

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
(Kardiologie, Angiologie, internistische Intensivmedizin)
der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Werdan)



Bedeutung des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) im Krankheitsbild der Atherosklerose

Habilitation

zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. habil.

Vorgelegt der
Medizinischen Fakultät der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Dr. med. Axel Schlitt, geboren am 04.10.1966 in Kassel

Datum der Verteidigung: 05.06.2007

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Werdan
2. Prof. Dr. med. M. Böhm
3. Prof. Dr. med. J. Thiery

urn:nbn:de:gbv:3-000012179

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012179>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Phospholipid-Transferproteins (PLTP), welches unter anderem den Transfer von Phospholipiden zwischen Lipoproteinen vermittelt, im Krankheitsbild der Atherosklerose untersucht werden.

Methodik

Die Evaluierung des PLTP erfolgte in klinischen Studien und zusätzlich in experimentellen Untersuchungen an verschiedenen Mausmodellen.

Ergebnisse

In humanen Studien konnte die Rolle des PLTP an Hand verschiedener Populationen aufgezeigt werden. So war in einer Studie mit mehr als 1.500 Patienten und Probanden eine erhöhte Plasma PLTP-Aktivität unabhängig von anderen Risikofaktoren mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung assoziiert.

In einer Interventionsstudie, bei der eine fettreiche Mahlzeit von gesunden Probanden eingenommen wurde, zeigte sich eine Korrelation des PLTP mit den postprandial erhöhten, atherogenen Lipoproteinen als ein Aspekt seiner Pro-Atherogenität.

Eine weitere Hypothese zur Pro-Atherogenität des PLTP war seine Assoziation zur maßgeblich die Prognose der Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen bestimmenden Entzündungsreaktion. Diese Hypothese konnte in Mausmodellen bestätigt werden. Es bestand ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des PLTP-Gens und der Inflammation, auch in atherosklerotischen Mausmodellen (LDL-Rezeptor-knock-out).

Weiterhin wurde die Rolle des PLTP bei Hämodialyse-Patienten untersucht. Deren Risiko für die Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen und kardiovaskulärer Komplikationen ist stark erhöht. Die PLTP-Aktivität war gegenüber einer gepaarten Kontrollgruppe nahezu verdoppelt, weiterhin korrelierte die PLTP-Aktivität mit der Inflammationsreaktion und den Triglyzeriden. Somit bestätigte diese Untersuchung die Ergebnisse der in den vorherigen Arbeiten generierten Hypothesen.

Letztendlich können jedoch nur prospektive Analysen die Rolle eines Risikofaktors im Krankheitsbild der Atherosklerose klären. Hier zeigte sich sowohl bei Patienten

mit koronarer Atherosklerose als auch bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz keine Assoziation zwischen erhöhter PLTP-Aktivität und schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen.

Schlussfolgerungen

1. Eine Erhöhung der PLTP-Aktivität ist mit dem Vorliegen atherosklerotischer Erkrankungen assoziiert.
2. Inflammatorische Effekte des PLTP und die Assoziation zu den postprandial erhöhten Lipoproteinen sind Aspekte seiner potentiell pro-atherogenen Wirkung.
3. Die prognostische Relevanz dieses Enzyms für Patienten mit atherosklerotischen Krankheitsbildern in Hinblick auf eine potentielle therapeutische Beeinflussung gilt es in weiteren Populationen zu prüfen.

Dr. med. Axel Schlitt, Habilitation zum Thema „Bedeutung des Phospholipid-Transferproteins (PLTP) im Krankheitsbild der Atherosklerose“. Halle, Universität, Medizinische Fak., Diss., 88 Seiten, 2006.

Inhalt

1. Einleitung

1.1. Mechanismen und Risikofaktoren der Atherosklerose

1.2. Die Rolle des Lipoproteinmetabolismus bei der Entstehung der Atherosklerose

1.3. Die Rolle des Phospholipid-Transferprotein bei der Entstehung der Atherosklerose

2. Zielstellungen

3. Studienpopulationen, Material und Methodik

3.1 Patienten und Methodik zum Themenkomplex "Die Rolle des PLTP bei Patienten mit koronarer Atherosklerose: Querschnittsvergleich zu gesunden Probanden und prognostische Relevanz bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Atherosklerose."

3.2 Probanden und Methodik zum Themenkomplex "PLTP bei gesunden Probanden nach einer fettreichen Mahlzeit".

3.3 Untersuchungen zur proinflammatorischen Wirkung von PLTP in Mausmodellen

3.4 Studienpopulation und Methodik zum Studienkomplex: PLTP bei Hämodialysepatienten, Vergleich mit einer gepaarten Kontrollgruppe und prognostische Relevanz

4. Ergebnisse

4.1. Phospholipid-Transferprotein bei Patienten mit koronarer Atherosklerose: „Querschnittsvergleich mit gesunden Probanden und prognostische Relevanz bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Atherosklerose“

4.2. PLTP-Kinetik bei gesunden Probanden nach einer fettreichen Mahlzeit

4.3. PLTP hat proinflammatorische Effekte in Mausmodellen

4.4. PLTP bei Hämodialysepatienten: Vergleich mit einer gepaarten Kontrollgruppe und prognostische Relevanz

5. Diskussion

5.1. PLTP und seine Rolle im Krankheitsbild der Atherosklerose

5.2. PLTP hat proinflammatorische Eigenschaften

5.3. Bedeutung des Phospholipid-Transferproteins bei Atherosklerose-Risiko-
Populationen am Beispiel der Hämodialysepatienten

5.4. PLTP als prospektiver Marker bei Patienten mit manifester koronarer
Atherosklerose und bei Hämodialysepatienten

5.5. Ausblick

5.6. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

8.2 Danksagung

8. Thesen

9. Tabellarischer Lebenslauf

Verzeichnis der Abkürzungen

ABC-1	ATB-binding cassette transporter-1
ACAT	Acyl-Cholesteryl-Acyltransferase
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE0	Apolipoprotein E-Gen-knockout
BMI	Body mass index (Körpermassenindex)
CETP	Cholesterylester-Transferprotein
CETPtg	CETP-transgen
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme linked immuno absorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FFS	Freie Fettsäuren
HD	Hämodialyse
HDL	High density lipoprotein
HL	Hepatische Lipase
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	High performance liquid chromatography
IDL	Intermediate density lipoprotein
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
KHK	Koronare Herzerkrankung
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LCAT	Lecithin-Cholesteryl-Acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LDLr0	LDL-Rezeptor-Gen-knockout
Lp(a)	Lipoprotein(a)
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein ("Monocyte chemotactic protein")

M-CSF	Monocyte colony stimulating factor
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
NO	Stickoxid
ox-LDL	Oxidiertes LDL
PAF-AH	Platelet-activating-factor-Acetylhydrolase
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PLTP0	PLTP-Gen-knockout
PLTPtg	PLTP-transgen
PCR	Polymerase chain reaction
RCT	Reverser Cholesterintransport
ROS	Reactive oxygen species
SR-BI	Klasse B, Typ 1 Scavenger Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very low density lipoprotein
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die Behandlung von Patienten mit atherosklerosebedingten Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist eine der häufigsten ärztlichen Aufgaben in der westlichen Welt. Obwohl es schwierig ist, zur Gesamthäufigkeit atherosklerotischer Gefäßkrankheiten verlässliche Zahlen zu finden, wird angenommen, dass mindestens 30% der mitteleuropäischen Bevölkerung an der häufig noch unentdeckten Atherosklerose leiden. Als schwerwiegendste Komplikationen dieser Systemerkrankung repräsentieren Herzinfarkte und Schlaganfälle die Haupttodesursachen in entwickelten Ländern.

Seit mehreren Dekaden sind kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Nikotin bekannt, welche mit der Entstehung und Progression atherosklerotischer Erkrankungen assoziiert sind. Die Bedeutung des Cholesterins als wichtiger Risikofaktor ist seit der Publikation der Framingham-Studie unbestritten (1).

Das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) ist ein in den Lipoproteinstoffwechsel, insbesondere den Metabolismus des High-Density-Lipoproteins (HDL) involviertes Plasmaenzym. Seine Rolle in der Entwicklung und Progression der Atherosklerose ist bis dato ungeklärt.

Einleitend werden in der vorliegenden Habilitationsschrift zunächst das Krankheitsbild der Atherosklerose und die Rolle des Entzündungsprozesses (Abschnitt 1.1) sowie der Lipidmetabolismus (Abschnitt 1.2) zusammengefasst. Im dritten Abschnitt der Einleitung wird das Phospholipid-Transferprotein und seine physiologischen und pathophysiologischen Aspekte vorgestellt (Abschnitt 1.3).

1.1 Inflammation als wesentliche Komponente der Atherosklerose-Entstehung

“Atherosclerosis is an inflammatory disease” (2). Dieser Satz von R. Ross bestimmt unsere heutige Vorstellung der Pathogenese der Atherosklerose. Histopathologisch und experimentell nachgewiesen, finden sich in atherosklerotischen Läsionen Reaktionen, welche zusammenfassend als Entzündungserkrankung beschrieben werden (3).

Die erste pathophysiologisch detektierbare Manifestation der Atherosklerose äußert sich in einer verminderten endothelialen Produktion von Stickoxid (NO). Die beginnende endotheliale Dysfunktion entsteht auf dem Boden einer Endothelschädigung. Diese kann durch hämodynamische Veränderungen (4), oxidiertes oder enzymatisch verändertes Low-density lipoprotein (LDL) (5), vasoaktive Amine, Immunkomplexe (6) und weitere Faktoren ausgelöst werden. Die endotheliale Dysfunktion ist mit einem Ungleichgewicht von Proliferation und Anti-Proliferation, Pro- und Anti-Thrombogenität des Endothels, sowie Gefäßwandkontraktion und -relaxation verbunden (7) und korreliert mit einem erhöhten Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (8).

Die Anlagerung und Einwanderung von Leukozyten an/in die Intima sind weitere, entscheidende, frühe Schritte zur Bildung einer atherosklerotischen Läsion. Im Rahmen der Endothelschädigung werden spezifische Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin aus der Gruppe der Selektine oder vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (VCAM-1) aus der Familie der Immunglobuline auf den Endothelzelloberflächen den zirkulierenden Leukozyten präsentiert. Selektine vermitteln den temporären Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzelle und werden überwiegend auf Endothelzellen exprimiert, welche über atherosklerotischen Läsionen liegen. Vaskuläre Adhäsionsmoleküle hingegen binden vornehmlich in der frühen Phase der Atherogenese Lymphozyten und Monozyten fest an das Endothel und begünstigen die Einwanderung dieser Zellen in den subendothelialen Raum (9). Die Rekrutierung der inflammatorischen Zellen in den subintimalen Raum findet in Anwesenheit von Lipiden statt, so dass eine subintimale Lipidakkumulation die Einwanderung inflammatorischer Zellen begünstigt (10).

Abbildung 1.1 beschreibt schematisch die Einwanderung der maßgeblich in den atherosklerotischen Prozess involvierten Monozyten.

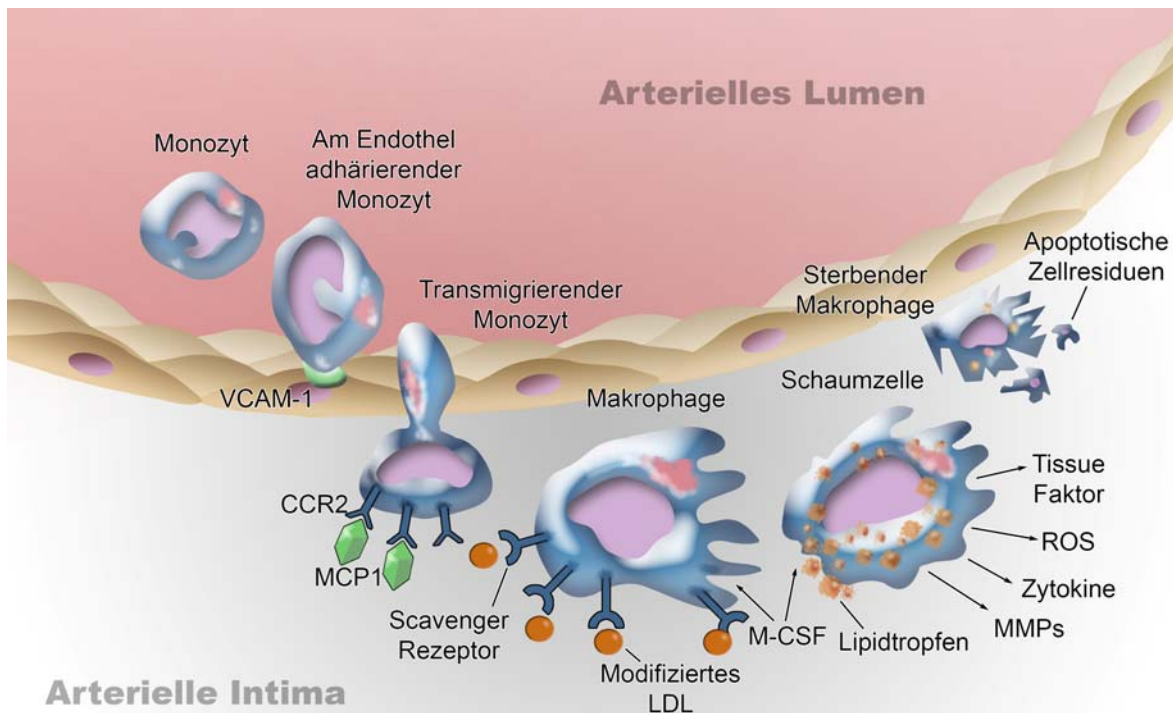


Abbildung 1.1.1
Schematische Darstellung der Einwanderung von Monozyten in den subintimalen Raum und deren Transformation in Makrophagen und Schaumzellen im Rahmen der Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque.

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, MCP-1: monocyte chemotactic protein, M-CSF: monocyte colony stimulating factor, MMPs: Matrix-Metallo-Proteinasen, ROS: Reactive oxygen species.

Der Einwanderungsprozess der Leukozyten in den subendothelialen Raum wird über verschiedene Chemokine und Zytokine reguliert (11). Als zentraler inflammatorischer Mediator wird das aus aktivierten Lymphozyten freigesetzte Molekül Interferon- γ (IFN- γ) diskutiert (12). IFN- γ kann die Expression von Adhäsionsmolekülen regulieren und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) induzieren, welche ihrerseits Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen aktivieren und somit den subendothelialen inflammatorischen Prozess unterhalten. Sind Monozyten/Makrophagen in der Intima lokalisiert, können sie Cholesterin, insbesondere in Form von oxidiertem LDL (ox-LDL), aufnehmen. Sie verändern sich

zu Schaumzellen. Moleküle an der Zelloberfläche der Makrophagen, so genannte „scavenger receptors“, sind für die Bindung der modifizierten Lipoproteine verantwortlich (13). Schaumzellen bilden das histopathologische Korrelat der frühen atherosklerotischen Läsion, der so genannten Fettstreifenläsion, welche man schon in der Kindheit und Jugend in der Aorta Verstorbenen nachweisen kann. Die Präsenz von Entzündungszellen und Schaumzellen innerhalb der Intima ist reversibel und führt in der Regel nicht zur Manifestation einer atherosklerotischen Erkrankung. Jedoch kann eine Progression der atherosklerotischen Plaque hin zu einer fibrösen oder komplizierten Plaque stattfinden.

Die atherosklerotische Plaque besteht aus einer Deckplatte, welche fibröses Bindegewebe und glatte Muskelzellen beinhaltet. Die glatten Muskelzellen der fibrösen Deckplatte produzieren Wachstumshormone, die ihre Proliferationsrate erhöhen. Weiterhin produzieren sie Matrixproteine wie Kollagen und Elastin. So trägt die Deckplatte, die den thrombogenen, lipid- und zellreichen Kern der Plaque vom Blutstrom trennt, zur Stabilität der atherosklerotischen Läsion bei (14). Das Gleichgewicht bestimmter pathophysiologischer Abläufe determiniert die Entwicklung der Plaque (siehe Abbildung 1.1.2).

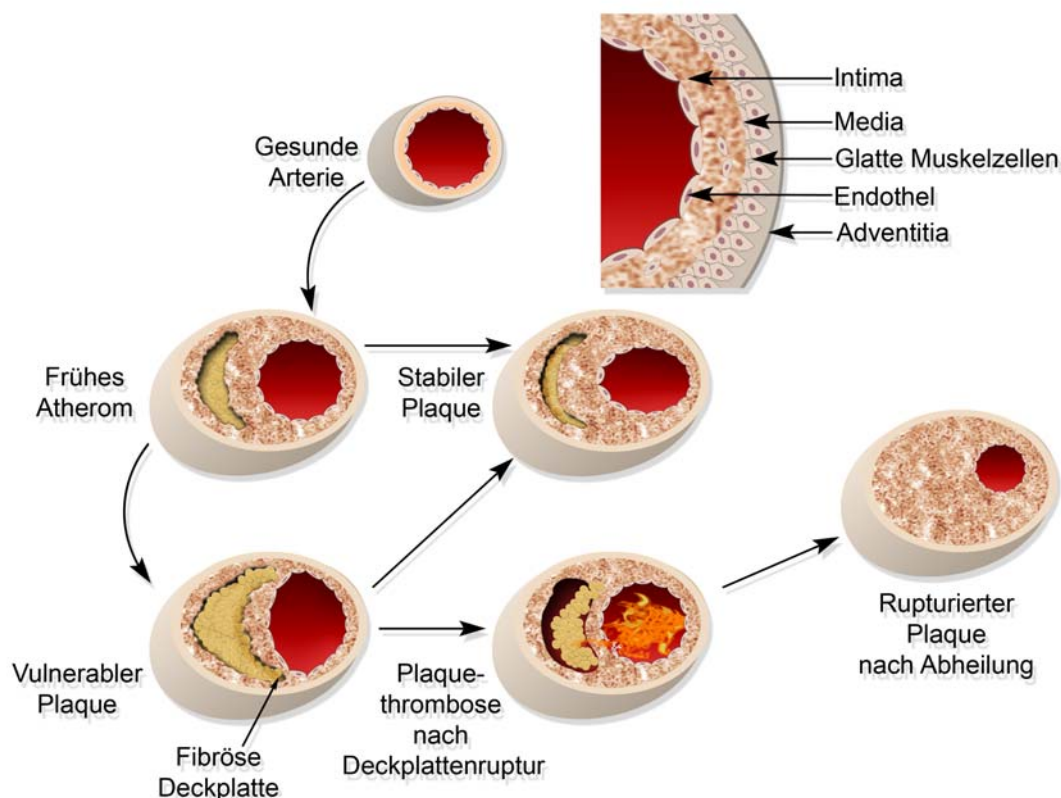


Abbildung 1.1.2

Darstellung der atherosklerotischen Stadien und der Entwicklung einer gesunden Arterie zu einer durch atherosklerotische Plaques erkrankten Arterie

Die Mehrzahl der arteriellen Gefäßthrombosen resultiert aus einer Ruptur der fibrösen Deckplatte atherosklerotischer Plaques. Insbesondere Plaques mit einem großem Lipidpool und einer dünnen Deckplatte sind rupturgefährdet. An der Stelle der Ruptur, in der Regel der so genannten "Plaqueschulter", finden sich gehäuft Makrophagen und T-Lymphozyten (15). Aktivierte T-Zellen produzieren IFN- γ , welches neben seiner Fähigkeit, die Zytokinbildung anzuregen und somit die Inflammation zu unterhalten, Enzyme in Makrophagen aktiviert, welche den Kollagengehalt der Plaque abbauen können (16). Diese Metalloproteinasen können von Makrophagen sezerniert werden (17) und unterliegen verschiedenen Regulationsmechanismen (18). Zytokine selbst können Apoptose von glatten Muskelzellen und anderen Zellen induzieren und somit zu einer weiteren Destabilisierung der Läsion führen (19).

Verschiebt sich das Gleichgewicht hin zur Destabilisierung der Deckplatte, entsteht eine rupturgefährdete, vulnerable Plaque (Abbildung 1.1.2). Tritt im Falle einer Plaqueruptur der thrombogene Plaqueinhalt mit dem Blutstrom in Kontakt, kann sich ein Thrombus bilden, welcher das Gefäßlumen partiell oder vollständig verschließt (20) und zur Manifestation schwerwiegender Krankheitsbilder wie akutem Koronarsyndrom oder cerebrovaskulärem Insult führt.

Die wesentliche Bedeutung der fokalen Entzündungsreaktion für die Atherogenese und die akute Plaqueruptur ist histopathologisch (21) und experimentell (3) gesichert. Seit einigen Jahren lassen sich diese Ergebnisse auf die epidemiologische Ebene übertragen, und die Bedeutung der Inflammationsreaktion ist als wesentlicher prognostischer Faktor mehr und mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Obwohl die Atherosklerose ein in der Intima der Blutgefäße gelegenes, fokales Geschehen darstellt, konnten Serummarker der systemischen Entzündungsreaktion mit Auftreten und Prognose der koronaren Herzerkrankung in Verbindung gebracht werden. Schon seit über 20 Jahren ist eine Erhöhung von Markern der Akuten Phase-Reaktion wie Fibrinogen bekannt (22), das C-reaktive Protein (CRP) ist jedoch erst in den letzten Jahren zunehmend in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Eine Erhöhung des CRP konnte im Rahmen des akuten Myokardinfarktes (23) bzw. der instabilen Angina pectoris (24) demonstriert werden. Andere, am Anfang der Inflammationskaskade stehende Zytokine - wie TNF- α oder IL-6 -

scheinen pathogenetisch eine wesentlichere Rolle zu spielen und nicht nur Marker der Inflammation wie CRP oder Fibrinogen zu sein (25-28).

Die Ursache erhöhter Serumkonzentrationen zirkulierender Zytokine wird kontrovers diskutiert. Sie könnten einerseits durch die atheromatösen Veränderungen selbst entstehen und somit deren Quantität (atheromatöse Last) oder auch Qualität (inflammatorische Aktivität innerhalb der Plaques) anzeigen. Andererseits ist auch eine nichtvaskuläre Herkunft der Zytokine vorstellbar. Die Zytokinerhöhung kann hierbei einen pro-inflammatorischen Zustand, welcher direkt in den atherosklerotischen Prozess involviert ist (z.B. chronische Infektion), widerspiegeln. Unabhängig von anderen Faktoren erzeugt die vaskuläre oder nichtvaskuläre Entzündungsreaktion eine lokale bzw. systemische Zytokinantwort pro-inflammatorischer Moleküle wie IL-1 β , TNF- α oder IL-6, welche ihrerseits zu einer gesteigerten hepatischen Produktion der Akutphase-Proteine CRP oder Fibrinogen führen kann (29).

Zusammenfassend ist die Entzündungsreaktion im Krankheitsbild der Atherosklerose ein entscheidender pathophysiologischer Mechanismus, der sowohl für die Initiierung des Krankheitsprozesses als auch für dessen Progression maßgeblich ist.

1.2 Lipoproteinmetabolismus

1.2.1 Struktur und Aufbau der Lipoproteine

Die beim Menschen nachweisbaren Lipide sind eine heterogene Gruppe hydrophober Moleküle. Man unterscheidet die freien Fettsäuren (FFS), die vor allem an Albumin gekoppelt transportiert werden, von den restlichen Serumlipiden, die als Lipoproteinkomplexe zirkulieren. Lipoproteine sind komplexe Makromoleküle, die aus einem Kern aus hydrophoben Lipiden (Triglyzeride, Cholesterin-Ester) und einer einschichtigen Hülle aus amphophilen Lipiden (Phospholipide, freies Cholesterin) bestehen. In der Hülle sind verschiedene Apolipoproteine verankert, die für die hydrophilen Eigenschaften und für die Stoffwechselregulation (Bindung an Rezeptoren, Enzyme etc.) der Lipoproteine essentiell sind (30, 31, 32).

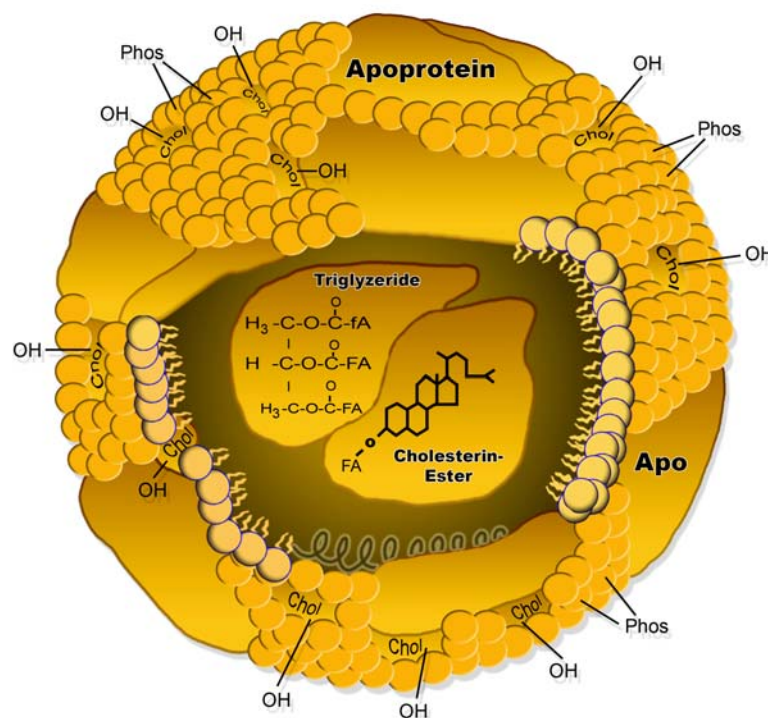


Abbildung 1.2.1

Schematische Darstellung des Aufbaus von Lipoproteinen (30, 31).

Um den hydrophoben Lipidkern mit Triglyzeriden und Cholesterylestern sind amphophile Moleküle wie Phospholipide oder Apolipoproteine angeordnet, deren lipophile Anteile nach innen und hydrophile Anteile nach außen gerichtet sind. Diese Molekülgruppierung bedingt die Wasserlöslichkeit und somit Transportfähigkeit der Lipoprotein-Makromoleküle im peripheren Blut. Chol: Cholesterin; Phos: Phospholipide; Apo(protein): Apolipoproteine.

Lipoproteine werden aufgrund ihrer Dichte und ihrer Eigenschaft, im elektrischen Feld zu wandern, in 5 Hauptklassen unterteilt, welche sich wesentlich in ihrer Molekülgröße, sowie ihrer Apolipoprotein- und Lipidzusammensetzung unterscheiden: High density lipoprotein (HDL), Low density lipoprotein (LDL), Intermediate density lipoprotein (IDL), Very low density lipoprotein (VLDL) und Chylomikronen. Tabelle 1 beschreibt die Hauptklassen und ihre wesentlichen Eigenschaften (30, 31, 32).

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte, g/l	<0.95	<1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.21
Größe, ø in nm	100-1000	30-70	27	22	8
Elektrophorese	keine Wanderung	prä-β	β	β	α
Apolipoproteine	B-48, C, E, A-I, A-II, A-IV	B-100, C, E	B-100, (C und E)	B-100	A-I, A-II C, D, E
Protein, %	1-2	10	20	25	50
Cholesterin, %	3-4	15	35	50	20
Phospholipide, %	5	18	20	20	25
Triglyzeride, %	90	57	25	5	5
Halbwertszeit	<1 Stunde	2-4 Stunden	2-4 Stunden	3 Tage	Tage
Syntheseort	Darm	Darm, Leber	Blut	Leber	Darm, Leber
Hauptfunktion	Transport der exogenen Triglyzeride und des exogenen Cholesterins.	Transport der endogenen Triglyzeride von der Leber zu den extrahepatischen Geweben.	Auch als VLDL-Remnants bezeichnet, können in LDL metabolisiert oder von der Leber aufgenommen werden.	Transport des Cholesterins zu den extrahepatischen Geweben.	Reverser Transport des Cholesterins von extrahepatischen Geweben zur Leber.

Tabelle 1.2.1

Lipoproteinhauptklassen und ihre wesentlichen Eigenschaften (30, 31, 32)

1.2.2 Komponenten der Lipoproteine

1.2.2.1 Cholesterin

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil von Zellmembranen und Myelinscheiden. Es ist Ausgangspunkt der Synthese von Steroidhormonen (Gonaden, Nebennierenrinde) und Gallensäuren (Leber) und wird mit der Nahrung aufgenommen. Cholesterin wird in einer Tagesmenge von ca.1,2 g hauptsächlich in

der Leber (70%) und im Dünndarm (30%) gebildet und im peripheren Blut vor allem in LDL-Partikeln transportiert (30, 31, 32).

1.2.2.2 Triglyzeride

Triglyzeride werden auch als Neutralfette bezeichnet. Sie stellen den wichtigsten Energiespeicher dar. Ihre Metabolisierung erfolgt durch die Triglyzerid-Lipase (hormonsensitive Lipase), welche Triglyzeride in freie Fettsäuren aufspaltet. Exogen zugeführte (Nahrungs-)Triglyzeride werden durch die Pankreaslipase in β -Monoglyzeride und freie Fettsäuren (FFS) aufgespaltet und resorbiert; in der Dünndarmepithelzelle werden dann erneut Triglyzeride synthetisiert, welche durch Chylomikronen via Ductus thoracicus in die Blutbahn weitertransportiert werden. Endogene Triglyzeride (aus Leber und Fettgewebe) werden in VLDL- und IDL-Partikeln transportiert (30, 31, 32).

1.2.2.3 Freie Fettsäuren (FFS)

FFS sind rasch verfügbare Energielieferanten, die insbesondere für den Metabolismus der Muskulatur essentiell sind. Ihr Transport erfolgt - an Albumin gebunden - über die Blutbahn (30, 31).

1.2.2.4 Phospholipide

Die Phospholipide sind eine heterogene Gruppe von Lipiden, welche als Bausteine der Zellmembranen fungieren, aber auch in Signalkaskaden involviert sind. Einer ihrer wichtigsten Vertreter ist das Sphingomyelin (30, 31, 32).

1.2.3 Enzyme des Lipidstoffwechsels

Der Lipidstoffwechsel kann in 3 Komponenten gegliedert werden, welche in engem Zusammenhang stehen: Den exogenen Transportweg der intestinal resorbierten Lipide via Chylomikronen, den endogenen Transportweg der hepatischen Lipide via VLDL und LDL (IDL) und schließlich den so genannten reversen Cholesterintransport von nicht-hepatischen Geweben zur Leber via HDL (30,31, 32).

Teilaspekte des komplexen Zusammenspiels der beteiligten Enzyme sind schematisch in den Abbildungen 1.2.2 und 1.2.3 aufgeführt.

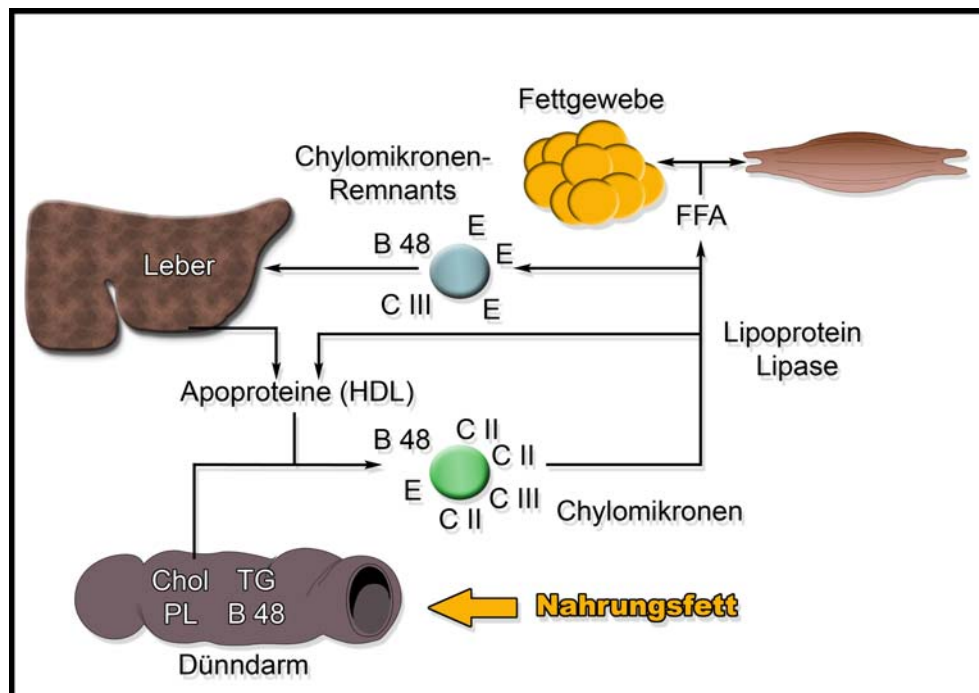


Abbildung 1.2.2
Der exogene Lipoproteinmetabolismus (30,31,32,33).

Lipide werden über den Dünndarm aufgenommen und in Form von Chylomikronen über den Ductus thoracicus in den venösen Blutstrom gebracht, um für die Metabolisierung in allen Geweben sowie der Leber zur Verfügung zu stehen.

Chol: Cholesterin; TG: Triglyzeride; PL: Phospholipide; Apoproteine: Apolipoproteine; B48: Apolipoprotein B48; E: Apolipoprotein E, CII: Apolipoprotein CII, CIII: Apolipoprotein CIII; FFA: Freie Fettsäuren („Free fatty acids“).

1.2.3.1 Pankreas-Lipase

Die Pankreas-Lipase spaltet Nahrungstriglyzeride zu β -Monoglyzeriden und FFS, die als Mizellen mit Cholesterin und Gallensäuren von den Dünndarmepithelzellen metabolisiert werden. Die Aktivierung der Pankreas-Lipase erfolgt über Gallensäuren im Duodenum (30, 31, 32).

1.2.3.2 Lipoproteinlipase

Die Lipoproteinlipase (LPL) spaltet FFS aus Triglyzeriden von Chylomikronen und VLDL-Partikeln ab. LPL ist an das Kapillarendothel von Herz- und Skelettmuskulatur gebunden, weiterhin kann man sie im Fettgewebe nachweisen. Insulin aktiviert dieses Enzym, welches als weitere Co-Faktoren Heparin (clearing-factor) und das Apolipoprotein C-II benötigt (30, 31, 32).

1.2.3.3 Hepatische Lipase

Die Hepatische Lipase (HL) findet man an den Zelloberflächen der Leber. HL spaltet verbleibende Triglyzeride der IDL, welche nach Abspaltung der Triglyzeride die Charakteristika der LDL erfüllen. Weiterhin ist die HL in den HDL-Stoffwechsel involviert (30, 31, 32).

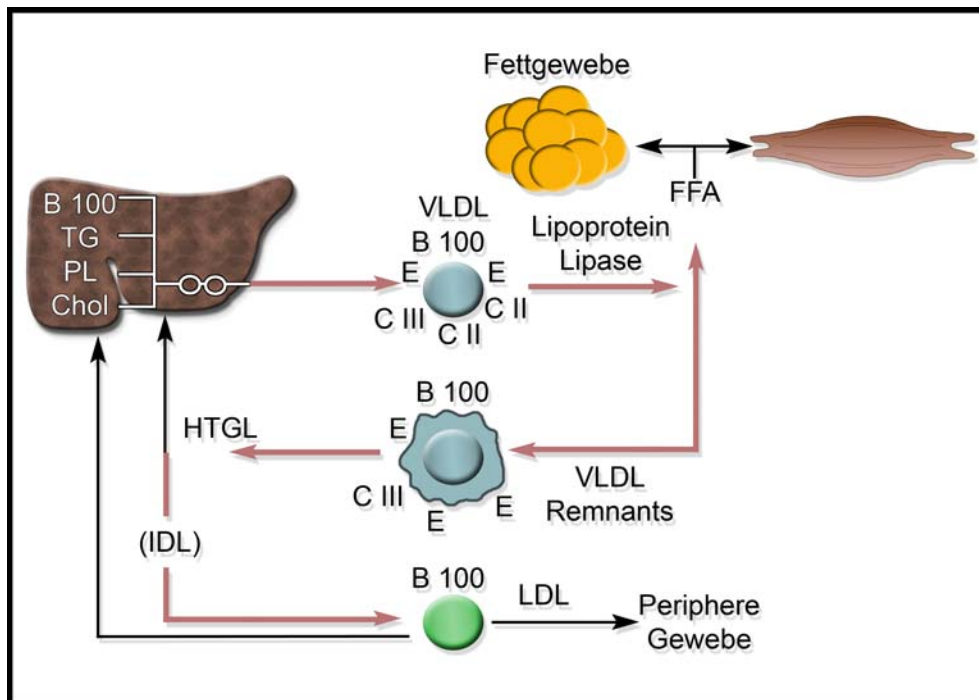


Abbildung 1.2.2
Der endogene Lipoproteinmetabolismus (30, 31, 32, 33).

Cholesterin, Triglyzeride, Phospholipide und andere Lipide werden in der Leber synthetisiert und in Form des VLDL zu den peripheren Geweben transportiert. Hierbei fungieren die Apolipoproteine (B100, CII, CIII, E) unter anderem als Rezeptoren.

Chol: Cholesterin; PL: Phospholipide; Apolipoproteine: Apolipoproteine; B100: Apolipoprotein B100; E: Apolipoprotein E, CII: Apolipoprotein CII, CIII: Apolipoprotein CIII; FFA: Freie Fettsäuren („Free fatty acids“).

1.2.3.4 Acyl-Cholesteryl-Acyl-Transferase

Die Acyl-Cholesteryl-Acyl-Transferase ist intrazellulär gelegen und verestert freies, überschüssiges (intrazelluläres) Cholesterin, das als Cholesterylester die Speicherform des Cholesterins darstellt (30, 31, 32).

1.2.3.5 Lecithin-Cholesteryl-Acyl-Transferase (LCAT)

Die LCAT verestert freies, überschüssiges (Plasma-) Cholesterin, das von HDL-Partikeln aufgenommen werden kann (30, 31, 32).

1.2.3.6 β -Hydroxi- β -Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase

Die β -Hydroxi- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) ist das Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinsynthese. Durch die effiziente Therapie atherosklerotischer Erkrankungen mit spezifischen Inhibitoren dieses Enzyms, den so genannten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren oder Statinen, ist der Stoffwechselweg der HMG-CoA-Reduktase in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

Die Wirkweise auf die Cholesterinbiosynthese ist in Abbildung 1.2.3 aufgeführt (30, 31, 32, 33).

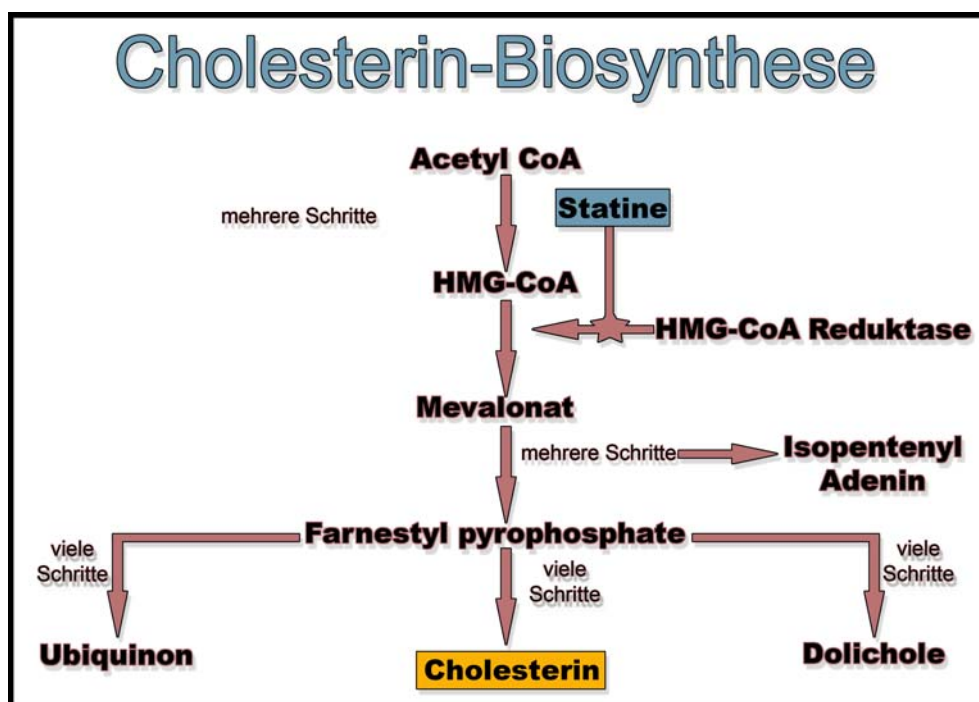


Abbildung 1.2.3

Die Cholesterinbiosynthese und Wirkweise der Statine (31, 32, 33).

Statine hemmen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese, indem sie die durch die HMG-CoA-Reduktase katalysierte Metabolisierung von HMG-CoA zu Mevalonat hemmen.

1.2.3.7 Cholesterylester-Transferprotein (CETP)

Das im Plasma nachweisbare CETP überträgt Cholesterinester von HDL auf VLDL und Chylomikronen im Austausch mit Triglyzeriden. Seine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose ist in den letzten Jahren ausführlich untersucht worden und hat zur Entwicklung spezifischer CETP-Inhibitoren geführt (z.B. Torcetrapid). CETP-Inhibitoren steigern das HDL-Cholesterin (HDL-C). Dieser Effekt wird aktuell

hinsichtlich seines therapeutischen Nutzens im Rahmen klinischer Studien bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen geprüft (30, 31, 32, 34).

1.2.3.8 Phospholipid-Transferprotein (PLTP)

Siehe 1.3

1.2.4 Pathogenetischer Zusammenhang von Lipoproteinmetabolismus und Atherosklerose

Die Rolle der Lipoproteine im Krankheitsbild der Atherosklerose ist vielfältig und in einer unüberschaubaren Anzahl von Publikationen dargestellt worden. In allen Stadien der Krankheitsentwicklung spielen Lipoproteine eine entscheidende Rolle. LDL ist das pro-atherosklerotische Lipoprotein, das in den letzten Jahren in epidemiologischen Studien im Mittelpunkt des Interesses stand, und HDL ist ein wichtiger anti-atherosklerotischer Faktor, dem immer mehr Bedeutung zukommt. Der Zusammenhang zwischen dem prospektiven Wert der Lipoproteine und der Inflamationsreaktion konnte in einer eigenen Arbeit bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung gezeigt werden (35). Die Zusammenfassung aller Aspekte des Lipoproteinmetabolismus im Krankheitsbild der Atherosklerose überschreitet jedoch den Rahmen dieser Habilitation. Im Folgenden sollen die wesentlichen, mit PLTP assoziierten Aspekte vorgestellt, untersucht und diskutiert werden.

1.3 Phospholipid-Transferprotein

Humanes Phospholipid-Transferprotein (PLTP) ist ein Glykoprotein mit einem berechneten Protein-Molekulargewicht von 54,7 kDa. PLTP gehört zu einer Genfamilie lipidtransportierender Proteine, zu denen als andere wichtige Vertreter das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) und CETP gehören (36). PLTP ist eines der Enzyme, welches neben dem CETP und der LCAT wesentlich die Zusammensetzung der HDL-Partikel nicht nur unter physiologischen Bedingungen, sondern auch im Rahmen einer Entzündungsreaktion bestimmt (37). PLTP hat multifaktorielle Aufgaben im Lipoproteinmetabolismus (Abb. 1.3.1.).

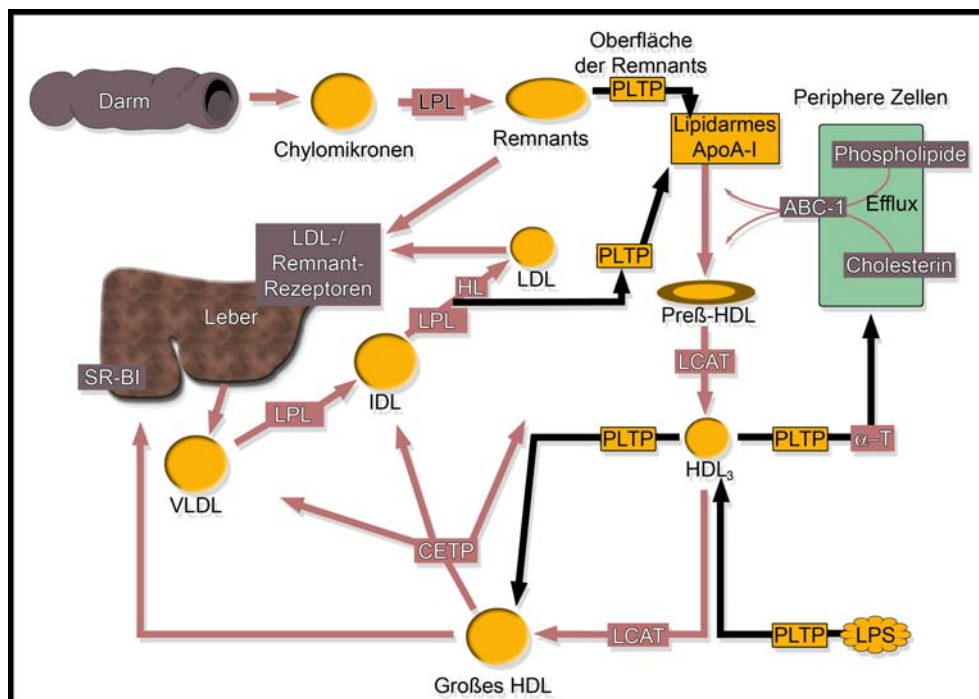


Abbildung 1.3.1
Wirkweise des Phospholipid-Transferproteins

PLTP vermittelt den Transfer von Phospholipiden, α-Tocopherol und freiem Cholesterin von triglyzeridreichen Lipoproteinen zu HDL über den Prozess der Lipolyse, moduliert die HDL-Partikel-Größe und -Zusammensetzung und ist in den HDL-vermittelten, zellulären Efflux von Phospholipiden und Cholesterin involviert. PLTP hat die Eigenschaft, LPS auf Lipoproteine zu übertragen und hiermit die schädigende Funktion des LPS zu neutralisieren. VLDL: Very low density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; IDL: Intermediate density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; PLTP: Phospholipid-Transferprotein; CETP: Cholesterylester Transferprotein; LCAT: Lecithin-cholesterol-acyltransferase; HL: Hepatische Lipase; LPL: Lipoprotein Lipase; SR-BI: Klasse B, Typ 1 Scavenger Rezeptor; ABC-1: ATB-binding cassette Transporter-1; LPS: Lipopolysaccharid; α-T: α-Tocopherol.

Der bekannteste, durch PLTP vermittelte Mechanismus ist der Transfer von Phospholipiden zwischen Lipoproteinen, welcher dem Enzym seinen Namen gab (38). In Experimenten mit PLTP-transgenen Mäusen führte die Überexpression von humanem PLTP zu einem Anstieg von Phospholipiden und Cholesterin in HDL-Partikeln und somit zu einem Anstieg der so genannten prä- β -Partikel (39-41). Weiterhin katalysiert PLTP den Transfer und Austausch von α -Tocopherol zwischen Lipoproteinen und insbesondere zwischen HDL und zellulären Systemen (42-43). Dieser Mechanismus scheint für eine verminderte Oxidation von Lipoproteinen bei gentechnisch modifizierten Mäusen, denen das PLTP-Gen fehlt (PLTP0), gegenüber Wildtypmäusen verantwortlich zu sein (44, 45). Ein weiterer, durch PLTP vermittelter, potentiell auf die Inflammation Einfluss nehmender Effekt ist der Transfer von zirkulierendem Lipopolysaccharid zu HDL (46).

1.3.1 PLTP im Krankheitsbild der Atherosklerose

Experimente mit PLTP-Knockout (PLTP0) Mäusen konnten erstmalig zeigen, dass PLTP pro-atherogene Eigenschaften hat. Zwei potentiell involvierte Mechanismen werden in diesen Modellen diskutiert, zum einen die vermehrte Bildung von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) und zum anderen pro-oxidative Eigenschaften (47-49).

Humane Studien konnten bis dato die experimentell nachgewiesene Pro-Atherogenität des PLTP nur partiell bestätigen. Bei Patienten mit Typ-II-Diabetes war die Plasma-PLTP-Aktivität gegenüber Kontrollpersonen erhöht (50-51). Weiterhin konnte auch bei Patienten mit Insulinresistenz eine Assoziation mit erhöhter Plasma-PLTP-Aktivität gezeigt werden (52). Bezüglich der Korrelation des PLTP mit dem HDL-Cholesterin (HDL-C), welches von der überwiegenden Zahl der Experten als anti-atherogener Faktor anerkannt ist (53), existieren widersprüchliche Ergebnisse: In einer Studie war PLTP mit HDL-C positiv korreliert (51), und in einer anderen Studie war PLTP mit HDL-Partikeln korreliert, welche ApoA-I, aber nicht mit HDL-Partikeln, welche ApoA-II beinhalten (54). Beide Studien würden - unter der Annahme einer anti-atherogenen Funktion des HDL-C - der Pro-Atherogenität des PLTP widersprechen. In einer anderen Untersuchung wurden jedoch gegenteilige Daten publiziert (55).

Eine weitere Eigenschaft des PLTP, die Einfluss auf atherosklerotische Vorgänge nehmen könnte und in Mausmodellen beschrieben worden ist, ist seine anti-oxidative und damit potentiell anti-inflammatorische Wirkung (47-49).

Letztendlich ist die Rolle des PLTP in der Pathogenese atherosklerotischer Erkrankungen ungeklärt.

2. Zielstellungen

Die im Rahmen dieser Habilitationsarbeit vorgestellten Untersuchungen beschäftigen sich mit der Physiologie, Pathophysiologie und der klinischen Relevanz des Phospholipid-Transferproteins im Krankheitsbild der Atherosklerose.

Als atherogener Faktor wird der Effekt von PLTP auf die Bildung postprandialer triglyzeridreicher Lipoproteine diskutiert; dieser Fragestellung wird unter anderem in einer Probandenstudie nachgegangen.

Anhand von gentransformierten Mausmodellen wird untersucht, welche Rolle pro-inflammatorische Eigenschaften des PLTP bei seiner potentiell pro-atherogenen Wirkung besitzen könnten.

Weiterhin wird in zwei klinischen Studien der Stellenwert einer erhöhten PLTP-Aktivität als kardial-atherogener, prognostisch relevanter Risikofaktor diskutiert: bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und bei einer Patientengruppe - Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz - bei denen ein beträchtlich gesteigertes Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Komplikationen bekannt ist.

3. Studienpopulationen, Material und Methodik

3.1 Patienten und Methodik zum Themenkomplex "Die Rolle des PLTP bei Patienten mit koronarer Atherosklerose: Querschnittsvergleich zu gesunden Probanden und prognostische Relevanz bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Atherosklerose."

3.1.1 Studienpopulation

Von November 1996 bis Juli 2000 rekrutierten wir 830 Patienten mit stabiler Angina pectoris, 222 Patienten mit instabiler Angina pectoris und 50 Patienten mit akutem oder subakutem Myokardinfarkt, die zur diagnostischen Koronarangiographie in die II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz oder in das Bundeswehrzentral Krankenhaus Koblenz eingewiesen worden waren. Patienten mit einer Koronarstenose >30% in einer der großen Koronararterien wurden in die Studie eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden Patienten mit anderen schwerwiegenden Erkrankungen wie Herzklappenerkrankungen, bekannter dilatativer Kardiomyopathie, Malignomen, Sepsis, autoimmunen Erkrankungen, u. a. Die Patienten wurden zu klassischen Risikofaktoren befragt, insbesondere zur Nikotinanamnese, zum Vorliegen eines Diabetes mellitus, einer arteriellen Hypertonie oder einer Hyperlipoproteinämie. Weiterhin wurden die Medikation bei Aufnahme und eine positive Familienanamnese für das Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung (direkte Anverwandte mit einer koronaren Manifestation vor dem 65. Lebensjahr) erfragt. Ein Diabetes mellitus wurde bei denjenigen Patienten diagnostiziert, welche diätetisch, mit oralen Antidiabetika oder mit Insulin behandelt wurden oder einen Nüchternblutzucker >125mg/dl in wiederholten Kontrollen während des stationären Aufenthaltes hatten.

Ein arterieller Hypertonus wurde angenommen, wenn die Patienten Antihypertensiva einnahmen oder in wiederholten Kontrollen unter standardisierten Bedingungen einen Blutdruck >160/90mmHg hatten.

Die Diagnose einer Hyperlipoproteinämie wurde gestellt bei Patienten, die Lipidsenker einnahmen oder ein Gesamtcholesterin >240mg/dl aufwiesen.

444 gesunde Kontrollpersonen wurden sowohl durch Hausärzte rekrutiert, bei denen sich die Probanden im Rahmen eines Routine-Check-Ups vorstellten als auch durch Zeitungsannoncen, bei denen das Studiendesign vorgestellt und Probanden über 40

Lebensjahren die freiwillige Teilnahme an der AtheroGene-Studie vorgeschlagen worden war. Bei den Kontrollpersonen ergaben sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer atherosklerotischen Erkrankung; ein pathologisches Ruhe-EKG galt als Ausschlusskriterium.

Insgesamt 1091 Patienten (99.1%) wurden für einen mittleren Zeitraum von 5,1 Jahren (0,1-7,6 Jahre) nachbeobachtet. Der Großteil der Patienten stellte sich zu einem Follow-up erneut vor, bei einer kleinen Anzahl wurde das Follow-up telefonisch durchgeführt. Bei 156 der 1091 Patienten trat dokumentiert einer der kombinierten Endpunkte aus nichttödlichem Myokardinfarkt oder kardiovaskulärem Tod auf, welcher entweder vom behandelnden Hausarzt oder der zuletzt behandelnden Klinik beschrieben worden war.

Alle Studienpatienten waren Einwohner des Rhein-Main-Gebietes und kaukasischer Abstammung. Die Studie war von der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz geprüft und bewilligt worden. Jeder Proband wurde vor Beginn der Untersuchungen mündlich und schriftlich aufgeklärt und hatte sein schriftliches Einverständnis gegeben.

3.1.2 Labormethoden

Alle Blutentnahmen zur Bestimmung des PLTP und der Serumlipide wurden unter standardisierten Bedingungen vor der Koronarangiographie unter Einhaltung einer Nüchternzeit durchgeführt. Nach der Blutentnahme wurden die Proben auf Eis gelagert und schnellstmöglich mit 4000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Aliquots verteilt und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

Die PLTP-Aktivität wurde mit einem kommerziell verfügbaren Kit bestimmt (Cardiovascular Target, Inc, NY, USA), die Analyse erfolgte für den Untersucher verblindet bzgl. Patienten und Kontrollen. Der Kit besteht im Wesentlichen aus Donor- und Akzeptor-Partikeln. Die Zugabe von 3µl Plasma resultiert in einem PLTP-vermittelten Transfer von fluoreszierenden Phospholipiden. Dieser Transfer wird als Anstieg der Fluoreszenz-Intensität gemessen. Der Interassay-Koeffizient der PLTP-Aktivitäts-Variation beträgt $3,3 \pm 0,5\%$. Die Testergebnisse wurden durch dreimaliges Einfrieren und erneutes Auftauen nicht beeinflusst. Zur Validierung des Tests wurde er mit einer anderen, klassischen Methode der PLTP-Aktivitätsbestimmung verglichen (38). Die Methoden zeigten einen Korrelationskoeffizienten von $r=0,9$ ($n=30$, $p=0,01$).

Serum-Lipide wurden direkt ohne vorheriges Einfrieren mit Standardmethoden bestimmt (Gesamtcholesterin, Roche Diagnostics; HDL-C, Rolf Greiner Biochemical; LDL-Cholesterin (LDL-C) und mit der Friedewald-Formel errechnet; Triglyzeride (Roche Diagnostics). ApoA-I und ApoB wurden mit immunoturbodimetrischen Assays bestimmt (Tina-quant, Roche Diagnostics). Die Lipoprotein(a) (Lp(a) Konzentration wurde mit einer ELISA-basierten Methode (Immuno Ltd, Dunton Green) gemessen. Zur Detektion des Homozystein verwendeten wir eine HPLC (High Performance Liquid Chromatography)-Methode.

3.1.3 Statistische Analyse

Die Plasma-PLTP-Aktivität war normal verteilt, alle Resultate wurden als Mittelwerte präsentiert.

Demographische und klinische Variablen wurde mit dem χ^2 -Test bei kategorialen und mit dem ANOVA-Test bei kontinuierlichen Variablen verglichen.

Die schief verteilte Variable "Triglyzeride" wurde als Median-Wert präsentiert und der Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Gruppen durchgeführt.

Pearsons Korrelationskoeffizienten wurden für PLTP und andere Lipidparameter berechnet. Weiterhin wurde die Assoziation der PLTP-Aktivität (kontinuierliche Variable) mit der kategorialen Variable "koronare Herzerkrankung" nach Geschlecht stratifiziert und mittels ANOVA sowie logistischer Regression nach Adjustierung für die klassischen Risikofaktoren und die Lipidvariablen getestet.

Nach Kategorisierung des PLTP in Quintile führten wir 4 logistische Regressionsmodelle durch, im ersten Modell adjustiert für Alter und Geschlecht, und in den weiteren Modellen zusätzlich adjustiert für die weiteren konventionellen Risikofaktoren (BMI, Nikotin [aktive Raucher], Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie), sowie für Lipidparameter, Homozystein und Hs-CRP. Auf Grund der multiplen Kolinearität der Variablen wurde LDL als Repräsentant der Lipidvariablen-Gruppe (Gesamtcholesterin, Triglyzeride, LDL-C und ApoB) verwendet. Der Wald- χ^2 -Test wurde durchgeführt, um die Differenzen über alle Quintile zu schätzen; hierbei wurde die Assoziation mittels des Mittelwertes der Odds Ratio quantifiziert.

Die Überlebensanalyse wurde mittels der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-rank-Test durchgeführt. In dieser Analyse wurde ein kombinierter Endpunkt aus nichttödlichem Myokardinfarkt und kardiovaskulärem Tod verwendet. Patienten, die

aus einer anderen als kardiovaskulärer Ursache verstarben, wurden zum Zeitpunkt des Todes zensiert.

$P < 0.05$ wurde als signifikant bezeichnet, alle Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS (V10.01, V11.5) durchgeführt.

3.2 Probanden und Methodik zum Themenkomplex "PLTP bei gesunden Probanden nach einer fettreichen Mahlzeit".

3.2.1 Studienpopulation

31 gesunde, junge Probanden ohne klinische oder anamnestische Hinweise auf das Vorliegen einer atherosklerotischen Erkrankung wurden in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten waren deutsche Staatsbürger und Einwohner des Rhein-Main-Gebietes. Die Studie wurde durch die Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz bewilligt, die Teilnahme war freiwillig, und jeder Proband gab sein schriftliches Einverständnis.

3.2.2 Labormethoden

Die Blutentnahmen wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die erste Blutentnahme erfolgte nach einer mindestens 10-stündigen, nächtlichen Nahrungskarenz. Nach dieser ersten Blutentnahme mussten die Probanden zügig (ca. 15 Minuten) eine definierte, fettreiche Mahlzeit zu sich nehmen. Diese Mahlzeit wurde an die Körperoberfläche (KÖF) des Probanden adaptiert und bestand aus 1.265 kcal/m² KÖF (105g Fett, hiervon 52g gesättigtes Fett und 300mg Cholesterin, 48g Kohlenhydrate und 32g Protein). Während der folgenden Studienperiode wurden die Probanden instruiert, keine Kalorien in flüssiger oder fester Form zu sich zu nehmen. Das Trinken kalorienfreier Flüssigkeiten war den Probanden erlaubt. Weitere Blutentnahmen wurden nach 3,5,7 und 10 Stunden durchgeführt. Bei einer weiblichen Probandin konnten die Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 5, 7 und 10 Stunden nicht durchgeführt werden, da die Probandin weitere Blutentnahmen ablehnte.

Alle Blutproben wurden direkt auf Eis gelagert, mit 4.000 rpm über 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in Aliquots verteilt. Alle Aliquots für die Bestimmung von PLTP und anderer Lipidparameter wurden bei -80°C bis zur Analyse gelagert. Die Durchführung der Bestimmung von Gesamtcholesterin, HDL-C, LDL-C, ApoA-I, ApoB und Triglyzeriden erfolgte unverzüglich mit Standardmethoden (siehe 3.1.2). Zur Bestimmung der PLTP-Aktivität siehe 3.1.2.

3.2.3 Statistische Analysen

Zum Vergleich von Triglyzeriden und PLTP wurden Pearson's Korrelationskoeffizienten berechnet. $P < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet. Alle Analysen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, V11.5 durchgeführt.

3.3 Untersuchungen zur proinflammatorischen Wirkung von PLTP in Mausmodellen

Eine der Hypothesen, mit denen die atherogene Wirkung des PLTP erklärt werden könnte, ist dessen potentiell proinflammatorische Wirkung. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden in zwei experimentellen Ansätzen die Wirkung inflammatorischer Reize auf PLTP0(/LDLr0)-Mäuse und deren Kontrollen untersucht. Die Experimente wurden im Rahmen eines Stipendiums durch die Deutsche Herzstiftung im Department of Anatomy and Cell Biology des Downstate Medical Center Brooklyn der State University of New York durch den Habilitanden durchgeführt.

3.3.1 Mausmodell, PCR-Protokolle und Blutentnahmen

Drei männliche und drei weibliche, in den C57BL/6-Stamm rückgekreuzte PLTP0-Mäuse wurden von der Columbia-Universität (Labor A.R. Tall, New York, USA) zur Verfügung gestellt. Für die Durchführung unserer Experimente wurden die Nachfahren dieser Tiere verwendet. Als Kontrollgruppe fungierten C57BL/6 Mäuse (Jacksons Laboratories, USA). Alle Tiere dieser Gruppe wurden mittels einer Standarddiät (Chow-Diät) ernährt.

Jeweils zwölf, 16 Wochen alte Wildtyp (WT)- oder PLTP0-Mäuse waren auf vier Gruppen von jeweils sechs Tieren verteilt und entweder mit intraperitonealen Injektionen von 5.000 internationalen Einheiten (IE) Interleukin-6 (recombinant mouse IL-6, R&D Systems, Inc., USA) oder sterilisierter, isotonischer Kochsalzlösung für einen Zeitraum von 6 Wochen an jedem fünften Tag behandelt worden.

Die Tierhaltung erfolgte im Tierhaltungsbereich des Downstate Medical Center Brooklyn der State University New York, USA, durch qualifizierte Tierpfleger unter Aufsicht von Veterinärmedizinerinnen. Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in Gruppen von maximal 5 Tieren gehalten, wobei männliche und weibliche (Ausnahme bei Kreuzung), sowie PLTP0-, LDLr0-, PLTP0/LDLr0 und WT-Mäuse getrennt worden waren. Die Haltung der Tiere sowie alle Untersuchungen entsprachen dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* der US National Institutes of Health.

Mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und spezifischer Primer wurde das komplette Fehlen des PLTP-Gens dokumentiert. Zur DNA-Extraktion wurden Gewebe aus dem Mausschwanz gewonnen und in 0,5ml einer so genannten

Arbeitslösung in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß eingefüllt. Die Arbeitslösung beinhaltete 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 0,5 % SDS und 0,1mg/ml Proteinase K. Dieser Ansatz wurde in einem Inkubator unter kontinuierlicher Rotation bei 58°C bis zur kompletten Auflösung des Gewebes geschwenkt (in der Regel Inkubation über Nacht). Hiernach wurde das Eppendorf-Gefäß bei 14.000rpm über 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Eppendorf-Gefäß gefüllt. Es erfolgte die Zugabe von 500µl Phenol. Nach gründlichem Durchmischen wurde das Gefäß mit 14.000rpm über 10 Minuten zentrifugiert und erneut der Überstand in ein weiteres Eppendorf-Gefäß gefüllt. Dieser Vorgang wurde nach Zugabe von 500µl Chloroform wiederholt und zu der nun gewonnenen DNA 1ml 100%-iger Ethanol hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt, nach ca. 15 Minuten das Pellet in 60µl Puffer (mit 3M EDTA) gelöst und über 2 Stunden bei 58°C inkubiert. Die so gewonnene DNA-Lösung wurde nun für die PCR verwendet.

Der PCR-Ansatz für den Nachweis des PLTP-Gens bestand aus 5µl 10x PCR-Puffer, 2µl 50mM MgCl₂, 1µl 25mM dNTP, jeweils 2µl spezifischer PLTP-Primer, 30,5µl doppelt destilliertem H₂O sowie 0,5µl Taq-Polymerase. Dieser Ansatz wurde mit 4µl der gewonnen DNA-Lösung gemischt. Das PCR-Protokoll beinhaltete 1 Zyklus initiale Denaturierung mit 94°C über 3 Minuten, 30 Zyklen mit jeweils einer Minute DNA-Denaturierung (94°C), einer Minute Annealing (56°C) und 3 Minuten Primer-Extension (72°C). Abschließend wurde ein Zyklus über 5 Minuten mit 72°C durchgeführt und die gewonnene DNA bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

Nach Herstellung eines 0,8%-igen Agarose-Gels wurden 2µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Dieses Gel wurde in einen Elektrophorese-Behälter gefüllt und nach Abkühlen und Einfügen von 12µl einer DNA-Leiter-Lösung (100-1000kbp), der Proben (jeweils 15µl PCR-Produkt) und einer Negativkontrolle in die jeweiligen Vertiefungen eine Elektrophorese mit 100 V für ca. 45 Minuten durchgeführt. Abschließend wurde das Resultat (Bande bei ca. 800kbp bei Vorhandensein des PLTP-Gens) unter ultraviolettem Licht kontrolliert und dokumentiert.

Blut wurde bei allen Tieren aus der Schwanzvene nach einer nächtlichen Nahrungskarenz in heparinisierte Kapillarröhrchen (Fisherbrand, USA) entnommen. Für die zytometrischen Analysen war Vollblut, für die Bestimmung der Lipoproteine und der Zytokine Serum verwendet worden, welches nach Zentrifugation mit 4.000 rpm über 10 Minuten vom Pellet abgesert worden war. Alle Bestimmungen wurden

vor Beginn der Behandlungen mit IL-6 oder Kochsalz sowie nach 4 und 6 Wochen durchgeführt.

In einem weiteren Experiment kreuzten wir LDL-Rezeptor-Gen-knock-out-Mäuse (LDLr0, Jacksons Laboratories, USA) mit PLTP0-Mäusen bis zum Erhalt von Doppel-knock-out-Mäusen (PLTP0/LDLr0). Das Vorhandensein des PLTP-Gens wurde mittels der oben beschriebenen PCR, das des LDL-Rezeptor-Gens ebenfalls mittels PCR nachgewiesen.

Der PCR-Ansatz für den Nachweis des LDL-Receptor-Gens bestand aus 5µl PCR-Puffer, 50mM MgCl₂, 1µl 25mM dNTP, jeweils 2µl spezifischem Primer, sowie 30,5µl doppelt destilliertem H₂O und 0,5µl Taq-Polymerase. Nach einer initialen Denaturierung mit 94°C über 2:30 Minuten erfolgten 30 Zyklen mit 94°C über 1 Minute und 68°C über 5 Minuten. Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

Für die Elektrophorese wurde ein 1%-iges Agarose-Gel verwendet und jeweils 10µl PCR-Produkt mit 2µl loading buffer in die Vertiefungen des Gels eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte mit 100V über ca. 45 Minuten, die entstandenen Banden (ca. 300kbp) wurden unter ultraviolettem Licht analysiert.

Fünf PLTP0/LDLr0-Mäuse wurden mit fünf (PLTP WT)/LDLr0-Mäusen verglichen. Die Tiere erhielten ein cholesterinreiches Futter (Western-diet, 0,15% Cholesterin, Harlan Teklad, USA). Nach 8 Wochen wurde den Tieren 1ml einer 4%-igen Brewers Thioglykolat Lösung (Becton Dickinson, USA) zur Auslösung einer Peritonitis intraperitoneal appliziert. Nach 4 Tagen unter Fortsetzung der Fütterung der cholesterinreichen Diät war die akute Phase der Peritonitis mit Überwiegen der Granulozyten beendet, und die chronische Phase der Inflammation mit Überwiegen der Makrophagen trat ein. Am fünften Tag nach Injektion der Thioglykolat-Lösung wurden den Tieren nach Sakrifizierung unter sterilen Kautelen Peritonealmakrophagen entnommen.

Weiterhin bestimmten wir die IL-6-Serumkonzentrationen vor der Applikation des Thioglykolats, sowie vor Sakrifizierung der Tiere.

Alle für die PCR verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Becton Dickinson, USA bezogen.

3.3.2 Zellkulturen und Oil-Red-O-Färbung

Die entnommenen Peritonealmakrophagen waren bis zum nächsten Morgen in 8-Well-Kammern (Lab-Tek II, chamber slide system, Nalge Nunc international, USA) in DMES (Dulbecos modified eagle solution), welches 10% FBS (fetal bovine serum), 1% Streptomycin und 1% Penizillin enthielt, kultiviert worden. Die Entnahme der Zellen aus 4 der 8 Wells erfolgte nach einer Minute Trypsinierung - 50µl 0,25%iges Trypsin (Invitrogen, USA) - und nachfolgender Zugabe von 0,5ml DMES. Die so abgelösten Makrophagen wurden in Analogie zu der im Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Methode für periphere Monozyten für die zytometrische Analyse präpariert.

Für die Färbung adhätierender Makrophagen wurde das Medium der verbleibenden 4 Wells entfernt und die Zellen mit 10%igem Formaldehyd für 10 Minuten fixiert (LabChem, USA) und dann 3x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60%igem Propanol zu den adhären und jetzt fixierten Makrophagen für 2 Minuten, um dann abschließend die Zellen für 15 Minuten in 0,2%igem Oil-Red-O zu färben (Sigma, USA). Zur Quantifizierung des prozentualen Anteils der gefärbten Makrophagen (Cholesterinbeladung) wurden von einem für die Herkunft der Zellen verblindeten Untersucher fünf zufällig gewählte Bereiche auf dem Glasträger ausgezählt.

Abbildung 3.3.2.1 zeigt exemplarisch ein Beispiel kultivierter Peritoneal-Makrophagen einer PTLP0/LDLr0-Maus in dem verwendeten, standardisierten Ausschnitt.

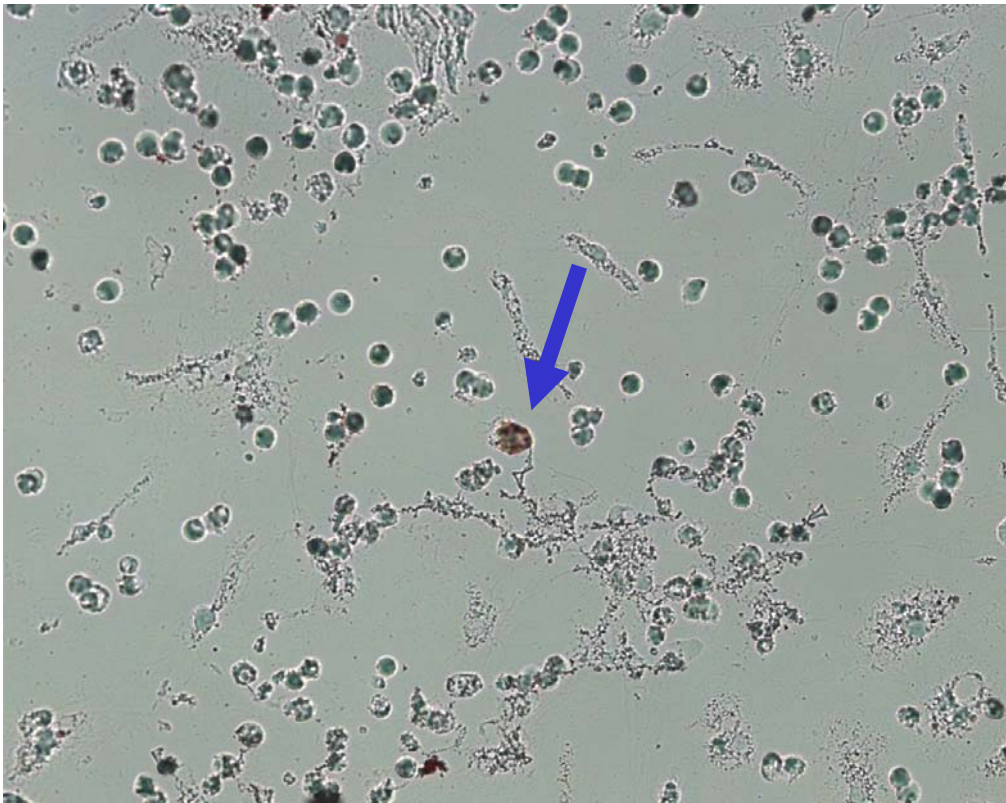


Abbildung 3.3.2.1

Peritonealmakrophagen von PLTP0/LDLr0-Mäusen nach Induktion einer Peritonitis durch intraperitoneale Gabe einer 4%igen Brewers Thioglykolat Lösung nach ca. 12-stündiger Kultur. Die rote Färbung zeigt die mit Oil-Red-O gefärbten und somit cholesterinbeladenen Zellen.

3.3.3. Zytometrische Analysen

Für die zytometrischen Analysen wurden monoklonale Antikörper gegen F4/80 (FITC, Clone Cl:A3-1, Serotec, USA) - ein spezifischer Marker monozytärer Mauszellen -, I-A^b (PE, Clone AF6-120.1, Pharmingen, USA) - ein MHC-Klasse-II Oberflächenantigen -, und CD11b (PerCP, Clone M1/70, Pharmingen, USA) - ein Integrin - verwendet.

Die Antikörper (jeweils 3µl) wurden mit 100µl Vollblut bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 900µl Lysepuffer (Becton Dickinson, USA) zur Lysierung der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten zugefügt. Die Zellen wurden hiernach dreimal in jeweils 1ml PBS (plus 2,5% FBS

und 0,025% NaN₃) gewaschen. Nach jedem Waschprozess wurde die Lösung zentrifugiert und der Überstand erneut abgesert. Nach drei Waschvorgängen wurde nach Zentrifugation und Abseren das entstandene Pellet in 1ml PBS resuspendiert und zur Analyse mittels FACS („Fluorescence Activated Cell Sorter“) verwendet. Nach Selektierung der F4/80-positiven Zellen (Monozyten/Makrophagen) mittels eines Gates wurde auf diesen Zellen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von I-A^b (Monozyten und Makrophagen) und CD11b (nur Monozyten) bestimmt. Ein Beispiel der verwendeten FACS-Analyse ist in Abbildung 3.2.1 dargestellt.

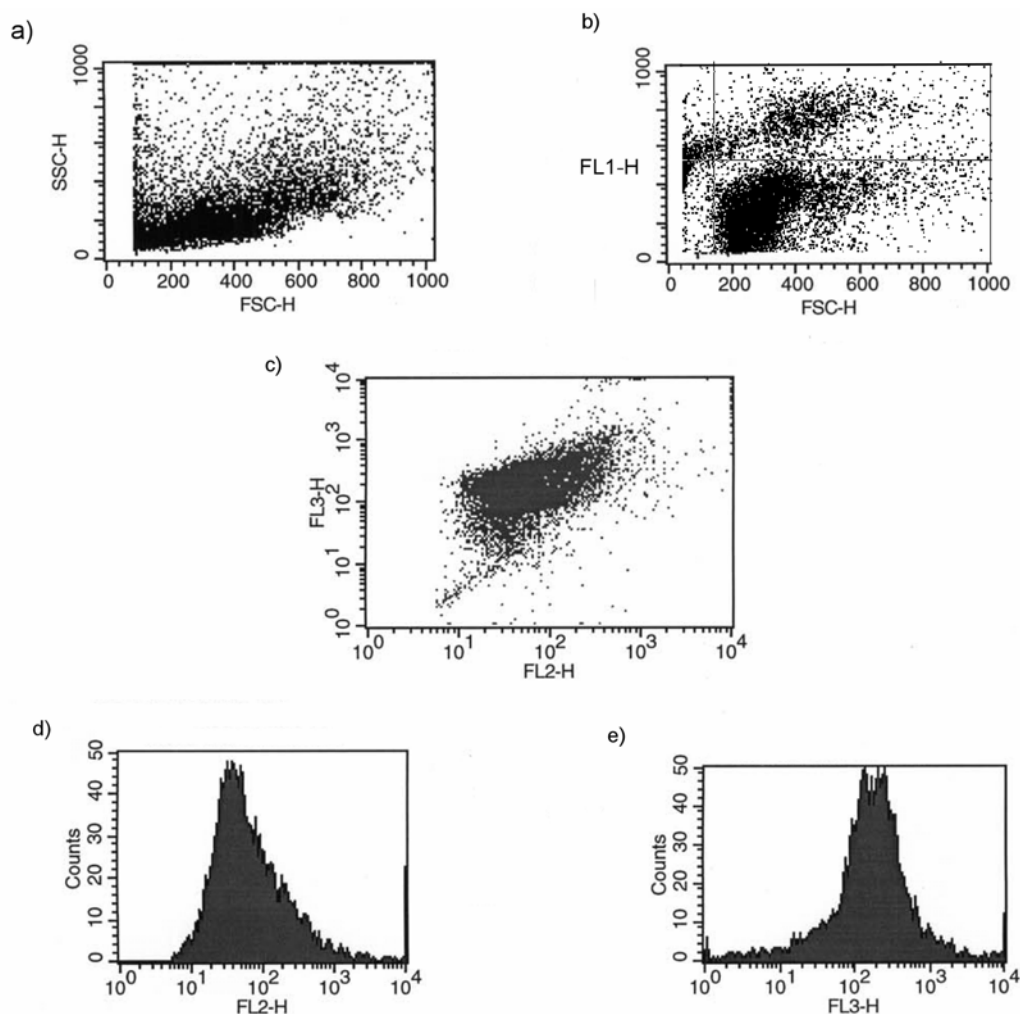


Abbildung 3.3.3.1
Beispiel der durchgeführten FACS-Analysen

- a) FSC („forward scatter“) für Zellgröße, SSC („sideward scatter“) für Granularität, Darstellung der Mausleukozyten
- b) FSC („forward scatter“) für Zellgröße, FL1 F4/80 (FITC), Gate: Monozyten
- c) FL2 für CD11b (PerCP), FL3 für I-A^b (PE)
- d) Mittlere Fluoreszenzintensität I-A^b
- e) Mittlere Fluoreszenzintensität CD11b

Bei den mit kultivierten Peritonealmakrophagen durchgeführten FACS-Analysen wurde nur die MFI von I-A^b bestimmt.

Ein „FAC sort flow“ Zytometer der Firma Becton Dickinson, USA wurde verwendet. Die Kalibrierung aller Kanäle erfolgte täglich vor Beginn der Experimente. Zur Auswertung diente das Cell Quest Software Systems (Becton Dickinson, USA).

3.3.4. Bestimmung von Lipiden und Zytokinen

Gesamtcholesterin und Phospholipide wurden mittels kommerziell erwerbbarer, enzymatischer Methoden bestimmt (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). Zur Analyse der Konzentrationen von TNF- α und IL-6 wurden mausspezifische, kommerziell erwerbbar ELISA (Enzym linked immuno absorbent assay) verwendet (BD Biosciences, USA) und die Analysen entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.5 Statistische Analysen

Um den Effekt der Behandlung mit IL-6 oder steriler Kochsalzlösung auf die Konzentrationen von IL-6, TNF- α , I-A^b, CD11b, Gesamtcholesterin und Phospholipiden zu untersuchen, wurden Student's T-Tests verwendet. Der statistische Vergleich des prozentualen Anteils der gefärbten Makrophagen erfolgte mittels χ^2 -Test. $P < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet. Alle Analysen wurden mit SPSS, V11.5 durchgeführt.

3.4 Studienpopulation und Methodik zum Studienkomplex "PLTP bei Hämodialysepatienten, Vergleich mit einer gepaarten Kontrollgruppe"

3.4.1 Studienpopulation

Die Studie schloss 68 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ein, die in einem Median von 2,8 Jahren (25%/75% Perzentile: 1,3/6,1 Jahre) hämodialysiert worden waren. Bei 23 Patienten war eine diabetische Nephropathie, bei 17 Patienten eine Glomerulonephritis, bei sechs Patienten eine Nephrosklerose, bei fünf Patienten eine polyzystische Nierenerkrankung und bei fünf Patienten eine interstitielle Nephritis die Ursache der terminalen Niereninsuffizienz. Bei vier Patienten war die Ursache unbekannt, und bei weiteren acht Patienten waren verschiedene Krankheitsbilder Hintergrund der terminalen Niereninsuffizienz. Zur Hämodialyse wurden synthetische Membranen (Polyamide oder Polysulfone) verwendet, die mittlere Dauer der Dialyse betrug $4,0 \pm 0,4$ Stunden.

Die Patienten wurden für einen mittleren Zeitraum von 1,7 Jahren (0,2 bis maximal 2,1 Jahre) nachbeobachtet. Der Großteil der Patienten stellte sich im Rahmen der Dialysetherapie erneut vor, bei einer kleinen Anzahl wurde das Follow-up telefonisch durchgeführt. 26 Patienten verstarben im genannten Zeitraum, der Tod wurde entweder vom behandelnden Hausarzt oder der zuletzt behandelnden Klinik dokumentiert.

68 gesunde Kontrollpersonen wurden nach BMI und Geschlecht den Dialysepatienten in einem gematchten Protokoll zugeordnet. Zur Rekrutierung der Kontrollpersonen, zur Definition der Risikofaktoren und zu den demographischen Daten siehe 3.1.1.

3.4.2 Labormethodik

Das Blut wurde bei allen Personen unter standardisierten Bedingungen entnommen. Bei den Hämodialysepatienten wurde das Blut vor Beginn der Hämodialyse, in der Regel 48 Stunden nach der letzten Hämodialyse gewonnen. Zur weiteren Labormethodik siehe 3.1.2.

3.4.3 Statistische Analyse

PLTP-Aktivität, CRP und Triglyzeride waren nicht normal verteilt. Alle Werte sind als Mediane präsentiert bzw. es waren in den Korrelationsanalysen logarithmierte Werte

dieser Variablen verwendet worden. Mittels gepaarten T-Tests wurde der Vergleich der logarithmierten PLTP-Werte von Hämodialysepatienten und Kontrollen durchgeführt.

Zur Evaluierung der Assoziation erhöhter PLTP-Werte mit der Variablen "Hämodialyse" führten wir zwei logistische Regressionmodelle durch, im ersten Modell als univariate Variable, im zweiten Modell adjustiert für Geschlecht, Alter, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie.

Die Überlebensanalysen wurden mittels der Kaplan-Meier-Methode und dem Log-rank-Test durchgeführt.

$P < 0.05$ wurde als signifikant bezeichnet. Alle Analysen wurden mit den Statistikprogrammen SPSS, V12.0 und SAS, V8.1 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Phospholipid-Transferprotein bei Patienten mit koronarer Atherosklerose: „Querschnittsvergleich mit gesunden Probanden und prognostische Relevanz bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Atherosklerose“

Die Rolle des PLTP war in einer großen epidemiologischen Studie bis dato nicht untersucht worden. Ziele der Untersuchung lagen darin, PLTP als potentiellen Risikofaktor für eine koronare Herzerkrankung und die Assoziationen der PLTP-Aktivität mit anderen Risikofaktoren zu bestimmen. Zusätzlich sollte die Frage beantwortet werden, ob die PLTP-Aktivität das ereignisfreie Überleben von Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Atherosklerose anzeigt.

4.1.1 Vergleich von KHK-Patienten und Kontrollen, Basisdaten

Der Vergleich der Basisvariablen von 1.102 Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzerkrankung und 444 gesunden Kontrollpersonen ist in Tabelle 4.1.1 dargestellt. Klassische Risikofaktoren wie aktives Rauchen (25,8% versus 12,6%), Diabetes mellitus (32,8% versus 9,9%), arterielle Hypertonie (72,3% versus 28,6%), und Vorliegen einer familiären Disposition für eine koronare Herzerkrankung (38,7% versus 20,8%) fanden sich wie erwartet häufiger bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Statine wurden bei Einschluss in die Studie häufiger in der Gruppe der Patienten eingenommen; ein Aspekt, der die niedrigeren Gesamtcholesterin- und LDL-C-Konzentrationen bei den Patienten erklären kann. In der Patientengruppe waren HDL-C- und ApoA-I-Konzentrationen niedriger, Lp(a) und Triglyzeride waren nicht erhöht. ApoB war in der Patientengruppe nicht erhöht.

Variable	KHK-Patienten n = 1102	Kontrollen n = 444	p-Wert
Alter in Jahren	61,5 ± 10,2	59,9 ± 7,4	0,001
BMI, kg/m ²	27,1 ± 3,8	26,7 ± 4,4	0,02
Männliches Geschlecht, %	74,3	72,3	0,4
Aktive Raucher, %	25,8	12,6	<0,001
Diabetes mellitus, %	32,8	9,9	<0,001
Arterielle Hypertonie, %	72,3	28,6	<0,001
Positive Familienanamnese, %	38,7	20,8	<0,001
<i>Lipid Status</i>			
Gesamtcholesterin, mg/dl	220,0 ± 45,9	239,2 ± 41,4	<0,001
LDL -C, mg/dl	141,0 ± 40,1	155,5 ± 35,1	<0,001
HDL -C, mg/dl	48,0 ± 14,6	59,2 ± 16,0	<0,001
LDL/HDL	3,2 ± 1,2	2,8 ± 0,9	<0,001
Triglyzeride, mg/dl*	143 (103/198)	123 (87/166)	<0,001
ApoA-I, g/l	1,31 ± 0,24	1,62 ± 0,28	<0,001
ApoB, g/l	1,20 ± 0,29	1,19 ± 0,23	0,3
Lp(a), mg/dl	34,9 ± 37,7	26,9 ± 34,7	<0,001

Tabelle 4.1.1

Basisdaten der KHK-Patienten und Kontrollpersonen

Die kategorialen Variablen sind als Prozent der Patienten aufgeführt und die P-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test errechnet. Kontinuierliche Variablen sind als Mittelwert ± Standardabweichung oder bei nicht normaler Verteilung* als Mediane (25%/75%-Perzentilen) dargestellt. Die P-Werte wurden mit ANOVA oder bei nicht normaler Verteilung mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

4.1.2 PLTP-Aktivität im Vergleich von KHK-Patienten und gesunden Kontrollen, im Vergleich der Geschlechter und in Abhängigkeit von der klinischen Manifestation der KHK

Eine der wesentlichen Fragen dieser Untersuchung war, ob sich in den Populationen Unterschiede in der PLTP-Aktivität nachweisen lassen. Zunächst waren Patienten und Kontrollpersonen verglichen worden. In der Abbildung 4.1.2 ist die Verteilung der PLTP-Aktivität - getrennt in Patienten und Kontrollen - graphisch dargestellt. Die

Patienten mit angiographisch nachgewiesener KHK hatten durchschnittlich höhere PLTP-Aktivitäten als die Kontrollpersonen.

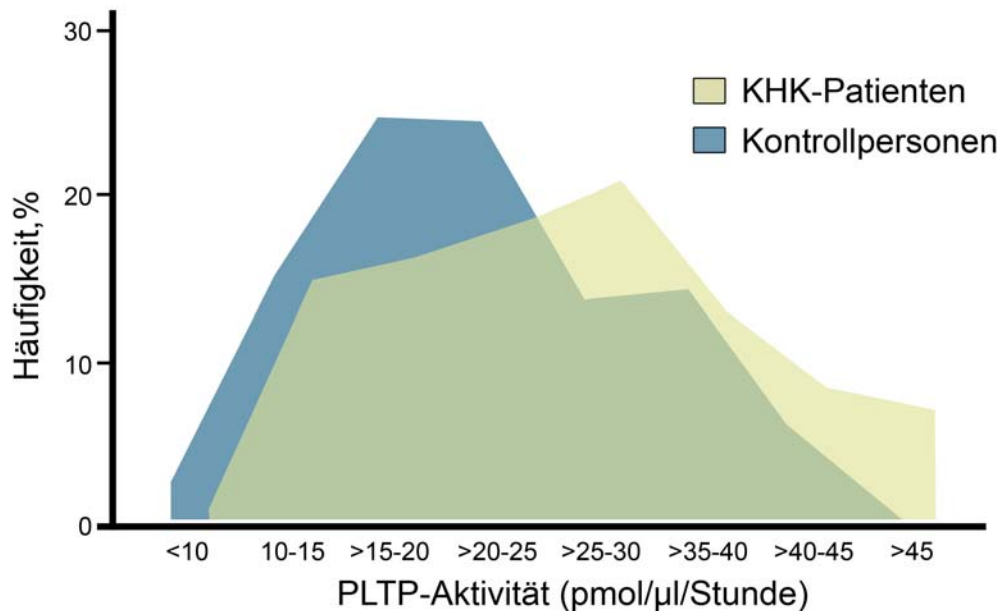


Abbildung 4.1.2

Verteilung der Häufigkeit der gemessenen Plasma-PLTP-Aktivität bei KHK-Patienten (n=1.102) im Vergleich zu Kontrollpersonen (n=444).

Dieser Unterschied war signifikant. Patienten mit KHK hatten im Mittel höhere Plasma-PLTP- Aktivitäten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen ($25,5 \pm 9,8$ versus $22,4 \pm 7,4$ pmol/μl/h, $p < 0,001$; siehe auch Tabelle 4.1.3).

Weiterhin war der Zusammenhang von erhöhten PLTP-Aktivitäten und dem Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung in Abhängigkeit von anderen Einflussfaktoren mittels einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse untersucht worden. Der Zusammenhang von KHK und erhöhtem PLTP blieb auch in dieser Analyse nach Adjustierung für die Risikofaktoren Alter, Geschlecht, BMI, Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese für eine KHK, LDL-C, HDL-C, Triglyzeride, ApoA-I und Lp(a) bestehen ($p < 0,001$, siehe Tabelle 4.1.3).

PLTP-Aktivitäten waren weiterhin geschlechtsabhängig verglichen worden. Die PLTP-Aktivität ergab beim Vergleich von Männern und Frauen in der

Patientengruppe keinen signifikanten Unterschied ($25,6 \pm 9,8$ pmol/ μ l/h Männer versus $25,1 \pm 10,0$ pmol/ μ l/h Frauen, $p=0,439$). Jedoch lag bei den Kontrollpersonen die mittlere PLTP-Aktivität der Frauen signifikant niedriger als die der Männer (Männer: $23,5 \pm 7,4$ pmol/ μ l/h; Frauen: $19,4 \pm 6,7$ pmol/ μ l/h, $p<0,001$).

Der Korrelation von KHK und PLTP-Aktivität blieb jedoch geschlechtsunabhängig bestehen, sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Patienten waren die PLTP-Aktivitäten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (Tabelle 4.1.3).

	n	PLTP, pmol/μl/h	p univariate	p adjustiert
<u>Gesamtpopulation</u>				
Kontrollen	444	22,4±7,4‡	<0,001	< 0,001
KHK-Patienten	1102	25,5±9,8‡		
<u>Männer</u>				
Kontrollen	323	23,5±7,4‡	<0,001	<0,001
KHK-Patienten	823	25,6±9,8‡		
<u>Frauen</u>				
Kontrollen	121	19,4±6,7‡	<0,001	0,01
KHK-Patienten	279	25,1±10,0‡		

Tabelle 4.1.2

Plasma PLTP Aktivität bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und bei Kontrollpersonen

Die univariaten Analysen wurden mittels ANOVA durchgeführt, die multivariaten Analysen mittels logistischer Regression nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, BMI, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, positive Familienanamnese für eine KHK und die Lipidvariablen LDL-C, HDL-C, Triglyzeride, ApoA-I und Lp(a) ($n= 1207$). $\ddagger$: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

272 Patienten der untersuchten Population waren mit einem akuten Koronarsyndrom in die Klinik eingewiesen worden. Es sollte geprüft werden, ob die Patienten dieser Gruppe im Vergleich zu den Patienten mit stabiler Angina pectoris unterschiedliche PLTP-Aktivitäten hatten. Die Manifestation der KHK - chronisch versus akut - hatte

jedoch keinen Einfluss auf die PLTP-Aktivität ($25,9 \pm 9,6$ pmol/ μ l/h bei Patienten mit stabiler Angina pectoris versus $24,7 \pm 10,2$ pmol/ μ l/h bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, $p=0,281$, Daten nicht tabellarisch präsentiert).

4.1.3 PLTP-Aktivität im Vergleich mit anderen Risikofaktoren

Mausmodelle und humane Studien konnten die Assoziation des PLTP mit HDL-Cholesterin und triglyzeridhaltigen Lipoproteinen zeigen (39,40,47-49). Zum Zusammenhang von PLTP-Aktivitäten und Serumkonzentrationen von HDL-C und/oder ApoB-haltigen Lipoproteinen in der vorliegenden Population führten wir Korrelationsanalysen durch, welche in Tabelle 4.1.3 dargestellt sind.

	PLTP-Aktivität, pmol/ μ l/h	
	KHK-Patienten	Kontrollen
Alter in Jahren	-0,02	-0,11*
Gesamtcholesterin, mg/dl	0,04	-0,07
LDL-C, mg/dl	0,03	-0,09
HDL-C, mg/dl	0,04	-0,15**
Triglyzeride, mg/dl	0,02	0,17**
ApoA-I, g/l	0,11**	-0,14*
ApoB, g/l	0,01	-0,08
Lp(a), mg/dl	-0,01	0,08

Tabelle 4.1.3
Korrelationsanalysen von PLTP mit anderen, kontinuierlichen Variablen

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Bei den Kontrollpersonen konnten wir moderate, aber signifikante, negative Korrelationen der PLTP-Aktivität mit HDL-C ($r = -0,15$, $p < 0,001$) und mit ApoA-I-Konzentrationen ($r = -0,14$, $p < 0,05$) aufzeigen. Weiterhin war eine moderate, aber signifikante Korrelation mit Triglyzeriden zu dokumentieren ($r = 0,17$, $p < 0,001$). Die genannten Korrelationen waren nicht bei KHK-Patienten festzustellen. Weiterhin war PLTP weder in Kontrollen noch bei KHK-Patienten mit LDL-C oder ApoB assoziiert.

Die klassischen Risikofaktoren aktives Rauchen ($p=0,089$), arterielle Hypertonie ($p=0,774$) und insbesondere Diabetes ($24,5 \pm 9,2$ pmol/ μ l/h, Nicht-Diabetiker versus $24,5 \pm 9,7$ pmol/ μ l/h, Diabetiker, $p=0,433$) hatten keinen Einfluss auf die PLTP-Aktivität in der von uns untersuchten Population (Daten nicht tabellarisch präsentiert). Ebenfalls nicht unterschiedlich war die PLTP-Aktivität bei Patienten mit oder ohne Statintherapie ($25,6 \pm 9,9$ pmol/ μ l/h, Patienten ohne Statine versus $25,0 \pm 9,6$ pmol/ μ l/h, Patienten mit Statinen; $p=0,350$).

4.1.4 PLTP als Risikofaktor für eine KHK (univariate und multivariate Analysen)

Um das mit der Plasma-PLTP-Aktivität erhöhte Risiko für eine koronare Herzerkrankung zu untersuchen, war die Odds Ratio für jedes Quintil der Plasma-PLTP-Aktivität im Vergleich zum ersten Quintil, basierend auf den Werten der gesamten Population bestimmt worden. Wie in Tabelle 4.1.4 dargestellt, zeigte sich im vierten und fünften Quintil ein signifikanter Zusammenhang zum Vorliegen einer KHK. Individuen im vierten Quintil hatten eine Odds Ratio von 1,5, im fünften Quintil eine Odds Ratio von 2,0 im Vergleich zu den Individuen im ersten Quintil.

Quintile PLTP, pmol/ μ l/h	n	Anzahl der Fälle (%)	Odds Ratio	Unteres Konfidenzintervall	Oberes Konfidenzintervall
<16,5	317	215 (67,8)	1	--	--
16,5 - 21,5	321	198 (61,7)	0,8	0,6	1,1
>21,5 - 26,2	312	222 (71,2)	1,2	0,8	1,6
>26,2 - 32,6	297	226 (76,1)	1,5	1,1	2,2
>32,6	299	241 (80,6)	2,0	1,4	2,9

Tabelle 4.1.4.1

Odds Ratios der univariaten Assoziationen der in Quintile kategorisierten PLTP-Aktivität im Vergleich zum Fall-Kontroll-Status.

Um den Einfluss anderer Faktoren auf die PLTP-Aktivität bei Vorliegen einer KHK zu evaluieren, führten wir verschiedene multivariate Analysen durch.

Wie in Tabelle 4.1.5 dargestellt, war nach Adjustierung für Alter und Geschlecht jeder Anstieg der PLTP-Quintile mit einem 1,2-fachen Anstieg der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer KHK assoziiert (95% KI 1,1-1,3; $p < 0,001$). Individuen mit PLTP-Aktivitäten im höchsten Quintil hatten ein 1,9-fach erhöhtes Risiko für das Vorliegen einer KHK im Vergleich zu den Individuen im niedrigsten Quintil. Nach Adjustierung für weitere Risikofaktoren wie BMI, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und positive Familienanamnese für eine koronare Herzerkrankung und den Lipidvariablen LDL-C, HDL-C und Triglyzeride blieb dieser Zusammenhang nahezu unverändert (Tabelle 4.1.5, Modell 2). Nach zusätzlicher Adjustierung für ApoA-I und Lp(a), welche in der Untersuchung signifikant bei Patienten mit KHK erhöht waren, blieb der Zusammenhang zwischen in Quintilen kategorisierter PLTP-Aktivität und KHK ebenfalls bestehen (Modell 3, Tabelle 4.1.4.2).

	PLTP-Quintile (pmol/μl/h)					p-Wert
	1 (<16,5)	2 (16,5 - 21,5)	3 (>21,5 - 26,2)	4 (>26,2 - 32,6)	5 (>32,6)	
OR (Modell 1)	1,0	0,7	1,1	1,5	1,9	<0,001
95% CI	--	0,5 - 1,0	0,8 - 1,6	1,1 - 2,2	1,3 - 2,8	
OR (Modell 2)	1,0	0,6	0,9	1,2	2,5	0,001
95% CI	--	0,4 - 1,0	0,6 - 1,4	0,8 - 2,0	1,2 - 5,1	
OR (Modell 3)	1,0	0,6	0,7	1,9	2,4	<0,001
95% CI	--	0,3 - 1,2	0,3 - 1,4	0,9 - 4,3	1,1 - 5,2	

Tabelle 4.1.4.2

Odds Ratios in drei logistischen Regressions-Modellen für das Vorliegen einer KHK in Abhängigkeit von in Quintilen kategorisiertem PLTP

Modell 1: Adjustiert für Alter und Geschlecht.

Modell 2: Zusätzlich adjustiert für BMI, Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und positive Familienanamnese für eine Koronare Herzerkrankung und die Lipidvariablen LDL-C, HDL-C und Triglyzeride.

Modell 3: Weiterhin adjustiert für ApoA-I und Lp(a), (n= 1207).

P über Trend wurde mit dem Wald Chi-Quadrat Test berechnet, ORs wurden für ansteigende PLTP-Quintile in jedem logistischen Regressionsmodell kalkuliert.

Weiterhin untersuchten wir die Assoziation von der in Quintilen kategorisierten PLTP-Aktivität und KHK in Bezug auf Geschlechtsabhängigkeit. Bei diesen Analysen war jeder Anstieg der PLTP-Quintile mit einem 1,4-fachen Anstieg für das Vorliegen einer KHK bei Frauen (95% KI, 1,2-1,6; $p < 0,001$) und mit einem 1,2-fachen Anstieg bei Männern (95% KI, 1,02-1,2; $p = 0,014$) assoziiert (Daten nicht tabellarisch präsentiert).

4.1.5 PLTP-Aktivität als prognostischer Faktor

Um die prognostische Relevanz erhöhter Plasma-PLTP-Aktivitäten zu untersuchen, verglichen wir zunächst mittels Student's T-Test Patienten, welche im Follow-up einen nichttödlichen Myokardinfarkt oder einen kardiovaskulären Tod erlitten hatten ($n=156$) mit Patienten ohne Ereignis. Hierbei war PLTP in der Gruppe der Patienten mit Erreichen des kombinierten Endpunktes nicht signifikant erhöht ($25,6 \pm 10,0$ pmol/ μ l/h bei Patienten ohne Ereignis, $26,0 \pm 8,7$ pmol/ μ l/h bei Patienten mit Ereignis; $p = 0,624$). Zur weiteren Evaluierung der prognostischen Wertigkeit des PLTP führten wir eine Kaplan-Meier-Analyse mit am Median ($25,0$ pmol/ μ l/h) kategorisiertem PLTP durch. In dieser Analyse war die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des kombinierten Endpunktes bei den Patienten mit PLTP-Aktivitäten über dem Median nicht signifikant erhöht ($p = 0,367$, Abbildung 4.1.5).

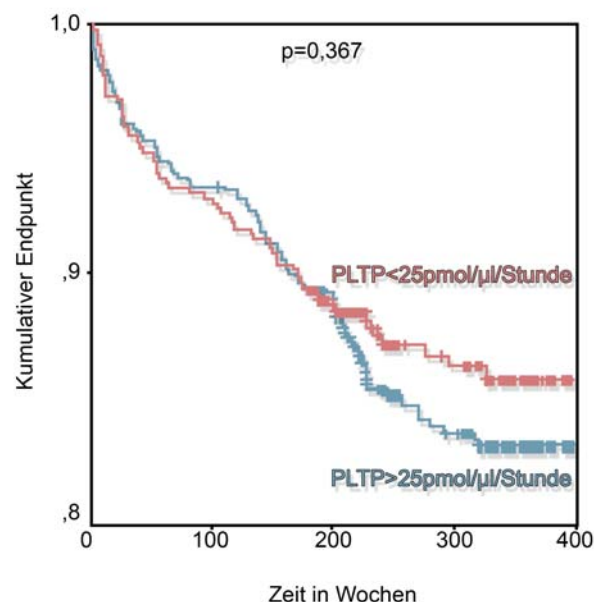


Abbildung 4.1.5
Kaplan-Meier-Kurve für den kombinierten Endpunkt aus nichttödlichem Myokardinfarkt und kardiovaskulärem Tod in Abhängigkeit von der PLTP-Aktivität, kategorisiert am Median.

Zusammenfassend konnten die gezeigten Resultate PLTP als unabhängigen Risikomarker für das Krankheitsbild der koronaren Atherosklerose identifizieren.

Als Riskofaktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse konnte PLTP nicht dargestellt werden. In einer Überlebensanalyse mit dem kombinierten Endpunkt aus kardiovaskulärer Mortalität und nichttödlichem Myokardinfarkt war die am Median kategorisierte PLTP-Aktivität nicht mit dem Auftreten des kombinierten Endpunktes assoziiert.

4.2 PLTP-Kinetik bei gesunden Probanden nach einer fettreichen Mahlzeit

In verschiedenen Untersuchungen war ein Zusammenhang von PLTP und den proatherogenen, postprandial erhöhten triglyzeridreichen Lipoproteinen gezeigt worden (40-46). In der vorliegenden Studie mit gesunden Probanden sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang von PLTP-Nüchternwerten und den postprandialen Triglyzeriden als stärkstem Marker der postprandialen Lipide besteht, ein weiterer Mechanismus, mit dem man die Atherogenität des PLTP erklären könnte. Weiterhin war die Kinetik der PLTP-Aktivität nach einer fettreichen Mahlzeit von Interesse.

Die Studienpopulation bestand aus 14 weiblichen und 17 männlichen Probanden mit einem mittleren Alter von $31 \pm 7,6$ Jahren und einem mittleren BMI von $24,5 \pm 3,7$ kg/m^2 . Fast die Hälfte der Probanden waren Raucher, eine Hyperlipoproteinämie wurde bei einem Drittel, ein arterieller Bluthochdruck bei einem Fünftel der Probanden angegeben. Acht von 14 Frauen nahmen orale Kontrazeptiva ein. Die Basisdaten der Probanden sind in Tabelle 4.2.1 aufgeführt.

Alter in Jahren	31,0 $\pm$ 7,6
BMI, kg/m²	24,5 $\pm$ 3,7
Männliches Geschlecht, %	54,8
Aktive Raucher, %	45,2
Diabetes mellitus, %	0
Arterielle Hypertonie, %	19,4
Hyperlipoproteinämie, %	32,2
Positive Familienanamnese für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, %	25,8
Systolischer Blutdruck, mmHg	120,7 $\pm$ 14,0
Diastolischer Blutdruck, mmHg	80,0 $\pm$ 9,5
Orale Kontrazeptiva, Frauen, %	57,1

Tabelle 4.2.1

Basisdaten der 31 gesunden Probanden zur Studie "Serum-PLTP-Aktivität nach einer fettreichen Mahlzeit"

Kategoriale Variablen sind als Prozente, kontinuierliche Variablen als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

Wir verglichen die im Probandenserum gemessenen Lipidparameter vor, sowie 3, 5, 7 und 10 Stunden nach einer definierten fettreichen Mahlzeit (1.265 kcal/m² KÖF). Wie in Tabelle 4.2.2 dargestellt, waren die Serumkonzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL-C, HDL-C, ApoA-I, und ApoB nahezu unbeeinflusst von der Einnahme der fettreichen Mahlzeit. Triglyzeride waren 3, 5 und 7 Stunden nach der Mahlzeit erhöht und 10 Stunden nach der Mahlzeit erniedrigt im Vergleich zu den Nüchternwerten.

	Nüchtern	3 Stunden	5 Stunden	7 Stunden	10 Stunden
Gesamtcholesterin, mg/dl	192,6±42,1	193,0±42,8	193,9±42,8	195,2±41,2	195,6±41,0
LDL-C, mg/dl	111,5±36,6	98,7±40,9*	101,2±37,3	109,5±36,6	115,3±76,1
HDL-C, mg/dl	54,1±2,1	52,5±2,1	53,1±2,3	54,8±2,3	57,6±2,3
ApoA-I, g/l	1,36±0,05	1,37±0,05	1,36±0,05	1,37±0,05	1,37±0,04
ApoB, g/l	0,89±0,05	0,88±0,05	0,88±0,05	0,89±0,05	0,90±0,05
Triglyzeride, mg/dl	102,6±41,0	170,2±75,5*	158,0±76,6*	121,9±60,9*	79,0±34,8*
PLTP, pmol/μl/h	27,3±11,7	27,9±8,7	28,6±9,6	30,5±11,5	28,9±11,6

Tabelle 4.3.2

Lipidparameter im Vergleich der Nüchternwerte mit den Werten 3, 5, 7 und 10 Stunden nach Einnahme der fettreichen Mahlzeit.

Alle Resultate sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. *p<0,05 mittels ANOVA und post-hoc-Analyse und Vergleich 3,5,7 und 10-Stundenwerte gegen Nüchternwerte.

Die PLTP-Aktivität stieg von nüchtern 27,3±11,7 pmol/μl/h auf 27,9±8,7 pmol/μl/h nach 3 Stunden, 28,6±9,6 pmol/μl/h nach 5 Stunden und 30,5±11,5 pmol/μl/h nach 7 Stunden an, um dann nach 10 Stunden wieder auf 28,9±11,6 pmol/μl/h abzusinken. Die Differenzen der PLTP-Aktivitäten waren nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich der Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (alle p-Werte>0,05, auch in den post-hoc-Analysen).

Um die Hypothese zu evaluieren, dass die PLTP-Aktivität ein Marker für die postprandial erhöhten Lipoproteine sei, führten wir Korrelationsanalysen durch, die einen Zusammenhang von PLTP-Nüchternwerten und postprandialen Triglyzeridwerten (r=0,317, p<0,05) zeigten. Die im Nüchternserum gemessene PLTP-Aktivität scheint somit die Konzentration der atherogenen, postprandial erhöhten, triglyzeridreichen Lipoproteine zu beeinflussen.

4.3 PLTP hat proinflammatorische Effekte in Mausmodellen

In verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen ist ein pro-oxidativer und somit potentiell pro-inflammatorischer Effekt des PLTP beschrieben worden (42-46). Es war zu vermuten, dass dieser Effekt einen Aspekt der Pro-Atherogenität dieses Enzyms darstellte. Aus diesem Grund wurden zwei experimentelle Ansätze zur Inflammation auf dem Hintergrund von Mäusen, denen das PLTP-Gen fehlt (PLTP0), gewählt. In der ersten experimentellen Reihe wurde eine chronische Inflammation als Modell des chronischen Entzündungsprozesses der Atherosklerose in Form von intraperitonealen Interleukin-6(IL-6)-Injektionen hervorgerufen. Im zweiten Teil der Experimente wurde der Effekt eines Entzündungsreizes auf die Cholesterinbeladung der Peritoneal-Makrophagen als Modell für die Cholesterinbeladung der aortalen Makrophagen in einem zusätzlich atherosklerotischen Mausmodell (LDL-Rezeptor-knock-out-Mäuse (LDLr0-Mäuse) untersucht.

4.3.1 Effekt der intraperitonealen Gabe von Interleukin-6 im Vergleich Wildtyp-versus

PLTP0-Mäuse

Zum Vergleich von PLTP0- mit WT-Mäusen bestimmten wir zunächst vor Beginn der Behandlung mit IL-6 oder steriler Kochsalzlösung die in den Tabellen 4.3.1.1 und 4.3.1.2 aufgeführten Parameter.

Mausspezies	HDL-C (mg/dl)	Non-HDL-C (mg/dl)	HDL-PL (mg/dl)	Non-HDL-C (mg/dl)	Glukose (mg/dl)
WT	80±8	23±5	125±11	39±7	76±3
PLTP0	30±6**	17±3	51±9**	31±3	58±7*

Tabelle 4.3.1.1

Cholesterin- und Glukose-Plasmawerte bei PLTP0- und WT-Mäusen vor Beginn der Behandlung mit steriler Kochsalzlösung oder IL-6.

Alle Angaben als Mittelwert±Standardabweichung. WT: Wildtyp-Mäuse, PLTP0: PLTP-Gen-knock-out-Mäuse, C: Cholesterin, PL: Phospholipide. *p<0.05; **p<0.01.

PLTP0-Mäuse hatten signifikant weniger HDL-Phospholipide (51±9mg/dl PLTP0 versus 125±11mg/dl WT, p<0,01) und HDL-C (30±6mg/dl PLTP0 versus

125±11mg/dl WT, $p<0,01$). Die Nüchtern glukosewerte waren ebenfalls signifikant niedriger in den PLTP0-Mäusen (58±7mg/dl PLTP0 versus 76±3mg/dl WT, $p<0,05$).

Vor Beginn der Behandlung wurden unterschiedliche Inflammationsmarker bestimmt, wie in Tabelle 4.3.1.2 gezeigt. IL-6 war um mehr als 50% bei PLTP0-Mäusen gegenüber WT-Mäusen reduziert (26±12pg/ml PLTP0 versus 55±30pg/ml WT, $p<0,05$). Hingegen ergab sich kein Unterschied der Konzentrationen von TNF- α sowie der mittleren Fluoreszenzintensität von CD11b und I-A^b auf peripheren Monozyten im Vergleich zum Beginn der Behandlung (siehe Tabelle 4.3.1.2).

Mausspezies	IL-6	TNF-α	CD11b	I-A^b
	pg/ml	pg/ml	MFI	MFI
WT	55±30	201±55	209±54	710±76
PLTP0	26±12*	189±41	219±53	759±63

Tabelle 4.3.1.2

Plasma-Zytokinspiegel und Monozytenmarker vor Beginn der Behandlung mit steriler Kochsalzlösung oder IL-6 in PLTP0- und WT-Mäusen.

Alle Angaben als Mittelwert±Standardabweichung. WT: Wildtyp-Mäuse, PLTP0: PLTP-Gen-knock-out-Mäuse * $p<0.05$. MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität.

Um den Einfluss des PLTP-Gens auf inflammatorische Prozesse zu prüfen, verglichen wir den Effekt der intraperitonealen Gabe von IL-6 zur Induktion eines Inflamationsprozesses in PLTP0- und WT-Mäusen mit der intraperitonealen Gabe sterilisierter Kochsalzlösung als Kontrolle. Jeweils 12 männliche, 16 Wochen alte PLTP0- und WT-Mäuse wurden in jeweils zwei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppe 1 (jeweils sechs PLTP0- und WT-Mäuse) wurde mit intraperitonealen Gaben von 5.000 IU rekombinantem Maus-IL-6 über sechs Wochen an jedem 5. Tag behandelt. Als Kontrollen wurden den Mäusen der Gruppe 2 (jeweils sechs PLTP0- und WT-Mäuse) sterile Kochsalzlösungen an den gleichen Tagen für 6 Wochen injiziert.

Die zu Beginn der Untersuchung gemessenen Parameter wurden nach 4 und 6 Wochen erneut gemessen. Die Abbildungen 4.3.1.1 und 4.3.1.2 zeigen die Resultate nach 4-wöchiger und 6-wöchiger Behandlung.

Die Plasmakonzentrationen von IL-6 waren 4 und 6 Wochen nach Beginn der Behandlung mit rekombinantem Maus-IL-6 sowohl in den PLTP0- als auch in den WT-Mäusen signifikant im Vergleich zu den jeweiligen, mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppen erhöht. Hiermit konnte die Auslösung einer systemischen Erhöhung

der IL-6-Konzentrationen durch die wiederholte intraperitoneale Gabe von IL-6 nachgewiesen werden.

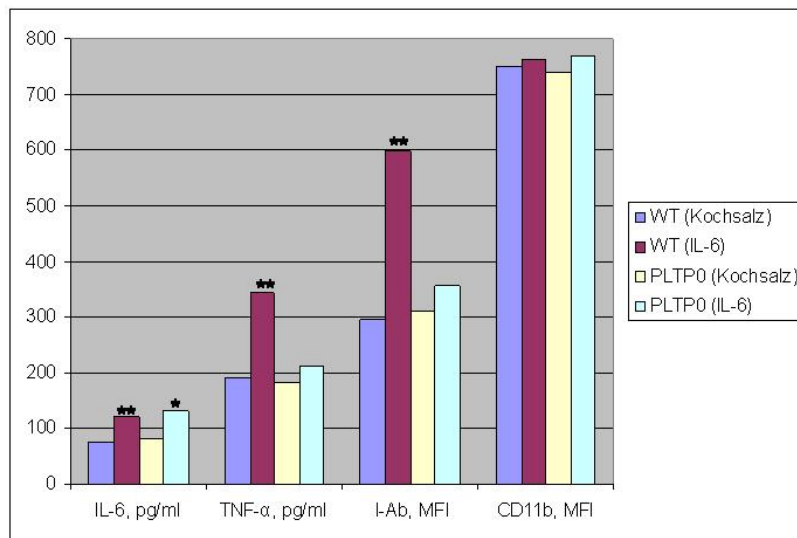


Abbildung 4.3.1.1

Effekt der 4-wöchigen intraperitonealen Gabe von IL-6 oder steriler isotonischer Kochsalzlösung auf Plasmazytokine und Monozytenmarker in WT- und PLTP0-Mäusen.

Dargestellt sind Mittelwerte. MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität. *p<0.05, **p<0.01 für WT (Kochsalz) versus WT (IL-6) und PLTP0 (Kochsalz) versus PLTP0 (IL-6).

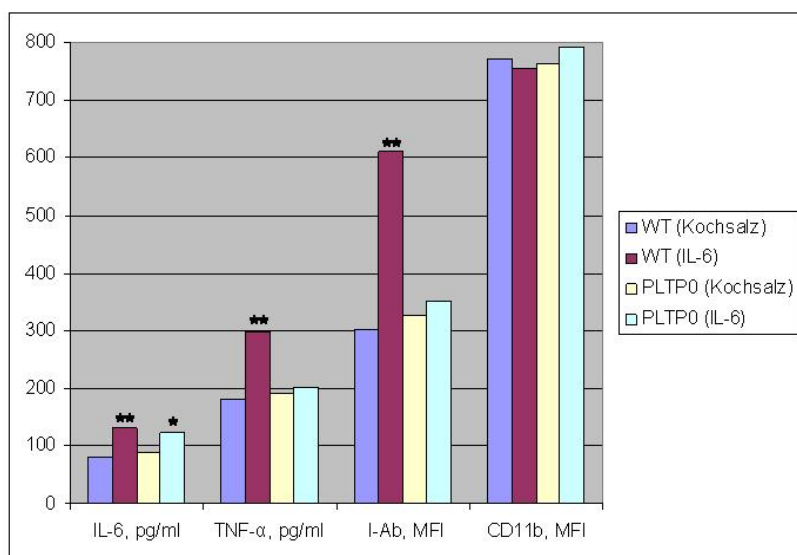


Abbildung 4.3.1.2

Effekt der 6-wöchigen intraperitonealen Gabe von IL-6 oder steriler isotonischer Kochsalzlösung auf Plasmazytokine und Monozytenmarker in WT- und PLTP0-Mäusen.

Dargestellt sind Mittelwerte. MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität. *p<0.05, **p<0.01 für WT (Kochsalz) versus WT (IL-6) und PLTP0 (Kochsalz) versus PLTP0 (IL-6).

Wie in den Abbildungen 4.3.1.1 und 4.3.1.2 gezeigt, war TNF- α nach 4 und 6 Wochen in den Wildtyp-Mäusen, aber nicht in den PLTP0-Mäusen, signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Das mittels FACS-Analyse bestimmte Monozytenoberflächenantigen I-A^b, ein MHC-Klasse II Molekül, war ebenfalls in den mit IL-6 behandelten WT-Mäusen, aber nicht in den PLTP0-Tieren hochreguliert. Somit konnten wir einen PLTP-spezifischen, pro-inflammatorischen Effekt aufzeigen. Im Gegensatz zu I-A^b war CD11b in keiner der Gruppen durch die intraperitoneale Gabe von IL-6 oder Kochsalz zu beeinflussen.

Weiterhin bestimmten wir die Konzentration der Lipidparameter und der Serumglukose 4 und 6 Wochen nach Beginn der Behandlung und konnten keine relevante Beeinflussung durch die intraperitoneale Gabe von IL-6 oder Kochsalz zeigen.

4.3.2 Vergleich der Wirkung einer cholesterinreichen Diät und der intraperitonealen Injektion von Thioglykolat auf die Cholesterinaufnahme und den Aktivierungszustand von kultivierten Peritonealmakrophagen sowie Vergleich der IL-6-Serumkonzentrationen bei LDLr0- versus PLTP0/LDLr0-Mäusen

Im zweiten Teil der Experimente wurde der Effekt eines Entzündungsreizes auf die Cholesterinbeladung der Peritoneal-Makrophagen als Modell für die Cholesterinbeladung der aortalen Makrophagen in einem atherosklerotischen Mausmodell (LDL-Rezeptor-knock-out-Mäuse (LDLr0-Mäuse) auf dem Hintergrund des Vorliegens des PLTP-Gens untersucht. Der inflammatorische Reiz wurde mittels einer intraperitonealen Injektion von Thioglykolat induziert. Nach fünf Tagen, also nach Abklingen der akuten Entzündung mit Überwiegen der Neutrophilen und Beginn der chronischen Inflammation mit Überwiegen der Makrophagen, wurden nach Sakrifizierung unter sterilen Bedingungen Peritonealmakrophagen entnommen. Diese wurden kultiviert, und nach einer mindestens 12-stündigen Inkubation wurde der Anteil der Cholesterinaufnahme der Makrophagen mittels Oil-Red-O-Färbung, sowie der Aktivierungsmarker I-A^b auf der Makrophagenoberfläche bestimmt.

Weiterhin untersuchten wir die IL-6-Serumkonzentrationen vor der Thioglykolinjektion sowie zum Ende der Untersuchung.

4.3.2.1 Oil-Red-O-Färbung

Der Anteil der Oil-Red-O gefärbten und somit cholesterinbeladenen Makrophagen war signifikant in der Gruppe der LDLr0- im Vergleich zu PLTP0/LDLr0-Mäusen erhöht ($88,2 \pm 7,1\%$ versus $48,6 \pm 17,1\%$, $p=0,001$, Tabelle 4.2.2.1). Diese verminderte peritoneale Schaumzellbildung in den PLTP0-Mäusen könnte einen spezifischen Effekt des Vorhandenseins des PLTP-Gens auf die Bildung atherosklerotischer Läsionen, die sich im Modell der LDLr0-Maus typischerweise in Form von intimaler Schaumzellenanreicherung manifestiert, anzeigen.

4.3.2.2 FACS –Analyse von Peritonealmakrophagen

Die zytometrische Analyse zeigte, dass die MFI von Peritonealmakrophagen bei LDLr0-Mäusen signifikant gegenüber PLTP0/LDLr0-Mäusen erhöht war (230 ± 73 LDLr0 versus 106 ± 56 PLTP0/LDLr0, $p=0,017$, Tabelle 4.3.2.1). Es ist zu vermuten, dass der geringere Aktivierungsgrad der Peritonealmakrophagen in den PLTP0-Mäusen nach einem Entzündungsreiz auch in den subintimal gelegenen Makrophagen der atherosklerotischen Läsionen zu finden ist und somit einen spezifischen, pro-atherosklerotischen Effekt des Vorhandenseins des PLTP-Gens anzeigt.

4.3.2.3 IL-6-Serumkonzentrationen vor und nach intraperitonealer Injektion von Thioglykolat

Vor Beginn der Thioglykolinjektionen und nach 6-wöchiger Fütterung einer cholesterinreichen Diät war die IL-6-Serumkonzentration in den LDLr0-Mäusen signifikant gegenüber den LDLr0/PLTP0-Mäusen erhöht (103 ± 30 pg/ml LDLr0 versus 60 ± 12 pg/ml PLTP0/LDLr0, $p=0,037$, Tabelle 4.3.2.3). Fünf Tage nach intraperitonealer Thioglykolatgabe war die IL-6-Serumkonzentration in beiden Gruppen hochreguliert, als Ausdruck einer systemischen Antwort auf den peritonealen Entzündungsreiz, jedoch war der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht mehr signifikant (251 ± 51 pg/ml LDLr0 versus 208 ± 47 pg/ml PLTP0/LDLr0, $p=0,077$, Tabelle 4.2.2.3).

Mausspezies	IL-6 (prä) pg/ml	IL-6 (post) pg/ml	Oil-Red-O %	I-A ^b MFI
LDLr0	103±30	251±51	88±7	230±73
LDLr0/PLTP0	60±12*	208±47	48±17*	106±56*

Tabelle 4.3.2.3

Effekt der intraperitonealen Injektion von Thioglykolat unter einer cholesterinreichen Diät im Vergleich bei LDLr0- versus LDLr0/PLTP0-Mäusen

Mittelwerte±Standardabweichung, *p<0.05, prä: Vor intraperitonealer Thioglykolatinjektion, post: 5 Tage nach Thioglykolatinjektion

Zusammenfassend konnte in den durchgeführten Experimenten ein spezifischer pro-inflammatorischer und somit potentiell pro-atherosklerotischer Effekt bei Vorliegen des PLTP-Gens in den verwendeten Mausmodellen gezeigt werden. Dies war erstens in erhöhten Serumkonzentrationen von IL-6 und TNF- α , zweitens durch die vermehrte Aktivierung des auf peripheren Monozyten gemessenen Oberflächenantigens I-A^b, drittens durch den erhöhten Aktivierungsgrad von Peritonealmakrophagen und viertens durch den erhöhten Cholesteringehalt von Peritonealmakrophagen in Wildtyp versus PLTP0-Mäusen nachzuweisen.

4.4 PLTP bei Hämodialysepatienten: Vergleich mit einer gepaarten Kontrollgruppe und prognostische Relevanz

Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben ein stark erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (56). Bei diesen Patienten ist im Gegensatz zur Restbevölkerung ein niedriges Cholesterin mit einem schlechteren Outcome assoziiert, ein Sachverhalt, der bis dato nicht vollständig aufgeklärt werden konnte (56). Auf diesem Hintergrund sollte in erster Linie die Serum-PLTP-Aktivität bei Dialysepatienten im Vergleich zu einer gematchten Kontrollgruppe untersucht werden. Eine Erhöhung könnte einen Teilaspekt des hohen Atheroskleroserisikos dieser Patienten anzeigen. In zweiter Linie sollte die Assoziation erhöhter Serum-PLTP-Aktivitäten mit einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko erfasst werden.

Die Basisdaten der Hämodialysepatienten (HD-Patienten) und der Kontrollpatienten sind in Tabelle 4.4.1 aufgeführt. Das Alter der HD-Patienten war geringgradig höher im Vergleich zu dem der Kontrollpatienten. Die Diagnosen „Diabetes mellitus“, „arterielle Hypertonie“ und „Statineinnahme“ wurden häufiger bei HD-Patienten gestellt. Das CRP zeigte signifikant höhere Werte in der Gruppe der HD-Patienten [6,15mg/l (2,38/13,43) HD-Patienten versus 2,51mg/l (1,49/6,76) Kontrollen, $p<0,001$].

	HD-Patienten (n=68)	Kontrollen (n=68)	p-Wert
Männliches Geschlecht, %	54,4	54,4	1,0
BMI, kg/m ²	25,4±4,5	25,4±4,3	0,679
Alter in Jahren	66,0±15	60,2±8,8	0,012
Diabetes mellitus, %	47,1	1,5	<0,001
Arterielle Hypertonie, %	85,3	33,9	<0,001
Aktive Raucher, %	17,6	11,8	0,468
Statineinnahme, %	22,1	5,9	0,012
CRP‡, mg/dl*	6,15 (2,38/13,43)	2,51 (1,49/6,76)	<0,001
Triglyzeride‡, mg/dl	143,5 (101,2/219)	108 (82,5/162)	0,069
Gesamtcholesterin, mg/dl	154,2±39,2	247,6±45,7	<0,001
LDL-C, mg/dl	82,9±30,5	159,5±40,0	<0,001
HDL-C, mg/dl	46,0±13,6	65,1±19,4	<0,001

Tabelle 4.4.1
Vergleich der Basisdaten von Hämodialysepatienten und gesunden Kontrollpersonen.

Kategoriale Variablen sind als Prozente, kontinuierliche Variablen als Mittelwerte ± Standardabweichung oder bei nicht normaler Verteilung‡ als Mediane (25%/75%-Perzentile) dargestellt. P-Werte wurden mittels gepaartem Student's T-Test oder gepaartem Mann-Whitney-Test errechnet. *CRP wurde bei 31 Patienten und 68 Kontrollpersonen gemessen.

Die Gesamtcholesterin-, LDL-C- und HDL-C-Serumkonzentrationen waren bei den HD-Patienten niedriger, während die Triglyzeridkonzentrationen höher lagen. Dieser Sachverhalt ist nur bedingt durch die vermehrte Statineinnahme (22,1% versus 5,9%) der HD-Patienten zu erklären (siehe Tabelle 4.4.1), sondern eher Ausdruck des gestörten Lipidmetabolismus bei HD-Patienten.

Die vorliegende Untersuchung sollte zunächst mögliche Unterschiede in der gemessenen Serum-PLTP-Aktivität zwischen HD-Patienten und Kontrollpersonen aufzeigen.

Bei Patienten unter Hämodialysetherapie wurde nahezu eine Verdoppelung der Serum-PLTP-Aktivität im Vergleich zu den gematchten Kontrollpersonen festgestellt [Kontrolle: Median 43,0 pmol/μl/h (25%/75%-Perzentile 35,3/51,8 pmol/μl/h) bei HD-Patienten versus 22,4 pmol/μl/h (16,2/29,3 pmol/μl/h) bei Kontrollen; $p < 0,001$].

Zur weiteren Verdeutlichung sind die Differenzen zwischen den Vergleichspaaren in Abbildung 4.3.1 aufgeführt.

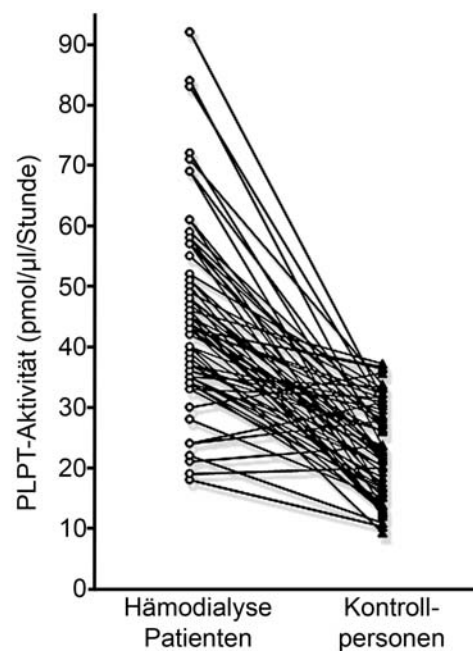


Abbildung 4.4.1
Paarweiser Vergleich der Serum-PLTP-Aktivitäten von Hämodialyse-Patienten und Fall-Kontrollen

Zur Untersuchung der Frage, ob der Zusammenhang von Serum-PLTP-Aktivität und Hämodialyse durch andere Faktoren beeinflusst oder gar bedingt war, prüften wir die Unabhängigkeit von anderen Parametern in einem univariaten und in einem multivariaten Regressionsmodell (inklusive der klassischen Risikofaktoren Geschlecht, Alter, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie). In diesen Modellen war die Serum-PLTP-Aktivität univariate ($p < 0,001$) und multivariat ($p = 0,013$) mit der Variable Hämodialyse assoziiert.

Zur weiteren Evaluation der Bedeutung des PLTP bei HD-Patienten führten wir Korrelationsanalysen durch. Signifikante Korrelationen der PLTP-Aktivität zeigten sich bei HD-Patienten mit HDL-C ($r = 0,333$, $p = 0,014$) und Gesamtcholesterin, ($r = 0,260$, $p = 0,016$). Bei den Kontrollpersonen waren die Triglyzeride signifikant mit der PLTP-Aktivität korreliert ($r = 0,256$, $p = 0,035$, Tabelle 4.4.3).

	PLTP Aktivität‡, pmol/µl/h					
	HD-Patienten		Kontrollen		Gesamtgruppe	
	R	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
Alter in Jahren	-0,049	0,691	-0,061	0,621	0,091	0,292
BMI, kg/m ²	0,184	0,134	-0,006	0,962	0,068	0,433
Triglyzeride‡, mg/dl	0,075	0,546	0,256	0,035	0,202	0,018
Gesamtcholesterin, mg/dl	0,291	0,016	-0,047	0,704	-0,443	<0,001
LDL-C, mg/dl	0,159	0,196	-0,101	0,415	-0,489	<0,001
HDL-C, mg/dl	0,342	0,004	-0,082	0,504	-0,256	0,003
CRP‡, mg/dl*	-0,057	0,644	0,278	0,131	0,369	<0,001

Tabelle 4.4.3

Pearson's Korrelationskoeffizienten bei HD-Patienten und Kontrollen.

‡ Logarithmierte Variablen. *CRP wurde bei 68 Patienten und 31 Kontrollen gemessen.

Unter Berücksichtigung der Daten des Gesamtkollektivs war PLTP mit CRP ($r = 0,369$, $p < 0,001$), HDL-C ($r = -0,256$, $p = 0,003$), LDL-C ($r = -0,489$, $p < 0,001$), Gesamtcholesterin ($r = -0,443$, $p < 0,001$) und Triglyzeriden ($r = 0,202$, $p = 0,018$) signifikant assoziiert.

Letztendlich entscheidend für die Identifizierung eines Risikofaktors bei atherosklerotischen Erkrankungen ist seine Assoziation zum ereignisfreien Überleben. Um die prognostische Wertigkeit des PLTP zu untersuchen, führten wir

eine Kaplan-Meier-Analyse mit am Median (43,0 pmol/μl/h) kategorisiertem PLTP durch. In dieser Analyse war die Wahrscheinlichkeit für das Überleben bei HD-Patienten mit am Median kategorisierten PLTP-Aktivitäten nicht korreliert ($p=0,853$, Abbildung 4.4.2).

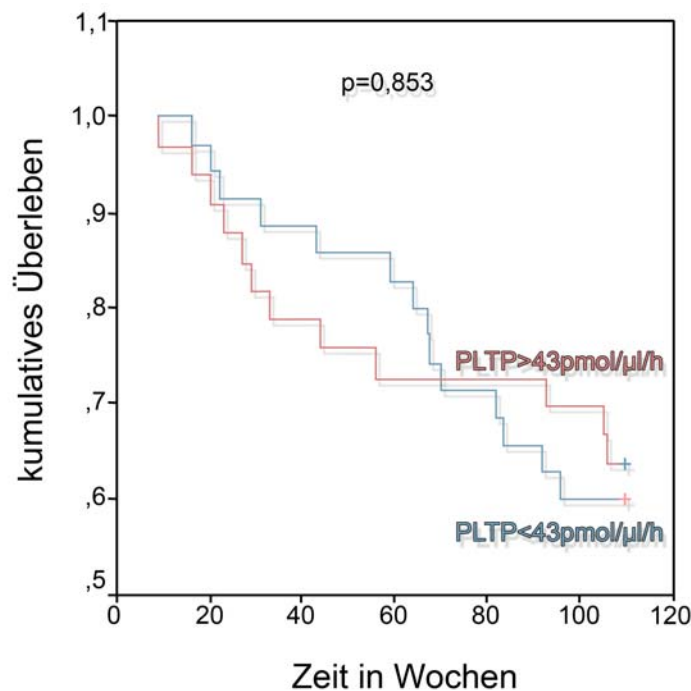


Abbildung 4.4.2

Kaplan Meier-Kurve für das Überleben terminal niereninsuffizienter Patienten in Abhängigkeit von der Serum-PLTP-Aktivität, kategorisiert am Median (43,0 pmol/μl/h).

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass PLTP sowohl pro-atherogene als auch anti-atherogene Eigenschaften besitzt. Welche dieser Eigenschaften überwiegt und welche Regulationsmechanismen als Gegenspieler fungieren, scheint von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren (Inflammationsreaktion, Grunderkrankung, HDL-Konzentration und -Zusammensetzung, Aktivität anderer Enzyme wie z.B. CETP, etc.) mitbestimmt zu werden.

Zur weiteren Evaluation dieser Fragestellung wurden die Daten der Hämodialysepatienten geprüft. Bei Betrachtung dieser Patientengruppe zeigte sich eine signifikante Korrelation zum HDL-Cholesterin ($r=0,342$, $p=0,004$) aber nicht zu der Variablen CRP ($r= -0,057$, $p=0,644$, Tabelle 4.4.3).

Zu der Fragestellung der prospektiven Wertigkeit von CRP und HDL-C konnten wir in einer weiteren Analyse zeigen, dass das am Median kategorisierte CRP (6,15 mg/dl) mit dem Überleben der Patienten korrelierte. Patienten mit einem CRP unter dem Median hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Überleben ($p=0,047$, Abbildung 4.4.3).

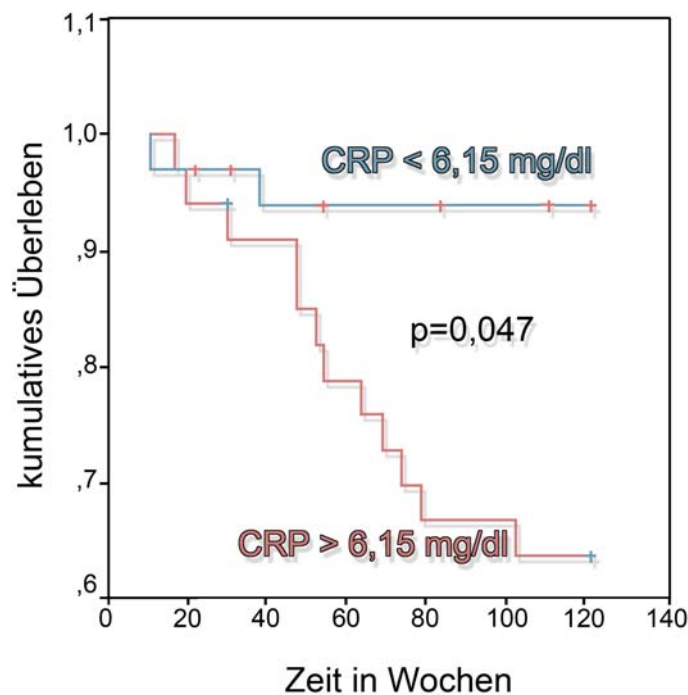


Abbildung 4.4.3 Kaplan Meier-Kurve für das Überleben terminal niereninsuffizienter Patienten in Abhängigkeit von der CRP-Konzentration, kategorisiert am Median (6,15mg/dl).

Dies wurde in einer univariaten (95%CI 0,034-0,687, $p=0,014$) und multivariaten (95%CI 0,030-0,668, $p=0,014$ unter Einbeziehung der klassischen Risikofaktoren arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Geschlecht und Alter) Cox-Regressions- Analyse bestätigt (Daten nicht tabellarisch dargestellt). Die Entzündungsreaktion ist somit in der von uns untersuchten Kohorte für die Prognose der Hämodialyse-Patienten entscheidend.

Im Gegensatz hierzu war das HDL-Cholesterin, ebenfalls stratifiziert am Median (42,5mg/dl), nicht mit dem Überleben der Patienten assoziiert ($p=0,071$, Abbildung 4.4.4).

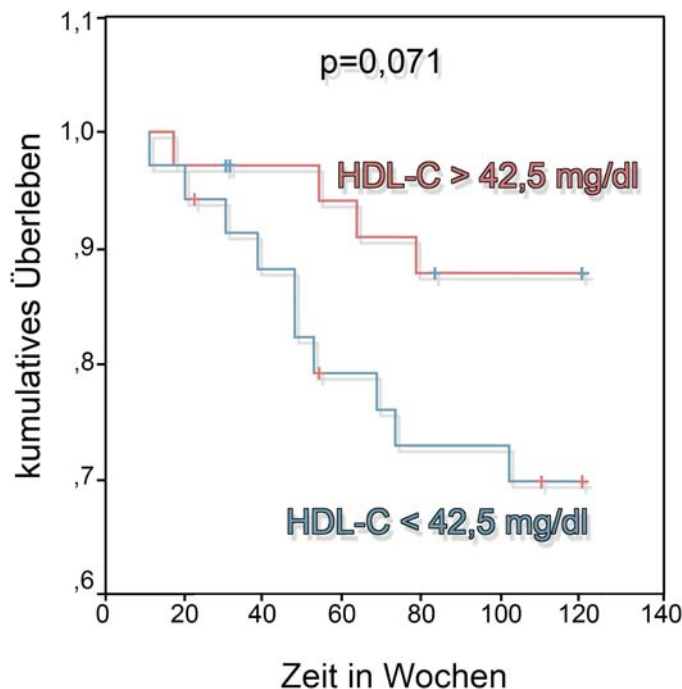


Abbildung 4.4.4 Kaplan Meier-Kurve für das Überleben terminal niereninsuffizienter Patienten in Abhängigkeit von der HDL-Cholesterin-Konzentration, kategorisiert am Median (42,5mg/dl).

Zusammenfassend konnte in dieser Studie erstmalig gezeigt werden, dass eine erhöhte PLTP-Aktivität einen weiteren Aspekt der urämischen Dyslipidämie darstellt. Die Serum-PLTP-Aktivität war mit dem in unserer Untersuchung prognostisch irrelevanten HDL-Cholesterin, aber nicht mit dem für den Progress der Atherosklerose maßgeblichen und prognostisch relevanten Entzündungsprozess, und somit nicht mit dem ereignisfreien Überleben der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz assoziiert. Daraus ist zu schlussfolgern, dass PLTP einen Risikomarker aber keinen Risikofaktor für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz darstellt. Dies könnte mit seiner in diesem Patientenkollektiv fehlenden proinflammatorischen Wirkung zu erklären sein.

5. Diskussion

Die im Plasma gemessenen Lipoproteine bestehen aus einer heterogenen Gruppe von Makromolekülen, deren Rolle im Krankheitsbild der Atherosklerose in den letzten Jahrzehnten mehr und mehr aufgeklärt worden ist. Der Metabolismus der pro-atherogenen, ApoB-assoziierten Lipoproteine, insbesondere des LDL, war hierbei im Rahmen der zahlreichen Statinstudien im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Erst in den letzten Jahren fokussieren sich die Studien vermehrt auf das als anti-atherogen bezeichnete HDL. Obwohl bisher nicht alle Mechanismen der atheroprotektiven Rolle des HDL vollständig aufgeklärt sind, scheint der so genannte "reverse Cholesterintransport (RCT)", der den Prozess des Cholesterintransportes von peripheren Zellen - insbesondere von Makrophagen - zur Leber beinhaltet, einer der maßgeblichen, anti-atherosklerotischen Effekte des HDL zu sein (53).

Bei Standardbestimmungen wird HDL als HDL-Cholesterin bestimmt. Wie die anderen Lipoproteine besteht das im Plasma oder Serum gemessene HDL jedoch aus verschiedenen Subtypen, deren Größe, Wanderung im elektrischen Feld und Zusammensetzung, insbesondere der Anteil der auf inflammatorische oder oxidative Vorgänge wirksamen Bestandteile wie ApoA-I, Paraoxonase, Serum-Amyloid-A (SAA), etc., unterschiedlich ist. Die Bestimmung des HDL-C kann nur das an HDL-Partikel gebundene Cholesterin messen, jedoch keine Aussage über andere Bestandteile der HDL-Partikel treffen.

Das Plasma-Enzym PLTP beeinflusst maßgeblich über seine Phospholipid-Transferaktivität und seine Rolle in der so genannten HDL-Konversion die Zusammensetzung und Größe der HDL-Partikel und somit deren Wirkung auf die Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen (57). Weiterhin hat PLTP Einfluss auf andere, in den Lipoproteinmetabolismus involvierte Faktoren. PLTP ist in den HDL-vermittelten, zellulären Efflux von Phospholipiden und Cholesterin involviert. Hierbei steht seine Wirkung auf die so genannten präß-HDL-Partikel im Vordergrund. PLTP vermittelt weiterhin den Transfer von Phospholipiden, α -Tocopherol und freiem Cholesterin von triglyzeridreichen Lipoproteinen zu HDL über den Prozess der Lipolyse.

Abbildung 5.1 fasst schematisch die wichtigsten Faktoren zusammen, auf die PLTP unter physiologischen, aber auch pathophysiologischen Bedingungen Einfluss nimmt.

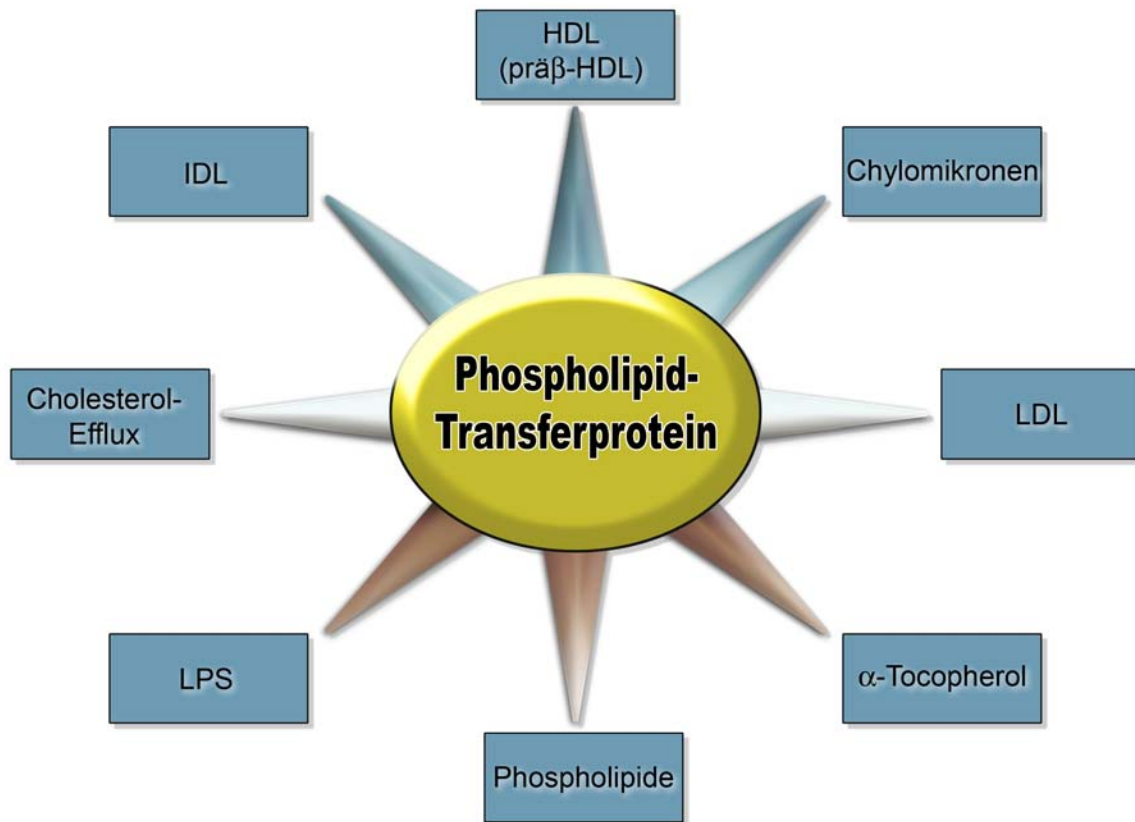


Abbildung 5.1
Schematische Darstellung der wichtigsten Ansatzpunkte für die Wirkung von aktivem Phospholipid-Transferprotein

PLTP ist in den HDL-Metabolismus involviert, indem es unter anderem die Größe und Zusammensetzung dieser Partikel sowie den zellvermittelten Efflux von Cholesterin bestimmt. Weiterhin hat PLTP einen Einfluss auf den Metabolismus der Chylomikronen, sowie der Lipoproteine LDL und IDL. PLTP vermindert den Gehalt des membranassoziierten α -Tocopherol und kann LPS neutralisieren.

LDL: Low density lipoprotein; IDL: Intermediate density lipoprotein; HDL: High density lipoprotein; LPS: Lipopolysaccharid.

PLTP ist somit ein multifaktoriell wirkendes Enzym, welches auch über andere Mechanismen, als den seiner Wirkung auf den Lipoproteinmetabolismus, in den Prozess der Atherosklerose involviert ist.

5.1 Phospholipid-Transferprotein und seine Rolle im Krankheitsbild der Atherosklerose: pro- oder anti-atherosklerotische Effekte?

Die Rolle des Phospholipid-Transferproteins in der Atherogenese war Gegenstand und Diskussion zahlreicher Studien der letzten Jahre. Hierbei war bis dato kein abschliessender Konsens über die Rolle des PLTP im Hinblick auf eine pro- oder eine anti-atherosklerotische Wirkung gefunden worden. Im Folgenden soll versucht werden, die wesentlichen Teilaspekte der Pathophysiologie des PLTP-Metabolismus im Krankheitsbild der Atherosklerose auf dem Hintergrund der gezeigten Ergebnisse zu diskutieren.

5.1.1 Tierexperimentelle Untersuchungen sprechen für eine pro-atherogene PLTP-Wirkung

Die Funktion des PLTP im Krankheitsbild der Atherosklerose war in zahlreichen *in-vivo* Studien der letzten Jahre untersucht worden. Hierbei spielten Mausmodelle eine entscheidende Rolle. Jiang et al. konnten 2001 zeigen, dass es bei PLTP0-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen auf dem Hintergrund von Mausmodellen für Atherosklerose (ApoB-transgene (ApoBtg)- und LDL-Rezeptor-knock-out (LDLr0)-Mäuse) zu einer Reduktion atherosklerotischer Läsionen in der Aorta kommt. Als potentieller Mechanismus zeigte sich eine reduzierte hepatische Produktion und Serumkonzentration von ApoB-haltigen Lipoproteinen in PLTP0-Mäusen. Dieser Effekt konnte *in-vitro* durch Infektion der Hepatozyten von PLTP0-Mäusen mit Adenoviren, die das PLTP-Gen trugen, korrigiert werden (47).

Experimente mit PLTP-transgenen (PLTPtg) Mäusen zeigten in Übereinstimmung mit den Untersuchungen mit PLTP0-Mäusen, dass die Überexpression des PLTP-Gens zu einer vermehrten Bildung atherosklerotischer Läsionen führt. Dies war, als potentiell involvierter Mechanismus, mit einem Anstieg von Phospholipiden und Cholesterin in HDL-Molekülen assoziiert (58). Andere pro-atherogene Eigenschaften des PLTP lassen sich aus den Befunden bei PLTP0-Mausmodellen ableiten: in diesen Mäusen finden sich eine verminderte Vitamin-E-Konzentration in atherogenen Lipoproteinen, eine vermehrte Oxidierbarkeit von Lipoproteinen und eine höhere Konzentration von Autoantikörpern gegen ox-LDL (47, 59).

Ein wesentlicher Kritikpunkt der gezeigten Ergebnisse war, dass Mäuse kein CETP bilden und die Übertragung der Ergebnisse von PLTP-modifizierten Mäusen auf den

Menschen fragwürdig erschien, da CETP und PLTP überlappende Funktionen im humanen Lipoproteinmetabolismus besitzen. Zur weiteren Evaluation wurden deshalb komplexe Mausmodelle entwickelt, die sowohl humanes PLTP (PLTPtg) als auch humanes CETP (CETPtg) überexprimierten. Zum Vergleich der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen wurden diese Tiere mit heterozygoten LDLr0-Mäusen gekreuzt. Nach Gabe einer cholesterinreichen (Western-)Diät, unter der LDLr0-Mäuse atherosklerotische Läsionen entwickeln, zeigte sich eine vermehrte Bildung aortaler atherosklerotischer Läsionen in den PLTPtg/CETPtg/LDLr0-Mäusen im Vergleich zu den CETPtg/LDLr0-Mäusen bei verminderter Bildung von HDL-C, aber auch von VLDL-C und LDL-C. Als involvierte Mechanismen waren die Aktivitäten der HDL-assoziierten und anti-atherogenen Proteine Paraoxonase und Platelet-activating-factor-Acetylhydrolase (PAF-AH) in den das PLTP-Gen tragenden Mäusen reduziert (60). Somit ist PLTP auch bei Vorliegen von CETP in Mausmodellen ein pro-atherogener Faktor.

5.1.2 Humane Studien: PLTP ist ein Risikomarker, aber kein Risikofaktor

Die bis dato vorliegenden humanen Studien zur Rolle des PLTP in atherosklerotischen Krankheitsbildern waren jedoch nur mit kleinen Gruppen durchgeführt worden und hatten zum Teil widersprüchliche Ergebnisse gezeigt (50-52, 54).

O'Brien et al. konnten PLTP in humanen Atheromen detektieren. Diese in Plaques vorliegende Form des PLTP beeinflusste den Lipoprotein-Metabolismus auch in der atherosklerotischen Läsion (61). Hierbei wurde das in der Plaque nachweisbare PLTP von Plaque-Makrophagen und Schaumzellen gebildet, eine Hypothese, welche eine Untersuchung von Desrumaux und Mitarbeitern bestätigte (62). Diese Daten unterstreichen die Hypothese der bivalenten Funktionen des PLTP im Krankheitsbild der Atherosklerose.

Weiterhin hat PLTP auch eindeutig anti-atherosklerotische Eigenschaften. Im Prozess des reversen Cholesterintransportes (RCT) ist insbesondere eine HDL-Subpopulation, das prä β -HDL, involviert. Diese HDL-Partikel nehmen Cholesterin im Prozess des so genannten Cholesterin-Efflux an Plasma-Zellmembranen peripherer Zellen auf (63). Eine Wirkung des PLTP - ein potentiell anti-atherosklerotischer Effekt - ist die Bildung eben dieser prä β -HDL-Partikel im Prozess der HDL-Konversion (64).

In einer großen epidemiologischen Studie war die Rolle des PLTP bei Patienten mit manifester Atherosklerose und gesunden Kontrollpersonen bis dato nicht untersucht worden, unter anderem auf Grund der aufwendigen Detektionsmethoden für PLTP. Eine solche Untersuchung könnte aber die klinische Relevanz des mit pro- und anti-atherogenen Eigenschaften ausgestatteten PLTP aufklären helfen.

Aus diesem Grund war die unter 3.1. und 4.1 beschriebene Studie durchgeführt worden. Um in dieser großen Patientenzahl PLTP messen zu können, wurde ein PLTP-Aktivitätstest verwendet, der in Abschnitt 3.1.2 beschrieben ist. Mit diesem Test war es effizient und zuverlässig möglich, PLTP-Aktivitäten bei 1.102 Patienten mit manifester koronarer Herzerkrankung und 444 gesunden Kontrollpersonen zu bestimmen.

In dieser Studie war die PLTP-Aktivität bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener KHK signifikant gegenüber gesunden Kontrollpersonen erhöht. Dieser Zusammenhang von koronarer Herzerkrankung und erhöhten PLTP-Aktivitäten bestand unabhängig von anderen Risikofaktoren, was multivariate Analysen zeigten. Individuen mit PLTP-Aktivitäten im höchsten Quintil hatten ein ca. 2-fach erhöhtes Risiko für das Vorliegen einer KHK im Vergleich zu den Patienten im niedrigsten Quintil, nahezu unbeeinflusst von der Adjustierung für Risikofaktoren im verwendeten Modell (siehe Tabelle 4.1.5).

Die vorliegenden Daten konnten somit eine Korrelation des PLTP zum Krankheitsbild der humanen Atherosklerose, zumindest der koronaren Atherosklerose, aufzeigen.

Die Frage der Kausalität des Zusammenhangs zwischen KHK und erhöhter Plasma-PLTP-Aktivität war durch die aufgezeigte Korrelation jedoch nicht geklärt. Der Einfluss vorliegender Risikofaktoren könnte eine mögliche Erklärung für die gefundene Erhöhung des PLTP bei Patienten mit manifester Atherosklerose in unserer Studie sein: Statine beeinflussten die PLTP-Aktivität in unserer Studie nicht, ein Zusammenhang, der zuvor auch in anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte (54, 65).

Diabetes mellitus hätte ein weitere Faktor sein können, welcher die erhöhten PLTP-Aktivitäten bei Patienten hätte erklären können, da signifikant mehr Patienten als Kontrollpersonen Diabetiker waren und dieser Zusammenhang in mehreren Studien beschrieben worden war (50-52, 66). In der von uns untersuchten Population unterschied sich die PLTP-Aktivität jedoch nicht bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern. Weiterhin hatte in den multivariaten Analysen die Variable

"Diabetes mellitus" (wie auch die Variable "BMI") keinen Einfluss auf den Zusammenhang von KHK und erhöhten PLTP-Aktivitäten (Tabelle 4.1.5).

Andere als die bisher genannten Zusammenhänge müssen somit die Assoziation der PLTP-Aktivität zur Atherosklerose in der vorliegenden Studie erklären. Der Einfluss auf den Lipoproteinmetabolismus scheint hierbei die wahrscheinlichste Erklärung für eine pro-atherogene Rolle des PLTP zu liefern.

5.1.3 Phospholipid-Transferprotein und HDL

Humanes Plasma-PLTP hat multiple Wirkungen auf den HDL-Metabolismus. PLTP konvertiert *in-vitro* HDL₃-Partikel in größere Partikel unter Freisetzung von Lipid-armem ApoA-I (67, 68) (siehe Abbildung 1.3.1.). Weiterhin vermittelt PLTP die Konversion von HDL₂-Partikeln, ebenfalls unter Freisetzung von Lipid-armem ApoA-I (69). Der durch PLTP vermittelte Prozess der HDL-Konversion wird von mindestens drei Faktoren reguliert: der HDL-Zusammensetzung bzgl. des Verhältnisses von Apolipoproteingehalt zu Proteingehalt, dem Lipidkerngehalt der HDL-Partikel, sowie dem Aktivitätsgrad des PLTP (70). Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen den beiden Hauptwirkungen des PLTP: der effiziente Phospholipid-Transfer scheint eine Voraussetzung für eine effiziente HDL-Konversion durch PLTP zu sein (70).

Im Gegensatz zu Mausmodellen, bei denen die PLTP-Aktivität stark erhöht ist, führte ein moderater Anstieg der PLTP-Aktivität in transgenen Mäusen für humanes ApoA-I nur zu einem leichten Anstieg von ApoA-I und prä β -HDL. Dieses prä β -HDL ist zudem sehr ApoA-I-reich (71). Dieser nur mäßige Anstieg von ApoA-I und prä β -HDL bezüglich der Wirkung des PLTP auf den HDL-Stoffwechsel in Abhängigkeit von seinem Aktivierungsgrad könnte die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der Assoziation von PLTP-Aktivität und HDL-C-Konzentration in Maus- und humanen Studien erklären (40-41, 51, 72-73). Der Aktivierungsgrad bestimmt die Einflussnahme des PLTP auf das HDL-Cholesterin, dieser Aktivierungsgrad kann in unterschiedlichen Populationen quantitativ unterschiedlich ausgeprägt zu sein.

Zusammenfassend scheint das Gleichgewicht der Faktoren PLTP-Aktivität und HDL-Konzentration einem empfindlichen Regulationsmechanismus zu unterliegen, und die Wirkung des PLTP auf die HDL-Partikel ist eher ein anti- als ein pro-atherosklerotischer Aspekt.

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie war nur bei den Kontrollpersonen ($r=-0,14$), nicht aber bei den KHK-Patienten ($r=0,04$), eine geringe negative Korrelation der

PLTP-Aktivität mit HDL-C, zu dokumentieren. Demzufolge kann die Wirkung des PLTP auf HDL keinesfalls seine vermutete Pro-Atherogenität in unserer Studie erklären. Kritisch anzumerken ist, dass die Regulation des HDL-Metabolismus ein Resultat des Zusammenspiels verschiedener zellulärer und plasmatischer Faktoren ist. Hierzu zählen Zellrezeptoren wie der Typ 1 Scavenger Rezeptor (SR-BI), der ATP-binding cassette Rezeptor (ABC-1), Plasmaproteine wie CETP und LCAT, aber auch die endothelial gebundenen Lipasen (LPL und HL) (53). Diese Faktoren wurden nicht untersucht, so dass deren Einflussnahme auf die Verbindung von Serum-PLTP-Aktivität und HDL-C in den beiden unterschiedlichen Populationen (KHK-Patienten und Kontrollpersonen) unklar bleibt.

5.1.4 Phospholipid-Transferprotein und ApoB-haltige Lipoproteine

In Mausmodellen war bei PLTP0- im Vergleich zu WT-Mäusen eine verminderte Serumkonzentration und Produktion ApoB-haltiger Lipoproteine beschrieben worden (47). Weiterhin zeigten Murdoch et al. bei prämenopausalen Frauen eine Assoziation der PLTP-Aktivität mit LDL-C ($r=0.53$) und ApoB ($r=0.44$) (51).

In unserer Studie war dagegen keine Korrelation von PLTP-Aktivität und ApoB bzw. LDL-C in Patienten und Kontrollen zu dokumentieren (siehe Tabelle 4.1.2). Auch bei den Vergleichen in den Subgruppen Männer und Frauen mit oder ohne KHK zeigte sich in keiner Subgruppe eine relevante Korrelation der PLTP-Aktivität mit LDL oder ApoB (alle r -Werte $<0,12$, Daten nicht tabellarisch präsentiert), bei allerdings eingeschränkter Beurteilbarkeit auf Grund der geringeren Fallzahl. Somit scheint die Assoziation zu den pro-atherogenen, ApoB-haltigen Lipoproteinen keine Erklärung für die Assoziation der PLTP-Aktivität zur KHK zu geben. Die Widersprüchlichkeit zu den vorherigen Studien könnte durch die unterschiedlichen Detektionsmethoden erklärt werden. In den Publikationen von Murdoch und Mitarbeitern wurde die PLTP-Aktivität durch die Übertragung von markiertem Phosphatidylcholin auf HDL₃ gemessen. Weiterhin waren die Anzahl der untersuchten Patienten deutlich niedriger im Vergleich zu der von uns untersuchten Patientengruppe (51).

5.1.5 Phospholipid-Transferprotein und triglyzeridhaltige Lipoproteine

Als weiterer, potentiell in das Krankheitsbild der Atherosklerose involvierter Mechanismus, war eine Assoziation des PLTP zu den postprandial erhöhten, triglyzeridreichen Lipoproteinen in Mausmodellen gezeigt worden (47).

In der vorliegenden Studie bestand jedoch nur eine schwache, wenn auch signifikante Korrelation von PLTP-Aktivität und Triglyzeriden, allerdings nur bei Kontrollen ($r=0,16$), nicht aber bei Patienten ($r=0,02$). Eine Limitation bzgl. dieser Fragestellung in unserer Studie war, dass wir ausschließlich Nüchternwerte bestimmt hatten, welche nur eine eingeschränkte Aussage über die postprandial erhöhten Lipoproteine erlauben.

Somit konnten wir aus den Daten dieser Studie, welche eine Assoziation der PLTP-Aktivität zur koronaren Atherosklerose zeigte, keine eindeutigen Aussagen über den potentiellen Zusammenhang von PLTP und postprandial erhöhten, triglyzeridhaltigen Lipoproteinen treffen.

Aus diesem Grund führten wir in einem weiteren Ansatz eine Analyse mit gesunden Probanden durch, bei denen wir Nüchternwerte sowie, nach Einnahme einer definierten, fettreichen Mahlzeit (1.265 kcal/m^2 Körperoberfläche), postprandiale Werte der PLTP-Aktivität und anderer Lipoproteine (Gesamtcholesterin, HDL-C, LDL-C, Triglyzeride) nach 3, 5, 7 und 10 Stunden bestimmten. Das Ziel dieser Untersuchung war eine mögliche Assoziation des PLTP zu triglyzeridreichen, postprandial erhöhten Lipoproteinen zu zeigen.

In dieser Studie wurden die Serumkonzentrationen von Gesamtcholesterin, HDL-C und LDL-C nicht durch die fettreiche Mahlzeit über den Zeitverlauf der Blutentnahmen nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu kam es zu einem signifikanten Anstieg der Triglyzeride nach der fettreichen Mahlzeit (siehe Tabelle 4.3.2). Die PLTP-Aktivität stieg nicht signifikant bis 7 Stunden an, um nach 10 Stunden wieder abzufallen.

Diese Ergebnisse widersprechen zum Teil denen einer Arbeit von Mero und Mitarbeitern 1998 (74). Diese konnten bei Rauchern, aber nicht bei Nicht-Rauchern einen signifikanten Abfall der PLTP-Aktivität nach einer fettreichen Mahlzeit zeigen. Im Vergleich der Gruppen Raucher versus Nichtraucher in der von uns untersuchten Population zeigte sich jedoch kein Unterschied, in beiden Gruppen kam es tendenziell zu einem postprandialen Anstieg der PLTP-Aktivität (Daten nicht präsentiert).

Um die Hypothese zu evaluieren, dass die PLTP-Aktivität ein Marker für die postprandial erhöhten Lipide ist, führten wir Korrelationsanalysen durch. PLTP-Nüchternwerte und postprandiale Triglyzeride waren signifikant korreliert ($r=0,317$).

Somit zeigten wir mit den vorliegenden Daten eine Assoziation der nüchtern gemessenen PLTP-Aktivität mit der Erhöhung postprandialer, triglyzeridreicher Lipoproteine beim Menschen auf, welche zuvor in Mausmodellen beschrieben worden war und einen pro-atherosklerotischen Aspekt des PLTP darstellen könnte (47).

5.2 Das Phospholipid-Transferprotein hat proinflammatorische Eigenschaften

Ein weiterer entscheidender Mechanismus der pro-atherogenen Wirkung des PLTP könnte seine Wirkung auf oxidative und inflammatorische Vorgänge darstellen, welche wir allerdings mit den zuvor diskutierten Studien nicht untersuchen konnten. Auf diesem Hintergrund prüften wir zunächst, ob PLTP in einem Mausmodell proinflammatorische Eigenschaften besitzt.

Makrophagen monozytären Ursprungs sind als Schaumzellen die dominante Zellpopulation sowohl in menschlichen atherosklerotischen Plaques als auch in den Plaques atherosklerotischer Mausmodelle wie LDLr0- und Apolipoprotein E-knock out (ApoE0)-Mäusen (75). IL-6 reguliert die leukozytäre Produktion von Zytokinen wie TNF- α und IL-1. Diese Zytokine induzieren die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selektin (76). Die endotheliale Expression dieser Adhäsionsmoleküle wird als einer der ersten und zentralen Schritte in der Entstehung und Entwicklung einer atherosklerotischen Plaque angesehen, da dieser Vorgang die Adhäsion von Monozyten und anderen Leukozyten an das aktivierte Endothel und deren Transmigration in den subintimalen Raum induzieren kann, in dem die Zellen sich zu Schaumzellen nach Aufnahmen von LDL/ox-LDL entwickeln können (77).

Auf diesem pathophysiologischen Hintergrund der Inflammationskaskade im Krankheitsbild der Atherosklerose untersuchten wir, ob die von uns gezeigte Assoziation des PLTP mit dem Krankheitsbild der Atherosklerose durch eine mögliche proinflammatorische Wirkung miterklärt werden kann. Als Modell wurde die Wirkung der intraperitonealen Gabe von IL-6 als Induktor einer systemischen Inflammationsreaktion im Vergleich zu mit steriler Kochsalzlösung behandelten PLTP0- und WT-Mäusen verwendet. Dieses experimentelle Design wurde gewählt, da es Aspekte der Inflammationsreaktion im Krankheitsbild der Atherosklerose simulierte und die systemische (Serumzytokine, Monozytenaktivierung) und lokale (Peritonealmakrophagenaktivierung) Inflammationsreaktion hierdurch im Vergleich der Gruppen messbar war. Weiterhin konnten durch die Cholesterinbeladung der Peritonealmakrophagen Rückschlüsse auf die Cholesterinlast der aortalen Makrophagen gezogen werden.

In den von uns untersuchten Mausmodellen hatten PLTP0-Mäuse signifikant niedrigere Basalwerte für IL-6. Durch die kontinuierliche intraperitoneale Gabe von 5.000 IU rekombinatem Maus-IL-6 wurde eine Inflamationsreaktion induziert. Nach vier und nach sechs Wochen Behandlung waren die Serumkonzentrationen des Zytokins TNF- α und der monozytäre Aktivationsmarkers I-A^b in WT-, aber nicht in PLTP0-Mäusen signifikant in der Gruppe der mit IL-6 behandelten Tiere gegenüber den mit Kochsalz behandelten Tieren erhöht (Abbildungen 4.3.1.1 und 4.3.3.2).

In einem zweiten Ansatz verglichen wir LDLr0- mit PLTP0/LDLr0-Mäusen unter einer cholesterinreichen Diät. Die IL-6-Serumkonzentrationen waren vor Beginn der Fütterung einer cholesterinreichen Diät signifikant, nach Injektion einer Thioglykolatlösung - einem Inflamationsstimulus - nicht signifikant in den LDLr0- im Vergleich zu PLTP0/LDLr0-Mäusen erhöht.

Der Anteil der Oil-Red-O gefärbten und somit cholesterinbeladenen Peritonealmakrophagen war in der Gruppe der PLTP0/LDLr0- im Vergleich zu LDLr0-Mäusen signifikant erniedrigt. Diese verminderte peritoneale Schaumzellbildung bestätigt vorgehende Untersuchungen mit atherosklerotischen Mausmodellen, die als Marker der Atherosklerose eine verminderte aortale Schaumzellbildung in PLTP0-Mäusen nachweisen konnten (47). In unseren Experimenten konnten wir jedoch weiterhin zeigen, dass der Aktivierungszustand der Peritonealmakrophagen, der durch die mittels FACS gemessene mittlere Fluoreszenzintensität des MHC-Klasse II-Moleküls I-A^b verglichen wurde, im Vergleich von PLTP0/LDLr0- zu LDLr0-Mäusen signifikant niedriger war. Dies unterstreicht die Hypothese einer pro-inflammatorischen Wirkung des PLTP nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in Geweben (61).

Auf dem Hintergrund der Ergebnisse unserer Studie könnte ein potentieller pro-inflammatorischer und damit pro-atherosklerotischer Effekt des PLTP eine gesteigerte IL-6-Produktion durch Makrophagen und Monozyten sein, wie aus der von uns gezeigten, verminderten basalen IL-6-Produktion bei PLTP0-Mäusen geschlossen werden kann.

Als Marker des Monozyten- und Makrophagen-Aktivitätszustandes verwendeten wir I-A^b, ein MHC-Klasse II-Molekül, welches auf Mausleukozyten exprimiert wird. Deren Rolle im Krankheitsbild der Atherosklerose ist gut untersucht: MHC-Klasse II

Moleküle sind essentiell in die Antigenpräsentation involviert, ihre Expression wird durch Zytokine reguliert, und sie sind in den Atheroskleroseprozess involviert (78).

Ein anderer, von uns verwendeter, monozytärer Marker war CD11b. Das Adhäsionsmolekül CD11b ist ein Mitglied der Integrin-Familie und in die Bindung von Leukozyten an aktiviertes, seinen Rezeptor ICAM-1 exprimierendes Endothel involviert. In humanen Studien scheint CD11b zum Krankheitsbild der Atherosklerose assoziiert zu sein (79). Im Gegensatz dazu ist es in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in Mausmodellen von untergeordneter Rolle. In einer Studie mit einem rein gewebespezifischen Gen-knock-out-Maus-Modell für CD11b mittels Knochenmarkstransplantation zeigte das Fehlen des CD11b-Gens keinen Einfluss auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in LDLr0 Mäusen (80). Die fehlende Regulation des CD11b auf peripheren Leukozyten in allen Subgruppen in unserer Studie, insbesondere in den mit IL-6 behandelten Mäusen, unterstützt die Hypothese, dass CD11b eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei atherogenen Mausmodellen spielt.

Zusammenfassend konnten wir in unseren Experimenten eine proinflammatorische Wirkung des PLTP als weitere potentielle Ursache seiner Pro-Atherogenität zeigen.

Nach Publikation unserer Experimente konnten diese Ergebnisse in einer *in-vivo* Untersuchung bestätigt und potentielle Mechanismen für die pro-inflammatorische Wirkung des PLTP aufgezeigt werden (81): In den von Yan et al. durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss des HDL auf die LDL-induzierte, monozytäre chemotaktische Aktivität in Kokulturen untersucht. Hierbei wurde HDL von LDLr0/PLTP0 und ApoBtg/PLTP0 im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen mit Vorliegen des PLTP-Gens verwendet (LDLr0 und ApoBtg). Die Autoren konnten zeigen, dass HDL von PLTP0-Mäusen proteinreicher und ärmer an Phospholipiden war. Die Fähigkeit des HDL zur Übertragung von Proteinen und Cholesterylethern war 4-fach erhöht bei den PLTP0-Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen, und die Induktion monozytärer, chemotaktischer Aktivität war in den Experimenten mit Kokulturen durch HDL der PLTP0-Mäuse signifikant gegenüber den Kontrollmäusen reduziert. Weiterhin war das LDL der PLTP0-Mäuse widerstandsfähiger gegen Oxidation und induzierte signifikant weniger monozytäre chemotaktische Aktivität. Das HDL der PLTP0-Mäuse konnte in einem weiteren Ansatz signifikant mehr oxidierte Phospholipide aus LDL mobilisieren. Das Fehlen des PLTP-Gens bei Mäusen verstärkte somit die anti-inflammatorischen

Eigenschaften des HDL und reduzierte die Fähigkeit des LDL zur Induktion monozytärer, chemotaktischer Aktivität in Mausmodellen (81).

Die in den eigenen vorgestellten Experimenten und Studien gezeigten, proinflammatorischen Effekte des PLTP sind in Abbildung 5.1 schematisch präsentiert:

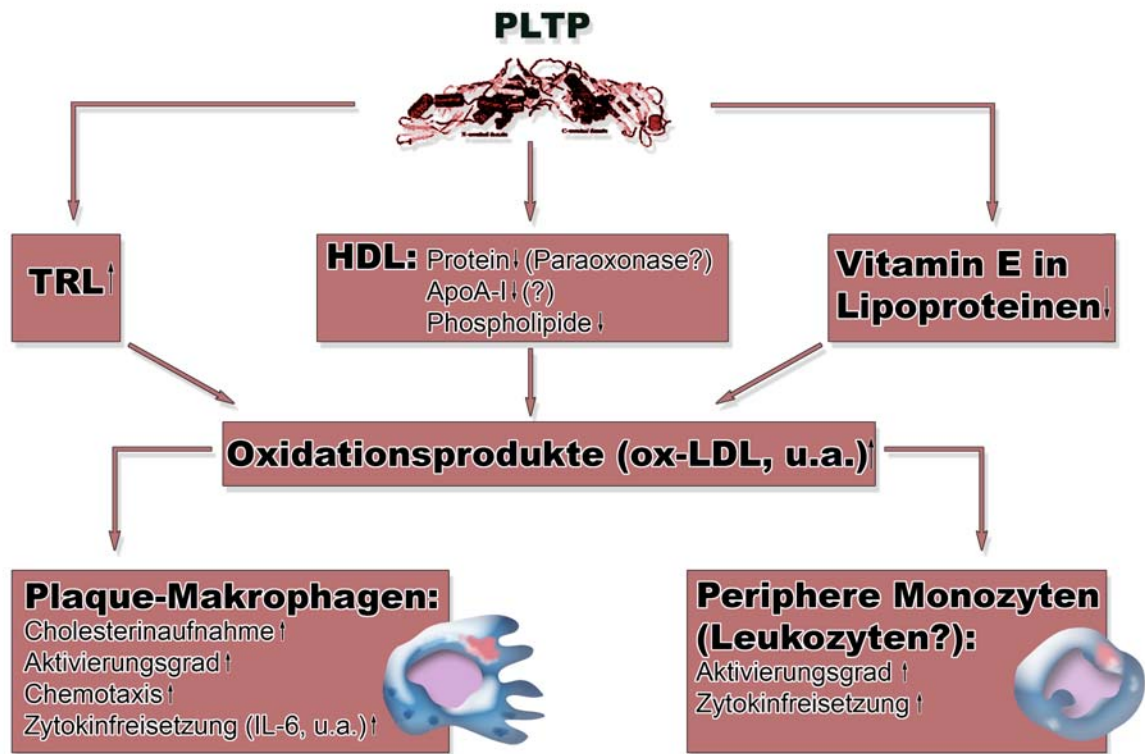


Abbildung 5.2.1 Mechanismen für die proinflammatorische Wirkung des PLTP

PLTP ist mit einem Anstieg von triglyzeridreichen Lipoproteinen (TRL) und mit einem verminderten Gehalt von Vitamin E in atherogenen Lipoproteinen assoziiert. Ein Anstieg der PLTP-Aktivität führt zur Verminderung anti-inflammatorischer und anti-oxidativer Komponenten (Paraoxonase, ApoA-I, etc.) in HDL-Partikeln. Durch diese Effekte kommt es zur vermehrten Bildung von Oxidationsprodukten wie z.B. ox-LDL. Dies führt zur Aktivierung von peripheren Monozyten (eventuell auch anderen Leukozytenpopulationen) und (Plaque-)Makrophagen, die unter anderem vermehrt Zytokine freisetzen und somit die chronische Inflammation beim Krankheitsprozess der Atherosklerose verstärken können.

Wie in Abbildung 5.1 dargestellt, führt eine erhöhte PLTP-Aktivität zur Erhöhung von triglyzeridreichen Lipoproteinen, zur Verminderung von anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Bestandteilen des HDL, sowie zur Verminderung des Vitamin-E-Gehaltes der Plasmalipoproteine. Durch diese Effekte kommt es unter anderem zur vermehrten Bildung von ROS wie ox-LDL, welches zur Aktivierung von Monozyten

und eventuell auch anderen Leukozyten im peripheren Blut und zur Aktivierung von Plaque- und anderen Gewebs-Makrophagen führt. Hierdurch kommt es zur vermehrten Freisetzung von IL-6 und anderen Zytokinen, die die Inflamationsreaktion im Krankheitsbild der Atherosklerose induzieren und/oder verstärken können.

Durch diese Mechanismen könnte bei hoher PLTP-Aktivität, die in experimentellen Untersuchungen mit einer Assoziation zum HDL-Cholesterin verbunden war (71), die Zusammensetzung der HDL-Partikel trotz eines hohen HDL-Cholesteringehaltes ungünstig im Sinne eines proinflammatorischen Effektes verschoben werden.

Zusammenfassend scheinen die pro-inflammatorischen Eigenschaften des PLTP ein wesentlicher pro-atherosklerotischer Aspekt dieses Enzyms zu sein, der sowohl im peripheren Blut als auch in Geweben nachweisbar ist.

Abbildung 5.2.1 soll abschliessend schematisch das Wechselspiel der potentiell pro- und anti-atherosklerotischen Aspekte des Phospholipid-Transferproteins zusammenfassen.

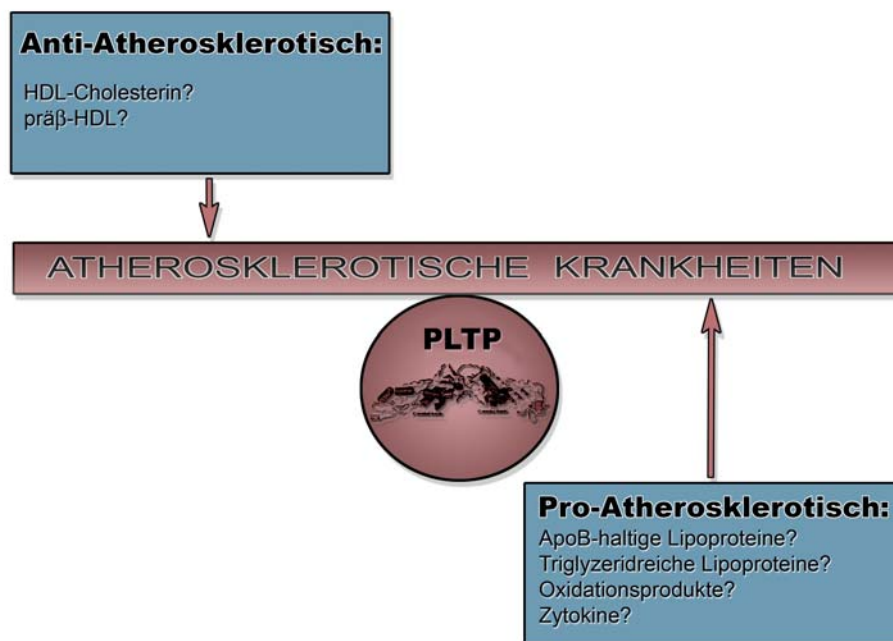


Abbildung 5.2.2 Wechselspiel der pro- und anti-atherosklerotischen Effekte des PLTP

PLTP ist über seine Steigerung von HDL-Cholesterin und der präβ-HDL-Partikel als Ausdruck eines gesteigerten und effizienteren reversen Cholesterintransports (RCT) potentiell anti-atherosklerotisch wirksam. Im Gegensatz dazu repräsentieren die vermehrte Bildung apoB-haltiger und triglyzeridhaltiger Lipoproteine, sowie die Bildung von Oxidationsprodukten und Zytokinen potentiell pro-inflammatorische Aspekte.

5.3 Bedeutung des Phospholipid-Transferproteins bei anderen Populationen am Beispiel der Hämodialysepatienten

Zur Bestätigung der Atherogenität des PLTP und seiner potentiellen pro-inflammatorischen Eigenschaften untersuchten wir in einer weiteren Studie die PLTP-Aktivität in einer Population mit einem stark erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, in Hämodialysepatienten (HD-Patienten). In einem matched-pairs Design verglichen wir eine Gruppe von 68 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz mit einer gesunden Kontrollgruppe.

Der Lipoproteinmetabolismus unterscheidet sich in HD-Patienten wesentlich von dem anderer Populationen. Die typische Fettstoffwechselstörung des Niereninsuffizienten ist eine Erhöhung der Triglyzeride, eine Erniedrigung des HDL-Cholesterins und eine Erhöhung von kleinen dichten LDL Partikeln. LDL Cholesterinspiegel korrelieren mit dem Ausmaß der Proteinurie und sind zu Beginn der Nierenersatztherapie höher als nach zunehmender Zeit an der Dialyse (82). Prädiktiv für Atherosklerose bei HD-Patienten sind auch Intermediate Density Lipoproteine (83). Der wichtigste Aspekt des gestörten Lipidmetabolismus bei chronischen Nierenerkrankungen ist jedoch ein U-förmiger Zusammenhang von Gesamtcholesterin und kardiovaskulären Ereignissen im Gegensatz zum linearen Zusammenhang in der Allgemeinbevölkerung und bei Patienten mit manifester Atherosklerose. HD-Patienten mit sehr hohem, aber auch sehr niedrigem Gesamtcholesterin, haben ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse (84, 85). Dieses Paradoxon wird im Allgemeinen dadurch erklärt, dass hohes Cholesterin ein Surrogatmarker für gute Ernährung ist. Vice versa geht die prognostisch relevant gesteigerte Inflamationsreaktion bei terminal Niereninsuffizienten mit niedrigem Cholesterin und niedrigem Albumin einher (86).

In unserer Untersuchung zeigten sich in Übereinstimmung mit den publizierten Daten im Basisvergleich der Lipidwerte signifikant niedrigere Gesamtcholesterin- und LDL-C-Serumkonzentrationen in HD-Patienten versus Kontrollen, während die Triglyzeride bei den HD-Patienten erhöht waren. Wir konnten als weiteren Aspekt des gestörten Lipidmetabolismus bei HD-Patienten erstmalig eine Erhöhung der PLTP-Aktivität aufzeigen. In unseren Analysen zeigte sich nahezu eine Verdoppelung der PLTP-Aktivität bei HD-Patienten gegenüber den Kontrollen.

Weiterhin blieb auch der Zusammenhang zwischen PLTP-Aktivität und Hämodialyse in einem multivariaten Modell unter Einschluss klassischer Risikofaktoren nahezu unbeeinflusst.

Auch in diesem Gruppenvergleich untersuchten wir die Korrelation der PLTP-Aktivität mit anderen Parametern. Es zeigten sich signifikante Korrelationen der PLTP-Aktivität mit HDL-C und Gesamtcholesterin bei HD-Patienten. Bei den Kontrollpersonen waren Triglyzeride signifikant mit der PLTP-Aktivität korreliert.

Um den Zusammenhang der erhöhten Entzündungsaktivität bei HD-Patienten mit erhöhter PLTP-Aktivität zu untersuchen, führten wir weitere Korrelationsanalysen durch. PLTP war mit CRP in der Gesamtgruppe signifikant assoziiert. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass in den Untergruppen, insbesondere bei den HD-Patienten keine signifikante Korrelation bestand und dass bei nur 31 Kontrollpersonen CRP bestimmt werden konnte.

Der Zusammenhang von Entzündungsreaktion und PLTP-Aktivität gilt auch für andere Populationen (37). In einer erst kürzlich publizierten Studie wurde die Korrelation von PLTP mit Entzündungsmarkern erstmalig bei KHK-Patienten mit niedrigem HDL gezeigt (87), so dass nach der vorliegenden Datenlage eine Assoziation der PLTP-Aktivität und der Inflammationsreaktion auch *in-vivo* unter bestimmten Bedingungen vorliegen kann. Dies bestätigt die experimentellen Daten.

5.4 PLTP als prospektiver Marker bei Patienten mit manifester koronarer Atherosklerose und bei Hämodialysepatienten

Um die Wertigkeit der Assoziation von PLTP-Aktivität und Atherosklerose einschätzen zu können, führten wir sowohl bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung als auch bei Dialysepatienten Überlebensanalysen durch.

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung war die am Median kategorisierte PLTP-Aktivität nicht mit einem erhöhten Risiko für das Erleiden eines kombinierten Endpunktes aus nichttödlichem Myokardinfarkt und kardiovaskulärem Tod korreliert (siehe Abbildung 4.1.5).

Bei Hämodialysepatienten konnten wir trotz der Verdoppelung der PLTP-Werte im Vergleich zu gepaarten Kontrollpersonen keine Assoziation der PLTP-Aktivitätswerte mit dem Überleben zeigen (Abbildung 4.4.2).

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass PLTP sowohl pro-atherogene als auch anti-atherogene Eigenschaften besitzen muss, welche zur Prognoseneutralität führt und anscheinend keine einfache positive oder negative Korrelation von PLTP und Überleben bei Atherosklerosepatienten mit KHK oder terminaler Niereninsuffizienz zulässt. Welche dieser Eigenschaften - Pro- oder Anti-Atherogenität - überwiegt und welche Regulationsmechanismen als Gegenspieler fungieren, scheint von einem komplexen, bisher noch wenig durchschauten Zusammenspiel verschiedener Faktoren (Inflammationsreaktion, Grunderkrankung, HDL-Konzentration und -Zusammensetzung, Aktivität anderer Enzyme wie z.B. CETP, etc.) mitbestimmt zu werden.

Zur weiteren Evaluation dieser Hypothesen untersuchten wir, ob HDL-C oder CRP mit dem Überleben der Dialysepatienten korrelierte. Patienten mit einem CRP unter dem Median hatten eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für das Überleben (Abbildung 4.4.3). Dies wurde in einer univariaten und multivariaten Cox-Regressions-Analyse bestätigt. Die Entzündungsreaktion war somit in der von uns untersuchten Kohorte für die Prognose der Hämodialyse-Patienten entscheidend. Diese Daten stehen in Einklang mit den veröffentlichten Studien; die Entzündungsreaktion ist ein bekannter prospektiver Marker bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (86).

Im Gegensatz hierzu war das HDL-Cholesterin, ebenfalls stratifiziert am Median, nicht mit dem Überleben der Patienten assoziiert. Dieser fehlende Zusammenhang

zwischen niedrigem HDL-C und Überleben bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz war ebenfalls zuvor in anderen Studien gezeigt worden (88)

Bezüglich der Wirkung des PLTP auf die Prognose der Hämodialyse-Patienten lässt sich folgende Hypothese formulieren: PLTP scheint in der besonderen Situation der Hämodialyse nur einen untergeordneten Einfluss auf die unter anderem die Prognose der Patienten bestimmende Inflamationsreaktion zu haben. Im Gegensatz dazu beeinflusst PLTP den Cholesterinanteil der HDL-Partikel, welcher jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der Patienten hat (siehe Abbildung 4.4.4). Welche der pro-inflammatorischen Eigenschaften des PLTP in der speziellen Situation der Hämodialyse wirksam oder unwirksam sind, kann jedoch aus den vorliegenden Daten nicht geklärt werden.

Als potentieller Mechanismus ist in einer erst kürzlich erschienenen Arbeit gezeigt worden, dass HDL-Partikel von Hämodialyse-Patienten verminderte anti-oxidative Eigenschaften haben (89). Dies könnte durch verminderte ApoA-I- und Paraoxonase-Konzentrationen, die bei HD-Patienten in einer Arbeit von Dirican und Mitarbeitern gezeigt wurden und wiederum durch bei HD-Patienten stark erhöhte PLTP-Aktivitäten bedingt sein könnten, erklärt werden (90).

Diese Zusammenhänge könnte ein Teilaspekt des fehlenden prospektiven Wertes des PLTP in den untersuchten Populationen, insbesondere bei Hämodialyse-Patienten, erklären.

5.5 Ausblick und erste Ergebnisse: Phospholipid-Transferprotein bei Patienten im kardiogenen Schock

Zur weiteren Evaluation der Rolle des PLTP in atherosklerotischen Krankheitsbildern wählten wir eine Gruppe von Patienten, deren Prognose entscheidend durch oxidative und inflammatorische Vorgänge bestimmt werden, Patienten im kardiogenen Schock.

Ein kardiogener Schock entwickelt sich bei 5–10% aller mit akutem Myokardinfarkt hospitalisierten Patienten und ist auch heutzutage unter modernster intensivmedizinischer Therapie mit einer Letalität von ca. 50% assoziiert (91). Da die Inflamationsreaktion und oxidative Vorgänge im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens sowie die schnelle Revaskularisation des minderperfundierten Myokards eine entscheidende prognostische Rolle in diesem Krankheitsbild spielt (92), bestand die Frage, ob die im Serum gemessene PLTP-Aktivität mit der Prognose der Patienten assoziiert war.

Wir schlossen vierzig Patienten im kardiogenen Schock, die zur invasiven Diagnostik und Therapie in die Klinik für Innere Medizin III der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg eingewiesen wurden, in unsere Studie ein und bestimmten PLTP und andere Marker aus Blutproben, die bei Einschluß in die Studie sowie zum Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus bzw. am Todestag entnommen wurden.. Die Studie war von der Ethikkommission der Martin Luther-Universität genehmigt worden. Verstorbene und Überlebende unterschieden sich nicht hinsichtlich klassischer Risikofaktoren (Alter, Geschlecht, etc.). Die PLTP-Aktivität sank im Vergleich aller Patienten von im Mittel 34,8 pmol/µl/h bei Einschluß der Patienten im kardiogenen Schock auf 31,2 pmol/µl/h zum Ende der Studie (Tod oder Entlassung aus dem Krankenhaus) ($p=0,026$). Bei den 26 überlebenden Patienten sank die PLTP-Aktivität von im Mittel 36,2 pmol/µl/h bei Einschluss in die Studie auf 31,3 pmol/µl/h bei Entlassung aus dem Krankenhaus ($p=0,012$). Im Gegensatz dazu konnte keine signifikante PLTP-Abnahme bei den 14 im Krankenhaus verstorbenen Patienten nachgewiesen werden (33,6 pmol/µl/h bei Einschluß in die Studie versus 31,2 pmol/µl/h zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme vor Tod, $p=0,799$).

Diese Daten deuten an, dass bei Patienten mit kardiogenem Schock das fehlende Absinken einer initial erhöhten PLTP-Aktivität während des Krankheitsverlaufes mit

einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein scheint. Dies könnte durch die pro-inflammatorische und pro-oxidative Wirkung des PLTP erklärt werden.

Auf dem Hintergrund dieser retrospektiv erhobenen Ergebnisse gilt es, die Rolle des PLTP als Prognosemarker, aber auch als pathophysiologisch relevantes Substrat im Hinblick auf einen zukünftigen therapeutischen Ansatzpunkt im kardiogenen Schock sowohl in Mausmodellen als auch in weiteren, dann prospektiven, humanen Studien zu untersuchen.

5.6 Zusammenfassung

Das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) ist in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Vorgänge involviert, wobei seine Wirkung auf das Lipoprotein HDL im Vordergrund steht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PLTP-Aktivität bei Patienten mit manifester koronarer Atherosklerose und bei Dialysepatienten signifikant und unabhängig von anderen Risikofaktoren im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht ist.

Weiterhin war in einer Studie mit gesunden, jungen Probanden die PLTP-Aktivität durch eine fettreiche Mahlzeit beeinflusst und mit den postprandialen Triglyzeriden assoziiert.

In den vorliegenden und anderen Untersuchungen war die PLTP-Aktivität mit dem Ausmass der Inflamationsreaktion assoziiert. In Mausmodellen war die Inflamationsantwort nach intraperitonealer Gabe von IL-6 in PLTP0-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen signifikant reduziert. Weiterhin war in einem zweiten Mausmodell der Aktivierungsgrad der Peritonealmakrophagen nach Induktion einer Peritonitis in PLTP0/LDLr0- im Vergleich zu LDLr0-Mäusen signifikant niedriger.

Sowohl bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener Koronarer Herzerkrankung als auch bei Dialysepatienten waren hohe PLTP-Aktivitäten nicht mit dem ereignisfreien Überleben assoziiert.

Die Rolle des PLTP im Krankheitsbild der Atherosklerose ist nicht geklärt: PLTP ist ein pro-atherogener Faktor auf Grund seiner pro-inflammatorischen Eigenschaften und seiner positiven Korrelation zu den postprandial erhöhten, triglyzeridreichen Lipoproteinen. Dem gegenüber steht jedoch seine Wirkung auf den HDL-Cholesterin-Metabolismus, der vor allem anti-atherogene Eigenschaften repräsentiert. Dieses Wechselspiel zwischen Pro- und Anti-Atherogenität könnte den fehlenden prädiktiven Wert für das ereignisfreie Überleben bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen in unseren Untersuchungen erklären.

Um diese Fragen weiter zu prüfen, müssen Populationen untersucht werden, bei denen die Inflammation einen noch entscheidenderen, prognostischen Stellenwert besitzt. Hierzu zeigen erste, retrospektiv erhobene Ergebnisse, dass PLTP einen prognostischen Wert bei Patienten im kardiogenem Schock besitzt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Kannel WB, Dawber TR, Friedmann GD, Glennon WE, McNamara PM. Risk Factors in coronary heart disease. An evaluation of several serum lipids as predictors of coronary heart disease: The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1964;61:888-99.
- 2 Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-25.
- 3 Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138:419-20.
- 4 Tardy Y, Resnick N, Nagel T, Gimbrone MA Jr, Dewey CF Jr. Shear stress gradients remodel endothelial monolayers in vitro via a cell proliferation-migration-loss cycle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3102-6.
- 5 Witztum JL, Berliner JA. Oxidized phospholipids and isoprostanes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:441-8.
- 6 Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998; 338:1042-50.
- 7 Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;22:1-14.
- 8 Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation.* 2000;101:1899-906.
- 9 Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788-91.
- 10 Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:197-204.
- 11 Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2:275-81.
- 12 Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 1995;91:2844- 50.

- 13 Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, Gordon S, van der Laan LJ, Kraal G, Ishibashi S, Kitamura N, Takahashi K. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest*. 1998;78:423-34.
- 14 Weissberg PL. Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart*. 2000;83:247-52.
- 15 van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.
- 16 Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995;77:863-8.
- 17 Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995;92:1565-9.
- 18 Ye S, Eriksson P, Hamsten A, Kurkinen M, Humphries SE, Henney AM. Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression. *J Biol Chem*. 1996;271:13055-60.
- 19 Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:19-27.
- 20 Fuster V, Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. In: Fuster V, Topol EJ, Ross R. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:441- 60.
- 21 Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994;90:775-8.
- 22 Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. *JAMA*. 1998;279:1477-82.

- 23 de Beer FC, Hind CR, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J*. 1982;47:239-43.
- 24 Berk BC, Weintraub WS, Alexander RW. Elevation of C-reactive protein in „active“ coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1990;65:168-72.
- 25 Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation*. 1996;94:874-7.
- 26 Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med*. 1999;106:506-12.
- 27 Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767-72.
- 28 Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000;101:2149-53.
- 29 Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Hafner G, Meyer J. The role of inflammation and infection in acute coronary syndrome. *Herz*. 2001;26S1:9-18.
- 30 Aus dem Endokrinologie-Modul, Kapitel Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel, Universitätsspital Zürich, Autoren: G. A. Spinas, N. Lüthi (<http://www.megru.unizh.ch/j3/module/endokrinologie>).
- 31 Löffler,G., Petrides,P.E. Biochemie und Pathobiochemie. Löffler, Georg; Petrides, Petro E.; Heinrich, Peter C. (Hrsg.) Springer-Verlag, 7. Aufl., 2003, XXXVI.
- 32 Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL in Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Edition, 2001, McGraw-Hill Medical Publishing Division.
- 33 Aus Dyslipidämien oder Hyperlipidämien. Abteilung Endokrinologie, Diabetologie und Klinische Ernährung, Medizin, Universitätskliniken Kantonsspital Basel. Autor: Ulrich Keller (www.endo-diabasel.ch).

- 34 Stein O, Stein Y. Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005;178:217-30.
- 35 Schlitt A, Blankenberg S, Bickel C, Meyer J, Hafner G, Jiang XC, Rupprecht HJ. Prognostic value of lipoproteins and their relation to inflammatory markers among patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2005;102:477-85.
- 36 Albers JJ, Tu AY, Wolfbauer G, Marcovina SM. Molecular biology of phospholipid transfer proteins. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:88–93.
- 37 Pussinen PJ, Metso J, Malle E, Barlage S, Palosuo T, Sattler W, Schmitz G, Jauhiainen M. The role of plasma phospholipid transfer protein (PLTP) in HDL remodeling in acute-phase patients. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1533:153-63.
- 38 Tall AR, Krumhol S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ. Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res*. 1985;26:842-51.
- 39 Jiang XC, Francone OL, Bruce C, Milne R, Mar J, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. 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.
- 40 Foger B, Santamarina-Fojo S, Shamburek RD, Parrot CL, Talley GD, Brewer HB Jr. Plasma phospholipid transfer protein: adenovirus mediated overexpression in mice leads to decreased plasma high density lipoprotein (HDL) and enhanced hepatic uptake of phospholipids and cholesteryl esters from HDL. *J Biol Chem*. 1997;272: 27393–400.
- 41 Ehnholm S, van Dijk KW, van't Hof B, van der Zee A, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Hofker M, Havekes L, Ehnholm C. Adenovirus mediated overexpression of human phospholipid transfer protein alters plasma HDL levels in mice. *J Lipid Res*. 1998;39:1248–53.
- 42 Kostner GM, Oettl K, Jauhiainen M, Ehnholm C, Esterbauer H, Dieplinger H. Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem J*. 1995; 305:659-67.
- 43 Desrumaux C, Deckert V, Athias A, Masson D, Lizard G, Palleau V, Gamber P, Lagrost L. Plasma phospholipid transfer protein prevents vascular

- endothelium dysfunction by delivering alpha-tocopherol to endothelial cells. *FASEB J.* 1999;13:883-92.
- 44 Jiang XC, Qin S, Min L, Schneider M, Tall AR, Lagrost L. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency represents an anti-oxidant state in mice. *Circulation.* 2001;104:II-232.
 - 45 Qin S, Tall AR, Jiang XC. Phospholipid transfer protein deficiency reduces atherogenesis by inhibited LDL oxidation in LDL receptor knock out mice on western type diet. *Circulation.* 2001;104:II-329.
 - 46 Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL Metabolism. *Atherosclerosis.* 2001;155:269–81.
 - 47 Jiang XC, Qin S, Qiao C, Kawano K, Lin M, Skold A, Xiao X, Tall AR. Apolipoprotein B secretion and atherosclerosis are decreased in mice with phospholipid-transfer protein deficiency. *Nat Med.* 2001;7:847–52.
 - 48 Jiang XC, Qin S, Min L, Schneider M, Tall AR, Lagrost L. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency represents an anti-oxidant state in mice. *Circulation.* 2001;104:II-232.
 - 49 Qin S, Tall AR, Jiang XC. Phospholipid transfer protein deficiency reduces atherogenesis by inhibited LDL oxidation in LDL receptor knock out mice on western type diet. *Circulation.* 2001;104:II-329.
 - 50 Desrumaux C, Athias A, Bessede G, Verges B, Farnier M, Persegol L, Gambert P, Lagrost L. Mass concentration of plasma phospholipid transfer protein in normolipidemic, type IIa hyperlipidemic, type IIb hyperlipidemic, and non-insulin-dependent diabetic subjects as measured by a specific ELISA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:266–75.
 - 51 Murdoch SJ, Carr MC, Hokanson JE, Brunzell JD, Albers JJ. PLTP activity in premenopausal women: relationship with lipoprotein lipase, HDL, LDL, body fat, and insulin resistance. *J Lipid Res.* 2000;41:237–44.
 - 52 Riemens SC, van Tol A, Sluiter WJ. Plasma phospholipid transfer protein activity is related to insulin resistance: impaired acute lowering by insulin in obese type II diabetic patients. *Diabetologia.* 1998;41:929–34.
 - 53 Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989;321:1311–6.

- 54 Cheung MC, Wolfbauer G, Kennedy H, Brown BG, Albers JJ. Plasma phospholipid transfer protein activity in patients with low HDL and cardiovascular disease treated with simvastatin and niacin. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1537:117–24.
- 55 Huuskonen J, Ekstrom M, Tahvanainen E, Vainio A, Metso J, Pussinen P, Ehnholm C, Olkkonen VM, Jauhiainen M. Quantification of human plasma phospholipid transfer protein (PLTP): relationship between PLTP mass and phospholipid transfer activity. *Atherosclerosis*. 2000;151:451–61.
- 56 Wanner C, Krane V, Marz W, Olschewski M, Mann JF, Ruf G, Ritz E; German Diabetes and Dialysis Study Investigators. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2005;353:238–48.
- 57 Bruce C, Chouinard RA Jr, Tall AR. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu Rev Nutr*. 1998;18:297–330.
- 58 Yang XP, Yan D, Qiao C, Liu RJ, Chen JG, Li J, Schneider M, Lagrost L, Xiao X, Jiang XC. Increased atherosclerotic lesions in apoE mice with plasma phospholipid transfer protein overexpression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1601–7.
- 59 Jiang XC, Tall AR, Qin S, Lin M, Schneider M, Lalanne F, Deckert V, Desrumaux C, Athias A, Witztum JL, Lagrost L. Phospholipid transfer protein deficiency protects circulating lipoproteins from oxidation due to the enhanced accumulation of vitamin E. *J Biol Chem*. 2002;277:39561–6.
- 60 Lie J, de Crom R, van Gent T, van Haperen R, Scheek L, Sadeghi-Niaraki F, van Tol A. Elevation of plasma phospholipid transfer protein increases the risk of atherosclerosis despite lower apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Lipid Res*. 2004;45:805–11.
- 61 O'Brien KD, Vuletic S, McDonald TO, Wolfbauer G, Lewis K, Tu AY, Marcovina S, Wight TN, Chait A, Albers JJ. Cell-associated and extracellular phospholipid transfer protein in human coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108:270–4.
- 62 Desrumaux CM, Mak PA, Boisvert WA, Masson D, Stupack D, Jauhiainen M, Ehnholm C, Curtiss LK. Phospholipid transfer protein is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells. *J Lipid Res*. 2003;44:1453–61.

- 63 Castro GR, Fielding CJ. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry*. 1988;27:25–9.
- 64 von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C, Assmann G. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates prebeta1-HDL. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1301:255–62.
- 65 Lagrost L, Athias A, Lemort N, Richard JL, Desrumaux C, Chatenet-Duchene L, Courtois M, Farnier M, Jacotot B, Braschi S, Gambert P. Plasma lipoprotein distribution and lipid transfer activities in patients with type IIb hyperlipidemia treated with simvastatin. *Atherosclerosis*. 1999;143:415-25.
- 66 Riemens SC, Van Tol A, Stulp BK, Dullaart RP. Influence of insulin sensitivity and the TaqIB cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism on plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activities and their response to hyperinsulinemia in non-diabetic men. *J Lipid Res*. 1999;40:1467-74.
- 67 Tu AY, Nishida HI, Nishida T. High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *J Biol Chem*. 1993;268:23098–105.
- 68 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.
- 69 Marques-Vidal P, Jauhiainen M, Metso J, Ehnholm C. Transformation of high density lipoprotein 2 particles by hepatic lipase and phospholipid transfer protein. *Atherosclerosis* 1997;133:87–95.
- 70 Huuskonen J, Olkkonen VM, Ehnholm C, Metso J, Julkunen I, Jauhiainen M. Phospholipid transfer is a prerequisite for PLTP-mediated HDL conversion. *Biochemistry*. 2000;39:16092–8.
- 71 Jiang X, Francone OL, Bruce C, Milne R, Mar J, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. 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.
- 72 van Haperen R, van Tol A, Vermeulen P, Jauhiainen M, van Gent T, van den Berg P, Ehnholm S, Grosveld F, van der Kamp A, de Crom R. Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high

- density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1082-8.
- 73 Oka T, Kujiraoka T, Ito M, Egashira T, Takahashi S, Nanjee MN, Miller NE, Metso J, Olkkonen VM, Ehnholm C, Jauhiainen M, Hattori H. Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. *J Lipid Res.* 2000;41:1651-7.
 - 74 Mero N, Van Tol A, Scheek LM, Van Gent T, Labeur C, Rosseneu M, Taskinen MR. Decreased postprandial high density lipoprotein cholesterol and apolipoproteins A-I and E in normolipidemic smoking men: relations with lipid transfer proteins and LCAT activities. *J Lipid Res.* 1998;39:1493-502.
 - 75 Lindstedt KA, Kovanen PT. Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:567-73.
 - 76 Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2364-7.
 - 77 Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-74.
 - 78 Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation.* 2001;103:2610-6.
 - 79 Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica.* 1995;80:161-75.
 - 80 Kubo N, Boisvert WA, Ballantyne CM, Curtiss LK. Leukocyte CD11b expression is not essential for the development of atherosclerosis in mice. *J Lipid Res.* 2000;41:1060-6.
 - 81 Yan D, Navab M, Bruce C, Fogelman AM, Jiang XC. PLTP deficiency improves the anti-inflammatory properties of HDL and reduces the ability of LDL to induce monocyte chemotactic activity. *J Lipid Res.* 2004;45:1852-8.

- 82 Baigent C, Wheeler DC. Should we reduce blood cholesterol to prevent cardio-vascular disease among patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15:1118-9.
- 83 Shoji T, Nishizawa Y, Kawagishi T, Kawasaki K, Taniwaki H, Tabata T, Inoue T, Morii H. Intermediate density lipoproteins as an independent risk factor for aortic atherosclerosis in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:1277-84.
- 84 Lowrie EG, Lew NL. Death risk in hemodialysis patients: the predictive value of commonly measured variables and an evaluation of death rate differences between facilities. *Am J Kidney Dis*. 1990;15:458-82.
- 85 Iseki K, Yamazato M, Tozawa M, Takishita S. Hypocholesterolemia is a significant predictor of death in a cohort of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2002; 61:1887-93.
- 86 Bologa RM, Levine DM, Parker TS, Cheigh JS, Serur D, Stenzel KH, Rubin AL. Interleukin-6 predicts hypoalbuminemia, hypocholesterolemia, and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 1998;32:107-14.
- 87 Cheung MC, Brown BG, Marino Larsen EK, Frutkin AD, O'Brien KD, Albers JJ. Phospholipid transfer protein activity is associated with inflammatory markers in patients with cardiovascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1762:131-7.
- 88 Chiang CK, Ho TI, Hsu SP, Peng YS, Pai MF, Yang SY, Hung KY, Tsai TJ. Low-density lipoprotein cholesterol: association with mortality and hospitalization in hemodialysis patients. *Blood Purif*. 2005;23:134-40.
- 89 Jurek A, Turyna B, Kubit P, Klein A. LDL susceptibility to oxidation and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure. *Clin Biochem*. 2006;39:19-27.
- 90 Dirican M, Akca R, Sarandol E, Dilek K. Serum paraoxonase activity in uremic predialysis and hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2004;17:813-8.
- 91 Hollenberg SM, Kavinsky CJ, Parrillo JE. Cardiogenic shock. *Ann Intern Med*. 1999;131:47-59.
- 92 Geppert A, Steiner A, Zorn G, Delle-Karth G, Koreny M, Haumer M, Siostrzonek P, Huber K, Heinz G. Multiple organ failure in patients with cardiogenic shock is associated with high plasma levels of interleukin-6. *Crit Care Med*. 2002;30:1987-94.

8 Anhang

8.1 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Habilitationsleistung selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Zugleich erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren derzeit anhängig ist bzw. jemals anhängig war.

Halle, den 15.06.06

Dr. med. Axel Schlitt

8.2 Danksagung

Für die Unterstützung und Förderung möchte ich mich bei meinen klinischen und wissenschaftlichen Lehrern Prof. Dr. med. H. Schieffer, Prof. Dr. med. J. Meyer, Prof. Dr. med. T. Münzel und Prof. Dr. med. K. Werdan bedanken.

Meinem Freund und Mentor PD Dr. med. Michael Buerke möchte ich für seine tatkräftige Unterstützung und die vielen fruchtbaren Diskussionen danken.

Weitere, wesentliche Danksagungen gelten Prof. Dr. med. H.-J. Rupprecht, der mich in einem großen Teil meiner Laufbahn gefördert und unterstützt hat, Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg, mit dem ich in zahlreichen, freundschaftlichen Diskussionen Wesentliches über die Pathogenese der Atherosklerose und Epidemiologie erlernen konnte, sowie meinem wissenschaftlichen Lehrer Prof. Xian-Cheng Jiang, der mich die Grundlagenforschung des Lipoproteinmetabolismus lehrte.

Für die Gewährung des Stipendiums, das mir meinen Forschungsaufenthalt im Department of Anatomy and Cell Biology des Downstate Medical Center Brooklyn der State University of New York ermöglichte, möchte ich der Deutschen Herzstiftung danken.

Den Statistikern Fr. A. Victor, Fr. M. Messow und insbesondere Hans von Gizycki gilt mein Dank für die Hilfe in der Erstellung der zum Teil komplexen statistischen Modelle, die Grundlagen meiner Publikationen waren.

Nicht zu vergessen in der Danksagung sind Fr. Dr. med. Wallner, Dr. med. R. Prondzinski, PD Dr. med. C. Bickel, die Doktoranden, die mich bis heute in meinem wissenschaftlichen Werdegang, sowie alle Kollegen, die mich in meiner klinischen und wissenschaftlichen Laufbahn begleitet haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Tochter und bei meiner Ehefrau bedanken, die mich trotz der wenigen Zeit, die mir das wissenschaftliche zusätzlich zum klinischen Arbeiten gelassen hat, immer auf diesem Weg unterstützt haben.

7 Thesen

Das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) ist ein Risikofaktor für eine koronare Herzerkrankung

Das atherogene Potential des PLTP beruht unter anderem auf seinem pro-oxidativen und pro-inflammatorischen Potential, sowie in seiner Assoziation zu triglyzeridreichen Lipoproteinen.

PLTP hat über seine Rolle in der so genannten HDL-Konversion auch anti-atherogenes Potential.

Diese bivalenten Eigenschaften des PLTP im Krankheitsbild der Atherosklerose könnten die fehlende prognostische Relevanz bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung und Hämodialysepatienten in den vorliegenden Studien erklären; eine hohe PLTP-Aktivität war in diesen Populationen nicht mit dem ereignisfreien Überleben assoziiert.

In anderen Populationen, in denen die Prognose der Patienten noch wesentlicher durch die Inflamationsreaktion bestimmt wird, scheint dies nicht zu gelten: In ersten Untersuchungen war bei Patienten mit kardiogenem Schock eine erhöhte PLTP-Aktivität mit dem Überleben assoziiert.

8 Tabellarischer Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Schlitt
Vorname: Axel
Akademischer Titel: Dr. med.
Geburtsdatum / -ort: 04.10.1966, Kassel
Anschrift: Brühlweg 22, 06188 Braschwitz
Familienstand: Verheiratet

Schulbildung:

1972-1975: Grundschule Niedervellmar
1975-1976: Grundschule Königstor, Kassel
1976-1985: Gymnasium Albert Schweitzer-Schule, Kassel,
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehr- / Ersatzdienst:

1985-1987: Zivildienst im Alten- und Pflegeheim Marie-Behre-Heim, Guntershausen

Berufsausbildung:

1987-1990: Krankenpflegeausbildung als Auszubildender der Hans-
Prinzhorn-Klinik, Hemer

Hochschulausbildung:

1991-1993: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
Saarbrücken-Homburg/Saar
1993-1998: Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz

Berufliche Tätigkeiten:

1990-1991: Krankenpfleger, Kreisspital Männedorf, Schweiz
1998-1999: Arzt im Praktikum, Universität des Saarlandes, Saarbrücken-
Homburg/Saar, III. Medizinische Klinik
1999-10/2002: Arzt im Praktikum/Assistenzarzt, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz,
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
seit 05/2000: Doktor der Medizin
11/2002-10/2003: Postdoctoral research fellow, State University of New York, Stipendiat der
Deutschen Herzzstiftung
11/2003-04/2005: Assistenzarzt, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Klinik und
Poliklinik für Innere Medizin II
seit 02/2005: Facharzt für Innere Medizin
05/2005-12/2006: Assistenzarzt, Martin Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Klinik für
Innere Medizin III
seit 10/2006: Zusatzbezeichnung Kardiologie
seit 01/2007: Oberarzt, Martin Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Klinik für Innere
Medizin III