Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G.A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Analyse von Proteinen und deren Elimination durch drei verschiedene extrakorporale Therapieverfahren der LDL-Apherese bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie mittels Proteomics-Methoden

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tanja Söllner
aus
Kösching, Lkrs. Eichstätt (Bayern)

Göttingen 2010

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Analyse von Proteinen und deren Elimination durch drei verschiedene extrakorporale Therapieverfahren der LDL-Apherese bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie mittels Proteomics-Methoden

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tanja Söllner
aus
Kösching, Lkrs. Eichstätt (Bayern)

Göttingen 2010

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. H. Dihazi
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
III. Berichterstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. P. Virsik-Köpp
Tag der mündlichen Prüfung:	25. Oktober 2010

Gewidmet meiner geliebten Oma Magdalena Schindler,
Bubach am Forst.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**
Abbildungsverzeichnis ..... **IV**
Tabellenverzeichnis ..... **V**
Abkürzungsverzeichnis ..... **VII**

1 Einleitung **1**

1.1 Atherosklerose **1**
1.2 Risikofaktor Hypercholesterinämie **2**
1.3 Krankheitsbild: Familiäre Hypercholesterinämie (FH) **6**
1.4 Therapieoptionen der Cholesterinreduktion **8**
1.5 LDL-Apherese **9**
1.5.1 Membrandoppelfiltration (MDF) 9
1.5.2 Heparin-induzierte LDL-Präzipitation (HELP) 10
1.5.3 Direktadsorption von Lipoproteinen (DALI) 11
1.5.4 Effektivität der Methoden 12
1.6 Proteomics **15**
1.7 Fragestellung der Arbeit **17**

2 Material und Methoden **18**

2.1 Material **18**
2.1.1 Chemikalien und Enzyme 18
2.1.2 Antikörper, Antiseren und fertige Kits 19
2.1.3 Geräte 19
2.1.4 Verbrauchsmaterial 20
2.1.5 Wissenschaftliche Software 21
2.2 Methoden **21**
2.2.1 Patienten und klinische Studiendurchführung 21
2.2.2 Probengewinnung und Vorbereitung 23
2.2.2.1 Plasmaproben 23
2.2.2.2 Eluatproben 23
2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben 24
2.2.2.4 Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung 25
2.2.3 Proteinauftrennung in der 2D-Gelelektrophorese 25
2.2.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF) 25

2.2.3.2 Zweite Dimension: Die 2D-Gel-Elektrophorese ... 26
2.2.3.2.1 Vorbereitung des SDS-Gels ... 27
2.2.3.2.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen ... 27
2.2.3.2.3 Durchführung der zweiten Dimension ... 28
2.2.4 Färbung der Gele ... 28
2.2.4.1 Silberfärbung ... 28
2.2.4.2 Colloidal-Coomassie-Brillant-Blue-G-250-Färbung ... 29
2.2.5 Auswertung der 2D-Gele ... 29
2.2.6 Massenspektrometrische Analyse ... 30
2.2.6.1 Enzymatische Proteinspaltung im frischen Gel ... 31
2.2.6.2 Vorbereitung der Proben für MALDI-TOF-MS ... 32
2.2.6.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie ... 32
2.2.6.4 Proteinidentifizierung durch Peptidmassenmuster-Zuordnung ... 33
2.2.6.5 LC-ESI-Q-TOF-Tandem Massenspektrometrie ... 34
2.2.7 Western-Blot-Analyse ... 34
2.2.7.1 Vorbereitung der Proben für Western-Blot ... 35
2.2.7.2 Vorbereitung der SDS-PAGE ... 35
2.2.7.3 SDS-PAGE-Elektrophorese ... 35
2.2.7.4 Transfer der Proteine im Tankblotting-Verfahren ... 36
2.2.7.5 Färbung der Membran ... 36
2.2.7.6 Detektion der Antigene ... 36
2.2.7.7 Auswertung der Western-Blot-Analysen ... 38
2.2.8 Labormethoden ... 38
2.2.9 Berechnungen und Statistik ... 38

3 Ergebnisse ... 40

3.1 2D-Geldarstellung der Filtereluate ... 40

3.2 Massenspektrometrieanalyse und Datenbanksuche ... 46

3.2.1 Gruppe der Apolipoproteine ... 46
3.2.2 Gruppe der hämorheologisch wirksamen Proteine ... 47
3.2.3 Gruppe der adhäsiv wirksamen Proteine ... 48
3.2.4 Gruppe der Immunoglobuline und immunologisch wirksamen Proteine ... 48
3.2.5 Gruppe der Plasmaproteine ohne funktionale Zuordnung ... 50

3.3 Quantifizierung des LDL-Apherese-Proteinverlustes mittels Western-Blot ... 50

3.4 Laborchemische Analyse ausgewählter Proteine ... 54

4 Diskussion ... 58

4.1 Überblick über die Studie ... 58

4.2 Vergleich der Methoden der Studie mit den Literaturangaben ... 58

4.2.1 Patienten ... 58
4.2.2 Proteomics-Methoden ... 59
4.2.2.1 Proben ... 59
4.2.2.2 2D-Gelelektrophorese ... 59
4.2.2.3 MALDI-TOF-MS und LC-ESI-Q-TOF-MS/MS ... 60
4.2.2.4 Western-Blot ... 61
4.2.3 Standard-Laboranalysen ... 61
4.3 Einordnung der Ergebnisse in den Prozess der Atherosklerose ... 62
4.3.1 Apolipoproteine ... 62
4.3.2 Hämorheologisch wirksame Proteine ... 64
4.3.3 Immunoglobuline und immunologisch wirksame Proteine ... 65
4.3.4 Komponenten des Komplementsystems ... 67
4.3.5 Adhäsiv wirksame Proteine ... 68
5 Zusammenfassung und kurzer Ausblick ... 70
6 Anhang: Tabelle 26-29 ... 72
7 Literaturverzeichnis ... 76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der wichtigen Faktoren der Atherosklerose 5

Abbildung 2 Darstellung des Prinzips des Verfahrens der MDF-Apherese 10

Abbildung 3 Darstellung des Prinzip des Verfahrens der HELP®-Apherese 11

Abbildung 4 Darstellung des Prinzips des Verfahrens der DALI®-Apherese 12

Abbildung 5 Prinzip der ersten Dimension 26

Abbildung 6 Prinzip der Ionisation bei MALDI 33

Abbildung 7 2D-SDS-Gele der Eluate der drei Verfahren im Vergleich 42

Abbildung 8 2D-Geldarstellung der Eluatproteine des EC50®-Filters 43

Abbildung 9 2D-Geldarstellung der Eluatproteine des Präzipitat®-Filters 44

Abbildung 10 2D-Geldarstellung der Eluatproteine des DALI500®-Filters 45

Abbildung 11 Western-Blot-Ergebnisse:I: Alpha-1-Antitrypsin; II: Protein Alpha-2-Makroglobulin 51

Abbildung 12 Western-Blot-Ergebnisse: I: Alpha-2-Antiplasmin; II: Plasminogen 52

Abbildung 13 Western-Blot-Ergebnisse: I: Komplement Faktor-B; II: TGFß-1 52

Abbildung 14 Western-Blot-Ergebnisse: I: Prä-Albumin; II: Transferrin 53

Abbildung 15 Western-Blot-Ergebnisse: I: Kollagen-1; II: Fibronektin 53

Abbildung 16 Darstellung der Konzentrationsdifferenz von TNF-α und sIl-2R 55

Abbildung 17 Darstellung der Konzentrationsdifferenz von IL-6 und IL-1ß 56

Abbildung 18 Darstellung der Konzentrationsdifferenz von CRP 56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Stadien der Atherosklerose	1
Tabelle 2	Koronare Risikofaktoren nach NCEP-ATP-III	2
Tabelle 3	Gewünschte LDL-Konzentrationen nach der NCEP-ATP-III	5
Tabelle 4	Einteilung der Hypercholesterinämie nach Fredrickson	6
Tabelle 5	Charakteristika der isolierten und gemischten Hypercholesterinämie	7
Tabelle 6	Eigenschaften der benutzten LDL-Apherese-Techniken	12
Tabelle 7	Einflüsse der drei Aphereseverfahren auf bestimmte Plasmakomponenten	13
Tabelle 8	Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	22
Tabelle 9	Konzentrationsreihe zur Proteinbestimmung	24
Tabelle 10	Protokoll der isoelektrischen Fokussierung	26
Tabelle 11	Zusammensetzung der Trenn – und Sammelgellösungen	27
Tabelle 12	Protokoll der SDS-PAGE-Elektrophorese	36
Tabelle 13	Verdünnung der primären Antikörper	37
Tabelle 14	Verdünnung der sekundären Antikörper	37
Tabelle 15	Darstellung der Patientendaten	40
Tabelle 16	Darstellung der Behandlungsdaten	40
Tabelle 17	Gruppe der Apolipoproteine	47
Tabelle 18	Gruppe der hämorheologischen Proteine	47
Tabelle 19	Gruppe der Adhäsionsproteine	48
Tabelle 20	Gruppe der Immunsystem-modulierenden Proteine	48
Tabelle 21	Gruppe der Proteine ohne funktionale Einordung	50
Tabelle 22	Darstellung der mittleren Reduktionsrate ± Standardabweichung der verschiedenen Plasmaparameter	54
Tabelle 23	Zeittafel von Komplementaktivität CH50	57
Tabelle 24	Zeittafel von Komplementfaktor C3c	57
Tabelle 25	Zeittafel von Komplementfaktor C4	57
Tabelle 26	Auflistung der Patientendaten des MDF-Verfahrens	72

Tabelle 27 Auflistung der Patientendaten des HELP®-Verfahrens 72

Tabelle 28 Auflistung der Patientendaten des DALI®-Verfahrens..... 72

Tabelle 29 Aulistung der Zuordnung markierter Gelspot und Identifikationsergebnis aller drei Filter 73

Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Acid-citrate Dextrose-A
ACN	Acetonitril
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
$AgNO_3$	Silbernitrat
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Beta2-GPI	Beta2-Glykoprotein I
C	Cholesterin
C3	Komplement C3
C4	Komplement C4
CH50	Komplementaktivität
CHAPS	3-[(3-Chollamidopropyl)-Dimethylamino]-Propansulfat
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DALI	Direkte Adsorption von Lipoproteinen
ddH_2O	deionisiertes destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DHB-Matrix	2,5-Dihydroxybenzoesäure-Matrix
2D-PAGE	2-Dimensionale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DSA	Dextransulfat-Adsorption
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDRF	Endothelium-derived relaxing Factor
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FGFP	Fibrostenblastenwachstumsfaktor
FH	Familiäre Hypercholesterinämie
g	Gramm
GDI	GDP-Dissoziation-Inhibitor
GDP	Guadenosindiphosphat

Gesamt-C	Gesamtcholesterin
GTP	Guadenosintriphosphat
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDL	high-density Lipoprotein
HELP	Heparin induzierte Lipoprotein Adsorption
HMG-Co-A	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A
H_2O	Wasser
HOAc	Eisessig
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
IDL	intermediate density Lipoprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
kV	Kilovolt
l	Liter
LAARS	LDL-Apherese-Regressions-Studie
LACMART	Low-Density-Lipoprotein Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial-Study
LC	Flüssigkeitschromatographie
L-CAPS	Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDL-C	Low-Density Lipoprotein Cholesterin
Lp(a)	Lipoprotein (a)
µ	mikro
M	Mol
MALDI	Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionisation
MASP-2	Mannose-bindende-Lektin-Serin-Protease-2
MBL	Mannose bindendes Lektin

MCP-1	Monocyte-chemoattractant Protein-1
MCSF	Makrophagen-colony-stimulating-Faktor
mDa	Millidalton
MDF	Membran Differenzial Filtration
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mms	multimass unit
MS	Massenspektrometrie
MSDB	Massenspektrometrie-Proteinsequenz-Datenbank
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie (Hintereinanderschaltung von Analysatoren)
m/z	Masse pro Ladung
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NCBInr	National Center of Biotechnology Information non-redundant
NCEP-ATP-III	National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III
NF-κB	Nukleärer Faktor kappa B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
ox-LDL	Oxidiertes-Low-Density Lipoprotein
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Saline
PDGF	plättchenabstammender Wachstumsfaktor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Isoelektrischer Punkt
PL	Phospholipide
PMSF	Phenylmethylsulonylfluroid
ppm	parts per million (Teile von einer Million)
PRIND	prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
Q	Quadrupole-Analysator
s	Sekunde

SAP	Serum Amyloid P
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sIL-2R	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Triglyzeride
TGFß-1	Transformierter Wachstumsfaktor beta 1
TIA	Transiente ischämische Attacke
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TOF	Time-Of-Flight (Flugzeit)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
(v/v)	volume/volume
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molekül-1
VLDL	Very-Low-Density Lipoprotein
WHO	Weltgesundheitsorganisation
(w/v)	weight/volume

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

„Gewaltige Denkmäler für die Ewigkeit errichtete König Ramses II (1301-1234 v. Chr.) sich selbst in Abu Simbel. Das verhinderte indessen nicht, dass er an den Folgen einer schweren Arteriosklerose zugrunde ging.“ (Thorwald 1962, S. 42).

Die Weltgesundheitsoganisation (WHO) definiert die Atherosklerose als „…variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten, Blut und molekularen Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit hieraus resultierenden Veränderungen der Media.“ (Riede und Schäfer 1995, S. 437).

Nach Stary kann der atherosklerostische Prozess in fünf Phasen eingeteilt werden (Tab. 1) (Gutstein und Fuster 1999; Stary et al. 1994):

Tabelle 1 Stadien der Atherosklerose

Darstellung der Veränderungen über die Zeit sowie ggf. klinische Anzeichen; Modifiziert nach Gutstein und Fuster (1999, S. 324).

1.-30. Lebensjahr	I.	Intimale Verdickung, minimale Lipideinlagerungen, vereinzelt Schaumzellen, ohne klinische Zeichen
	II.	Sogenannte „fatty streaks“, gebildet durch zahlreiche Schaumzellen, vereinzelt Lymphozyten und Mastzellen
>30. Lebensjahr	III.	Präatherom, Nachweis freier Lipide, Reduktion der extrazellulären Matrix
	IV.	Atherom, Lipidsee, glatte Gefäßmuskelzellen, mögliche klinische Zeichen: Angina pectoris
>40. Lebensjahr	Va.	Fibroatherom
	Vb.	Atherom mit starken Kalzifizierungen
	Vc.	Atherom mit organisierten intramuralen Thromben
	VI.	komplizierte Läsion mit rupturierter Deckplatte, intramuraler Hämorrhagie und/oder aufgelagerten Thromben

Die von Ross (1999) entwickelte und modifizierte „response-to-injury“-Hypothese gilt nach heutigem Wissensstand als allgemein anerkannt. Die Hypothese postuliert die Dysfunktion des Endothels als den initialen Schritt der Atherosklerose. Dies konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Davignon und Ganz 2004). Neben den klassischen Risikofaktoren (Tab. 2) konnten noch weitere identifiziert werden, die mit der Entstehung und Progression einer kardiovaskulären Erkrankung korrelieren (Vapaatalo und Mervaala 2001). Dazu gehören unter anderem ein erhöhter Fibrinogenspiegel, eine erhöhte Plasmakonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) (Dietel et al. 2003) sowie eine Zunahme

der Plasmaviskosität (Yarnell et al. 1991).

Tabelle 2 Koronare Risikofaktoren nach NCEP-ATP-III

Risikofaktoren für Patienten ohne KHK und ohne Diabetes mellitus; Übernommen von NCEP-ATP-III (Grundy et al. 2004, S. e158).

Zigarettenrauchen
Hypertonie RR >140/90 mmHg
HDL-Cholesterin < 1,0 mol/l
Familiäre Anamnese für vorzeitige KHK (Verwandte 1. Grades: männlich <55 Jahre, weiblich < 65 Jahre)
Alter (männlich ≥ 45 Jahre, weiblich ≥ 55 Jahre)

Die Folgen der Atherosklerose können koronare Herzkrankheit (KHK), periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und zerebrovaskuläre Durchblutungsstörungen sein. Mehr als 3000 Jahre nach König Ramses II sind der Herzinfarkt als Folge der KHK und der zerebrale Insult epidemologische Krankheitsbilder, die in den USA, Deutschland und vielen anderen westlichen Industriestaaten die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter darstellen (Braunwald 1997, Breslow 1997).

Somit ist die primäre Prävention, die Vermeidung der Atherosklerose und ihrer Schäden, sowie danach die Vermeidung von erneuten Manifestationen (sekundäre Prävention), ein wichtiges Ziel der Medizin.

1.2 Risikofaktor Hypercholesterinämie

Der bedeutende Zusammenhang zwischen der Höhe des Serumcholesterins und des Auftretens einer koronaren Herzerkrankung wurde in großen epidemiologischen Studien, wie der Framingham-Studie (Kannel et al. 1971), dem „Multiple Risk Factor Intervention“ Versuch (Stamler et al. 1986) und der Whitehall-Studie (Davey Smith und Pekkanen 1992) bewiesen. Cholesterin ist im Blut an Proteine, sogenannte Apolipoproteine gebunden. Je nach Zusammensetzung von Triglyzeriden, Cholesterin, Cholesterinestern und Phospholipiden werden die Lipoproteine in verschiedene Dichteklassen unterteilt:

VLDL = Very-low-density-lipoproteins, bestehen zu 85-90% aus Triglyzeriden und 10-15% aus Apolipoproteinen.

LDL = Low-density-lipoproteins, entstehen aus VLDL und bestehen zu 75% aus Lipiden, (darin enthalten 65-70% Cholesterin) und zu 25% aus Apolipoproteinen.

HDL = High density lipoproteins, bestehen zu 50% aus Apolipoproteinen und 50% aus Cholesterin und Phospholipiden.

Der entscheidende Anteil des Gesamtcholesterins, das LDL-Cholesterin sowie modifiziertes

LDL-Cholesterin spielen in der Atherogenese eine zentrale Rolle.

LDL entsteht aus dem Abbau von VLDL in der Leber und stellt das Haupttransportprotein für Cholesterin im Plasma dar. Es versorgt die peripheren Zellen mit dem Grundbaustein Cholesterin, das aus der Nahrung aufgenommen oder von den Leberzellen endogen produziert wurde. Die Aufnahme der LDL-Partikel aus dem Blut in die Endothelzelle erfolgt über einen LDL-Rezeptor-gesteuerten Prozess. Bei einer Störung der Rezeptoren oder einem Überangebot an LDL gewinnen unspezifische Abbauwege durch Makrophagen und andere Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) an Bedeutung. Hierbei kommt es zu einer Akkumulation von LDL in der Gefäßwand. LDL fungiert als Stimulation für Adhäsion und Migration von Monozyten in die Intima. Monozyten wandern in die Gefäßwand ein und werden aktiviert und zu Makrophagen umgewandelt. Makrophagen nehmen das überschüssige LDL ebenso über spezifische LDL-Rezeptoren, hier Apo-B- und -E-Rezeptoren genannt, auf. Diese Rezeptoren unterliegen einem natürlichem Regulierungssystem, um eine Überladung der Makrophagen mit Cholesterin zu vermeiden. Makrophagen besitzen jedoch zusätzliche LDL-Rezeptoren für modifiziertes LDL, die sogenannten Scavenger-Rezeptoren. Da diese Rezeptoren keiner beschränkenden Regulation unterliegen, kommt es zu einer hohen Cholesterinüberladung der Makrophagen (Steinberg HO et al. 1997).

Die Modifizierung des LDLs ist abhängig von der Verweildauer in der Intima der Gefäße. Durch die Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix innerhalb der Gefäßintima werden die Lipoproteine von den Antioxidanzien des Plasmas getrennt und können so einer progressiven Oxidation unterzogen werden (Steinberg D 1997). Es zeigte sich, dass oxidiertes LDL (ox-LDL) die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) hemmt und die Expression der NO-Synthase herabreguliert. Dies führt zu einem Ungleichgewicht der Vasodilatatoren und Vasokonstriktoren mit dem Ergebnis einer Überempfindlichkeit gegenüber letzteren (Libby 2000). In Endothelzellen induziert ox-LDL die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle (VCAM)-1, P-Selektin, (Chen et al. 2002) und löst so eine Hochregulation der Genexpression des Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktors (MCSF)-1 und Monozyten-Chemoattractant-Proteins (MCP)-1 (Leonard und Yoshimura 1990, Rajavashisth et al. 1990) aus, die eine direkte Migration von Leukozyten ermöglichen. Das Internalisieren von modifizierten Lipoproteinpartikel in Plaquemakrophagen, die hierzu verstärkt Scavenger-Rezeptoren ausbilden, führt zur Umwandlung der mononukleären Phagozyten zu Schaumzellen (Tab. 1 I+II) (Han et al. 1997, Steinberg HO et al. 1997). Die Bezeichnung Schaumzellen stammt von dem charakteristischen histologischen Bild der

Zellen mit den aufgetriebenen lipidhaltigen Vakuolen im Zytoplasma der Zellen. Sie sind charakteristisch für die frühe Phase der Atherosklerose (Rajavashisth et al. 1990, Han et al. 1997, Steinberg HO et al. 1997). In der weiteren Atheromentwicklung schütten Schaumzellen Zytokine, wie Tumornekrosefaktor (TNF)-α und Interleukin (IL)-1, die ihrerseits die Expression von vaskulären Zelladhäsionsmolekülen (VCAM)-2 oder intrazellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM)-1 in Endothelzellen induzieren, aus. Das von Makrophagen und glatten Muskelzellen präsentierte ox-LDL aktiviert die T-Lymphozyten, die sich ebenfalls in der Intima der Arterie befinden, wodurch es zur weiteren Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren kommt. All dies wirkt an der Entstehung und Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion in der Gefäßwand mit. Somit entstehen atherosklerotische Plaques.

Des Weiteren hemmt ox-LDL die Produktion von Endothelium-derived relaxing Factor (EDRF) und führt somit direkt zu einer funktionellen Schädigung des Endothels (Glasser et al. 1996).

Der Gegenspieler des „bösen“ Cholesterins, dem LDL, ist das HDL und wird als „negativer Risikofaktor“ bezeichnet, da es eine Schutzwirkung auf die Gefäße ausübt. HDL hat die Aufgabe, Cholesterin aus den Zellen aufzunehmen und zurück zur Leber zu transportieren. Hohe HDL-Spiegel haben somit eine protektive, antiatherogene Wirkung. Das Verhältnis von HDL und LDL sollte nicht unter 1:4 liegen, wobei ein Serumcholesterinspiegel unter 180 mg/dl (Normwert 140-180 mg/dl), ein LDL-Cholesterin um die 100 mg/dl und ein HDL-Cholesterin über 45 mg/dl (Normwert 35-45 mg/dl) angestrebt werden sollte (McKenney 2003).

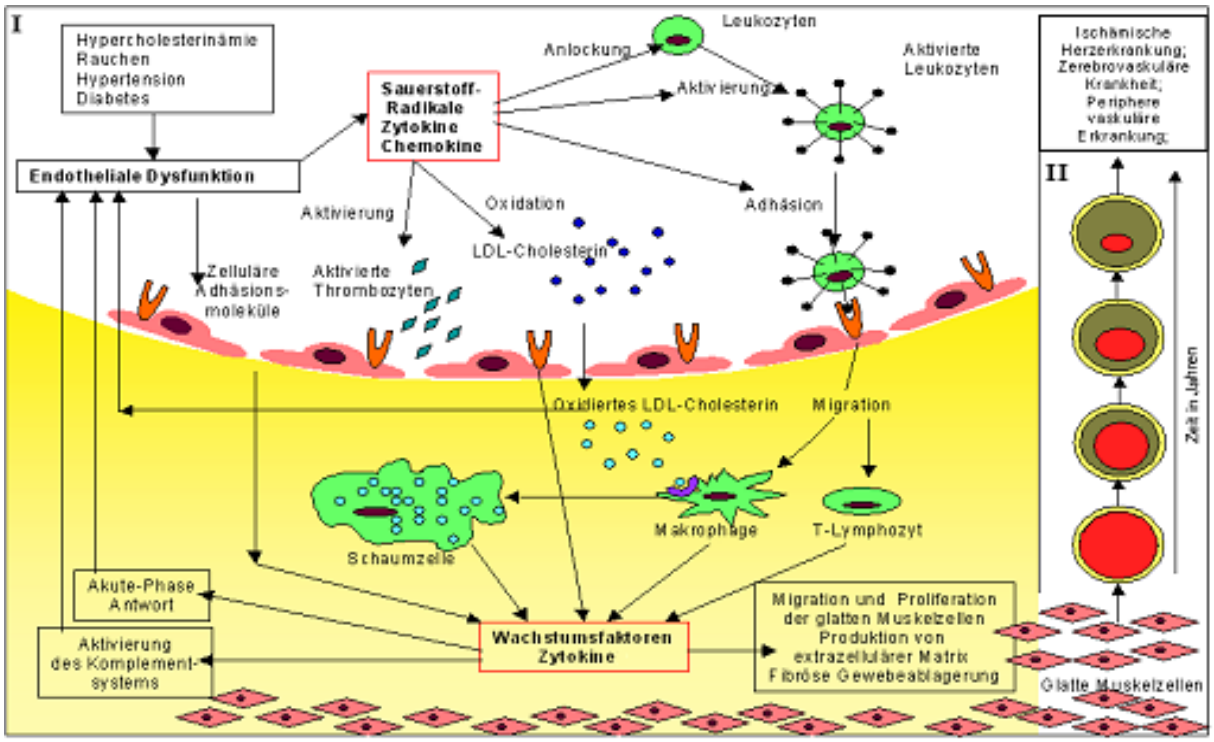


Abbildung 1 Darstellung der wichtigen Faktoren der Atherosklerose

I Schema wichtiger Faktoren und deren Funktionen und Effekte im Prozess der Atherosklerose;

II Die schematische Entwicklung des Gefäßlumens (rot), unter anderem als Folge der Aktivierung der glatten Muskelzellen, über die Zeit in Jahren mit den spätestens am Ende auftretenden Symptomen Plaque (braun), Gefäß (gelb); Abbildung modifiziert nach Francisco et al. (2006, S. 2).

Die Zielwerte des LDL sind festgelegt im National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel-III (NCEP-ATP-III) (Grundy et al. 2004).

Tabelle 3 Gewünschte LDL-Konzentrationen nach der NCEP-ATP-III

Gewünschte Cholesterinkonzentrationen abhängig von KHK und Risikofaktoren; Übernommen von NCEP-ATP-III (Grundy et al. 2004, S. e158).

KHK positiv,	KHK negativ,	KHK negativ,
>20% Risiko	mit ≥ 2 Risikofaktoren;	mit 0-1 Risikofaktor
	< 20% Risiko	
LDL-C < 100 mg/dl (2,6 mol/l)	LDL-C <130 mg/dl (3,4 mol/L)	LDL-C < 160 mg/dl (4,1 mol/L)
Optional <70 mg/dl (1,8 mol/L) bei sehr hohem Risiko oder TG erhöht		

Dies ist von besonderer Bedeutung, da es Patienten gibt, die, genetisch bedingt, diese oben aufgeführten Zielwerte deutlich überschreiten und somit ein deutlich erhöhtes Risiko der Atherosklerose entwicklung haben. Zu dieser Erkrankung gehört die familiäre Hypercholesterinämie. Aufgrund der aufgezeigten Rolle des LDLs ist die cholesterinreduzierende Therapie ein wichtiger Faktor in der primären als auch sekundären

Prävention der Atherosklerose.

1.3 Krankheitsbild: Familiäre Hypercholesterinämie (FH)

Die familiäre Hypercholesterinämie ist eine der bekanntesten und schwersten monogenetisch autosomal-dominant vererbten Formen einer Fettstoffwechselstörung (Goldstein und Brown 2001). Es liegt eine Störung des LDL-Rezeptors, der entscheidenden Schnittstelle zwischen dem Cholesterin tragenden LDL und der abbauenden Zelle, vor. Diese Störung kann zum einen auf einer Mutation des LDL-Rezeptorgens mit einer daraus folgenden Erhöhung des Cholesterinsspiegels auf über 500 mg/dl basieren. Zum anderen kann eine Mutation des Apo-B100, der anbindende Teil des LDLs, in heterogener Ausprägung einen Anstieg des Cholesterins auf Werte von 200-450 mg/dl, bei homozygoten Merkmalsträgern auf über 450 mg/dl bewirken. Klinisch kann man diese Gruppen nicht unterscheiden und ordnet sie nach Fredrickson in die Gruppe IIa ein (Tab. 4). Patienten mit diesen Störungen bilden somit eine Risikogruppe für alle Manifestationen der Atherosklerose und deren Folgen.

Tabelle 4 Einteilung der Hypercholesterinämie nach Fredrickson

Einteilung der Hypercholesterinämie nach Fredrickson anhand der durch Lipidelektrophorese bestimmten Lipoproteinfraktionen; modifiziert nach Mehnert (1990, S. 279).

Typen	I	IIa	IIb	III	IV	V
Cholesterin	normal	erhöht	erhöht	erhöht	(erhöht)	(erhöht)
Triglyzeride	erhöht	normal	erhöht	erhöht	erhöht	erhöht
LDL-Cholesterin	erniedrigt	erhöht	erhöht	(erhöht)	normal	(erniedrigt)
HDL-Cholesterin	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt
Lipidelektrophorese	alpha, prae-ß, ß	alpha, prae-ß	alpha	alpha, (ß)	alpha, ß	alpha, ß
Atheroskleroserisiko	nein	hoch	hoch	hoch	mäßig erhöht	gering erhöht

Aufgrund der in Tabelle 4 gezeigten Einteilung kann in verschiedene klinische Gruppen unterschieden werden (Tab. 5). Die Gemeinsamkeit aller Gruppen sind die erhöhten Werte für LDL-Cholesterin im Nüchternserum.

Tabelle 5 Charakteristika der isolierten und gemischten Hypercholesterinämie

Auflistung der familiären Hypercholesterinämie unter Angabe der Plasmalipidkonzentration in Form des Gesamtcholesterinspiegels (Gesamt-C) und der Triglyzeridkonzentration (TG), des erhöhten Lipoproteintyps [LDL, Very-low-density Lipoprotein (VLDL), Intermediate-density Lipoprotein (IDL)], des Phänoptyps (Tab. 4) und der klinischen Zeichen aufgeführt; übernommen aus Dietel et al. (2003, S. 2451).

Lipidphänotyp	Plasmalipidspiegel in mg/dl	Lipoproteine Erhöhung von	Phäno-typ	Klinische Zeichen
Isolierte Hypercholesterinämie				
Familiäre Hypercholesterinämie	Heterozygote: Gesamt-C = 275-500	LDL	IIa	Normalerweise Entwicklung von Xanthomen im Erwachsenenalter, Gefäßerkrankungen im Alter von 30-50 Jahren;
	Homozygote: Gesamt-C > 500	LDL	IIa	Normalerweise Entwicklung von Xanthomen und Gefäßerkrankungen in der Kindheit;
Familiärer Apo-B100-Defekt	Heterozygote: Gesamt-C = 270-500	LDL	IIa	
Polygene Hypercholesterinämie	Gesamt-C = 250-350	LDL	IIa	Normalerweise asymptomatisch bis Gefäßerkrankungen auftreten, keine Xanthome;
Hypertriglyzeridämie und Hypercholesterinämie = gemischte Hypercholesterinämie				
Kombinierte Hyperlipidämie	TG = 250-750 Gesamt-C = 250-500	VLDL, LDL	IIb	Normalerweise asymptomatisch bis Gefäßerkrankungen auftreten, bei der familiären Form können isoliert hohe TG- oder hohe LDL-Werte auftreten;
Dysbeta-lipoproteinämie	TG = 250-500 Gesamt-C = 250-500	VLDL, IDL,LDL normal	IIII	Normalerweise asymptomatisch bis Gefäßerkrankungen auftreten, palmare oder tuberoeruptive Xanthome können auftreten;

Die heterozygote Form der FH (Tab. 5) tritt mit einer Häufigkeit von 1 zu 500 auf. Diese Patienten leiden an einem (ab der Geburt) lebenslang konstant erhöhten LDL-Plasmaspiegel. Der Gesamtcholesterinspiegel liegt ohne Behandlung zwischen 275-500 mg/dl. In der Regel kommt es schon im jungen oder mittleren Erwachsenenalter zu einer schweren Atherosklerose. Männer mit dieser Form der FH entwickeln eine KHK bereits in der vierten Lebensdekade oder früher (Dietel et al. 2003), Frauen durchschnittlich 10 Jahre später (Stone et al. 1974). Insgesamt lassen sich bei 5% der Patienten mit einem Herzinfarkt vor dem 60. Lebensjahr der Genotyp einer FH nachweisen.

Die homozygote Form der FH (Tab. 5) tritt mit einer Häufigkeit von 1 auf 1 000 000 auf und geht mit einer deutlichen Erhöhung des Plasmagesamtcholesterinspiegels >500 mg/dl, großen Xanthelasmen und prominenten Sehnen- und Hautxanthomen einher. Die betroffenen Personen leiden früh an einer schweren KHK, die sich bereits in der Kindheit manifestieren

kann (Dietel et al. 2003). Meist führen die kardialen Ereignisse vor dem 20. Lebensjahr zum Tode (Allen et al. 1980).

1.4 Therapieoptionen der Cholesterinreduktion

Die therapeutischen Maßnahmen bestehen je nach Ausprägung der Hypercholesterinämie aus:

- Diät und körperlicher Aktivität
- Medikamenten (mit Statinen, Ionenaustauschern, Fibrinsäurederivaten,Nikotinsäurederivaten und Ezetimib)
- LDL-Apherese.

Die Basis jeder fettsenkenden Therapie sind Diät und körperliche Aktivität. Der nächste Schritt ist die medikamentöse Behandlung. Dabei stehen Statine und Ezetimib an erster Stelle: Statine als Substanzgruppe der ersten Wahl für FH hemmen kompetitiv das letzte Regulationsenzym, die HMG-CoA-Reduktase, der intrazellulären Cholesterinsynthese in der Leber. Die endogene Cholesterinproduktion nimmt ab, zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Cholesterinkonzentration kommt es zu einer Hochregulation der LDL-Rezptoren und einer erhöhten Aufnahme von exogenem Cholesterin aus dem Blut. Bei Behandlung mit maximaler Dosis kann eine Reduktion der LDL-Konzentration um 24 bis 60% erreicht werden (The Lovastatin Pravastatin Study Group. 1993, Pravastatin Multicenter Study Group II. 1993, The Simvastatin Pravastatin Study Group. 1993, The Pravastatin Multinational Study Group for Cardiac Risk Patients. 1993). Über eine Hemmung von Metaboliten des Mevalonats zeigen sich positive Effekte im Hinblick auf endotheliale Funktion, Entzündungsmediatoren, Intima-Media-Bindung und prothrombotische Faktoren, sowie Stabilisierung der Plaqueformationen (Paoletti et al. 2005). Statine, als primäre oder sekundäre Prävention bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung, bewirken einen Inzidenzabfall der kardialen Ereignisse von 25 bis 60% (The Lovastatin Pravastatin Study Group. 1993, Pravastatin Multicenter Study Group II. 1993, The Simvastatin Pravastatin Study Group. 1993, The Pravastatin Multinational Study Group for Cardiac Risk Patients. 1993, Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. 1994, Shepherd 1995).

Durch Ezetimib besteht die wichtige medikamentöse Möglichkeit, die intestinale Cholesterinresorption um 50 bis 23% zu reduzieren (Sudhop et al. 2002). Der Stoff rezirkuliert im enterohepatischen Kreislauf, wobei die fluktuierende systemische Konzentration mit der LDL-Reduktion korreliert (Ezzet et al. 2001). Es ist das erste lipid-senkende Medikament, das die intestinale Aufnahme von Nahrungs- und biliärem Cholesterin, ohne Beeinflussung der Absorption fettlöslicher Nährstoffe, hemmt (Kosoglou et al. 2005). In den pharmakologisch schwierig zu behandelnden Fällen der homozygoten FH

bewirkte eine zusätzliche Behandlung mit Ezetimib, zusätzlich zu dem senkenden Effekt von Simvastatin oder Atrovastatin, eine Reduktion des LDL um 20% (Gagne et al. 2002).

1.5 LDL-Apherese

Die dritte Behandlungsmöglichkeit ist die invasive LDL-Apherese. Das Wort Apherese stammt aus dem Griechischen und bedeutet „wegnehmen“ (Thompson G 2003). Die therapeutische Apherese wird zur extrakorporalen Reinigung des Blutes (in Quantität oder Qualität) von pathologischen Proteinen oder Zellen angewendet (Bosch und Wendler 2004). Der Begriff LDL-Apherese steht für alle Methoden der extrakorporalen Entfernung von Apo-B enthaltenden Bestandteilen, vor allem des LDL-Cholesterins aus dem Blut (Klingel et al. 2003).

Diese Therapieoption ist in Deutschland nur bei der kleinen Patientengruppe indiziert, die trotz aller aufgeführten Therapiemaßnahmen nicht die Ziele des NCEP-ATP-III (Tab. 3) erreicht (Grundy et al. 2004). Diese wenigen Patienten leiden an der Kombination einer schweren Dysregulation der Lipoproteine (heterogene FH) mit einem atherosklerotisch bedingten Endorganschaden und einer erhöhten LDL-Blutspiegels trotz maximaler Basis und medikamentöser Therapie, oder unter homozygoter FH.

Insgesamt gibt es zurzeit sechs verschiedene Methoden der LDL-Apherese, wobei in unserer Klinik die folgenden drei Verfahren benutzt werden:

- Membrandoppelfiltration (MDF)
- Heparin-induzierte LDL-Präzipitation (HELP®)
- Direktadsorption von Lipoproteinen (DALI®).

Dabei wird bei dem MDF und HELP® das Plasma vor der Reinigung mittels eines Hollow-fiber-Plasmaseperators von den restlichen Blutbestandteilen abgetrennt, bei DALI® wird das Vollblut behandelt.

1.5.1 Membrandoppelfiltration (MDF)

Diese Methode (Abb. 2 I) wurde von Agishi et al. in Japan entwickelt und war die erste moderne Technik der LDL-Apherese (Agishi et al. 2000).

Das Prinzip entspricht einer größenselektiven Filtration des Plasmas mittels einer speziellen Membran, das heißt die Partikelgröße des LDL (ca. 3 Millionen Dalton) ist hierbei entscheidend und alle Teilchen die größer sind werden mitherausfiltriert (Abb. 2 II). Nach Durchlaufen des Plasmafilters passiert das Plasma den Sekundärfilter (EC-50® mit einer Oberfläche von 2,0 m²), in dem der eigentliche Prozess stattfindet (Klingel et al. 2002). Nach mehreren Verbesserungen der Methode zur Erhöhung der Selektivität entstand das als

Thermofiltration bezeichnete Verfahren. Die benutzte Maschine (Octo Nova, Diamed, Cologne, Germany) verfügt über ein Heizsystem, um das Plasma konstant auf einer Temperatur von 38°C zu halten, und so Veränderungen des Cryogels des Sekundärfilters zu verhindern. Dies erhöht so die Selektivität der LDL-Filtration (Matsuda et al. 1995).

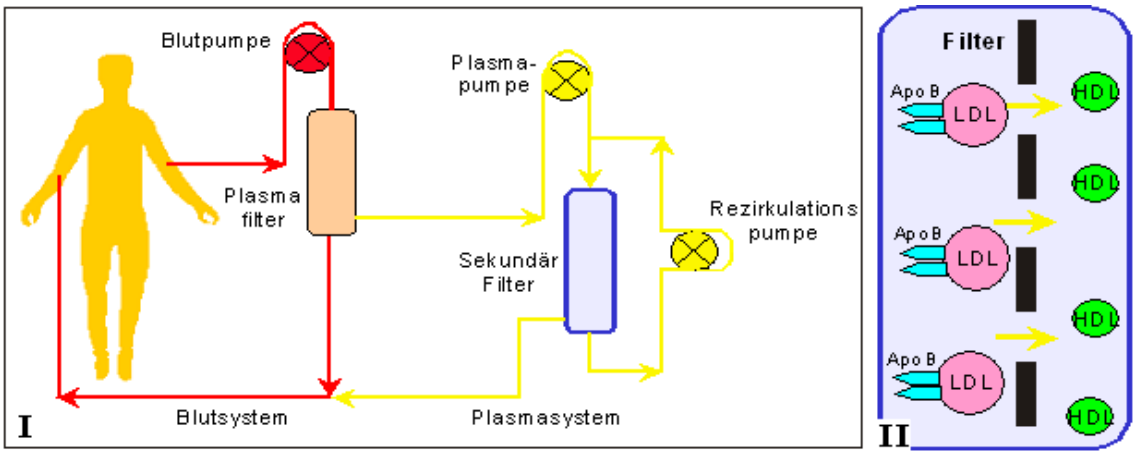


Abbildung 2 Darstellung des Prinzips des Verfahrens der MDF-Apherese

Abbildung ist modifiziert nach dem Vortrag „LDL-Apherese“ Göttingen, 2006 (Koziolek 2006);

I Darstellung des Wegs des Blutes bzw. des Plasmas während des MDF-Verfahren mit Durchlaufen der verschiedenen Filter.

II Abbildung des Prinzips des Sekundärfilters EC-50®, die Apo-B-LDL-Partikel können die Membran nicht passieren; anders als das „gute“ HDL.

1.5.2 Heparin-induzierte LDL-Präzipitation (HELP®)

Dieses Verfahren (Abb. 3 I) nutzt die Eigenschaft des LDL, Lp(a) und Fibrinogen in der Anwesenheit von kleinmolekularen Polyanionen (<50.000 Dalton), wie Heparin, bei saurem pH-Wert Präziptate zu bilden. Nach Absenkung des pH-Wertes auf 5,12 bilden sich unlösliche Heparin-Protein-Komplexe aus den bei neutralem pH-Wert löslichen Stoffen (Burstein 1957). Diese unterschiedlichen Fällungseigenschaften der Lipoproteine nutzen Wieland und Seidel (1983), um selektiv das LDL aus dem Plasma zu entfernen.

Separiertes Plasma wird kontinuierlich mit Natriumacetatpuffer 0,2 M (pH 4,84), versetzt mit 100 IE Heparin/ml, im Verhältnis von 1:1 gemischt. Die daraufhin ausfallenden Heparin-LDL-Komplexe (Abb. 3 II) werden mittels des Präzipitatfilters aus Polycarbonat (0,4 mm Porengröße, 1,7 m² Fläche) aus dem restlichen Plasma herausgefiltert. Nach Entfernung des Heparins mittels eines Polyanionenaustauschers (DEAE-Zellulose), sowie pH- und Volumenkorrektur mittels Bikarbonatdialyse wird das LDL-reduzierte Plasma dem Patienten gefahrlos wieder zugeführt (Mellwig 2002).

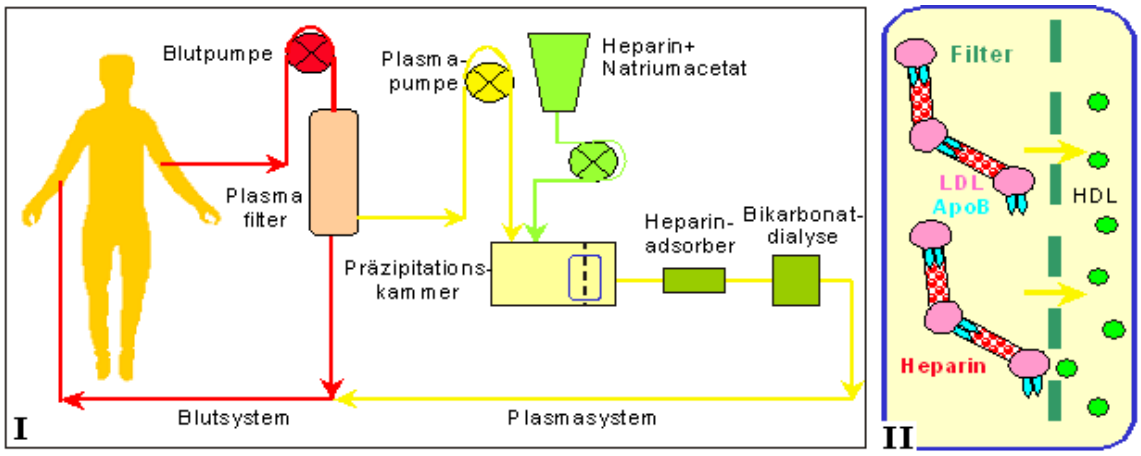


Abbildung 3 Darstellung des Prinzip des Verfahrens der HELP®-Apherese

Abbildung modifiziert nach dem Vortrag „LDL-Apherese“ Göttingen, 2006 (Koziolek 2006);

I Darstellung des Kreislaufes des Blutes bzw. des Plasmas während der Behandlung mit dem HELP®-Verfahren.

II Darstellung des Prinzips der Präzipitationskammer, die Heparin-LDL-Komplexe können nicht die Membran passieren, anders als das „gute HDL“.

1.5.3 Direktadsorption von Lipoproteinen (DALI®)

Die neuste Entwicklung auf dem Gebiet der Apherese ist die Vollblutadsorption DALI® (Abb. 4 I) von Bosch et al. (1997). Es ist das bis jetzt einzige Verfahren, das eine Elimination von LDL und Lp(a) im Vollblut, d. h. ohne vorherige Abtrennung der Blutzellen, ermöglicht.

Der Adsorber besteht aus negativ geladenen polyacrylatüberzogenen Polyacrylamidperlen (Durchmesser 150-200 µm) mit schwammähnlicher Struktur (Porengröße ca. 100 nm). Hierbei entsteht im Inneren im Vergleich zur Außenseite eine enorme Oberflächenvergrößerung auf ca. 1200 m² (ca. 99% der Gesamtoberfläche des Adsorbers). Das Plasma mit den darin enthaltenen Lipoproteinen kann, im Gegensatz zu den großen korporalen Blutbestandteilen, ungehindert passieren und hat großflächig Kontakt mit der negativ geladenen Innenoberfläche. Die Blutzellen hingegen sind zu groß für die Poren und berühren daher nur die Außenoberfläche, also einen Bruchteil der Gesamtoberfläche. So ersetzt die Struktur der Perlen den Plasmaseperator. An der polyacrylatüberzogenen Innenoberfläche findet die eigentliche Absorption der LDL-Lipoproteine statt (Abb. 4 II). Die Polyacrylatliganden besitzen die gleichen Eigenschaften, wie der LDL-Rezeptor, er besteht aus Polyanionen mit negativ geladenen Carboxylgruppen. Somit wird das positiv geladene Apoprotein-B100, das den Proteinanteil des LDL, Lp(a) und VLDL darstellt, mittels elektrostatischer Wechselwirkung gebunden. HDL und Fibrinogen werden nur unwesentlich unspezifisch gebunden. Als Antikoagulation dient eine ACD-A-Lösung (acid citrate dextrose-A), welche im Verhältnis von 1:20 bis 1:40 dem Blut vor dem Adsorber zugeführt wird

(Bosch und Keller 2002).

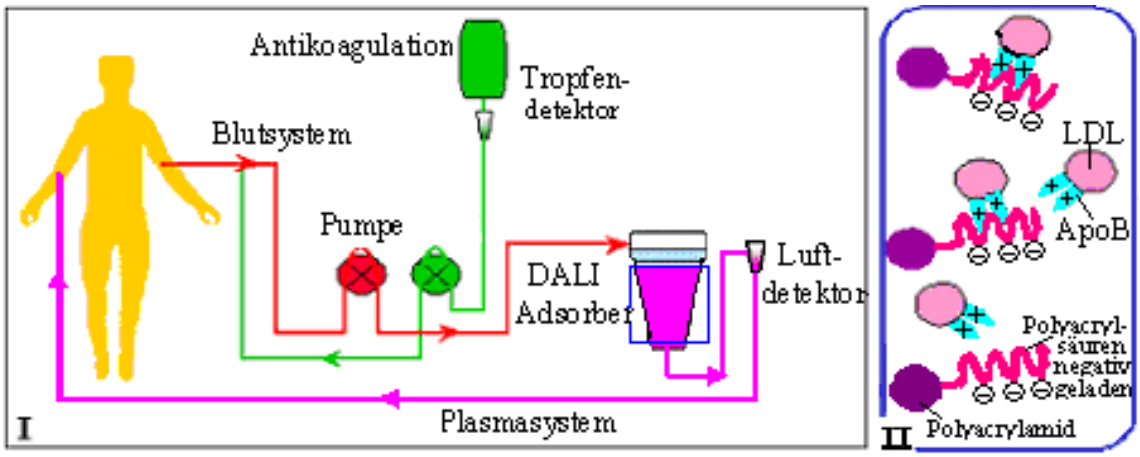


Abbildung 4 Darstellung des Prinzips des Verfahrens der DALI®-Apherese

Abbildung modifiziert nach dem Vortrag „LDL-Apherese“ Göttingen, 2006 (Koziolek 2006);

I Darstellung des Verlaufs des Blutes während einer DALI®-Behandlung.

II Darstellung des chemischen Prinzips des DALI®-Adsorbers, Anbindung der LDL-Partikel mittels der elektrostatischen Anziehung des positv geladenen Apo-B und der negativ geladenen Polyacrylsäuren v.a. in den Poren der schwammähnlichen Perlen.

1.5.4 Effektivität der Methoden

Alle drei Verfahren entfernen LDL, haben jedoch aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Prinzipien verschiedene Eigenschaften, was die Selektivität und Spezifität von anderen Plasmaproteinen betrifft. Hieraus resultieren verschiedene Nebeneffekte der verschiedenen Verfahren (Tab. 6).

Tabelle 6 Eigenschaften der benutzten LDL-Apherese-Techniken

Auflistung der verschiedenen Eigenschaften (Kapazität, Selektivität, Komplexität, Vorteile, Nachteile) der drei Verfahren (MDF, HELP®, DALI®) im Vergleich (+++ hoch; ++ mittel; + niedrig;); übernommen von Bosch (2005, S. 466).

	MDF	HELP®	DALI®
Kapazität	++	++	++ (+)
Selektivität	+ (+)	++	++
Komplexität	++	+++	+
Vorteile	Verbesserung der Hämorheologie;	Verbesserung der Hämorheologie;	Durchführung ist leicht und schnell;
Nachteile	Verlust von IgM;	Komplexität der Maschine;	Bradykinin Produktion erhöht;

Die klinischen Effekte der LDL-Apherese umfassen die Verminderung der Morbidität und Mortalität der koronaren Herzerkrankung, die Verlangsamung der Progression von

Koronarstenosen, die Verminderung der Plaqueareale und die Verbesserung der koronaren Reserve. Die Absenkung der Konzentration des LDL-Cholesterins im Blut mittels LDL-Apherese reduziert signifikant die Rate zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse dieser Patientenguppe (Mabuchi et al. 1998). Weitere Eigenschaften, wie die Reduktion VLDL und Lipoprotein(a) [Lp(a)], Gerinnungsfaktoren, Plasmaviskosität, Erythrozytenaggregation und der Adhäsionsmoleküle, können positive Effekte bewirken. Ebenso konnte eine Verbesserung des NO-Angebots mit einem damit einhergehenden positiven Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion gefunden werden.

Alle verschiedenen Techniken reduzieren LDL-C und Lp(a) effektiv um mehr als 60% pro Behandlung unter den passenden Bedingungen (Klingel et al. 2003). Zusätzlich werden auch andere Plasmabestandteile reduziert (Tab. 7).

Tabelle 7 Einflüsse der drei Aphereseverfahren auf bestimmte Plasmakomponenten

Reduktion der verschiedenen Plasmaproteine in % [LDL-C, HDL-C, Lp(a), Triglyzeride, Fibrinogen und Immunglobulin G (IgG)] nach Behandlung mit den verschiedenen Apheresemethoden, wie von verschiedenen Autoren für die einzelnen Verfahren (MDF, HELP®, DALI®) in der Literatur beschrieben.

Plasmabestandteile	MDF (Julius et al. 2002)	HELP® (Eisenhauer et al. 1987, Schaumann et al. 1996, Park et al. 1998, Richter et al. 1999)	DALI® (Bosch et al. 1997, Jansen et al. 2000, Schechner et al. 2004)
LDL-C	61%	55-61%	53-76%
HDL-Cn	6%	5-17%	5-31%
Lp(a)	61%	55-68%	28-74%
Triglyzeride	56%	20-53%	29-47%
Fibrinogen	42%	51-58%	13-16%
IgG	14%	16%	15-20%

Weiterhin wurden die folgenden Effekte in der Literatur beschrieben: Die Apherese mit der HELP®-Methode senkt zusätzlich den CRP-Spiegel und hemmt so die Expression der Leukozytenadhäsionsmoleküle, wie E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1, in Endothelzellen (Empen et al. 2002). Die LDL-Apherese könnte die Widerstandsfähigkeit des LDL gegenüber der Oxidation verbessern, obwohl der genaue Mechanismus hierfür noch nicht bestimmt ist (Leitinger et al. 1996). Ebenso kommt es durch die LDL-Apherese akut zu einer Verminderung der Plasmaviskosität und der Erythrozytenaggregation und einer Zunahme der Erythrozytenverformungsfähigkeit. Dieser Rückgang der Plasmaviskosität ist vor allem auf die Reduktion der Fibrinogenkonzentration zurückzuführen. Hiermit verringern sich die kardialen Ereignisse, wie Myokardinfarkt und plötzlicher Tod (Thompson SG et al. 1995). Ferner verbessert sich durch die LDL-Apherese die Funktion des Endothels. So zeigte eine

einzige LDL-Apheresebehandlung in der Unterarm-Blutdruck-Plethysmographie und einer Ultraschalldarstellung der Arteria brachialis eine Steigerung der endothelabhängigen Vasodilatation nach Acteylcholingabe (Tamai et al. 1997). Des Weiteren ließ sich eine Verbesserung der koronaren Vasodilatationskapazität (koronare Reserve) von 30% in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Darstellung innerhalb von 24 Stunden nach einer einzelnen Apheresebehandlung feststellen (Mellwig et al. 1998). Der Mechanismus zur Erzielung der erhöhten Flussreserve könnte die Verstärkung der Vasodilatation über die Produktion von Bradykinin, Prostazyklin und NO beinhalten und korreliert mit dem Rückgang des ox-LDLs nach der Apherese (Tamai et al. 1997). Statine haben eine Verbesserung der Funktion des Endothels innerhalb von 6 Monaten gezeigt, während die LDL-Apherese denselben Effekt nach nur einer Behandlung von 3 Stunden erzielte (Tamai et al. 1997).

Verschiedene Studien haben den Einfluss der LDL-Apherese auf die Progression der Atherosklerose untersucht. In der „LDL-Apherese-Regressions-Studie“ (LAARS) (Aengevaeren et al. 1996) wurden die Effekte auf die regionale Myokardperfusion bei unter massiver KHK leidenden Patienten untersucht. Hier zeigte sich durch eine Kombination von Statinmedikation und Behandlung mit zwei LDL-Apheresebehandlungen pro Woche eine Verbesserung der Myokardperfusion gegenüber einer alleinigen medikamentösen Behandlung. Die „Low-Density-Lipoprotein Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial“ (LACMART) (Matsuzaki et al. 2002), eine 1-Jahres-Multicenterstudie, untersuchte die KHK-Progression mit Hilfe von Koronarangiographie und intravaskulärem Ultraschall bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie. Auch hier zeigte sich ausschließlich in der Gruppe mit der LDL-Apherese eine Reduktion des minimalsten Gefäßdurchmessers, wie auch der Fläche des Plaques gegenüber alleiniger Therapie mit Statinen. Ähnliche Resultate zeigte die „Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study“ (L-CAPS) (Nishimura et al. 1999), die Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie mit verschiedenen Therapien (wie oben beschrieben) untersuchte und den KHK-Fortschritt nach 2 Jahren mit einer quantitativen Koronarangiographie überprüfte. Bei 16% der Patienten mit LDL-Apheresebehandlungen zeigte sich eine Plaquerückbildung, während bei alleiniger medikamentöser Therapie die koronare Atherosklerose bei 64% der Patienten fortschritt. Thompson G (2003) veröffentlichte eine Metaanalyse über acht angiographische Studien über eine Dauer von mehr als 2 Jahren. Der Anteil der Patienten mit progressiven Stenosen war bei der Gruppe mit Apheresebehandlung und fettsenkenden Medikamenten (18%) gegenüber der mit alleiniger medikamentöser Therapie (33%) bemerkenswert erniedrigt. Damit

übereinstimmend vergrößerte sich der Anteil der Patienten, bei denen die LDL-Apherese die Progression der KHK zum Stillstand brachte, von 49% in der Medikamentengruppe auf 69% bei den Patienten, die zusätzlich LDL-Apherese erhielten. Die Inzidenz der Regression war in beiden Gruppen gleich. Die Horikuriku-Studie (Mabuchi et al. 1998) zeigte den Einfluss der Apherese auf die schweren Folgeerscheinungen der Atherosklerose. Hier wurden heterozygote FH-Patienten mit zwei Apheresebehandlungen pro Woche und Statinen (N=43) mit einer allein mit Statinen behandelten Kontrollgruppe (N=87) verglichen. Über einen mittleren Zeitraum von sechs Jahren konnte das Risiko, die kombinierten kardialen Endpunkte von koronarer Mortalität, Myokardinfarkten und koronarer Intervention zu erreichen, in der Apherese-Gruppe um 72% gegenüber der Kontrolle gesenkt werden.

Alle großen Studien demonstrieren die positiven Effekte von LDL-Apherese auf kardiale Ereignisse. Zusätzlich zu der Hemmung der Progression der Atherosklerose verbesserte sich mit der LDL-Apherese das Outcome von Patienten mit vorangegangener KHK und Hypercholesterinämie. Kurz- sowie Langzeitstudien zeigten einen Abfall von 45% von kardialem Tod und Myokardinfakt (Gordon et al. 1998).

Allgemein wird die Behandlung mit der LDL-Apherese gut toleriert. Alle Verfahren können bei 1,3% der Behandlungen eine Hypotension auslösen (Thiery und Seidel 1998) und der Spiegel des Serumproteins kann akut abfallen (Kroon et al. 1996), bei dem HELP®-Verfahren treten jedoch diese Nebeneffekte seltener auf.

1.6 Proteomics

Das Proteom wurde ursprünglich als das komplette Proteinkomplement, das durch das Genom exprimiert wird, verstanden (Wilkins et al. 1996). Der Begriff „Proteomics“ wurde erstmals 1995 aus den beiden Wörtern „Protein“ und „genomics“ kreiert, das Konzept, der Analyse der humanen Proteine, hingegen existierte schon seit 1977 und wurde von Norman G. Anderson und N. Leigh Anderson im „Human Proteins Index Project“ aufgestellt (1977). Man erkannte, dass die dynamische Ausführung biologischer Funktionen nicht auf dem starren Genom, sondern auf den exprimierten Proteinen beruht. Entscheidend ist hier die Erkenntnis der Rolle der posttranslationalen Modifikation eines Proteins. So können aus den identischen Translationen eines Gens durch Phosphorylisierung, Glykosylierung oder Acetylisierung Proteine mit verschiedenen Funktionen entstehen (de Hoog und Mann, 2004). Daher gewinnt das Feld der Proteomics an Bedeutung, da die Proteine als ein Komplement des Genoms, also als funktionales Genom verstanden werden. Die experimentellen Methoden sind zwar an sich nicht neu, haben aber von dem Fortschritt in der Genomforschung, der Bioinformatik und der Entwicklung von sensitiven, reproduktiven und stabilen Techniken profitiert. Mit den

Methoden der Proteomics ist das Augenmerk auf die Proteine mitsamt ihrer Struktur, Expression, Lokalisation, biochemischer Aktivität, Interaktionen und Modifikationen gerichtet. Aufgrund dieser Erkenntnisse durch die Proteomics-Forschung ist die lang geltende „Ein–Gen-ein-Protein-Hypothese“ überholt. Die Expression von Proteinen ist nicht starr, sondern eine dynamische Reaktion der Zelle auf die Einflüsse, denen sie ausgesetzt ist. Eine solche Technik erlaubt durch die veränderte Proteinexpression zu bestimmten Zeitpunkten die Detektion von spezifischen Proteinmarkern für verschiedene Zustände, Reaktionen, Entwicklungen und Krankheiten. Vergleiche zwischen Serumproteomen einzelner Patienten erlauben die Identifikation von serologischen Markern, die zur Krankheitsidentifizierung oder zur Krebsdiagnostik eingesetzt werden können (Graham et al. 2004, Lueking et al. 2005). Momentan sind die Proteomics-Methoden die einzigen Methoden, die es ermöglichen das Gesamte von einem Genom expremierte Proteinspektrum zu einem bestimmten Zeitpunkt direkt zu untersuchen.

Eine der meist genutzten Methoden der Proteomics ist die 2-Dimensionale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE). Über die Eigenschaften der elektrischen Ladung und der Masse wird mittels der 2D-PAGE eine zweidimensionale Auftrennung eines komplexen Proteingemisches erreicht (Klose 1975, O'Farrell 1975). Dies ermöglicht eine visuelle Darstellung der verschiedenen Proteinexpressionen eines komplexen Proteingemisches zu einem bestimmten Zeitpunkt. Über diese Darstellung hinaus kann jedes einzelne Protein des Proteoms mit weiteren Schritten identifiziert werden. Die Schritte nach Westmeier (2001) aufgeführt in folgender Reihenfolge:

- Proteinvorbereitung
- SDS-PAGE
- Detektion der Spots
- Analyse der Spots mittels spezieller Software
- Exzision der Spots
- Enzymatische Spaltung der Proteine im Gel
- Analyse der Proteinspaltprodukte mittels Massenspektrometrie
- Datenbanksuche und Proteinidentifizierung.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Hypercholesterinämie ist, wie oben bereits dargestellt, ein bedeutender Faktor der Atherogenese.

Die LDL-Apherese als invasives Verfahren ist somit bei vererbten Hypercholesterinämien die letzte Therapiemöglichkeit. Die Aphereseverfahren anbietenden Firmen werben mit selektiver Entfernung des „bösen“ LDL-Cholesterins. Die in dieser Arbeit angewendeten drei Aphereseverfahren unterscheiden sich aufgrund verschiedener physikochemischer Funktionsprinzipien. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung (mit Hilfe der momentan aktuellen Methoden der Proteomics) eines möglichen Einflusses der verschiedenen Aphreseverfahrenen auf die Eliminierung der funktionell wichtigen Proteine. Des Weiteren sollte der Zusammenhang der Proteineliminierung mit den Aphereseverfahren-Nebenwirkungen diskutiert werden.

Um das Ziel des Vorhabens zu verwirklichen, wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Erstellung eines typischen zweidimensionalen Proteinmusters in Form eines 2D-Gels für jedes Aphereseverfahren zur Erfassung der Gesamtheit der Proteine, die während der Behandlung verloren gehen
- Identifizierung der Gesamtheit der Proteine, die während der Apherese entfernt wurden, für jedes Aphreseverfahren
- Validierung und Semiquantifizierung von potentiell wichtigen eliminierten Proteinen
- Vergleichende Analyse der Proteinmuster und Ermittlung der Unterschiede zwischen den drei benutzten Aphereseverfahren wie auch mögliche Rückschlüsse auf die Selektivität der einzelnen Verfahren
- Funktionelle Einordnung der gefundenen Proteine im Hinblick auf die Atherosklerose und Rückschlüsse auf „Neben“-Effekte, die möglicherweise zur bekannten Wirkung der Apherese beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In der Arbeit wurden folgende Materialien benutzt:

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Es wurden folgende Chemikalien und Enzyme benutzt.

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ammoniumperoxiddisulfat (ambic)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ampholyte 3/10	BioRad, München, Deutschland
Bradford-Reagens	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Butanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CHAPS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brillant Blue G-250	BioRad, München, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rinder-Serum-Albumin	Sigma Aldrich, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Luminal Reagent	Perkin Elmer Inc, Boston, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
MeOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mineralöl	BioRad, München, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulonylfluroid	Fluka, Seelze, Deutschland
Phosphate buffered saline	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Precision Plus Protein Standard	BioRad, München, Deutschland
Roti-Blue	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Fluka, Steinheim, Deutschland
Thiourea	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Urea	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Western Lighting Oxidant Reagent	Perkin Elmer Inc, Boston, USA
Complete^{TM}-Protease	Roche
Trypsin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Antikörper, Antiseren und fertige Kits

Bezeichnung	Hersteller
Affen-Anti-Kaninchen Antikörper	Amersham Biosience, Freiburg, Deutschland GE healthcare
Anti-C2q Komplement (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Kaninchen-Anti-Ziegen Antikörper	Amersham Biosience, Freiburg, Deutschland GE healthcare
Anti-beta-2-Mikroglobulin (Maus)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Anti-alpha-2Makroglobulin (Kaninchen)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Anti-alpha-Antitrypsin (Ziege)	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Anti-Ceruloplasmin (Kaninchen)	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Fibrinogen Kaninchenantikörper	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Komplement Faktor B (Kaninchen)	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Plasminogen (Kaninchen)	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Transferrin (Kaninchen)	Dako, Hamburg, Deutschland
Schaf-Anti-Maus Antikörper	Amersham Biosience, Freiburg, Deutschland GE healthcare
IMMULITE® IL-6	Diagnostic Products Corporation, L.A., USA
IMMULITE® IL-1ß	Diagnostic Products Corporation, L.A., USA
IMMULITE® IL2R	Diagnostic Products Corporation, L.A., USA
IMMULITE® TNF-α	Diagnostic Products Corporation, L.A., USA
Entfärbungskit	Invitogen, Karlsruhe, Deutschland
Untersuchungskit	Dade Behring AG, Marburg, Deutschland

2.1.3 Geräte

Es wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Modell	Hersteller
Elektrophoresekammer	Protean Cell	BioRad, München, Deutschland
Elektrophoresekammer mit zentralem Kühlblock	Protean II XL	BioRad, München, Deutschland
Entwicklungsmaschine	Konica SRX-101 A	Konica, Taiwan
Fokussierkammer	Protean IEF Cell	BioRad,München, Deutschland
Geltrockner	543	BioRad, München, Deutschland
Inkubator	3548	Forma Scientific Inc,Ohio,USA
Kocher	Dri-Block DB-20	Techne, Dublin, Irland
MALDI-TOF-MS	Voyager DE-STR	Applied Biosystems, CA, USA
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland

Photometer	Lambda	Perkin-Elmer &Co GmbH, Stuttgart, Deutschland
Spannungsgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amershan Pharmacia Biotech, UK
Fokussierkammer	Protean-IEF-Cell-Gerät	BioRad, München, Deutschland
Q-TOF MS/MS	Ultima Global Molecular Imager PharosFX Systems	Micromass, Manchester, UK
Schüttler	400	Robbins Scientific, CA, USA
Speed Vakuumzentrifuge	SVC 10 CH	Savant, Holbrook, NY, USA
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex, Berlin, Deutschland
Ultraschallpulser	Brandso Sonifer 250	Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Vertikale Platten-elektrophoreseapparatur	Protean II XL Cell	BioRad, München, Deutschland
Vortexer	REAX Top	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Waage	Universal	Satorius, Göttingen, Deutschland
Western-Blot-Apparatur	Xcell II™ Blot Module	BioRad, München, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge 15 R	Heraeus Sepatech, Berlin, Deutschland
Zentrifuge	Sigma 3-18K	Sigma, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Optima™TL Ultrazentrifuge 100.000 Umdrehungen pro Minute, Modell TL-100	Beckmann, Palto Alto, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
16 well Glasplatten	Nunc, Rochester, USA
6 well Glasplatten	Nunc, Rochester, USA
Amincon Säule	Beverly, MA, USA
Blotmembranen Nitrozellulosemembranen	Amersham Pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK
C18 pepMap µ-Precolumn™	LC Packings, Amsterdam, Niederlande
C18 pepMap 100nano Serie™	LC Packings, Amsterdam, Niederlande
CapLC Autosampler	Micromass, Manchester, UK
Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eluierungssäulen	LC Packings, Dionex, CA, USA
Entwickler RP X-OMAT EX	Kodak, Rochester, USA
Filterpapier	BioRad, München, Deutschland
Fixierer RP X-OMAT LO	Kodak, Rochester, USA
Folienpapier	Haushaltswarengeschäft
Handschuhe Peha Soft	Hartmann, Deutschland
Immobilisierter pH Gradient Streifen	BioRad, München, Deutschland
Platzhalter	BioRad, München, Deutschland
Parafilm	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Pipettenspitze (10, 20, 100, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (500, 1500, 2000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm	Kodak, Hohenbrunn, Deutschland
Sterile Filter	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Vlies	BioRad, München, Deutschland
Zip-Tip-Säulen	Millipore, Billerica, USA

2.1.5 Wissenschaftliche Software

Diese Software wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Programm	Verwendungszweck	Hersteller
Analysis Image Processing	Bildbearbeitung	
Data Explorer Voyager V5.0	MALDI-TOF Datenanalyse	Applied Biosystems, Laguna Beach, USA
Fluor-S Multimanager	Software für Western-Blot	BioRad, München, Deutschland
Harvester	Proteindatenbank	http://harvester.fzk.de/harvester
MASCOT	Proteindatenbank-Suchmaschine	http://www.matrixscience.com
Mascot-Peptide-mass-fingerprint-Software	Software für Proteinidentifizierung	Matrix science, Oxford, UK
Mass Spectrometry Protein Sequenz Data Base (MSDB)	Proteindatenbank	ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/MSDB/msdb.nam
MassLynx, Version 4.0	Software für Massenspektrometer	Waters, Massachusetts, USA
Microsoft Excel 2003	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation, USA
Molecular Image Pharos FX Systems	LC Scanner	BioRad, München, Deutschland
PD Quest V6.2.1	2-D Gel-Elektrophorese Analyse	BioRad, CA, USA
Software Multi-Analyst Version 1.1	Densitometrieanalyse	BioRad, CA, USA
Swissprot	Proteindatenbank	http://www.expasy.org/uniprot/

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten und klinische Studiendurchführung

Bei dieser Studie handelt es sich um eine offene, monozentrische Studie mit inter- und intra-individuellen Vergleichen. Aufgrund der Grunderkrankung der Probanden ist ausschließlich diese Form der Studie möglich.

Auf der Apheresestation des Universitätsklinikums Göttingen wurden 21 Patienten, die sich dort in teilstationärer Behandlung befanden, eingeschlossen. Dabei handelt es sich um Patienten beiderlei Geschlechts, zwischen 12 und 69 Jahren, die entweder unter homozygoter

Hypercholesterinämie (primäre Prävention) oder in der Vorgeschichte an mit Hypercholesterinämie assoziierten Organschäden leiden (Sekundärprävention). Alle Patienten erfüllten die Bedingungen zum Einsatz der Lipidapherese nach der Konsensuskonferenz von 1992 (Greten 1992) und waren zum Zeitpunkt des Studienbeginns schon mindestens sechs Monate in Behandlung. Die genauen demographischen Daten sind in Tabelle 16, die Behandlungsdaten der Patienten in Tabelle 15 zusammengefasst. Die ausführlicheren Angaben zu den einzelnen Patienten der verschiedenen Behandlungsverfahren sind in Tabelle 24-26 des Anhangs dargestellt. Alle Patienten erhielten neben der Apheresebehandlung eine individuell angepasste medikamentöse Therapie zur Behandlung der anderen Risikofaktoren bzw. der schon vorhandenen Folgeerkrankungen. Diese Therapie beinhaltete koagulatorische, antihypertensive und herzprotektive Medikamente.

Die zuständige Ethikkommission prüfte das Studienprotokoll (Nr. 10/11/03) und alle Patienten bzw. die Erziehungsberechtigten gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Einschlusskriterien (Tab. 8) wurden von allen teilnehmenden Patienten erfüllt.

Tabelle 8 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
▪ Volljährigkeit bzw. Einwilligung des Erziehungsberechtigten; ▪ mindestens 6 Monate Apheresetherapie; <u>4 Wochen vor Studienbeginn:</u> ▪ keine Infektion oder Infektkonstellation im Labor (Leukozyten >12000 /µl); keine CRP-Werte >20 mg/dl; keinen stationären Krankenhausaufenthalt; <u>3 Wochen vor Studienbeginn:</u> ▪ keine Hämoglobin (Hb)-Schwankungen um mehr als 3 g/dl; keine Hb-Werte <11 g/dl;	▪ nicht einwilligungsfähig; <u>4 Wochen vor Studienbeginn:</u> ▪ offensichtliche Infekte oder Infektkonstellationen im Labor; ▪ Infektionserkrankungen wie Hepatitis B-E; ▪ neoplastische Grunderkrankung; ▪ akute Erkrankungen der Lunge, der Leber oder des Herzens (z.B. akuter Myokardinfarkt); psychiatrische Erkrankungen; ▪ Hb-Wert <8,5 g/dl; ▪ Arzneimittel-, Drogen-, oder Alkoholmissbrauch; ▪ bestehende Schwangerschaft oder nicht beendete Stillperiode; ▪ gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie gemäß § 40 AMG;

Alle Patienten erhalten wöchentlich eine Behandlung mit einem der Aphereseverfahren.

Die MDF-Methode wurde mit einer Octo Nova® Maschine (Diamed, Köln, Deutschland) mit EC50®-Filter (Asahi, Osaka, Japan) bei neun Patienten durchgeführt. Die derzeitig genutzte Geräteversion für das HELP®-Verfahren war die neue HELP®-Futura® Maschine (Braun Melsungen, Deutschland) mit Präzipitatfilter® (Braun Melsungen, Deutschland) für LDL und wurde zum Zeitpunkt der Studie bei sieben Patienten angewendet. Für das DALI®-Verfahren

wurden in der Studie mit dem System 4008-ADS® (Fresenius Medical Care, St. Wendel, Deutschland) und zwei DALI 500®- oder DALI 750®-Filter (Fresenius Medical Care, St. Wendel, Deutschland) je nach individuellem Bedarf fünf Patienten behandelt.

2.2.2 Probengewinnung und Vorbereitung

2.2.2.1 Plasmaproben

Die Abnahme der Serumproben erfolgte 5 und 60 min nach Beginn der Apheresebehandlung unmittelbar vor und nach dem aphereserelevanten Filter (in MDF der EC50®-Filter, bei HELP® die Präzipitationssäule®, bei DALI® der DALI500® oder 750®-Filter) aus einer Vene oder dem ateriovenösen Shunt.

Die Blutprobe wurde bei 4°C für 15 min bei 15.000 Umdrehungen/min abzentrifugiert (Sigma 3-18K, Sigma, Osterode, Deutschland) und das Plasma abgenommen. Nach Acetonfällung der Proteine, wurde das Pellet in 2D-Gel-Puffer (Urea 9,5 M, CHAPS 2% (w/v), DTT 1%, Complete™ Protease, 1 Tablette/25 ml Lösung) für die 2-D-Gelelektrophorese oder in Laemmli-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% (w/v) SDS 0,1% Bromophenolblau, 10% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) ß-Mercaptoethanol) für Western-Blot-Analysen resuspendiert und bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.2.2.2 Eluatproben

Hierfür wurden die aphereserelevanten Filter in verschiedenen Waschschritten bearbeitet. Alle drei Filter wurden vorbereitend mit PBS (phosphatgepufferte Saline) gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte nach folgenden, den jeweils entsprechenden physikochemischen Filtereigenschaften angepassten Protokollen: Jeder Filter wurde mit 50 ml dreier Lösungen behandelt und die Eluate gesammelt. Die Elution begann mit der entsprechenden Lösung A (MDF: 100 ml 100 mM Sodiumacetat, 1 M NaCl pH 5; HELP®: 400 ml 100 mM Sodiumacetat, 1 M NaCl pH 5; DALI®: 30 ml 100 mM Sodiumacetat, 1 M NaCl pH 5). Anschließend wurden die Filter mit Lösung B (MDF: 100 ml 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl pH 8,5; HELP®: 150 ml 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl pH 8,5; DALI®: 30 ml 100 mM Sodiumacetat, 1 M NaCl pH 4) gewaschen. Als letztes wurden die Filter mit Lösung C (MDF: 100 ml 20% Acetonitril, ddH2O; HELP®: 150 ml 20 mM Tris/HCl, 1 M NaCl pH 7; DALI®: 60 ml 100 mM Sodiumacetat, 1 M NaCl pH 3) behandelt. Jeweils 10 ml der Eluate der drei Elutionsschritte wurden in einem neuen Gefäß gemischt und bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Zur Fällung der Proteine wurden 10 ml der Eluatprobe mithilfe einer Amincon Säule

(Beverly, MA, USA) auf 2 ml konzentriert, anschließend mit einer Fällungslösung (20% Trichloressigsäure, Aceton) im Verhältnis 3:1 gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden alliquotiert, bei 15.000 Umdrehungen/min für 15 min zentrifugiert (Sigma 3-18K, Sigma, Osterode, Deutschland) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit jeweils 100 µl Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert (Sigma 3-18K, Sigma, Osterode, Deutschland). Nachdem das Pellett 5 min an der Luft getrocknet war, wurde es in 2D-Gel-Puffer (Urea 9,5 M, CHAPS 2% (w/v), DTT 1%, Complete™ Protease, 1 Tablette/25 ml Lösung) für die 2-D-Gelelektrophorese, oder in Laemmli-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 6,8, 2% (w/v) SDS 0,1% Bromophenolblau, 10% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) ß-Mercaptoethanol) für Western-Blot-Analysen, resuspendiert und bei –20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben

Die Proteinkonzentration wurde nach dem Protokoll nach Bradford (1976) ermittelt. Zur Erstellung der Eichkurve wurde eine Konzentrationsreihe mit Rinderserumalbumin (Sigma Aldrich, Deutschland) in einer Konzentration von 1 mg/ml und Bradford Reagens (BioRad, München, Deutschland) in Mikroliter Küvetten 10x 5x 45 mm (Sarstedt Nümbrecht) angelegt (Tab. 9).

Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die photometrische Messung mit dem Photometer Lambda (Perkin-Elmer & Co GmbH, Stuttgart, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Nach Erstellung der Eichkurve und Funktionsgleichung konnte hieraus die Konzentration der Probe ermittelt werden.

Tabelle 9 Konzentrationsreihe zur Proteinbestimmung

Pipettierschema der einzelnen Komponenten.

Rinder Serum Albumin (1 mg/ml) µl	Bradford Reagens	Wasser	Probe
0 µl	200 µl	800 µl	
1µl	200 µl	799 µl	
2 µl	200 µl	798 µl	
5 µl	200 µl	795 µl	
10 µl	200 µl	790 µl	
20 µl	200 µl	780 µl	
30 µl	200 µl	770 µl	
	200 µl	799	1 µl
	200 µl	798	2 µl

2.2.2.4 Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung

Alle Proben wurden mit Rehydrationspuffer [8 M Urea, 1% (w/v) CHAPS, 0,2% Ampholyte pH 3-10 (frisch hinzugefügt), 15 mM DTT (frisch hinzugefügt)] auf ein Endvolumen von 315 µl verdünnt und mit 0,5 µl Bromphenolblaulösung eingefärbt. Mittels der Einfärbung der Lösung mit Bromphenolblau lässt sich die Proteinwanderung während der Fokussierung auf dem Gelstreifen beurteilen.

2.2.3 Proteinauftrennung in der 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Elektrophorese wurde, wie schon von Dihazi et al. (2005) beschrieben, durchgeführt. Die zweidimensionale (2D-)Elektrophorese setzt sich aus zwei Schritten zusammen: der Fokussierung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt mittels eines immobilisierten pH-Gradienten (IPG)-Streifens horizontal (erste Dimension) und anschließend der vertikalen Auftrennung nach Größe bzw. Molekulargewicht mittels eines Sodiumdodecylsulfats (SDS)-Polyacrylamidgels (zweite Dimension). Ergebnis dieses Verfahrens, erstmals von Klose (1975, O'Farrell 1975) durchgeführt, ist ein zweidimensionales Raster, in dem sich die einzelnen visualisierten Proteine als Spots darstellen.

2.2.3.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Jedes Protein hat einen spezifischen isoelektrischen Punkt (pI). Dieser ist abhängig von dem unterschiedlichen Ladungsverhalten der einzelnen Aminosäuren der Proteine. Diese Eigenschaft wird in der isoelektrischen Fokussierung genutzt. Die Proteine werden auf einen IPG-Gelstreifen aufgetragen. Dieser Streifen enthält aufgrund einer im Gel enthaltenen Mischung aus basischen und sauren Ampholyten einen stabilen, kontinuierlichen pH-Gradienten, hier pH 3-10. Je nach Lokalisation der Proteine auf dem IPG-Streifen verändert sich der Ladungszustand der Aminosäuren und somit des Proteins (Abb. 6). Liegen sie in einem pH-Bereich größer als ihr pI, werden die Aminosäuren negativ, in einem pH-Bereich kleiner als ihr pI, positiv geladen. In einem angelegten elektrischen Spannungsfeld bewegen sich die Proteine je nach ihrem Ladungszustand auf einen der Pole zu. Sie wandern entlang der pH-Bereiche auf dem Streifen, bis sie den pH-Bereich, der ihrem pI entspricht, erreichen. Hier ist die Ladung des Proteins neutral und das Protein bleibt dort liegen.

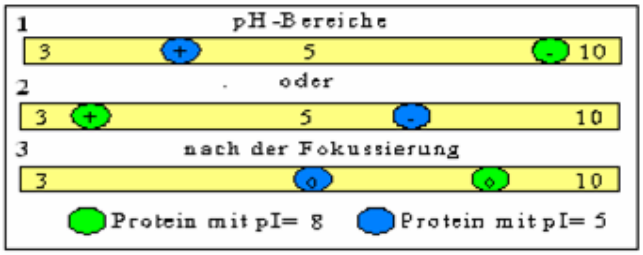


Abbildung 5 Prinzip der ersten Dimension

Bei der isoelektrischen Fokussierung auf einem IPG-Streifen mit pH-Bereich von 3-10 werden Proteine nach ihrem pI, bei dem ihre Nettoladung gleich null ist, aufgetrennt; 1+2: Somit befindet sich das Protein nach dem Auftragen auf den Streifen zufällig in irgendeinem pH-Bereich; 3: Nach der Fokussierung liegt das Protein ihrem pI entsprechend sicher in dem Bereich, in dem das Protein eine ausgeglichene Ladung hat.

Von den zu analysierenden Proben wurden 400 µg für Colloidal-Coomassie-Blue-G-250-Färbung bzw. 150 µg für Silberfärbung in der Fokussierungskammer (Protean IEF Cell, BioRad, München, Deutschland) zentral platziert, während der IPG-Streifen (BioRad, München, Deutschland) unter Vermeidung von Lufteinschlüssen mit der Gelseite der Probe aufgelegt wurde. Die Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur gewährleistete die passive Rehydration der Probe in das Gel. Um eine Verdampfung der Probe in der Fokussierungskammer zu vermeiden, wurde der Streifen mit 3 ml Mineralöl bedeckt und nochmals über Nacht für mindestens 12 h (bis zur vollständigen Aufnahme der Probe in den IPG-Streifen) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die isoelektrische Fokussierung nach folgendem mehrstufigen Protokoll (Tab. 10) mit einem Protean IEF-Cell-Gerät (BioRad, München, Deutschland).

Tabelle 10 Protokoll der isoelektrischen Fokussierung

Dauer	Spannung
1 h	500 V
1 h	1.000 V
4 h	8.000 V

Hiermit war die Auftrennung nach der ersten Dimension, dem isoelektrischen Punkt, abgeschlossen. Der fokussierte IPG-Streifen wurde entweder sofort weiterverarbeitet bzw. eingeschweißt in Plastikfolie und bei –20°C gelagert.

2.2.3.2 Zweite Dimension: Die 2D-Gel-Elektrophorese

Die zweite Dimension trennt die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Dabei wird ein Trenngel mit Gitterstruktur benutzt. Die Wanderung der Proteine in einem elektrischen Feld wird nicht nur von der unterschiedlichen Ladung der Proteine, sondern auch von ihrer Größe beeinflusst. So bewegen sich kleine Proteine, also mit geringem Molekulargewicht, schneller

als große, also mit größerem Molekulargewicht (Abb. 6). Um die Wanderung alleine von der Größe bestimmen zu lassen, muss die Tertiär- und Sekundärstruktur des Proteins verändert werden. Gleichzeitig darf die Primärstruktur nicht beeinflusst werden. Dies wurde mit der Behandlung der IPG-Streifen mit drei Chemikalien erreicht: Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), 1,4-Dithiothreitol (DTT), Jodacetamid. Mit SDS wurde die Tertiärstruktur des Proteins aufgelöst und so die Proteinstruktur linearisiert. Gleichzeitig bewirkte SDS eine Negativierung des Ladungszustandes aller Proteine. Mit DTT wurden die bestehenden Disulfidbrücken aufgebrochen. Jodacetamid alkyliert die Thiogruppen des Proteins.

2.2.3.2.1 Vorbereitung des SDS-Gels

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde nach Laemmli (1970) in einer vertikalen Plattenelektrophoreseapparatur (Protean II XL Cell, BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele (12%, 200 mm x 230 mm x 1,5 mm) wurde die Polyacrylamidgellösung (Tab. 11) in eine Gießvorrichtung, bestehend aus zwei Glasplatten von der Größe 18 cm x 20 cm (BioRad, München, Deutschland), zwei 1 mm dicken Platzhaltern (IPG Platzhalter, BioRad, München, Deutschland) und einer Haltevorrichtung, gegossen. Um einen glatten und geraden Gelabschluss zu gewährleisten, wurde die Gellösung mit 3 ml Isopropanol bedeckt. Die homogene Polymerisation der Gele wurde über Nacht bei 4°C erreicht.

Tabelle 11 Zusammensetzung der Trenn – und Sammelgellösungen

Gellösung	Trenngel 12%ig, pH 8,8	Trenngel 10%ig, pH 8,8	Sammelgel 4%ig, pH 6,8
Material	Menge	Menge	Menge
ddH_2O	3,5 ml	4,17 ml	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl	2,5 ml	2,5 ml	1,25 ml
Acrylamid	4 ml	3,33 ml	0,65 ml
Entgasung unter leichtem Schwenken	5 min	5 min	5 min
10% SDS	100 µl	100 µl	50 µl
10% APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

2.2.3.2.2 Äquilibrierung der IPG-Streifen

Die Äquilibrierung besteht aus zwei Schritten: Zuerst wurde jeder der IPG-Streifen für 20 min in 10 ml Äquilibrierungspuffer A (6 M Urea, 30% Glycerol (w/v), 2% SDS (w/v), 0,05 M Tris-HCl pH 8,8, 100 mg DTT) und danach für ebenfalls 20 min in 10 ml

Äquilibrierungspuffer B (6 M Urea, 30% Glycerol (w/v), 2% (w/v) SDS, 0,05 M Tris-HCl pH 8,8, 400 mg Jodacetamid) schwenkend inkubiert. Beide Puffer wurden zur besseren Lokalisierung der Proteine mit jeweils 50 µl Bromophenolblaulösung angefärbt.

2.2.3.2.3 Durchführung der zweiten Dimension

Der äquilibrierte IPG-Streifen und 10 µl eines Markers (Precision Plus Protein Standard, BioRad, München, Deutschland) zur späteren Beurteilung des Molekulargewichts wurden auf das polymerisierte SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer (Protean II XL, BioRad, München, Deutschland) mit einem zentralen Kühlblock (BioRad, München, Deutschland) wurde mit einfachem Elektrophoresepuffer (3 g Tris, 14,4 g Glycerin, 1 g SDS, aufgefüllt mit H_2O auf 1 l) gefüllt. Nach Anlegen der Spannung von 100 V wurde die zweite Dimension über Nacht bei 4°C durchgeführt.

2.2.4 Färbung der Gele

Zur Visualiserung der Proteine in den Gelen ist eine Färbung nötig. Als Massenspektrometrie-kompatible Färbungen standen zwei Methoden zur Verfügung: die Silberfärbung modifiziert nach Blum et al. (1987) und Shevchenko et al. (1996), sowie die Coomassie Brillant Blue G-250-Färbung nach Neuhoff et al. (Neuhoff et al. 1988).

2.2.4.1 Silberfärbung

Zur Vorbereitung der Proteine wurden die Gele für 1 h in der Fixierlösung (50% MeOH, 12% HOAc) gebadet. Hierdurch wurden Substanzen, die die Färbung negativ beeinflussen könnten, wie z. B. SDS oder Glycine, weitgehend entfernt worden. Dem folgend wurden die Waschschritte, bestehend aus zweimal 20 min mit Waschlösung 50% (50% EtOH) und einmal 20 min mit Waschlösung 30% (30% EtOH), durchgeführt. Anschließend wurden die proteinenthaltenden Gele genau 60 s der Sensibilisator-Lösung (0,02% $Na_2S_2O_3$) ausgesetzt und danach mit deionisiertem, destilliertem Wasser (ddH_2O) dreimal je 20 s gewaschen. Nachdem die Silberfärbung (12 mM $AgNO_3$, 0,026% Formaldehyd) 20 min einwirkte, wurde noch einmal zur Entfernung des überschüssigen Silbers dreimal 20 s mit ddH_2O gewaschen. Die eigentliche Entwicklung der Färbung der Proteine erfolgte mit der Entwicklungslösung (6% Na_2CO_3, 0,0185% Formaldehyd, 16 µM $Na_2S_2O_3$), wobei nach 2 bis 10 min die Proteinspots deutlich sichtbar wurden. Die Farbreaktion wurde mit der Stopplösung (50% MeOH, 12% HOAc) unterbrochen und die Gele für 10 min mit ddH_2O gewaschen, bevor sie weiterverarbeitet bzw. in der Aufbewahrungslösung (5%iges HOAc) bis zur weiteren Analyse aufbewahrt wurden.

2.2.4.2 Colloidal-Coomassie-Brillant-Blue-G-250-Färbung

Zur Anfärbung der Proteine wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur in Brillant-Blau-Farblösung (Roti Blue 20 ml, 40 ml MeOH, 40 ml H_2O) geschwenkt. Um die Spots sichtbar zu machen, wurde das komplett gefärbte Gel für dreimal jeweils 30 min mit Entfärbelösung (20 % (v/v) MeOH, 5% (v/v) Essigsäure, mit H_2O aufgefüllt auf 1l) und anschließend ebenfalls dreimal je 10 min mit ddH_2O von der überschüssigen Farblösung gereinigt. Danach wurden die Gele sofort weiterverarbeitet oder in der Aufbewahrungslösung (5% HOAc) bis zur weiteren Analyse eingelegt.

2.2.5 Auswertung der 2D-Gele

Die Abbildungsanalyse der Gele wurde mithilfe der PDQuest-Software (Version 6.2.1, BioRad, CA, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Um Variationen bei der Probengewinnung Rechnung zu tragen, wurden drei Gele für jeden Filtertyp unter den gleichen Bedingungen angefertigt und miteinander verglichen.

Mittels Scanner (Molecular Image Pharos FX Systems, BioRad, München, Deutschland) wurden die gefärbten Gele eingelesen. Hierbei ist die verwendete Färbung (Silber oder Coomassie) zu berücksichtigen. Es wurde ein mittlerer Auflösungsbereich von 84,7 x 84,7 Pixel gewählt. Ein ausgewählter Filterprozess eliminiert Artefakte und andere Störelemente.

Um eine einheitlichen Auswertung zu gewährleisten wurden zu Beginn die Auswertungsparameter festgelegt. Die Detektion der einzelnen Proteinspots erfolgte hiernach automatisch. Anfangs erfolgte die manuelle Markierung drei charakteristischer Spots (ein sehr schwacher, ein kleiner und ein großer) sowie der spotarmen Regionen. Hiernach erfolgte eine Vorprozessierung des Gels nach den Standardeinstellungen des Herstellers. In Abhängigkeit der zuvor gewählten Markierungen, wurden durch einen Glättungsalgorythmus und die Hintergrundsubtraktion die Densitometerstöreffekte verringert. Die Spoterkennung aller Gele erfolgte nun nach dieser Parametereinstellung. Die Erkennung der Spotzentren und die Spotquantifizierung erfolgten anschließend automatisch. Anschließend wurden manuelle Korrekturen vorgenommen.

Zur Analyse der Übereinstimmung der Spots wurden die Proteinspotbilder der einzelnen Gele nach Abgleichung der einzelnen Spots in einem Übereinstimmungsset, einem künstlichen Bild, zusammengefasst. Diese Übereinstimmungssets wurden miteinander verglichen. Hierfür war eine Abstimmung der zusammenfassenden Gelbilder nötig. Diese wurde erreicht indem das Gel in vier Quadranten aufgeteilt wurde, in welchen die charakteristischen Spots (die in allen 3 Gelen detektiert wurden) markiert wurden. Diese Spots dienten als Orientierungspunkte und ermöglichten die Detektion der unmakierten Spots. Nicht

automatisch erkannte Spots wurden manuell bearbeitet. So konnte die ungefähre Anzahl von Spots in den verschiedenen Filtergelen ermittelt werden.

2.2.6 Massenspektrometrische Analyse

In dieser Arbeit wurden zwei Massenspektrometermethoden, die „Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation“ (MALDI), entwickelt von Karas und Hillenkamp (1988), als auch die „Electrospray Ionisation“ (ESI) benutzt. Ein Massenspektrometer besteht aus drei Teilen: der Ionenquelle, dem Analysator und dem Detektor. Er ist in der Lage, Ionen im gasförmigen Zustand zu detektieren.

Die Ionenquelle ionisiert die Proteine der Probe und überführt diese in die Gasphase. Hierfür werden bei MALDI die Proteine in eine kristalline Matrix integriert und eine große Menge an Matrixmolekülen durch kurzen Beschuss mit einem Laserstrahl verdampft. So werden die Proteine als Ionengas freigesetzt und untersucht. Bei ESI entsteht das Ionengas indem die Proteinlösung durch eine feine Nadel in ein elektrisches Feld mit einer Spannung von mehreren Kilodalton gesprüht wird.

Der Analysator ist für die Auftrennung der Peptide nach ihrer Masse pro Ladung (m/z) geladener Teilchen zuständig. Hier gibt es drei Möglichkeiten der Messung: Flugzeit-Analysatoren [„Time Of Flight“ (TOF)], Quadrupole (Q) und Ionenfallen („Ion Trap“). In dieser Arbeit wurden der TOF- als auch der Q-Analysator benutzt. Bei dem TOF-Analysator fliegen die Ionen durch ein Vakuumrohr, an dessen Ende sie auf den Detektor treffen (Hortin 2006).

Die Detektoren stehen am Ende und fangen die entsprechenden Signale auf. Bei der TOF-Analyse gilt: je kleiner die Masse und je größer die die Ladung des Ions, desto schneller fliegt es durch das Rohr (Hortin 2006).

In dieser Arbeit wurde die Kombination des MALDI-TOF-MS und der LC-ESI-Q-TOF-MS/MS benutzt. Dabei dient die Flüsigkeitschromatographie zur ersten Präparation der Probe, die ESI erzeugt das Ionengas, und der Quadrulope trifft eine Peptidauswahl, deren Fragmente in der TOF-Analyse bestimmt werden. Dies wird dann als Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bezeichnet (Hortin 2006).

Das Ergebnis der MALDI-TOF ist letztendlich der m/z-Wert der einzelnen Peptide. Der m/z-Wert gibt das Verhältnis von Masse zu Ladung der geladenen Teilchen an (Hortin 2006).

Da bei der ESI multiple Ionen entstehen, muss hier der errechnete m/z-Wert mit z multipliziert werden, um das korrekte Molekulargewicht zu erhalten. (Hortin 2006).

2.2.6.1 Enzymatische Proteinspaltung im frischen Gel

Dieser Schritt, wurde wie von Dihazi et al. 2005 beschrieben, durchgeführt. Die einzelnen Proteinspots wurden nach 30 minütigen Wachschritten manuell mit Skalpell aus dem Gel geschnitten. Jeder Spot wird in einem markierten Reaktionsgefäß zerkleinert, mit 100 µl ddH_2O bedeckt und wenn nötig über Nacht bei 4°C gelagert. Die silbergefärbten Spots wurden vorher mit dem Entfärbungskit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers entfärbt.

Zur Vorbereitung der Verdauung mit Trypsin wurden alle Proben mehreren Dehydrierungsschritten unterzogen: Hierfür wurden nach dem Entfernen der 100 µl ddH_2O, die Gelstücke mit 40 µl 50%igem Acetonitril (ACN) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde die Lösung in allen Reaktionsgefäßen mit 40 µl 100%igem ACN ersetzt und für 1 h inkubiert, bis die Gelstücke sich weiß färbten und klebrig wurden. Anschließend wurden die Proben für 5 min mit 40 µl 100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,5 und danach mit 40 µl 100%igem ACN zu einer sich 1:1-verhaltenden Lösung aufgefüllt und für weitere 15 min inkubiert. Am Ende wurde die Lösung verworfen und die Gelstücke in einer Speed-Vakuumzentrifuge (SVC 10 CH, Savant, New York, USA) für ca. 15 min getrocknet.

Im eigentlichen Verdauungsschritt wurden die getrockneten Gelstücke in 40 µl Trypsinlösung (10 ng/µl Trypsin, 100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,5, 2 mM Calciumchlorid) rehydriert und 45 min auf Eis bei 4°C inkubiert.

Trypsin ist eine aggressive stabile Protease, welche spezifisch hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin das Protein spaltet und so bei jedem Protein ein spezifisches Peptidset kreiert. Nach Entfernen der überschüssigen Lösung wurden die Gelstücke mit 40-60 µl Verdauungspuffer (100 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,5) bedeckt. Bei der Inkubation bei 37°C für 12 h vollzog sich die Proteinaufspaltung im Gel.

Die Extraktion der Spaltprodukte des Trypsin erfolgte mit organischen Lösungsmitteln in drei Schritten. Hierfür werden die folgenden benutzten Lösungen nach dem Kontakt mit den einzelnen Gelstücken in neuen, markierten Reaktionsgfäße gesammelt. Nach Abnahme der überschüssigen Lösung wurden die Proben zuerst mit 0,1%igem TFA für 30 min im Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex, Berlin, Deutschland) inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde der Prozess mit einer Lösung aus 30% ACN in 0,1%igem TFA und 60% ACN in 0,1%igem TFA durchgeführt. Die Überstände der einzelnen Extraktionsschritte sind das Produkt der Proteinspaltung, und enthalten die gewünschten Peptide zur weiteren Analyse. Diese Lösung wurde in der Speed-Vakuumzentrifuge (SVC 10 CH, Savant, New

York, USA) eingetrocknet und bis zur MS-Analyse bei –20°C aufbewahrt.

2.2.6.2 Vorbereitung der Proben für MALDI-TOF-MS

Um Störeffekten bei der Massenspektrometrie vorzubeugen, wurden die Proben von Salzen gereinigt. Dies wurde mittels Zip-Tip-Säulen (Millipore, Billerica, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 10 µl 50% ACN in 0,1%igem TFA. Die Probe wurde anschließend erneut mit der Speed-Vakuumzentrifuge (SVC 10 CH, Savant, New York, USA) getrocknet.

Um die Probenionen für die Messung erzeugen zu können, benötigt man für MALDI eine kristalline Matrix, die auf den Laserbeschuss reagiert. Die Matrix ist in dieser Arbeit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), welche ultraviolette Strahlung absorbiert und sich gut zur Aufnahme der Massenspektren von Proteinspaltprodukten eignet. Die Matrixlösung ist eine gesättigte saure Lösung (DHB in 50% ACN in 0,1%igem TFA), wurde für jede Messung frisch hergestellt. Die Probe, das Resultat der enzymatischen Proteinspaltung, wurde in 5 µl 0,1%igem TFA rehydriert. Auf einem Edelstahl-Probenträger wurden 0,5 µl Matrix vorgelegt und 0,5 µl der Probe in die noch flüssige Matrix aufgetragen. Die Mischung kristallisierte bei Raumtemperatur nach ca. 15 min aus.

2.2.6.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Messung der Massen-Ladungs-Verhältnisse der trypsinverdauten Peptide wurde mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Voyager DE-STR, Applie Biosystems, Kalifornien, USA) durchgeführt. Um eine konstante Messsicherheit zu gewährleisten wurde sowohl eine externe als auch eine interne Kallibrierung jeweils vor den Messungen durchgeführt. Die externe Kalibrierung erfolgt mit folgender Peptidmischung {Des-Arg-Bradykinin ([Proteinmasse (M) + Proteinladung (H)]$^+$ 904,46), Angiotensin I ([M + H]$^+$ 1296,68), Glu 1-Fibrinopeptide B ([M + H]$^+$ 1570,67), ACTH (1-17) ([M + H]$^+$ 2093,08), ACTH (18-39) ([M + H]$^+$ 2465,19)}. Bei der internen Kalibrierung erfolgt nach der Messung des unbekannten Probespektrums eine Abgleichung mit Hilfe der bekannten Trypsinautolyseprodukten (m/z 842,50 und m/z 2211,10).

Das Gerät arbeitete mit einem zeitversetzten Reflektronmodus („delayed reflector“) und einer Beschleunigungsspannung von 20 kV. Es wurde ein Stickstofflaser verwendet. Die Massenspektren der Peptide wurden durch 50 individuelle Laserschüsse gewonnen (Abb. 6).

Der Probenträger mit den Kristallen des Proben-Matrix-Gemischs sowie der Kalibrierungsmixtur wurde in das Gerät eingeführt. Durch den Beschuss mit den Laserstrahlen verdampft die Matrix und mit ihr die Probe, ohne diese zu verändern. Es

entstand das Ionengas. Die Probenionen fliegen im TOF-Analysator durch das Vakuumflugrohr, und die Signale werden am Ende von einem Detektor aufgefangen.

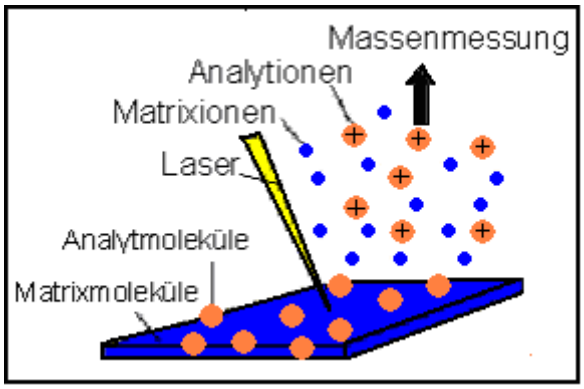


Abbildung 6 Prinzip der Ionisation bei MALDI

Die auf Matrix (blau) aufgetragene Probe (rot) wird mithilfe eines Lasers (gelb) beschossen. Die überschüssigen Matrixmoleküle sublimieren und transferieren die aufgetragenen nicht-verdampfbaren Probemoleküle in die Gasphase. Durch Molekülkollision in der Gasphase entsteht eine Anzahl von Ionen. Aber nur die protonierten Probeionen werden mithilfe elektrischer Potentiale beschleunigt und in das Massenmessgerät transportiert; modifiziert nach Steen und Mann (2004, S. 702).

2.2.6.4 Proteinidentifizierung durch Peptidmassenmuster-Zuordnung

Die MS ermöglichte die Messung der Peptide, die sich aus der spezifischen Spaltung mit Trypsin ergaben. Dadurch ergab sich ein eindeutiges Spektrum von Massen der Peptide. Dieses Massenspektrum ist so eindeutig dem fragmentierten Protein zuzuordnen, wie der Fingerabdruck dem einzelnen Menschen.

Über diesen Peptidmassen-Fingerabdruck konnte nun durch den Vergleich mit Proteindatenbanken, wie der Massenspektrometrie-Proteinsequenz-Datenbank (MSDB) oder der National-Center-of-Biotechnology-Information non-redundant (NCBInr), das Protein identifiziert werden. Der Vergleich wurde mit einer geeigneten Software, der Mascot-Peptide-Mass-Fingerprint-Software (Matrix Science, Oxford, UK), durchgeführt. Dabei berechnete die Software die theoretischen Spaltprodukte für die vorgegebene Protease (hier Trypsin) für alle in der Datenbank gespeicherten Proteine. So entstand ein „theoretischer Fingerabdruck" für jedes Protein in der Datenbank. Je nach Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den Peptidmassen der Probe und den theoretischen Werten konnte ein schon bekanntes Protein durch die Zuordnung von Massenmustern identifiziert werden.

Die Proteinidentifikation musste bestimmte Prämissen erfüllen und wurde aufgrund dessen unter bestimmten Voreinstellungen durchgeführt: Als Probenspezies wurde human gewählt, die Toleranz der Peptidmasse sollte unter 50 ppm liegen und es durfte nur eine Spaltung fehlen. Die minimale Peptidmassenabweichung sollte im mDa-Bereich liegen. Die Veränderung von Cystein und die Methionin-Oxidation waren als eine variable Modifikation erlaubt. Um als eine signifikante Identifikation zu zählen, musste der Mascot-Score mehr als

70 betragen.

2.2.6.5 LC-ESI-Q-TOF-Tandem Massenspektrometrie

Um die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse zu sichern und zu prüfen, wurden die Proben noch dem Verfahren der Peptidsequenzanalyse mit einem LC-ESI-Q-TOF-MS/MS-Gerät (Ultima Global Molecular Imager Pharos FX Systems, BioRad, München, Deutschland) unterzogen.

Die Geräteeinstellungen wurden folgendermaßen gewählt: Das Gerät arbeitete im positiven Ionenmodus. Die Peptidmassentoleranz sollte unter 50 parts per million (ppm) liegen. Ebenso wird eine Toleranz der Fragmente von 100 multi mass units (mms) gewählt. Die Proben wurden, wie unter 2.2.2 dargestellt, gewonnen und vorbereitend in 0,1% Ameisensäure gelöst. 1 µl der Lösung wurde in spezielle CapLC Autosampler (Micromass, Manchester, UK) pipettiert. Die Probe wurde mittels einer elektrischen Kanüle der Flüssigkeits-Chromatographie (LC) zugeführt. Diese erste Auffächerung der Peptide wurde durchgeführt um differenziertere Informationen zu gewinnen. Hierfür durchlief die Probe zuerst einen C18-pepMap-µ-Precolumn™-Filter (300 µm x 5 mm; 5 µm Partikelgröße; LC Packings, Amsterdam, Niederlande) und anschließend eine C18-pepMap-100nano-Serie™-Analysesäule (75 µm x 5 mm; 3 µm Partikelgröße; LC Packings, Amsterdam, Niederlande). Die anschließende Elution der Säule wurde über 60 min mittels eines Elusionsgradienten und mit einer Mischung der Lösungen I (5% ACN in 0,1%iger Ameisensäure) und II (95% ACN in 0,1%iger Ameisensäure) durchgeführt. Dabei steigerte sich der prozentuale Anteil der Lösung II von anfangs 10% auf letztlich 95%. Die damit erzeugte Steigerung der ACN-Konzentration diente der Elution der Peptide von der Säule. Nach dieser Probenpräperation wurden mittels der ESI kontinuierlich aus den eluierten Peptidfraktionen multipel geladene Ionen erzeugt. Diese Ionen wurden dem Quadrupole zugeführt, der hierbei die Rolle einer Stoßkammer übernahm. In dieser Hexapolkollisionszelle wurden die Peptide fragmentiert. Hiernach schloss sich der TOF-Analysator an, der die Analyse der Fragmente erzeugte. Am Ende stand der Detektor, der die Peptidsequenz aufzeichnete.

Die Datenakquirierung erfolgte mit dem MassLynx (Version 4.0, Waters, Massachusetts, USA). Die eigentliche Proteinidentifizierung wurde mithilfe der Proteindatenbankensuchmaschine MASCOT, die sich auf die Datenbanken MSDB und Swissport bezog, abgeglichen.

2.2.7 Western-Blot-Analyse

Um die Ergebnisse der 2D-Gelanalysen zu bestätigen, wurden Western-Blot-Analysen nach

einem modifizierten Protokoll nach Towbin et.al. (Towbin et al. 1979) durchgeführt. Der Western-Blot ist eine auf einem SDS-Gel basierende Methode, bestehend aus elektrophoretischer Immobilisierung der Proteine auf einer Membran und nachfolgendem immunologischem Nachweis.

2.2.7.1 Vorbereitung der Proben für Western-Blot

Für den Western-Blot wurden alle Proben (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) mit Laemmli-Puffer [125 mM Tris-HCl pH 6,8. 4% SDS (w/v), 20% Glycerol (v/v), Bromphenolblau 0,006 (v/v), 2% ß-Mercaptoethanol (v/v)] und jeweils 20 µg Plasmaprotein von den extrakorporalen Blutproben oder 20 µg Protein der Filtereluate der verschiedenen Filtertypen auf 20 µl aufgefüllt. Die anschließende Denaturation wurde bei 97°C für 10 min durchgeführt.

2.2.7.2 Vorbereitung der SDS-PAGE

Die Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit Minigelen (10 cm x 7 cm) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Diese bestehen aus zwei verschiedenen Gelen mit unterschiedlichen Polymerisationseigenschaften. Die erste Schicht, die Grundlage des Elektrophoreseprozesses, wurde aus 10%igem Trenngel pH 8,8 (Tab. 11), die zweite aus 4%igem Sammelgel pH 6,8 (Tab. 11) zur Probenauftragung gegossen. Zur Herstellung der Minigele wurden die Substanzen (Tab. 11) in einem kleinen Becherglas angerührt. Die Polymerisation der Gele wurde durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Die Trenngellösung wurde in eine Gießvorrichtung (BioRad, München, Deutschland) gegossen und mit 1 ml Isopropanol, zwecks eines gleichmäßigen geraden Gelabschlusses, beschichtet. Eine vollständige Polymerisation des Trenngels erfolgte über Nacht, wobei das Isopropanol verworfen wurde. Anschließend wurde die zweite Gelschicht aus 4%igem Sammelgel pH 6,8 (Tab. 11) auf das Trenngel gegossen und mit Hilfe eines Kunststoffkamms (BioRad, München, Deutschland) wurden acht Ladetaschen zum Auftragen der Proben geformt.

2.2.7.3 SDS-PAGE-Elektrophorese

Die Elektrophoresekammer (BioRad, München, Deutschland) wurde mit Elektrophoresepuffer (3 g Tris, 14,4 g Glycerin, 1 g SDS aufgefüllt mit H_2O auf 1 l) gefüllt und die hergestellten Minigele darin installiert. Die, wie in 2.2.7.1 beschrieben, vorbereiteten Proben und 7 µl eines Markers (Precision Plus Protein Standards, BioRad, München, Deutschland) wurden sorgfältig in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese lief nach folgendem Protokoll (Tab. 12).

Tabelle 12 Protokoll der SDS-PAGE-Elektrophorese

Dauer	Spannung
10 min	100 V
40 min	200 V

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurden die Gele der Kammer entnommen und im eigentlichen Blot-Prozess weiterverarbeitet.

2.2.7.4 Transfer der Proteine im Tankblotting-Verfahren

Zur Vorbereitung der Tankblotting- Methode wurden Nitrozellulosemembranen (Amersham Pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK) in Transferpuffer [190 mM Glycerin, 25 mM Tris, 0,01% SDS (w/v), 0,4% MeOH (v/v)] für mindestens 15 min inkubiert. Die folgende Herstellung des sogenannten „Blot-Sandwiches“ wurde in einem mit Transferpuffer gefüllten Behältnis durchgeführt, um so Lufteinschlüsse zu vermeiden und einen gleichmäßigen Stromfluss durch alle Schichten zu gewährleisten. Die Blotzelle wurde mit der negativ geladenen Seite als Boden unten in dem Gefäß platziert. Hierauf wurden in folgender Reihenfolge ein Vlies (BioRad, München, Deutschland), zwei Filterpapiere (BioRad, München, Deutschland), das vorbereitete Minigel, die präparierte Nitrozellulosemembran, erneut zwei Filterpapiere und zum Schluß ein zweites Vlies geschichtet. Die geschlossene Blotzelle wurde in einer mit Transferpuffer gefüllten Kammer (BioRad, München, Deutschland) befestigt und der Proteintransfer von Gel auf Membran erfolgte bei einer Stromspannung von 30 V über 24 h.

2.2.7.5 Färbung der Membran

Zur Erfolgskontrolle des Elektro-Blottings wurden die Membranen mit einer Ponceau-Sigma-Lösung (0,2% Ponceau-Sigma in 3%igem TCA) schüttelnd für 5 min angefärbt. Bei erfolgreichem Transfer der Proteine werden diese rosa gefärbt. Anschließend wurde die Membran mit 5%iger Essigsäure entfärbt und getrocknet.

2.2.7.6 Detektion der Antigene

Zur Vorbereitung der Membran wurde diese für 2 h bei 37°C mit dem Blockpuffer [5% fettarme Trockenmilch (w/v) in TBS-Puffer pH 7,4, 0,1% Tween-20], welcher die Visualisation nicht beeinflusste, inkubiert. Das Casein der Trockenmilch besetzt die freien unspezifischen Bindungstellen der Membran und kann von den Antikörpern nicht erkannt werden. Somit wurde gewährleistet, dass sich die Antikörper ausschließlich an ihr spezifisches Antigen binden und somit ein spezifischer Nachweis erbracht wurde. Die

anschließende Inkubation mit den ersten Antikörpern erfolgte für 60 min bei 37°C in geschütteltem Zustand (400, Robbins Scientific, CA, USA). Hierfür wurde eine Verdünnung mit Blockpuffer, entsprechend spezifisch für den jeweiligen Antikörper (Tab. 13) hergestellt, in der die Membran inkubiert wurde.

Tabelle 13 Verdünnung der primären Antikörper

Antikörper	Verdünnung
polyklonale Anti-Fibrinogen (Kaninchen)	1:1000
polyklonale Anti-Komplement Faktor B (Kaninchen)	1:1000
polyklonale Anti-Ceroloplasmin (Kaninchen)	1:1000
polyklonale Anti-Plasminogen (Kaninchen)	1:1000
polyklonale Anti-Transferrin (Kaninchen)	1:1000
polyklonale Anti-alpha-Antitrypsin (Ziege)	1:1200
polyklonale Anti-alpha-2-Makroglobulin (Kaninchen)	1:1000
Anti-C2q-Komplement (Kaninchen)	1:1000
monoklonale Anti-beta-2-Mikroglobulin (Maus)	1:1200

Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 15 min bei 37°C mit Waschpuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1% Tween 20 (v/v), 100 mM NaCl) gereinigt. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper in entsprechend spezifischer Verdünnung mit Blockpuffer (Tab. 14), ebenfalls geschüttelt für 60 min bei 37°C. Der zweite Antikörper ist an eine Meerrettich-Protease gebundenen und erzeugt somit eine Signalverstärkung.

Tabelle 14 Verdünnung der sekundären Antikörper

Antikörper	Verdünnung
Affen-Anti-Kaninchen Antikörper	1:10000
Kaninchen-Anti-Ziegen Antikörper	1:10000
Schaf-Anti-Maus Antikörper	1:10000

Es erfolgten zwei weitere Waschschritte mit dem Waschpuffer für je 15 min bei 37°C. Zur endgültigen Visualisation der Proteinbanden wurden die Nitrozellulosemembranen mit 2 ml eines Chemiluminesenzreagenz (Perkin Elmer Inc, Boston, USA) für 1-2 min behandelt (Laing 1986). Anschließend wurde die Membran in einer Fotokammer fest verschlossen verwahrt. In der Dunkelkammer wurde das Ergebnis mittels eines Röntgenfilms (Kodiak, Hohenbrunn, Deutschland) mit wechselnden Belichtungszeiten festgehalten. Die Aufnahmen wurden mit einer Entwicklungsmaschine (Konica SRX-101 A, Taiwan) fertiggestellt.

2.2.7.7 Auswertung der Western-Blot-Analysen

Die dargestellten Western-Blot-Banden wurden mittels der Software Multi-Analyst (Version 1.1, BioRad, CA, USA) quantifiziert. Die Analyse erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Hierfür wurden die Western-Blot-Ergebnisse mit dem Fluor-S-Multimanager (BioRad, München, Deutschland) mit folgenden Einstellungen eingelesen: Das Scannen erfolgte im „white light modus“ mit der Filtereinstellung „clear“ und einer Einleseweite von 300 mm. Nach vorheriger Hintergrundsubtraktion wurden die unterschiedlichen Intensitäten der verschiedenen Banden automatisch von der Software ermittelt. Diese wurden dann mittels Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) in Diagrammen dargestellt.

2.2.8 Labormethoden

Die Messungen der klinisch-chemischen Parameter wurden mithilfe von standardisierten Routinemessmethoden im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Göttingen durchgeführt. Die Parameter TNF-α, IL-1β, löslicher Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) und IL-6 wurden mithilfe von immunometrischen und funktionellen Standarduntersuchungen mit dem IMMULITE® System aus EDTA-Plasma ermittelt. Fibrinogen wurde in Citrat-Plasma nach der Methode der Koagulometrie nach Clauss (1957) gemessen. Zur Bestimmung der Komplementkomponenten C3c und C4 wurde ein Untersuchungskit (Dade Behring AG, Marburg, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Komplementaktivität CH50 wurde mithilfe der Hämolyse der Erythrozyten bei einer Wellenlänge von 541 nm getestet. Die Cholesteringruppen des Serums, Gesamt-, LDL-, HDL-Cholesterin, und die Triglycerine wurden mit dem standardisiertem Verfahren des klinisch-chemischen Labors des Universitätklinikums Göttingen gemessen. Die Gesamtproteinmenge wurde nach Bradford (1976) analysiert.

2.2.9 Berechnungen und Statistik

Die Reduktion einer einzelnen LDL-Apheresebehandlung wurde nach der folgenden Formel unter Einschluss der Konzentrationen vor (K_{vor}) und nach (K_{nach}) der Behandlung berechnet:

$$\text{Reduktionsrate (\%)} = (K_{vor} - K_{nach}) \times 100/K_{vor}$$

Der mittlere LDL-Cholesterinspiegel (m LDL-C) wurde mithilfe der Methode von Friedwald et al. (Friedewald et al. 1972) gemessen und wie vorher beschrieben:

$$\text{m LDL-C} = b + 3{,}78\ (a-b)/x$$

Wobei „a“ der LDL-Cholesterinspiegel direkt nach der Apheresebehandlung, „b“ der LDL-Cholesterinspiegel direkt vor der Apheresebehandlung und „x“ das Behandlungsintervall in Tagen ist.

Die durch MALDI-TOF-MS entdeckten Proteine wurden qualitativ beschrieben.

Die anderen Resultate wurden mithilfe der Mittelwerte ± Standardabweichung (SA) beschrieben.

Vergleichende Statistiken über Änderungen innerhalb von Subjekten oder Behandlungen wurden errechnet mithilfe des t-Tests für gepaarte Proben. Die T-Statistik wurde hier berechnet als:

$$T = \frac{\bar{x}_d - \mu_d}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}}$$

wobei $\bar{x}_d$ das arithmetische Mittel der Differenzen der Messwerte der einzelnen Paare und s_d die Standardabweichung dieser Differenzen war, die gemäß der Formel

$$\sqrt{\frac{\sum_{i-1}^{n}(d_i - \bar{x}_d)^2}{n-1}}$$

berechnet wurde (d_i sind hier die Differenzen der Messwerte der einzelnen Paare). Die Größe T folgt einer t-Verteilung mit n-1 Freiheitsgraden; n ist hier die Anzahl der Messwertpaare (http://www.lrz-muenchen.de/~wlm/ilm_t4.htm).

Ein p-Wert von $p < 0,05$ hält das Ergebnis für statistisch signifikant und $p < 0,01$ für statistisch hoch signifikant.

3 Ergebnisse

Alle drei Methoden der LDL-Apherese erbrachten eine signifikante Reduktion des LDL-Cholesterins. Die relevanten Daten der Patienten sowie die Apheresedaten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Patientengruppen. Die Patientendaten und Behandlungsdaten sind in den folgenden Tabellen (Tab. 15, 16) dargestellt. Die genauere Auflistung der einzelnen Patientengruppen sind im Anhang Tabelle 26-28 zusammengefasst.

Tabelle 15 Darstellung der Patientendaten

Auflistung der demographischen Daten, Erkrankung und zusätzlicher medikamentöser Therapie; (*) ggf. keine Behandlung aufgrund von Nebenwirkungen.

	Gesamt	MDF	HELP®	DALI®
Demographische Daten				
Anzahl n	21	9/21 (42.9%)	7/21 (33.3%)	5/21 (23.8%)
Alter (Jahren)	46,8 ± 16,8	56,8 ± 13,1	46,8 ± 16,8	44,7 ± 20,1
Geschlecht (m:w)	11:10	5:4	3:4	3:2
vorhandene Erkrankungen				
Familiäre homozygote HC	3/21 (14.3%)	0/9 (0%)	2/7 (28.6%)	1/5 (20%)
Isolierte HC	14/21 (66.6%)	5/9 (55.6%)	5/7 (71.4%)	4/5 (80%)
Gemischte HC	7/21 (33.3%)	4/9 (44.4%)	2/7 (28.6%)	1/5 (20%)
Erhöhte Lp(a)-Konzentration (>0,3g/L)	10/21 (47.6%)	3/9 (33.3%)	3/7 (42.9%)	4/5 (80%)
Mittleres LDL-C-Konzentration (mg/dl)	125,1 ± 27,4	131,1 ± 34,9	116,7 ± 30.8	124,7 ± 20,6
Zusätzliche lipidsenkende Therapie				
Statine *	19/21 (90,5%)	8/9 (88,9%)	6/7 (85,7%)	5/5 (100%)
Ezetimib	21/21 (100%)	9/9 (100%)	7/7 (100%)	5/5 (100%)

Tabelle 16 Darstellung der Behandlungsdaten

Mittlerer Wert ± Standardabweichung Behandlungsdauer und mittlerer Wert ± Standardabweichung des behandelten Volumens einer Apheresebehandlung eingeteilt nach den einzelnen Verfahren; (*) die Berechnung der behandelten Volumen erfolgte nach Herstellerangaben, welche eine LDL-Reduktionsrate von >60% erreichten, in dem Fall von MDF und HELP® wird der Plasmafluss, bei DALI® der Vollblutfluss betrachtet.

Apheresebehandlungsdaten	MDF	HELP®	DALI®
N	9/21 (42,9%)	7/21 (33,3%)	5/21 (23,8%)
Dauer einer Behandlung (min)	119,8 ± 13,6	100,7 ± 3,6	96,5 ± 20,5 (26-240)
Behandeltes Plasma-/Blut-Volumen (ml) *	3222 ± 363	7586 ± 138	2950 ± 122
Plasma-/Blut-Flussrate ml/min) *	29,0 ± 2,2	30,0 ± 0,0	88,3 ± 4,1
Behandlungsintervalle (1/Woche: 2/Woche)	9:0	7:0	4:1

3.1 2D-Geldarstellung der Filtereluate

Zu diesem Zweck wurden für die drei Verfahren entsprechend der Filtereigenschaft ein angepasstes Protokoll zur Eluation der Proteine benutzt. Das Ergebnis und die Anzahl der

adsorbierten Proteine unterscheidet sich von Filter zu Filter. Im Sinne der Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit wurden jeweils drei Gele für jeden der drei Filtertypen hergestellt. In einem pH-Bereich von 3-10 und dem Filterlimit von 20.000 Pixel der automatischen Image-Analyse wurden im Gel des DALI500®-Filtereluats die höchste Spotanzahl nachgewiesen (1001±36). Die Darstellungen der MDF- und HELP®-Filtereluate zeigten jeweils weniger Spots. So liegt das EC50®-Filtereluat des MDF-Verfahrens mit 881 ± 25 noch vor dem Präzipitat®-Filter des HELP®-Verfahrens mit 535 ± 20 Spots. Das Pixelvolumen eines jeden Spots ist der Ausgangspunkt für den Vergleich der Proteinmenge zwischen den einzelnen Gelen der verschiedenen Filtertypen der Apherese. Ein representatives Gelelektrophorese-Resultat für jeden Filtertyp im direkten Vergleich ist in der Abbildung 7, als auch vergrößerte Ausschnitte mit Spotarkierung in den Abbildungen 8-10 zu sehen.

Die Proteinspots des Eluatgels des EC50®-Filters (MDF) (Abb. 8 I) verteilen sich vor allem auf die Molekulargewichtsbereiche 37-100 Kilodalton (kDa), 25 kDa und kleiner als 15 kDa. In den Bereichen von 100-250 kDa kommen kaum Spots zur Darstellung. Die meisten Spots finden sich in den pH-Bereichen größer 5. In den unteren pH-Bereichen sind kaum Proteine in nahezu allen Molekulargewichtsbereichen zu erkennen. In Abbildung 8 II sind die bearbeiteten Abschnitte des Gels des EC50®-Filters vergrößert dargestellt. Die weiter analysierten Spots (insgesamt 92) wurden markiert.

Die Spots im Gel des Eluats des Präzipitat®-Filters (HELP®) (Abb. 9 I) konzentrieren sich auf den kompletten dargestellten pH-Bereich von 3-10 im Molekulargewichtsbereich zwischen 75 und 150 kDa, in den höheren pH-Bereichen auf den Bereich um 37 kDa. Im Molekulargewichtsbereich um 20 kDa finden sich nur einzelne Spots. In den Bereichen mit einem Molekulargewicht um 15, 25 und 50 kDa kommen kaum Proteine als sichtbare Spots zur Darstellung. Die folgende Abbildung 9 II zeigt die Vergrößerung der bearbeiteten Abschnitte des Gels des Präzipitat®-Filters mit der entsprechenden Markierung der weiter analysierten Spots. Insgesamt wurden hier bei 48 Spots bearbeitet.

Die Proteine des Eluats des DALI500®-Filters des DALI®-Verfahrens (Abb. 10 I) präsentieren sich vor allem als Spots in dem Molekulargewichtsbereich zwischen 15 und 150 kDa und dem pH-Bereich zwischen 5 und 10. Dabei sind die meisten auf den Bereich zwischen 25 und 150 kDa verteilt. Die meisten Proteine im pH-Bereich 6 bis 7 haben ein Gewicht um 15 und 20 kDa. In den niedrigen pH-Bereichen um 3 stellen sich in keinen Molekulargewichtsbereichen Proteine dar. Es wurden beim DALI500®-Filter insgesamt 81 Spots (Abb. 10 II) einer weiteren Analyse zugeführt.

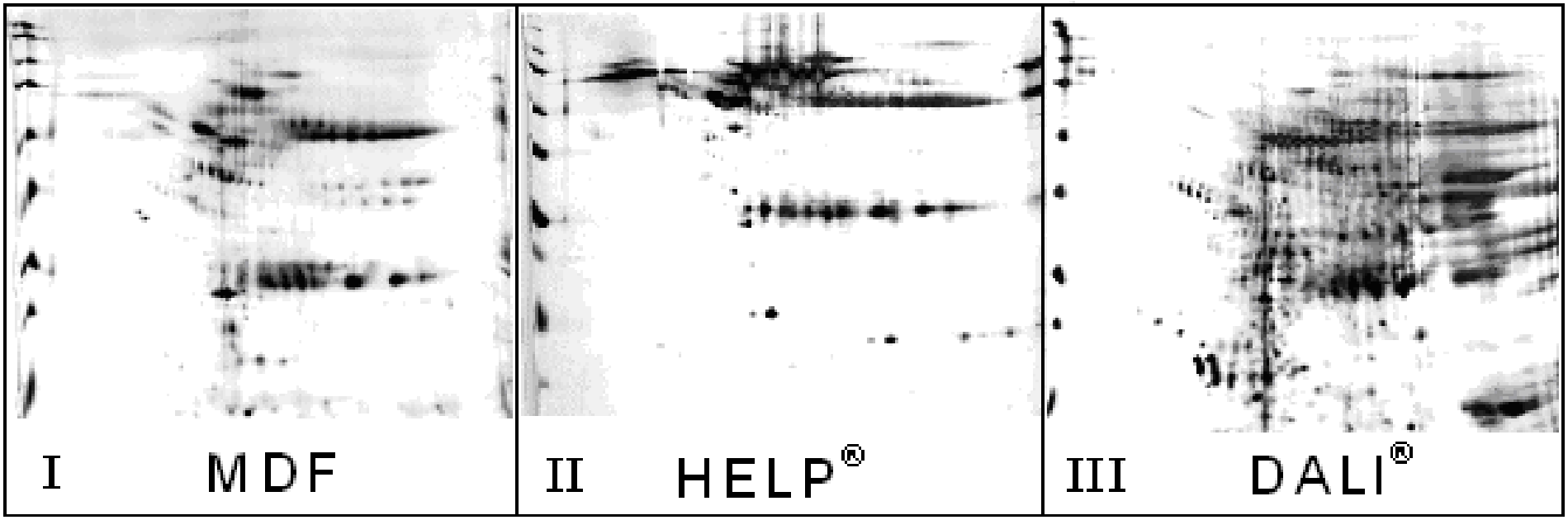
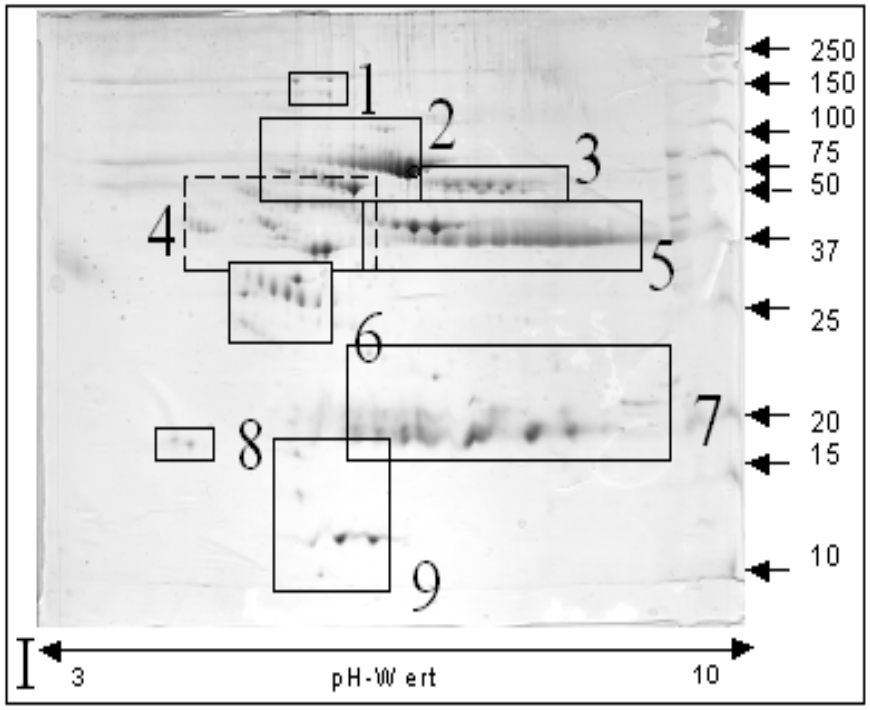


Abbildung 7 2D-SDS-Gele der Eluate der drei Verfahren im Vergleich

I: Gel des Eluats des EC50®-Filters (MDF-Verfahren); **II:** Gel des Eluats des Präzipitatfilters® (HELP®-Verfahren); **III:** Gel des Eluats des DALI500®-Filters (DALI®-Verfahren);



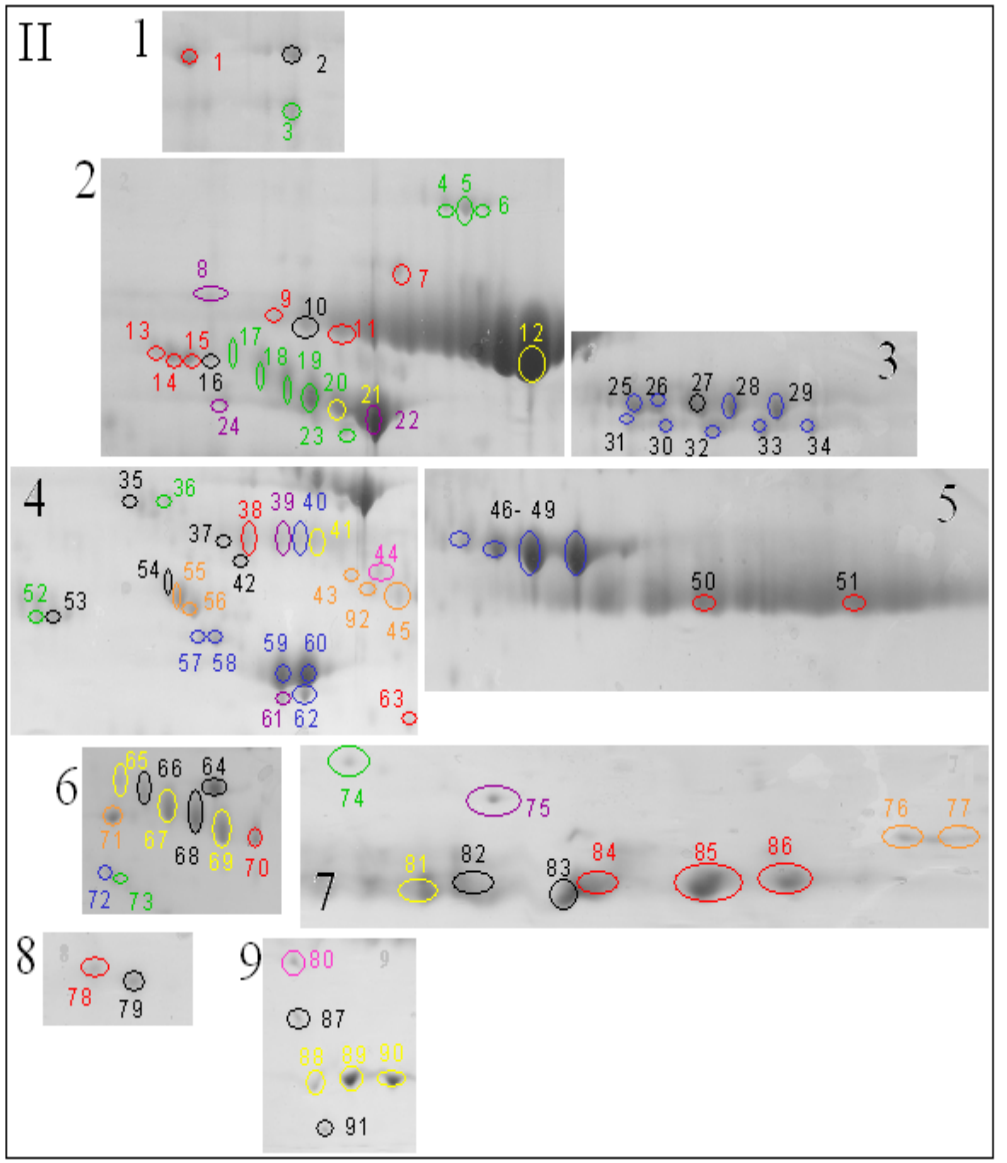
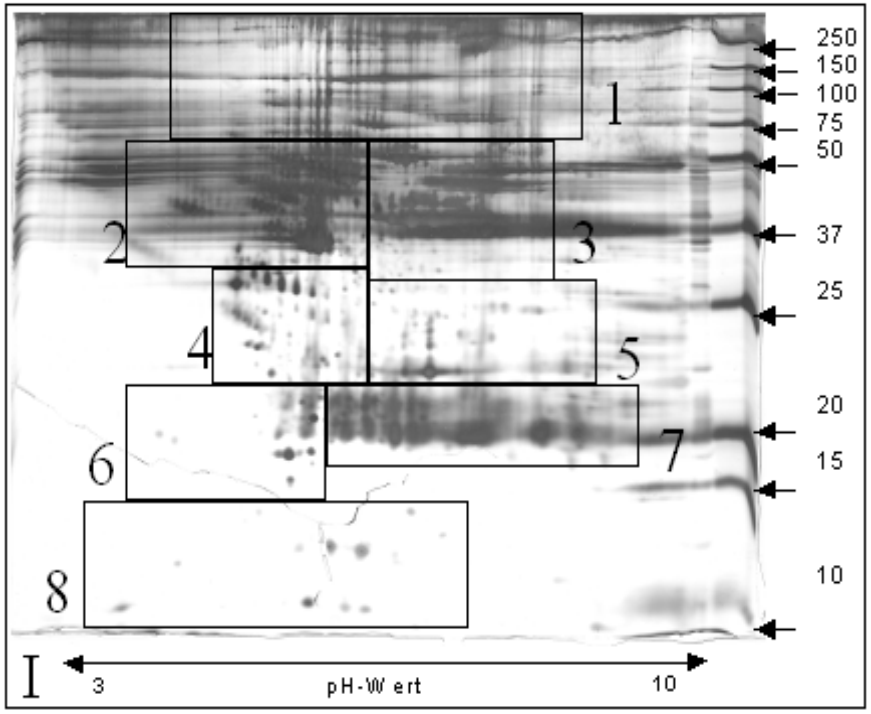


Abbildung 8 2D-Geldarstellung der Eluatproteine des EC50®-Filters

I Darstellung des gesamten 2D-Gels mit Angabe der Molekulargewichtsbereiche von 15-250 kDa (vertikal) und des pH-Wertes von 3-10 (horizontal); 75 identifizierte Spots, davon 38 verschiedene Proteine; Markierung der verschiedenen Ausschnitte (1-9);

II Darstellung der vergrößerten Ausschnitte (1-9) des Gels des MDF-Filtereluats mit Nummerierung und Markierung der verschiedenen bearbeiteten Proteinspots zur besseren Abgrenzung ohne weitere Zuordnungsfunktion;



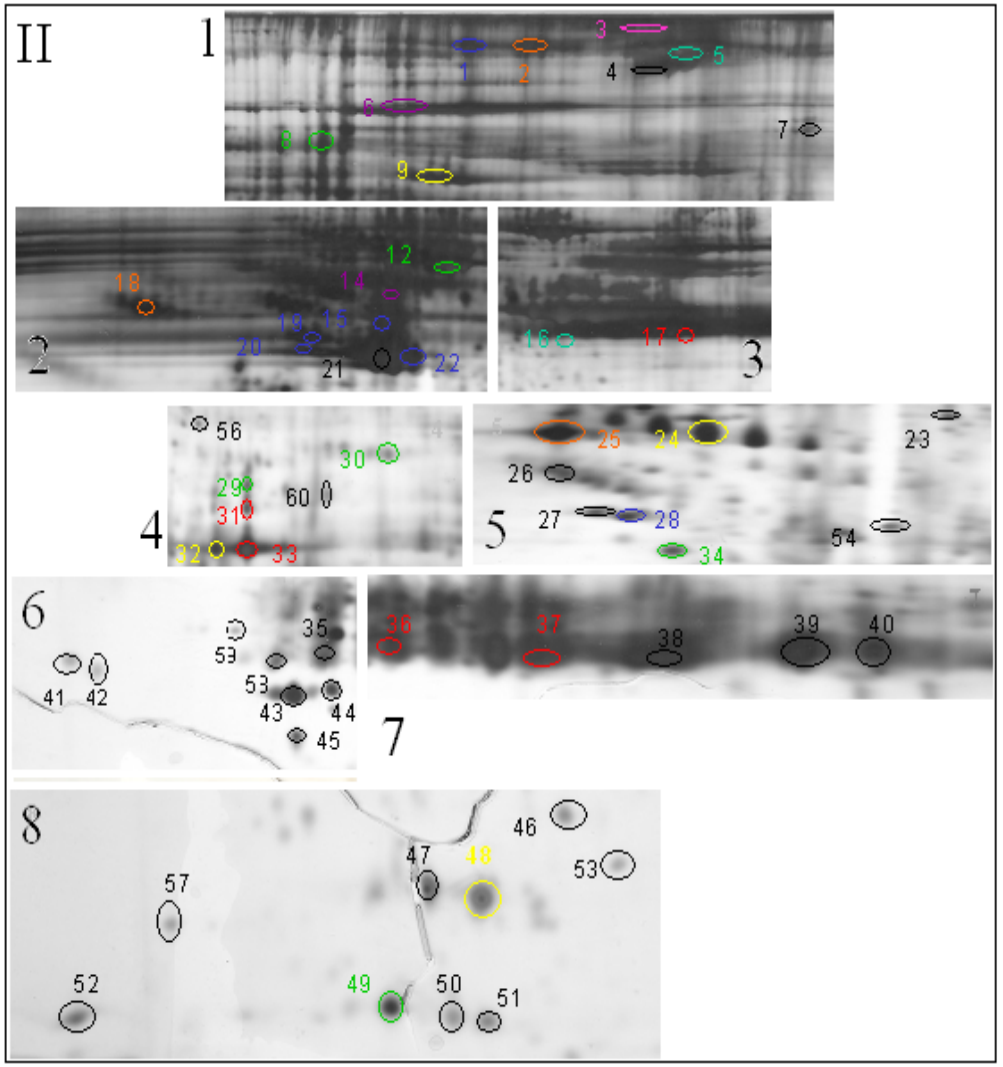
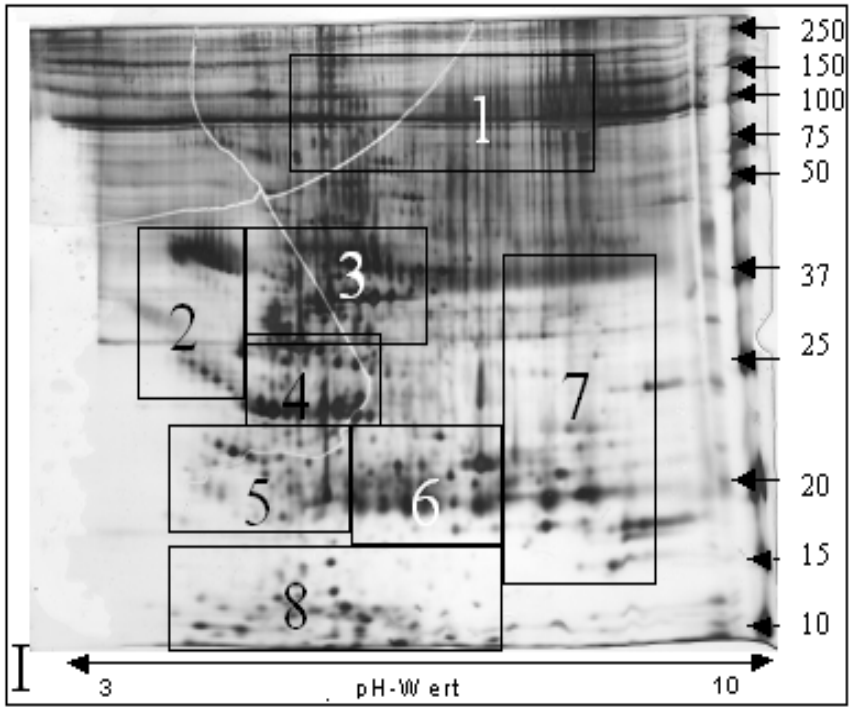


Abbildung 9 **2D-Geldarstellung der Eluatproteine des Präzipitat®-Filters**

I Darstellung des gesamten 2D-Gels mit Angabe der Molekulargewichtsbereiche von 15-250 kDa (vertikal) und des pH-Wertes von 3-10 (horizontal); 34 identifizierte Spots, davon 23 verschiedene Proteine; Markierung der verschiedenen Ausschnitte (1-8);

II Darstellung der vergrößerten Ausschnitte des Gels (1-8) des HELP®-Filtereluats mit Nummerierung und Markierung der verschiedenen bearbeiteten Proteinspots zur besseren Abgrenzung ohne weitere Zuordnungsfunktion;



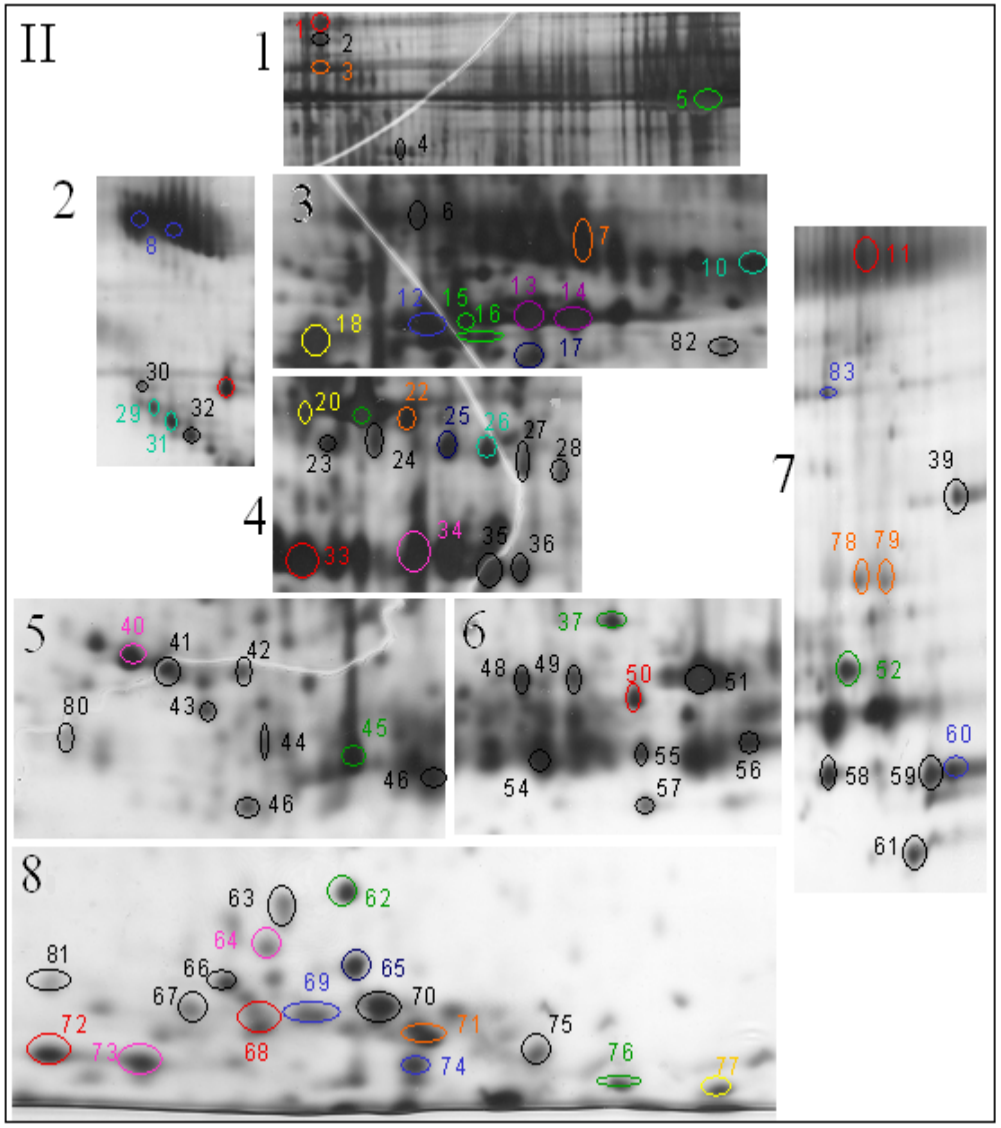


Abbildung 10 2D-Geldarstellung der Eluatproteine des DALI500®-Filters

I Darstellung des gesamten 2D-Gels mit Angabe der Molekulargewichtsbereiche von 15-250 kDa (vertikal) und des pH-Wertes von 3-10 (horizontal); 47 identifizierte Spots, davon 30 verschiedene Proteine; Markierung der verschiedenen Ausschnitte (1-8);

II Darstellung der vergrößerten Ausschnitte des Gels (1-8) des DALI®-Filtereluats mit Nummerierung und Markierung der verschiedenen bearbeiteten Proteinspots zur besseren Abgrenzung ohne weitere Zuordnungsfunktion;

3.2 Massenspektrometrieanalyse und Datenbanksuche

Bei der Interpretation der Massenspektrometriedaten wurden posttranslationale Modifikationen, wie Carboxyamidomethylierung und Methionin-Oxidation, als variable Identifikationsparameter betrachtet. Mithilfe der MALDI- oder LC-ESI-Q-TOF-Analyse wurden für alle drei Filtereluate die Proteine einer Auswahl von Spots identifiziert. Die identifizierten Proteine wurden nach deren Funktion in Gruppen zusammengefasst. Aufgrund der multiplen Funktionen eines einzelnen Proteins, erfolgte die Aufteilung nach der funktionellen Relevanz im Rahmen der Atherosklerose. Somit wurden die folgenden Gruppen gefunden:

- Gruppe der Apolipoproteine
- Gruppe der hämorheologisch wirksamen Proteine
- Gruppe der inflammatorischen Proteine
- Gruppe der Adhäsionsproteine
- Plasmaproteine ohne funktionale Zuordnung.

Die identifizierten Proteine sind mit Zugangsnummer, Molekulargewicht in kDa, Identifizierungs-Score basierend auf der gefundenen Peptidanzahl mittels MS/MS und Datenbanksuche oder basierend auf dem Massenfingerabdruck, sowie dem Resultat der Peptidsequenzierung in den Tabellen 17-21 dargestellt. Durch eine Markierung (+) ist zu sehen, in welchen Filtern die einzelnen Proteine gefunden wurden. Insgesamt wurden 13 Proteine gefunden, die ubiquitär in allen drei Filtereluaten detektiert werden konnten.
Eine ausführliche, vergrößerte Darstellung der Gelspots mit Nummerierung für die drei Verfahren wird in den Abbildungen 8 II -10 II demonstriert. Für den EC50®-Filter (Abb. 8 II) wurden bei insgesamt 92 behandelten Spots, 75 eindeutig identifiziert, wovon 35 Proteine verschieden waren. Im Gel des Präzipitatfilters® des HELP®-Verfahrens (Abb. 9 II) wurden von 48 ausgeschnittenen Spots, insgesamt 34 entschlüsselt, von denen wiederum 23 unterschiedliche Proteine identifiziert wurden. Bei den 81 bearbeiteten Spots des DALI 500®-Filters (Abb. 10 II) wurden 47 Spots erfolgreich bestimmt, wobei sich 30 verschiedene Proteine fanden. Die gesamte Auflistung der Ergebnisse der Identifikation der markierten Spots findet sich im Anhang Tabelle 28.

3.2.1 Gruppe der Apolipoproteine

Bei der Lipoproteingruppe (Tab. 17) wurden für jeden Filter unterschiedliche Proteine identifiziert: Für den EC50®-Filter wurden die Apolipoproteine-A-I und -H gefunden. Beim

HELP®-Filter wurde das Apolipoprotein-A-IV identifiziert. Beim DALI500®-Filter wurde das Apolipoprotein-B dargestellt.

Tabelle 17 Gruppe der Apolipoproteine

Auflistung der analysierten Proteine mit Zugangsnummer der Vergleichsdatenbank Swiss port, Molekulargewicht (MG), dem Identifizierungs-Score sowie der Anzahl der gefundenen sequenzierten Peptide nach der Peptidsequenzierung. Mit (+) markierte Proteine wurden in den verwandten Eluaten identifiziert, mit (-) markiert konnten sie nicht in den entsprechenden Eluaten identifiziert werden. Die angegebenen Scores wurden basierend auf dem Massenfingerabdruck oder basierend auf der gefundenen Peptidanzahl nach Datenbanksuche mittels Mascot von Matrix Science ermittelt.

Proteinname	Zugangsnummer Swiss prot	MG	Score	Anzahl sequenzierter Peptide	MDF	HELP®	DALI®
Apolipoprotein-A-I	P02647	30778	162	7	+	-	-
Apolipoprotein-A-IV	P06727	45371	85	2	-	+	-
Apolipoprotein-B (einschließlich Ag (x) Antigen)	P04114	515563	389	25	-	-	+
Apolipoprotein-H	P02749	38298	103	3	+	-	-

3.2.2 Gruppe der hämorheologisch wirksamen Proteine

Diese Proteine sind an der Gerinnung beteiligt und beeinflussen somit auch die Viskosität des Blutes (Tab. 18). Insgesamt wurde bei allen Filtereluaten Fibrinogen gefunden.

Tabelle 18 Gruppe der hämorheologischen Proteine

Auflistung der analysierten Proteine mit Zugangsnummer der Vergleichsdatenbank Swiss port, Molekulargewicht (MG), dem Identifizierungs-Score sowie der Anzahl der gefundenen sequenzierten Peptide nach der Peptidsequenzierung. Mit (+) markierte Proteine wurden in den verwandten Eluaten identifiziert, mit (-) markiert konnten sie nicht in den entsprechenden Eluaten identifiziert werden. Die angegebenen Scores wurden basierend auf dem Massenfingerabdruck oder basierend auf der gefundenen Peptidanzahl nach Datenbanksuche mittels Mascot von Matrix Science ermittelt.

Proteinname	Zugangsnummer Swiss prot	MG	Score	Anzahl sequenzierter Peptide	MDF	HELP®	DALI®
Albumin	P02768	65695	530	21	+	+	-
ALB-Protein	P02768	45160	180		-	-	+
Alpha-1-Antitrypsin	P01009	46737	164	8	+	+	+
Alpha-2-Antiplasmin	P08697	54566	416	11	+	+	+
Fibrinogen A alpha Polypeptid	P02671	69714	679	30	+	+	+
Fibrinogen beta Kette	P02675	55928	217	8	+	+	+
Fibrinogen gamma Polypeptid	P02679	51512	176	6	+	+	+
Kininogen-1	P01042	71900	89		+	+	+
Plasminogen	P00747	90569	168		+	-	+
Protein-S	P07225	6380	85		+	-	-

Thrombin	P00734	69992	134	9	+	-	+
Transthyretin (Prealbumin)	P02766	15877	38	2	+	+	+
Vitronectin	P04004	53306	143		-	-	+

3.2.3 Gruppe der adhäsiv wirksamen Proteine

Diese Gruppe umfasst insgesamt vier Proteine (Tab. 19). Für den EC50®-Filter wurde das Protein Ficolin gefunden. Im DALI500®-Filtereluat konnte Fibulin-1 identifiziert werden. Die Serum-Amyloid-P-Komponente (SAP) wurde sowohl im Eluat des HELP®- als auch des DALI500®-Filters entdeckt. Bei allen drei Filtern wurde Fibronektin-1 nachgewiesen.

Tabelle 19 Gruppe der Adhäsionsproteine

Auflistung der analysierten Proteine mit Zugangsnummer der Vergleichsdatenbank Swiss port, Molekulargewicht (MG), dem Identifizierungs-Score sowie der Anzahl der gefundenen sequenzierten Peptide nach der Peptidsequenzierung. Mit (+) markierte Proteine wurden in den verwandten Eluaten identifiziert, mit (-) markiert konnten sie nicht in den entsprechenden Eluaten identifiziert werden. Die angegebenen Scores wurden basierend auf dem Massenfingerabdruck oder basierend auf der gefundenen Peptidanzahl nach Datenbanksuche mittels Mascot von Matrix Science ermittelt.

Proteinname	Zugangsnummer Swiss prot	MG	Score	Anzahl sequenzierter Peptide	MDF	HELP®	DALI®
Amyloid-P-Komponente, Serum	P02743	25387	97	7	-	+	+
Fibulin-1	P23142	77261	50	2	-	-	+
Ficolin	O75636	32882	67		+	-	-
Fibronektin-1	P02751	262607	106	11	+	+	+

3.2.4 Gruppe der Immunoglobuline und immunologisch wirksamen Proteine

Bei allen drei Gruppen wurden Immunoglobulinketten, sowie Bestandteile des Komplementsystems (Komplement C3, C4, C4B, Faktor H) gefunden (Tab. 20). Ebenso fanden sich eine Reihe von Proteinen, die im Blut Transportfunktionen (z.B. Transferrin) erfüllen. Hier wurden sie als ein Teil der rheologisch-tätigen Proteine eingeordnet. Bei allen drei Verfahren wurde Haptoglobin und Alpha-2-Makroglobulin identifiziert.

Tabelle 20 Gruppe der Immunsystem-modulierenden Proteine

Auflistung der analysierten Proteine mit Zugangsnummer der Vergleichsdatenbank Swiss port, Molekulargewicht (MG), dem Identifizierungs-Score sowie der Anzahl der gefundenen sequenzierten Peptide nach der Peptidsequenzierung. Mit (+) markierte Proteine wurden in den verwandten Eluaten identifiziert, mit (-) markiert konnten sie nicht in den entsprechenden Eluaten identifiziert werden. Die angegebenen Scores wurden basierend auf dem Massenfingerabdruck oder basierend auf der gefundenen Peptidanzahl nach Datenbanksuche mittels Mascot von Matrix Science ermittelt.

Proteinname	Zugangsnummer Swiss prot	MG	Score	Anzahl sequenzierter Peptide	MDF	HELP®	DALI®
Alpha-2-HS-Glykoprotein	P02765	39325	104	4	+	-	-
Alpha-2-Makroglobulin	P01023	163278	121	8	+	+	+

B-Faktor, Properdin	P00751	85508	166	10	+	-	-
CD5-Antigen-ähnlich	O43866	38088	89		+	-	-
Ceruloplasmin (Ferroxidase)	P00450	122205	121		+	-	-
Komplement C1q	P02746	26377	96		+	-	-
Komplement C1r Subkomponente	P00736	80122	110		+	-	+
Komplement C4 Precursor	P0C0L4	192771	58	2	+	+	+
Komplement C 1	P00736	80174	99		+	-	+
Komplement C 3	P01024	187164	452	14	+	+	+
Komplement C 7	P10643	93518	68	2	-	+	-
Komplement Komponente C1s Subkomponente	P09871	76635	75		-	-	+
Komplementkomponente 4A	Q5JNX2	192742	135		+	-	+
Komplementkomponente C4B	Q5ST68	32399	112	4	+	+	+
Komplementfaktor B, Properdin	P00751	85533	166		+	-	+
Komplementfaktor H Precursor	P08603	139125	172	8	+	+	+
Komplementfaktor H-verwandt 5	Q09101	67402	156	6	-	-	+
Haptoglobin-verwandtes Protein	P00739	38811	115	3	+	+	-
Haptoglobin	P00738	38427	311		+	+	+
Hemopexin	P02790	51643	172		+	-	-
IGHA1-Protein	Q6GMX2	52865	76		+	-	-
Ig kappa Kette C Region	P01834	49310	170	5	+	+	+
Immunoglobulin schwere Konstante mu	P01871	49557	127		+	-	-
Immunoglobulin J Kette	P01591	15594	77		+	+	+
Immunoglobulin schwere Konstante gamma 1	P01857	36106	150		+	-	-
Immunoglobulin schwere Konstante gamma 1	P01857	36083	225	5	-	-	+
Immunoglobulin schwere Konstante gamma 2	P01857	52666	459	11	+	-	-
Inter-alpha-Trypsininhibitor-H4	P19823	103358	100		-	+	-
Inter-alpha-(Globulin)-Inhibitor-H3	Q06033	99121	76	3	-	-	-
Inter-alpha-(Globulin)-Inhibitor-H2	P19823	125688	68	4	-	+	-
Lysozyme	P37161	16430	89		-	-	+
Mannan-bindende Lectin-Serine-Protease-2	O00187	75654	50	3	-	-	+

Peroxiredoxin-2	P23119	21761	100	5	-	-	+
Prokollagen-C-Endopeptidaseenhancer	Q15113	47972	71		-	-	+
Purinergic-Rezeptor-PX2	P99572	68559	97		-	+	-
TGF-ß	P01137	44341	156		-	-	+
Transferrin	P02787	77050	289	8	+	+	-

3.2.5 Gruppe der Plasmaproteine ohne funktionale Zuordnung

In diese Gruppe wurden insgesamt vierzehn Proteine eingeordnet (Tab. 21).

Tabelle 21 Gruppe der Proteine ohne funktionale Einordung

Auflistung der analysierten Proteine mit Zugangsnummer der Vergleichsdatenbank Swiss port, Molekulargewicht (MG), dem Identifizierungs-Score sowie der Anzahl der gefundenen sequenzierten Peptide nach der Peptidsequenzierung. Mit (+) markierte Proteine wurden in den verwandten Eluaten identifiziert, mit (-) markiert konnten sie nicht in den entsprechenden Eluaten identifiziert werden. Die angegebenen Scores wurden basierend auf dem Massenfingerabdruck oder basierend auf der gefundenen Peptidanzahl nach Datenbanksuche mittels Mascot von Matrix Science ermittelt.

Proteinname	Zugangs nummer Swiss prot	MG	Score	Anzahl sequenzierter Peptide	MDF	HELP®	DALI®
Aktin-gamma-1	P63261	40220	121	7	-	-	+
Alpha-1B-Glykoprotein	P04217	54239	517	13	+	-	-
Carbonicanhydrase-1	P00915	28739	71		-	-	+
Clusterin	P10909	36712	108		+	-	-
Kollagen alpha-1(V)	P20908	183560	406	13	-	-	+
Kollagen alpha-2 (I)	P08123	129457	345	11	-	+	+
Gelsolin (Amyloidosis, finnischer Typ)	P06396	85698	50	2	-	-	+
Methyltransferase-ähnliches Protein-2	Q96IZ6	43521	65		-	+	-
Nebulin (Fragment)	P20929	773214	167	6	+	-	+
Serine-(oder Cystein)-Proteinaseinhibitor	P05154	39861	80		-	-	+
P2X Purinoceptor-7	Q99572	68559	110		-	-	+
Retinol-bindendes Protein-4, Plasma	P02753	66027	101	9	-	-	+
Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor-(GDI)-beta	P52566	22988	90	2	-	-	+
Smoothelin	P53814	102267	79		-	+	-

3.3 Quantifizierung des LDL-Apherese-Proteinverlustes mittels Western-Blot

Um die Ergebnisse der 2D-Elektrophorese, einen Proteinverlust während der LDL-Apherese, zu verifizieren wurden mittels der Western-Blot-Methode ausgewählte Proteine [Alpha-1-

Antitrypsin, Alpha-2-Antiplasmin, Alpha-2-Makroglobulin, Kollagen, Komplementfaktor-B, Fibronektin, Plasminogen, Prä-Albumin, transformierter Wachstumsfaktor beta-1 (TGFß-1), Transferrin] immunochemisch analysiert und abgebildet (Abb. 11-15 IA + IIA). Mittels der Messung der relativen Intensität der erzeugten Western-Blot-Spots im Vergleich zwischen vor und nach dem Filter, konnte so die quantitative Veränderung in Form eines Diagramms dargestellt werden (Abb. 11-15 IB + IIB). Das Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern nach der 1D-Gelauftrennung bestätigt das Vorkommen von Plasmaproteinen, wie Alpha-1-Antitrypsin (Abb. 11 I), Alpha-2-Makroglobulin (Abb. 11 II), Alpha-2-Antiplasmin (Abb. 12 I), Plasminogen (Abb. 12 II), Komplementfaktor-B (Abb. 13 I), TGFß-1 (Abb. 13 II), Prä-Albumin (Abb. 14 I), Transferrin (Abb. 14 II), Kollagen (Abb. 15 I) und Fibronektin (Abb. 15 II) in allen drei Filtereluaten.

Als Bestätigung der 2D-Gelelektrophoresedaten zeigt die Western-Blot-Analyse einen Verlust von Plasmaproteinen nach Durchlaufen der verschiedenen LDL-Apheresefilter. Die Analyse des Plasmas zeigt eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes der einzelnen gesuchten Proteine nach dem Filter im Vergleich zu den Proben, die vor dem Filter entnommen wurden. Im folgenden sind die Abbildungen zusammengefasst für jedes Protein dargestellt.

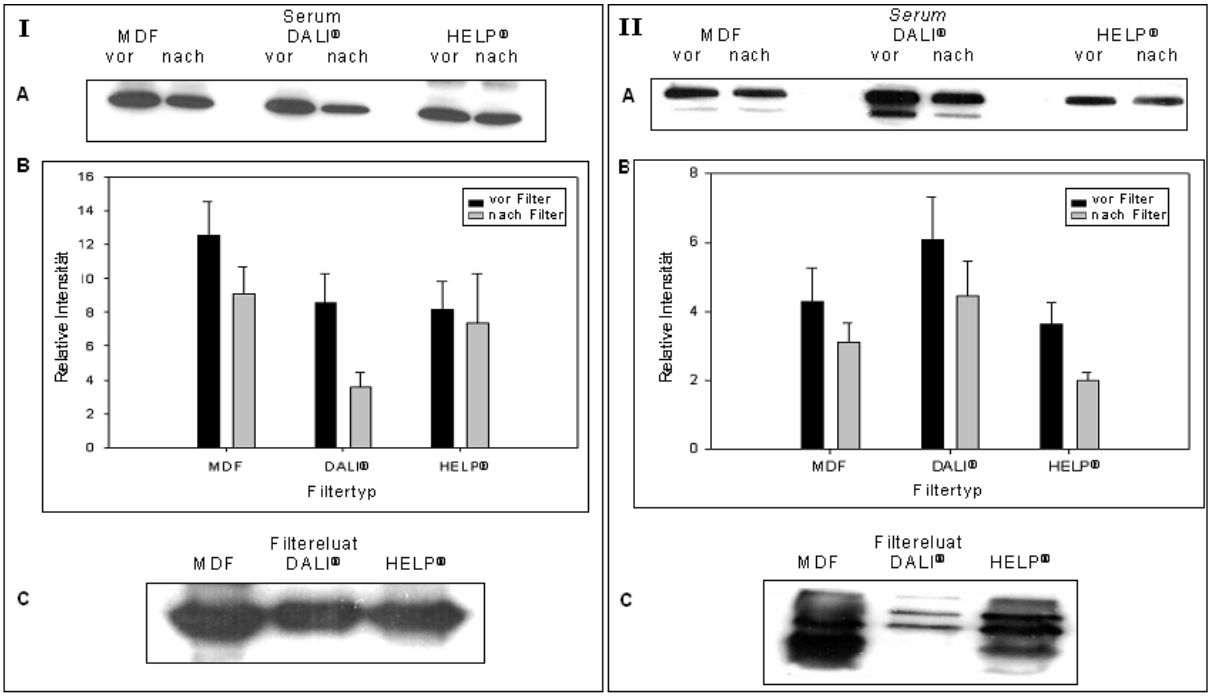


Abbildung 11 Western-Blot-Ergebnisse:I: Alpha-1-Antitrypsin; II: Protein Alpha-2-Makroglobulin

A Darstellung der Proteinspots der Serumprobe vor und nach Durchlaufen der drei Filtertypen;

B Statistische Darstellung der relativen Intensität der Serumprobe vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Filtertypen;

C immunochemische Darstellung der Proteinspots der drei verschiedenen Filtereluatproben;

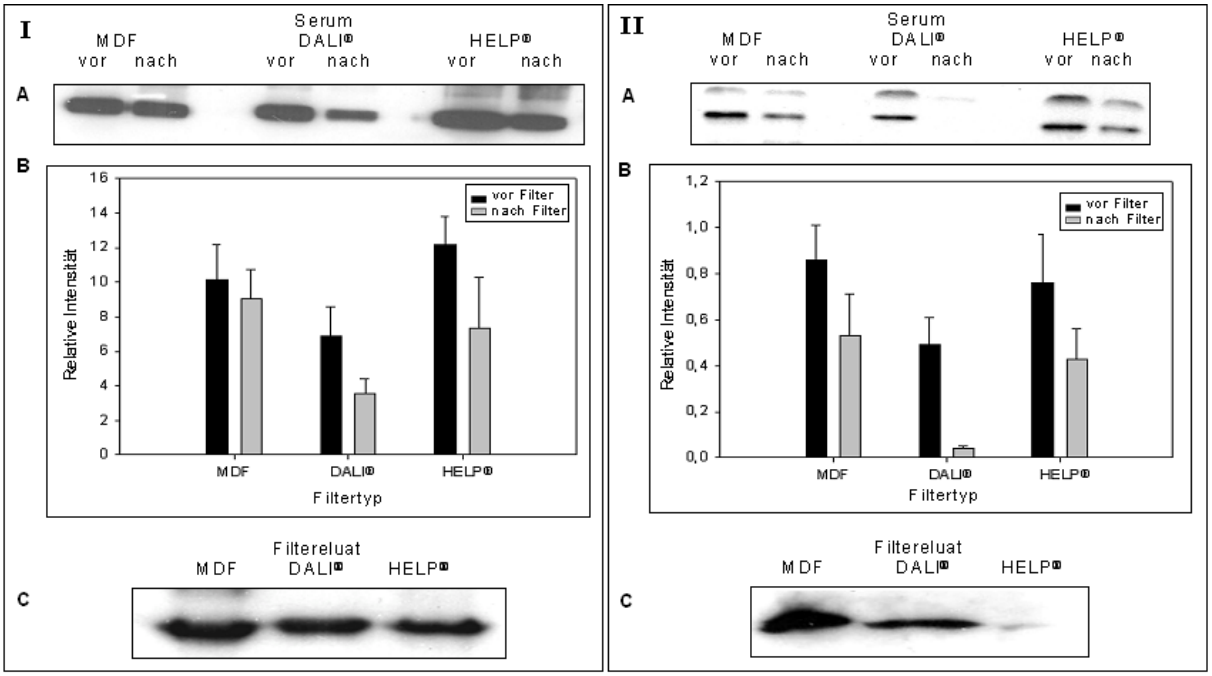


Abbildung 12 Western-Blot-Ergebnisse: I: Alpha-2-Antiplasmin; II: Plasminogen

A Darstellung der Proteinspots der Serumprobe vor und nach Durchlaufen der drei Filtertypen;

B Statistische Darstellung der relativen Intensität der Serumprobe vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Filtertypen;

C immunochemische Darstellung der Proteinspots der drei verschiedenen Filtereluatproben;

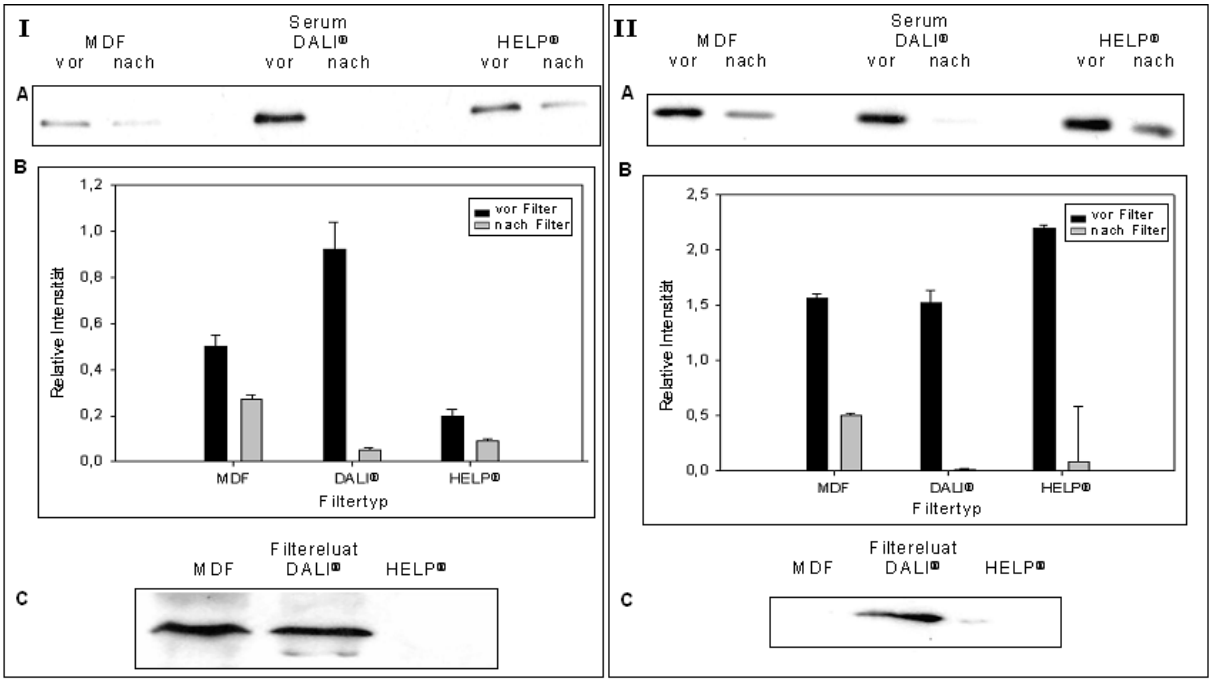


Abbildung 13 Western-Blot-Ergebnisse: I: Komplement Faktor-B; II: TGFß-1

A Darstellung der Proteinspots der Serumprobe vor und nach Durchlaufen der drei Filtertypen;

B Statistische Darstellung der relativen Intensität der Serumprobe vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Filtertypen;

C immunochemische Darstellung der Proteinspots der drei verschiedenen Filtereluatproben;

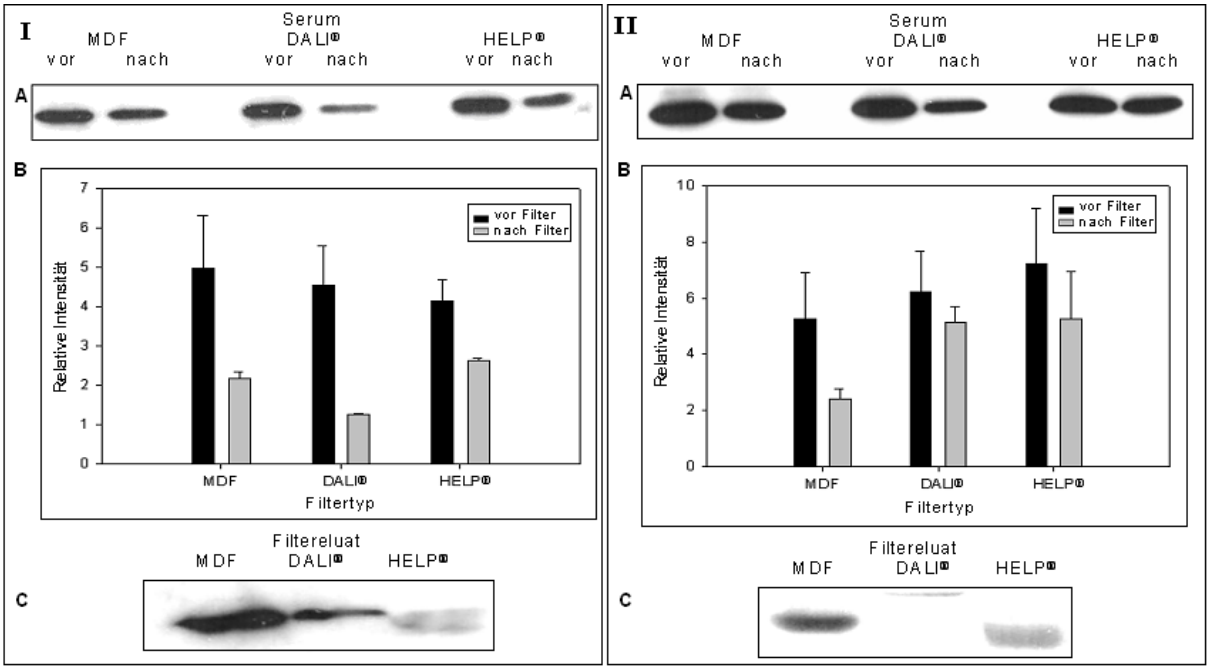


Abbildung 14 Western-Blot-Ergebnisse: I: Prä-Albumin; II: Transferrin

A Darstellung der Proteinspots der Serumprobe vor und nach Durchlaufen der drei Filtertypen;

B Statistische Darstellung der relativen Intensität der Serumprobe vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Filtertypen;

C immunochemische Darstellung der Proteinspots der drei verschiedenen Filtereluatproben;

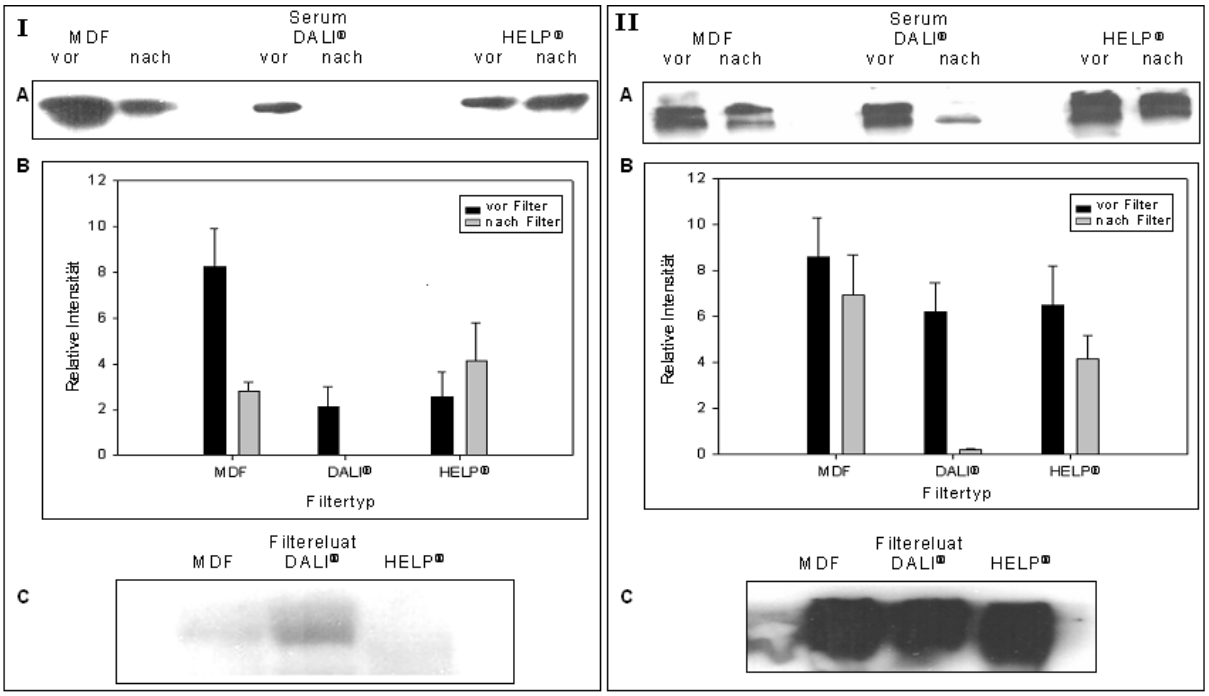


Abbildung 15 Western-Blot-Ergebnisse: I: Kollagen-1; II: Fibronektin

A Darstellung der Proteinspots der Serumprobe vor und nach Durchlaufen der drei Filtertypen;

B Statistische Darstellung der relativen Intensität der Serumprobe vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Filtertypen;

C immunochemische Darstellung der Proteinspots der drei verschiedenen Filtereluatproben;

3.4 Laborchemische Analyse ausgewählter Proteine

Zur weiteren Bestätigung der Ergebnisse konnten einige der gefundenen Proteine mit laborchemischen Methoden gemessen werden (Tab. 22). Es zeigt sich eine signifikante Reduktionsrate des Gesamtproteins (-18,0% ± 5,9%, p <0,01) in allen benutzten LDL-Apheresеverfahren, diese reichte von -13,5% ± 5,7% des DALI®-Verfahrens bis zu -20,8% ± 5,4% der HELP®-Methode. Der Rückgang von Apolipoprotein-A-I, Albumin und Transferrin bewegte sich in einem vergleichbaren Rahmen, war jedoch im Vergleich zum Gesamtprotein nicht signifikant. Eine signifikant höhere Reduktion im Vergleich zu der Gesamtproteinmenge konnte für Fibrinogen, Haptoglobin, Komplement C3c, Komplement C4 und Komplement CH50 nachgewiesen werden.

Tabelle 22 Darstellung der mittleren Reduktionsrate ± Standardabweichung der verschiedenen Plasmaparameter

Gesamtcholesterin (Gesamt-C), LDL-Cholesterin (LDL-C), HDL-Cholesterin (HDL-C), Triglyzeride (TG), Lipoprotein(a), Apolipoprotein-A-I (Apo-A-I), -B (Apo-B), Gesamtprotein, Albumin, Fibrinogen, Komplement CH50, C3 und C4, Haptoglobin und Transferrin eingeteilt nach den einzelnen Verfahren und für alle Methoden zusammengefasst; *Reduktionsrate (%) = (Konz.vor-Konz.nach) x 100/Konz.vor; **p <0,05 Vergleich der Werte vor und nach der Apheresebehandlung, ***p <0,01 Vergleich der Werte vor und nach der Apheresebehandlung;

Reduktionsrate *	Gesamt	MDF	HELP®	DALI®
Patientenanzahl	21	9	7	5
Gesamt-C	-54,9 ± 6,0%***	-52,6 ± 3,8%***	-53,4 ± 8,2%***	-57,8 ± 5,9%***
LDL-C	-63,1 ± 5,7%***	-59,3 ± 2,7%***	-61,1 ± 5,0%***	-67,4 ± 5,4%***
HDL-C	-11,0 ± 9,1%	-13,8 ± 9,7%**	-9,7 ± 12,3%	-9,3 ± 7,3%
TG	-62,0 ± 12,2%***	-62,5 ± 14,1%***	-59,9 ± 11,3%***	-62,8 ± 12,8%***
Lp(a)	-70,7 ± 5,6%***	-69,6 ± 8,5%***	-66,0 ± 5,6%**	-72,4 ± 5,2%***
Apo-B	-60,3 ± 10,0%***	-55,0 ± 12,4%***	-60,7 ± 8,4%**	-66,2 ± 5,8%***
Apo-A-I	-16,5 ± 6,4%**	-17,2 ± 3,5%***	-20,8 ± 6,4%**	-9,6 ± 2,9%***
Gesamtprotein	-18,0 ± 5,9%***	-16,8 ± 2,0%***	-20,8 ± 5,4%***	-13,5 ± 5,7%***
Albumin	-13,6 ± 4,3%**	-12,1 ± 2,2%***	-16,5 ± 5,3%**	-11,2 ± 2,7%***
Fibrinogen	-47,2 ± 20,1%***	-51,4 ± 11,0%***	-70,1 ± 6,2%***	-23,2 ± 6,9%***
CH50	-29,0 ± 27,1%**	-24,9 ± 37,1%**	-42,9 ± 15,7%**	-26,0 ± 9,0%**
C3c	-19,3 ± 13,2%**	-16,1 ± 6,9%***	-41,1 ± 2,9%***	-9,6 ± 6,0%**
C4	-36,3 ± 21,0%***	-34,9 ± 21,5%***	-61,4 ± 4,1%***	-21,5 ± 7,9%***
Haptoglobin	-25,1 ± 12,5%**	-32,0 ± 8,1%***	-28,1 ± 12,9%	-11,2 ± 3,3%***
Transferrin	-13,4 ± 4,5%***	-11,4 ± 2,8%***	-16,4 ± 5,4%*	-11,4 ± 3,2%***

Ebenso wurden bei allen Patienten vor und nach der Behandlung die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine im Plasma gemessen.

Die Werte für das Zytokin TNF-α (Abb. 16) verhalten sich bei den verschiedenen Verfahren deutlich unterschiedlich. So kam es bei der MDF zu einer geringen (0,12 pg/l ± 1,22), bei dem DALI®-Verfahren zu einer höheren (1,12 pg/l ± 1,37) Abnahme. Dagegen ließ sich bei HELP® eine Zunahme (-1,88 pg/l ± 3,64) verzeichnen.

Anders dagegen zeigten alle drei Verfahren eine Abnahme der Konzentration des löslichen Interleukins sIL-2R nach dem jeweiligen Filter (Abb. 16).

Das Zytokin IL-6 (Abb. 17) nimmt bei MDF (-0,31 pg/l ± 0,61) und HELP® (12,02 pg/l ± 25,8) zu, die Konzentration bei DALI® (0 pg/l ± 0) verändert sich nicht messbar. Insgesamt lässt sich bei allen Behandlungen eine Zunahme der Konzentration (-3,5 pg/l ± 14,8) feststellen.

Bei den Konzentrationen des proinflammatorischen Zytokins IL-1ß (Abb. 17) ließen sich mit diesen klinisch-chemischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Behandlung messen.

Für das CRP (Abb. 18) ließ sich nach der Behandlung mit Ausnahme von HELP® eine Abnahme der Konzentration feststellen.

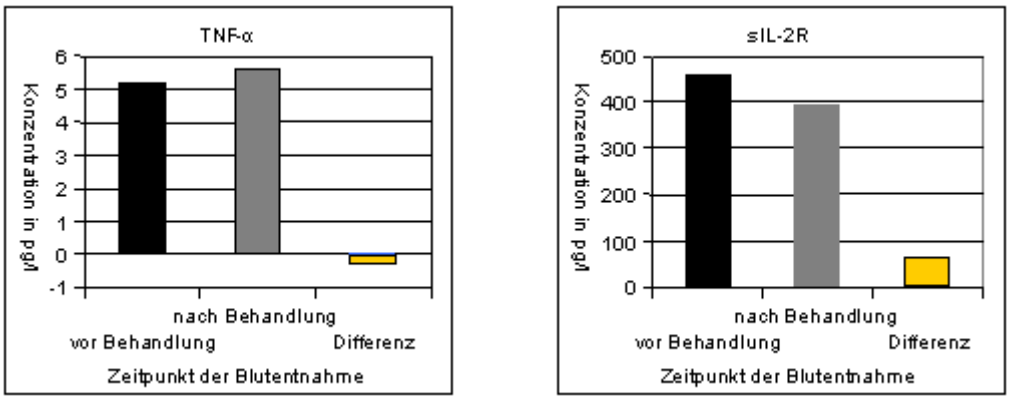


Abbildung 16 Darstellung der Konzentrationsdifferenz von TNF-α und sIl-2R

Graphische Darstellung der Konzentrationen vor und nach Behandlung und Konzentrationsdifferenzen (Konz. vor – Konz. nach) für die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und sIl-2R in pg/l zusammengefasst für alle Verfahren;

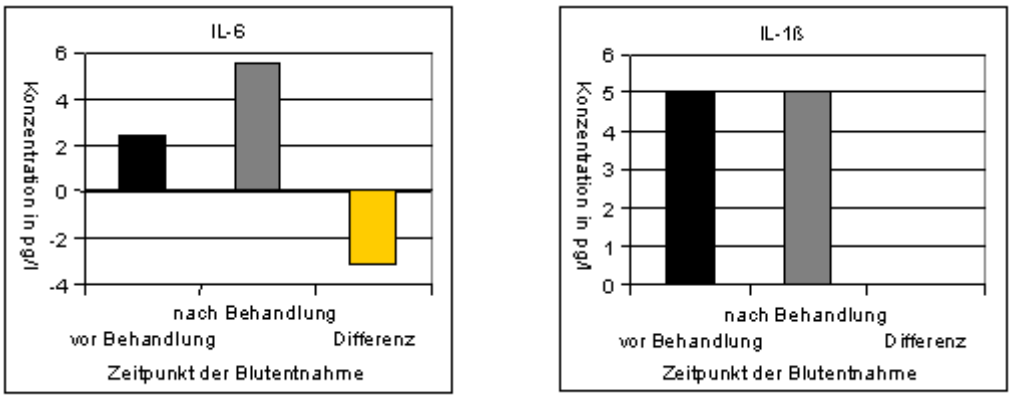


Abbildung 17 Darstellung der Konzentrationsdifferenz von IL-6 und IL-1ß

Graphische Darstellung der Konzentrationen vor und nach Behandlung und Konzentrationsdifferenzen (Konz. vor – Konz. nach) für die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1ß in pg/l zusammengefasst für alle Verfahren;

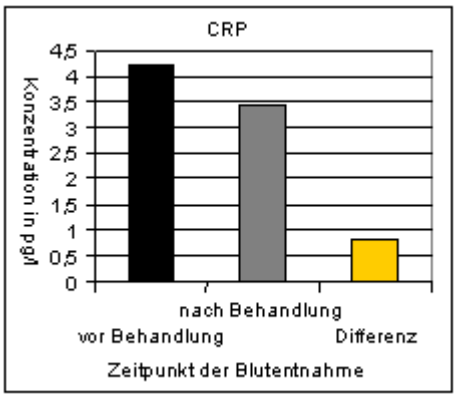


Abbildung 18 Darstellung der Konzentrationsdifferenz von CRP

Graphische Darstellung der Konzentrationen vor und nach Behandlung und Konzentrationsdifferenzen (Konz. vor – Konz. nach) für CRP in pg/l zusammengefasst für alle Verfahren;

Exemplarisch wurde die Kinetik des Komplements mittels der Komplementaktivität CH50 (Tab. 23) und den beiden Komponenten C3c (Tab. 24) und C4 (Tab. 25) analysiert. Dabei erfolgte eine Bestimmung der Konzentration der Faktoren im Serum insgesamt vor und nach der Behandlung sowie jeweils 5 und 60 Minuten vor und nach dem Apherese-relevanten Filter der drei Methoden.

Hier konnte jeweils ein signifikanter Abfall der Konzentrationen der Komplementkomponenten C3c und C4 bzw. der Aktivität von CH50 in % bei allen drei benutzten LDL-Aphereseverfahren gezeigt werden.

Tabelle 23 Zeittafel von Komplementaktivität CH50

Die Blutproben wurden zuerst vor (vorB) und nach Behandlung (nachB), 5 (5`) und 60 (60`) Minuten vor (vorF) und nach (nachF) dem LDL-Apherese-relevanten Filter analysiert; Aufgetragen sind Mittelwerte ± Standardabweichung; * p< 0,05 vorB verglichen mit nachB oder vorF verglichen mit nachF; § p < 0,05 nachF(5´) verglichen mit nachF (60´);

	CH50 (in %) (Normbereich: 90-150%)					
Zeit	vorB	nachB	5´		60´	
			vorF	nachF	vorF	nachF
Total (n=21)	124.1±24.8	86.4±30.0*	121.3±31.0	55.4±43.6*	97.6± 24.2§	52.9± 39.4*
MDF (n=9)	123.2±33.2	88.8±36.8*	132.2±25.8	106.7±22.5*	103.9± 18.1§	83.7± 22.6*
HELP (n=7)	113.7±3.32	64.4±16.8*	135.6±31.8	106.6±27.9	112.8±17.5	94.4± 25.3
DALI (n=5)	132.8±17.2	98.4±18.0*	121.6±32.6	106.6±27.9*	94.0±31.9§	94.4± 25.3

Tabelle 24 Zeittafel von Komplementfaktor C3c

Die Blutproben wurden zuerst vor (vorB) und nach Behandlung (nachB), 5 (5`) und 60 (60`) Minuten vor (vorF) und nach (nachF) dem LDL-Apherese-relevanten Filter analysiert; Aufgetragen sind Mittelwerte ± Standardabweichung; * p< 0,05 vorB verglichen mit nachB oder vorF verglichen mit nachF; § p < 0,05 nachF(5´) verglichen mit nachF (60´);

	C3c (in g/l) (Normbereich: 0,90-1,80 g/l)					
Zeit	vorB	nachB	5´		60´	
			vorF	nachF	vorF	nachF
Total (n=21)	1,11±0,21	0,90±0,23*	1,0±0,24	0,58±0,28*	0.87±0.2§	0.66±026*
MDF (n=9)	1,18±0,19	0,88±0,21*	1,00±0,11	0,77±0,19*	0.93±0.17	0.81±0.22
HELP (n=7)	0,98±0,09	0,58±0,07*	0,98±0,12	0,72±0,23	0.94±0.23	0.82±0.31
DALI (n=5)	1,10±0,29	0,88±0,21*	0,96±0,44	0,35±0,30*	0.84±0.29	0.61±0.09

Tabelle 25 Zeittafel von Komplementfaktor C4

Die Blutproben wurden zuerst vor (vorB) und nach Behandlung (nachB), 5 (5`) und 60 (60`) Minuten vor (vorF) und nach (nachF) dem LDL-Apherese-relevanten Filter analysiert; Aufgetragen sind Mittelwerte ± Standardabweichung; * p< 0,05 vorB verglichen mit nachB oder vorF verglichen mit nachF; § p < 0,05 nachF(5´) verglichen mit nachF (60´);

	C4 (in g/L) (Normbereich: 0.10-0.40 g/L)					
Zeit	vorB	nachB	5´		60´	
			vorF	nachF	vorF	nachF
Total (n=21)	0.22±0.07	0.14±0.07*	0.21±0.09	0.09±0.07*	0.16±0.06§	0.13±0.05*
MDF (n=9)	0.22±0.08	0.14±0.07*	0.21±0.07	0.15±0.04*	0.18±0.05§	0.14±0.05*
HELP (n=7)	0.18±0.03	0.07±0.01*	0.19±0.08	0.14±0.06	0.17±0.07	0.15±0.06
DALI (n=5)	0.24±0.07	0.17±0.06*	0.26±0.12	0.04±0.04*	0.16±0.06§	0.12±0.04*

4 Diskussion

4.1 Überblick über die Studie

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen der verschiedenen Apheresefilter auf die Proteinbestandteile (Proteinindex) des Plasmas unter Verwendung von Proteomics-Methoden untersucht. Dazu wurden Proben von 21 Patienten mit homozygoter oder heterozygoter Hypercholesterinämie, die im Universitätsklinikum Göttingen ambulant mit einem der drei Aphereseverfahren (MDF, HELP®, DALI®) behandelt wurden, gewonnen. Zum einen wurden Plasmaproben vor und nach einer Behandlung und zum anderen Filtereluatproben der drei Verfahren analysiert.

Damit ist diese Studie die bisher einzige, die hierfür Proteomics-Methoden verwendet hat. Keine der bisherigen Publikationen wandte bei der Untersuchung der Effekte der LDL-Apherese diese Verfahren zur Analyse an. Ebenso wurden in keiner der bis dato erschienenen Veröffentlichungen die Filter der drei Verfahren eluiert und die gewonnenen Proben untersucht. Die vorliegenden Daten zeigten sowohl schon bekannte als auch neue Aspekte bezüglich der Veränderung von Plasmabestandteilen durch die drei Verfahren der LDL-Apherese. Teilweise ließen sich die erzielten Resultate den bekannten klinischen Effekten und deren Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose und deren Erscheinungen zuordnen bzw. dort wiederfinden.

4.2 Vergleich der Methoden der Studie mit den Literaturangaben

Zunächst sollen die Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen, wie sie in der Literatur berichtet werden und sich auch bei dieser Studie zeigten, dargestellt werden.

4.2.1 Patienten

Die Resultate der Untersuchungen mit Labormethoden und Proteomics-Techniken wurden anhand von Plasmaproben von 21 Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie und Eluatproben von drei ausgewählten Apheresefiltern je Verfahren bestimmt.

Die Fallzahl ist mit 21 Patienten für eine Studie mit familiärer Hypercholesterinämie etwas größer als die Fallzahlen großer und wichtiger Studien [LACMART, 18 Patienten (Matsuzaki et al. 2002); L-CAPS, 11 Patienten (Nishimura et al. 1999);]. Wie bei jeder klinischen Studie muss dem Wohl der Patienten Vorrang vor dem wissenschaftlichen Anspruch, bestmögliche Daten zu erheben, gegeben werden. Die Kollision von ethischen Grundsätzen und dem klinischen Alltag mit dem Wunsch nach Erhebung möglichst konsistenter wissenschaftlicher Daten war auch in der vorliegenden Arbeit ausschlaggebend für die fehlende Randomisierung

und die begrenzte Patientenzahl der einzelnen Gruppen.
Dennoch gibt es in den drei Gruppen der Behandlungsmethoden keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Patienteneigenschaften und den Apheresedaten. Trotz des höheren Mittelwerts des LDL-Cholesterins in der MDF-Gruppe unterscheiden sich die Laborwerte nicht signifikant. Somit sind die Gruppen untereinander vergleichbar (Tab. 15, 16). Die klinische Durchführung aller Apheresebehandlungen lief ohne Zwischenfälle ab.

4.2.2 Proteomics-Methoden

Die benutzte Methode der zweidimensionalen Elektrophorese mit anschließender Identifizierung mittels MALDI-TOF-MS und ESI-MS ist Bestandteil der klassischen Definition des Begriffs „Proteomics“. Ebenso gehört auch die Methode des Western-Blot zu dieser Gruppe. Die Einschränkungen der Proteomics-Analysen werden durch zwei grundlegende Faktoren begründet: zum einen durch die Grenzen, die aufgrund der Zusammensetzung des zu analysierenden Proteoms, vor allem bezüglich der Konzentration der betreffenden Proteine, gegeben sind, zum anderen durch die Beschränkungen, denen die analysierenden Methoden an sich unterliegen und die im Folgenden dargestellt werden (Anderson NL und Anderson NG 2002).

4.2.2.1 Proben

Die Eigenschaften der Proben legen u.a. die Grenzen der Methoden fest. Da es eine große Variation an Molekulargröße, Ladungszustand, hydrophoben und -philen Eigenschaften, Proteinkonformation, posttranslationalen Modifikationen, Komplexbildungen mit anderen makromolekularen biologischen Geweben und enzymatischen Co-Faktoren sowie zellulären Bindungen gibt, ist die Probenvorbereitung ein komplizierter mehrstufiger Prozess (Anderson NL und Anderson NG 2002). Ebenso beeinflusst die unterschiedliche Bandbreite verschiedener Proteine und deren ebenso variable Konzentrationen in einer Probe das Ergebnis (Anderson NL und Anderson NG 2002).
In dieser Studie wurde als Probe: zum einen das Filtereluat der verschiedenen Aphereseverfahren gewählt, um die Elutionsvorgänge der einzelnen Filter näher zu untersuchen, zum anderen wurde zur Validierung der Ergebnisse das Serum der behandelten Patienten als Probe für die Western-Blot-Analyse und die klinisch-chemischen Untersuchungen benutzt.

4.2.2.2 2D-Gelelektrophorese

Diese Methode hat den Vorteil, dass sie gleichzeitig die Visualisierung von Tausenden von Proteinspots sowie die (Semi-)Quantifizierung ihrer Konzentration und die Ermittlung post-

translationaler Modifikationen ermöglicht (Garbis et al. 2005).

Die Reproduzierbarkeit der Analysen mit 2D-Gelen ist in der Regel befriedigend, falls eine relativ kleine Menge Protein auf das Gel aufgetragen wird (kleiner als 500 µg) (Garbis et al. 2005). In dieser Studie betrug die Proteinmenge 150 bzw. 400 µg pro Gel. Der Nachteil dieser Methode ist, dass in jedem Fall die Darstellung des gesamten Proteoms einer Probe mit 2D-Elektrophorese experimentell auf Proteine mit einem Molekulargewicht im Bereich von 10 bis 120 kDa und neutralem bis saurem isoelektrischem Punkt limitiert ist. Basische oder sehr basische Proteine (über pH 9,5) sind äußerst schwierig darzustellen. 2D-Gele bilden spärlich hydrophobe Proteine ab und ebenso werden üblicherweise nur in großen Konzentrationen vorkommende Proteine abgebildet. Proteine in kleinen Mengen von physiologischer Relevanz, wie Regulator- oder Signalproteine, sind schwierig zu entdecken (Corthals et al. 2000). Oft ist die im 2D-Gel gefundene Proteinvielfalt größer als die am Ende endgültig durch die Massenspektrometrieanalyse identifizierten Proteine, da nicht alle möglichen Spots ausgeschnitten bzw. nicht erfolgreich identifiziert werden (Garbis et al. 2005). Auch in dieser Studie waren mehr Spots in den Gelen zu sehen, als endgültig identifiziert werden konnten. Zum einen wurden nicht alle Spots ausgeschnitten und der Analyse zugeführt, zum anderen konnte bei einigen Spots kein Resultat gefunden werden. Von insgesamt 2417±81 vorhandenen Gelspots wurden 226 Stück bearbeitet, davon 156 identifiziert. Insgesamt wurden 74 unterschiedliche Proteine identifiziert. Die Heterogenität vieler Spots kann die Folge von verschiedenen Splicing-, Processing- und posttranslationalen Modifikationen sein. Daraus ergeben sich Änderungen des pH-Wertes der Polypeptide und folglich der Fokussierungsposition (Garbis et al. 2005). Dies könnte auch der Grund für die Identifizierung gleicher Proteine sein, trotz ihrer unterschiedlichen Spotlokalisationen im Gel bezüglich pH-Wert als auch Molekulargewicht.

4.2.2.3 MALDI-TOF-MS und LC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Nach jetzigem Stand der Forschung besitzen nur die Elektrospray-Ionisation und die Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisation eine hohe Sensitivität und sind in der Lage, Ionen – ohne signifikante chemische Aufspaltungen – zu erzeugen. MALDI-TOF-MS ist der effizienteste Ansatz der High-Throughput-Proteomics (Lahm und Langen 2000). MALDI-TOF-MS ist bei der Identifizierung von kleinmolekularen Proteinen, die nur wenige Peptide hervorbringen, begrenzt. Die Identifizierung basiert oft nur auf einer kleinen Anzahl von Übereinstimmungen (Fountoulakis et al. 1998). Ebenso können mit MALDI-TOF-MS keine Mixtur verschiedener Proteine identifiziert werden (Garbis et al. 2005). Die Massenspektrometrie unterliegt ebenso bestimmten Grenzen, insbesondere im Hinblick auf

die Probenpräparation - erfordert präzise Arbeitsschritte und die Messung bestimmter Proteinklassen – und der unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Proteine in einer Probe (Garbis et al. 2005). Trotz dieser erheblichen methodisch-bedingten Begrenzung und der sich daraus ergebenden Unvollständigkeit der Identifizierung konnten bei dem EC50®-Filtereluat von 92 Spots 75 Spots (davon 38 verschiedene Proteine) identifiziert werden, bei dem Eluat des DALI500®-Filters konnten von 83 Spots 47 Proteine (davon 34 Verschiedene) erfolgreich dargestellt werden, beim Präzipitat®-Filtereluat konnten von 49 Spots, 34 (davon 25 Verschiedene) identifiziert werden. Somit kann diese Studie nur einen Ausschnitt der im Filter zurückgebliebenen Proteine darstellen und wegen der methodischen Grenzen keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben.

4.2.2.4 Western-Blot

Diese Methode ist äußerst selektiv. Mit ihr lässt sich spezifisch das Protein, das von Interesse ist, in den verschiedenen Proben nachweisen (Stoll et al. 2002). Einzige Voraussetzung ist hierfür die Verfügbarkeit der Antikörper für das gewünschte Protein, woraus sich der kritische Punkt ergibt (Anderson NL und Anderson NG 2002). In dieser Arbeit wurden mit dieser Methode für elf Proteine (Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Makroglobulin, Alpha-2-Antiplasmin, Plasminogen, Komplement Faktor-B, TGFß-1, Prä-Albumin, Transferrin, Kollagen-1, Fibronektin) die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse bestätigt und präzisiert.

4.2.3 Standard-Laboranalysen

Diese Methoden dienen zur Standardüberprüfung bei jeder durchgeführten Apheresebehandlung (Eisenhauer et al. 1987, Schaumann et al. 1996, Park et al. 1998, Richter et al. 1999). Hiermit wurden einige Proteine, die in dem Zusammenhang von Interesse waren, quantitativ dargestellt, zur Ergänzung der ansonsten qualitativ zu bewertenden Resultate. Dennoch ist auch diese Methode gewissen Beschränkungen unterworfen, vor allem die Zytokinmessung betreffend. Zytokine sind alle relativ instabil und so muss das Serum bzw. Plasma schnell von den zellulären Blukomponenten getrennt werden. Die Probe sollte schnell bearbeitet werden, um den Abbau der Zytokine zu vermeiden (Francisco et al. 2006). Diese Probleme lassen sich umgehen, wenn nicht das Zytokin selbst, sondern der gelöste Rezeptor oder die Rezeptorantagonisten gemessen werden (Francisco et al. 2006). In dieser Arbeit wurde hierfür das Immulite®-System benutzt, dennoch sind die Ergebnisse, bis auf einige Parameter, aufgrund einer niedrigen Grenze der Quantifizierung und der fehlenden Standardisierung kritisch zu bewerten.

4.3 Einordnung der Ergebnisse in den Prozess der Atherosklerose

Eine Vielzahl von Quellen in der Literatur unterstützt, dass die Atherosklerose ein multifaktorieller Prozess ist, der das Zusammenspiel von Lipidmetabolismus, Blutzellen, Gerinnungsproteinen, Zytokinen, hämodynamischer Kräfte, extrazellulärer Matrix und sogar verhaltensassoziierter Risikofaktoren mit einbezieht. Eine Verbesserung der myokardialen Ischämie als Resultat der LDL-Apherese wurde in der LAARS und anderen Studien gezeigt (Tatami et al. 1992, Nishimura et al. 1999, Koga 2002, Matsuzaki et al. 2002, Bambauer et al. 2003). Diese Effekte korrelieren mit der Reduktion des LDL-Cholesterins. Dennoch wurden auch die „Neben"-Wirkungen des Verfahrens an sich auf andere Determinanten der Atherosklerose als verstärkende positive Mechanismen diskutiert. So kommt es ebenso auch zu einer Reduktion des Gesamtproteins von –13,5 ± 5,7% bei DALI®, -16,8 ± 2,0% bei MDF, und –20,8 ± 5,4% bei HELP®. Der positive Einfluss einer Behandlung mit LDL-Apherese, gleich welchen Verfahrens, auf den Prozess der Atherosklerose wurde eindeutig in der Literatur dargestellt. Die in dieser Arbeit gefundenen Proteine konnten durch ihre Rolle in der Atherogenese nun größtenteils in den Kontext der Atherosklerose eingeordnet werden und können so weitere Erklärungen für die positiven Effekte der LDL-Apherese liefern. Im folgendem sollen nun die in dieser Arbeit gefundenen Proteine weiter erörtert werden.

4.3.1 Apolipoproteine

Das Apolipoprotein-B (Apo-B) ist das Hauptprotein der cholesterinreichen Lipoproteine. Ein Anstieg von Apo-B-enthaltenden Partikeln im Blut ist der Hauptauslöser für den Atheroskleroseprozess. Die Konzentration von Plasma-Apo-B-Partikel korreliert hoch mit dem Non-HDL-Cholesterin (Non-HDL-C) Spiegel. Non-HDL-C wurde von den NCEP-ATP-III-Richtlinien als ein Ziel der lipidsenkenden Therapie anerkannt (Grundy et al. 2004). Diese Absenkung wurde bei den Patienten mit allen benutzten LDL-Apherese-Methoden erreicht. Die klinisch-chemischen Analysen dieser Studie zeigten eine mittlere Reduktion des Apo-B von –60,3 ± 10,0% und stimmen hier mit den von Schechner et al. berichteten Daten (63 ± 9%, $p < 0{,}01$) für das DALI®-Verfahren überein (Schechner et al. 2004). Ebenso konnte eine signifikante Absenkung des LDL-C, wie in früheren Studien (Eisenhauer et al. 1987, Schaumann et al. 1996, Bosch et al. 1997, Richter et al. 1999, Jansen et al. 2000, Julius et al. 2002, Schechner et al. 2004) bereits beschrieben, für alle drei Verfahren nachgewiesen werden. Dies ist, seit bekannt wurde, dass Non-HDL-C als ein Parameter für die Risikoeinschätzung von Myokardinfarkten und Angina pectoris fungiert (Bittner et al. 2002, Walldius und Jungner 2004), von besonderer Bedeutung.

Das Apo-A-I stellt zu 70-80% den Proteinanteil von HDL und spielt somit die entscheidende

Rolle bei der Struktur des HDL-Partikels. Weiterhin ist das Apo-A-I der Ligand des ATP-bindenden Kassette-Proteins und daher in den Andockprozess von Cholesterin an periphere Zellen besonders involviert. HDL wird für den weiteren Rücktransport von Cholesterin zur Leber, entweder direkt oder indirekt, aus LDL freigesetzt (Walldius und Jungner 2004). Auch diese Elimination konnte in der klinisch-chemischen Analyse gemessen werden, im Vergleich zum Gesamtproteinverlust ist der Apo-A-I-Abfall als gering (-16,5% ± 6,4%) einzuschätzen.
Das Apo-A-IV spielt als potenter Aktivator der Lecithin-Acyltransferase und als eine Hauptkomponente von HDL und Chylomikronen eine bedeutende Rolle in der Lipidabsorption, dem Lipidtransport und dem Lipidmetabolismus. Darüber hinaus kann es als postprandiales Sättigungssignal, als Antioxidans und Hauptfaktor in der Prävention der Atherosklerose fungieren (Stan et al. 2003). Die Reduktion (13% ± 6%, $p < 0,01$) des nicht näher klassifizierten Apolipoproteins-A wurde für das DALI®-Verfahren von Schechner et al. (Schechner et al. 2004) gezeigt und bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Studie.
Insgesamt zeigte sich in dieser Studie eine gemessene Reduktion des HDLs um -11,0% ± 9,1% bezogen auf das Gesamtprotein. Nach den Angaben in der Literatur fanden sich mehrere Studien, die sogar über eine Reduktion des HDLs von maximal 5%-31% je nach Verfahren (Eisenhauer et al. 1987, Schaumann et al. 1996, Bosch et al. 1997, Richter et al. 1999, Jansen et al. 2000, Julius et al. 2002, Schechner et al. 2004) berichten. Das ist unerwünscht, aber methodisch bedingt offenbar unvermeidlich.
Das Apolipoprotein-H, auch Beta2-Glykoprotein-I (Beta2-GPI) genannt, trägt durch die direkte Bindung an ox-LDL und die nachfolgende Aufnahme dieses Komplexes durch Makrophagen zur Formation der Atheroskleroseläsion bei (Koike 2000). Das reiche Vorkommen von Beta2-GPI in dem Atherom wurde mit Hilfe von immunologischen Zellen demonstriert. Im Tiermodell wurden beta2-GPI-reaktive Lymphknoten und Milzzellen auf LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse übertragen. Dadurch wurde die Ausbildung von „fatty streak“-Formationen gefördert und eine direkte proatherogene Rolle für beta2-GPI-spezifische Lymphozyten bewiesen (Harats und George 2001). Ox-LDL/beta2-GPI-Komplexe wurden als für die Atherogenese relevante metabolische Produkte und als signifikante Teilnehmer bei der autoimmun-vermittelten Atherosklerose beschrieben (Matsuura und Lopez 2004). Die in der MALDI-TOF-Analyse entdeckte Verminderung dieses Proteins wurde so in der Literatur noch nicht beschrieben und kann zu den Verbesserungen der atherosklerotischen Veränderungen beitragen. Große Studien, wie der LAARS (Aengevaeren et al. 1996) und der LAMCART (Matsuzaki et al. 2002), belegen dies.

4.3.2 Hämorheologisch wirksame Proteine

Die Reinigung von Fibrinogen (EC50®-Filter, DALI®-Filter, HELP®-Filter) ist ein gut bekanntes Phänomen, das dabei einen senkenden Einfluss auf die Plasmaviskosität nimmt (Eisenhauer et al. 1987, Schaumann et al. 1996, Bosch et al. 1997, Richter et al. 1999, Jansen et al. 2000, Julius et al. 2002, Schechner et al. 2004). Mehreren Berichten zufolge hat bereits eine einzige Behandlung mit LDL-Apherese einen signifikanten Einfluss auf den myokardialen, cerebralen und peripheren Blutfluss (Bosch und Keller 2003). Dieses große von der Leber hergestellte Protein beeinflusst die Hämostase, die Leukozytenadhäsion und erhöht die Blutviskosität (Margaglione et al. 2000). Es zählt zu der Gruppe der Akute-Phase-Proteine und gilt seit den großen Studien wie der Framingham-Studie (Kannel et al. 1987) und der Northwick-Park-Heart-Studie (Meade et al. 1986) als ein unabhängiger Risikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen.

Bei der vorliegenden massenspektrometrischen Analyse aller drei Verfahren fanden sich drei verschiedene Isoformen des Fibrinogens (alpha, beta, gamma), deren Untersuchung so noch nicht beschrieben wurde. Die klinisch-chemische Analyse zeigte, dass eine Reduktion von Fibrinogen vor allem das HELP®- (-70,1% ± 6,2%), gefolgt vom MDF- (-51,4 ± 11,0%), aber nur moderat das DALI®-System (-23,2 ± 6,9%) betrifft. Dies könnte ein Resultat der Filtereigenschaft sein.

Neben dem für die Gerinnung wichtigen Fibrinogen konnten noch weitere Komponenten des Gerinnungssystems nachgewiesen werden: Alle diese Proteine stellen Determinanten der Plasmaviskosität und der Gerinnung dar, die in Teilen noch nicht als Effekte der LDL-Apherese beschrieben wurden. Da Hypercholesterinämie-Patienten mit der Indikation zur LDL-Apherese eine signifikant erhöhte Plasmaviskosität aufzeigen, welche als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor gilt (Bosch et al. 2001), werden einer Reduktion der Viskosität des Plasmas hilfreiche Effekte für diese Hochrisikogruppe zugeschrieben.

Wie schon von Jaeger et al. (2001) allein für das HELP®-System gezeigt, stellt sich bei allen drei Verfahren eine Eliminierung von Prokoagulantien, wie z.B. Plasminogen, als auch hemmenden Faktoren, wie α2-Antiplasmin, dar.

Eine Abnahme von α2-Makroglobulin und Prä-Albumin zeigte sich bei allen drei Verfahren, wie von Klingel et al. (2003) für HELP® und MDF schon dargelegt. Dies bestätigt den Einfluss und die Regulierung der LDL-Apherese auf hämorheologische Faktoren, deren Abweichungen in den Prozess der Atherosklerose involviert sind (Poredos und Zizek 1996).

Wie in mehreren Studien (Tab. 7) schon berichtet, fand sich auch in dieser Studie eine Abnahme der Lipoproteine (Apo-A-I und Apo-B), Triglyzeride und des Fibrinogens. Die

hiermit einhergehende Verminderung der Blutviskosität mag die vaskuläre Funktion und Perfusion verbessern. Wie in Studien gezeigt, geht eine einzige LDL-Apheresebehandlung mit einer Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation einher (Tamai et al. 1997, Meier und Blanc 2000).

Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, in denen eine Konzentrationsabnahme aller untersuchten Gerinnungsfaktoren nach Behandlung mit dem DALI®- und HELP®-Verfahren dargestellt ist (Julius et al. 2000, Jaeger et al. 2001). Die untersuchten Faktoren sind Fibrinogen*, Prothrombin, Faktor V, Faktor VII*, Faktor VIII, von-Willebrand-Faktor, Faktor XI, Faktor XII, Faktor XIII, Plasminogen*, Antithrombin, Protein S* und Protein C. Die hervorgehobenen Proteine (*) konnten im Rahmen dieser Studie ebenfalls bei allen drei Verfahren identifiziert werden.

In den oben genannten Studien über DALI® und HELP® zeigte sich sowohl eine Verminderung der Plasmaviskosität als auch der Erythrozytenaggregation. Der dort durchgeführte Erythrozytenaggregations/Adhäsions-Test bezieht multiple inflammatorisch sensitive Proteine wie Fibrinogen*, Gamma-Globuline, Ceruloplasmin*, Haptoglobin*, α-1-Antitrypsin* und CRP* bei der Induktion und Aufrechterhaltung der verstärkten Erythrozytenaggregation mit ein (Imaizumi und Shiga 1983, Weng et al. 1996, Weng et al. 1998). Die mit (*) markierten Proteine konnten in der vorliegenden Studie ebenfalls bei allen drei Apheresemethoden gefunden werden. So zeigte sich eine Reduktion des Haptoglobins insgesamt um 25,1% ± 12,5%. Ebenso ließ sich eine Gesamtredukion von 47,2% ± 20,1% der Konzentration des Fibrinogens nachweisen. Diese dargestellten Daten sprechen alle für eine Verbesserung der Mikrozirkulation unter LDL-Apheresebehandlung, wie sie in Studien unter anderem von Mellwig et al. (1998) dargestellt wurde.

4.3.3 Immunoglobuline und immunologisch wirksame Proteine

Bei allen drei Filtern konnten Immunoglobulinketten nachgewiesen werden. Dabei fanden sich interessanterweise bei dem EC50®-Filterergebnissen die meisten identifizierten Spots. In den Eluaten der beiden anderen Filter konnten kaum Ketten von Immunoglobulinen festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen sich mit der von verschiedenen Studien (Eisenhauer et al. 1987, Schaumann et al. 1996, Bosch et al. 1997, Richter et al. 1999, Jansen et al. 2000, Julius et al. 2002, Schechner et al. 2004) gefundenen Reduktion des IgG bei allen drei Verfahren und der von Matsuda et al. (1995) beschriebenen Erniedrigung des IgM durch die Lipidfiltration in einen Konsens bringen. Bei der MALDI-TOF-Analyse fanden sich noch andere Proteine mit immunologischer Funktion, überwiegend bei dem EC50®-Filter der Lipidfiltration (Alpha-2-HS-Glykoprotein, B-Faktor (Properdin), CD5-Antigen like Protein),

welche noch nicht in der Literatur beschrieben wurden. Über die funktionelle Relevanz dieser Daten können lediglich Vermutungen angestellt werden. Ein Rückgang inflammatorischer Faktoren könnte sich durchaus hemmend auf den entzündlichen Prozess der Atherosklerose auswirken.

Die Reduktion des α-1-Antitrypsin (Abb. 11) konnte gezeigt werden und ist ebenfalls ein wichtiger Nebeneffekt der LDL-Apherese. Durch eine direkte molekulare Verbindung des α-1-Antitrypsins beeinflusst es die Entzündung, Oxidation und Akkumulation von Lipiden in – aus Monozyten hervorgegangener – Makrophagen, und somit einen Atherosklerose-induzierenden Prozess (Janciauskiene et al. 1999).

CRP ist ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor (Haverkate et al. 1997), der sich in der Arterienwand zusammen mit Komplementkomplexen und Schaumzellen ablagert (Torzewski et al. 2000). Als ein systemischer Entzündungsmarker kann er das Komplementsystem durch die Bindung an modifiziertes nichtoxidiertes LDL, ox-LDL und beschädigte Zellen aktivieren (Niculescu und Rus 2004). Seine Reduktion in der Plasmakonzentration nach LDL-Apherese konnte, wie schon in einigen Studien davor (Moriarty et al. 2001, Otto et al. 2002), in dieser Studie bei allen drei Verfahren (Tab. 7, Abb. 18) gezeigt werden.

Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-6, IL-1ß sind bei Patienten mit Hypercholesterinämie erhöht (Ridker et al. 2000). Für die Entzündungsmarker CRP, IL6 und TNF-α wurde in mehreren Studien eine Beziehung zwischen erhöhten Plasmakonzentrationen dieser Zytokine und einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko aufgezeigt (Harris et al. 1999, Ridker et al. 2000). IL-6 (Abb. 17) wird von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen produziert und sezerniert und kann über verschiedene Wege an der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen mitwirken (Ridker et al. 2000, Ikeda et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurden nach einer Apheresebehandlung erhöhte Werte gegenüber dem Ausgangswert im Plasma gemessen. IL-1ß (Abb. 17) wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch noch anderen Zellen produziert. Es erhöht die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die die Anbindung von anderen Entzündungszellen an das aktivierte Endothel ermöglicht (Wang et al. 1995). In dieser Studie konnte keine Veränderung des Zytokins nach einer Apheresebehandlung im Plasma gemessen werden. Hierbei ist es fraglich, ob es sich um eine Schwäche der Methode handelt oder dieses Zytokin nicht von dem Apherese-Prozess beeinflusst wird. TNF-α ist ein multifunktionales Protein, das durch Aktivierung der Synthese anderer Zytokine eine wichtige Rolle in der Zytokinkaskade spielt (Hotamisligil et al. 1993). Zusammen mit IL-1ß stimuliert TNF-α die Synthese von IL-6 und erhöht die Expression von MCSF, plättchenabstammender

Wachstumsfaktor (PDGF) und des Fibroblastenwachstumsfaktors (FGFP), die alle mit der Progression des entzündlichen Prozesses der Atherosklerose assoziiert sind (Filonzi et al. 1993, Ng et al. 1994). Sowohl für IL-6 und TNF-α wurden in dieser Untersuchung eine nicht signifikante Zunahme der Plasmakonzentration nach einer Apheresebehandlung festgestellt (Abb. 16, 17).

Die Abnahme sowohl des Komplementfaktors B, der als einziger positiver Regulator die Komplementaktivierung stabilisiert, als auch proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. TGF-ß1 (Abb. 13) und der Akute-Phase-Proteine, wie z.B. Transferrrin (Abb. 14), beeinflusst die fokale Entzündungsaktivität, wie möglicherweise auch den Prozess der Atherosklerose, der hierdurch charakterisiert ist (Libby et al. 1996).

4.3.4 Komponenten des Komplementsystems

Vorangegangene Studien zeigten, dass Immunoglobuline, Komplementkomponenten (Vlaicu et al. 1985) und komplementhemmende Proteine (Faktor-H, C3, CR1, Clusterin, Protein-S) (Niculescu et al. 1990, Mackness et al. 1997) in der menschlichen atherosklerotischen Arterienwand vorhanden sind. Diese Daten lassen vermuten, dass die Komplementbestandteile aus dem Plasma in die Intima und die fibrösen Plaques aufgenommen werden (Vlaicu et al. 1985). Ebenso interagieren Proteine wie Faktor-H (Oksjoki et al. 2003a) und Protein-S (Niculescu et al. 1989) mit arteriellen Wandkomponenten, vor allem mit verbindender Gewebematrix. TGF-ß regt die interstielle Kollagenproduktion durch glatte Muskelzellen an.

Es wurden auch eine Serie von verschiedenen Komponenten des Komplementsystems identifiziert, die durch alle eingesetzten LDL-Apheresemethoden, jedoch am meisten durch das HELP®-System, entfernt wurden (Tab. 22-25). Wie in der Literatur berichtet, wird das Komplementsystem in atherosklerotischen Verletzungen über den klassischen als auch den alternativen Weg aktiviert und *in vivo* wurde seine Relevanz mit der Entdeckung von C1q, C4, C3 bei der Erzeugung des „terminal membrane attack complex“ C5b-9 in den Verletzungen gezeigt. Zusätzlich zu der Infiltration mit Komplement des Blutplasmas, exprimieren verschiedene vaskuläre Zellen „messenger“-RNA für Komplementproteine, womit in den atherosklerotischen Verletzungen die Expression dieser Proteine hochreguliert ist. Die permanente Aktivierung des Komplementsystems bei bestimmten Ereignissen mag schädlich sein, da hierdurch Entzündungen ausgelöst und aufrechterhalten werden können. Weiterhin könnte die enzymatische Modifikation des LDLs, vermittelt durch das Komplementsystem, ein entscheidender Schritt der Atherogenese sein. Eine Komplementaktivierung trägt auf verschiedenen Wegen, wie der Aktivierung von Leukozyten

und Endothelzellen, Steigerung der Apoptose, Hochregulation der Gene zur Zytokin-Produktion und Unterbrechung der Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivität, zur myokardialen Schädigung bei. Sollte das Komplementsystem wirklich als eine zentrale Komponente in der Atherogenese auftreten, könnte sich die Hemmung des Komplements als mögliche Behandlungsoption im Sinne von Prävention und Therapie der Atherosklerose erweisen (Oksjoki et al. 2003b, Kostner 2004).

Unsere Daten (Abb. 24, 25) stehen im Kontrast zu vorangegangenen Studien, die eine minimale Komplementaktivierung mit einer zu vernachlässigenden Steigerung von C3a und C5a nach der DALI®-Therapie gezeigt haben (Bosch und Keller 2003). Diese Unterschiede könnten auf die verschiedenen Subklassen, die analysiert wurden, zurückzuführen sein. Für die anderen LDL-Apheresemethoden gab es keine Beschreibungen zu diesem Thema.

Die Gesamtabnahme der Komplementaktivität gemessen mit CH50 (-29,0% ± 27,1%, $p < 0,05$) könnte folglich auf zwei Weisen interpretiert werden: Zum einen könnte sie als Eliminierung durch die Filter gesehen werden, zum anderen ließe sich dieses Ergebnis aber auch als Verbrauch des Komplements, wie Komplementaktivierung durch „Fremdkörper“ in Gestalt von Schläuchen, Filtern etc., bei der LDL-Apherese verstehen.

4.3.5 Adhäsiv wirksame Proteine

Bisher wurde die Absorption von SAP und Fibronektin durch die LDL-Apherese als Ursache für die Prävention oder Regression der Atherosklerose dargestellt (Kojima 2001). Fibronektin und Kollagen-Typ-1 sind Bestandteil der für die Atherosklerose charakteristischen extrazellulären Matrix (Ross 1993). Fibronektin kann den Zellzyklus hemmen und durch Zell-Matrix-Interaktionen eine Expression von Chemokinen bei Makrophagen auslösen (Mercurius und Morla 1998, Wesley et al. 1998). Interessanterweise wurde bei HELP® ein Anstieg von Kollagen nach Passieren des Filters im Plasma festgestellt. Es ließ sich jedoch ebenfalls im Eluat des Präzipitatsfilters identifizieren. Die Eliminierung von Fibronektin (Kojima et al. 1992) und SAP (Kojima 2001) wurde schon im Zusammenhang der LDL-Apherese-Methode mit Dextransulfat-Cellulose-Säulen gezeigt. Es gibt jedoch noch keine literarischen Angaben über die Elimination des Fibronektins bei dem HELP®-Verfahren, wie in dieser Studie gezeigt wurde (Abb.15).

Das Protein Ficolin (Iwaki et al. 2006) ist ein Mustererkennungsprotein des angeborenen Immunsystems. Ficolin initiiert über eingebaute Serin-Proteasen die Komplementaktivierung über den Lektin-Weg (Holmskov et al. 2003). Seine Rolle in der Atherosklerose oder dem Lipoproteinmetabolismus muss jedoch noch bestimmt werden.

Vorangegangene Studien haben Fibulin als ein prädominantes Bindungsprotein für

extrazelluläre Superoxid-Dismutasen identifiziert, die durch die Modulation der Konzentrationen von Superoxid-Anionen im extrazellulären Raum eine wichtige Rolle in der Atherosklerose und der endothelialen Funktion spielen (Nguyen et al. 2004). Diese Erkenntnisse präzisieren vorangegangene Daten, die aussagen, dass durch LDL-Apheresebehandlung potentiell atherogene Cholesterinoxidationsprodukte des Plasmas effektiv reduziert werden (Linseisen et al. 1999). Eine Reinigung von Ficolin oder Fibulin-1 bei der LDL-Apherese war bis jetzt nicht bekannt.

5 Zusammenfassung und kurzer Ausblick

Die therapeutische Bedeutung für das Arteriosklerose risiko von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie, also eine erfolgreiche Reduktion der Morbidität von Patienten mittels der Behandlung mit einem der LDL-Aphereseverfahren ist nach gegenwärtiger Auffassung direkt an die Effizienz der Elimination von LDL-Cholesterin gekoppelt. Die Unterschiede der Apheresemethoden sind auf die unterschiedlichen physikochemischen Prinzipien zurückzuführen. Es wurde schon in mehreren Arbeiten eine Protein-Depletion belegt.

Ziel der vorliegenden Studie ist nun eine möglichst umfassende Charakterisierung der Proteine, die bei den drei üblichen LDL-Apherese-Verfahren ungeplant mit entfernt werden. Dazu wurden die derzeit umfassendsten Proteomics-Methoden zur qualitativen und semiquantitativen Analyse von Proteinen eingesetzt.

Konkret wurden die Plasmaproben von 21 Patienten, behandelt mit MDF (N=9), HELP® (N=7) und DALI® (N=5), wie auch das Eluat der drei verschiedenen Filter analysiert. Die Proteine der Eluatproben wurden in 2D-Gelen dargestellt und anschließend mit MALDI-TOF- oder LC-ESI-Q-TOF-Tandem-Massenspektrometrie und Datenbanksuche identifiziert. Dabei wurde hier der pH-Wertbereich von 3-10 und das Molekulargewicht von 10-250 kDa untersucht.

Da es sich bei unseren Proben um Eluatproben handelt, also Proben, deren Bestandteile nach Passieren und anschließendem Entfernen des Plasmas aus dem entsprechenden Filter herausgelöst wurden, sollten sich, wenn es sich um eine selektive Filtermethode handelt, kaum Proteine des Plasmas darin wiederfinden. Dies konnte durch unsere Studie nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es fand sich in den Filtern eine Vielfalt von nützlichen Proteinen in erheblicher Menge. Bei dem Blick auf die Gelbilder der verschiedenen Filtereluate der drei Verfahren wird (Abb.7), wenn auch mit kleinen Unterschieden zwischen den Filtern, eine Vielzahl von Spots sichtbar. Dies bestätigte die Auswertung mit Hilfe der PDQuest Software. Dabei ließen sich mit Hilfe der Proteomics-Techniken in jedem der Filter sowohl eine Reihe von Proteinen des Plasmas als auch Zellproteine identifizieren.

Die mittels massenspektrometrischer Messungen identifizierten Proteine konnten verschiedenen funktionellen Gruppen zugeordnet werden. So zeigte sich eine Reduktion von Proteinen mit direkter Involvierung in die intrinsische Gerinnungskaskade (z.B. Kininogen 1), Proteinen mit Adhäsionsfunktion (z.B. Fibronektin), immunologisch, entzündlich (z.B. Haptoglobin und Komplement-Komponenten) und rheologisch relevante Proteine (z.B. Fibrinogen). Für einige relevante Proteine wurden diese Ergebnisse mit der Western-Blot-Analyse bzw. laborchemischen Methoden bestätigt und quantifiziert. Eine signifikante ($p <$

0,01) Abnahme fand sich für die Komplementkomponenten C3 (-19,3% ± 13,2%), C4 (-36,3% ± 21,0%), CH50 (-29,0% ± 27,1%), Fibrinogen (-47,2% ± 20,1%) und Haptoglobin (-25,1% ± 12,5%). Dabei zeigte sich, dass die Proteine bei allen Aphereseverfahren reduziert werden. Bisher existieren keine Daten zur Analyse der Proteine aus Apheresefiltern mit der Technik der 2D-Elektrophorese in der Literatur. Da diese Proben Plasmafiltrate darstellen, kann als Literaturvergleich die Arbeit von Anderson NL und Anderson NG zur Analyse des Plasmaproteoms herangezogen werden (2002), wenn auch die eingeschränkte dynamische Bandbreite der konventionellen Proteomics-Technik (2D-Gele und Massenspektrometrie) ihren Beitrag auf 289 Proteine beschränkt. Jedoch werden davon nur einige Proteine in der klinischen Diagnostik benutzt (Anderson NL und Anderson NG 2002).

Unsere Daten entdeckten viele verschiedene Proteine, deren Konzentration mittels der LDL-Apherese reduziert wurde. Das wirft die Frage auf, ob die günstigen Effekte der LDL-Apherese auf das Atheroskleroserisiko ausschließlich auf der Elimination von LDL beruhen oder ob zusätzliche Effekte durch die bisher nicht bekannte und nicht quantifizierte Reduktion von Proteinen bedingt sind. Denn einige der von allen drei Aphereseverfahren filtrierten Proteine haben bekanntermaßen adhäsive, rheologische und immunologisch-entzündliche Funktionen.

Somit beschränken sich die Effekte der LDL-Apherese offenbar nicht auf die Cholesterinreduktion. Die vorliegenden Daten belegen eine größere Bandbreite der Wirkung der LDL-Apherese über die Cholesterinreduktion hinaus - unabhängig von der Wahl des Verfahrens - und können somit Anstoß zu weiteren Forschungen auf diesem Gebiet geben.

Die umfassendsten Informationen über relevante Veränderungen der Proteine ergäbe die komplette Proteinanalyse des Patientenserums vor und nach der Apherese-Behandlung. Dies scheitert zur Zeit noch an der Komplexität der Verfahren.

Zu einem besseren Verständnis der Effekte der LDL-Apherese und quantitativen Sicherung könnten noch mehrere Proteine mit anderen Methoden, wie immunochemischen Nachweisen, im Serum untersucht werden. Hierbei wäre auch die Beeinflussung des Komplementsystems durch die Apheresebehandlungen von großem Interesse, da es hier kaum Studienergebnisse gibt. Zur Erforschung der in-vivo-Relevanz der in-vitro-Ergebnisse dieser Arbeit wäre eine weiterführende Untersuchung des Verhaltens der glatten Muskelzellen in den Gefäßen, die in der Atherosklerose eine entscheidende Rolle spielen, nach einer LDL-Apherese von Bedeutung.

6 Anhang: Tabelle 26-29

Tabelle 26 Auflistung der Patientendaten des MDF-Verfahrens

unter Angabe von Geschlecht, Geburtsjahr, wichtigen Diagnosen und der benutzten Probe;

Patient	Geschlecht	Geburtsjahr	Diagnosen	Proben
001	männlich	1940	FH; KHK; pAVK; art. Hypertonie	Plasma, Filter
006	männlich	1953	FH; KHK; pAVK; art. Hypertonie	Plasma,
007	männlich	1947	FH; KHK; pAVK	Plasma,
008	männlich	1933	FH; KHK; art. Hypertonie	Plasma,
009	weiblich	1957	FH; pAVK; art. Hypertonie	Plasma,
013	weiblich	1964	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK	Plasma,
022	männlich	1959	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK; pAVK; art. Hypertonie	Plasma,
023	weiblich	1973	FH + Lp(a)-Erhöhung; art. Hypertonie	Plasma, Filter
024	weiblich	1935	FH; KHK; art. Hypertonie;Vitien	Plasma, Filter

Tabelle 27 Auflistung der Patientendaten des HELP®-Verfahrens

unter Angabe von Geschlecht, Geburtsjahr, wichtigen Diagnosen und der benutzten Probe;

Patient	Geschlecht	Geburtsjahr	Diagnosen	Proben
002	weiblich	1938	FH; KHK; art. Hypertonie	Plasma,
004	weiblich	1957	FH; KHK	Plasma,
005	männlich	1951	FH; KHK; pAVK; art. Hypertonie	Plasma, Filter
011	weiblich	1987	Homozygote FH; KHK; Vitien	Plasma, Filter
012	weiblich	1990	Homozygote FH; pAVK; Vitien	Plasma, Filter
019	männlich	1950	FH; KHK; art. Hypertonie	Plasma,
020	männlich	1947	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK; art. Hypertonie	Plasma,

Tabelle 28 Auflistung der Patientendaten des DALI®-Verfahrens

unter Angabe von Geschlecht, Geburtsjahr, wichtigen Diagnosen und der benutzten Probe;

Patient	Geschlecht	Geburtsjahr	Diagnosen	Proben
003	männlich	1948	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK; pAVK; art. Hypertonie	Plasma, Filter,
010	weiblich	1986	Homozygote FH + Lp(a)-Erhöhung; pAVK	Plasma, Filter
014	weiblich	1944	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK; Vitien	Plasma, Filter
015	männlich	1954	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK; art. Hypertonie	Plasma,
017	männlich	1950	FH + Lp(a)-Erhöhung; KHK	Plasma,

Tabelle 29 Auflistung der Zuordnung markierter Gelspot und Identifikationsergebnis aller drei Filter

Auflistung der in Abbildung 8-10 markierten und ausgeschnittenen Proteinspots mit den jeweiligen Identifikationsergebnissen bzw. ohne erfolgreiche Analyse;

Spot	EC50® Filter MDF®- Verfahren	DALI 500®- Filter DALI®- Verfahren	Präzipitatfilters® HELP®- Verfahren
1	Komplement Faktor-H-Percursor	Fibronektin-1	Komplement- C4 Precursor
2	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #	Komplement Komponente 3
3	Ceruloplasmin (Ferroxidase)	Komplement Faktor-H	Apolipoprotein-A-IV
4	B-Faktor, Properdin	# Kein Ergebnis #	Fibronektin Fragment
5	B-Faktor, Properdin	Apolipoprotein-B (inklusive Ag(x) Antigen)	Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor schwere Kette H2 Precursor
6	B-Faktor, Properdin	Hypothetisches Protein FLJ14473	Komplement Faktor-H
7	Immunoglobulin schwere Konstante mu	Komplement Komponente C1r Subkomponente	# Kein Ergebnis #
8	Koagulation Faktor II	Kininogen-1	Inter- alpha Inhibitor-H4
9	Immunglobulin Mu Kette	Kininogen-1	Komplement Komponente-7
10	Immunoglobulin schwere Konstante mu (IGHM Protein)	Fibrinogen beta Kette Percursor	Transferrin
11	Immunoglobulin schwere Konstante mu	Putativ Zink Fingerprotein	Komplement Komponente-C3
12	Transferrin	Ig gamma-1 Kette C Region	Albumin
13	Alpha-1B-Glykoprotein	Fibrinogen, gamma Polypeptide	Fibrinogen-A alpha Polypeptide
14	Alpha-1B-Glykoprotein	Fibrinogen beta Kette	Purinergic Rezeptor PX2
15	Alpha-1B-Glykoprotein	Fibrinogen beta Kette	Fibrinogen gamma Polypeptide
16	# Kein Ergebnis #	Protein C Inhibitor	Fibrinogen beta Polypeptide
17	Hemopexin	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
18	Hemopexin	Fibrinogen Fragment d, Kette c	Immunoglobulin schwere Konstante gamma 1 (G1m marker)
19	Hemopexin	Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	Methyltransferase ähnlich
20	Hemopexin	Komplement Komponente-3	Fibrinogen gamma Polypeptide
21	Transferrin	Haptogobin	Fibrinogen gamma Polypeptide
22	Albumin	Actin gamma 1, ACTB Protein	# Kein Ergebnis #
23	Hemopexin	Komplement Faktor H-verwandt - 5	Fibrinogen gamma Polypeptide
24	Albumin	Actin-1-Fragment	# Kein Ergebnis #
25	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	# Kein Ergebnis #	Haptoglobin
26	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	Fibrinogen beta Kette	Komplement Komponente-C3
27	# Kein Ergebnis #	Fibrinogen doppel Fragment d, Kette b	# Kein Ergebnis #
28	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #

29	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	# Kein Ergebnis #	Fibrinogen gamma A Kette
30	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	Kininogen-1	Albumin
31	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
32	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	Kininogen-1	Komplement Komponente C4B
33	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	# Kein Ergebnis #	Smoothelin
34	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	Komplement Komponente C1r Subkomponente	Komplement Komponente C4B
35	# Kein Ergebnis #	Fibronektin-1	# Kein Ergebnis #
36	Kininogen-1	# Kein Ergebnis #	Amyloid-P-Komponente, Serum
37	Immungoglubin schwere Konstante mu	# Kein Ergebnis #	Ig kappa Kette C Region
38	Immungoglubin schwere Konstante mu	Komplement Komponent C4B (Komplement Komponent 4A) (Fragment)	Ig kappa Kette C Region
39	Ähnliche Immunoglobulin schwere Kette VH3	# Kein Ergebnis #	Kollagen, Typ I, alpha 1
40	Igal Ketten a and b	# Kein Ergebnis #	Ig kappa Kette NIG26 Percusor
41	Protein S	ProKollagen C-Endopeptidase Enhancer	# Kein Ergebnis #
42	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
43	Komplement Komponente-1	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
44	Apolipoprotein-H	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
45	Komplement Subkomponente Cir	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
46	Fibrinogen, B beta Polypeptide	Amyloid P Komponente, Serum	# Kein Ergebnis #
47	Fibrinogen, B beta Polypeptide	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
48	Fibrinogen, B beta Polypeptide	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #
49	Fibrinogen, B beta Polypeptide	# Kein Ergebnis #	Haptoglobin-verwandtes Protein
50	Hypothetisches Protein	# Kein Ergebnis #	Transthyretin Vorläufer
50	IGHG1 Protein	Carbonic Anhydrase-1	
51	IGHG1 Protein	# Kein Ergebnis #	
52	Alpha-2-HS-Glykoprotein	Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	
53	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #	
54	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #	
55	Alpha-1-Antitrypsin	# Kein Ergebnis #	
56	Alpha-1-Antitrypsin	FGA Protein	
57	Fibrinogen gamma Polypeptide	# Kein Ergebnis #	
58	Fibrinogen gamma Polypeptide	FGA Protein	
59	Fibrinogen, gamma Polypeptide	Komplement Subkomponente C1s Vorstufe	
60	Fibrinogen gamma Polypeptide	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	
61	Fibrinogen, B beta Polypeptide	# Kein Ergebnis #	

62	Fibrinogen, gamma Polypeptide	Peroxiredoxin 2	
63	Ig mu Kette C Region	Retinolbindendes Protein-4, Plasma	
64	CD5-Antigen ähnlich	Retinolbindendes Protein-4, Plasma	
65	Haptoglobin	Mannan-bindende Lectin Serine - Protease-2	
66	# Kein Ergebnis #	Retinolbindendes Protein-4, Plasma	
67	Haptoglobin	# Kein Ergebnis #	
68	# Kein Ergebnis #	Komplement Komponente-C1r Subkomponente	
69	Haptoglobin	# Kein Ergebnis #	
70	Haptoglobin verwandtes Protein	# Kein Ergebnis #	
71	Komplement Komponente-3	Rho-GDP-Dissoziation-Inhibitor (GDI) beta	
72	Fibrinogen, gamma Polypeptide	Inter-alpha Trypsin (Globulin) Inhibitor H2	
73	Clusterin	Inter-alpha Trypsin (Globulin) Inhibitor H2	
74	Ficolin	# Kein Ergebnis #	
75	Komplement-C4B	Retinolbindendes Protein-4, Plasma	
76	Komplement C1q	Gelsolin (amyloidosis, Finnish Typ)	
77	Komplement C1q	Fibulin-1	
78	Immunoglobulin-J-Kette	Komplement Faktor H-related 5	
80	Apolipoprotein-A-I	Komplement Faktor H-related 5	
81	Haptoglobin	# Kein Ergebnis #	
82	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #	
83	# Kein Ergebnis #	# Kein Ergebnis #	
84	IgG Kappa Kette	Fibrinogen, A alpha Polypeptide	
85	IgG Kappa Kette		
86	Ig kappa Kette C Region		
87	# Kein Ergebnis #		
88	Haptoglobin		
89	Haptoglobin		
90	Haptoglobin		
91	# Kein Ergebnis #		
92	Komplement Subkomponente C1r		

7 Literaturverzeichnis

Aengevaeren WR, Kroon AA, Stalenhoef AF, Uijen GJ, van der Werf T (1996): Low density lipoprotein apheresis improves regional myocardial perfusion in patients with hypercholesterolemia and extensive coronary artery disease. LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). J Am Coll Cardiol 28, 1696-1704

Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, Hayasaka Y, Sanaka T, Ota K, Amemiya H, Sugino N, Abe M, Ono T, Kawai S, Yamane T (2000): Double filtration plasmapheresis. 1980. Ther Apher 4, 29-33

Allen JM, Thompson GR, Myant NB, Steiner R, Oakley CM (1980): Cardiovascular complications of homozygous familial hypercholesterolaemia. Br Heart J 44, 361-368

Anderson L, Anderson NG (1977): High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5421-5425

Anderson NL, Anderson NG (2002): The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics 1, 845-867

Bambauer R, Schiel R, Latza R (2003): Low-density lipoprotein apheresis: an overview. Ther Apher Dial 7, 382-390

Bittner V, Hardison R, Kelsey SF, Weiner BH, Jacobs AK, Sopko G (2002): Non-high-density lipoprotein cholesterol levels predict five-year outcome in the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI). Circulation 106, 2537-2542

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99

Bosch T (2005): Therapeutic apheresis-state of the art in the year 2005. Ther Apher Dial 9, 459-468

Bosch T, Keller C (2002): Vollblut-LDL-Apherese mit DALI. Der Lipid-2 report 11, 24-28

Bosch T, Keller C (2003): Clinical effects of direct adsorption of lipoprotein apheresis: beyond cholesterol reduction. Ther Apher Dial 7, 341-344

Bosch T, Wendler T (2004): Efficacy and safety of DALI-LDL-apheresis in two patients treated with the angiotensin II-receptor 1 antagonist losartan. Ther Apher Dial 8, 269-274

Bosch T, Schmidt B, Kleophas W, Otto V, Samtleben W (1997): LDL hemoperfusion--a new procedure for LDL apheresis: biocompatibility results from a first pilot study in hypercholesterolemic atherosclerosis patients. Artif Organs 21, 1060-1065

Bosch T, Wendler T, Jaeger BR, Samtleben W (2001): Improvement of hemorheology by DALI apheresis: acute effects on plasma viscosity and erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic patients. Ther Apher 5, 372-376

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254

Braunwald E (1997): Shattuck lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. N Engl J Med 337, 1360-1369

Breslow JL (1997): Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. Nat Med 3, 600-601

Burstein M (1957): Precipitation of blood beta-lipoproteins by heparin and synthetic heparinoids at pH5. C R Hebd Seances Acad Sci 245, 586-588

Chen M, Masaki T, Sawamura T (2002): Lox-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. Pharmacol Ther 95, 89-100

Clauss A (1957): Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. Acta Haematol 17, 237-246

Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2000): The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. Electrophoresis 21, 1104-1115

Davey Smith G, Pekkanen J (1992): Should there be a moratorium on the use of cholesterol lowering drugs? BMJ 304, 431-434

Davignon J, Ganz P (2004): Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 109, III 27-32

de Hoog CL, Mann M (2004): Proteomics. Annu Rev Genomics Hum Genet 5, 267-293

Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N: Harrisons Innere Medizin, 15. Auflage; ABW Wiss.-Verl., Berlin 2003

Dihazi H, Asif AR, Agarwal N, Doncheva Y, Müller GA (2005): Proteomic analysis of cellular response to osmotic stress in thick ascending limb of henle's loop (TALH) cells. Mol Cell Proteomics 4(10), 1445-58

Eisenhauer T, Armstrong VW, Wieland H, Fuchs C, Scheler F, Seidel D (1987): Selective removal of low density lipoproteins (LDL) by precipitation at low pH: first clinical application of the HELP system. Klin Wochenschr 65, 161-168

Empen K, Otto C, Brodl UC, Parhofer KG (2002): The effects of three different LDL-apheresis methods on the plasma concentrations of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1. J Clin Apher 17, 38-43

Ezzet F, Wexler D, Statkevich P, Kosoglou T, Patrick J, Lipka L, Mellars L, Veltri E, Batra V (2001): The plasma concentration and LDL-C relationship in patients receiving ezetimibe. J Clin Pharmacol 41, 943-949

Filonzi EL, Zoellner H, Stanton H, Hamilton JA (1993): Cytokine regulation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and macrophage colony-stimulating factor production in human arterial smooth muscle cells. Atherosclerosis 99, 241-252

Fountoulakis M, Juranville J-F, Roeder D, Evers S, Berndt P, Langen H (1998): Reference map of the low molecular mass proteins of Haemophilus influenzae. Electrophoresis 19, 1819-1827

Francisco G, Hernandez C, Simo R (2006): Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. Clin Chim Acta 369, 1-16

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972): Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 18, 499-502

Gagne C, Gaudet D, Bruckert E (2002): Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. Circulation 105, 2469-2475

Garbis S, Lubec G, Fountoulakis M (2005): Limitations of current proteomics technologies. J Chromatogr A 1077, 1-18

Glasser SP, Selwyn AP, et al. (1996): Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. Am Heart J 131, 379-384

Goldstein JL, Brown MS (2001): Molecular medicine. The cholesterol quartet. Science 292, 1310-1312

Gordon BR, Kelsey SF, Dau PC, Gotto AM, Jr., Graham K, Illingworth DR, Isaacsohn J, Jones PH, Leitman SF, Saal SD, Stein EA, Stern TN, Troendle A, Zwiener RJ (1998): Long-term effects of low-density lipoprotein apheresis using an automated dextran sulfate cellulose adsorption system. Liposorber Study Group. Am J Cardiol 81, 407-411

Graham KL, Robinson WH, Steinman L, Utz PJ (2004): High-throughput methods for measuring autoantibodies in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. Autoimmunity 37, 269-272

Greten H (1992): Hypercholesterolemia in need of therapy--general practice definition. Fortschr Med 110, 51-53

Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB, Jr., Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC, Jr., Stone NJ (2004): Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 149-161

Gutstein DE, Fuster V (1999): Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. Cardiovasc Res 41, 323-333

Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC (1997): Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. J Biol Chem 272, 21654-21659

Harats D, George J (2001): Beta2-glycoprotein I and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 12, 543-546

Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, Jr., Heimovitz H, Cohen HJ, Wallace R (1999): Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. Am J Med 106, 506-512

Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB (1997): Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. Lancet 349, 462-466

Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC (2003): Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. Annu Rev Immunol 21, 547-578

Hortin GL (2006): The MALDI-TOF Mass Spectrometric View of the Plasma Proteome and Peptidome. Clin Chem 52, 1223–1237

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science 259, 87-91

http://harvester.embl.de

http://www.lrz-muenchen.de/~wlm/ilm t4.htm

Ikeda U, Ito T, Shimada K (2001): Interleukin-6 and acute coronary syndrome. Clin Cardiol 24, 701-704

Imaizumi K, Shiga T (1983): Effect of immunoglobulins and IgG-fragments on the human erythrocyte aggregation, studied by a rheoscope combined with image analyzer. Biorheology 20, 569-577

Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Lynch NJ, Schwaeble WJ, Matsushita M, Okabe M, Fujita T (2006): Small mannose-binding lectin-associated protein plays a regulatory role

in the lectin complement pathway. J Immunol 177, 8626-8632

Jaeger BR, Goehring P, Schirmer J, Uhrig S, Lohse P, Kreuzer E, Reichart B, Seidel D (2001): Consistent lowering of clotting factors for the treatment of acute cardiovascular syndromes and hypercoagulability: a different pathophysiological approach. Ther Apher 5, 252-259

Janciauskiene S, Wright HT, Lindgren S (1999): Atherogenic properties of human monocytes induced by the carboxyl terminal proteolytic fragment of alpha-1-antitrypsin. Atherosclerosis 147, 263-275

Jansen M, Banyai S, Schmaldienst S, Goldammer A, Rohac M, Horl WH, Derfler K (2000): Direct adsorption of lipoproteins (DALI) from whole blood: first long-term clinical experience with a new LDL-apheresis system for the treatment of familial hypercholesterolaemia. Wien Klin Wochenschr 112, 61-69

Julius U, Siegert G, Gromeier S (2000): Intraindividual comparison of the impact of two selective apheresis methods (DALI and HELP) on the coagulation system. Int J Artif Organs 23, 199-206

Julius U, Metzler W, Pietzsch J, Fassbender T, Klingel R (2002): Intraindividual comparison of two extracorporeal LDL apheresis methods: lipidfiltration and HELP. Int J Artif Organs 25, 1180-1188

Kannel WB, Castelli WP, Gordon T, McNamara PM (1971): Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study. Ann Intern Med 74, 1-12

Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, D'Agostino RB (1987): Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. JAMA 258, 1183-1186

Karas M, Hillenkamp F (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal. Chem., 78, 2299-3201

Klingel R, Göhlen B, Fassbender CM, Faßbender T (2002): Fortschritte der Lipidapherese am Beispiel der Membran-Differential-Filtration / Lipidfiltration. Der Lipid-2 report November 2002, 11, 12-17

Klingel R, Fassbender T, Fassbender C, Gohlen B (2003): From membrane differential filtration to lipidfiltration: technological progress in low-density lipoprotein apheresis. Ther Apher Dial 7, 350-358

Klose J (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik 26, 231-243

Koga N (2002): Meaning of low-density lipoprotein-apheresis for hypercholesterolemic patients at high risk for recurrence of coronary heart disease. Ther Apher 6, 372-380

Koike T (2000): Antiphospholipid antibodies in arterial thrombosis. Ann Med 32 Suppl 1, 27-31

Kojima S (2001): Low-density lipoprotein apheresis and changes in plasma components. Ther Apher 5, 232-238

Kojima S, Harada-Shiba M, Toyota Y, Kimura G, Tsushima M, Kuramochi M, Sakata T, Uchida K, Yamamoto A, Omae T (1992): Changes in coagulation factors by passage through a dextran sulfate cellulose column during low-density lipoprotein apheresis. Int J Artif Organs 15, 185-190

Kosoglou T, Statkevich P, Johnson-Levonas A, Paolini J, Bergman A, Alton K (2005):

Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. Clin Pharmacokinet 44, 467-494

Kostner KM (2004): Activation of the complement system: a crucial link between inflammation and atherosclerosis? Eur J Clin Invest 34, 800-802

Koziolek M (2006): LDL-Apherese. Göttingen, Symposium LDL-Apherese.

Kroon AA, Aengevaeren WR, van der Werf T, Uijen GJ, Reiber JH, Bruschke AV, Stalenhoef AF (1996): LDL-Apheresis Atherosclerosis Regression Study (LAARS). Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. Circulation 93, 1826-1835

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

Lahm H-W, Langen H (2000): Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. Electrophoresis 21, 2105-2114

Laing P (1986): Luminescent visualization of antigens on blots. J Immunol Methods 92, 161-165

Leitinger N, Pirich C, Blazek I, Endler G, Sinzinger H (1996): Decreased susceptibility of low-density lipoproteins to in-vitro oxidation after dextran-sulfate LDL-apheresis treatment. Atherosclerosis 126, 305-312

Leonard E, Yoshimura T (1990): Human monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1]. Immunol Today 11, 97-101

Libby P (2000): Changing concepts of atherogenesis. J Intern Med 247, 349-358

Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT (1996): Macrophages and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol 7, 330-335

Linseisen J, Wilhelm M, Hoffmann J, Hailer S, Keller C, Wolfram G (1999): Acute effects of LDL-apheresis on cholesterol oxidation products and antioxidants in plasma and lipoproteins of patients with familial hypercholesterolemia. Eur J Med Res 4, 433-441

Lueking A, Huber O, Wirths C, Schulte K, Stieler KM, Blume-Peytavi U, Kowald A, Hensel-Wiegel K, Tauber R, Lehrach H, Meyer HE, Cahill DJ (2005): Profiling of alopecia areata autoantigens based on protein microarray technology. Mol Cell Proteomics 4, 1382-1390

Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Kajinami K, Miyamoto S, Ueda K, Takegoshi T (1998): Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. Am J Cardiol 82, 1489-1495

Mackness B, Hunt R, Durrington PN, Mackness MI (1997): Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17, 1233-1238

Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G (2000): C-reactive protein in offspring is associated with the occurrence of myocardial infarction in first-degree relatives. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20, 198-203

Matsuda Y, Sueoka A, Nose Y (1995): An effective LDL removal filter for the treatment of hyperlipidemia. Artif Organs 19, 129-134

Matsuura E, Lopez LR (2004): Are oxidized LDL/beta2-glycoprotein I complexes pathogenic antigens in autoimmune-mediated atherosclerosis? Clin Dev Immunol 11, 103-111

Matsuzaki M, Hiramori K, Imaizumi T, Kitabatake A, Hishida H, Nomura M, Fujii T, Sakuma I, Fukami K, Honda T, Ogawa H, Yamagishi M (2002): Intravascular ultrasound evaluation of coronary plaque regression by low density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: the Low Density Lipoprotein-Apheresis Coronary Morphology and Reserve Trial (LACMART). J Am Coll Cardiol 40, 220-227

McKenney JM (2003): Update on the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines: getting to goal. Pharmacotherapy 23, 26S-33S

Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG (1986): Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. Lancet 1986, 2, 533-537

Meier P, Blanc E (2000): Long-term efficacy of lipoprotein apheresis in homozygous familial hypercholesterolaemia. Nephrol Dial Transplant 15, 738A-740

Mehnert H: Stoffwechselkrankheiten: Grundlagen-Diagnostik-Therapie, 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 1990, 279

Mellwig K-P (2002): Heparin-induzierte extrakorporale LDL-Präzipitation (H.E.L.P.). Der Lipid-2 report November 2002, 11, 5-11

Mellwig KP, Baller D, Gleichmann U, Moll D, Betker S, Weise R, Notohamiprodjo G (1998): Improvement of coronary vasodilatation capacity through single LDL apheresis. Atherosclerosis 139, 173-178

Mercurius KO, Morla AO (1998): Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. Circ Res 82, 548-556

Moriarty PM, Gibson CA, Shih J, Matias MS (2001): C-reactive protein and other markers of inflammation among patients undergoing HELP LDL apheresis. Atherosclerosis 158, 495-498

Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9, 255-262

Ng SB, Tan YH, Guy GR (1994): Differential induction of the interleukin-6 gene by tumor necrosis factor and interleukin-1. J Biol Chem 269, 19021-19027

Nguyen AD, Itoh S, Jeney V, Yanagisawa H, Fujimoto M, Ushio-Fukai M, Fukai T (2004): Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase. Circ Res 95, 1067-1074

Niculescu F, Rus H (2004): The role of complement activation in atherosclerosis. Immunol Res 30, 73-80

Niculescu F, Rus HG, Porutiu D, Ghiurca V, Vlaicu R (1989): Immunoelectron-microscopic localization of S-protein/vitronectin in human atherosclerotic wall. Atherosclerosis 78, 197-203

Niculescu F, Rus HG, Vlaicu R (1990): Decay-accelerating factor regulates complement-mediated damage in the human atherosclerotic wall. Immunol Lett 26, 17-23

Nishimura S, Sekiguchi M, Kano T, Ishiwata S, Nagasaki F, Nishide T, Okimoto T, Kutsumi Y, Kuwabara Y, Takatsu F, Nishikawa H, Daida H, Yamaguchi H (1999): Effects of intensive lipid lowering by low-density lipoprotein apheresis on regression of coronary atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: Japan Low-density Lipoprotein Apheresis Coronary Atherosclerosis Prospective Study (L-CAPS). Atherosclerosis 144, 409-417

O'Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol

Chem 250, 4007-4021

Oksjoki R, Jarva H, Kovanen PT, Laine P, Meri S, Pentikainen MO (2003a): Association between complement factor H and proteoglycans in early human coronary atherosclerotic lesions: implications for local regulation of complement activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23, 630-636

Oksjoki R, Kovanen PT, Pentikainen MO (2003b): Role of complement activation in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 14, 477-482

Otto C, Geiss HC, Laubach E, Schwandt P (2002): Effects of direct adsorption of lipoproteins apheresis on lipoproteins, low-density lipoprotein subtypes, and hemorheology in hypercholesterolemic patients with coronary artery disease. Ther Apher 6, 130-135

Paoletti R, Bolego C, Cignarella A (2005): Lipid and non-lipid effects of statins. Handb Exp Pharmacol 170, 365-388

Park JW, Merz M, Braun P (1998): Effect of HELP-LDL-apheresis on outcomes in patients with advanced coronary atherosclerosis and severe hypercholesterolemia. Atherosclerosis 139, 401-409

Poredos P, Zizek B (1996): Plasma viscosity increase with progression of peripheral arterial atherosclerotic disease. Angiology 47, 253-259

Pravastatin Multicenter Study Group II. (1993): Comparative efficacy and safety of pravastatin and cholestyramine alone and combined in patients with hypercholesterolemia. Arch Intern Med 153, 1321-1329

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ (1990): Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. Nature 344, 254-257

Richter WO, Donner MG, Schwandt P (1999): Three low density lipoprotein apheresis techniques in treatment of patients with familial hypercholesterolemia: a long-term evaluation. Ther Apher 3, 203-208

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000): C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med 342, 836-843

Riede U-N, Schäfer H-E: Lehrbuch der allgemeinen und speziellen Pathologie; Thieme, Stuttgart 1995, 437

Ross R (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 362, 801-809

Ross R (1999): Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med 340, 115-126

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994): Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet 344, 1383-1389

Schaumann D, Welch-Wichary M, Voss A, Schmidt H, Olbricht CJ (1996): Prospective cross-over comparisons of three low-density lipoprotein (LDL)-apheresis methods in patients with familial hypercholesterolaemia. Eur J Clin Invest 26, 1033-1038

Schechner V, Berliner S, Shapira I, Justo D, Hershcovici T, Zeltser D, Beigel Y (2004): Comparative analysis between dextran sulfate adsorption and direct adsorption of lipoproteins in their capability to reduce erythrocyte adhesiveness/aggregation in the peripheral blood. Ther Apher Dial 8, 39-44

Shepherd J (1995): The West of Scotland Coronary Prevention Study: a trial of cholesterol reduction in Scottish men. Am J Cardiol 76, 113C-117C

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem 68, 850-858

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

Stan S, Delvin E, Lambert M, Seidman E, Levy E (2003): Apo A-IV: an update on regulation and physiologic functions. Biochim Biophys Acta 1631, 177-187

Stary HC, Chandler AB et al. (1994): A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 89(5), 2462-78

Steen H, Mann M (2004): The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol 5, 699-711

Steinberg D (1997): Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. J Biol Chem 272, 20963-20966

Steinberg HO, Bayazeed B, Hook G, Johnson A, Cronin J, Baron AD (1997): Endothelial dysfunction is associated with cholesterol levels in the high normal range in humans. Circulation 96, 3287-3293

Stoll D, Templin MF, Schrenk M, Traub PC, Vohringer CF, Joos TO (2002): Protein microarray technology. Front Biosci 7, c13-c32

Stone NJ, Levy RI, Fredrickson DS, Verter J (1974): Coronary artery disease in 116 kindred with familial type II hyperlipoproteinemia. Circulation 49, 476-488

Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S, Perevozskaya I, von Bergmann K (2002): Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. Circulation 106, 1943-1948

Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T (1997): Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. Circulation 95, 76-82

Tatami R, Inoue N, Itoh H, Kishino B, Koga N, Nakashima Y, Nishide T, Okamura K, Saito Y, Teramoto T, et al. (1992): Regression of coronary atherosclerosis by combined LDL-apheresis and lipid-lowering drug therapy in patients with familial hypercholesterolemia: a multicenter study. The LARS Investigators. Atherosclerosis 95, 1-13

The Lovastatin Pravastatin Study Group. (1993): A multicenter comparative trial of lovastatin and pravastatin in the treatment of hypercholesterolemia. Am J Cardiol 71, 810-815

The Pravastatin Multinational Study Group for Cardiac Risk Patients. (1993): Effects of pravastatin in patients with serum total cholesterol levels from 5.2 to 7.8 mmol/liter (200 to 300 mg/dl) plus two additional atherosclerotic risk factors. Am J Cardiol 72, 1031-1037

The Simvastatin Pravastatin Study Group. (1993): Comparison of the efficacy, safety and tolerability of simvastatin and pravastatin for hypercholesterolemia. Am J Cardiol 71, 1408-1414

Thiery J, Seidel D (1998): Safety and effectiveness of long-term LDL-apheresis in patients at high risk. Curr Opin Lipidol. 9(6), 521-526

Thompson G (2003): LDL apheresis. Atherosclerosis 167, 1-13

Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC (1995): Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. N Engl J Med 332, 635-641

Thorwald J: Macht und Geheimnis der früheren Ärzte, Droemersche Verlagsanstalt, München 1962, 42

Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J, Koenig W, Schmitz G, Hombach V, Torzewski J (2000): C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 2094-2099

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76, 4350-4354

Vapaatalo H, Mervaala E (2001): Clinically important factors influencing endothelial function. Med Sci Monit 7, 1075-1085

Vlaicu R, Rus HG, Niculescu F, Cristea A (1985): Quantitative determinations of immunoglobulins and complement components in human aortic atherosclerotic wall. Med Interne 23, 29-35

Walldius G, Jungner I (2004): Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. J Intern Med 255, 188-205

Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL (1995): Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. Atherosclerosis 115, 89-98

Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO (1996): Influence of acute-phase proteins on erythrocyte aggregation. Am J Physiol 271, H2346-2352

Weng X, Roederer GO, Beaulieu R, Cloutier G (1998): Contribution of acute-phase proteins and cardiovascular risk factors to erythrocyte aggregation in normolipidemic and hyperlipidemic individuals. Thromb Haemost 80, 903-908

Wesley RB, 2nd, Meng X, Godin D, Galis ZS (1998): Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18, 432-440

Westmeier R: Electrophoresis in Practice, 3. Auflage, Wiley-Vvh., Weinheim 2001

Wieland H, Seidel D (1983): A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. J Lipid Res 24, 904-909

Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996): From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Biotechnology (N Y) 14, 61-65

Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, Elwood PC (1991): Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. Circulation 83, 836-844

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. H. Dihazi für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie für die Betreuung dieser Arbeit. Hier gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei der Einführung in die Geheimnisse der Proteomics und der Durchführung des experimentellen Teils dieser Studie, sowie für die gute und nette Zusammenarbeit beim Verfassen der Arbeit.
Bei Herrn Dr. M. Koziolek möchte ich mich ganz außerordentlich für die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit im Hinblick auf die klinischen Fakten und im besonderen Maße für das geduldige und schnelle Korrekturlesen recht herzlich bedanken.
Ich danke Herrn Prof. F. Strutz aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums Göttingen, wie auch Herrn Dr. R. Klingel des Apheresеforschungsinstituts Köln, für ihre Hilfe und Unterstützung der Studie.
Mein vielleicht größter Dank gilt der medizinisch-technischen Assistentin Frau E. Knoblich, dem guten Geist des Labors, für die seelische und insbesondere auch tatkräftige Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit und der freundlichen Aufnahme. Ebenso möchte ich mich bei allen anderen im Labor tätigen Doktoranden für die freundschaftliche Hilfe und die gute Laune bedanken.
Des Weiteren bin ich Herrn A. R. Asif und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung „Klinische Chemie“ des Universitätsklinikums Göttingen für die Kooperation bei der Identifizierung von Proben zu Dank verpflichtet.
Frau C. Werner aus der Abteilung der medizinischen Statistik der Georg-August-Universität Göttingen danke ich für die Unterstützung der statistischen Auswertung der Arbeit.
Bei dem Pflegepersonal der Apheresestation 2021 des Universitätsklinikums Göttingen bedanke ich mich sehr herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie.
Den allergrößten Dank schulde ich den Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben ohne sie wäre diese Studie nicht möglich gewesen und ich wünsche ihnen weiterhin alles Gute.

Lebenslauf

Am 2. September 1981 wurde ich, Tanja Franziska Magdalena Theresa Söllner, als erstes Kind der Lehrerin Christine Söllner, geb. Schindler, und des Berufsoffiziers Anton Söllner in Kösching, Lkrs. Eichstätt (Bayern) geboren. 1987 wurde ich eingeschult und besuchte im Laufe meiner Grundschulausbildung drei verschiedene Schulen: 1987 bis 1988 die erste Klasse der Volksschule Ingolstadt an der Stollstraße, 1988 bis 1990 die zweite und dritte Klasse der Volksschule Freyung und von 1990 bis 1991 die vierte Klasse der Grundschule Freilassing. Anschließend wechselte ich 1991 nach bestandener Aufnahmeprüfung auf das Rottmayr-Gymnasium-Laufen. Hier verbrachte ich das fünfte und sechste Schuljahr. Danach besuchte ich die Klassen sieben bis neun auf dem Gymnasium Freyung. 1996 wechselte ich an das Konrad-Adenauer-Gymnasium Bonn-Bad Godesberg. Dort erhielt ich im Jahr 2000 mein Abitur (Note: 1,7) mit den Leistungskursen Biologie und Mathematik.
Im Wintersemester 2000/2001 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Hier legte ich im Sommersemester 2002 meine ärztliche Vorprüfung ab. Den klinischen Teil des Humanmedizinstudiums absolvierte ich ebenfalls an der Georg-August-Universität Göttingen. Von April 2006 bis März 2007 befand ich mich im praktischen Jahr. Das erste Tertial durchlief ich in der Abteilung für Innere Medizin/Nephrologie am Uniklinikum Göttingen. Den ersten Teil des chirurgischen Tertials absolvierte ich an der Ammerlandklinik in Westerstede. Die zweite Hälfte verbrachte ich im Department of Surgery der Universität Pretoria in Südafrika. Das dritte Tertial absolvierte ich in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin wieder in der Ammerlandklinik Westerstede. Am 17.04.2007 legte ich das Dritte Staatsexamen ab und schloss das Studium mit der Gesamtnote Gut (1,66) ab. Momentan arbeite ich als Assistenzärztin im St. Josef Hospital Bonn-Beuel in der Abteilung für Innere Medizin.