH-Zellen (s. Tabelle 8). Die gefundenen mäßigen (aber dennoch signifikanten) Korrelationen der CAK mit dem 1-h-Efflux aus Fibroblasten bei Cycle-Messung fanden sich jedoch nicht bei der Baseline-Messung wieder und sind daher mit Zurückhaltung zu bewerten (s. Tabelle 8).

### **6.3.3. Auswirkungen von LDL-Apherese auf die CAK**

In der bereits oben genannten Veröffentlichung von Erkenntnissen über HDL-defiziente Plasmen von von Eckardstein et al. (153) wurde nach Efflux des radioaktiv markierten Cholesterins (aus den Zellen) dessen Verteilung in den verschiedenen Plasma-Lipoproteinen untersucht. Hier zeigte sich, dass sich das radioaktiv markierte Cholesterin bei Verlängerung der Inkubationszeit (jedoch ohne Zellen) in den oben genannten initialen Cholesterin-Akzeptoren verringert und sich in der LDL-Fraktion anreichert. Dies war zuvor auch bereits in anderen Studien gezeigt worden (31;75). Falls von den Plasma-Lipoproteinen LDL einen entscheidenden Einfluss auf die Cholesterinaufnahme-Kapazität des Plasmas hat, müsste sich die abrupte Entfernung von LDL durch LDL-Apherese in einer deutliche Veränderung der CAK des Plasmas niederschlagen.

Durch die direkte Adsorption der Lipoproteine LDL und Lp(a) aus Gesamtblut (DALI(24)) mittels eines Lipid-Hämoperfusions-Systems wird pro Apherese-Sitzung eine durchschnittliche Reduktion von >60% LDL-Cholesterin erreicht (22;23). Verringerungen des HDL-Cholesterins hingegen wurden nicht beobachtet (22), so dass folglich Veränderungen der Cholesterinaufnahme-Kapazitäten in Abhängigkeit von der Apherese auf eine entscheidende Beteiligung von LDL unter den Lipoproteinen hinweisen würde.

Bei der Untersuchung der Cholesterinaufnahme-Kapazität ergaben sich sowohl bei den hypercholesterinämischen Patientinnen als auch bei den gesunden Kontrollpersonen intraindividuelle Variationen zwischen 5 und 9% (bei den Patientinnen) bzw. zwischen 2 und 5% (bei den gesunden Kontrollpersonen) (s. Tabelle 3, Kapitel 5.3.). Abhängigkeiten von der Apherese-Behandlung konnten nicht beobachtet werden. Obwohl eine in der Literatur beschriebene Langzeit-Lipoprotein-Reduktion bei Apherese-Patienten eintritt, im Rahmen derer sich bei regelmäßiger Apherese-Behandlung eine konstante LDL-Cholesterin-Reduktion einstellt (22), so ist dies dennoch keine ausreichende Erklärung für die geringen Veränderungen der CAK in Abhängigkeit von der Apherese, da in jeder Einzelsitzung eine deutliche LDL-Cholesterin-Reduktion von über 60% erzielt wurde (22), und den Patientinnen an den Tagen der Apherese unmittelbar vor und nach der Behandlung Blut abgenommen wurde. Man kann aus den Ergebnissen schließen, dass LDL in Konzentrationen > 100mg/dl kein limitierender Faktor für die CAK ist. Im physiologischen Schwankungsbereich scheint LDL also aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse keinen entscheidenden Einfluss auf die Cholesterinaufnahme-Kapazität zu haben, was mit der fehlenden Korrelation der CAK zu LDL-Cholesterinwerten in der Patientenstudie übereinstimmt (s. Tabelle 6, Kapitel 5.4.).

#### **6.4. Einsetzbarkeit des Testverfahrens**

Zur besseren Übersicht soll in Tabelle 10 veranschaulicht werden, welche der in Kapitel 6.3. diskutierten Ergebnisse für oder gegen eine klinische oder wissenschaftliche Einsetzbarkeit des neuen Assays sprechen.

**Tabelle 10: Konzept der CAK: pro und contra**

<b>Pro</b>	<b>Contra</b>
Gute Reproduzierbarkeit	Inkonsistente Ergebnisse der HDL-defizienten Plasmen bei längeren Inkubationszeiten
Einfachheit der Handhabung	Keine direkten Korrelationen mit Lipid-Transferproteinen und anderen Parametern des Cholesterinstoffwechsels
Erniedrigte CAK bei FED, A-I-Defizienz und TD	Keine direkten Korrelationen der CAK mit HDL oder HDL-Unterklassen
	Keine direkten Korrelationen der CAK mit dem Cholesterinefflux aus Zellen
	Keine Auswirkung der LDL-Apherese auf die CAK

Zusammenfassend kann man aus unseren Versuchen den Schluss ziehen, dass die Bestimmung der CAK nicht als Testverfahren geeignet ist, um die antiatherogenen Eigenschaften von HDL-Veränderungen in klinischen Studien zu untersuchen.

## **7. Zusammenfassung:**

Ergebnisse von epidemiologischen Studien, genetischen Tiermodellen und In-vitro-Versuchen sprechen für eine protektive Rolle der HDL in der Atherosklerose. Im Zuge der Entschlüsselung dieser „antiatherogenen“ Rolle von HDL wurde die zentrale Bedeutung des Cholesterinefflux aus Zellen im Rahmen des Reversen Cholesterintransportes hervorgehoben.

Da die Bestimmung des Cholesterinefflux aus Zellen bisher stets die aufwendige Kultivierung von Zellen erforderte, sollte in dieser Arbeit ein neues Verfahren zur Cholesterinefflux-Messung entwickelt werden, in dem die Zellen durch ein Silikat als künstlichen Cholesterindonor ersetzt werden. Hiermit sollte das Potential von Plasmen gemessen werden, radioaktiv markiertes Cholesterin aus dem Silikat aufzunehmen: die Cholesterinaufnahme-Kapazität (CAK). Der in dieser Arbeit entwickelte Test zeigte eine gute Reproduzierbarkeit. Die CAK war abhängig von der Verdünnung der eingesetzten Plasmen und der Inkubationszeit.

Plasmen von Probanden mit unterschiedlichen HDL-Defizienzen zeigten CAK-Werte, die unter denen von Kontrollplasmen lagen.

In einer großen Patientenstudie wurden Wechselbeziehungen zwischen der CAK und verschiedenen Parametern des Cholesterin- und Lipoproteinstoffwechsels einschließlich des Cholesterinefflux aus zwei verschiedenen Zellarten untersucht, ohne dass aussagekräftige signifikante Korrelationen gefunden wurden.

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob starke Schwankungen der LDL-Konzentration des Plasmas (durch LDL-Apherese) ein limitierender Faktor der CAK sind, ebenfalls ohne dass sich eine Beeinflussung abzeichnete.

Trotz einfacher Handhabung und guter Reproduzierbarkeit sprechen die gesammelten Erkenntnisse gegen eine klinische oder wissenschaftliche Einsetzbarkeit des neuen Testverfahrens.



## **8. Literaturverzeichnis:**

1. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease: the Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation* 2000;102:21-7.
2. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:518-20.
3. Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Steffensen R, Jensen G, Tybjaerg-Hansen A. Elevated HDL cholesterol is a risk factor for ischemic heart disease in white women when caused by a common mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene. *Circulation* 2000;101:1907-12.
4. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol.Biol.Cell* 1999;10:1463-75.
5. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 2002;105:310-5.
6. Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, Hagele EO. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. *Clin.Chem.* 1983;29:2026-30.
7. Assmann G, von Eckardstein A, Brewer HB. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier disease. In: Scriver CA, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: McGraw-Hill 1995:2053-72.
8. Asztalos BF, Roheim PS. Presence and formation of 'free apolipoprotein A-I-like' particles in human plasma. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1995;15:1419-23.

9. Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS. Comparison of apo A-I-containing subpopulations of dog plasma and prenodal peripheral lymph: evidence for alteration in subpopulations in the interstitial space. *Biochim.Biophys.Acta* 1993;1169:301-4.
10. Atger V, de la Llera MM, Bamberger M et al. Cholesterol efflux potential of sera from mice expressing human cholesteryl ester transfer protein and/or human apolipoprotein AI. *J.Clin.Invest* 1995;96:2613-22.
11. Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J.Lipid Res.* 2001;42:1717-26.
12. Babitt J, Trigatti B, Rigotti A et al. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J.Biol.Chem.* 1997;272:13242-9.
13. Barrans A, Collet X, Barbaras R et al. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J.Biol.Chem.* 1994;269:11572-7.
14. Barter PJ. Evidence that lecithin:cholesterol acyltransferase acts on both high-density and low-density lipoproteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1983;751:261-70.
15. Barter PJ, Hopkins GJ, Gorjatschko L. Comparison of human plasma low- and high-density lipoproteins as substrates for lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta* 1984;792:1-5.
16. Berard AM, Foger B, Remaley A et al. High plasma HDL concentrations associated with enhanced atherosclerosis in transgenic mice overexpressing lecithin-cholesteryl acyltransferase. *Nat.Med.* 1997;3:744-9.

17. Bobak M, Hense HW, Kark J et al. An ecological study of determinants of coronary heart disease rates: a comparison of Czech, Bavarian and Israeli men. *Int.J.Epidemiol.* 1999;28:437-44.
18. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High--Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am.J.Cardiol.* 2000;86:19L-22L.
19. Bodzioch M, Orso E, Klucken J et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat.Genet.* 1999;22:347-51.
20. Bolibar I, von Eckardstein A, Assmann G, Thompson S. Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Thromb.Haemost.* 2000;84:955-60.
21. Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G et al. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J.Biol.Chem.* 2000;275:28634-40.
22. Bosch T. Direct adsorption of lipoproteins from whole blood by DALI apheresis: technique and effects. *Ther.Apher.* 2001;5:239-43.
23. Bosch T, Lennertz A, Schmidt B et al. DALI apheresis in hyperlipidemic patients: biocompatibility, efficacy, and selectivity of direct adsorption of lipoproteins from whole blood. *Artif.Organs* 2000;24:81-90.
24. Bosch T, Schmidt B, Blumenstein M, Gurland HJ. Lipid apheresis by hemoperfusion: in vitro efficacy and ex vivo biocompatibility of a new low-density lipoprotein adsorber compatible with human whole blood. *Artif.Organs* 1993;17:640-52.
25. Braschi S, Couture N, Gambarotta A et al. Hepatic lipase affects both HDL and ApoB-containing lipoprotein levels in the mouse. *Biochim.Biophys.Acta* 1998;1392:276-90.

26. Broccardo C, Luciani M, Chimini G. The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim.Biophys.Acta* 1999;1461:395-404.
27. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.* 1999;22:336-45.
28. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
29. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997;89:331-40.
30. BUCHER NL, OVERATH P, LYNEN F. beta-Hydroxy-beta-methyl-glutaryl coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* 1960;40:491-501.
31. Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988;27:25-9.
32. Chen CH, Albers JJ. Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1982;107:1091-6.
33. Chouinard RA, Jr., Luo Y, Osborne TF, Walsh A, Tall AR. Sterol regulatory element binding protein-1 activates the cholesteryl ester transfer protein gene in vivo but is not required for sterol up-regulation of gene expression. *J.Biol.Chem.* 1998;273:22409-14.
34. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J.Biol.Chem.* 2000;275:28240-5.

35. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:243-51.
36. Czarnecka H, Yokoyama S. Lecithin:cholesterol acyltransferase reaction on cellular lipid released by free apolipoprotein-mediated efflux. *Biochemistry* 1995;34:4385-92.
37. Danielsen EM, Hansen GH, Poulsen MD. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J.Cell Biol.* 1993;120:1347-56.
38. de Backer G, de Bacquer D, Kornitzer M. Epidemiological aspects of high density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis* 1998;137 Suppl:S1-S6.
39. de la Llera MM, Atger V, Paul JL et al. A cell culture system for screening human serum for ability to promote cellular cholesterol efflux. Relations between serum components and efflux, esterification, and transfer. *Arterioscler.Thromb.* 1994;14:1056-65.
40. DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 1999;99:703-12.
41. Despres JP, Marette A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr.Opin.Lipidol.* 1994;5:274-89.
42. Dieplinger H, Zechner R, Kostner GM. The in vitro formation of HDL2 during the action of LCAT: the role of triglyceride-rich lipoproteins. *J.Lipid Res.* 1985;26:273-82.
43. Duverger N, Ghalim N, Ailhaud G, Steinmetz A, Fruchart JC, Castro G. Characterization of apoA-IV-containing lipoprotein particles isolated from human plasma and interstitial fluid. *Arterioscler.Thromb.* 1993;13:126-32.

44. Erren M, Reinecke H, Junker R et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;19:2355-63.
45. Fan J, Wang J, Bensadoun A et al. Overexpression of hepatic lipase in transgenic rabbits leads to a marked reduction of plasma high density lipoproteins and intermediate density lipoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:8724-8.
46. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J.Lipid Res.* 1995;36:211-28.
47. Fielding CJ, Fielding PE. Intracellular cholesterol transport. *J.Lipid Res.* 1997;38:1503-21.
48. Fielding CJ, Fielding PE. Cellular cholesterol efflux. *Biochim.Biophys.Acta* 2001;1533:175-89.
49. Foger B, Chase M, Amar MJ et al. Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J.Biol.Chem.* 1999;274:36912-20.
50. Foger B, Ritsch A, Doblinger A, Wessels H, Patsch JR. Relationship of plasma cholesteryl ester transfer protein to HDL cholesterol. Studies in normotriglyceridemia and moderate hypertriglyceridemia. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1996;16:1430-6.
51. Forte TM, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J, McCall MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J.Lipid Res.* 1995;36:148-57.
52. Forte TM, Goth-Goldstein R, Nordhausen RW, McCall MR. Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J.Lipid Res.* 1993;34:317-24.

53. Fournier N, Atger V, Cogny A et al. Analysis of the relationship between triglyceridemia and HDL-phospholipid concentrations: consequences on the efflux capacity of serum in the Fu5AH system. *Atherosclerosis* 2001;157:315-23.
54. Fournier N, Atger V, Paul JL et al. Human ApoA-IV overexpression in transgenic mice induces cAMP-stimulated cholesterol efflux from J774 macrophages to whole serum. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:1283-92.
55. Fournier N, Cogny A, Atger V et al. Opposite effects of plasma from human apolipoprotein A-II transgenic mice on cholesterol efflux from J774 macrophages and Fu5AH hepatoma cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2002;22:638-43.
56. Fournier N, Francone O, Rothblat G et al. Enhanced efflux of cholesterol from ABCA1-expressing macrophages to serum from type IV hypertriglyceridemic subjects. *Atherosclerosis* 2003;171:287-93.
57. Francone OL, Royer L, Haghpassand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J.Lipid Res.* 1996;37:1268-77.
58. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin.Chem.* 1972;18:499-502.
59. Funke H, von Eckardstein A, Pritchard PH et al. A molecular defect causing fish eye disease: an amino acid exchange in lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) leads to the selective loss of alpha-LCAT activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88:4855-9.
60. Gillotte KL, Davidson WS, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Removal of cellular cholesterol by pre-beta-HDL involves plasma membrane microsolubilization. *J.Lipid Res.* 1998;39:1918-28.

61. Gillotte KL, Zaiou M, Lund-Katz S et al. Apolipoprotein-mediated plasma membrane microsolvubilization. Role of lipid affinity and membrane penetration in the efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *J.Biol.Chem.* 1999;274:2021-8.
62. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J.Lipid Res.* 1968;9:155-67.
63. Glomset JA, Verdery RB. Role of LCAT in cholesterol metabolism. *Expos.Annu.Biochim.Med.* 1977;33:137-42.
64. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989;79:8-15.
65. Gould AL, Rossouw JE, Santanello NC, Heyse JF, Furberg CD. Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation* 1998;97:946-52.
66. Gu X, Kozarsky K, Krieger M. Scavenger receptor class B, type I-mediated [3H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor. *J.Biol.Chem.* 2000;275:29993-30001.
67. Hamilton RL, Williams MC, Fielding CJ, Havel RJ. Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J.Clin.Invest* 1976;58:667-80.
68. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat.Cell Biol.* 2000;2:399-406.
69. Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X et al. Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J.Clin.Invest* 1995;96:2071-4.



70. Hegele RA, Little JA, Vezina C et al. Hepatic lipase deficiency. Clinical, biochemical, and molecular genetic characteristics. *Arterioscler.Thromb.* 1993;13:720-8.
71. Hergenc G, Schulte H, Assmann G, von Eckardstein A. Associations of obesity markers, insulin, and sex hormones with HDL-cholesterol levels in Turkish and German individuals. *Atherosclerosis* 1999;145:147-56.
72. Hersberger M, von Eckardstein A. Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* 2003;63:1907-45.
73. Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM et al. Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1996;93:11448-53.
74. Hokland BM, Slotte JP, Bierman EL, Oram JF. Cyclic AMP stimulates efflux of intracellular sterol from cholesterol-loaded cells. *J.Biol.Chem.* 1993;268:25343-9.
75. Huang Y, von Eckardstein A, Assmann G. Cell-derived unesterified cholesterol cycles between different HDLs and LDL for its effective esterification in plasma. *Arterioscler.Thromb.* 1993;13:445-58.
76. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Assmann G. Effects of the apolipoprotein E polymorphism on uptake and transfer of cell-derived cholesterol in plasma. *J.Clin.Invest* 1995;96:2693-701.
77. Huang Y, von Eckardstein A, Wu S, Maeda N, Assmann G. A plasma lipoprotein containing only apolipoprotein E and with gamma mobility on electrophoresis releases cholesterol from cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91:1834-8.
78. Huang Y, Zhu Y, Langer C et al. Effects of genotype and diet on cholesterol efflux into plasma and lipoproteins of normal, apolipoprotein A-I-, and

- apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997;17:2010-9.
79. Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y et al. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J.Lipid Res.* 1990;31:1911-24.
80. Ikewaki K, Rader DJ, Sakamoto T et al. Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J.Clin.Invest* 1993;92:1650-8.
81. Inazu A, Koizumi J, Mabuchi H. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:389-96.
82. Jauhiainen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, van Tol A, Ehnholm C. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J.Biol.Chem.* 1993;268:4032-6.
83. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat.Genet.* 1999;21:424-8.
84. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation* 1998;97:1029-36.
85. Ji Y, Jian B, Wang N et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J.Biol.Chem.* 1997;272:20982-5.
86. Jiang X, Francone OL, Bruce C et al. Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J.Clin.Invest* 1996;98:2373-80.

87. Jiang XC, Bruce C, Mar J et al. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J.Clin.Invest* 1999;103:907-14.
88. Kannel WB, DAWBER TR, KAGAN A, REVOTSKIE N, STOKES J, III. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann.Intern.Med.* 1961;55:33-50.
89. Kellner-Weibel G, Llera-Moya M, Connelly MA et al. Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry* 2000;39:221-9.
90. Knipping G, Birchbauer A, Steyrer E, Groener J, Zechner R, Kostner GM. Studies on the substrate specificity of human and pig lecithin: cholesterol acyltransferase: role of low-density lipoproteins. *Biochemistry* 1986;25:5242-9.
91. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:721-7.
92. Krieger M. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu.Rev.Biochem.* 1999;68:523-58.
93. 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.
94. Lambert G, Chase MB, Dugi K, Bensadoun A, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. Hepatic lipase promotes the selective uptake of high density lipoprotein-cholesteryl esters via the scavenger receptor B1. *J.Lipid Res.* 1999;40:1294-303.
95. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J.Clin.Invest* 1999;104:R25-R31.

96. Libby P, Aikawa M, Schonbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochim.Biophys.Acta* 2000;1529:299-309.
97. Lin G. Insights of high-density lipoprotein apolipoprotein-mediated lipid efflux from cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2002;291:727-31.
98. Liscovitch M, Lavie Y. Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem.Sci.* 2000;25:530-4.
99. Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA et al. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J.Lipid Res.* 1999;40:575-80.
100. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie.* Springer-Verlag, 2003.
101. Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J.Clin.Invest* 2000;105:513-20.
102. Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, Somerharju P, Ehnholm C. The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem.J.* 1996;313 ( Pt 1):275-82.
103. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature* 1993;364:73-5.
104. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D et al. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:4245-50.
105. Mendez AJ. Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *J.Lipid Res.* 1997;38:1807-21.

106. Mendez AJ, Oram JF, Bierman EL. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol. *J.Biol.Chem.* 1991;266:10104-11.
107. Miccoli R, Bertolotto A, Navalesi R et al. Compound heterozygosity for a structural apolipoprotein A-I variant, apo A-I(L141R)Pisa, and an apolipoprotein A-I null allele in patients with absence of HDL cholesterol, corneal opacifications, and coronary heart disease. *Circulation* 1996;94:1622-8.
108. Moestrup SK, Kozyraki R. Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:133-40.
109. Morton RE. Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr.Opin.Lipidol.* 1999;10:321-7.
110. Musliner TA, Long MD, Forte TM et al. Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J.Lipid Res.* 1991;32:917-33.
111. Nanjee MN, Cooke CJ, Olszewski WL, Miller NE. Concentrations of electrophoretic and size subclasses of apolipoprotein A-I-containing particles in human peripheral lymph. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:2148-55.
112. Nanjee MN, Doran JE, Lerch PG, Miller NE. Acute effects of intravenous infusion of ApoA1/phosphatidylcholine discs on plasma lipoproteins in humans. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999;19:979-89.
113. Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J.Lipid Res.* 1996;37:2473-91.
114. Ordovas JM, Cupples LA, Corella D et al. Association of cholesteryl ester transfer protein-TaqIB polymorphism with variations in lipoprotein subclasses and coronary heart disease risk: the Framingham study. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:1323-9.

115. Phillips MC, Gillotte KL, Haynes MP, Johnson WJ, Lund-Katz S, Rothblat GH. Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes. *Atherosclerosis* 1998;137 Suppl:S13-S17.
116. Phillips MC, Johnson WJ, Rothblat GH. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim.Biophys.Acta* 1987;906:223-76.
117. Pohl P, Saporov SM, Antonenko YN. The size of the unstirred layer as a function of the solute diffusion coefficient. *Biophys.J.* 1998;75:1403-9.
118. Rader DJ, Castro G, Zech LA, Fruchart JC, Brewer HB, Jr. In vivo metabolism of apolipoprotein A-I on high density lipoprotein particles LpA-I and LpA-I,A-II. *J.Lipid Res.* 1991;32:1849-59.
119. Rader DJ, Jaye M. Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:141-7.
120. Rajaram OV, Barter PJ. Reactivity of human lipoproteins with purified lecithin: cholesterol acyltransferase during incubations in vitro. *Biochim.Biophys.Acta* 1985;835:41-9.
121. Remaley AT, Schumacher UK, Stonik JA, Farsi BD, Nazih H, Brewer HB, Jr. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1997;17:1813-21.
122. Rittershaus CW, Miller DP, Thomas LJ et al. Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:2106-12.
123. Rosseneu M, Michiels G, De Keersgieter W et al. Quantification of human apolipoprotein A-IV by "sandwich"-type enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Chem.* 1988;34:739-43.

124. Rothblat GH, Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J.Lipid Res.* 1999;40:781-96.
125. Rust S, Rosier M, Funke H et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* 1999;22:352-5.
126. Rye KA, Barter PJ. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2004;24:421-8.
127. Sacks FM, Tonkin AM, Craven T et al. Coronary heart disease in patients with low LDL-cholesterol: benefit of pravastatin in diabetics and enhanced role for HDL-cholesterol and triglycerides as risk factors. *Circulation* 2002;105:1424-8.
128. Sakai N, Vaisman BL, Koch CA et al. Targeted disruption of the mouse lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) gene. Generation of a new animal model for human LCAT deficiency. *J.Biol.Chem.* 1997;272:7506-10.
129. Sakr SW, Williams DL, Stoudt GW, Phillips MC, Rothblat GH. Induction of cellular cholesterol efflux to lipid-free apolipoprotein A-I by cAMP. *Biochim.Biophys.Acta* 1999;1438:85-98.
130. Santamarina-Fojo S, Lambert G, Hoeg JM, Brewer HB, Jr. Lecithin-cholesterol acyltransferase: role in lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:267-75.
131. Schmitz G, Assmann G, Robenek H, Brennhäusen B. Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985;82:6305-9.
132. Schriewer H, Jabs HU, Assmann G. [The enzymatic analysis of sphingomyelin in HDL (author's transl)]. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1982;20:305-12.
133. Schriewer H, Jung G, Emke F, Assmann G. An economical assay for HDL phosphatidyl choline. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1983;21:611-4.

134. Schuler-Luttmann S, Zhu Y, Hoffmann M et al. Cholesterol efflux from normal and Tangier disease fibroblasts into normal, high-density lipoprotein-deficient, and apolipoprotein E-deficient plasmas. *Metabolism* 2000;49:770-7.
135. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994;107:85-98.
136. Sharrett AR, Ballantyne CM, Coady SA et al. Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2001;104:1108-13.
137. Siperstein MD, Fagan VM. Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *J.Biol.Chem.* 1966;241:602-9.
138. Szakacs G, Langmann T, Ozvegy C et al. Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2001;288:1258-64.
139. Takahashi Y, Smith JD. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:11358-63.
140. Tall A. Plasma lipid transfer proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 1995;64:235-57.
141. Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:1185-8.
142. Thuren T. Hepatic lipase and HDL metabolism. *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:277-83.
143. Trigatti B, Rayburn H, Vinals M et al. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96:9322-7.



144. van Haperen R, van Tol A, Vermeulen P et al. Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20:1082-8.
145. van Veen HW, Higgins CF, Konings WN. Molecular basis of multidrug transport by ATP-binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine model. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* 2001;3:185-92.
146. Vance DE, Vance J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* New Comprehensive Biochemistry, Vol. 20. Elsevier, 2002.
147. von Eckardstein A, Assmann G. High density lipoproteins and reverse cholesterol transport: lessons from mutations. *Atherosclerosis* 1998;137 Suppl:S7-11.
148. von Eckardstein A, Assmann G. Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol? *Curr.Opin.Lipidol.* 2000;11:627-37.
149. von Eckardstein A, Crook D, Elbers J et al. Tibolone lowers high density lipoprotein cholesterol by increasing hepatic lipase activity but does not impair cholesterol efflux. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 2003;58:49-58.
150. von Eckardstein A, Funke H, Chirazi A et al. Sex-specific effects of the glutamine/histidine polymorphism in apo A-IV on HDL metabolism. *Arterioscler.Thromb.* 1994;14:1114-20.
151. von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* 2005;8:147-52.
152. von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. *Curr.Opin.Lipidol.* 1994;5:404-16.

153. von Eckardstein A, Huang Y, Wu S, Funke H, Nosedá G, Assmann G. Reverse cholesterol transport in plasma of patients with different forms of familial HDL deficiency. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1995;15:691-703.
154. von Eckardstein A, Huang Y, Wu S et al. Lipoproteins containing apolipoprotein A-IV but not apolipoprotein A-I take up and esterify cell-derived cholesterol in plasma. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1995;15:1755-63.
155. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y et al. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim.Biophys.Acta* 1996;1301:255-62.
156. von Eckardstein A, Langer C, Engel T et al. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J.* 2001;15:1555-61.
157. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. Acceleration of reverse cholesterol transport. *Curr.Opin.Cardiol.* 2000;15:348-54.
158. 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.
159. von Eckardstein A, Schulte H, Assmann G. Increased risk of myocardial infarction in men with both hypertriglyceridemia and elevated HDL cholesterol. *Circulation* 1999;99:1925.
160. Wang X, Driscoll DM, Morton RE. Molecular cloning and expression of lipid transfer inhibitor protein reveals its identity with apolipoprotein F. *J.Biol.Chem.* 1999;274:1814-20.
161. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998;97:1837-47.

162. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2003;23:712-9.
163. Zandonella G, Haalck L, Spener F, Faber K, Paltauf F, Hermetter A. Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacyl glycerols. Effect of substrate solubilization. *Eur.J.Biochem.* 1995;231:50-5.
164. Zanotti I, Favari E, Sposito AC, Rothblat GH, Bernini F. Pitavastatin increases ABCA1-mediated lipid efflux from Fu5AH rat hepatoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2004;321:670-4.
165. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979;60:473-85.

**9. Abkürzungsverzeichnis:**

A-I-Def.	A-I-Defizienz
ABCA1	Mitglied einer <i>ATP</i> -bindenden Kassetten (ABC) -Transmembrantransporter-Familie
$\alpha$ -LpA-I	alpha-Lipoprotein A-I
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoA-II	Apolipoprotein A-II
ApoA-IV	Apolipoprotein A-IV
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CAK	Cholesterinaufnahme-Kapazität
cAMP	zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
Ci	Curie
CRP	C-reaktives Protein
DALI	Direkte Adsorption von Lipoproteinen aus Gesamtblut mittels Lipid-Hämoperfusionssystem
DTNB	5,5'-Dithio-Bi[2-Nitrobenzoesäure]; Hemmer des Enzyms LCAT
FC	freies (nicht-verestertes) Cholesterin
FED	Fish-eye-disease, Fischaugenkrankheit
Fu5AH-Zellen	Zellen einer transformierten Ratten-Hepatoma- Zelllinie, die in hohem Maße <i>SR-B1</i> exprimieren
$\gamma$ -LpE	Gamma-Lipoprotein E
h	Stunde
hApoA-II	Menschliches Apolipoprotein A-II
HDL	High-Density-Lipoprotein
HDL-PC	Im HDL enthaltenes Phosphocholin
HDL-SPM	Im HDL enthaltenes Sphingomyelin
HL	Hepatische Lipase

J774-Zellen	Zellen einer Mäuse-Makrophagen-Zelllinie
KHK	Koronare Herzkrankheit
Konz.	Konzentration
LCAT	Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-Density-Lipoprotein
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LpA-I	Lipoprotein A-I
LpA-I/A-II	Lipoprotein A-I/A-II
LPL	Lipoproteinlipase
MDR	Multidrug-(Transmembran-)Transporter
μ	Mikro
Min	Minute
N	Nano
PC	Phosphocholin
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
Praeβ-LpA-I	Prae-beta-Lipoprotein A-I
proz.	prozentual
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SPM	Sphingomyelin
SR-B1	Scavenger Rezeptor, Klasse B, Typ 1
TD	Tangier-disease, Tangierkrankheit
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
VK	Variationskoeffizient

**10. Lebenslauf:****Persönliche Daten:**

Name: Stefan Sondermann  
 Geburtsdatum / -ort: 03.01.1977, Bocholt  
 Eltern: Günter Sondermann, Bankbetriebswirt  
 Magdalene Sondermann, geb. Klötgen, Bankkauffrau  
 1 Bruder: Peter Sondermann (geb. am 17.01.1975), Arzt

**Schulbildung:**

1983-1987 Marienschule, Bocholt – Biemenhorst  
 1987-1996 Privates Bischöfliches St.-Josef-Gymnasium, Bocholt

**Zivildienst:**

07/ 1996 – 08/ 1997 St.-Agnes-Hospital, Bocholt

**Hochschulbildung:**

10/ 1997 – 05/ 2004 Studium der Humanmedizin an der WWU Münster  
 08/ 1999 Ärztliche Vorprüfung  
 08/ 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 03/ 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/ 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Famulaturen/ Praktisches Jahr/ beruflicher Werdegang:**

04/ 2001 Kardiologie, St.-Agnes-Hospital, Bocholt  
 08 – 09/ 2001 Innere Medizin, Zentralkrankenhaus in Pori, Finnland  
 05/ 2002 Kinder- und Jugendpsychosomatik, Universitätsklinikum  
 Münster  
 04 – 08/ 2003 Chirurgie, Universitätsklinikum Oulu, Finnland  
 (Chirurgie-Tertial des PJ – Auslandsaufenthalt im Rahmen  
 eines ERASMUS-Stipendiums)  
 08 – 11/ 2003 Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Münster (Wahl-  
 Tertial des PJ)  
 12/ 2003 – 03/ 2004 Innere Medizin, Universitätsklinikum Münster (Innere-  
 Medizin-Tertial des PJ)

Seit 08/ 2004

Assistenzarzt der Inneren Abteilung des Marienhospitals  
in Emsdetten

**Berufliche Nebentätigkeiten:**

10/ 1999 – 03/ 2003

Studentische Hilfskraft (Tutor des Physiologischen  
Praktikums) am Institut für Physiologie des  
Universitätsklinikums Münster

**Danksagung:**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Gerd Assmann für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit der wissenschaftlichen Ausführung im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Münster.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Arnold von Eckardstein für dessen ausgezeichnete Unterstützung.

Ebenso danke ich Melanie Horter für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Ausführung.

Für die Unterstützung bei der wissenschaftlichen Einarbeitung möchte ich folgenden Personen danken (in alphabetischer Reihenfolge): Kirstin Ebert, Gabriele Klapdor, Dr. Claus Langer, Alois Roetrige und Isabel Schaukal.

Für die mathematisch-statistische Unterstützung danke ich Herrn Michael Stenneken.