

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen

Abteilung Kinderheilkunde IV

(Schwerpunkt: Neonatologie, neonatologische Intensivmedizin)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. F. Poets

**Der pathologische Phospholipid-Metabolismus der  
Leber bei Mukoviszidose: Stoffwechseluntersuchungen  
mittels [*Methyl-D<sub>9</sub>*]Cholinchlorid und  
Tandemmassenspektrometrie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Sandra Miriam Tschürtz

aus

Tübingen

2012

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. Dr. W. Bernhard

2. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. J. Riethmüller

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1. Phospholipide</b> .....	<b>8</b>
2.1.1. Systematik und Struktur der Phospholipide .....	9
2.1.1.1. Systematik und Struktur der Fettsäuren.....	11
2.1.1.2. Synthese von Fettsäuren.....	12
2.1.2. Phospholipidmetabolismus .....	14
2.1.3. Störung des Phospholipidmetabolismus.....	16
2.1.4. Synthese der Phosphatidylcholine .....	17
2.1.4.2. Cholin-Synthese .....	18
2.1.4.3. De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin.....	19
2.1.4.4. Lands-Zyklus .....	19
2.1.4.5. PEMT-Pathway .....	20
2.1.5. Stabile Isotopenmarkierung von Cholin .....	22
<b>2.2. Triglyceride</b> .....	<b>24</b>
2.2.1. Synthese von Triglyceriden .....	25
2.2.2. Abbau von Triglyceriden .....	25
<b>2.3. Mukoviszidose</b> .....	<b>27</b>
2.3.1. Definition und Inzidenz.....	27
2.3.2. Pathogenese.....	27
2.3.3. Klinik .....	29
2.3.4. Diagnostik.....	32
2.3.5. Therapie.....	32
2.3.6. Prognose .....	33
<b>3. Material und Methodik</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1. Geräte und Chemikalien</b> .....	<b>35</b>
3.1.1. Geräte und Verbrauchsmittel .....	35
3.1.1.1. Probengewinnung (Blutplasma).....	35
3.1.1.2. Phospholipid-Extraktion.....	35
3.1.1.3. Phospholipidquantifizierung .....	35
3.1.1.4. Festphasenextraktion .....	35
3.1.1.5. Gaschromatographie .....	36
3.1.2. Chemikalien, Lösungen und Standardsubstanzen .....	36
3.1.2.1. Chemikalien.....	36
3.1.2.2. Lösungen .....	37
3.1.2.3. Standardsubstanzen.....	37
<b>3.2. Studienteilnehmer</b> .....	<b>38</b>
3.2.1. Genehmigung der Ethikkommission.....	38
3.2.2. Kontrollgruppe.....	38
3.2.3. Patientengruppe.....	39
<b>3.3. Studienablauf</b> .....	<b>40</b>
3.3.1. Studienstart: [Methyl-D <sub>9</sub> ]Cholin-Infusion.....	40
3.3.2. Blutentnahme.....	41
<b>3.4. Aufarbeitung des Plasmas für HPLC, MS und GC</b> .....	<b>41</b>
3.4.1. Phospholipid-Extraktion nach Bligh & Dyer .....	41
3.4.2. Phospholipidquantifizierung .....	43
3.4.3. Festphasenextraktion der Plasmalipide für GC- und HPLC-Analytik .....	44
3.4.4. Fertigstellung der Proben für die Massenspektrometrie .....	46
3.4.5. Aufarbeitung der Triglyceride für die Gaschromatographie.....	46

<b>3.5. Analysemethoden</b> .....	<b>47</b>
3.5.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	47
3.5.2. Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie .....	51
3.5.2.1. Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)	52
3.5.2.2. Analytik von Phosphatidylcholinen.....	53
3.5.2.3. Analytik der wässrigen Metabolite (Cholin, Betain, Phosphocholin) .....	56
3.5.3. Gaschromatographie (GC).....	57
<b>3.6. Statistische Auswertung</b> .....	<b>58</b>
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1. Massenspektrometrie der wässrigen Metabolite</b> .....	<b>59</b>
4.1.1. Kinetik des endogenen Cholins, endogenen Betains und endogenen Phosphocholins .....	59
4.1.2. Kinetik des [Methyl-D <sub>9</sub> ]Cholins, [Methyl-D <sub>9</sub> ]Betains und [Methyl-D <sub>9</sub> ]Phosphocholins.....	61
4.1.3. [Methyl-D <sub>9</sub> ]Cholin-, [Methyl-D <sub>9</sub> ]Betain- und [Methyl-D <sub>9</sub> ]Phosphocholin-Anreicherung .....	63
<b>4.2. Phospholipid-Konzentrationen im Blutplasma</b> .....	<b>64</b>
<b>4.3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Analytik des Plasma-PCs</b> .....	<b>65</b>
4.3.1. Anteil des Phosphatidylcholins an Gesamt-Phospholipiden und PC-Konzentration im Blutplasma .....	65
4.3.2. Molekulare Zusammensetzung von Phosphatidylcholin .....	66
4.3.3. Konzentrationen der Phosphatidylcholin-Spezies.....	68
<b>4.4. Massenspektrometrie der Phosphatidylcholine</b> .....	<b>69</b>
4.4.1. Endogene PC-Konzentration im Blutplasma .....	69
4.4.2. Zusammensetzung des endogenen Phosphatidylcholins .....	70
4.4.3. Konzentrationen der endogenen PC-Spezies .....	71
4.4.4. Zusammensetzung des [Methyl-D <sub>9</sub> ]- und [Methyl-D <sub>3</sub> ]PCs im Zeitverlauf ....	72
4.4.5. Konzentrationen des [Methyl-D <sub>9</sub> ]- und [Methyl-D <sub>3</sub> ]PCs im Zeitverlauf.....	74
4.4.6. [Methyl-D <sub>9</sub> ]PC- und [Methyl-D <sub>3</sub> ]PC- Anreicherung .....	77
4.4.7. Kinetik des De novo- und PEMT-Pathways.....	77
4.4.8. D <sub>3</sub> /D <sub>6</sub> -Ratio .....	79
<b>4.5. Gaschromatographie</b> .....	<b>79</b>
4.5.1. Triglycerid-Konzentration im Blutplasma .....	79
4.5.2. Zusammensetzung der Triglycerid-Fettsäuren .....	80
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>81</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>88</b>
<b>7. Anhang</b> .....	<b>91</b>
<b>8. Verzeichnisse</b> .....	<b>94</b>
8.1. Literaturverzeichnis .....	94
8.2. Tabellenverzeichnis .....	102
8.3. Abbildungsverzeichnis .....	103
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Adenosintri-phosphat binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	analysis of variance
ATGL	Adipose-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosintri-phosphat
BADH	Betainaldehyd-Dehydrogenase
BHMT	Betain-Homozystein-Methyltransferase
BHT	Butylhydroxytoluol
C8:0	Caprylsäure
C10:0	Caprinsäure
C12:0	Laurinsäure
C14:0	Myristinsäure
C16:0	Palmitinsäure
C16:1	Palmitoleinsäure
C18:0	Stearinsäure
C18:1	Ölsäure
C18:2	Linolsäure
C20:0	Arachinsäure
C20:4	Arachidonsäure
C20:5	Timnodonsäure = Eicosapentaensäure
C22:0	Behensäure
C22:6	Cervonsäure = Dokosahexaensäure
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CDH	Cholindehydrogenase
CDP-Cholin	Cytidindiphosphat-Cholin
CDP-DAG	Cytidindiphosphat-Diacylglycerol
CF	Engl.: cystic fibrosis = Zystische Fibrose
CF1, CF2, CF3	CF-Patient 1, 2, 3
CFRD	cystic-fibrosis-related Diabetes mellitus
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CK	Cholinkinase
CM 2+1	Chloroform : Methanol = 2 : 1
CMP	Cytidinmonophosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Co-A	Coenzym A
CPCT	Cholinphosphatcytidyl-Transferase
CTP	Cytidintri-phosphat
CV	Central vene = Zentralvene
D	Deuterium
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DAG	Diacylglyceride
DAG-CPT	Diacylglycerol-Cholinphosphotransferase
DAT	Diacylglycerol-Acyltransferase

DHA	Dokosahexaensäure
DIOS	Distales intestinales Obstruktionssyndrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPH	Diphenylhexatrien
EC	Enzyme commission Nummer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	Englisch
EPA	Eicosapentaensäure
ESI-MS/MS	Elektrosprayionisations-Tandemmassenspektrometrie
etc.	et cetera
FABP <sub>pm</sub>	fatty acid binding protein <sub>pm</sub>
FAT	fatty acid translocase
FATP	fatty acid transport protein
FEV1	Einsekundenkapazität
FS	Fettsäure
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High density lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSL	Hormonsensitive Lipase
ICM	Intestinale Kurzschlussstrom-Messung
IDL	Intermediate density lipoprotein
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
l	Liter
LDL	Low density Lipoprotein
LPCAT	Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
m	Meter
M	Masse
m/z	Masse/ Ladung
MAG	Monoacylglyceride
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
mbar	Millibar
MeS	Methioninsynthase
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MGL	Monoglycerid-Lipase
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol = mM	Millimol
mN	Millinewton
MRM	Multiple Reaction Monitoring

MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Fallzahl
N	Teilchenzahl
N <sup>5</sup> -Methyl-THF	N <sup>5</sup> -Methyltetrahydrofolsäure
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAD <sup>+</sup> /NADH+H <sup>+</sup>	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid oxidierte/ reduzierte Form
NADP <sup>+</sup> / NADPH/H <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat oxidierte/ reduzierte Form
NH <sub>2</sub>	Primäre Aminogruppe
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniumhydroxid
nm	Nanometer
nmol = nM	Nanomol
nPD	Nasale Potentialdifferenz-Messung
OP	Oberphase
P1, P2, P3, P4	Proband 1, 2, 3, 4
PC	Phosphatidylcholin
PC14:0/14:0	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/14:0	Palmitoylmyristoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/16:0	Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/16:1	Palmitoylpalmitoleoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/18:1	Palmitoyloleoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/18:2	Palmitoyllinoleoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/20:4	Palmitoylarachidonoyl-Phosphatidylcholin
PC16:0/22:6	Palmitoyldocosahexaenoyl-Phosphatidylcholin
PC18:0/18:1	Stearoyl-oleoyl-Phosphatidylcholin
PC18:0/18:2	Stearoyllinoleoyl-Phosphatidylcholin
PC18:0/20:4	Stearoylarachidonoyl-Phosphatidylcholin
PC18:0/22:6	Stearoyldocosahexaenoyl-Phosphatidylcholin
PC18:1/18:2	Oleoyllinoleoyl-Phosphatidylcholin
PC18:1/20:4	Oleoylarachidonoyl-Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PEMT	Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase
PG	Phosphatidylglycerol
PGP	Phosphatidylglycerophosphat
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipid
PP <sub>i</sub> /P <sub>i</sub>	organisches Phosphat
PS	Phosphatidylserin
PUFA	Polyunsaturierte Fettsäuren
rez.	rezidivierend
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	(Reversed phase-) Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
s.	Siehe
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SAH	S-Adenosylhomozystein
SAH-H	S-Adenosylhomozystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	standard deviation (Standardabweichung)



SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
Sn	Stereospezifische Nummerierung
sog.	Sogenannt
Std.	Standard
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAG/ TG	Triacylglyceride/ Triglyceride
TFE	Trifluorethanol
THG	Tetrahydrofolsäure
u.a.	unter anderem
UP	Unterphase
UV	Ultraviolett-Strahlung
V	Volt
VE	Vollentsalztes Wasser
VIS	engl.: visible = sichtbares Licht
Vit. B <sub>12</sub>	Vitamin B <sub>12</sub>
VLDL	Very low density lipoprotein
v/v/w	volume/ volume/ weight
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1. Einleitung

Die Leber spielt eine zentrale Rolle in der Versorgung extrahepatischer Organe mit Lipiden und Lipidbausteinen. Sie ist das größte Stoffwechselorgan des Menschen mit einem Gewicht von 1500 – 2000 g beim Erwachsenen. Die funktionelle Grundeinheit der Leber ist der Leberazinus, der von zwei benachbarten Periportalfeldern und zwei Zentralvenen gebildet wird.

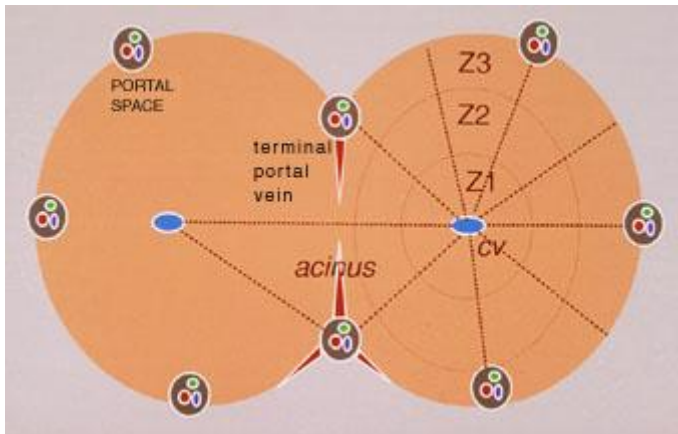


Abbildung 1: Leberazinus [1]

CV = Zentralvene, Z1 – Z3: drei unterschiedliche Zonen, terminal portal vein = terminale Portalvene im Periportalfeld (portal space).

Der Leberazinus ist durch unterschiedliche Zonen (s. Abb. 1, Z1 – Z3) der Durchblutung und Sauerstoffsättigung gekennzeichnet, einhergehend mit verschiedenen Hormonkonzentrationen und Stoffwechselspezialisierungen. In der Periportalzone (Z3) finden vorwiegend Oxidationsreaktionen wie die  $\beta$ -Oxidation statt, zudem die Gluconeogenese, Harnstoffsynthese, Gallenbildung und Cholesterolsynthese. In der sauerstoffärmeren perivenösen Zone (Z1) hingegen sind überwiegend die Glykolyse, Liponeogenese, Ketogenese, Glutaminsynthese und der Xenobiotikametabolismus lokalisiert [2, 3]. Damit ist dieser Bereich auch der Ort der Lipoproteinsynthese.

Die Funktionen der Leber sind sehr vielfältig (Tab. 2). Ihre Funktion im Rahmen des Lipidstoffwechsels besteht in der Synthese, Modifikation sowie Verteilung von Lipiden an periphere Organe. Sie werden als Phospholipide und Neutrallipide in Lipoproteinen zu den Zielzellen transportiert. Lipoproteine sind Komplexe aus Proteinen und Lipiden, bei denen 5 verschiedene Klassen mit

## 1. Einleitung

unterschiedlichen Funktionen und Zusammensetzung unterschieden werden [4] (siehe Kap. 2.1.2, Tab.4). Die Lipoproteinklasse VLDL („very low density lipoprotein“) ist vor allem dafür verantwortlich, Lipide der Leber in die peripheren Gewebe zu transportieren.

Vorherrschende Phospholipide der Lipoproteine sind molekulare Spezies des Phosphatidylcholins (PC), die ein charakteristisches molekulares Pattern aufweisen, das sich von dem anderer Organe und Zellen unterscheidet [5]. In Tab. 3 ist die massenspektrometrisch bestimmte PC-Zusammensetzung des Surfactants der Lunge [6] im Vergleich zu der des Plasmas [7] dargestellt.

Tabelle 2: Funktionen der Leber

Stoffwechselfunktionen	Kohlenhydrat-, Lipidstoffwechsel, Synthese von Hormonen und Plasmaproteinen (Albumin, Globuline, Gerinnungsfaktoren, Akute-Phase-Proteine)
Entgiftungsfunktionen	Abbau von toxischen Substanzen (Hämoglobin, Ammoniak, Medikamente, Alkohol, etc.)
Drüsenfunktion	Produktion von Galle (Bestandteile: Wasser, Gallensalze, Enzyme, Phosphatidylcholine und andere Phospholipide, Cholesterin, Abbauprodukte der Leber [8])
Speicherfunktionen	Vitamine (A, B <sub>12</sub> , D, E, K), Spurenelemente (Eisen, Kupfer, Zink, Mangan, etc.), Glykogen
Immunabwehrfunktionen	Kupffer-Zellen, Pit-Zellen etc.

Tabelle 3: Prozentuale PC-Zusammensetzung von Surfactant [6] und Plasma [7], bestimmt über MS

Surfactant [6]		Plasma [7]	
PC16:0/16:0	54,0 ± 1,5 %	PC16:0/18:2	29,8 ± 5,1 %
PC16:0/18:1	13,1 ± 0,3 %	PC18:0/18:2	15,5 ± 1,7 %
PC16:0/16:1	10,0 ± 1,0 %	PC16:0/20:4	13,6 ± 2,6 %
PC16:0/14:0	9,7 ± 0,7 %	PC16:0/18:1	10,9 ± 1,3 %
PC16:0/18:2	6,9 ± 0,2 %	PC18:1/18:2	9,7 ± 0,7 %

PC-Spezies können prinzipiell auf mehreren Wegen synthetisiert werden. Zum einen kann PC durch Neusynthese über den Cholin-Einbau via Kennedy-Pathway gebildet werden [9] (s. Abb. 10 in Kap. 2.1.4.3.). Dieser Weg ist in allen Organen möglich, wobei das Cholin aus dem Plasma bzw. der Nahrung und dem eigenen PC-Katabolismus entstammt. Es entstehen dabei vor allem

## 1. Einleitung

Phosphatidylcholine mit gesättigten sowie mono- und diunsaturierten Fettsäuren mittlerer Kettenlänge [10].

Zum anderen werden die primär synthetisierten PC-Spezies sekundär via Lands-Zyklus modifiziert. Hierbei wird der Fettsäurerest in Position sn-2 (chirales mittleres C-Atom) des Glycerols gegen einen anderen Fettsäurerest ausgetauscht und ein organotypisches Muster hergestellt [11]. In der Lunge sind die primären Syntheseprodukte z. B. großenteils 1-Palmitoyl-2-oleoyl- oder -2-linoleoyl-PC, die via Lands-Zyklus in 1,2-Dipalmitoyl-PC des Surfactants umgewandelt werden [12] (s. Abb. 11 in Kap. 2.1.4.4.).

Drittens können Phosphatidylcholine auch durch die Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase (PEMT) mittels 3 Methylierungsschritte aus Phosphatidylethanolamin (PE) synthetisiert werden (s. Abb. 12 in Kap. 2.1.4.5.) [13, 14]. Dabei dient S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator. Dieser Syntheseweg ist nur in der Leber [15, 16], im neonatalen ZNS der Ratte und in der lactierenden Mamma nachgewiesen [17, 18], wo er einen wesentlichen Beitrag zur PC-Synthese leistet. Über diesen Weg entstehen vor allem Phosphatidylcholine mit längerkettigen polyunsaturierten Fettsäuren (PUFA) wie Arachidonsäure (C20:4) und Dokosahexaensäure (C22:6) [7, 10], da PE vorwiegend 20:4 und 22:6 enthält. Durch ihren Einbau in hepatogene Lipoproteine, vor allem in VLDL, hat dieser Stoffwechselweg der Leber eine wichtige Funktion in der Versorgung anderer Organe, nicht allein mit Cholin, sondern auch mit polyunsaturierten Fettsäuren [19]. Die PEMT wird nur von differenzierten Hepatozyten exprimiert, während sie bei entdifferenzierten Hepatozyten fehlt [20-22].

Patienten mit Mukoviszidose (Zystische Fibrose, CF) zeigen neben der pulmonalen Problematik und exokrinen Pankreasinsuffizienz im Laufe ihrer Erkrankung oft eine Leberfunktionsstörung [23].

Untersuchungen bei CF-Patienten sowie CF-Mausmodellen haben gezeigt, dass die Ausscheidung von cholinhaltigen Komponenten über die Fäzes bei CF-Patienten erhöht ist [16]. Obwohl die Leber via PEMT-Pathway Cholin als Kopfgruppe von PC aus PE generieren kann, ist Cholin ein essentieller

## 1. Einleitung

Nährstoff (adäquate Aufnahme: 8 mg/ kg Körpergewicht/ Tag für gesunde Männer [24]). Cholin selbst ohne Lipidbindung kann nicht gebildet werden [13, 25]. Die vermehrte Cholinausscheidung wird durch eine Malabsorption und Maldigestion aufgrund einer Funktionsstörung der duodenalen Pankreaslipase bedingt (s.u.) [26]. Es kommt zu einer Störung des enterohepatischen Kreislaufs des Galle-PCs, welches bis zu 50 % des Leber-PCs pro Tag umfasst [27, 28]. Die vermehrte Cholinausscheidung führt daher zu einem verminderten Cholinspiegel im Plasma [29]. Durch den Cholinmangel kommt es zu einer Störung oder Verminderung der Phosphatidylcholin-Synthese über den CDP-Cholin-Pathway und den PEMT-Pathway [30]. Eine funktionierende PC-Synthese wird jedoch für eine normale VLDL-Sekretion aus den Hepatozyten benötigt. Die Triglyceride lagern sich bei PC-Synthesestörungen durch Cholinmangel in der Leber ab und es entwickelt sich eine Hepatosteatose [13, 31, 32].

Die Zusammensetzung der Plasmaphospholipide wird durch ihre Sekretion als Bestandteil hepatogener Lipoproteine bestimmt [7]. Die Plasma-PC-Zusammensetzung ist der der Leber sehr ähnlich [7] und Leberfunktionsstörungen korrelieren mit veränderten PC-Konzentrationen im Plasma [5].

Studien haben gezeigt, dass bei CF-Patienten die Plasmakonzentrationen von Phosphatidylethanolamin, Homozystein und S-Adenosylhomozystein erhöht, jedoch die von Methionin und PC erniedrigt sind [16, 32, 33]. Das Verhältnis von PC zu PE in Leber und Plasma ist in Folge einer gestörten PC-Synthese via PEMT und/ oder durch Cholin-Mangel erniedrigt [33]. Detaillierte Fettsäureanalysen der Phospholipide bzw. ihrer molekularen Spezies bei CF-Mäusen zeigten, dass hauptsächlich der Arachidonsäure-, und auch der Dokosahexaensäure-Spiegel im Plasma der CF-Mäuse erniedrigt sind [5]. Die Fettsäure-Veränderungen der Plasmalipide konnten auch bei CF-Patienten gezeigt werden [34], unabhängig davon, ob sie eine Pankreasinsuffizienz aufwiesen oder nicht [35, 36].

## 1. Einleitung

Diese bisher durchgeführten Studien liefern den Hinweis, dass bei CF-Patienten der Lipidmetabolismus der Leber im Vergleich zu den Gesunden beeinträchtigt ist. Es ist jedoch unklar, ob die Störung die hepatische PC-Synthese oder nur die Sekretion von PC ins Plasma als Bestandteil von VLDL betrifft. Auch ist unklar, ob beide Synthesewege, der Kennedy-Pathway und der PEMT-Pathway, betroffen sind und gemeinsam zur Steatose führen [13].

Deskriptive Daten über die Lipidveränderungen der CF-Leber liegen im großen Umfang vor. So zeigte eine Studie bereits, dass die Methionin-, S-Adenosylmethionin- und S-Adenosylhomozystein-Spiegel durch Nahrungsergänzung mit Lecithin (PC), Cholin oder Betain beeinflussen lassen und das Ungleichgewicht verbessern [32]. Die Veränderungen des zugrundeliegenden Cholin- und PC-Stoffwechsels wurden hingegen bislang noch nicht an Patienten *in vivo* untersucht. Dies könnte jedoch die Option der Cholin-Substitution bei CF zur Besserung der Leberproblematik weiter unterstützen, indem die PC-Synthese via Kennedy- und/oder PEMT-Pathway stimuliert wird.

Ziel dieser Studie ist deshalb, Veränderungen von PC-Homöostase und Metabolismus zu untersuchen, wofür eine stabile Isotopenmarkierungstechnik zur Verfügung steht, die zuvor bereits am Menschen angewandt wurde [6, 7].

Die zu testende Hypothesen sind:

- Bei CF-Patienten ist die Cholin-Konzentration im Blutplasma erniedrigt.
- Bei CF-Patienten ist die Konzentration des Gesamt-PC im Plasma erniedrigt.
- Bei CF-Patienten ist die hepatische Sekretion von neu synthetisiertem PC gestört.

Die Untersuchung von Stoffwechselveränderungen setzt die Anwendung von Markierungstechniken voraus, wofür beim Menschen zur Analyse von Lipiden nur stabile Isotope in Frage kommen, wodurch die Syntheseprodukte massenspektrometrisch differenziert werden können und der Metabolismus beurteilbar wird. Deuteriertes Cholin ([Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin) wurde dazu bei

## 1. Einleitung

Patienten intravenös als Kurzzeitinfusion verabreicht, um die Stoffwechselkinetik und eventuelle Veränderungen zu untersuchen. Diese Technik wurde zuvor an kultivierten Zellen und an Erwachsenen erprobt und zeigte, dass sie eine sensitive und sichere Methode ist, um die PC-Synthese und -Sekretion zu quantifizieren [6, 7, 37, 38]. Diese Studie ist die erste Anwendung von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin an Patienten mit einer klinisch relevanten Leberbeteiligung, um die Pathophysiologie des Lipidstoffwechsels der Leber untersuchen.

Die Studienteilnehmer bekamen dazu [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin (Abb. 2) in isotonischer Kochsalzlösung über 3 Stunden infundiert. Diese Markierungsmethode erlaubt eine Beladung des Organismus mit [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin, das sehr schnell ins Gewebe aufgenommen wird, und über charakteristische Massenverschiebungen der gebildeten PC-Spezies (M+9 für den direkten Einbau, M+3 und M+6 für den sequentiellen Einbau isolierter deuterierter Methylgruppen) die Differenzierung endogener, unmarkierter Phosphatidylcholins und derer, die über den Kennedy-Pathway bzw. PEMT-Pathway synthetisiert werden (siehe Kapitel 2.1.4.).

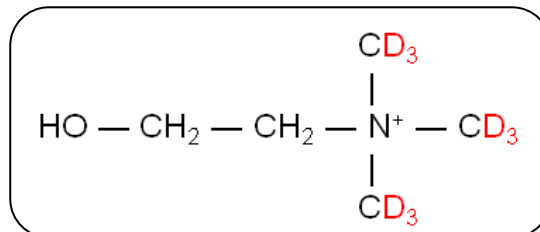


Abbildung 2: Strukturformel von deuteriertem Cholin

[Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin ist nicht radioaktiv, weil Deuterium ein stabiles Isotop ist. Es ist daher für den Menschen ungefährlich. Da Plasma-Cholin eine sehr kurze Halbwertszeit (ca. ½ h) hat, stellt dieser Ansatz einen „pulse-chase“-Versuch bei Menschen *in vivo* dar [6]. Bei einem „pulse-chase“-Versuch wird über eine kurze Zeitdauer eine markierte Testsubstanz appliziert, die mit einem metabolischen Pathway interagiert und nach Beendigung ihrer Zufuhr rasch aus dem Blutplasma entfernt sowie durch unmarkierte Komponenten ersetzt wird. Somit kann nach Beladung des Organismus die Untersuchung der Stoffwechselkinetik durchgeführt werden. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3 (Ende

## 1. Einleitung

der Infusion), 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Infusionsbeginn wurden dazu den Studienteilnehmern je 2 ml EDTA-Blut entnommen. Daraus wurde durch Zentrifugation das Blutplasma zur weiteren Analyse gewonnen.

Es wurde unmarkiertes, endogenes Cholin, Betain und Phosphocholin und die Kinetiken ihrer deuteriummarkierten Derivate mittels Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) untersucht. Die Analytik nativer Phospholipide und Triglyceride des Plasmas erfolgte zunächst durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC) als Standardverfahren zur Bestimmung der Äquilibrium-Konzentrationen und Zusammensetzung unmarkierter Einzelanalyte. Zudem wurden die endogenen PC-Spezies mittels ESI-MS/MS gemessen, um die Ergebnisse mit der HPLC-Analytik zu vergleichen. Zusätzlich wurden die neu synthetisierten PC-Spezies aus beiden hepatischen Stoffwechselwegen massenspektrometrisch bestimmt, um die Spezifität der Stoffwechselwege für die jeweiligen molekularen Spezies von PC und pathologische Veränderungen bei CF zu quantifizieren.

In dieser Dissertation werden der Phosphatidylcholinstoffwechsel und die Lipidhomöostase der Leber bei Zystischer Fibrose untersucht. Aus ihren Veränderungen sollen wichtige Erkenntnisse zur Optimierung der Therapie bei CF-Patienten entwickelt werden, die vor allem in Hinblick auf die steigende Lebenserwartung der CF-Patienten und die dadurch zunehmende Leberproblematik bei Zystischer Fibrose eine große Bedeutung haben.

Im folgenden Kapitel 2 werden zunächst die Grundlagen des Stoffwechsels der Phospholipide und Triglyceride, die daraus abgeleitete Analytik der beteiligten Stoffwechselwege mit [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin und das Krankheitsbild Mukoviszidose besprochen.



## 2. Grundlagen

Glycerophospholipide haben zusammen mit den Sphingolipiden eine überaus bedeutende Funktion bei dem Aufbau zellulärer Membranen, die die Grundvoraussetzung zur Lebensfähigkeit aller Spezies darstellt. Ihre amphiphilen Eigenschaften (s.u.) ermöglichen es Doppelmembransichten für die subzelluläre Kompartimentierung auszubilden. Weitere wichtige Funktionen der Phospholipide sind jedoch in verschiedensten Sekreten zu finden. Dazu gehört die Emulgierung von Nahrungsfetten durch die Galle, ohne die der Zugriff von Lipasen und die Aufnahme aus dem Darm nicht möglich sind. Der Export der Triglyceride aus Leber und Darm erfolgt in Form von Lipoproteinen (VLDL und Chylomikronen), die neben definierten Proteinen immer auch eine Außenhülle aus PC enthalten müssen. Ebenso wichtig sind Phospholipide für die Stabilität der Lungenalveolen und kleinen Atemwege als Surfactant, wo sich PC-Komponenten an der Gas-Flüssigkeitsgrenze anlagern und die Oberflächenspannung von ca. 70 mN/m auf  $< 5$  mN/m erniedrigen [39, 40]. Zudem leiten sich aus Phospholipiden biologisch aktive Moleküle ab, die als Signal- und Gewebshormone dienen.

### 2.1. Phospholipide

Phospholipide sind Moleküle mit einem hydrophilen und einem hydrophoben Teil und damit „amphiphil“. Der hydrophobe (apolare) Teil des Moleküls wird durch Fettsäurereste oder auch langkettige Alkohole gebildet. Die sogenannte hydrophile Kopfgruppe kann von verschiedenen, polaren geladenen oder ungeladenen Gruppen gebildet werden, die als Phosphodiester an den Glycerinrest mit seinen zwei Acylresten gebunden sind. Alle Glycerophospholipide tragen durch die Phosphatgruppe eine negative Ladung. Die Ladung der Kopfgruppe definiert, ob sie zwitterionische (neutrale) oder anionische (negativ geladene) Phospholipide sind (siehe Abb. 4 und 5).

Die amphiphile Eigenschaft bewirkt, dass Phospholipide in polaren Lösungsmitteln wie Wasser Mizellen oder Lipiddoppelschichten (Liposomen) bilden. Durch die Ausbildung von Lipiddoppelschichten sind Phospholipide die Grundvoraussetzung für Biomembranen, die den Inhalt der Zelle und ihrer

## 2. Grundlagen

Organellen gegenüber der Umgebung abgrenzen [41]. Die Phospholipide sind mit ihrer ganz unterschiedlichen molekularen Zusammensetzung in hydrophiler Kopfgruppe und Fettsäuren charakteristisch auf Organe verteilt [5-7]. Sie nehmen in den einzelnen Organen spezifische strukturelle, funktionelle und regulatorische Funktionen ein, so als oberflächenspannungsreduzierender pulmonaler Surfactant [42-44], Emulgator in der Galle, um das gallensäure- und cholesterinhaltige ternäre Gemisch zu stabilisieren, sowie als Lipoproteinbaustein, da ohne amphiphile Phosphatidylcholin-Hülle die hepatischen Triglyceride nicht exportiert werden können.

### 2.1.1. Systematik und Struktur der Phospholipide

Bei den Phospholipiden werden die Sphingolipide von den Glycerophospholipiden unterschieden. Die Sphingolipide besitzen als Grundbaustein den Aminodialkohol Sphingosin. Über Verknüpfung der Aminogruppe des Sphingosins mit einer Fettsäure entsteht das einfachste Sphingolipid Ceramid (Abb. 3). Hieraus leiten sich die weitere Sphingolipide wie die Sphingomyeline, Cerebroside oder Ganglioside ab.

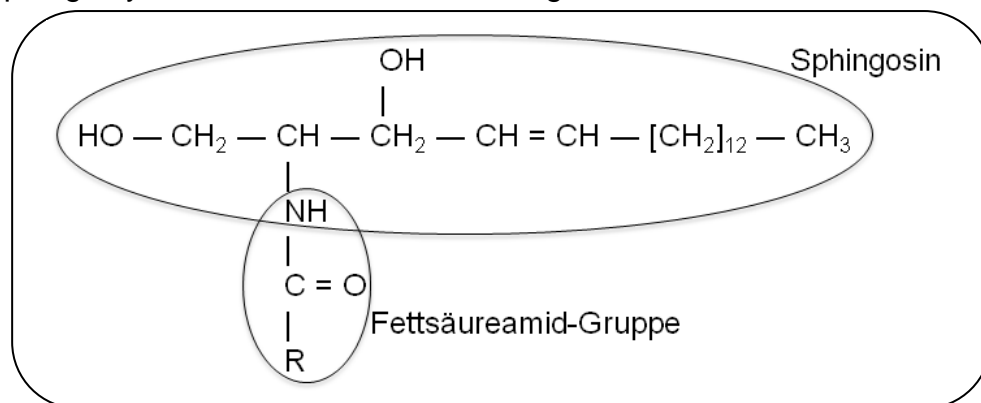


Abbildung 3: Strukturformel des Ceramids  
Ceramid hat Sphingosin als Grundgerüst und eine Fettsäure (R) in Esterbindung

Die Glycerophospholipide (Abb. 4) haben den dreiwertigen Alkohol Glycerin als Grundgerüst. Die C1- und C2- Hydroxylgruppe des Glycerins sind mit jeweils einer Fettsäure und die C3- Hydroxylgruppe mit einem ortho-Phosphorsäure-Rest verestert. In Position 1 kann jedoch auch ein Fettalkohol in Etherbindung vorliegen. Auf diesem Wege unterscheidet man Diacyl- von Alkylacyl-Phospholipiden.

## 2. Grundlagen

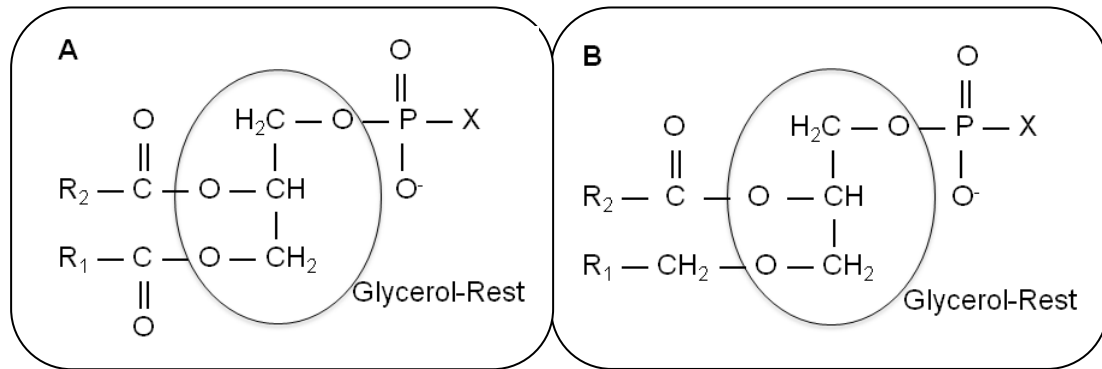


Abbildung 4: Strukturformel eines Glycerophospholipids

X ist die polare Kopfgruppe in Esterbindung

A: Diacyl-Phospholipid: R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>: Fettsäuren in Esterbindung

B: Alkylacyl-Phospholipid: R<sub>1</sub>: Fettalkohole in Etherbindung, R<sub>2</sub>: Fettsäuren in Esterbindung

Das einfachste Glycerophospholipid ist die Phosphatidsäure (Abb. 5), bei der kein Alkohol an den Phosphatrest gebunden ist. Ist der Phosphatrest der Phosphatidsäure mit einem weiteren Alkohol wie Cholin, Ethanolamin, Serin, Glycerol oder Inositol verknüpft, entstehen Phosphorsäurediester. Diese Kopfgruppe des Phospholipids definiert die Zugehörigkeit zu einer Phospholipidklasse. Zudem ist sie für die Ladung des Phospholipids verantwortlich. Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin sind Zwitterionen und somit insgesamt elektrisch neutral. Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol und Phosphatidsäure hingegen sind anionische Phospholipide.

Phosphatidylcholin (PC) ist das häufigste Phospholipid.

Phospholipidklasse	Kopfgruppe X
Phosphatidsäure	R — OH Wasserstoffrest
Phosphatidylcholin (PC)	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  \text{R} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N}^+ - \text{CH}_3 \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $ Cholin-Rest
Phosphatidylethanolamin (PE)	R — O — CH <sub>2</sub> — CH <sub>2</sub> — N <sup>+</sup> H <sub>3</sub> Ethanolamin-Rest
Phosphatidylglycerol (PG)	$  \begin{array}{c}  \text{OH} \quad \text{OH} \\    \quad   \\  \text{R} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2  \end{array}  $ Glycerin-Rest
Phosphatidylserin (PS)	$  \begin{array}{c}  \text{COO}^- \\    \\  \text{R} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{N}_2\text{H}  \end{array}  $ Serin-Rest

## 2. Grundlagen

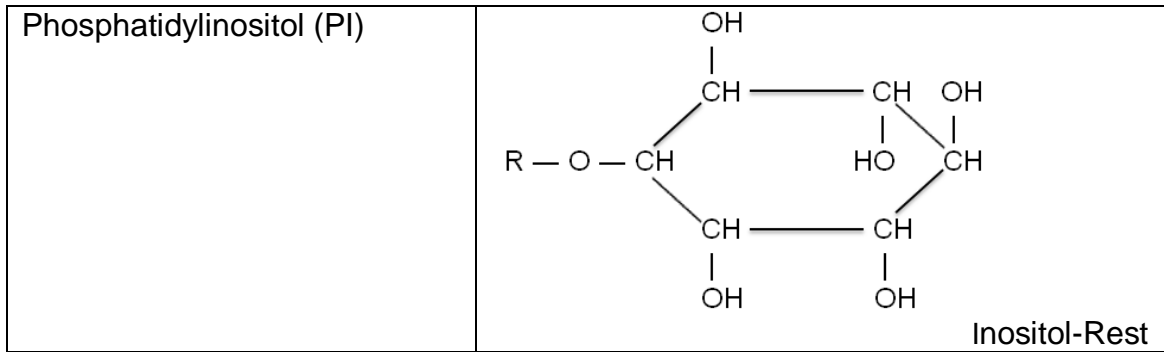


Abbildung 5: Phospholipide (R) mit den jeweiligen Kopfgruppen  
Phosphatidsäure, Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol (PI).

Die Phospholipide unterscheiden sich nicht nur in der Kopfgruppe, sondern auch in den Fettsäure- bzw. Fettalkoholresten, die bei den Glycerophospholipiden an die Positionen C1 und C2 gebunden sind. Dadurch differenziert man innerhalb der durch die Kopfgruppe definierten PL-Klassen die sog. molekularen Spezies.

### 2.1.1.1. Systematik und Struktur der Fettsäuren

Fettsäuren sind in der Regel geradzahlige Monocarbonsäuren, die aus einer Carboxylgruppe und einer unterschiedlich langen, meist unverzweigten Kohlenwasserstoffkette bestehen. In der Kohlenwasserstoffkette können eine oder mehrere Doppelbindungen vorkommen (ungesättigte Fettsäuren). Durch die Doppelbindungen wird die räumliche Anordnung der Kohlenwasserstoffkette festgelegt. Liegen zwei Substituenten auf der gleichen Seite der Doppelbindung spricht man von cis-Konfiguration, anderenfalls von trans-Konfiguration. Die in der Natur vorkommenden Fettsäuren liegen vorwiegend in cis-Anordnung vor. Zudem können Doppelbindungen an unterschiedlichen Positionen der Kohlenwasserstoffkette vorkommen. Relativ häufig liegt eine an Position  $\Delta^9$ , d.h. zwischen C-Atom 9 und 10 einer Fettsäure.

In der folgenden Abbildung 6 sind die für diese Dissertation relevanten Fettsäuren aufgeführt. Zudem sind für die Öl- und Linolsäure beispielhaft die Strukturformeln dargestellt. Sie sind beide 18 C-Atome lang, weisen jedoch eine unterschiedliche Anzahl an Doppelbindungen an verschiedenen Positionen auf.

## 2. Grundlagen

Trivialname	Chemischer Name/ Strukturformel	Zahl der C-Atome : Doppelbindungen
Caprylsäure	Octansäure	8 : 0
Caprinsäure	Decansäure	10 : 0
Laurinsäure	Dodecansäure	12 : 0
Myristinsäure	Tetradecansäure	14 : 0
Palmitinsäure	Hexadecansäure	16 : 0
Stearinsäure	Octadecansäure	18 : 0
Arachinsäure	Eicosansäure	20 : 0
Behensäure	Docosansäure	22 : 0
Palmitoleinsäure	Cis- $\Delta^9$ -Hexadecensäure	16 : 1
Ölsäure	Cis- $\Delta^9$ -Octadecensäure $\text{HOOC} - [\text{CH}_2]_7 - \text{CH} = \text{CH} - [\text{CH}_2]_7 - \text{CH}_3$ <small>1 9 18</small>	18 : 1
Linolsäure	All-Cis- $\Delta^{9,12}$ -Octadecadiensäure $\text{HOOC} - [\text{CH}_2]_7 - \text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} - [\text{CH}_2]_4 - \text{CH}_3$ <small>1 9 12 18</small>	18 : 2
Arachidonsäure	All-Cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäuren	20 : 4
Timnodonsäure	All-Cis- $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eicosapentaensäure (EPA)	20 : 5
Clupanodonsäure	All-Cis- $\Delta^{7,10,13,16,19}$ -Docosapentaensäure	22 : 5
Cervonsäure	All-Cis- $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -Docosahexaensäure (DHA)	22 : 6

Abbildung 6: Fettsäuren mit ihrem Trivial- und chemischen Namen

Strukturformeln von Öl- und Linolsäure: Die Positionen der Doppelbindungen sind mit roten Nummern markiert.

### 2.1.1.2. Synthese von Fettsäuren

Die Biosynthese gesättigter Fettsäuren (Abb. 7) findet an einem Multienzymkomplex, der Fettsäuresynthase, statt. Die Fettsäuresynthase besitzt 2 Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen), eine zentrale und eine periphere. Zuerst wird Acetyl-CoA an die zentrale SH-Gruppe der Fettsäuresynthase gebunden und auf die periphere SH-Gruppe übertragen. Danach wird Malonyl-CoA, das durch Carboxylierung aus Acetyl-CoA entsteht, an die freie zentrale SH-Gruppe gebunden. Im nächsten Reaktionsschritt erfolgt die Kondensation des Acetylrests mit dem Malonyl-Rest. Durch Reduktion, Dehydratisierung und weitere Reduktion des Acetacetylrests entsteht ein um zwei C-Atome

## 2. Grundlagen

verlängerter Acylrest, der an die zentrale Sulfhydrylgruppe des Fettsäuresynthase gebunden ist. Die weitere Verlängerung der Acylkette erfolgt durch erneute Verknüpfung mit Malonyl-CoA, bis eine Abspaltung der Acylkette von der Fettsäuresynthase durch das Enzym Thioesterase (EC 3.1.2.23) erfolgt. Hierdurch werden Fettsäuren mit einer geraden Anzahl an C-Atomen gebildet. Sie sind meist bis 18 C-Atome lang.

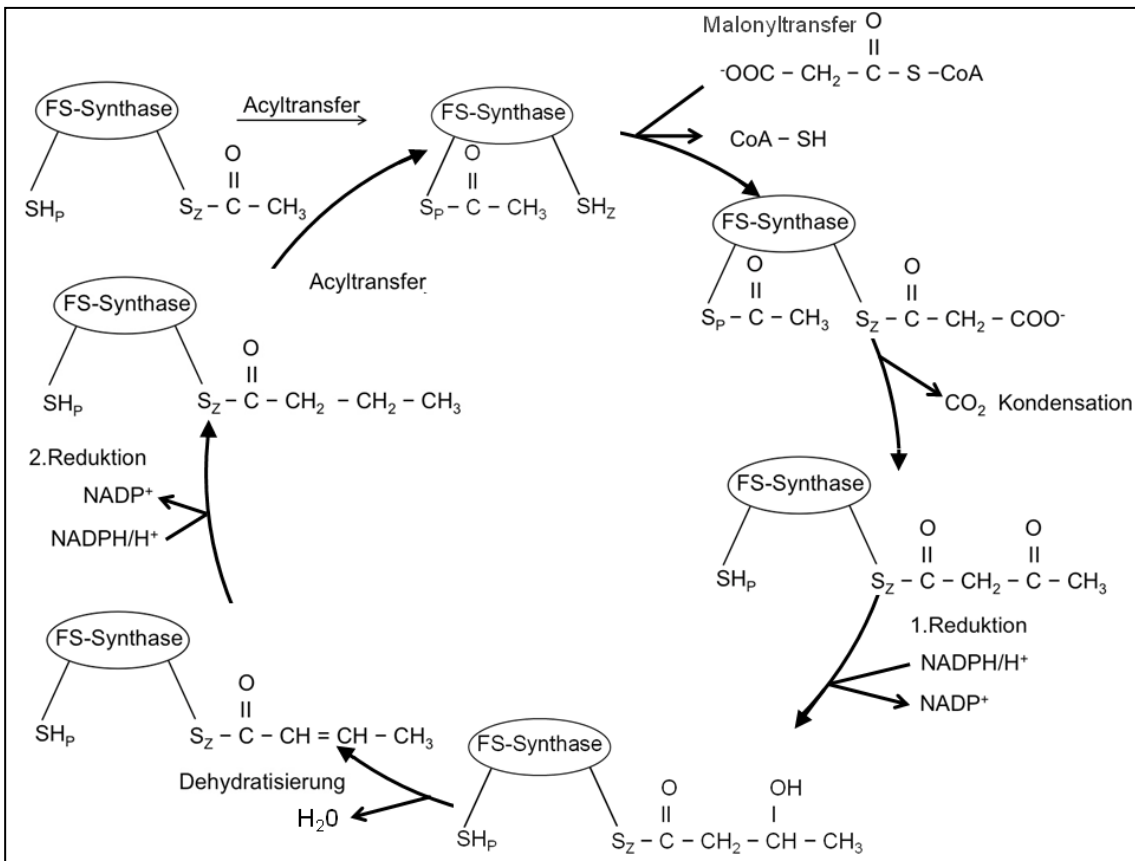


Abbildung 7: Fettsäuresynthese

FS-Synthase = Fettsäure-Synthase (EC 2.1.3.85); SH<sub>P</sub>/SH<sub>Z</sub> = periphere/ zentrale Sulfhydrylgruppe; NADPH/H<sup>+</sup>/ NADP<sup>+</sup>: reduzierten/ oxidierte Form des Nicotinamidadenindinukleotidphosphats.

Im menschlichen Organismus können nur zum Teil ungesättigte Fettsäuren hergestellt werden. Die Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren, deren Doppelbindungen mehr als 9 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt sind, ist nicht möglich. Dafür fehlen die benötigten Enzyme. Da diese Fettsäuren jedoch eine wichtige Rolle spielen, müssen sie mit der Nahrung zugeführt werden. Sie werden als essentielle Fettsäuren bezeichnet (z.B. Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure). In diese Fettsäuren können durch spezielle Desaturasen noch weitere

## 2. Grundlagen

Doppelbindungen eingefügt werden. So kann aus Linolsäure bzw. Linolensäure Arachidonsäure gebildet werden. Genauso kann die Bildung von Ölsäure (cis- $\Delta^9$ -C18:1) durch Einführung einer Doppelbindung in Stearinsäure (C18:0) erfolgen.

### 2.1.2. Phospholipidmetabolismus

Phospholipide (PL) bestimmen mit ihren spezifischen Eigenschaften und molekularen Unterschieden in Ladung, Fettsäurezusammensetzung und Fettsäureposition Membraneigenschaften wie die Fluidität, Oberflächenspannung, Raftbildung etc. Außerdem spielen PL eine bedeutende Rolle als Mediatoren in der Signaltransduktion. Dabei ist unter anderem bei Phosphatidylinositol von Bedeutung, dass daraus Inositol-1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol abgespalten wird. Aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin wird via Phospholipase A<sub>2</sub> Arachidonsäure und Dokosahexaensäure abgespalten, woraus Eicosanoide und Resolvine gebildet werden. Diese Mediatoren spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen [45, 46].

Zudem spielen die Phospholipide eine wichtige Rolle bei der Aufnahme, dem Transport und der Verteilung von Lipiden. Die exogenen Lipide aus der Nahrung werden im Darm durch Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipide emulgiert und über Pankreaslipasen u.a. Triglyceridlipasen, Phospholipasen und Cholesterinesterasen gespalten. Daraus entstehen Mizellen, bei denen die Triacylglyceride (TAG), Diacylglyceride (DAG), Monoacylglyceride (MAG) und Fettsäuren von Phospholipiden, Cholesterin und Gallensalzen umgeben sind. Sie werden von den Enterozyten resorbiert. Kurzkettige Fettsäuren und Glycerin liegen frei vor und können spontan oder über Transporter in die Enterozyten aufgenommen werden. In den Enterozyten erfolgt die Resynthese der TAG und des PC, aus denen zusammen mit Cholesterin und Proteinen die Chylomikronen gebildet werden [47]. Chylomikronen gehören zu den Lipoproteinen. Die Lipoproteine sind Komplexe aus Proteinen und Lipiden des Blutplasmas, deren Funktion es ist, hydrophobe Lipide im Blut zu transportieren

## 2. Grundlagen

[48, 49]. Man unterscheidet 5 Klassen von Lipoproteinen, die sich in Funktion und Zusammensetzung unterscheiden [4]:

Tabelle 4: Lipoproteinklassen [4]

VLDL = very low density lipoprotein, IDL = intermediate density lipoprotein, LDL = low density lipoprotein, HDL = high density lipoprotein; TAG = Triacylglycerin, PL = Phospholipide

Lipoproteinklasse	Funktion	Apolipoprotein	Inhalt
Chylomikronen	Transport der Nahrungslipide	ApoB-48 ApoC-II ApoE	TAG: 80 – 95 % Cholesterin: 2 – 7 % <b>PL: 3 – 9 %</b> Proteine: 1 %
VLDL	Transport der Lipide von der Leber in die Peripherie	ApoB-100 ApoC-II	TAG: 55 – 80 % Cholesterin: 5 – 15 % <b>PL: 10 – 20 %</b> Proteine: 10 %
IDL	Abbauprodukt des VLDL	ApoB-100	TAG: 20 – 50 % Cholesterin: 20 – 40 % <b>PL: 15 – 25 %</b>
LDL	Abbauprodukt des IDL, Transport von Cholesterin in die Peripherie	ApoB-100	TAG: 5 – 15 % Cholesterin: 40 – 50 % <b>PL: 20 – 25 %</b> Proteine: 20 %
HDL	Cholesterintransport aus der Peripherie zur Leber	ApoA-I ApoE	TAG: 5 – 10 % Cholesterin: 15 – 25 % <b>PL: 20 – 30 %</b> Proteine: 50 %

Die Chylomikronen werden in die Lymphe abgegeben, gelangen ins Blut und werden zu den Zielgeweben transportiert. Dort werden die TAG freigesetzt und vor allem im Fettgewebe gespeichert [50]. Ein Teil der TAG gelangt aus den Adipozyten via HDL in die Leber. Freie Fettsäuren kurzer bis mittlerer Kettenlänge werden von den Enterozyten zum Teil direkt ins Blut, d.h. in den Portalkreislauf abgegeben. Der Hauptteil der freien Fettsäuren wird dabei an Albumin gebunden zur Leber transportiert. Bei Ratten finden sich C12:0 und C14:0 in den Chylomikronen [51].

In der Leber werden endogene Lipoproteine aus Fettsäuren (Kap. 2.1.1.1.), Phospholipiden (Kap. 2.1.2.), Triacylglyceriden (Kap. 2.2.) etc. gebildet. Vor allem über die VLDL werden die endogenen Lipide in die Peripherie transportiert [52]. Dadurch erfolgt auch die Versorgung der extrahepatischen



## 2. Grundlagen

Organe mit Cholin und essentiellen Fettsäuren, insbesondere polyunsaturierten Fettsäuren (wie C20:4 und C22:6) [31].

Die besondere Bedeutung der Leber für die Phospholipid-Versorgung der peripheren Organe konnte in Tierexperimenten und am Menschen gezeigt werden [7]. Die Synthese und Sekretion von PC-Spezies mit polyunsaturierten Fettsäuren durch die mütterliche Leber ist während der Neuritogenese bei Ratten- und Meerschweinchenfeten erhöht [53-55]. Vor allem Dokosahexaensäure (C22:6) spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung von Neugeborenen [56, 57]. Zudem ist Dokosahexaensäure essentiell für eine optimale Gewebefunktion [58] und eine wichtige Membrankomponente, vor allem der Nerven und Retina [59, 60]. Aus C22:6 entstehen zudem sog. Resolvine, die Entzündungsreaktionen terminieren [45]. Arachidonsäure-haltige Phospholipide werden in den Organen besonders für die Synthese von Eikosanoiden benötigt. Über die Phospholipase A<sub>2</sub> wird Arachidonsäure freigesetzt [61]. Diese langkettige Fettsäure spielt eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen, bei der Thrombozytenaggregation und als Gewebshormon [62].

### **2.1.3. Störung des Phospholipidmetabolismus**

Zu einer Störung der PC-Homöostase kommt es bei verschiedenen Lebererkrankungen, wie z.B. bei Steatohepatitis, Leberzirrhose oder hepatozellulärem Karzinom [22, 63] oder bei Cholinmangel im Rahmen der Mukoviszidose oder einer total parenteralen Ernährung [16, 25]. Durch die Störung der PC-Synthese wird die Lipoproteinzusammensetzung der Leber verändert und der Export von Triglyceriden und Phospholipiden aus der Leber herabgesetzt. Dadurch ist die Konzentrationen von Phosphatidylcholinen im Plasma vermindert und die Versorgung der peripheren Gewebe mit polyunsaturierten Fettsäuren und Cholin gestört [64].

### 2.1.4. Synthese der Phosphatidylcholine

Die Synthese der Phosphatidylcholine geschieht prinzipiell über drei Stoffwechselwege, d.h. die Neusynthese via CDP-Cholin- (Kennedy-) Pathway aus Diacylglycerol, der Deacylierungs-Reacylierungs- (Lands-) Zyklus zur sekundären Modifikation der FS-Zusammensetzung und der Methylierungspathway via PEMT, bei dem Phosphatidylcholin aus vorwiegend polyunsaturiertem Phosphatidylethanolamin entsteht [7, 14]. Neusynthese und Lands-Zyklus können in allen Organen stattfinden, wohingegen die Synthese über schrittweise Methylierung vorwiegend in der Leber zu finden ist [16]. Begrenzt konnte eine PEMT-Aktivität auch in laktierender sowie nicht-laktierender Mamma und im ZNS, vor allem in der Neonatalperiode der Ratten, nachgewiesen werden [17, 18, 65].

#### 2.1.4.1. Synthese von Phosphatidsäure

Zur Synthese der Phospholipide wird Phosphatidsäure benötigt, dessen Glycerolkern aus dem Kohlenhydratstoffwechsel entspringt. Aus Glucose wird über die Glycolyse  $\alpha$ -Glycerophosphat (Glycerin-3-Phosphat) gebildet (Abb. 8). Dann werden 2 Hydroxylgruppen des  $\alpha$ -Glycerophosphats mit 2 Fettsäuren aus Acyl-CoA verestert und es entsteht Phosphatidsäure (1,2-Diacylglycerol-3-phosphat). In einem Nebenweg in Niere, Leber, Darm und laktierender Mamma kann auch Glycerin durch die Glycerokinase zu  $\alpha$ -Glycerophosphat phosphoryliert werden.

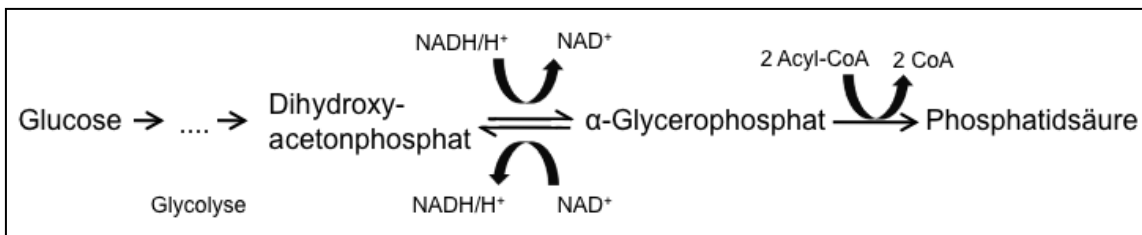


Abbildung 8: Synthese von Phosphatidsäure

NAD<sup>+</sup>/ NADH/H<sup>+</sup> = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid oxidierte/ reduzierte Form

Phosphatidsäure stellt die Schnittstelle der Phospholipid- und Triglycerid-Synthese dar (Abb. 9). Nach Abspaltung des organischen Phosphats entsteht 1,2-Diacylglycerol (DAG) zur Synthese der Phospholipide PC, PE und PS sowie der Triacylglyceride (TAG) (s. Kap. 2.2.1.). Die anionischen Phospholipide PG

## 2. Grundlagen

und PI hingegen werden aus Phosphatidsäure über CDP-Diacylglycerol (CDP-DAG) gebildet.

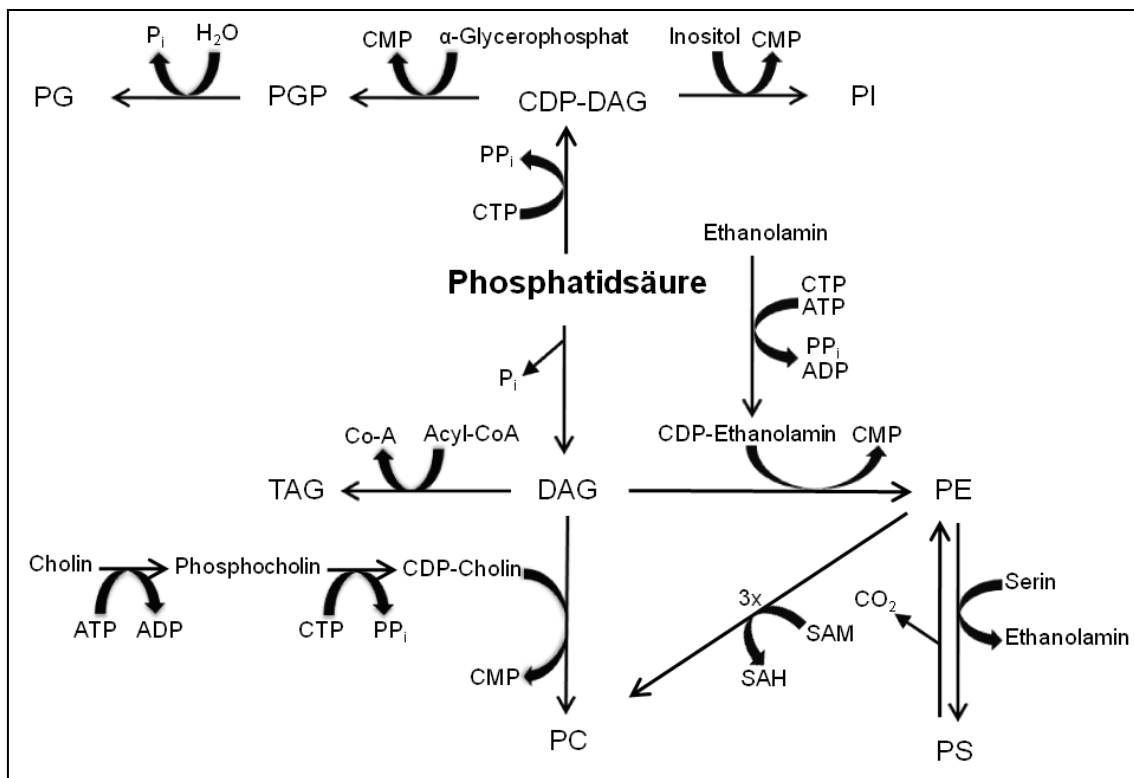


Abbildung 9: PL- und TAG-Synthese

Phosphatidsäure spielt eine zentrale Rolle bei der Synthese von Triacylglyceriden (TAG) und Phospholipiden (PL): PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin, PS = Phosphatidylserin, PG = Phosphatidylglycerol, PI = Phosphatidylinositol.

PGP = Phosphatidylglycerophosphat, CDP-DAG = Cytidindiphosphat-Diacylglycerol, CMP = Cytidinmonophosphat, CTP = Cytidintriphosphat, PP<sub>i</sub>/P<sub>i</sub> = organisches Phosphat, DAG = Diacylglycerol, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, CO<sub>2</sub> = Kohlenstoffdioxid, SAM = S-Adenosylmethionin, SAH = S-Adenosylhomozystein, Co-A = Coenzym A

### 2.1.4.2. Cholin-Synthese

Der tägliche Cholinbedarf des Menschen beträgt ca. 8 mg/ kg Körpergewicht [24]. Er wird hauptsächlich durch die Aufnahme von Phosphatidylcholin aus der Nahrung gedeckt. Cholin ist ein wichtiger Methylgruppendonator und essentiell für die Synthese von Phospholipiden [66]. Cholin kann in der Leber indirekt aus Ethanolamin via PEMT-Pathway und anschließender PC-Spaltung gebildet werden. Diese Synthese reicht aber nicht zur Versorgung aus, insbesondere bei niedriger Aktivität des PEMT-Pathways (s.u.) und Mangel an Methylgruppen-Donatoren. Keine tierische Zelle kann Cholin direkt synthetisieren. Deshalb ist Cholin ein essentieller Nährstoff [25, 67].

### 2.1.4.3. De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin

Bei der Neusynthese von Phosphatidylcholin wird Phosphocholin mit Diacylglycerol (DAG) verknüpft. Die Synthese von Phosphatidylethanolamin verläuft analog mit Ethanolamin statt Cholin.

Als erster Schritt wird Cholin durch die ATP-abhängige Cholinkinase zu Phosphocholin aktiviert (Abb. 10). Dann reagiert Phosphocholin mit Cytidintriphosphat (CTP) unter Pyrophosphatabspaltung zu CDP-Cholin (Cytidylyl-diphospho-cholin). Anschließend erfolgt die Verknüpfung der Phosphocholingruppe des CDP-Cholins mit Diacylglycerol unter CMP-Abspaltung zu Phosphatidylcholin [9].

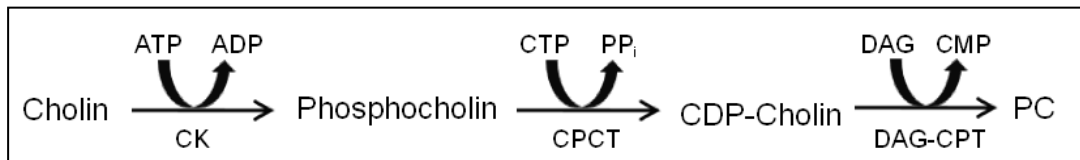


Abbildung 10: Kennedy-Pathway

De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin (PC) via Cholin-Einbau: CK = Cholinkinase (EC 2.7.1.32), CPCT = Cholinphosphatcytidyl-Transferase (EC 2.7.7.15), DAG-CPT = Diacylglycerol-Cholinphosphotransferase (EC 2.7.8.2); ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, CTP = Cytidintriphosphat, CMP = Cytidinmonophosphat, PP<sub>i</sub> = organisches Phosphat; DAG = Diacylglycerol, PC = Phosphatidylcholin.

### 2.1.4.4. Lands-Zyklus

Über 50 % des neu synthetisierten Phosphatidylcholins wird über den Lands-Zyklus weiter umgebaut [11]. Dies geschieht über Deacylierungs- und Reacylierungsreaktionen der Fettsäurereste des PCs, die über die Enzyme Phospholipase A<sub>2</sub> und Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase (LPCAT) katalysiert werden [68, 69]. Der Fettsäurerest in Position sn-2 des Glycerols wird gegen einen anderen Fettsäurerest ausgetauscht und es entstehen PC-Spezies mit einem charakteristischen Pattern der jeweiligen Organe (s. Tab. 3 in Kap. 1). Beispielsweise entsteht in der Lunge aus 1-Palmitoyl-2-oleoyl- oder -2-linoleoyl-PC großenteils via Lands-Zyklus 1,2-Dipalmitoyl-PC, das vorherrschende PC des Surfactants [12, 70] (Abb. 11).

## 2. Grundlagen

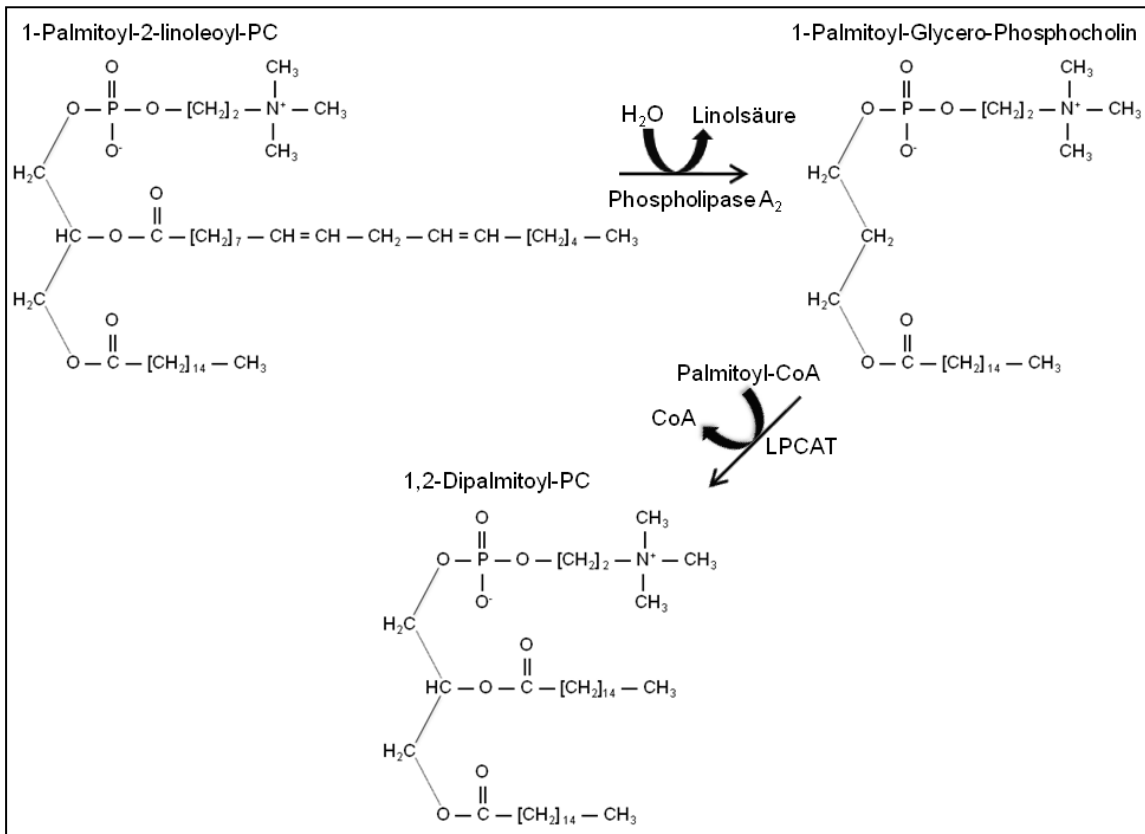


Abbildung 11: Lands-Zyklus

Lands-Zyklus am Beispiel des 1-Palmitoyl-2-linoleoyl-PCs (PC16:0/18:2) zu 1,2-Dipalmitoyl-PCs (PC16:0/16:0) über das Zwischenprodukt 1-Palmitoyl-Glycerophosphocholin. Phospholipase A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4), LPCAT (Lysophosphatidylcholin-Acyltransferase, EC 2.3.1.23).

### 2.1.4.5. PEMT-Pathway

Phosphatidylcholin (PC) kann auch in der Leber über Umwandlungsreaktionen aus Phosphatidylethanolamin (PE) entstehen. Dabei erfolgen nacheinander drei Methylierungsreaktionen am Aminostickstoff von PE (Abb. 12). Die Methylgruppen werden aus S-Adenosylmethionin (SAM) übertragen, wodurch S-Adenosylhomozystein (SAH) entsteht. Diese Reaktionsschritte finden über die PE-N-Methyltransferase (PEMT) statt [14].

## 2. Grundlagen

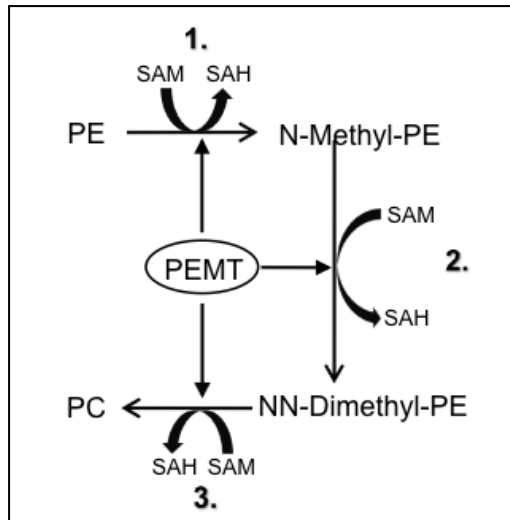


Abbildung 12: PEMT-Pathway

PC-Synthese via schrittweise Methylierung von Phosphatidylethanolamin (PE) durch PE-N-Methyltransferase = PEMT (EC 2.1.1.17), SAM = S-Adenosylmethionin, SAH = S-Adenosylhomozystein

S-Adenosylhomozystein wird dann in einem Kreislauf zu S-Adenosylmethionin regeneriert [71] (Abb. 13).

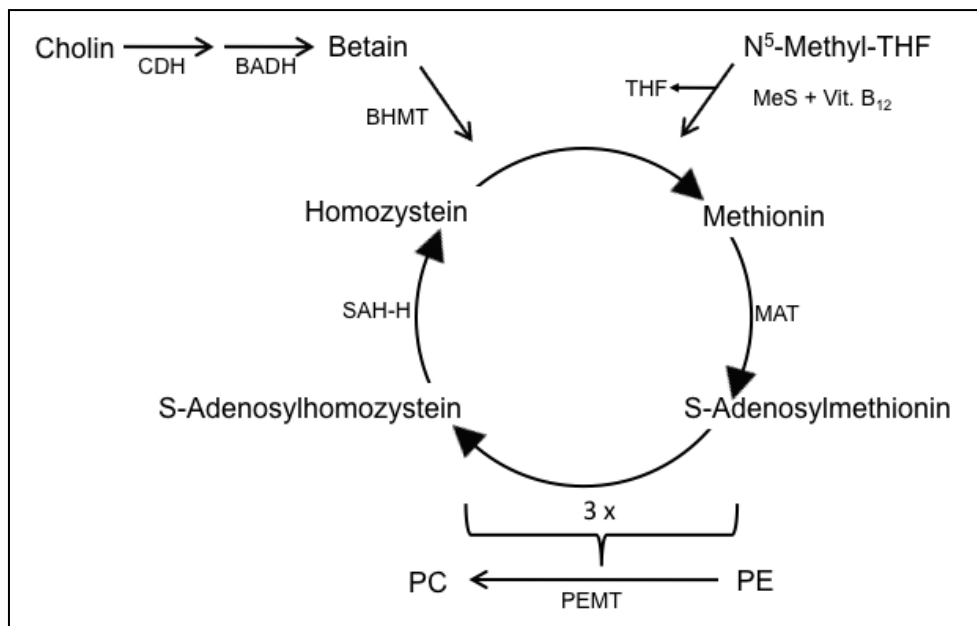


Abbildung 13: Homozystein-Methionin-Stoffwechselweg

Methylgruppen-Übertragung aus Cholin: CDH = Cholindehydrogenase (EC 1.1.99.1), BADH = Betainaldehyd-Dehydrogenase (EC 1.2.1.8); BHMT = Betain-Homozystein-Methyltransferase (EC 2.1.1.5)

Alternative: Methylgruppen-Übertragung aus N<sup>5</sup>-Methyl-THF: N<sup>5</sup>-Methyl-THF = N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolsäure, THF = Tetrahydrofolsäure, MeS = Methioninsynthese (EC 2.1.1.13); Vit. B<sub>12</sub> = Vitamin B<sub>12</sub> = Methylcobalamin

MAT = Methionin-Adenosyltransferase (EC 2.5.1.6), PEMT = Phosphatidylethanolamin-N-Methyltransferase (EC 2.1.1.17), SAH-H = S-Adenosylhomozystein-Hydrolase (EC 3.3.1.1)

PC = Phosphatidylcholin, PE = Phosphatidylethanolamin

## 2. Grundlagen

Im ersten Schritt wird aus S-Adenosylhomozystein durch die S-Adenosylhomozystein-Hydrolase (SAH-H) Homozystein gebildet. Auf Homozystein wird eine Methylgruppe übertragen. Diese Methylgruppe kann aus Cholin stammen, das zunächst zu Betain oxidiert wird. Über die Betain-Homozystein-Methyltransferase (BHMT) entsteht damit Methionin. Es kann jedoch auch eine Methylgruppe aus N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolsäure mit Hilfe des Cofaktors Methylcobalamin (aktive Form von Vitamin B<sub>12</sub>) via Methioninsynthase zur Bildung von Methionin verwendet werden. Damit besteht eine enge Beziehung zwischen dem Cholinstoffwechsel und dem Stoffwechsel von Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>.

Schließlich wird aus Methionin durch die Methionin-Adenosyltransferase (MAT) S-Adosylmethionin (SAM) resynthetisiert, das dann wiederum für weitere Methylierungsreaktionen zur Verfügung steht. S-Adosylmethionin wird als Cofaktor bei mehr als 40 Methylierungsreaktionen benötigt. Im Folgenden sind einige Beispiele aufgeführt:

- Methylierung von Ethanolamin zu Cholin [14]
- Methylierung von Noradrenalin und Adrenalin [72]
- Methylierung von Guanidinoacetat zu Creatin [73]
- Methylierung von DNA und RNA [74] etc.

Im Rahmen des Cholinmangels bei Zystischer Fibrose besteht ein Mangel an Methylgruppen aus Cholin, sodass verminderte SAM regeneriert werden kann. Dadurch kommt es unter anderem auch zu einer Störung der Creatinsynthese, was zu einer gestörten Muskelfunktion sowie zu einer Erhöhung der Creatinkinase führt [75].

### **2.1.5. Stabile Isotopenmarkierung von Cholin**

Um die Synthesewege der hepatischen, ins Blut sezernierten Phosphatidylcholin-Spezies zu differenzieren, wurde in der durchgeführten Studie eine Markierung mit [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin (verabreicht als Chlorid-Salz) vorgenommen. Dabei sind die Wasserstoffatome der 3 Methylgruppen des

## 2. Grundlagen

Cholins durch Deuterium ersetzt. Dadurch ist die Masse des [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin um 9 Dalton größer als bei nativem Cholin.

Wird nun eine PC-Spezies via direkten Einbau von Cholin (Kennedy-Pathway) gebildet, entsteht ein Phosphatidylcholin mit einer ebenfalls 9 Da größeren Masse (Abb. 14).

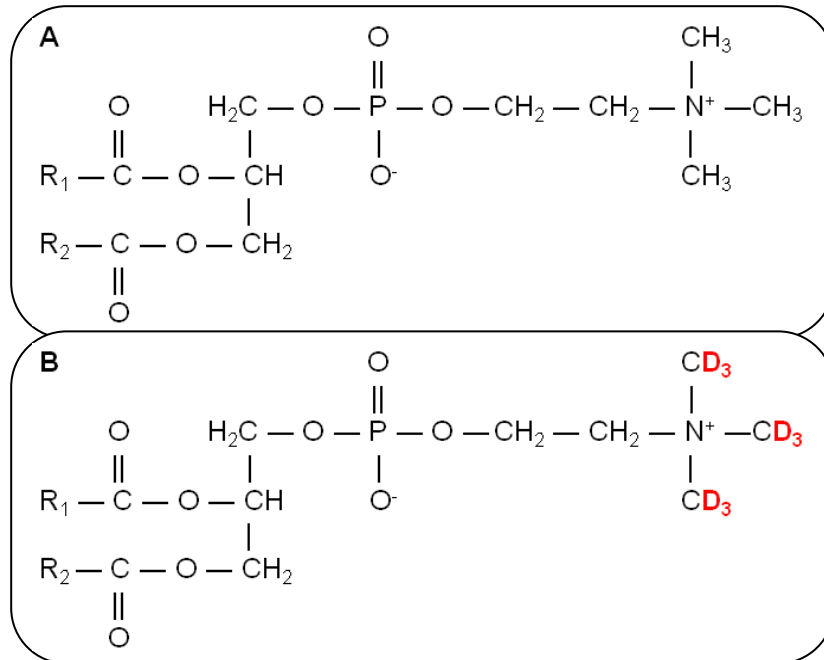


Abbildung 14: Strukturformel von Phosphatidylcholin

A: Endogenes Phosphatidylcholin

B: Markiertes Phosphatidylcholin mit 3 Deuteriumatomen

R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>: Fettsäuren in Esterbindung oder Fettalkohole in Etherbindung

Wird hingegen Phosphatidylcholin über den PEMT-Pathway in 3 sequenziellen, unabhängigen Methylierungsschritten synthetisiert und stammt eine der 3 Methylgruppen aus dem Abbau von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin via [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain und Synthese von [Methyl-D<sub>3</sub>]S-Adenosylmethionin, werden einzelne D<sub>3</sub>-Methylgruppen übertragen und es entstehen überwiegend PC-Spezies, deren Masse um 3 Da verschoben ist. In Abhängigkeit zum Ausmaß der D<sub>3</sub>C-Markierung des S-Adenosylmethionin-Pools nimmt die Wahrscheinlichkeit der Markierung von D<sub>3</sub> über D<sub>6</sub> bis D<sub>9</sub> ab (D<sub>3</sub>>>D<sub>6</sub>>>D<sub>9</sub>). Damit sind D<sub>3</sub>-markierte PCs repräsentativ für den PEMT-Pathway, D<sub>9</sub>-markierte PCs jedoch repräsentativ für die De-novo-Synthese.

Der Massenunterschied zwischen endogenen PC-Spezies und neu synthetisierten PC-Spezies kann durch Massenspektrometrie aufgezeigt und



## 2. Grundlagen

die entstandenen Komponenten quantifiziert werden [6]. Neue Untersuchungen mit gesunden Probanden nach [D<sub>9</sub>-Methyl]Cholin-Infusion zeigen die molekulare Spezifität der beiden PC-Synthesewege auf. Über PE-Methylierungsschritte werden vor allem PC-Spezies gebildet, die eine längere Kettenlänge haben und eher ungesättigt sind, zum Beispiel 20:4- und 22:6-haltige PC-Spezies. Gesättigte, mono- und diunsaturierte PC-Spezies werden hingegen über den CDP-Cholin-Weg gebildet [7, 10].

### 2.2. Triglyceride

Die Triglyceride sind Hauptbestandteil der Nahrungsfette. Sie sind bedeutender, schnell mobilisierbarer Energiespeicher unseres Organismus, Reservoir für essentielle Fettsäuren und essentiell für die körperliche Strukturbildung.

Sie haben ebenso wie die Glycerophospholipide Glycerin als Grundgerüst. Jedoch sind alle drei Hydroxylgruppen des Glycerins mit einer Fettsäure verestert (Abb. 15). Somit sind Triglyceride ungeladen und praktisch unlöslich in Wasser. In den natürlichen Triglyceriden sind meist mehrere unterschiedliche Fettsäuren mit Glycerin verestert, wodurch eine nahezu unüberschaubare Vielfalt molekularer Spezies vorliegt.

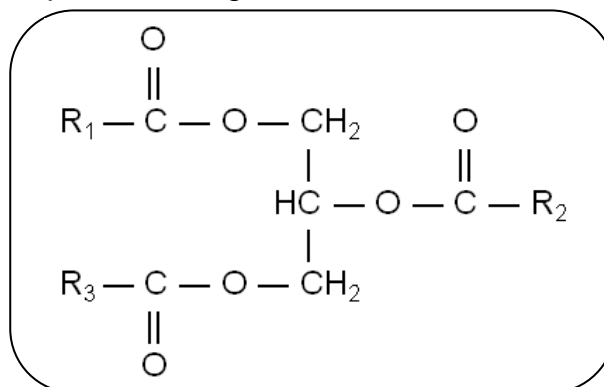


Abbildung 15: Strukturformel eines Triglycerids  
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> und R<sub>3</sub> sind Fettsäuren in Esterbindung

Wie schon in Kapitel 2.1.2. im Rahmen des Phospholipidmetabolismus beschrieben, werden die Triglyceride der Nahrung im Darm durch die Pankreaslipase in Fettsäuren, Monoacylglyceride und Glycerol gespalten. Diese Bestandteile bilden mit Gallensäuren, Cholesterol und Galle-PC Mizellen, die

## 2. Grundlagen

anschließend resorbiert werden. In den Enterozyten erfolgt die Resynthese der resorbierten Bestandteile zu Triglyceriden, die dann zusammen mit Apolipoproteinen, Cholesterin und Phospholipiden als Chylomikronen via Lymphe in den venösen Kreislauf abtransportiert werden und so zum Zielgewebe gelangen [47]. Zudem werden die in der Leber neu synthetisierten Triglyceride in VLDL eingebaut und über diese Lipoproteine in die Peripherie transportiert (siehe Lipoproteinklasse Tab. 4 in Kap. 2.1.2.).

Die meisten Zellen können kleine Mengen an Triglyceriden speichern. Sie dienen hier als rasch verfügbarer Energiespeicher. Die Fettzellen des Fettgewebes hingegen können sehr große Mengen speichern. Bei Nahrungskarenz bzw. hohem Energiebedarf und Ausschöpfung der Glycogenspeicher können diese Triglycerid-Speicher mobilisiert werden [50, 76, 77].

Bei CF-Patienten kommt es zu einer vermehrten Ablagerung von Lipiden in der Leber vermutlich aufgrund einer gestörten PC-Synthese durch Cholinmangel. Die Patienten entwickeln dann im Verlauf der Erkrankung häufig eine Hepatosteatose, die in schwerwiegende Leberkomplikationen übergehen kann [31, 32].

### 2.2.1. Synthese von Triglyceriden

Die Synthese der Triglyceride erfolgt bis zur Bildung von Diacylglycerol wie bei der Synthese der Phosphoglyceride (s. Abb. 8 und 9 in Kap. 2.1.4.). Dann erfolgt durch eine Diacylglycerol-Acyltransferase die Anheftung einer dritten Fettsäure über Acyl-CoA. Damit ist das Triacylglycerid (TAG) vollständig.

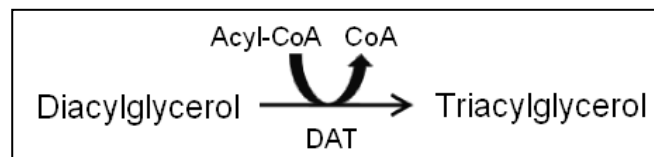


Abbildung 16: Synthese von Triacylglyceriden (TAG)  
DAT = Diacylglycerol-Acyltransferase (EC 2.3.1.20)

### 2.2.2. Abbau von Triglyceriden

Der Abbau der Triglyceride erfolgt über die Hydrolyse der Esterbindungen durch Lipasen, wodurch Fettsäuren und Glycerol freigesetzt werden (Abb. 17).

## 2. Grundlagen

Im Fettgewebe gibt es drei unterschiedliche Lipasen, die die dort gespeicherte Triglyceride bei Katecholaminstimulation oder Nahrungskarenz aufspalten: Adipose-Triglycerid-Lipase (ATGL) (EC 3.1.1.3) [78], hormonsensitive Lipase (HSL) (EC 3.1.1.79) und Monoglycerid-Lipase (MGL) (EC 3.1.1.23) [79, 80]. Für den ersten Schritt der Lipolyse sind die ATGL sowie die HSL zuständig, für den zweiten Schritt nur noch die HSL. Der letzte Schritt wird durch die MGL katalysiert [81].

Die Triglyceride aus der Nahrung oder der Neusynthese in der Leber werden in Lipoproteinen des Blutes, vor allem in Chylomikronen und VLDL transportiert. Bevor die Triglyceride in die Zellen aufgenommen werden können, werden sie meist an der Oberfläche der Kapillarendothelzellen über die Lipoproteinlipase gespalten [82]. Die Fettsäuren gelangen dann über Diffusion oder verschiedene Transportproteine (FATP = fatty acid transport protein, FAT/CD36 = fatty acid translocase, FABP<sub>pm</sub> = fatty acid binding protein<sub>pm</sub>) in die Zellen, wo sie zur Deckung des Energiebedarfs für die  $\beta$ -Oxidation verwendet werden [83].

Glycerol wird in der Leber und in den intestinalen Mukosazellen weiterverwertet, indem es durch die nur dort vorkommende Glycerokinase zu  $\alpha$ -Glycerophosphat phosphoryliert wird und dann über Dihydroxyacetonphosphat in die Glycolyse, Gluconeogenese oder PC-Synthese eingebracht werden kann.

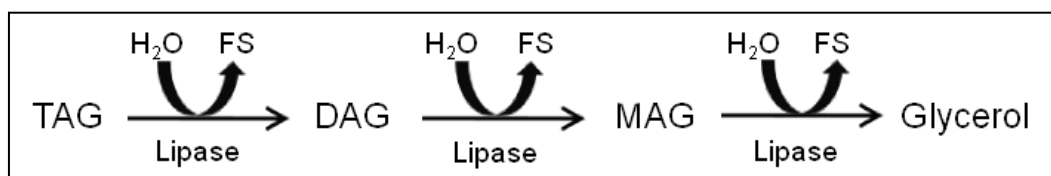


Abbildung 17: Lipolyse

TAG = Triacylglycerol, DAG = Diacylglycerol, MAG = Monoacylglycerol, FS = Fettsäure, H<sub>2</sub>O = Wasser

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan, in dem Lipide gebildet werden (s.o.). Die Lipide werden in hepatische Lipoproteine, vor allem VLDL, eingebaut und zur Versorgung der peripheren Organe ins Blut sezerniert. Im Rahmen der Mukoviszidose-Erkrankung kommt es bei einer erhöhten fäkalen Cholinausscheidung und verminderten enteralen Cholinaufnahme zu einem erniedrigten Cholinspiegel im Plasma [16]. Die dadurch bedingte PC-Synthesestörung beider Pathways (Kennedy- und PEMT-Pathway) bewirkt eine

## 2. Grundlagen

Störung der VLDL-Bildung und der Sekretion von TAG und PC [30]. Damit kommt es zu einer Unterversorgung der peripheren Organe mit wichtigen Lipiden. Das Krankheitsbild Mukoviszidose sowie die dabei häufig auftretende Hepatopathie werden im Folgenden beschrieben.

### **2.3. Mukoviszidose**

#### **2.3.1. Definition und Inzidenz**

Die Mukoviszidose (Synonym: Zystische Fibrose, engl. Cystic Fibrosis, CF) ist eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung. Sie ist die häufigste angeborene Stoffwechselerkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1:2500 in der kaukasischen Bevölkerung [84, 85]. Etwa jeder Zwanzigste in dieser Population ist damit heterozygoter Defekträger des verantwortlichen CFTR-Gens, phänotypisch jedoch gesund.

#### **2.3.2. Pathogenese**

Für die Pathogenese der Mukoviszidose wurde das CFTR-Gen identifiziert, das auf dem langen Arm des Chromosoms 7 im Bereich 7q3.1 lokalisiert ist [86, 87]. Es kodiert für ein Protein, den „cystic fibrosis transmembrane regulator“ (CFTR), das zu den ABC-Transportern gehört (von englisch: ATP-binding cassette transporter), einer großen Gruppe eukaryotischer Exporterproteine [88]. CFTR ist an der apikalen Membran der Epithelzellen von Schweißdrüsen, Speicheldrüsen, Pankreasgängen, Darmkrypten, Bronchien und Bronchiolen, Nierentubuli und Hoden lokalisiert [89-92]. Es weist die Funktion eines cAMP-abhängigen Chlorid-Kanals auf [93] und ist an der Regulation anderer Ionenkanäle, wie z.B. von bestimmten Na<sup>+</sup>-Kanälen beteiligt [94]. Zudem reguliert CFTR die Aufnahme von Sphingolipiden [88]. Sphingolipide sind ein wichtiger Bestandteil von Plasmamembranen und an der Signaltransduktion beteiligt [95-97]. Sie induzieren die Apoptose, bewirken Zelldifferenzierung und Zellmigration und spielen eine wichtige Rolle in der Infektabwehr, Angiogenese und embryonalen Entwicklung [98, 99].

## 2. Grundlagen

Mukoviszidose beruht auf verschiedenen Mutationen des CFTR-Gens. Prinzipiell unterscheidet man Klasse I bis V-Mutationen (Tab. 5) [100, 101], wobei mit ca. 70 % die häufigste Mutation eine Deletion von 3 Nukleotiden des Phenylalanin-Kodons an Position 508 ( $\Delta F$  508) ist [102]. Dieses ist eine Klasse II-Mutation [103].

Tabelle 5: Klasse I bis V-Mutationen [100, 101]

Klasse I	Defekte CFTR-Produktion durch nonsense-, frameshift- oder splice-site-Mutationen
Klasse II	Gestörte Proteinprozessierung und -Faltung im Golgi-Apparat
Klasse III	Defekte Funktion der Regulationsdomäne: CFTR ist resistent gegenüber Phosphorylierung und ATP-Bindung
Klasse IV	Reduzierte Chlorid-Leitfähigkeit des CFTR durch Phosphorylierung
Klasse V	Verminderte Anzahl von aktiven CFTR-Proteinen durch gestörtes Splicing

Neben  $\Delta F$  508 gibt es noch mehr als 1500 andere Mutationen, so dass man homozygote und compound-heterozygote CF-Varianten unterscheiden kann [104]. Sie führen, auch im Zusammenhang mit dem genetischen Hintergrund der individuellen Patienten, zu jeweils unterschiedlichen Verlaufsformen, Schweregraden und mittlerem Überlebensalter der Erkrankten [105-108]. So weisen beispielsweise CF-Patienten mit Klasse I/II-Mutationen in beiden Chromosomen einen signifikant schwereren Krankheitsverlauf und eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit auf [107].

Durch das veränderte CFTR-Protein kommt es zu einem verminderten Chlorid-Export und dadurch zu einem osmotisch bedingten, geringeren Flüssigkeits-Export, wodurch die Viskosität der Sekrete von Pankreas, Bronchialdrüsen, Drüsen des Verdauungssystems und anderer muköser Drüsen abnorm erhöht ist. Der Natrium- und Chloridgehalt im Schweiß ist gesteigert [104].

Die Bikarbonat-Sekretion der Pankreasgangzellen ist abhängig von dem Chloridgradienten [109]. Infolge der CFTR-Mutation kommt es zur erniedrigten extrazellulären Chloridkonzentration und dadurch zum Funktionsverlust des apikalen  $Cl^-/HCO_3^-$ -Antiporters. Dadurch enthält das Pankreassekret vermindert Bikarbonat zur Neutralisierung des Magensaftes. Der duodenale pH-Wert ist bei

## 2. Grundlagen

Mukoviszidose signifikant niedriger als bei gesunden Kontrollprobanden [110, 111]. In diesem sauren Milieu kommt es zu einer Veränderung der Sekundärstruktur der Pankreasphospholipase A<sub>2</sub> und zum irreversiblen Aktivitätsverlust dieses Enzyms [26], das essentiell für die Aufspaltung und Aufnahme von Lipiden ist [112]. Daher können Phosphatidylcholine aus Nahrung und Galle nicht effizient gespalten und ihr Cholin rückresorbiert werden, sodass über fäkale Verluste ein Cholinmangel entsteht.

### 2.3.3. Klinik

Die vielfältigen klinischen Manifestationen der Mukoviszidose sind vom Genotyp und dem genetischen Hintergrund des Patienten sowie vom Alter abhängig. Beim Fötus äußert sich das Krankheitsbild vorwiegend durch eine intestinale Symptomatik [113], die in 15 – 20 % der Fälle in einen Mekoniumileus als erste Manifestation mündet [114]. CF-Kinder mit Mekoniumileus werden früher diagnostiziert, haben größere Defizite in Größe und Gewicht, einen schlechteren Ernährungsstatus und ein geringeres Überleben [115]. Zudem können die Neugeborenen durch Hypotrophie, Gedeihstörung und seltener durch einen Ikterus neonatorum prolongatus infolge einer Obstruktion der Gallenwege auffallen [113, 116, 117].

Ab dem Säuglings- und Kleinkindesalter kommt es durch die Umweltexposition der Lunge zunehmend zu pulmonalen Manifestationen der Mukoviszidose. In der Lunge ist die mukoziliäre Clearance durch das zähe Sekret gestört [118-120]. Im Mittelpunkt stehen chronische, bakterielle Infektionen, vor allem mit *Staphylokokkus aureus*, *Haemophilus influenzae* und später mit *Pseudomonas aeruginosa* [120]. Die hydrophilen Surfactant-Proteine A und D, die eine wichtige Rolle in der Immunabwehr bakterieller Infektionen spielen, sind bei CF-Patienten stark vermindert bei normalen Surfactant-Phospholipid-Konzentrationen [121]. Damit ist die zelluläre Abwehr gegenüber Bakterien in der Lunge von Mukoviszidose-Patienten sehr eingeschränkt. Die chronische Entzündung der Lunge führt zur Ausbildung von Bronchiektasen, zur fortschreitenden Lungendestruktion und zu einem Cor pulmonale infolge der

## 2. Grundlagen

pulmonalen Hypertension. Am Ende steht die respiratorische Globalinsuffizienz [114].

Ca. 90 % aller CF-Patienten entwickeln über die ersten Lebensjahre eine exokrine Pankreasinsuffizienz [104]. Die dadurch bedingte Malabsorption führt zu Steatorrhoe, Abmagerung und Minderwuchs. Hämolytische Anämie, Blutgerinnungsstörung und Hautausschläge können durch Malabsorption von fettlöslichen Vitaminen und Zink auftreten [114]. Das Gleichgewicht von Antioxidanzien, reduziertem/ oxidiertem Glutathion sowie Homozystein/ Methionin ist wesentlich beeinträchtigt [32]. Im späteren Lebensalter kommt es in 15 – 20 % der CF-Patienten zu einem distalen intestinalen Obstruktionssyndrom (DIOS). Durch Retention von viskösem Sekret und Nahrungsbrei kommt es hierbei zu einer partiellen oder kompletten Obstruktion des distalen Darms [114]. In 15 % der Fälle tritt mit zunehmendem Alter als kritische Komplikation der „cystic-fibrosis-related Diabetes mellitus“ (CFRD) auf [122]. Dabei kommt es zu einer Destruktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und zu einer gestörten Insulinsensitivität [123]. In diesem Zusammenhang könnte unter anderem die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Pro- und Antioxidantien eine wichtige Rolle spielen [124].

Das CFTR-Protein ist zudem in den Epithelzellen der Gallengänge und Gallenblase lokalisiert, wo es bei der Gallensekretion und dem Gallenfluss eine wichtige Rolle spielt [125, 126]. Inwiefern diese CFTR-Lokalisation im Hinblick auf die Leberschädigung bei CF eine Rolle spielt, ist unklar. Durch die CFTR-Mutation könnte die Galle hyperviskös werden, akkumulieren und eine Obstruktion der Gallengänge bewirken. Dies könnte zu einer Schädigung der Cholangiozyten sowie Hepatozyten und zu einer fokalen biliären Fibrose führen, die innerhalb einiger Jahre in eine multilobuläre biliäre Zirrhose mit portaler Hypertension und Leberversagen übergehen kann [127, 128]. Der Verlauf ist meist schleichend progressiv und wird erst durch die Komplikationen der Leberzirrhose manifest [126, 129]. Es ist jedoch unbekannt, warum ein Teil der CF-Patienten an einer schweren Lebermanifestation erkranken und ein anderer nicht [125]. Betroffen sind ca. ein Drittel der CF-Patienten, die meist schon vor dem 18. Lebensjahr erkranken [130, 131]. Ein erhöhtes Risiko für die

## 2. Grundlagen

Leberbeteiligung haben CF-Patienten mit einem Mekoniumileus in der Vorgeschichte, männliche Patienten und Patienten mit schwerwiegenden Genotypen [23, 132, 133].

Wie bereits oben ausgeführt, kommt es bei CF-Patienten zu einem enteralen Verlust von Phospholipiden und Cholin über die Fäzes [16], der durch die fehlende Neutralisierung des Magensaftes im Duodenum und dem dadurch bedingten Funktionsverlust der Pankreaslipase verursacht sein dürfte. Ein Cholindefizit führt zu einer Entleerung hepatischer PC-Speicher mit verminderter PC-Synthese und damit zunächst zu einer Störung der Lipoproteinsynthese [30] mit obligater Akkumulation von Triacylglyceriden in der Leber (Hepatosteatose) [13, 16, 32]. Die Konsequenz daraus ist, dass bei den CF-Patienten die Versorgung peripherer Organe mit Cholin und essentiellen Fettsäuren gestört ist [31]. Bei schwerem Cholinmangel ist auch die Homöostase der Leberzellmembranen selbst betroffen, was zumindest im Tierversuch zur Erhöhung der Leberenzyme mit Steatohepatitis bis hin zum akuten Leberversagen führt [13].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass bei Mukoviszidose die Leberbeteiligung nach der Lungen- und Pankreas-Symptomatik die bedeutendste Rolle spielt. Es ist jedoch unklar, welche Rolle die CFTR-Proteine in den Epithelien der Gallengänge an der Entwicklung der Leberfunktionsstörung bei CF-Patienten ausmachen. Der Funktionsverlust der Pankreasphospholipase A<sub>2</sub> (PLase A<sub>2</sub>) aufgrund der fehlenden Neutralisierung des Magensaftes durch den gestörten Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Antiporter spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Hepatosteatose und einer schweren Leberbeteiligung. Es ist jedoch gewiss, dass durch die gestörte Leberfunktion die Versorgung der extrahepatischen Gewebe mit Lipiden gestört ist. Dies hat weitreichende Folgen für die CF-Patienten, beispielsweise bei der verminderten Abwehrmöglichkeit gegenüber pulmonalen Infektionen [120], bei der Einschränkung der Skelettmuskelfunktion [134, 135] oder der zunehmenden Abmagerung der Patienten [113].



### 2.3.4. Diagnostik

Die Diagnose der Mukoviszidose wird meist während der ersten Lebensmonate gestellt. Der Goldstandard zur Diagnose der Mukoviszidose ist der Schweißtest. Dabei wird mittels Pilocarpin-Iontophorese Schweiß gewonnen und die Natrium- und Chloridkonzentration gemessen. Ein positives Testergebnis liegt bei einer  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Konzentration von über 60 mmol/l vor. Zudem kann die Diagnose durch einen molekulargenetischen Nachweis des Gendefekts bestätigt werden [104, 136]. Daneben gibt es noch ICM (intestinale Kurzschlussstrom-Messung) in Rektumbiopsaten und nPD (nasale Potentialdifferenz-Messung) bei unklarer Pilocarpin-Iontophorese [137, 138].

### 2.3.5. Therapie

Die derzeitige Therapie richtet sich nach den bestehenden Symptomen und stützt sich auf 3 Säulen:

- Hochkalorische Ernährung, Pankreasenzym- und Vitaminsubstitution, ausreichende Kochsalz- und Flüssigkeitszufuhr
- Physio- und Inhalationstherapie zur Sekretmobilisation, Antiobstruktion und Antiinflammation
- Antibiotika zur lokalen und allgemeinen Infektionsbekämpfung

Zur Substitution der Pankreasenzyme bei Fettmalabsorption wird Pankreatin, eine Enzymkombination aus Lipase, Amylase und Protease, in der kleinst möglichen Dosierung eingesetzt. Dadurch wird die Steatorrhoe kontrolliert und eine normale Gewichtszunahme erreicht [139]. Zur Normalisierung des Cholinmangels ist eine Nahrungsergänzung mit Methylgruppendonatoren notwendig. Eine Studie von Innis et. al hat gezeigt, dass durch eine Nahrungsergänzung mit Lecithin, Cholin oder Betain die erniedrigten Plasmakonzentrationen von Methionin und S-Adenosylmethionin bei CF-Patienten signifikant erhöht werden können [32]. Dabei ist anzumerken, dass bei der Substitution der Methylgruppendonatoren keine Toxizität beobachtet wurde [32].

## 2. Grundlagen

Außerdem wird eine Fettsäure-Supplementation mit Dokosahexaensäure bei CF-Patienten diskutiert. Es wurde bei CF-Patienten ein Ungleichgewicht von 22:6- und 20:4-Fettsäuren gefunden, mit einem erniedrigten Anteil an Dokosahexaensäure (DHA) [71], aus dem Resolvine entstehen, die Entzündungsreaktionen terminieren [45]. Da jedoch DHA praktisch nur an Phosphatidylcholin gebunden transportiert wird und via PEMT-Pathway entsteht, hat die Supplementation von DHA in Form von Fischöl (als Triglyceride) keine Verbesserungen erbracht [140, 141].

Ab dem Zeitpunkt der Diagnose der Pankreasinsuffizienz sollte eine Vitamin-Supplementation mit Vitamin A, D und E begonnen werden [142]. Die Vitamin K-Gabe wird bei einer speziellen Indikation, wie z.B. bei einer Leberbeteiligung empfohlen, die Dosierung ist jedoch unklar [143]. Die Substitution wasserlöslicher Vitamine ist für CF-Patienten im Allgemeinen nicht erforderlich, da sie gut resorbiert werden [142, 144]. Eine Supplementation mit den Methylgruppendonatoren 5-Methyltetrahydrofolat und Vitamin B<sub>12</sub> könnte zu einer Verbesserung der Membraneigenschaften führen [145], weil sie Co-Faktoren bzw. Co-Substrate der Synthese von Methionin aus Homozystein sind. S-Adenosylmethionin ist essentiell für den hepatischen PEMT-Pathway und weitere Methylierungsreaktionen (DNA-Synthese u.v.m.). Jedoch ist weiterhin unklar, welche Nährstoffe, insbesondere Methylgruppendonatoren, vermehrt benötigt werden und in welcher Dosierung.

### **2.3.6. Prognose**

Die Prognose der CF ist abhängig von dem Schweregrad der Lungenerkrankung, dem Zeitpunkt der Diagnose und dem frühzeitigen Therapiebeginn mit regelmäßiger Betreuung in einem CF-Zentrum durch spezialisierte Ärzte. Die mittlere Lebenserwartung ist in den letzten Jahrzehnten durch verbesserte Behandlungsstrategien stetig gestiegen und liegt derzeit bei 37 Jahren [146, 147].

Die häufigste Todesursache der CF-Patienten ist die Lungenerkrankung [148]. Als 2. – 3. häufigste Todesursache folgt die Lebererkrankung [114, 149], die

## 2. Grundlagen

über die Komplikationen der Leberzirrhose (u.a. portale Hypertension mit Varizenblutung, Aszites etc.) zum Leberversagen führen kann [150, 151].

Im Hinblick auf die Häufigkeit der Leberkomplikationen bei Mukoviszidose und der dadurch bedingten Todesursache wird die Bedeutung der Leberbeteiligung hervorgehoben. In der bisherigen Forschung standen insbesondere die pulmonale und intestinale Symptomatik der CF-Patienten im Vordergrund, da sie die Prognose der Patienten bestimmt hat. Mit Verbesserung der Therapie rückt nun immer mehr die hepatische Problematik in den Fokus.

Diese Studie hat daher das Ziel, den hepatischen Metabolismus hinsichtlich des Lipidstoffwechsels bei Mukoviszidose zu charakterisieren, um daraus Therapieoptionen zur Verbesserung der Prognose abzuleiten.

Im folgenden Kapitel werden die Studie, die verwendeten Materialien sowie die Methodik beschrieben.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1. Geräte und Chemikalien

##### 3.1.1. Geräte und Verbrauchsmittel für

##### 3.1.1.1. Probengewinnung (Blutplasma)

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Probengewinnung der Plasmen

EDTA-Röhrchen	S-Monovette 2,7 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1 S-R, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Plastikpipette	VWR International GmbH, Darmstadt
Eppendorf-Pipette	Research 100µl (10-100µl), 1000µl (100-1000µl)
Hamilton-Pipetten	1000 µl, 500 µl, 100 µl, 25 µl, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA

##### 3.1.1.2. Phospholipid-Extraktion

Tabelle 7: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Phospholipid-Extraktion

Pyrex®-Röhrchen	Volumen 10 ml, Ø 14 mm, Schraubdeckel, Duran
Vortex®-Gerät	REAX top, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
„MS-Vials“: Probengefäß für die Massenspektrometrie-Analytik	1,5 ml braune KBW-Flasche mit Gewinde, Schraubdeckel 9 mm PP-Membran, beide VWR International GmbH Darmstadt

##### 3.1.1.3. Phospholipidquantifizierung

Tabelle 8: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Phospholipidquantifizierung

Blockthermostat	BT 200, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Glasküvette	Ø 10 mm
UV/VIS Spectrofotometer	Lamda Bio, Perkin Elmer, Massachusetts, USA

##### 3.1.1.4. Festphasenextraktion

Tabelle 9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Festphasenextraktion der Plasmaunterphasen

Säulensystem	BAKER-10 SPE System, Separation Sciences, NJ
Einmal-NH <sub>2</sub> -Säule	100 mg/ ml, Phenomenex Strata, USA
„HPLC-Röhrchen“: Probengefäß für die HPLC-Analytik	1,1 ml konische GW-Mikroliterflasche mit Gewinde, 32 x 11,6 mm, Schraubdeckel 8 mm PP-Membran, beide VWR International GmbH Darmstadt
4 ml-Vials	NeoLab-Probenfläschen 4 ml, Schraubdeckel, Scherf

### 3. Material und Methodik

#### 3.1.1.5. Gaschromatographie

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Aufarbeitung der Proben zur Gaschromatographie

Pyrex®-Röhrchen	Kulturröhrchen, 16 x 100, Schraubdeckel, Roland Vetter, Ammerbuch
Blockthermostat	Pierce Reacti Therm III, Heating/ Stirring module
Stangenpipetten	DIN B 2ml ± 0,015ml; DIN A5 5ml ± 0,015ml Hirschmann, EM, Techcolor, W. - Germany
GC-Vials	Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe: Mikroinsert G 30 Is; Flasche R1, weiß, 3,6 mm; Bördelkappe R 11-1.0/ HP
Zentrifuge	Hettich Rotanta/ RPC, Tuttlingen

#### 3.1.2. Chemikalien, Lösungen und Standardsubstanzen

##### 3.1.2.1. Chemikalien

Tabelle 11: Verwendete Chemikalien

Acetonitril	LiChrosolv, MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit ≥ 99,8 %
Acetylchlorid	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Reinheit ≥ 99 %
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat-7-Hydrat	MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit > 95 %
L(+)-Ascorbinsäure	VWR International, Fontenay sous bois; Reinheit ≥ 99,7 %
Brij 35	25 % w/w in Wasser, MERCK KGaA Darmstadt
Butylhydroxytoluol	MERCK Schuchardt OHG, Hohenbrunn; Reinheit > 95 %
Chloroform	J.T. Baker, Deventer, Holland; Reinheit ≥ 99,8 %
Cholinchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Reinheit ≥ 98 %
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit > 99 %
1,6 - Diphenyl - 1,3,5 - Hexatrien (DPH)	Sigma Chemical CO, St. Louis, USA
Ethanol	LiChrosolv, MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit ≥ 99,9 %
HPLC-Wasser	Wasser für die Chromatographie, MERCK KGaA, Darmstadt
5,85%ige Kochsalzlösung	Braun Infusionslösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Methanol	LiChrosolv, MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit ≥ 99,9 %
[Methyl-D <sub>9</sub> ]Cholinchlorid	Cholin-D <sub>9</sub> -Chlorid-Lösung 200 mg in 4 ml und

### 3. Material und Methodik

	50 mg in 1 ml, Universitätsapotheke Tübingen
Natriumchlorid 0,9%	NaCl 0,9%, fertige Infusionslösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Perchlorsäure	70%ig, Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	PBS-Dulbecco, w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Biochrom AG Berlin
Schwefelsäure	MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit 95 – 97 %
Stickstoff	Linde, München
Tetrahydrofuran	LiChrosolv, MERCK KGaA, Darmstadt; Reinheit ≥ 99,9 %
2,2,2-Trifluorethanol (TFE)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Reinheit ≥ 99,5 %
Wasserstoffperoxid	30 %ig, MERCK KGaA, Darmstadt

#### 3.1.2.2. Lösungen

Tabelle 12: Verwendete Lösungsmittel

Ammoniummolybdat-Lösung	7,724 g Ammoniumheptamolybdat-4-hydrat ad 250 ml einer 2,5 N Schwefelsäurelösung. Aufbewahrung bei 4 – 8 °C
10%ige Ascorbinsäure-Lösung	10 g Ascorbinsäure ad 100 ml Aqua bidest. Lagerung bei 4 – 8 °C
BHT-Lösung	20 mg Butylhydroxytoluol pro 1 ml Ethanol
DPH-Lösung	1 mg 1,6 – Diphenyl – 1,3,5 – Hexatrien pro 1 ml Tetrahydrofuran. Lagerung bei -30°C
6%ige Kaliumcarbonat-Lösung	30 g Kaliumcarbonat in 500 ml Aqua bidest
Phosphatstandard 2mM (100 nmol/ 50 µl)	0,5 mmol Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat ad 250 ml Aqua bidest. Aufbewahrung bei 4 – 8 °C

#### 3.1.2.3. Standardsubstanzen

Tabelle 13: Verwendete Standardsubstanzen

HPLC = Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie, GC = Gaschromatographie, MS = Massenspektrometrie

D <sub>4</sub> -Cholin-Standard	3,75 µmol D <sub>4</sub> -Cholin/ ml CDN Isotopes, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
HPLC-Standard	1 µmol PC14:0/14:0 / ml Trifluorethanol
GC-Standard	10 µg/ ml C 22:3 in Methanol/ Toluol 1:3
MS-Standard	500 nmol PC14:0/14:0, 50 nmol PG14:0/14:0, 200 nmol PE14:0/14:0 / ml

### 3.2. Studienteilnehmer

#### 3.2.1. Genehmigung der Ethikkommission

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt. Genehmigungsnummer: 295/2006; Protokoll-Code: Phos-CF.

#### 3.2.2. Kontrollgruppe

Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie war die schriftliche Einverständniserklärung sowie die Abwesenheit von Ausschlusskriterien:

- Alter unter 18 Jahre
- Schwangerschaft
- Schilddrüsen-/ Herz-/ Nierenerkrankungen
- Akute/ chronische Infektion der Lunge oder des Bronchialsystems
- Chronischer Alkohol-/ Nikotinabusus

In der folgenden Tabelle 14 sind die Daten der 4 Kontrollprobanden dargestellt:

Tabelle 14: Daten der Kontrollprobanden

Im Anhang befinden sich die gesamten Laborwerte (siehe Tab. 39)

	P1	P2	P3	P4
Alter (Jahre)	23,11	42,61	22,79	26,46
Geschlecht	Weiblich	Männlich	Männlich	Männlich
Größe (cm)	176	178	183	182
Gewicht (kg)	61	68	80	80
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	19,69	21,46	24,89	24,15
D <sub>9</sub> -Cholinchlorid-Infusion (mg)	220	245	288	288
Labor-Auffälligkeiten	Hypochrome Anämie	Keine	Hyperurikämie Hyperbilirubinämie (M. Meulengracht: homozygoter UGT1A1-Gendefekt) <sup>1</sup>	Keine

<sup>1</sup> M. Meulengracht: Zufallsbefund bei Hyperbilirubinämie ohne bisherige klinische Auffälligkeiten.

### 3. Material und Methodik

#### 3.2.3. Patientengruppe

Aus der Mukoviszidose-Ambulanz der Universitätskinderklinik Tübingen wurden CF-Patienten für eine Teilnahme an der Studie gewonnen. Ausschlusskriterien zur Teilnahme waren (zusätzlich zu den unter 3.2.2. aufgeführten Kriterien):

- Akute bronchopulmonale Aspergillose und andere akute Exazerbationen pulmonaler Infektionen
- FEV1 < 40 %

In der folgenden Tabelle 15 sind die Daten der 3 CF-Patienten dargestellt. Sie weisen alle den homozygoten Gendefekt  $\Delta F508$  auf.

Tabelle 15: Daten der CF-Patienten

Im Anhang befinden sich die gesamten Laborwerte (siehe Tab. 39); DIOS = Distales intestinales Obstruktions-Syndrom

	CF 1	CF2	CF3
Alter (Jahre)	28,80	19,83	21,95
Geschlecht	Männlich	Männlich	Männlich
CF-Genotyp	$\Delta F508$	$\Delta F508$	$\Delta F508$
Größe (cm)	173	183	171
Gewicht (kg)	66,5	66,8	57,0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22,22	19,95	19,49
D <sub>9</sub> -Cholin-Infusion (mg)	240	240	205
Labor-Auffälligkeiten	HbA <sub>1c</sub> erhöht: Diabetes mellitus	Hyperurikämie, Harnstoff-Erhöhung CRP-Erhöhung ohne Infektzeichen	Keine
Sono-Abdomen	Keine Splénomegalie (Ø 10,6 cm)	Grobknotige Leberzirrhose, leichte Splénomegalie (Ø 13,0 cm)	Keine Splénomegalie (Ø 10,2 cm)
Sonstiges	Leberbeteiligung ohne Zirrhose, Pankreas- insuffizienz	-	Pankreas- insuffizienz, rez. DIOS, Mekoniumileus in Vorgeschichte



### 3. Material und Methodik

In der Tabelle 16 sind die Daten der Kontrollprobanden und CF-Patienten im Vergleich dargestellt:

Tabelle 16: Daten der Kontrollprobanden und CF-Patienten im Vergleich

	Kontrollprobanden P1 – P4	CF-Patienten CF1 – CF3
Anzahl	4	3
Geschlecht	P1: weiblich P2 – P4: männlich	CF1 – CF3: männlich
Durchschnittliches Alter (Range)	30,62 Jahre (22,79 - 42,61 Jahre)	23,53 Jahre (19,83 – 28,80 Jahre)

#### 3.3. Studienablauf

Die Studie fand ambulant statt. Bei einem Voruntersuchungstermin wurden zunächst ein Aufklärungsgespräch und eine ausführliche Anamnese bezüglich Vorerkrankungen durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die körperliche Einganguntersuchung. Es wurde Blut abgenommen zur Routinekontrolle von Blutkörperchen, Entzündungswerten, Gerinnungswerten, Leber-, Nieren- und Schilddrüsenwerten und Bestimmung von Cholin und Phospholipiden im Blutplasma. Außerdem wurden eine Urinuntersuchung zum Ausschluss von Harnwegsinfektionen und Nierenerkrankungen, ein EKG des Herzens und eine Lungenfunktionsuntersuchung mittels Spirometrie durchgeführt.

Bei den Probanden, die nach durchgeführter Voruntersuchung in die Studie eingeschlossen wurden, erfolgte der Ablauf der Studie wie folgt:

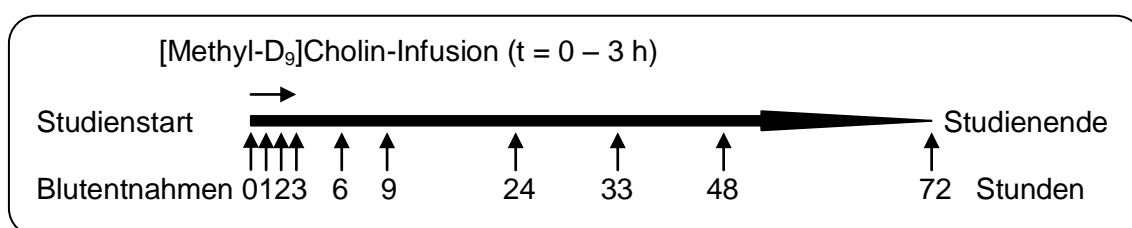


Abbildung 18: Studienablauf

##### 3.3.1. Studienstart: [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin-Infusion

Am ersten Tag der Studie bekamen die nüchternen Teilnehmer eine intravenöse Infusion mit [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid als sterile, pyrogenfreie Lösung über 3 Stunden mittels eines Perfusors verabreicht. Die Stammlösung mit 200 mg [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholinchlorid auf 4 ml NaCl war bei -32°C eingefroren

### 3. Material und Methodik

und wurde in der Dosierung von 3,6 mg/ kg Körpergewicht verwendet. Sie wurde auf 50 ml mit steriler isotonischer Kochsalzlösung gelöst und mit einer Infusionsrate von 50 ml/ 3 h verabreicht.

#### **3.3.2. Blutentnahme**

Es wurde nun zu verschiedenen Zeitpunkten EDTA-Blut aus einer kontralateralen Armvene entnommen. Diese Zeitpunkte waren 0, 1, 2 und 3 (Ende der Infusion) sowie 6, 9, 24, 33, 48 und 72 Stunden nach Infusionsbeginn. Das EDTA-Blut wurde umgehend nach Entnahme bei 1500 x g und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Blutplasma wurde in 2x 500 µl und 4x 100 µl aliquotiert. Dazu wurde je 25 µl bzw. 5 µl BHT-Lösung als Antioxidans hinzugegeben und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung und Analyse eingefroren.

### **3.4. Aufarbeitung des Plasmas für HPLC, MS und GC**

#### **3.4.1. Phospholipid-Extraktion nach Bligh & Dyer**

Die Extraktion erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer [152]. Dabei wird eine wässrige lipidhaltige Probe (Plasma) und Chloroform durch den Lösungsvermittler Methanol ineinander löslich gemacht (ternäres Gemisch). Somit wird die Extraktion beschleunigt, da sie nicht mehr durch den Übergang der Phasen verzögert wird. Durch anschließende Zugabe von Wasser (nicht isotonische Kochsalzlösung, da Chlorid die Ionisierung im Massenspektrometer beeinträchtigt!) und Chloroform in definiertem Überschuss werden die Phasen wieder getrennt. Die Oberphase enthält Methanol und Wasser mit einer Spur Chloroform sowie praktisch alle wasserlöslichen Metabolite, das heißt unmarkiertes Cholin, Betain und Phosphocholin sowie [D<sub>9</sub>-Methyl]Cholin, [D<sub>9</sub>-Methyl]Betain und [D<sub>9</sub>-Methyl]Phosphocholin. In der Unterphase sind im wesentlichen Chloroform mit etwas Methanol und H<sub>2</sub>O sowie die Phospholipide, Neutrallipide, Fettsäuren und Cholesterol. Mit diesem Verfahren lassen sich ca. 95 % der jeweiligen Metabolite und Lipide aus beliebigen Proben extrahieren [152].

### 3. Material und Methodik

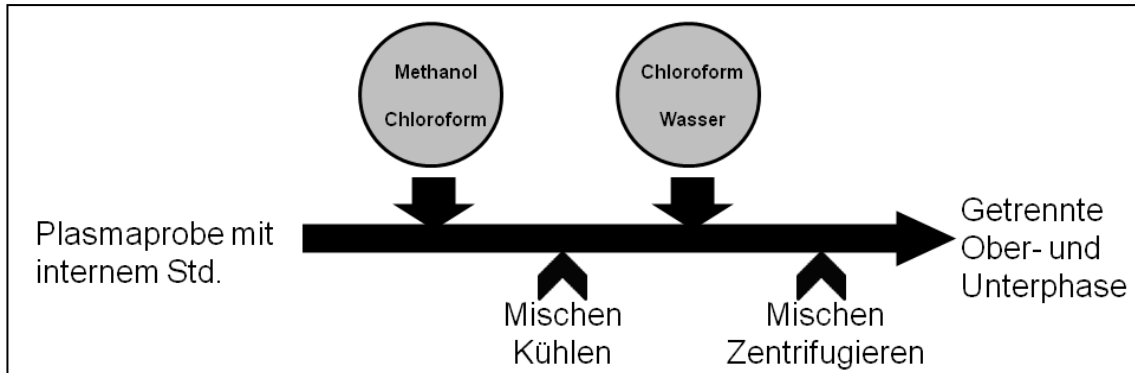


Abbildung 19: Phospholipidextraktion nach Bligh & Dyer  
Std. = Standard

Durchführung:

Herstellung des internen Standards: Ansetzen einer Stammlösung aus 1,1,2,2-D<sub>4</sub>-Cholinchlorid in Wasser (3,75 µmol/ ml) und Verdünnen der D<sub>4</sub>-Cholin-Stammlösung 1+24 mit Aqua bidest (HPLC-Wasser) auf eine Endkonzentration von 150 nmol D<sub>4</sub>-Cholin/ ml.

Pipettierschema:

In ein phosphatfreies Pyrex-Röhrchen wurden nacheinander pipettiert:

Tabelle 17: Pipettierschema Phospholipidextraktion nach Bligh & Dyer

Plasma mit 25 µl BHT-Lösung	500 µl
15 nmol D <sub>4</sub> -Cholin-Standard	100 µl
Methanol	1,8 ml (3 Volumenanteile)
Chloroform	0,6 ml (1 Volumenanteil)
Gut mischen mit Vortex-Gerät und für 1 h kalt stellen	
Chloroform	1,8 ml (3 Volumenanteile)
HPLC-Wasser	1,2 ml (2 Volumenanteile)
Kräftig schütteln und bei 3000 x g, 4°C, 20 min zentrifugieren → Trennung in Ober- und Unterphase	

Aufarbeitung der Oberphase: Pipettierschema

In ein neues Pyrex-Röhrchen wurden pipettiert:

Tabelle 18: Pipettierschema Aufarbeitung Oberphase

Plasma-Oberphase	2 ml
Acetonitril	3 ml
Zentrifugation bei 3000 x g, 4°C für 20 min → Aliquotieren der entstandenen Oberphase zu je 1 ml in MS-Vials und Einfrieren bei -80°C bis zur MS-Analytik	

### 3. Material und Methodik

Aufarbeitung der Unterphase:

Die Unterphase wurde sorgfältig entnommen, mit Chloroform/ Methanol 2+1 auf 5 ml eingestellt und für die Phosphatbestimmung pipettiert. Die restliche Unterphase wurde eingefroren.

#### 3.4.2. Phospholipidquantifizierung

Die Phospholipidbestimmung wurde aus Aliquots der organischen Unterphase durchgeführt und teilt sich auf in die Oxidation der Phospholipide zu anorganischem Phosphor (Phosphat) durch Veraschung und die anschließende Phosphatbestimmung nach Bartlett [153]. Die Phosphatbestimmung beinhaltet die Bildung eines stabilen Phosphomolybdat-Komplexes durch Zugabe von Wasser und Ammoniumheptamolybdat-Lösung, der nach einer Reduktionsreaktion durch Ascorbinsäure eine blaue Farbe bekommt. Das Absorptionsmaximum des Komplexes im Photometer liegt bei 820 – 830 nm. Die Eichkurve dieser Methode geht durch den Nullpunkt und ist linear bei einer Extinktion zwischen 0,1 bis 1,5.

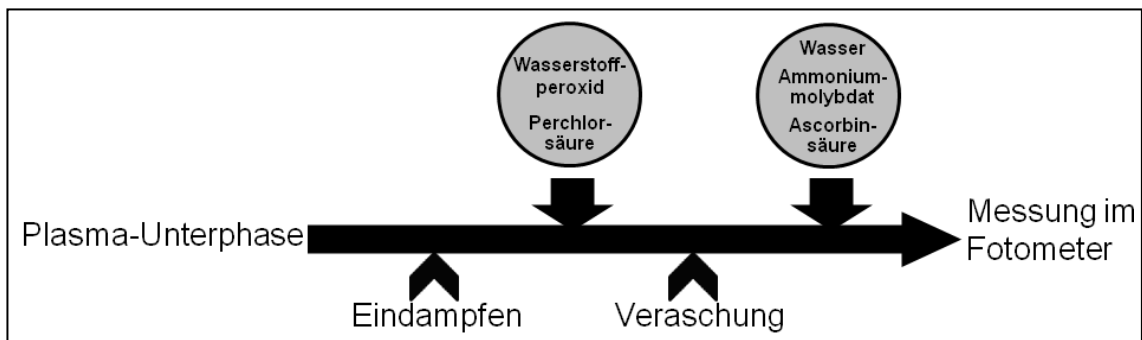


Abbildung 20: Phospholipidquantifizierung

### 3. Material und Methodik

Pipettierschema:

In ein phosphatfreies Pyrex-Röhrchen wurden nacheinander pipettiert:

Tabelle 19: Pipettierschema Phospholipidquantifizierung

Plasma-Unterphase	250 µl (Aliquot des 5 ml Probenextraktes)
Eindampfen unter Stickstoff	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %ig)	200 µl
Perchlorsäure (70 %ig)	500 µl
Veraschung in 200°C-Blockthermostat für 35 min	
Wasser	4 ml
Ammoniumheptamolybdat-Lösung (25 mM in 2,5 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	500 µl
Ascorbinsäure (10 %ig)	200 µl
Messung der Proben gegen Reagenzienleerwert und Phosphatstandard (50 µl Phosphatstandard 2nM)	

#### 3.4.3. Festphasenextraktion der Plasmalipide für GC- und HPLC-Analytik

Zur Festphasenextraktion der Phosphatidylcholine und der Neutrallipide aus den Plasmaunterphasen wurden Probenaliquots entsprechend 500 nmol Phospholipid eingesetzt. Zuerst wurden die Triglyceride zur Gaschromatographie-Analytik, dann die Phosphatidylcholine zur HPLC-Analytik isoliert.

Dazu wurden die Probenaliquots zunächst unter Stickstoff eingedampft, anschließend in absolutem Chloroform gelöst und auf Aminopropyl-Säulen aufgetragen. Die Probengefäße wurde zweimal mit Chloroform nachgespült (Endvolumen 1,2 ml). Die Phosphatidylcholine binden an die Säulenmatrix. Die nicht gebundenen Triglyceride wurden mit 2 ml Chloroform eluiert und anschließend für die Fettsäureanalytik mittels Gaschromatographie (s. Kap. 3.5.3.) genutzt. Dann erfolgte das Eluieren der Phosphatidylcholine mit Chloroform/ Methanol (2+1, v/v). Voruntersuchungen haben eine Ausbeute von 95% für PC ergeben, während andere Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin (PE) und saure Phospholipide unter diesen Bedingungen auf der Säule retiniert werden [154].

### 3. Material und Methodik

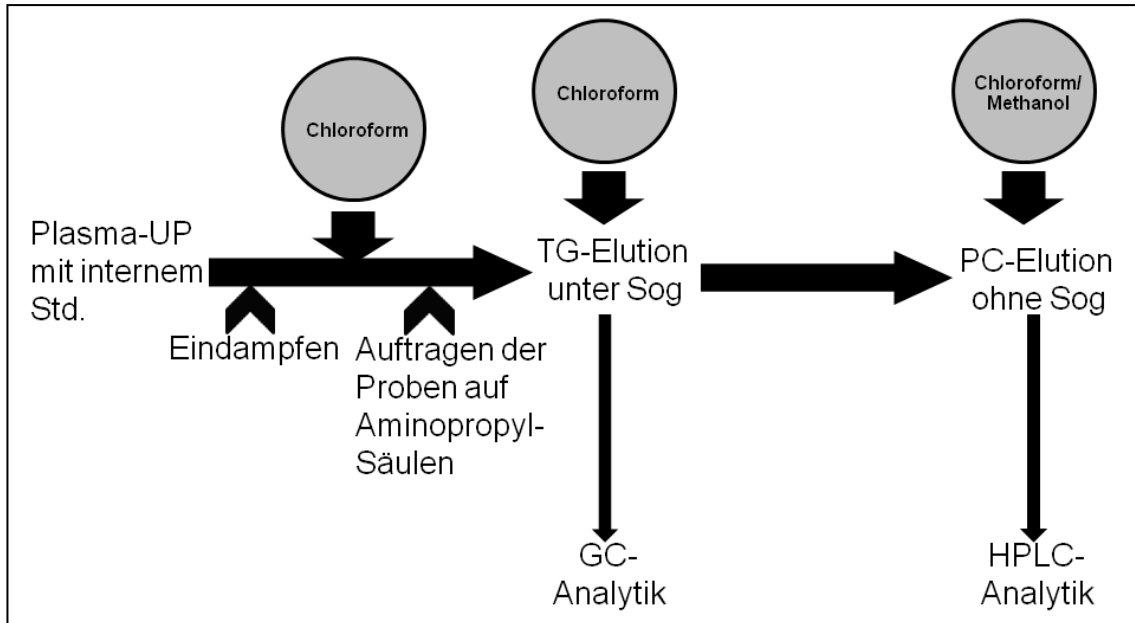


Abbildung 21: Festphasenextraktion der Plasmalipide  
 UP = Unterphase, Std. = Standard, TFE = 2,2,2-Trifluorethanol

#### Durchführung: Pipettierschema

In ein Glasröhrchen wurden pipettiert:

Tabelle 20: Pipettierschema Phospholipidextraktion der Plasmalipide

Plasma-Unterphase	500 nmol PL
HPLC-Standard (s. Tab. 13, Kap. 3.1.2.3.) als interner Standard	50 µl
Eindampfen unter Stickstoff	
Chloroform	0,8 ml
Gut Mischen und auf Aminopropyl-Einmalsäule geben	
Chloroform	2x 200 µl
Spülen des Röhrchen und Rest des Probe auf Säule geben → Probe langsam durch Säule laufen lassen	
Chloroform	2x 1 ml
Durchsaugen mittels Vakuumpumpe des BAKER 10-SPE Systems → Eluieren der Neutrallipide für Fettsäureanalytik mittels GC	
Chloroform/ Methanol 2+1	1 ml
Spülen der Säule (ohne Sog) → Eluieren der Phosphatidylcholine und des Sphingomyelins Eindampfen unter Sickstoff	
Trifluorethanol	125 µl
Einfrieren bei -32°C bis zur HPLC-Analyse	

#### 3.4.4. Fertigstellung der Proben für die Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurde das Volumen der Plasmaunterphasen entsprechend 100 nmol Phospholipide zusammen mit 20 µl Plasma-MS-Standard in ein MS-Vial pipettiert und unter Stickstoff eingedampft. Die fertige Probe wurde bis zur MS-Analyse bei -32°C eingefroren.

#### 3.4.5. Aufarbeitung der Triglyceride für die Gaschromatographie

Das Eluat der Festphasenextraktion, das die Triglyceride enthält, wurde mit Chloroform/ Methanol (2+1, v/v) auf 4 ml gebracht; ein Aliquot von 2 ml wurde für die gaschromatographische Analytik verwendet.

Die Probenaliquots wurden zunächst unter Stickstoff eingedampft. Dann erfolgte nach Zugabe des GC-Standards und Acetylchlorids die Veresterung der Triglyceride in einem 100°C-Thermostat. Nach Abkühlen der Proben und Zugabe von Kaliumkarbonat wurden die Proben durch Zentrifugation in eine Ober- und Unterphase aufgetrennt. Die Oberphase enthält die Triglyceride. Sie wurden auf ca. 180 µl eingeeengt und bis zur GC-Analyse bei -32°C aufbewahrt.

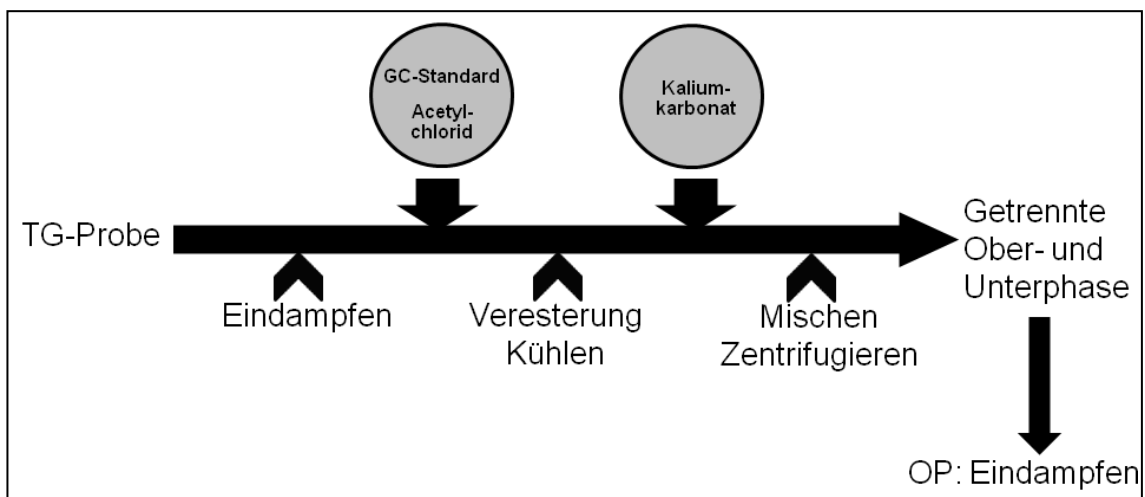


Abbildung 22: Aufarbeitung der Triglyceride für Gaschromatographie  
TG = Triglyceride, GC = Gaschromatographie, OP = Oberphase

### 3. Material und Methodik

Durchführung: Pipettierschema

In ein Pyrex®-Kulturröhrchen wurden pipettiert:

Tabelle 21: Pipettierschema: Aufarbeitung der Triglyceride für Gaschromatographie

TG-Probe	2 ml (Aliquot der 4 ml Proben)
→ Eindampfen unter Stickstoff	
GC-Standard Acetylchlorid	2 ml 200 µl
→ Veresterung in 100°C-Thermostat für 1 h, dann Abkühlen des Probe	
Kaliumcarbonat	5 ml
→ Gut Mischen und Zentrifugation bei 4000 x g, 5 min → Auftrennung in Ober- und Unterphase → Abpipettieren der Oberphase, die die Triglyceride enthält → Auf 180 µl Eindampfen → Lagerung im Kühlschrank bis zur GC-Analyse	

### 3.5. Analysemethoden

#### 3.5.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography) ist ein analytisches Verfahren, mit dem Substanzen aufgetrennt und über Standards bzw. molekulare Analytik der Eluate identifiziert werden können. Die Quantifizierung erfolgt substanz- und detektorabhängig, bei UV-Detektoren z.B. mittels molarer Absorptionskoeffizienten und mitgeführter interner Standards, bei Fluoreszenzdetektoren aufgrund ihrer spezifischen Absorptions- und Emissionsspektren. Das zu untersuchende Probengemisch wird auf die stationäre Phase (Säulenmatrix) aufgebracht. Dann wird eine Flüssigkeit (= mobile Phase) durch die Trennsäule mit der stationären Phase gepumpt. Wegen der unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten der Analyte zwischen mobiler und stationärer Phase haben sie unterschiedlich lange Retentionszeiten. Besteht eine starke Wechselwirkung, verbleibt die Komponente lange in der Säule und erscheint spät am Detektor. Die Besonderheit bei der HPLC ist, dass ein hoher Druck bis zu mehreren hundert Bar aufgebaut wird, mit dem die Flüssigkeit durch die Trennsäule gepumpt wird und dass Substanzgemische mit kleinen Probenvolumina in kurzer Zeit getrennt und ihre Komponenten quantifiziert werden können.



### 3. Material und Methodik

Das HPLC-Gerät und die verwendeten Lösungsmittel sind im Folgenden mit den einzelnen Bestandteilen aufgeführt:

Tabelle 22: Bestandteile des HPLC-Geräts, Merck, Hitachi, Darmstadt

Trennsäule (stationäre Phase)	Refill-Säure 250 x 4 mm Innendurchmesser, ODS 2, 5 µm Partikelgröße Sphere-Image, Schambeck SFD GmbH, Bad Honnef
Laufmittel (mobile Phase)	Methanol : H <sub>2</sub> O : Cholinchlorid = 925:75:7 (v/v/w)
Derivatisierungslösung	2,75 l H <sub>2</sub> O, 300 µl Brij 35, 125 µl DPH
Laufmittelpumpe	HPLC-Pumpe L-7100, Fluss 1 ml/ min
Derivatisierungspumpe	HPLC-Pumpe L-7100, Fluss 3 ml/ min
Interface	Interface D-7000
Säulenofen	Jet-Stream 2 plus-Säulenofen, Temperatur 50°C
Autoinjektor der Proben	Autosampler L-7200
Fluoreszenzdetektor	Fluoreszenzdetektor L-7485, Exzitation 340 nm, Emmision 460 nm
UV-Detektor	Diode array UV-Detektor L-7455, Extinktion 205 nm
HPLC-Software	HSM-D7000

Die hier verwendete Methode ist eine Sonderform namens Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC). Dabei ist die stationäre Phase in der Stahlsäule unpolar und besteht aus Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen, während die mobile Phase polar ist. Folglich haben amphiphile Moleküle (wie Phospholipide) mit kurzkettigen und ungesättigten Fettsäuren, die daher polarer sind, eine schwächere Wechselwirkung mit der stationären Phase als solche mit langkettigen und gesättigten Fettsäuren. Die mobile polare Phase (Laufmittel) wurde aus Methanol, Wasser und Cholinchlorid hergestellt [155].

Quantifizierung der PC-Spezies mittels Nachsäulenderivatisierung und Fluoreszenzdetektion:

Hinter der Säule sind Detektoren angebracht, die die nacheinander aus der Säule eluierten PC-Komponenten sichtbar machen. Dazu werden ein Diodenarray-Detektor (DAD) und ein Fluoreszenzdetektor verwendet. Der DAD wird auf eine feste Wellenlänge von 205 nm (Absorptionsmaximum isolierter Doppelbindungen) eingestellt. Das UV-Signal ist dann proportional zu der

### 3. Material und Methodik

Anzahl der Doppelbindungen innerhalb der Fettsäuren der PC-Spezies, so dass sich nur ungesättigte PC-Spezies gut detektieren lassen [155, 156].

Vor der anschließenden Fluoreszenzdetektion wird der mobilen Phase deshalb eine wässrige Derivatisierungslösung beigemischt, die die PC-Bestandteile in Mizellen überführt. Diese wässrige Derivatisierungslösung enthält Brij 35 (Polyalkylenglykolether), ein Detergens, das die Mizellenbildung beschleunigt, sowie Diphenylhexatrien (DPH). In die PC-Mizellen wird DPH eingelagert, was bei einer Exzitation von 340 nm und einer Emission von 460 nm in einer Lipid-Umgebung verstärkt fluoresziert und durch den Fluoreszenzdetektor gemessen werden kann. Dabei ist die Fluoreszenzemission proportional zur eingesetzten Stoffmenge der PC-Spezies, während das UV/Fluoreszenz-Verhältnis eine variable Stoffkonstante ist [155], vorausgesetzt die Temperatur für die Mizellenbildung ist ausreichend hoch (50°C).

#### **Berechnung der PC-Zusammensetzung und -Konzentration:**

Das Ergebnis der HPLC ist ein Chromatogramm (Abb. 23), das aus vielen einzelnen Peaks besteht. Einer der Peaks kann dem internen Standard zugeordnet werden, die anderen Peaks sind durch Vorversuche mit laborinternen Fettsäurestandards identifiziert worden.

Die Zusammensetzung der PC-Spezies wurde berechnet, indem die Peakfläche einer PC-Spezies ins Verhältnis zu den Peakflächen aller PC-Spezies gesetzt wurde. Die Flächen unter den Peaks sind proportional zu den Konzentrationen der PC-Spezies in der Probe. Die Konzentration einer PC-Spezies wurde aus der einzelnen Peakfläche im Verhältnis zum internen Standard mit einer bekannten Konzentration berechnet.

Tabelle 23: Formel der PC-Zusammensetzung und -Konzentration

Std = Standard; UP = Unterphase der Plasmaprobe; entn. UP (ml) = Volumen der entnommenen Unterphase

Zusammensetzung der PC-Spezies	= $\frac{\text{Peakfläche PC-Spezies}}{\text{Peakfläche aller PC-Spezies}} * 100 \%$
Konzentration der PC-Spezies	= $\frac{\text{Peakfläche PC-Spezies} * 50 \text{ nmol Std} * 5 \text{ ml UP}}{\text{Peakfläche Std} * \text{entn. UP (ml)} * 0,5 \text{ ml Plasma}}$

### 3. Material und Methodik

In der folgenden Abbildung ist beispielhaft das HPLC-Chromatogramm für den Probanden P1,  $t = 6$  h dargestellt:

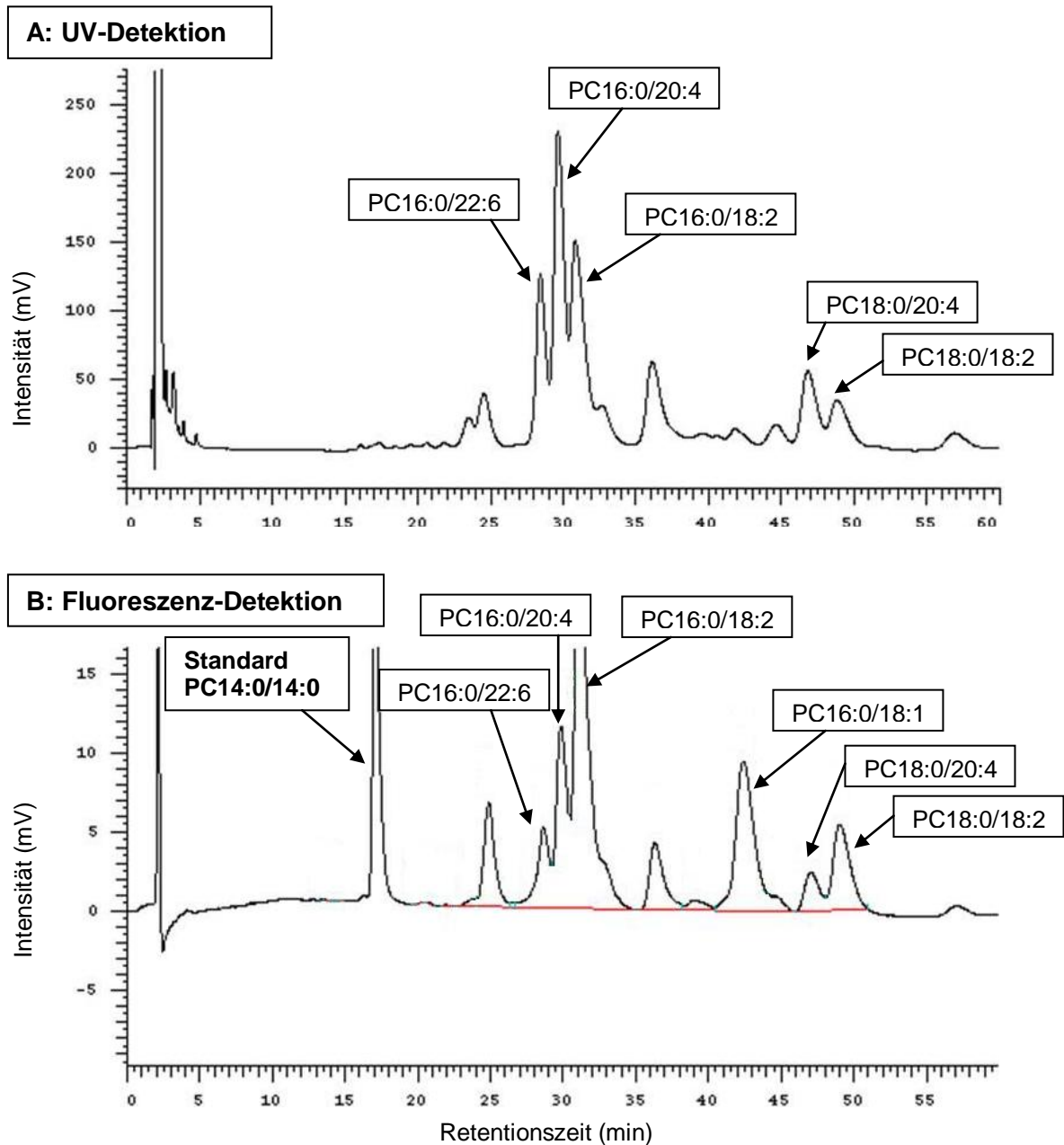


Abbildung 23: Beispiel für HPLC-Chromatogramm (P1,  $t = 6$  h)

A: Chromatogramm des Diodenarray-Detektors mit einer Wellenlänge von 205 nm: UV-Signal ist proportional zu der Anzahl an Doppelbindung innerhalb der Fettsäuren

B: Chromatogramm des Fluoreszenz-Detektors: Fluoreszenzemission ist proportional zur eingesetzten Stoffmenge der PC-Spezies

#### **3.5.2. Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein analytisches Verfahren, das zur Identifizierung und Quantifizierung chemischer Verbindungen entsprechend ihres Masse/ Ladungs-Verhältnisses und definierter Zerfallsprodukte dient. Sie ist ein äußerst sensitives Verfahren, das sehr geringe Mengen (femtomol – picomol) zur Analyse benötigt. Das Grundprinzip der MS ist es, die betreffenden Komponenten zu ionisieren und die Ionen anschließend in einem Magnetfeld nach ihrer Masse/ Ladung ( $m/z$ ) zu trennen. Danach werden die Ionen oder ihre definierten Bruchstücke an einem Massendetektor entsprechend ihrer Masse/ Ladung ( $m/z$ ) und in ihrer Menge (= total ion counts, tics) erfasst. Eine Besonderheit der Phospholipide ist, dass sie einfach ionisiert werden können, so dass durch  $m/z$  eine eindeutige Masse des Analyten definiert wird (z.B.  $m/z = +761$  für Palmitoyl-oleoyl-PC). Nachteile der einfachen Massenspektrometrie (Single-MS) gegenüber der Tandem-MS sind, dass andere Komponenten mit identischer  $m/z$  sowie Addukte von  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Li^+$  auftreten können. Dieses Problem der unüberschaubaren Anzahl von detektierten Massen wird bei Single-MS z.B. durch Zugabe von Na-Acetat gelöst, weil dadurch nur  $Na^+$ -Addukte der Analyte entstehen und alle  $H^+$ -,  $K^+$ - und  $Li^+$ -Addukte supprimiert werden.

#### **Das Massenspektrometer besteht aus 4 Komponenten: Probenaufgeber – Ionenquelle – Analysator – Detektor.**

Durch Injektion gelangt die Probe über das Interface in die Ionisierungskammer, in der ein Vakuum von ca.  $10^{-3}$  mbar herrscht, um die Kollision mit anderen Gasmolekülen oder Atomen zu vermeiden. Es erfolgt zunächst die Ionisation der Probe über eine Ionenquelle. Die hier verwendete Methode heißt Elektrospray-Ionisation (ESI). Die Methode erzeugt Ionen unter Atmosphärendruck, indem die Analytlösung durch eine Metallkapillare mit einer Spannung von ca. 4000 V und unter Zuleitung von heißem, trockenem Gas geleitet wird. Es entstehen zunehmend feine Tröpfchen und am Ende lösungsmittelfreie, ionisierte Einzelmoleküle. Die Ionen werden dann über ein Ziehpotential in Richtung des ersten Quadrupol-Analysators beschleunigt. Der

### 3. Material und Methodik

Quadrupol-Analysator besteht aus vier zylindrischen, parallel angeordneten Stäben, an denen eine rotierende Spannung angelegt wird. Dadurch beginnen die Ionen zu oszillieren und fliegen bei einer bestimmten Rotationsfrequenz zentral durch die Stäbe hindurch. Durch Variation der Spannung an den Quadrupolstäben kann festgelegt werden, dass nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis durch den Analysator den Detektor erreichen. Als Detektor wird ein Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) verwendet, der das Signal bis zu  $10^6$  verstärkt und über eine entsprechende Computer-Software ein Massenspektrum (s. Abb. 25) erstellt. Dabei werden die einzelnen Signale der Ionen, getrennt nach Massen-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) als Peaks dargestellt. Die Verarbeitung der Daten erfolgte in diesem Fall über die MassLynx NT Software.

#### **3.5.2.1. Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)**

Die bei den Analysen verwendete ESI-MS/MS ist eine Weiterentwicklung der einfachen Massenspektrometrie (Single-MS), um eine verbesserte Sensitivität und Selektivität zu erhalten. Dabei werden mehrere Quadrupole hintereinander geschaltet. Zwischen zwei Analysatoren (Q1 und Q3) wird eine Kollisionzelle (Q2) angebracht, die den Ionen durch Stöße mit dem Inertgas Argon Energie zuführt. Der Druck in der Kollisionzelle kann so gewählt werden, dass ein Ion nur maximal einmal mit einem Gasmolekül kollidiert und sehr spezifisch in andere Ionen fragmentiert wird.

Man kann nun entweder die Vorläufermassen („Precursors“) des ersten Analysators (Q1) für definierte individuelle Fragmente des Massenanalysators Q3 bestimmen oder die für die Zielmoleküle diagnostisch eindeutigen Fragmente definierter Ausgangsmassen aus Q1 („Products“) im Analysator Q3 quantifizieren. So wird aus allen endogenen PC-Molekülen ein diagnostisches Fragment mit einem Massen-Ladungsverhältnis von  $m/z = +184$  produziert, welches der protonierten Phosphocholin-Kopfgruppe entspricht (Abb. 24A).

Durch „Precursor Scans“ von  $m/z = +184$  können daher spezifisch die endogenen PC-Spezies nachgewiesen und mittels internem Standard ihre

### 3. Material und Methodik

Menge in der Probe bestimmt werden. Bei [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin-markiertem neu synthetisiertem PC hingegen sind die Ausgangsmassen der PC-Spezies um 9 Einheiten verschoben und es entsteht [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin als diagnostisches Fragment mit m/z = +193 (Abb. 24D). Analog gilt das für die Massenverschiebungen durch eine oder zwei deuterierte Methylgruppen (M+3, M+6) von PC aus dem Methylierungspathway (PEMT-Pathway, s.o.) (Abb. 24B und C). So erhält man über die „Precursor Scans“ Daten über endogene und neu synthetisierte PC-Spezies.

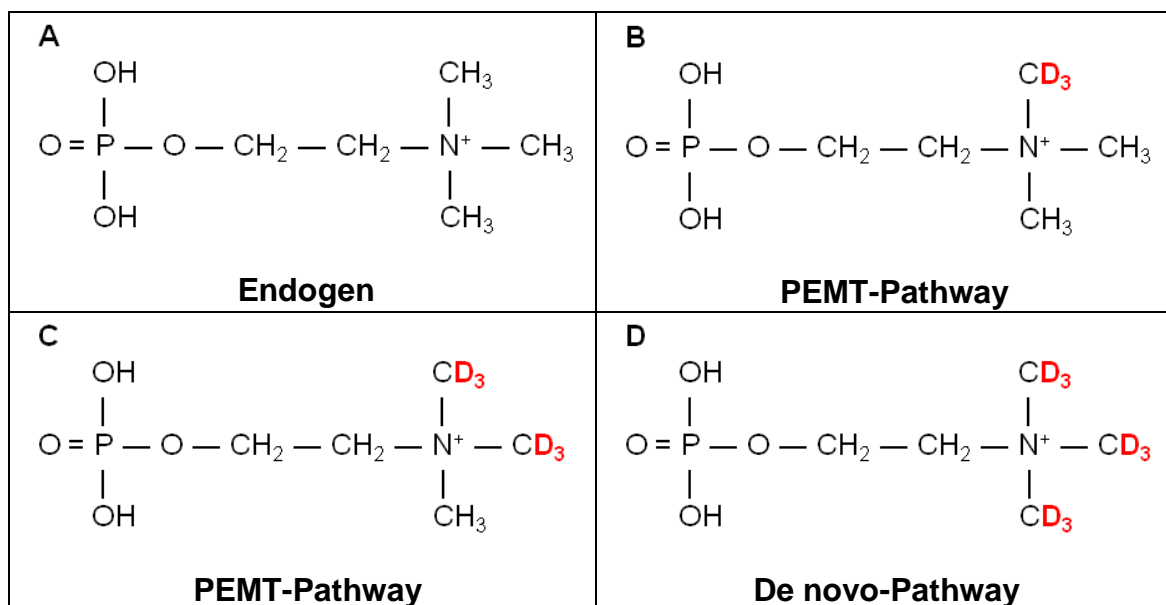


Abbildung 24: Phosphocholin  
 A: Endogenes Phosphocholin (p184)  
 B: [Methyl-D<sub>3</sub>]Phosphocholin (p187)  
 C: [Methyl-D<sub>6</sub>]Phosphocholin (p190)  
 D: [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin (p193)

#### 3.5.2.2. Analytik von Phosphatidylcholinen

Die MS-Analytik der Phosphatidylcholone erfolgte aus den Plasmaunterphasen. Das Massenspektrometer und die verwendeten Lösungsmittel sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 24: Massenspektrometer und Lösungsmittel

Massenspektrometer	Waters Micromass Quattro Ultima triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Wythenshaw, UK) ausgestattet mit einem Elektrospray-Ionisation-Interface
--------------------	--

### 3. Material und Methodik

Lösungsmittel	Methanol : Butanol : Wasser : 25 % NH <sub>4</sub> OH 6 : 2 : 1,6 : 0,4 (v/v)
Kollisionsgas	Argon
Probenaufgabe	HP1100 HPLC (Agilent Technology)

Die Phosphatidylcholine wurde über den sogenannten „Precursor-Ionen-Scan“ gemessen, indem die Produktionen der Phosphatidylcholine des jeweiligen Masse-Ladungs-Verhältnisses erfasst werden (Tab. 25).

Die Produktionen der Phosphatidylcholine abhängig vom Syntheseweg:

Tabelle 25: Masse-Ladungs-Verhältnis der Phosphatidylcholinderivate

Analyt	Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) des diagnostischen Fragments
PC (endogen)	184
PC aus Methylierung über PE, D <sub>3</sub> -markiert	187
PC aus Methylierung über PE, D <sub>6</sub> -markiert	190
PC neu synthetisiert, D <sub>9</sub> -markiert	193

Die einzelnen PC-Spezies, die den Peaks der Massenspektren (s. Abb. 25) zugeordnet werden können, sind in der Tabelle 26 mit ihrem charakteristischen Massen-Ladungs-Verhältnis dargestellt.

Tabelle 26: Massen-Ladungs-Verhältnisse (m/z) der molekularen PC-Spezies  
Aufgeteilt nach diagnostischen Fragmenten (m/z +184, +187, +193)

Molekulare PC-Spezies	Massen-Ladungs-Verhältnis (m/z)		
	Endogene PC-Spezies m/z = +184	Neu synthetisierte PC-Spezies via CDP-Cholin-Pathway m/z = +193	Aus PE gebildete PC-Spezies via PEMT-Pathway m/z = +187
PC14:0/14:0	679	688	682
PC16:0/16:1	733	742	736
PC16:0/18:2	759	768	762
PC16:0/18:1	761	770	764
PC16:0/20:4	783	792	786
PC18:1/18:2	785	794	788
PC18:0/18:2	787	796	790
PC18:0/18:1	788	797	791
PC16:0/22:6	807	816	810
PC18:1/20:4	809	818	812
PC18:0/20:4	811	820	814
PC18:0/22:6	835	844	838

### 3. Material und Methodik

Die Massenspektren der molekularen PC-Spezies, die durch die MS-Analyse erhalten werden, sind in Abb. 25 exemplarisch für den gesunden Probanden P1 t = 24 h dargestellt.

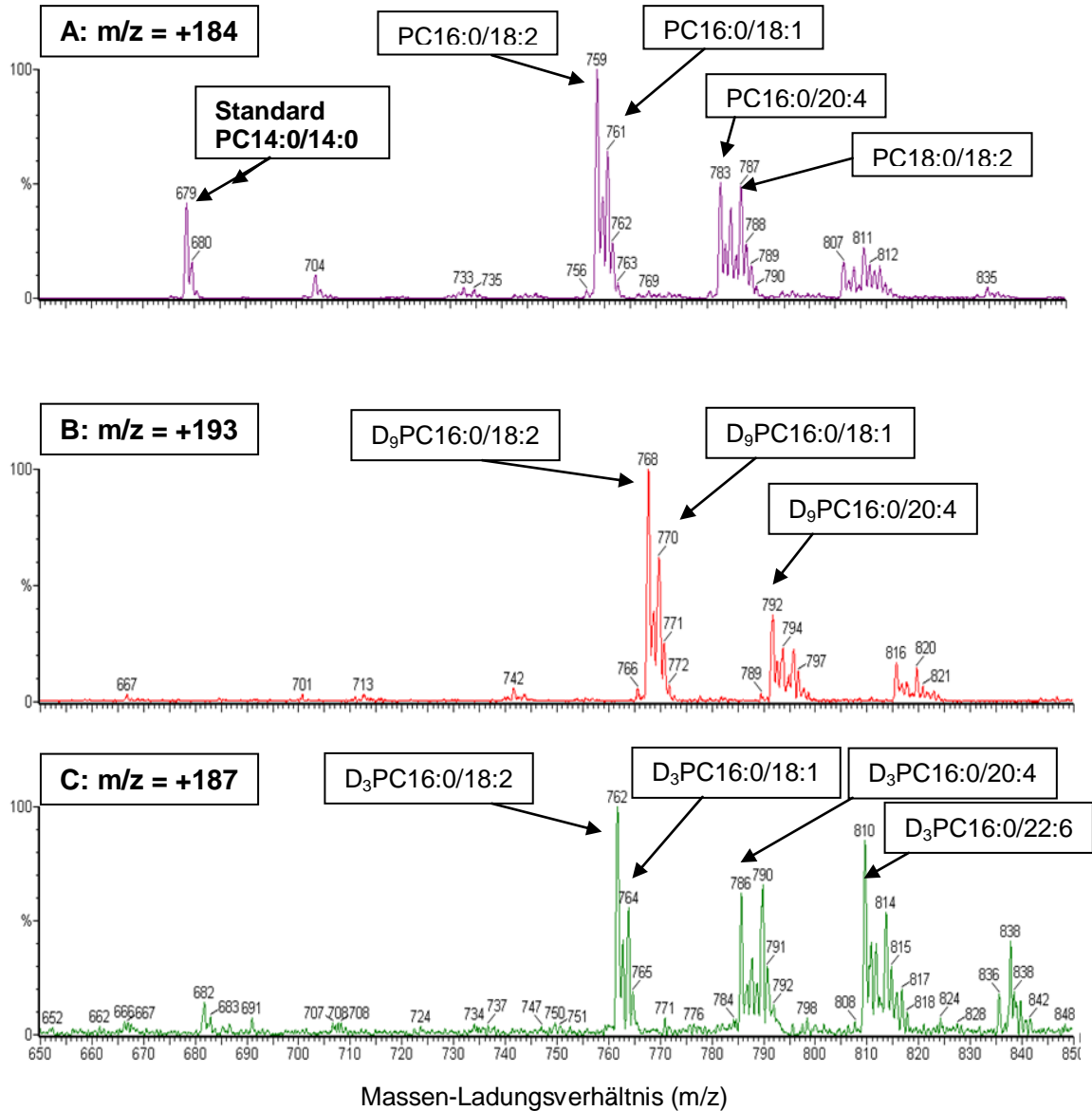


Abbildung 25: Beispiel für Massenspektren (P1 t = 24 h)  
x-Achse: m/z von 650 bis 850. Precursor Scans von:  
(A): Phosphocholinen (m/z = +184) aus endogenen PC-Spezies  
(B): D<sub>9</sub>-markierten Phosphocholinen (m/z = +193)  
(C): D<sub>3</sub>-markierten Phosphocholinen (m/z = +187)



### 3.5.2.3. Analytik der wässrigen Metabolite (Cholin, Betain, Phosphocholin)

Zur MS-Analytik von Cholin und seinen hydrophilen Derivaten Betain und Phosphocholin wurden 20 µl der Plasmaoberphasen verwendet. Das Massenspektrometer und die verwendeten Lösungsmittel sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 27: MS-Analytik der wässrigen Metabolite

Massenspektrometer	Waters Micromass Quattro Micro API triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Reutlingen, D) ausgestattet mit einem Elektrospray-Ionisation-Interface
Lösungsmittel A	500 mM Ammoniumformiat
Lösungsmittel B	Acetonitril, 0,05 % Ameisensäure
Trennsäule	Atlantis HILIC, Quarz 3 µm
Temperatur	50°C
Flussgeschwindigkeit	300 µl/min

Die Messungen erfolgten im sogenannten MRM-Modus, dem „Multiple Reaction Monitoring“. Dabei werden selektiv nur ein oder zwei Fragmentationen untersucht, das heißt von selektiven „Precursors“ zu deren „Products“. Diese Methode ist noch sensitiver, jedoch begrenzt in der Anzahl der zu messenden Analyte. Die Massen-Ladungs-Verhältnisse der gemessenen Analyte sind in der folgenden Tab. 28 aufgeführt:

Tabelle 28: Masse-Ladungs-Verhältnis der wässrigen Metabolite

Analyt	m/z Analyt	m/z Diagnostisches Fragment
Cholin	104	60
D <sub>4</sub> -Cholin	108	64
D <sub>9</sub> -Cholin	113	69
Betain	118	58/59
D <sub>9</sub> -Betain	129	66/68
Phosphocholin	184	86
D <sub>9</sub> -Phosphocholin	193	95

### 3.5.3. Gaschromatographie (GC)

Die Gaschromatographie wird zur Quantifizierung von Triglyceriden über ihre Fettsäuremethylester verwendet. Sie erfordert im Gegensatz zur HPLC eine gasförmige mobile Phase und einen flüssigen Analyten.

1 µl der Probe wird mit einem Injektor in den Gaschromatographen injiziert und dort bei einer Temperatur von 60 – 100°C vollständig verdampft. Dann wird die Probe durch die mobile Phase (Trägergas) in die Trennsäule transportiert und entsprechend den Verteilungskoeffizienten der einzelnen Fettsäuremethylester zwischen Trägergas und stationärer Phase unterschiedlich schnell eluiert.

Als mobile Phase wird Helium verwendet. Die stationäre Phase („GC-Säule“) besteht aus der Auskleidung bzw. Packung einer 60 m langen Glaskapillare mit Quarz. Die GC-Säule befindet sich in einem temperierbaren Ofen, der sie mit einem Temperaturgradienten beheizt, der für die Trennung der Probe optimal ist.

Die Verweildauer der Analyte auf der Säule ist proportional zu der Affinität zur stationären Phase. Nach Elution erscheinen sie an dem nachgeschalteten Detektor, der die austretenden Stoffe proportional zur Menge in ein Messsignal umwandelt. Die Messsignale über die Zeit ergeben ein Chromatogramm mit einzelnen Peaks (Abb. 26). Die Fläche der Peaks ist proportional zur Stoffmenge. Wie bei der HPLC wird auch ein interner Standard benutzt und zusätzlich werden die Daten um die stoffspezifischen, molaren Responsefaktoren der jeweiligen FS-Methylester korrigiert, um die Konzentration der Stoffe in der Probe zu berechnen.

Die Bestandteile des verwendeten GC-Gerätes Hewlett Packard 5890 A:

Tabelle 29: Bestandteile des GC-Gerätes

Injektor	Split-Splitless-Injektor: Splitinjektion Autosampler HP 7673 A, Hewlett Packard
Integrator	HP 3396 A, Hewlett Packard
Trennsäule (Stationäre Phase)	Free-fatty-acid-phase Quarz-Kapillarsäule (FFAP-DF), RTX 2330, Länge 60 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm df
Trägergas (Mobile Phase)	Helium
Detektor	Flammenionisationsdetektor mit Stickstoff und Sauerstoff (80:20) und Wasserstoff als Brenngase
GC-Software	HP ChemStation

### 3. Material und Methodik

GC-Chromatogramm:

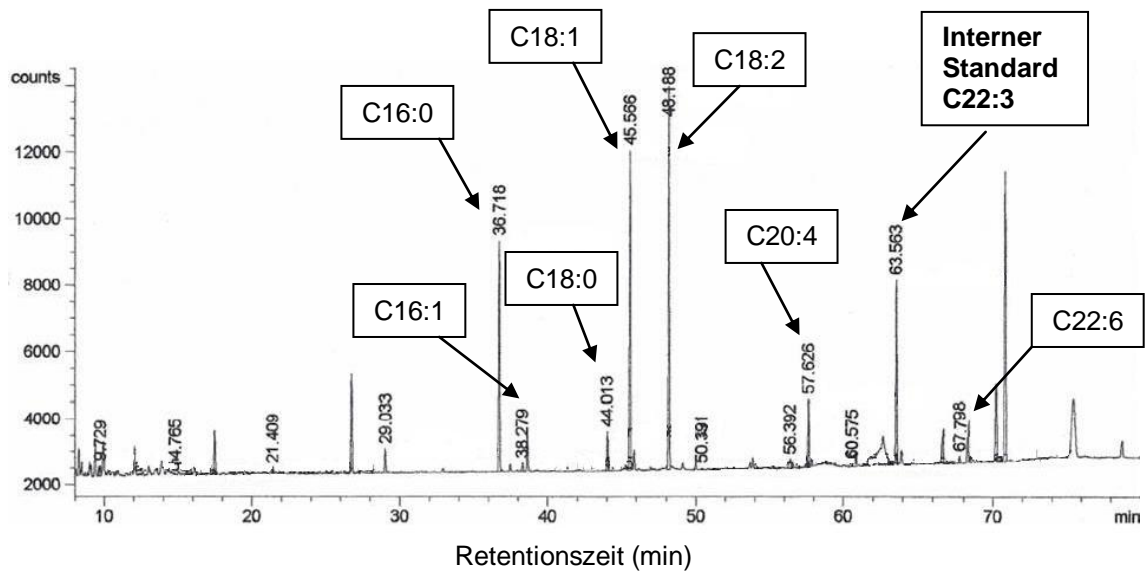


Abbildung 26: Beispiel für GC-Chromatogramm (P1 t = 24 h)

#### 3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) bzw. F-Test bei zwei voneinander unabhängigen Stichproben (Kontroll- und CF-Gruppe) [157, 158]. Das Messniveau war stetig und normalverteilt. Das Ergebnis des Signifikanztests ist der p-Wert. Er ist abhängig von der Differenz der Mittelwerte, der Standardabweichung und den Stichprobenumfängen [159]. Bei einem gewählten Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  liegt eine statistische Signifikanz vor, wenn der p-Wert kleiner ist als das Signifikanzniveau [159]. Ergibt sich ein nicht-signifikantes Ergebnis, bedeutet dies nicht, dass kein Unterschied zwischen den Stichproben besteht [159].

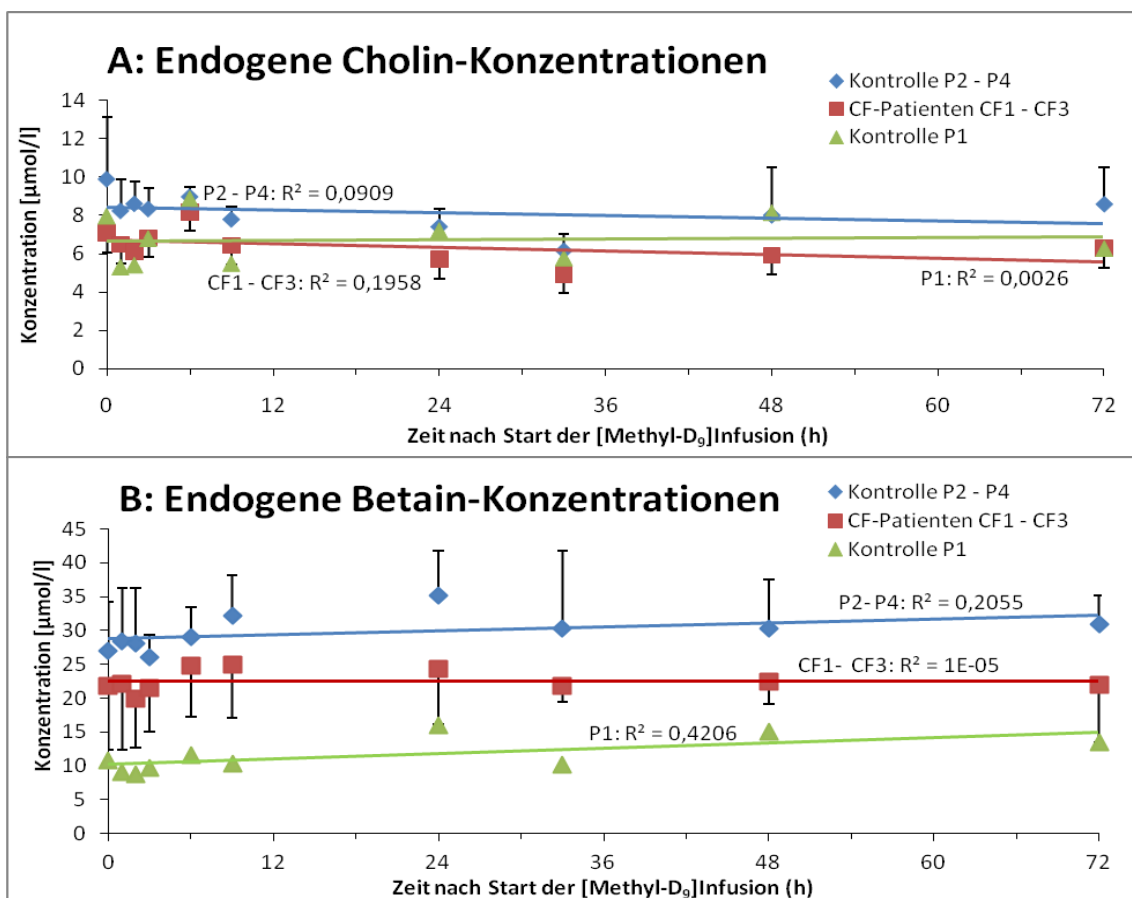
## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Massenspektrometrie der wässrigen Metabolite

##### 4.1.1. Kinetik des endogenen Cholins, endogenen Betains und endogenen Phosphocholins

Die Konzentrationen des endogenen Cholins sowie des endogenen Betains waren bei beiden Studiengruppen weitgehend konstant über die Zeit (Abb. 27A und B). Die Konzentrationen des endogenen Phosphocholins hingegen zeigten bei unseren Messungen größere Schwankungen (Abb. 27 C).



#### 4. Ergebnisse

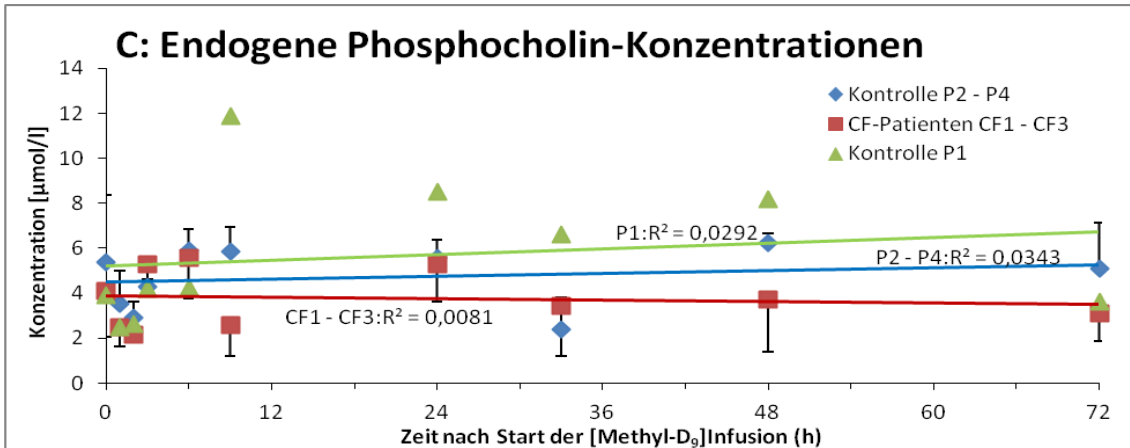


Abbildung 27: Endogene Cholin- (A), Betain- (B) und Phosphocholin-Konzentrationen (C) im Blutplasma

Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion; Daten sind MW ± SD: Kontrolle P1, Kontrollen P2 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

Die mittlere Cholin-Konzentration war bei den CF-Patienten um 22 % geringer als bei den Kontrollen P2 – P4. Der Effekt war statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Tab. 30). Die Cholin-Konzentration der weiblichen Probandin P1 lag unter den Werten der männlichen Kontrollen, jedoch über den Werten der CF-Patienten.

Die durchschnittliche Konzentration des endogenen Betains lag bei den CF-Patienten um 24 % niedriger als bei den Kontrollprobanden P2 – P4. Dieses Ergebnis war nicht signifikant ( $p > 0,05$ , Tab. 30). Die durchschnittliche Betain-Konzentration von P1 lag um 61 % unterhalb der übrigen Kontrollwerte und 49 % unter den Werten der CF-Patienten.

Die mittlere Konzentration des endogenen Phosphocholins lag bei den CF-Patienten etwas niedriger als bei den Kontrollprobanden P2 – P4 (Tab. 30). Die mittlere Phosphocholin-Konzentration der Probandin P1 war leicht erhöht im Vergleich zu den übrigen Kontrollen.

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 30: Endogene Cholin, Betain und Phosphocholin-Konzentrationen im Blutplasma Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und F-Test (p-Wert): Kontrolle P1 ist ausgeschlossen. Kontrolle P1, Kontrollen P2 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (10fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).<sup>2</sup>

	Mittelwert (µmol/l)	SD (µmol/l)	p-Wert
<b>Endogene Cholin-Konzentrationen</b>			
Kontrolle P1	6,73		
Kontrollen P2 – P4	8,19	1,08	0,1357
CF-Patienten CF1 – CF3	6,40	1,27	
<b>Endogene Betain-Konzentrationen</b>			
Kontrolle P1	11,49		
Kontrollen P2 – P4	29,72	5,97	0,2390
CF-Patienten CF1 – CF3	22,51	6,78	
<b>Endogene Phosphocholin-Konzentrationen</b>			
Kontrolle P1	5,62		
Kontrollen P2 – P4	4,72	1,79	
CF-Patienten CF1 – CF3	3,77	1,79	

#### 4.1.2. Kinetik des [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholins, [Methyl-D<sub>9</sub>]Betains und [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholins

Die Konzentration von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin im Zeitverlauf (Abb. 28A) zeigte einen Anstieg bis drei Stunden nach Infusionsbeginn. Danach sank die Konzentration innerhalb weiterer drei Stunden wieder auf 0 ab. Dabei bestand kein Unterschied zwischen den Kontrollen und CF-Patienten.

Die [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain-Konzentration erreichte innerhalb von drei Stunden nach Infusionsbeginn ihr Maximum von  $5,22 \pm 0,56$  µmol/l bei den Kontrollprobanden P2 – P4 und  $4,51 \pm 0,98$  µmol/l bei den CF-Patienten (Abb. 28B). Nachfolgend sank die D<sub>9</sub>-Betain-Konzentration rasch ab, allerdings langsamer als die D<sub>9</sub>-Cholin-Konzentration. Bei der weiblichen Kontrollprobandin P1 lag die [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain-Konzentration unter den Werten der übrigen Kontrollen und der CF-Patienten.

Die Kinetik des D<sub>9</sub>-Phosphocholins (Abb. 28C) war grundverschieden von den zuvor beschriebenen Konzentrationsverläufen des D<sub>9</sub>-Cholins und D<sub>9</sub>-Betains. D<sub>9</sub>-Phosphocholin begann erst nach 6 Stunden im Blut anzusteigen und war bis zum Ende der Studie nach 72 Stunden konstant. Dabei lag die [Methyl-

<sup>2</sup> Gesamtdaten des endogenen Cholins befinden sich im Anhang (Tab. 40).

#### 4. Ergebnisse

D<sub>9</sub>]Phosphocholin-Konzentration der einzigen weiblichen Probandin unter den übrigen Werten.

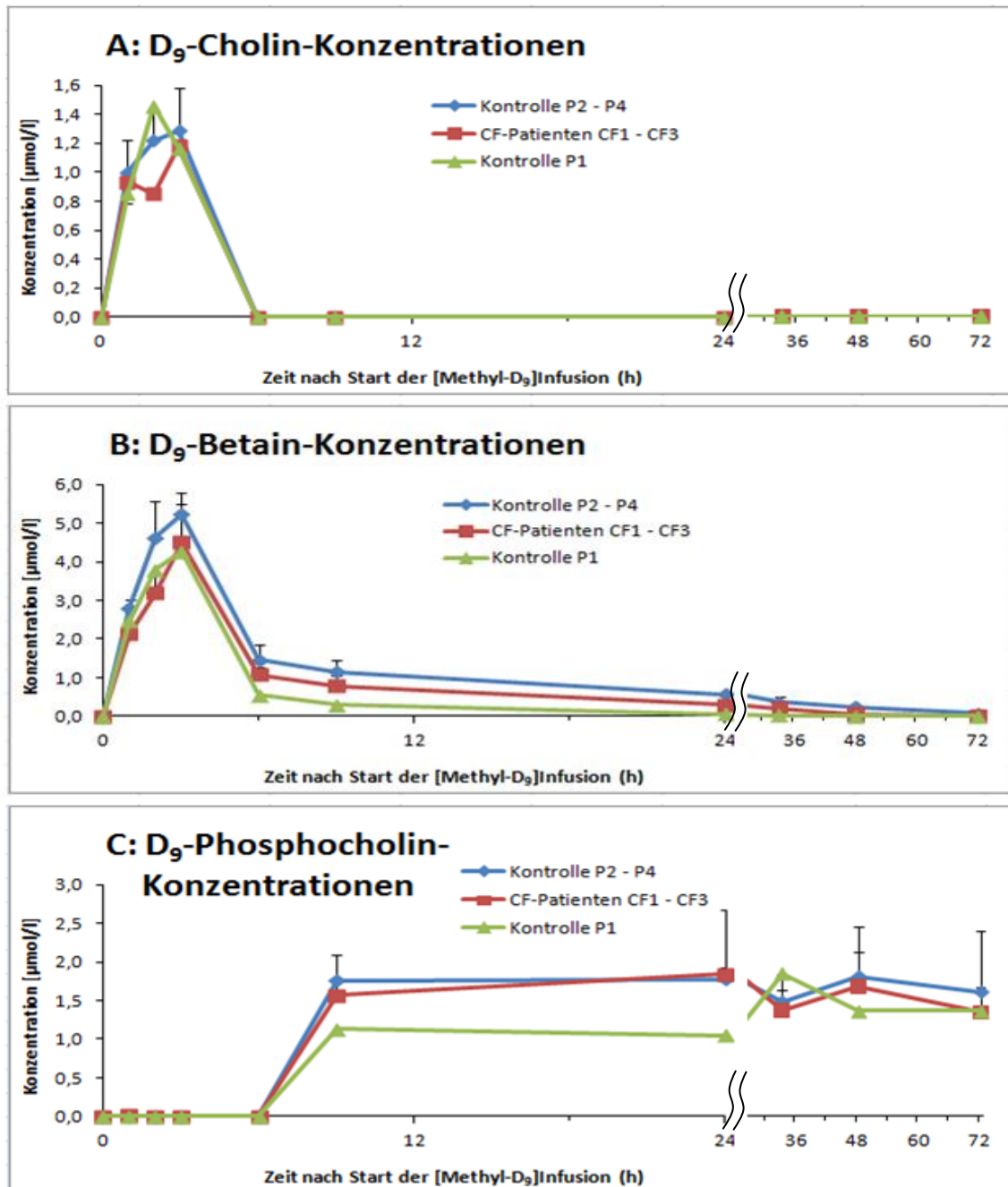


Abbildung 28: D<sub>9</sub>-Cholin- (A), D<sub>9</sub>-Betain- (B) und D<sub>9</sub>-Phosphocholin-Konzentrationen (C) im Blutplasma

Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion; 0 – 24 h gestreckt, 24 – 72 h gestaucht. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

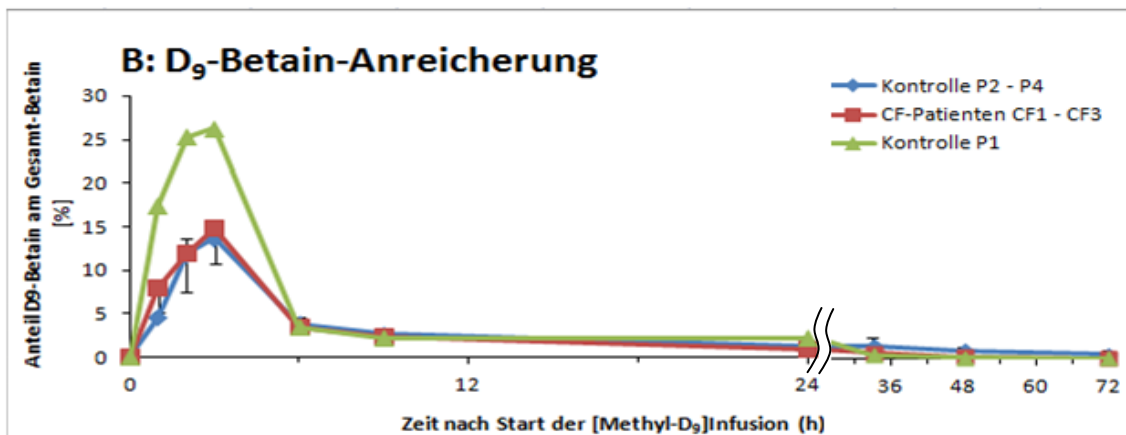
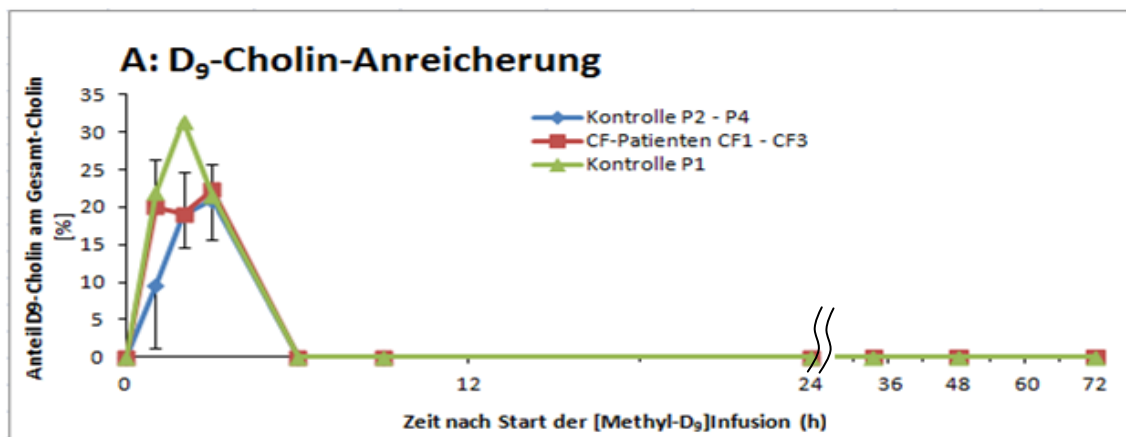
## 4. Ergebnisse

### 4.1.3. [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin-, [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain- und [Methyl-D<sub>9</sub>]-Phosphocholin-Anreicherung

In Abbildung 29A wird der Anteil des D<sub>9</sub>-Cholins am Gesamt-Cholin ([Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin-Anreicherung) im Zeitverlauf dargestellt. Sie nahm bei den Kontrollprobanden bis zum Zeitpunkt t = 2 h zu bzw. bei den CF-Patienten bis t = 3 h. Nach 6 Stunden war das zirkulierende Cholin nicht mehr D<sub>9</sub>-markiert.

Die Anreicherung des [Methyl-D<sub>9</sub>]Betains im Blutplasma (Abb. 29B) erreichte nach 3 Stunden den Höhepunkt und nahm danach rasch ab. Dies war für die männlichen Kontrollen und CF-Patienten gleich, bei der weiblichen Probandin hingegen war die D<sub>9</sub>-Betain-Anreicherung im Plasma fast doppelt so hoch.

Im Gegensatz dazu begann die [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin-Anreicherung erst nach 6 Stunden und war bis zum Versuchsende erhöht nachweisbar (Abb. 29C). Hierbei war die D<sub>9</sub>-Phosphocholin-Anreicherung der weiblichen P1 deutlich erniedrigt.





#### 4. Ergebnisse

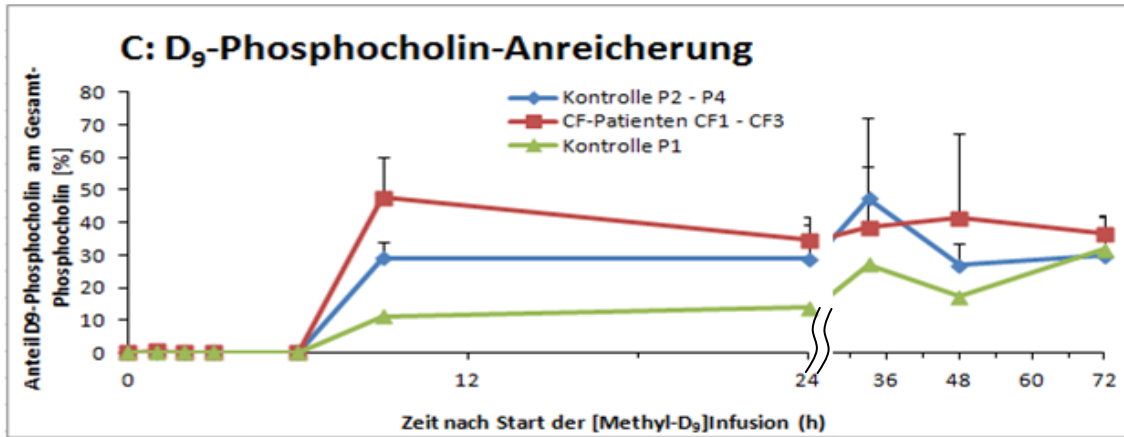


Abbildung 29: D<sub>9</sub>-Cholin- (A), D<sub>9</sub>-Betain- (B) und D<sub>9</sub>-Phosphocholin-Anreicherung (C) Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion; 0 – 24 h gestreckt, 24 – 72 h gestaucht. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

#### 4.2. Phospholipid-Konzentrationen im Blutplasma

Die Phospholipid-Konzentrationen im Blutplasma waren sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den CF-Patienten über die Zeit nach Infusionsbeginn konstant.

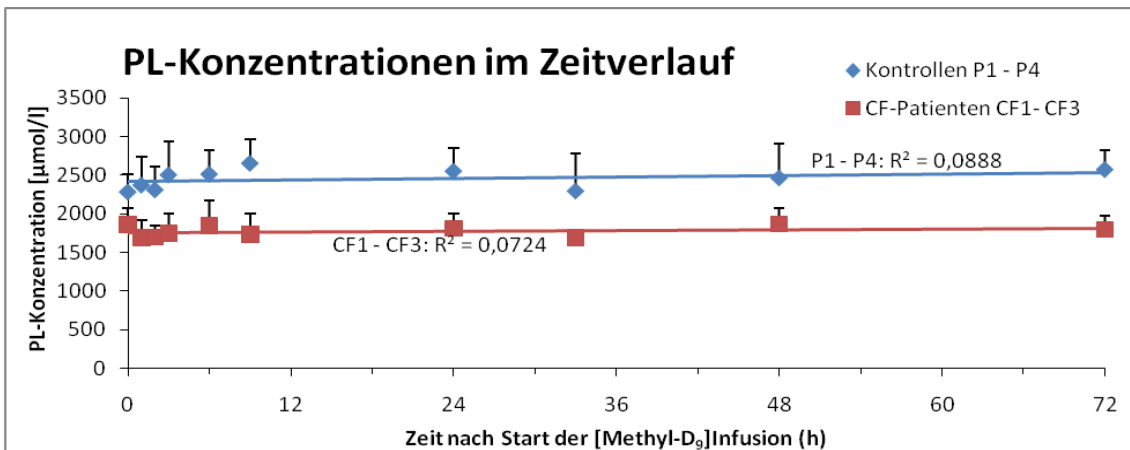


Abbildung 30: PL-Konzentrationen im Zeitverlauf Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion; Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

Es zeigte sich jedoch, dass die gesamte PL-Konzentration bei den CF-Patienten signifikant niedriger war als bei den Kontrollprobanden ( $p < 0,05$ ) (Abb. 30 und 31A, Tab. 31).

## 4. Ergebnisse

Tabelle 31: Phospholipid-Konzentrationen im Blutplasma

Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und F-Test (p-Wert): Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (10fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

<b>Phospholipid-Konzentrationen</b>			
	Mittelwert (µmol/l)	SD (µmol/l)	p-Wert
Kontrollen P1 – P4	2455	290	0,0167
CF-Patienten CF1 – CF3	1776	178	

### 4.3. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Analytik des Plasma-PCs

#### 4.3.1. Anteil des Phosphatidylcholins an Gesamt-Phospholipiden und PC-Konzentration im Blutplasma

Der Anteil des Phosphatidylcholins an den Gesamt-Phospholipiden lag bei den Kontrollprobanden bei  $64,52 \pm 5,95$  %, bei den CF-Patienten mit  $53,89 \pm 4,94$  % jedoch wesentlich niedriger (Abb. 31B). Die daraus errechnete PC-Konzentration lag bei den CF-Patienten um 36 % signifikant niedriger als bei den Kontrollprobanden (Tab. 32 und Abb. 31C). Es gab keinen Hinweis darauf, dass die weibliche Kontrolle (P1) eine grundsätzlich andere Phospholipidhomöostase hatte als P2 – P4, sodass die Werte zusammengefasst wurden.

Tabelle 32: Phosphatidylcholin-Konzentrationen im Blutplasma

Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und F-Test (p-Wert): Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

<b>Phosphatidylcholin-Konzentrationen</b>			
	Mittelwert (µmol/l)	SD (µmol/l)	p-Wert
Kontrollen P1 – P4	1573	150	0,0070
CF-Patienten CF1 – CF3	1001	195	

## 4. Ergebnisse

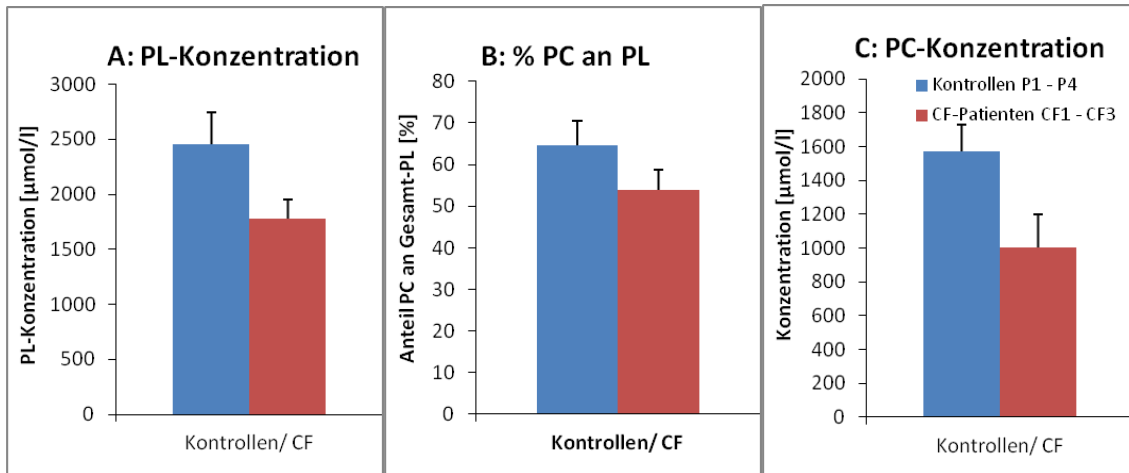


Abbildung 31 : PL- und PC-Konzentrationen im Blutplasma

A: Gesamt-PL-Konzentration im Blutplasma

B: Anteil des Phosphatidylcholins an den Gesamt-Phospholipiden

C: PC-Konzentration im Blutplasma, berechnet aus PL-Konzentration (Kap. 4.2) und Anteil PC an PL<sup>3</sup>

Daten sind MW  $\pm$  SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

### 4.3.2. Molekulare Zusammensetzung von Phosphatidylcholin

Die einzelnen molekularen PC-Spezies im Blutplasma wurden als prozentualer Anteil am Gesamt-Phosphatidylcholin berechnet und in Abb. 32 dargestellt. Bei den Kontrollprobanden war die Haupt-PC-Komponente im Blutplasma PC16:0/18:2, gefolgt von PC18:0/18:2, PC16:0/18:1, PC16:0/20:4 und PC18:0/20:4. Bei den CF-Patienten stellten ebenfalls diese 5 PC-Spezies die Hauptkomponenten im Blutplasma dar, ihr prozentualer Anteil im Vergleich zu den Kontrollen war leicht verändert. PC16:0/18:2 war im Vergleich zu den Kontrollen erniedrigt, der Anteil des PC16:0/18:1 erhöht. Bei den 20:4-haltigen PC-Komponenten bestanden keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und CF-Patienten.

<sup>3</sup> Die PC-Konzentration berechnet sich als arithmetischer Mittelwert des Produkts der PL-Konzentration und des PC-Anteils an PL (siehe Anhang), nicht als Produkt der arithmetischen Mittelwerte beider Faktoren.

#### 4. Ergebnisse

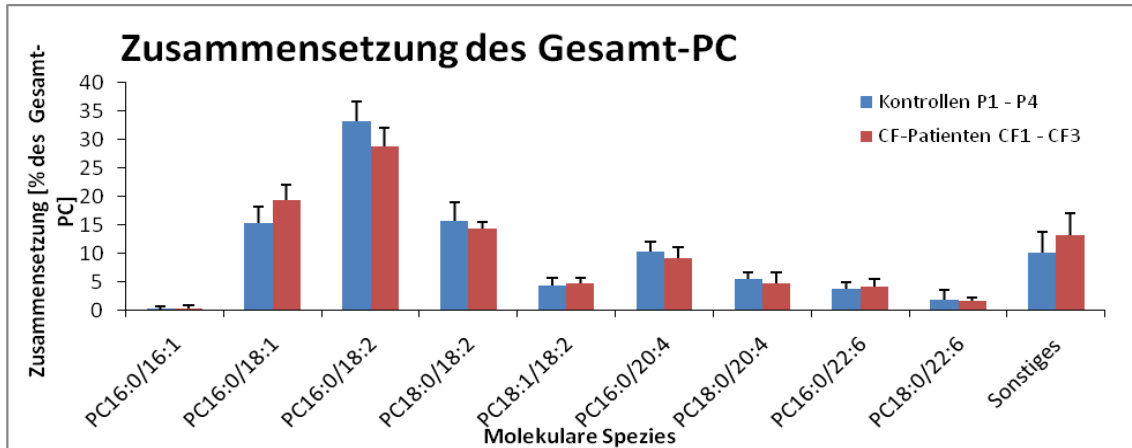


Abbildung 32: Zusammensetzung des Gesamt-PC: Molekulare PC-Spezies

Daten sind MW  $\pm$  SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

Die 18:1- zu 18:2-Ratio lag bei den Kontrollprobanden mit  $0,38 \pm 0,09$  um 25 % niedriger als bei den CF-Patienten ( $0,51 \pm 0,08$ ). Damit bestand bei CF-Patienten eine Tendenz zu mehr 18:1 und weniger 18:2-enthaltende PC-Spezies im Blutplasma.

Die mono- und diunsaturierten PC-Spezies zusammengenommen machten bei beiden Studiengruppen den weitaus größeren Anteil der Phosphatidylcholin-Spezies aus (Tab. 33). Einen deutlich geringeren Anteil hatten die polyunsaturierten PC-Spezies. Der Anteil 20:4-haltiger PC-Spezies an den PUFA-PC-Spezies war bei den CF-Patienten um 12,5 % geringer als bei den Kontrollen, der Anteil 22:6-haltiger PC-Spezies entsprechend um 12,5 % höher.

Tabelle 33: Zusammensetzung der PC-Spezies im Blutplasma, aufgeteilt nach mono-/di-unsaturierte und polyunsaturierte PC-Spezies  
Mittelwerte und Standardabweichungen (SD): Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

<b>Zusammensetzung der PC-Spezies</b>				
PC-Spezies	Kontrollen P1 – P4		CF-Patienten CF1 – CF3	
	Mittelwert (%)	SD (%)	Mittelwert (%)	SD (%)
Mono-/ di-unsaturierte Spezies	68,52	4,38	67,36	4,62
Polyunsaturierte Spezies: Davon:	21,33	2,86	19,51	3,10
- 20:4-Spezies	75,75	2,35	63,21	1,29
- 22:6-Spezies	24,25	2,35	36,79	1,29

## 4. Ergebnisse

### 4.3.3. Konzentrationen der Phosphatidylcholin-Spezies

Die absoluten molaren Konzentrationen aller PC-Spezies waren bei den CF-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden erniedrigt (Abb. 33). Am deutlichsten war die Haupt-PC-Komponente PC16:0/18:2 verringert. Sie lag bei den CF-Patienten um 45 % niedriger als bei den Kontrollen.

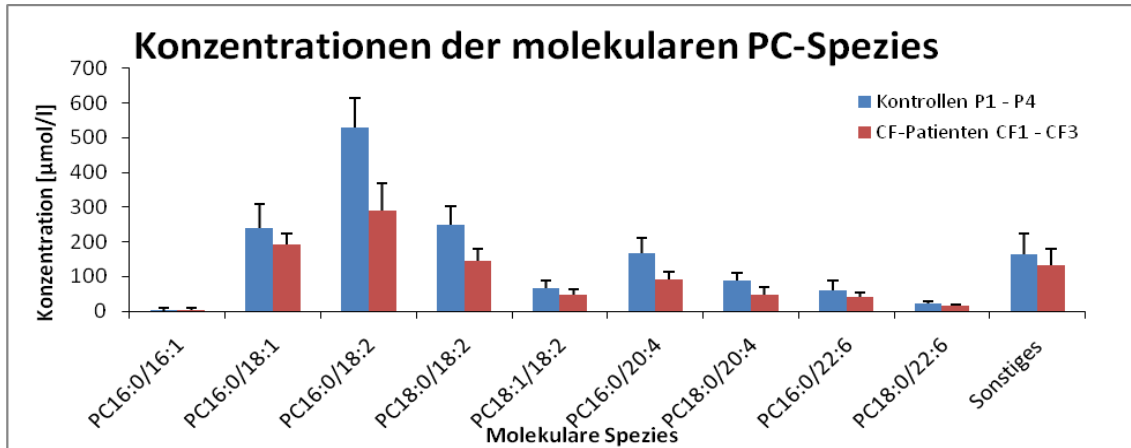


Abbildung 33: Konzentrationen der molekularen PC-Spezies

Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

Die Konzentration der mono- und diunsaturierte PC-Spezies (Tab. 34) war bei den CF-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden um 38 % verringert, die der PUFA-PC-Spezies um 43 %.

Tabelle 34: Konzentration mono- und diunsaturierter PC-Spezies sowie polyunsaturierter (PUFA) PC-Spezies

Mittelwerte und Standardabweichungen (SD): Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

Konzentration der PC-Spezies				
PC-Spezies	Kontrollen P1 – P4		CF-Patienten CF1 – CF3	
	Mittelwert (μmol/l)	SD (μmol/l)	Mittelwert (μmol/l)	SD (μmol/l)
Mono-/ di-unsaturierte Spezies	1088,27	174,89	676,00	150,82
PUFA- Spezies	340,65	85,62	193,19	40,15

## 4. Ergebnisse

### 4.4. Massenspektrometrie der Phosphatidylcholine

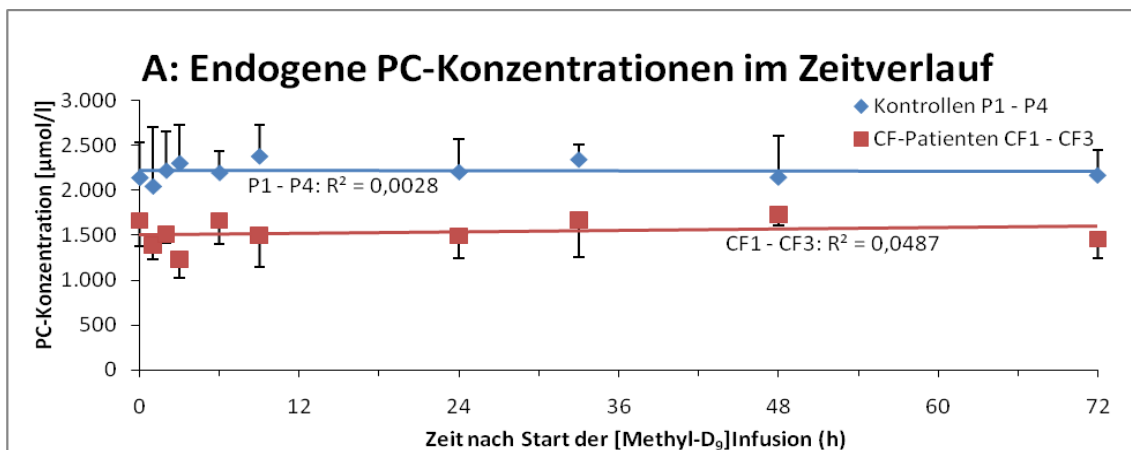
#### 4.4.1. Endogene PC-Konzentration im Blutplasma

Die Konzentrationen endogener PC-Spezies im Plasma gemessen über die Massenspektrometrie werden in Abbildung 34 dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen über die Versuchsdauer (Abb. 34A). Jedoch lag die gesamte endogene PC-Konzentration im Blutplasma (Abb. 34B) bei den CF-Patienten mit 31 % signifikant niedriger als bei den Kontrollprobanden ( $p < 0,05$ ) (Tab. 35).

Die durch Massenspektrometrie erhaltenen PC-Konzentrationen lagen über den HPLC-Daten (siehe Kap. 4.3.1.) für die PC-Konzentrationen.

Tabelle 35: Phosphatidylcholin-Konzentrationen im Blutplasma  
Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und F-Test (p-Wert): Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

Phosphatidylcholin-Konzentrationen			
	Mittelwert ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD ( $\mu\text{mol/l}$ )	p-Wert
Kontrollen P1 – P4	2218	306	0,0156
CF-Patienten CF1 – CF3	1531	125	



#### 4. Ergebnisse

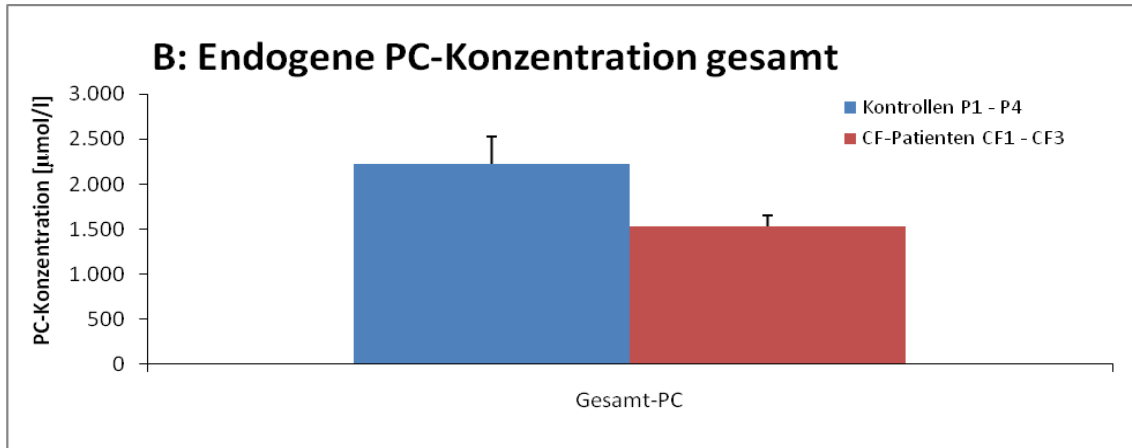


Abbildung 34: Endogene PC-Konzentrationen im Blutplasma im Zeitverlauf (A) und gesamt (B) Daten sind MW  $\pm$  SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (10fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

#### 4.4.2. Zusammensetzung des endogenen Phosphatidylcholins

Die PC-Spezies wurden zur Vereinfachung in Gruppen zusammengefasst (Tab. 36). Anlass dafür war insbesondere, dass mono- und diunsaturierte PCs überwiegend via CDP-Cholin-Pathway entstehen, C22:6-haltige vorwiegend über den PEMT-Pathway und C20:4-haltige über beide Synthesewege.

Tabelle 36: Gruppeneinteilung der PC-Spezies entsprechend ihrer Fettsäurereste

Gruppen	PC-Spezies
1: Monounsaturierte PC-Spezies	PC16:0/16:1 + PC16:0/18:1 + PC18:0/18:1
2: Diunsaturierte PC-Spezies	PC16:0/18:2 + PC18:0/18:2 + PC18:1/18:2
3: 20:4-PC-Spezies	PC16:0/20:4 + PC18:0/20:4 + PC18:1/20:4
4: 22:6-PC-Spezies	PC16:0/22:6 + PC18:0/22:6

Endogenes PC enthielt hauptsächlich mono- und diunsaturierte PC-Spezies mit gleichem Anteil in beiden Versuchsgruppen. Die übrigen endogenen PC-Spezies stellten die polyunsaturierten PC-Spezies (PUFA) dar (Abb. 35A). Hierbei machten PC-Spezies mit Arachidonsäure (20:4) den größeren Teil gegenüber denjenigen mit Dokosahexaensäure (22:6) aus. Der Anteil der 20:4- bzw. 22:6-PC-Spezies an der PUFA-PC-Spezies betrug 83 % bzw. 17 % bei den Kontrollen sowie den CF-Patienten (Abb. 35B).

## 4. Ergebnisse

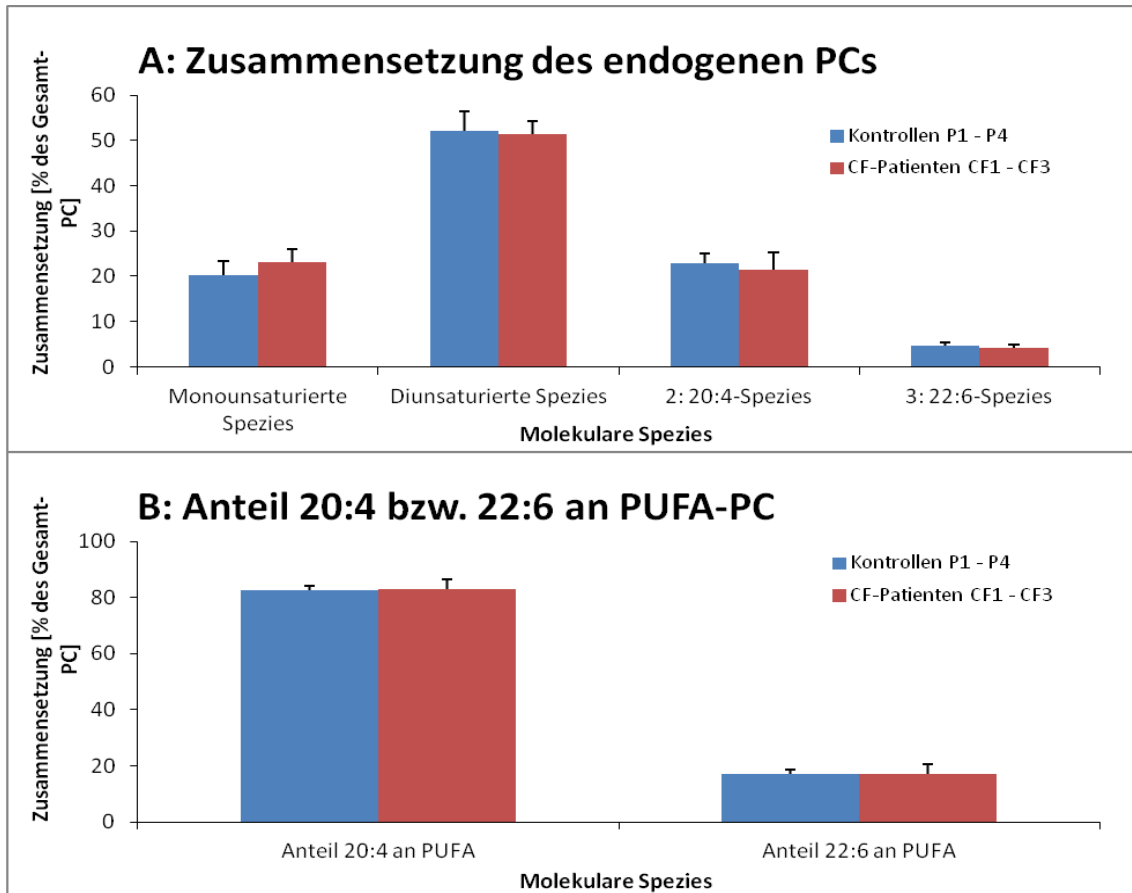


Abbildung 35: Zusammensetzung des endogenen PCs

A: Zusammensetzung des endogenen PCs, aufgeteilt in mono-, di- und polyunsaturierte PC-Spezies

B: Anteil der 20:4- bzw. 22:6-PC-Spezies an den PUFA-PC-Spezies

Daten sind  $MW \pm SD$ : Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (10fach, 0 - 72 h nach [Methyl- $D_9$ ]Infusion).

### 4.4.3. Konzentrationen der endogenen PC-Spezies

Die absoluten molaren Konzentrationen der endogenen PC-Spezies gemessen über die Massenspektrometrie sind genauso wie die HPLC-Werte bei den CF-Patienten für alle PC-Spezies gegenüber den Kontrollprobanden erniedrigt (Abb. 36).



## 4. Ergebnisse

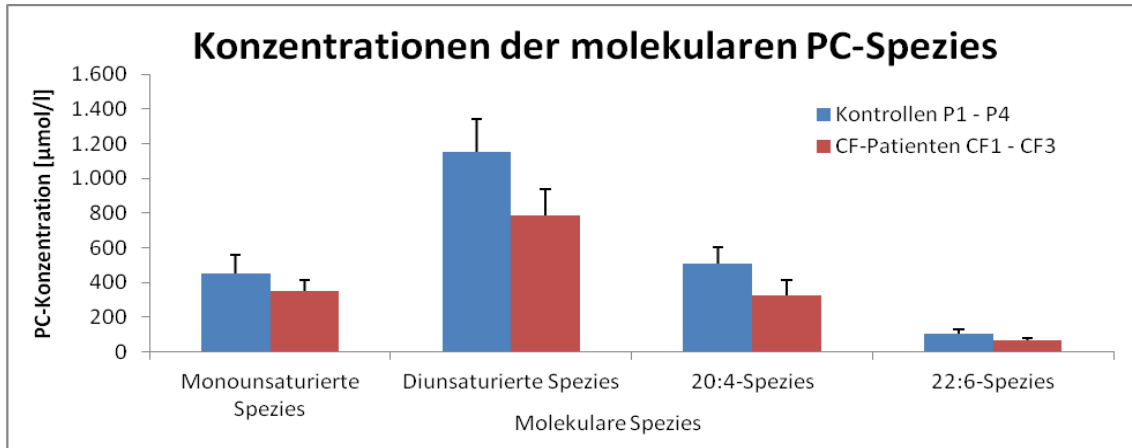


Abbildung 36: Konzentrationen der endogenen PC-Spezies

Daten sind MW  $\pm$  SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (10fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

### 4.4.4. Zusammensetzung des [Methyl-D<sub>9</sub>]- und [Methyl-D<sub>3</sub>]PCs im Zeitverlauf

Die Abbildungen 37 zeigen die unterschiedliche Zusammensetzung des über den Kennedy-Pathway ([Methyl-D<sub>9</sub>]PC) und den PEMT-Pathway ([Methyl-D<sub>3</sub>]PC) entstandenen Phosphatidylcholins bei gesunden Kontrollen und CF-Patienten.

Das initiale Markierungspattern war gegenüber dem Homöostasenlevel für den Kennedy-Pathway (Abb. 37A/B) grundsätzlich verschieden. Die monounsaturierten D<sub>9</sub>-PC-Spezies der Gruppe 1 waren direkt nach Infusionsbeginn im Blutplasma leicht erhöht, die diunsaturierten D<sub>9</sub>-PC-Spezies der Gruppe 2 erniedrigt gegenüber dem endogenen Niveau, das jedoch ab dem Zeitpunkt t = 24 - 33 h wieder erreicht wurde. Der prozentuale Anteil der Arachidonsäure-haltigen PC-Spezies der Gruppe 3 blieb über die Zeit hinweg weitergehend konstant auf endogenem Niveau. Die Gruppe 4-PC-Spezies hingegen, die Dokosahexaensäure enthalten, waren zu den frühen Zeitpunkten vermehrt im Blutplasma vorhanden, wurden dann zunehmend verbraucht.

Insgesamt war dabei kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den CF-Patienten zu erkennen.

#### 4. Ergebnisse

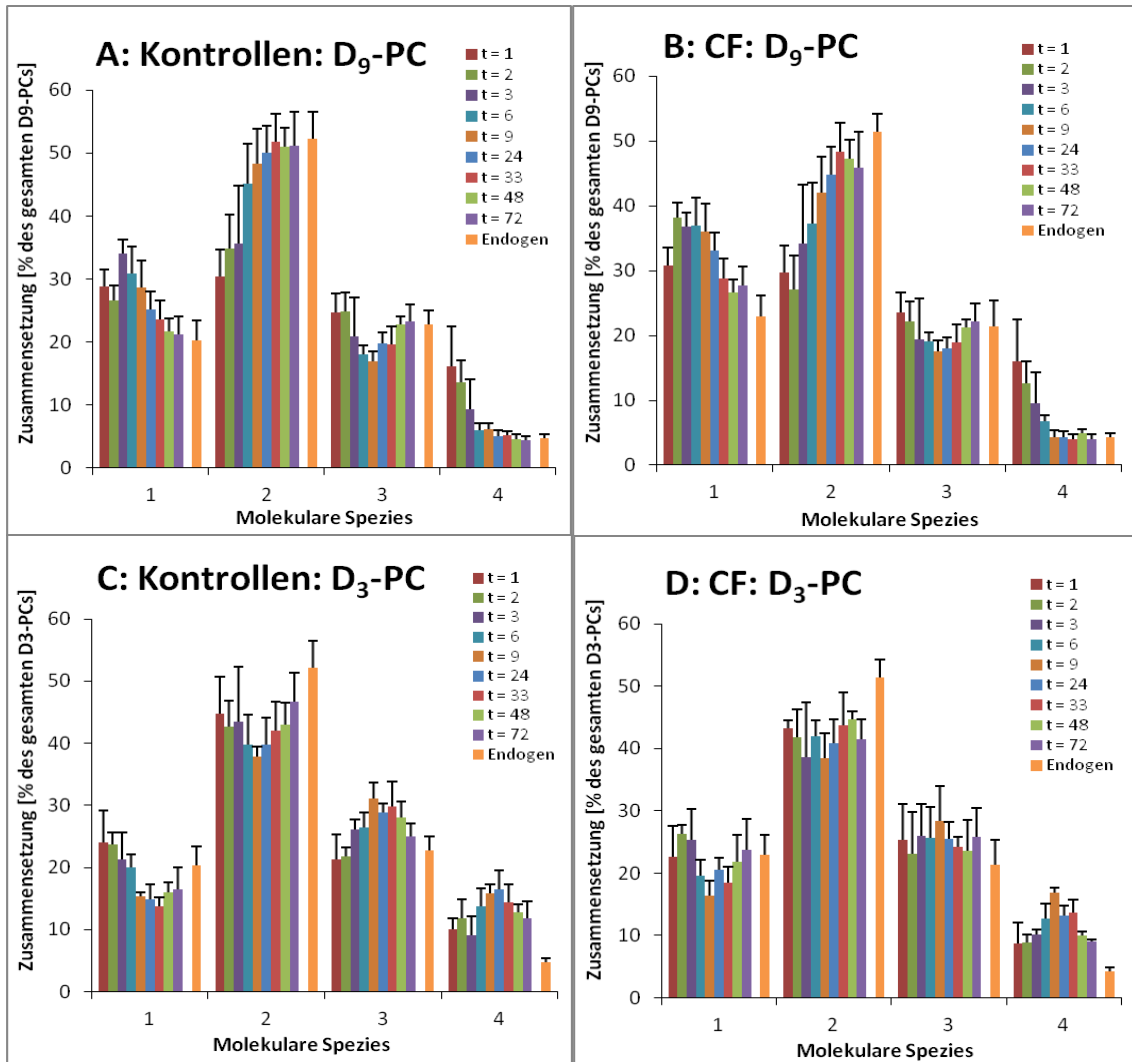


Abbildung 37: Zusammensetzung der molekularen D<sub>9</sub>- und D<sub>3</sub>-PC-Spezies

Gruppe 1: Monounsaturierte PC-Spezies

Gruppe 2: Diunsaturierte PC-Spezies

Gruppe 3: 20:4-PC-Spezies

Gruppe 4: 22:6-PC-Spezies

Im Zeitverlauf 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion im Bezug zum endogenen PC. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

Das Markierungsmuster für den PEMT-Pathway (Abb. 37C/D) war ebenfalls verschieden zu dem des endogenen PCs. Der Anteil der monounsaturierten PC-Spezies der Gruppe 1 war weitgehend konstant auf endogenem Niveau. Die diunsaturierten PC-Spezies der Gruppe 2, die über den PEMT-Pathway entstehen, waren insgesamt leicht vermindert. Der Anteil der PUFA-D<sub>3</sub>-PC-Spezies (Gruppe 3 und 4) nahm über die Zeit zu und erreichte danach wieder das endogene Level. Insgesamt befanden sich vermehrt länger-kettige PUFA-

## 4. Ergebnisse

D<sub>3</sub>-PC-Spezies im Blutplasma. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und CF-Patienten.

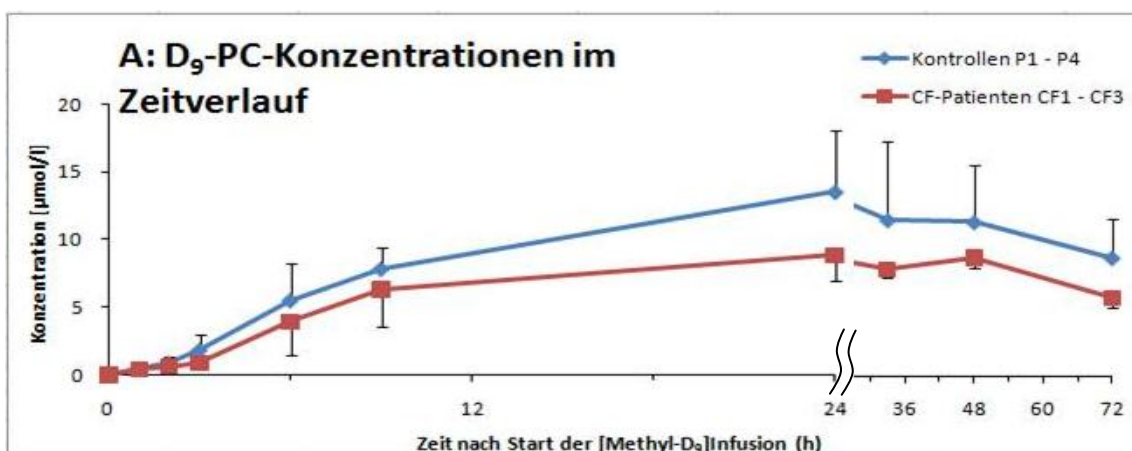
Bei beiden Synthesewegen stellte sich nach ca. 72 Stunden ein Gleichgewicht der PC-Zusammensetzung ein, die der endogenen PC-Zusammensetzung entsprach.

### 4.4.5. Konzentrationen des [Methyl-D<sub>9</sub>]- und [Methyl-D<sub>3</sub>]PCs im Zeitverlauf

In der Abbildung 38 ist im Gegensatz zu den konstanten endogenen PC-Konzentrationen die Kinetik der gesamten [Methyl-D<sub>9</sub>]- und [Methyl-D<sub>3</sub>]PC-Konzentrationen im Zeitverlauf dargestellt.

Die D<sub>9</sub>-PC-Konzentrationen (Abb. 38A) nahmen sowohl bei den Kontrollen als auch bei den CF-Patienten über die Zeit zu. Das Maximum war bei t = 24 h erreicht. Es lag bei den Kontrollprobanden mit  $13,51 \pm 4,61 \mu\text{mol/l}$  höher als bei den CF-Patienten mit  $8,83 \pm 1,84 \mu\text{mol/l}$ . Danach nahmen die Konzentrationen wieder ab.

Die D<sub>3</sub>-PC-Konzentrationen (Abb. 38B) nahmen anfangs bei beiden Studiengruppen schneller zu als die D<sub>9</sub>-PC-Konzentrationen. Sie erreichten ihr Maximum bei 48 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion. Insgesamt entstand bei den CF-Patienten weniger D<sub>3</sub>-markiertes PC als bei den Kontrollen.



#### 4. Ergebnisse

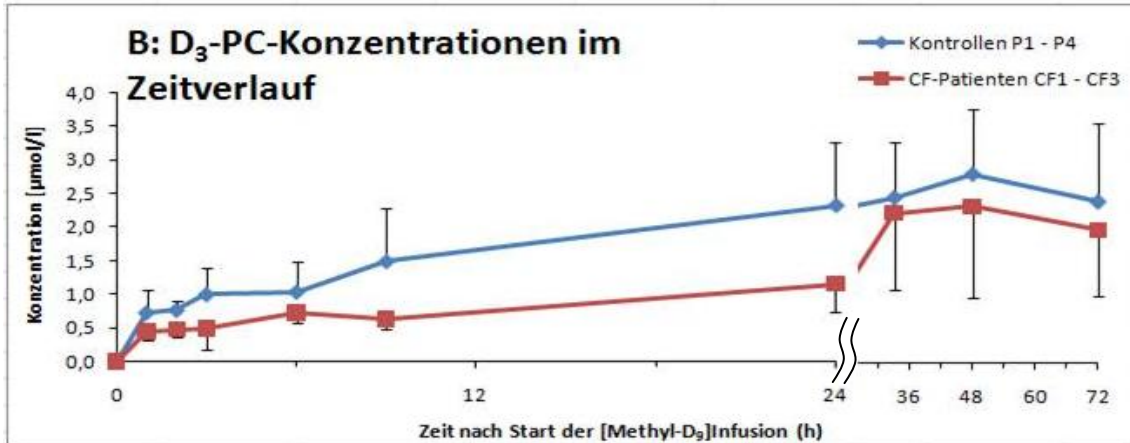


Abbildung 38: D<sub>9</sub>- (A) und D<sub>3</sub>- (B) PC-Konzentrationen im Blutplasma  
Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion; 0 – 24 h gestreckt, 24 – 72 h gestaucht. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

Aus der [Methyl-D<sub>9</sub>]PC-Konzentrationen und der [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin-Anreicherung lässt sich die Gesamtkonzentration der wirklich über den Kennedy-Pathway synthetisierten PCs errechnen. Sie lag bei den CF-Patienten mit 16,37 µmol/l deutlich unter den Kontrollen (P2 – P4: 34,55 µmol/l, P1: 97,19 µmol/l).

Zur weiteren Darstellung der Sekretion und Plasmakinetik von [Methyl-D<sub>9</sub>]- und [Methyl-D<sub>3</sub>]PC wurden die PC-Spezies in oben genannten Gruppen dargestellt (s. Tab. 36).

In Abb. 39 sind die Konzentrationen der [Methyl-D<sub>9</sub>]PCs im Zeitverlauf dargestellt. Die Konzentrationen aller Gruppen nahmen bis ca. 24 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion zu, danach waren sie wieder leicht rückläufig. Bei allen Gruppen lagen jeweils die Konzentrationen der CF-Patienten unter den der Kontrollprobanden.

#### 4. Ergebnisse

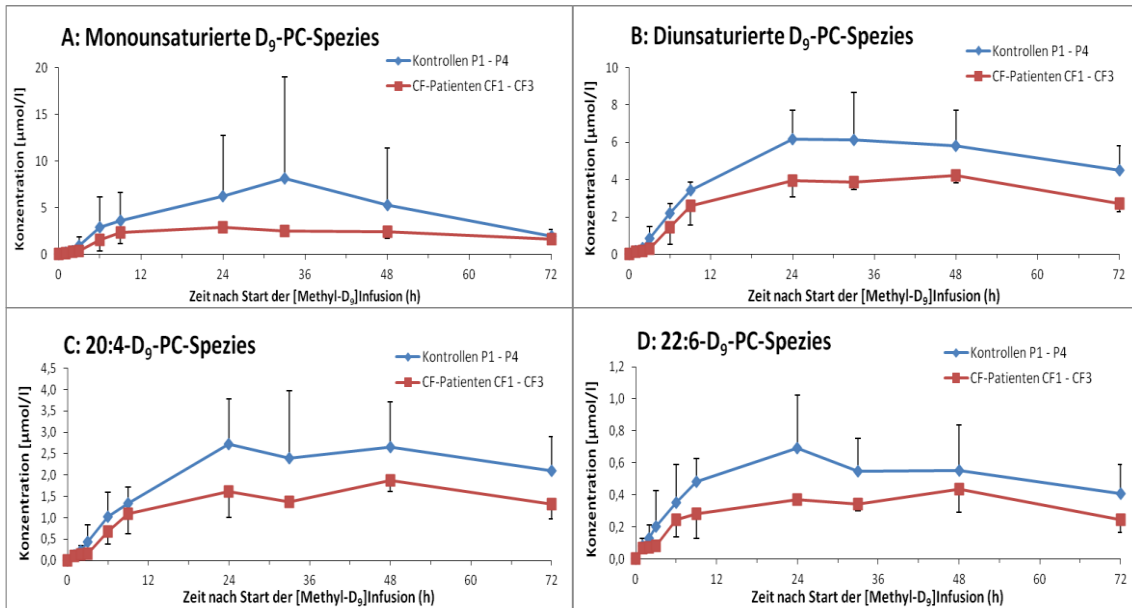


Abbildung 39: Konzentrationen des [Methyl-D<sub>9</sub>]-PCs aufgeteilt nach Gruppen  
Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

Für die Konzentrationen des [Methyl-D<sub>3</sub>]PC im Zeitverlauf (Abb. 40) ergab sich genauso wie für die des [Methyl-D<sub>9</sub>]PC ein Anstieg bis zum Zeitpunkt t = 33 – 48 h. Bei allen Gruppen (mit Ausnahme der monounsaturierten D<sub>3</sub>-PC-Spezies) lagen die Konzentrationen der Kontrollen über den der CF-Patienten.

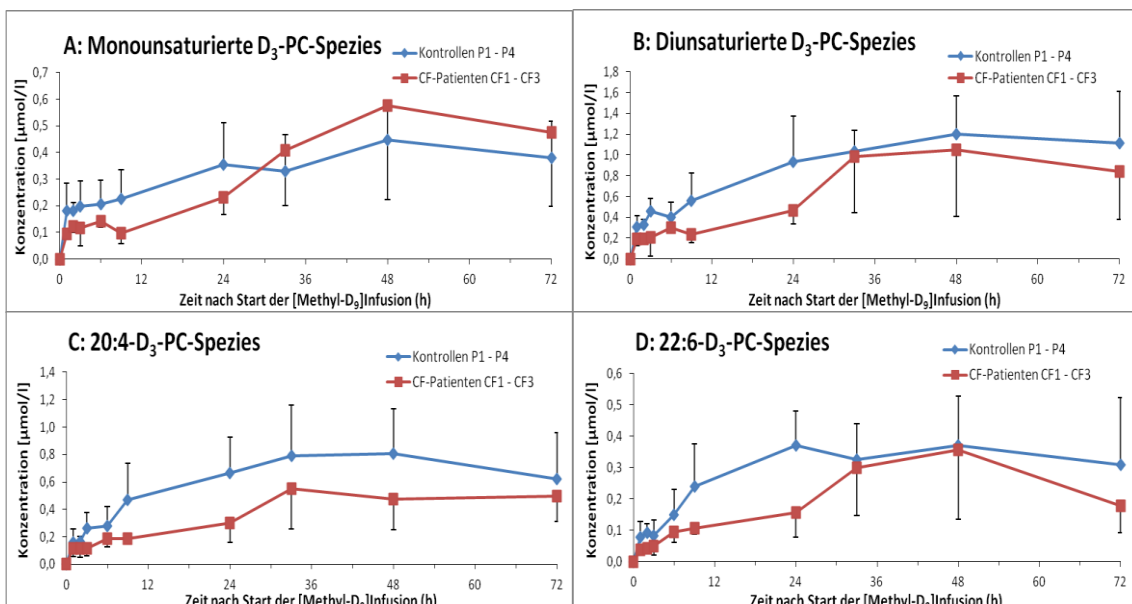


Abbildung 40: Konzentrationen des [Methyl-D<sub>3</sub>]-PCs aufgeteilt nach Gruppen  
Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

## 4. Ergebnisse

### 4.4.6. [Methyl-D<sub>9</sub>]PC- und [Methyl-D<sub>3</sub>]PC- Anreicherung

Abbildung 41 stellt die D<sub>9</sub>-PC- bzw. D<sub>3</sub>-PC-Anreicherung im Plasma dar. Die Anreicherung des D<sub>9</sub>-PC und D<sub>3</sub>-PC erreichte nach ca. 33 Stunden das Maximum und nahm danach wieder langsam ab. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Kontrolle und den CF-Patienten.

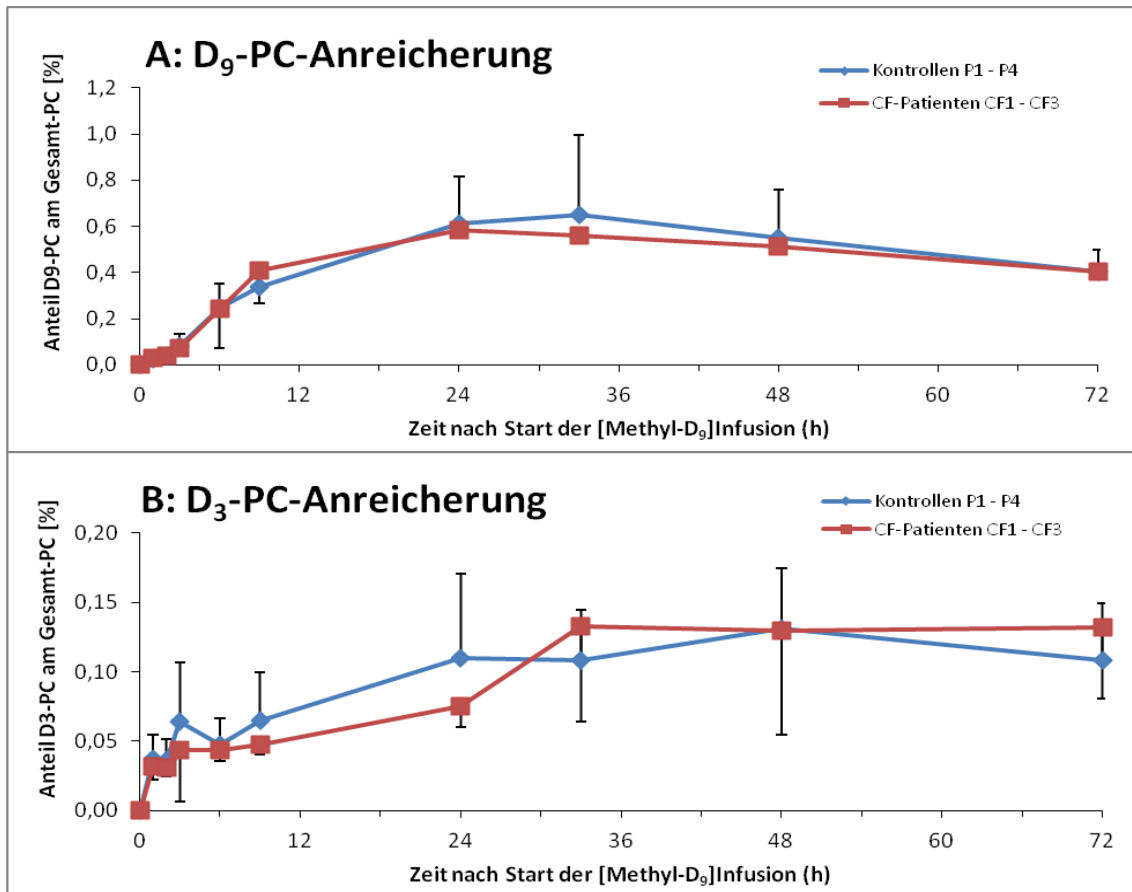


Abbildung 41: D<sub>9</sub>-PC- (A) und D<sub>3</sub>-PC- (B) -Anreicherung  
Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

### 4.4.7. Kinetik des De novo- und PEMT-Pathways

In Abbildung 42A ist der Anteil des D<sub>9</sub>-PCs am gesamten deuterium-markierten und damit neu synthetisierten PC ((D<sub>3</sub>+D<sub>6</sub>+D<sub>9</sub>)-PC) dargestellt. Dieser Anteil spiegelt den relativen Anteil des De novo-Pathways (Kennedy-Pathway) an der Gesamtsynthese wider. Bei den Kontrollen und CF-Patienten gleichermaßen

#### 4. Ergebnisse

nahm dieser PC-Anteil nach Infusionsbeginn rasch zu und erreichte 6 Stunden nach Infusionsbeginn ein Niveau von ca. 80 %.

Der relative Anteil des PEMT-Pathways an der Gesamt-PC-Synthese ergab sich aus der Summe des D<sub>3</sub>- und D<sub>6</sub>-markiertem PC im Verhältnis zu (D<sub>3</sub>+D<sub>6</sub>+D<sub>9</sub>)-PC (Abb. 42B). Da der PEMT-Pathway durch Geschlechtshormone beeinflusst wird, ist dieser Syntheseweg für die weibliche Probandin P1 gesondert dargestellt. Es erfolgte in allen drei Gruppen eine schnelle Zunahme des PEMT-PC-Anteils direkt nach Infusionsbeginn mit einem Maximum nach einer Stunde. Danach sank dieser Anteil wieder rasch ab und erreicht nach 6 h ein Niveau von ca. 20 %.

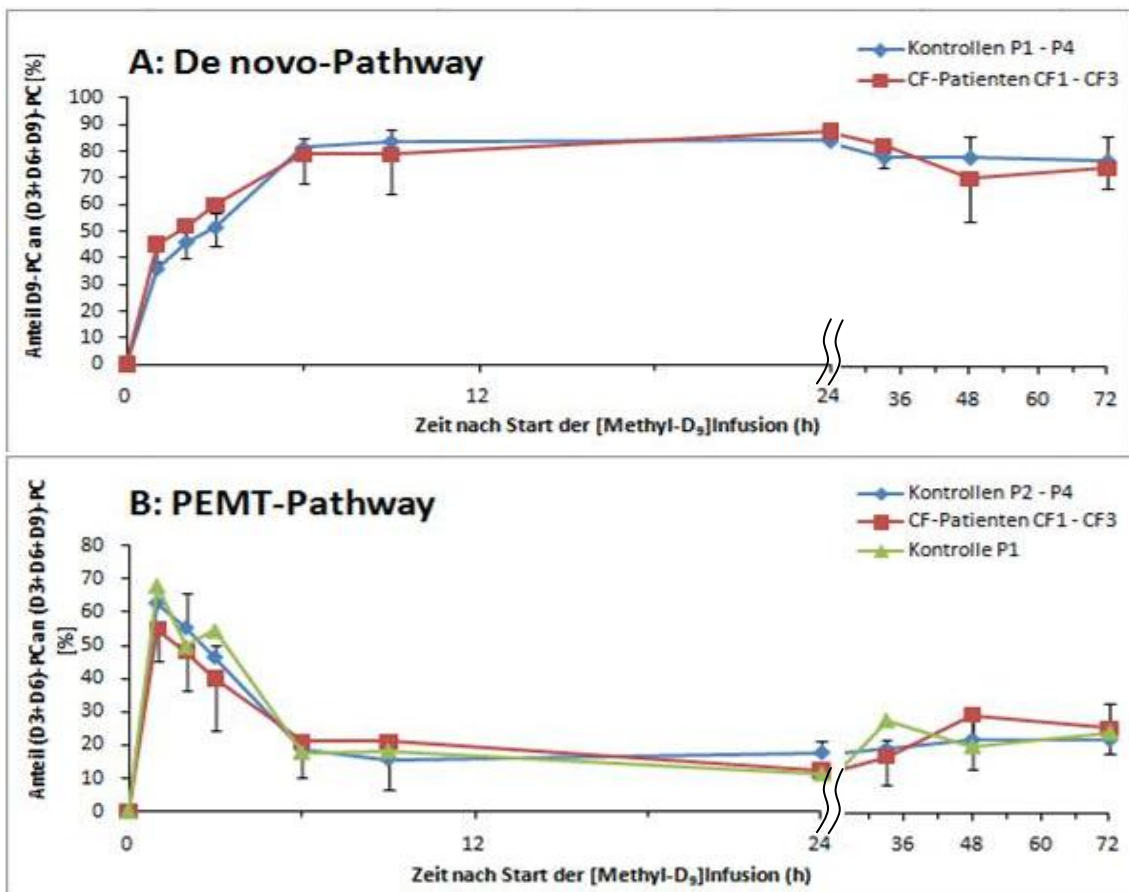


Abbildung 42: De-novo-Pathway und PEMT-Pathway

A: Anteil des über den Kennedy-Pathway synthetisierten D<sub>9</sub>-PCs an (D<sub>3</sub>+D<sub>6</sub>+D<sub>9</sub>)-PC

B: Anteil des über den PEMT-Pathway synthetisierten (D<sub>3</sub>+D<sub>6</sub>)-PCs an (D<sub>3</sub>+D<sub>6</sub>+D<sub>9</sub>)-PC

Im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>3</sub>]Infusion. Daten sind MW ± SD: Kontrolle P1, Kontrollen P2 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

## 4. Ergebnisse

### 4.4.8. D<sub>3</sub>/D<sub>6</sub>-Ratio

Die D<sub>3</sub>/D<sub>6</sub>-Ratio wies keine Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen auf.

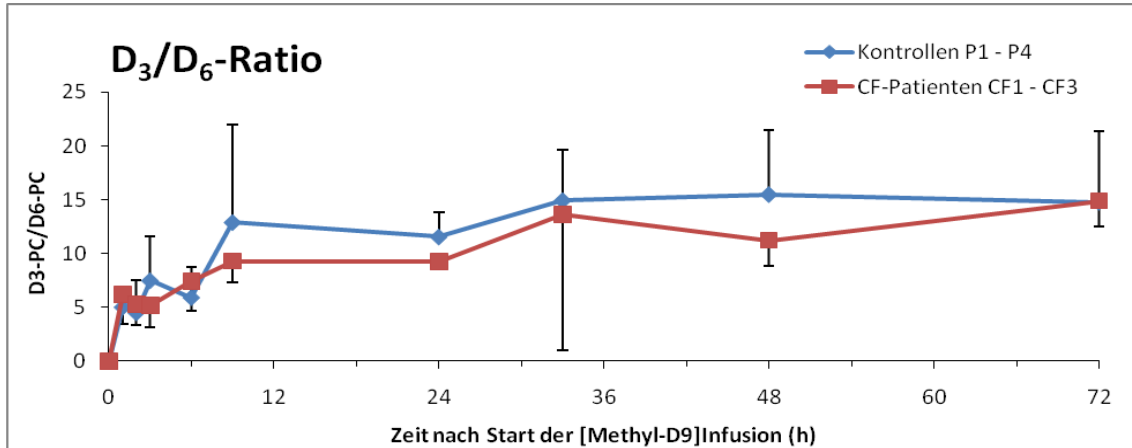


Abbildung 43: D<sub>3</sub>/D<sub>6</sub>-Ratio

Konzentration des [Methyl-D<sub>3</sub>]PCs pro Konzentration des [Methyl-D<sub>6</sub>]PCs im Zeitverlauf 0, 1, 2, 3, 6, 9, 24, 33, 48 und 72 h nach Start der [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion. Daten sind MW ± SD: Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

## 4.5. Gaschromatographie

### 4.5.1. Triglycerid-Konzentration im Blutplasma

Die mittlere Gesamtkonzentration der Triglyceride war bei nüchternen Kontrollprobanden und den CF-Patienten gleich (Tab. 37).

Tabelle 37: Konzentrationen der Triglyceride im Blutplasma

Mittelwerte und Standardabweichungen (SD): Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3, Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

<b>Konzentrationen der Triglyceride</b>				
	Kontrollen P1 – P4		CF-Patienten CF1 – CF3	
	Mittelwert (µmol/l)	SD (µmol/l)	Mittelwert (µmol/l)	SD (µmol/l)
Triglyceride	60,45	11,64	60,46	11,88

Das Verhältnis der Triglyceride zu Phosphatidylcholin lag bei den CF-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen höher, bei gleichen TG-Konzentrationen, jedoch signifikant niedrigeren PC-Konzentrationen (Tab. 38).



## 4. Ergebnisse

Tabelle 38: Verhältnis der Phosphatidylcholine zu Triglyceriden im Blutplasma  
PC-Konzentrationen gemessen über Massenspektrometrie, TG-Konzentrationen gemessen über Gaschromatographie in  $\mu\text{mol/l}$ . Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3.

<b>Verhältnis PC/ TG</b>		
	Kontrollen P1 – P4	CF-Patienten CF1 – CF3
PC/ TG	36,69	25,33

### 4.5.2. Zusammensetzung der Triglycerid-Fettsäuren

Die Hauptfettsäurekomponente der Triglyceride ist die Ölsäure (C18:1) (Abb. 44). Als zweithäufigste Fettsäure ist die Palmitinsäure (C16:0) in den Triglyceriden zu finden, gefolgt von Linolsäure (C18:2), Arachidonsäure (C20:4) und Stearinsäure (C18:0). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollprobanden und den CF-Patienten.

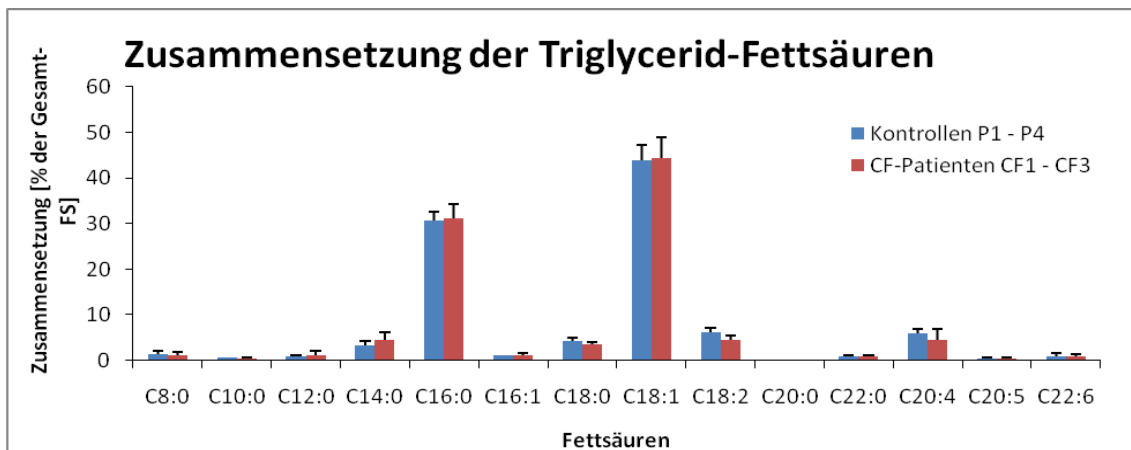


Abbildung 44: Zusammensetzung der Triglycerid-Fettsäuren im Blutplasma  
Daten sind  $\text{MW} \pm \text{SD}$ : Kontrollen P1 – P4, CF-Patienten CF1 – CF3. Mehrfachmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten (5fach, 0 - 72 h nach [Methyl-D<sub>9</sub>]Infusion).

## 5. Diskussion

In der durchgeführten Studie wurde eine Methode der stabilen Isotopenmarkierung zur Untersuchung des Phospholipid-Metabolismus der Leber erstmalig an erwachsenen Patienten angewandt. Es wurden dazu erwachsene Mukoviszidose-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden untersucht. Primäres Ziel der Studie war es, die Machbarkeit einer solchen etablierten Technik von Stoffwechseluntersuchungen am Menschen *in vivo* auf ein klinisches Krankheitsbild zu übertragen. Als Erkrankung wurde die Mukoviszidose mit häufigen Leberfunktionsstörungen ausgewählt, um die stabile Isotopenmarkierung mit D<sub>9</sub>-Cholin klinisch zu etablieren, die Veränderungen des hepatischen Lipidstoffwechsels zu charakterisieren und therapeutische Perspektiven daraus abzuleiten.

Es wurde diese etablierte Technik der stabilen Isotopenmarkierung zusammen mit Tandemmassenspektrometrie verwendet, da sie sehr sensitiv ist, die molekulare Spezifität der PC-Synthese-Wege in der Leber zu charakterisieren und zu quantifizieren [6, 7]. Durch eine dreistündige Infusion von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin ist damit eine Methode vorhanden, die Veränderungen nicht allein der Homöostase, sondern auch der Kinetik von Cholin, seinen wasserlöslichen Metaboliten und der Phosphatidylcholine bei Patienten *in vivo* zu untersuchen. Die angewandte Technik der Deuterium-Markierung in Kombination mit wenig invasiven Blutentnahmen und Tandemmassenspektrometrie eröffnet die strahlungsfreie Untersuchung des gestörten Lipidmetabolismus bei hepatologischen Erkrankungen.

Die Studie wurde mit vier Kontrollprobanden und drei CF-Patienten nach den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien durchgeführt. Sie diente als Pilotstudie, um erstmals Daten über Lipidstoffwechselprozesse *in vivo* zu sammeln. Das Blut der einzelnen Probanden wurde zu zehn verschiedenen, genau definierten Zeitpunkten untersucht, so dass zu jedem Probanden mehrere Messwerte zur Verfügung standen. Diese Zeitpunkte basierten auf den

## 5. Diskussion

publizierten Vordaten zu dieser Untersuchungstechnik bei gesunden Probanden [7]. Die Kontrollprobanden waren alle männlich bis auf eine Ausnahme, P1. Die CF-Patienten der vorliegenden Studie wiesen alle einen homozygoten  $\Delta F508$ -Gendefekt auf. Sie waren alle jung, männlich und von vergleichsweise hoher körperlicher Leistungsfähigkeit. Jedoch hatten sie bereits durchweg einen gestörten Leberlipidmetabolismus. Insgesamt beendeten alle Versuchsteilnehmer die Studie nach den geplanten drei Tagen ohne Komplikationen bei der [Methyl- $D_9$ ]Infusion und den Blutentnahmen. Es traten keinerlei nachgewiesene Nebenwirkungen auf.

### **Cholin**

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die endogene Cholin-Konzentration der gesunden männlichen Probanden P2 – P4 ( $8,19 \pm 1,08 \mu\text{mol/l}$ ) mit den Ergebnissen von Bernhard et al. 2004 ( $8,4 \pm 0,3 \mu\text{mol/l}$ ) übereinstimmt [6]. Bei den CF-Patienten lag die endogene Cholin-Konzentration um 22 % unter der der männlichen Kontrollprobanden. Dieses Ergebnis war bei der geringen Anzahl an Probanden zwar nicht signifikant, deckt sich jedoch mit den Literaturdaten [29]. Die Ursache dafür liegt nach Literaturdaten an einer erhöhten Cholin-Ausscheidung über die Fäzes sowie einer erniedrigten enteralen Cholin-Aufnahme bei Mukoviszidose, wie bereits Chen et al. 2005 postulierte [16]. Da diese Ergebnisse deutliche Unterschiede zeigten, sind Folgeuntersuchungen nach entsprechender power-Untersuchung für die Kollektiv-Größe impliziert.

Die [Methyl- $D_9$ ]Cholin-Konzentration erreichte 3 Stunden nach Infusionsbeginn das Maximum im Plasma, nach 6 Stunden war es komplett aus dem Blutplasma entfernt. Dies ist charakteristisch für einen „pulse-chase“-Versuch [6], wie auch z.B. der orale Glucosetoleranztest oder der  $C^{13}$ -Atemtest zum Nachweis von *Helicobacter pylori*. Die Anwendung von [Methyl- $D_9$ ]Cholin ist damit geeignet, den Organismus mit dem essentiellen Synthesesubstrat-Analogen zu beladen und die Kinetik der Synthese- und Abbauprodukte zu verfolgen.

## 5. Diskussion

Die Kinetik von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin im Blutplasma war bei den Kontrollprobanden und den CF-Patienten identisch. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei Mukoviszidose keine primäre Störung der Cholinaufnahme ins Gewebe, sondern eine Störung nachfolgender Stoffwechselschritte besteht [16].

### **Betain**

Die endogene Betain-Konzentration der CF-Patienten war genauso wie die Cholin-Konzentration im Vergleich zu den männlichen Kontrollen erniedrigt. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls deutliche Unterschiede, wiesen jedoch bei der geringen Fallzahl keine Signifikanz auf und implizieren daher Folgeuntersuchungen.

Die endogenen Betain-Konzentrationen der weiblichen Probandin P1 und in geringerem Maße auch deren endogene Cholin-Konzentrationen (s.o.) wiesen größere Unterschiede im Vergleich zu übrigen männlichen Studienteilnehmern auf. Die niedrigeren Betain-Konzentrationen der weiblichen Probandin erklären sich durch die geschlechtsspezifische endokrine Kontrolle des Betain-Metabolismus für die Generierung von Methylgruppendonatoren [160]. Die Plasma-Betain-Konzentration wird über die Nahrungszufuhr von Betain und Cholin sowie über die Aktivitäten der Cholin-Oxidase und Betain-Homozystein-Methyltransferase (BHMT) beeinflusst [161, 162]. Die BHMT-Aktivität wird wiederum von Hormonen wie Corticosteroide, Insulin, Östrogen und Testosteron reguliert [163, 164]. Zudem ist der Verbrauch von Methionin, das aus der BHMT-Reaktion unter Betain-Verbrauch gebildet wird, bei prämenopausalen Frauen höher, da die PEMT-Expression östrogenabhängig ist [66]. In einer Studie von Slow et al. zeigten sich demzufolge signifikant höhere Plasma-Betain-Konzentrationen bei männlichen verglichen mit weiblichen Ratten [165]. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied zwischen den Betain-Konzentrationen konnte Lever et al. auch beim Menschen zeigen [166, 167] und erklärt die hier vorliegenden Ergebnissen. Bei Folgeuntersuchungen ist daher das Geschlecht der Patienten und Probanden zu beachten.

## 5. Diskussion

[Methyl-D<sub>9</sub>]Betain erreichte genauso wie [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin nach 3 h das Maximum im Plasma. Es war im Gegensatz zu [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin jedoch erst nach ca. 48 Stunden annähernd vollständig aus dem Blutplasma verschwunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Betain ein länger verfügbarer Metabolit des Cholin ist.

Die leicht beschleunigte Abnahme von [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain bei den CF-Patienten im Vergleich zu den männlichen Probanden (P2 – P4) ist aus dem vermehrten Verbrauch von Betain als Methylgruppendonator bei Cholinmangel erklärbar und muss an einem größeren Kollektiv auf Signifikanz untersucht werden.

### **Phosphocholin**

[Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin war erst 9 Stunden nach Infusionsbeginn im Blutplasma nachweisbar. Es wird nicht ins Plasma sezerniert, sondern nur aus apoptotischen Zellen freigesetzt. Zudem war [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin im Gegensatz zu [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin und [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain auf konstantem Niveau bis zum Ende der Studie im Plasma messbar. Daher spiegelt [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin den für nicht-invasive Untersuchungen einzig verfügbaren zellulären Präkusoren-Pool wider, aus dem sich die wirkliche PC-Synthese via Kennedy-Pathway errechnen lässt. Sie lag bei den Kontrollen deutlich höher als bei den CF-Patienten.

Schließlich zeigen diese Ergebnisse, dass Cholin in Form von Phosphocholin lange in Zellen gespeichert wird. Das bedeutet, dass bei Cholin-Substitution dessen Derivate einen längeren Zeitraum im Körper verbleiben und bei CF-Patienten durch Substitution die Cholinspeicher des Körpers aufgefüllt werden können.

### **Phosphatidylcholin**

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass bei CF-Patienten die Phosphatidylcholin (PC) -Konzentration erniedrigt ist [33]. Dies bestätigte sich bei den Plasmaproben dieser Studie. Die Phospholipid-Konzentration und die

## 5. Diskussion

daraus errechnete PC-Konzentration waren bei den CF-Patienten signifikant gegenüber den Kontrollprobanden erniedrigt. Die PC-Konzentrationen wurden sowohl durch HPLC als auch durch MS gemessen. Dabei ergaben sich bei der Auswertung Differenzen zwischen diesen beiden Methoden. Die über HPLC erhaltenen Phosphatidylcholin-Werte lagen ca. 40 % unter den Werten, die über die Massenspektrometrie gemessen wurden. Dafür könnte die höhere Präzision der Massenspektrometrie gegenüber der HPLC verantwortlich sein. Auf den Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und CF-Patienten hatte das aber keinen Einfluss.

Die prozentuale Zusammensetzung der PC-Spezies im Plasma zeigte als Haupt-PC-Komponente PC16:0/18:2 mit ca. 33 %. In der Häufigkeit abnehmend folgten PC18:0/18:2, PC16:0/18:1, PC16:0/20:4 und PC18:0/20:4. Eine nahezu gleiche Verteilung der endogenen PC-Spezies postulierte Pynn et al. 2011 [7], wobei jedoch die Komponente PC18:1/18:2 einen leicht erhöhten Anteil im Vergleich zu den Werten dieser Studie aufwies [7]. Die Zusammensetzung der PC-Spezies der Kontrollen im Vergleich zu den CF-Patienten war nicht wesentlich verändert. Es bestand bestenfalls eine Tendenz zu mehr 18:1- und weniger 18:2-haltige PC-Spezies im Blutplasma von CF-Patienten.

Die absoluten molaren Konzentrationen aller PC-Spezies waren bei CF-Patienten erniedrigt, die Haupt-PC-Komponente PC16:0/18:2 um 45 %, die mono-/ diunsaturierten PC-Spezies um 38 % und die PUFA-PC-Spezies um 43 %. Es bestätigte sich beim Menschen nicht die von Dombrowsky et al. [5] in einem CF-Mausmodell gefundene, selektive Erniedrigung derjenigen Phospholipide, die polyunsaturierte Fettsäuren enthalten [5, 34] oder gar eine selektive Erniedrigung von Docosahexaensäure, die Freedman et al. postulierte [168].

Die Ergebnisse zeigten folglich, dass bei CF-Patienten die Konzentrationen aller PC-Spezies wesentlich erniedrigt sind, die Zusammensetzung aber nur unwesentlich verändert ist. Das weist darauf hin, dass bei CF-Patienten eine generell verminderte Sekretion vorliegt, wobei die Frage ist, ob nicht

## 5. Diskussion

ausreichend PC-Spezies gebildet werden oder ob sie nur nicht ins Plasma sezerniert werden.

Die Studie zeigte im Hinblick auf die markierten Phosphatidylcholine, dass sowohl die [Methyl-D<sub>9</sub>]- als auch die [Methyl-D<sub>3</sub>]PC bei den CF-Patienten über den ganzen Zeitverlauf im Plasma erniedrigt sind. Das gleiche Bild ergab sich bei der Aufteilung der markierten PCs in vier Gruppen, den mono- und diunsaturierten PC-Spezies, den 20:4- und den 22:6-PC-Spezies. Die neu synthetisierten [Methyl-D<sub>9</sub>]PC-Komponenten nahmen in den ersten 24 – 48 h nach Infusionsbeginn im Plasma beider Studiengruppen zu, was mit der Persistenz von D<sub>9</sub>-Phosphocholin als zellulären Cholinspeicher übereinstimmt. Es bedarf weiterer Untersuchungen und Berechnungen an einem größeren Kollektiv, um veränderte Sekretionsraten und den Plasma-Turnover des PCs bei CF-Patienten zu quantifizieren [7].

Die prozentuale Zusammensetzung der markierten PCs war wie bei den endogenen PC-Spezies bei den Kontrollprobanden und CF-Patienten nahezu gleich. Es hat sich zudem gezeigt, dass die vorzugsweise Synthese mono- und diunsaturierter PC-Spezies über den Kennedy-Pathway und längerkettiger polyunsaturierter PC-Spezies über den PEMT-Pathway in gleicher Weise bei CF-Patienten abläuft [7].

Die hier vorliegenden Daten zeigte, dass bei erniedrigten D<sub>9</sub>-PC- und D<sub>3</sub>-PC-Konzentrationen der CF-Patienten, jedoch identischer D<sub>9</sub>-PC- und D<sub>3</sub>-PC-Anreicherung im Plasma beider Studiengruppen, keine Einschränkung der PC-Synthese, sondern eine gestörte PC-Sekretion ins Plasma besteht.

### **Triglyceride**

Triglyceride werden sowohl aus der Nahrung aufgenommen als auch in der Leber neu synthetisiert. In der Studie wurden keine unterschiedliche Triglycerid-Konzentration und keine Veränderung der Fettsäure-Zusammensetzung der Triglyceride zwischen den Kontrollprobanden und CF-Patienten gefunden.

## 5. Diskussion

Jedoch war das PC/Triglycerid-Verhältnis der CF-Patienten erniedrigt. Die periphere Versorgung von Organen mit polyunsaturierten Fettsäuren, insbesondere Docosahexaensäure geschieht wesentlich über PC, nicht aber über Triglyceride. Dies bedeutet, dass bei CF-Patienten zwar keine Einschränkung der Triglycerid-Homöostase besteht, aber die periphere Versorgung mit Docosahexaensäure trotzdem eingeschränkt sein kann. Es ist zu untersuchen, ob die PC-Konzentration der VLDL-Fraktion bei CF-Patienten erniedrigt und ob der Plasma-Turnover der Triglyceride bei CF-Patienten verändert ist, weil ohne Isotopenmarkierung der Fettsäuren nur das Epiphänomen der Plasmakonzentrationen gemessen werden kann. Damit eröffnen sich über die Markierung mit [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin hinaus weitere wichtige Möglichkeiten der metabolischen Profilerstellung bei Erkrankungen mit hepatischen Leitsymptomen und Komplikationen.

Das Ergebnis dieser Studie ist, dass CF-Patienten ein quantitatives Problem der Substratversorgung mit Cholin und eine verminderte PC-Sekretion der Leber ins Blut haben. Daraus lassen sich die Steatose und möglicherweise die Steatohepatitis und schwerwiegende Folgeerkrankungen der Leber bei diesen Patienten erklären. Demzufolge ist eine Substitution von Cholin wahrscheinlich geeignet, die Hepatosteatose zu vermeiden oder zu therapieren [31, 169]. Ob damit auch eine Steatohepatitis vollständig verhindert wird oder kuriert werden kann und ob die bessere periphere Versorgung mit Cholin und insbesondere Dokosahexaensäure für die Bildung antiinflammatorischer Resolvine zur besseren Erhaltung weiterer Organfunktionen geeignet ist, bedarf weiterer Untersuchungen.



## 6. Zusammenfassung

Hintergrund der vorliegenden Studie ist, dass bei Mukoviszidose-Patienten die Leberfunktionsstörung nach der Lungen- und Pankreas-Problematik die bedeutendste Rolle spielt [127, 130], ihre Pathophysiologie jedoch nur inkomplett verstanden ist: Die hohe biliäre Sekretion von Phosphatidylcholin (PC) und sein enterohepatischer Kreislauf bedingt in Kombination mit einer insuffizienten enteralen Spaltung und Rückresorption von PC eine erhöhte Ausscheidung cholinhaltiger Komponenten über die Fäzes [16]. Der resultierende Cholinmangel und die Störung der hepatischen PC-Homöostase könnten dann eine verminderte Lipoproteinsekretion („very low density lipoprotein“, VLDL) durch die Leber zur Folge haben, um den enterohepatischen Kreislauf des Galle-PC aufrecht zu erhalten [30]. Somit kommt es zu einer gestörten Versorgung der extrahepatischen Gewebe mit Cholin und essentiellen Fettsäuren aus dem PC der VLDL. Arbeiten von Innis et al. zeigten, dass bei CF-Patienten die Phospholipid- und Phosphatidylcholin-Konzentrationen im Blutplasma erniedrigt sind [32, 33]. Neben einer gestörten Versorgung der peripheren Gewebe kommt es zu einer Akkumulation von Triglyceriden in der Leber (Lebersteatose), da VLDL nicht ausreichend gebildet und sezerniert werden. In schweren Fällen, bei denen die Leber nicht genug PC bildet, um die eigenen Membranhomöostase aufrecht zu erhalten, ist dies möglicherweise die Mitursache von Steatohepatitiden bis hin – wie bei Cholinmangel im Tierversuch – zum terminalen Leberversagen sein [13, 32].

In der durchgeführten Studie wurde die zuvor an gesunden Probanden etablierte Technik der [Methyl-D<sub>3</sub>]Cholin-Markierung zusammen mit Tandemmassenspektrometrie erstmalig an CF-Patienten angewandt. Diese Markierungstechnik stellt einen „pulse-chase“-Versuch *in vivo* dar, mit dem die Kinetiken des Cholin- und PC-Stoffwechsels erfasst werden. Sie erlaubt die differenzierte Untersuchung der Stoffwechselwege des Leber-PCs ohne radioaktive Belastung bei Patienten anhand von sequenziell entnommener Plasma-Proben [6, 7]. Die Studie war eine Pilotstudie mit 4 Kontrollprobanden

## 6. Zusammenfassung

und 3 CF-Patienten. Mit Ausnahme der Kontrollprobandin P1 waren alle Studienteilnehmer männlich. Die Studienteilnehmer bekamen eine intravenöse [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholininfusion über drei Stunden. Zu den Zeitpunkten von 0 bis 72 h wurde durch Venenpunktion EDTA-Blut entnommen und zur Analytik mittels Massenspektrometrie (MS) sowie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC) aufgearbeitet. Über HPLC und GC wurden die nativen PC-Spezies und Triglyceride bestimmt, über MS die wässrigen Metabolite Cholin, Betain und Phosphocholin, deren deuteriummarkierte Derivate sowie markiertes PC. Insbesondere diente die HPLC-Untersuchungen dem Methodenvergleich gegenüber der Tandem-MS.

Die Studie zeigte eine Verminderung der endogenen Konzentrationen von Cholin und seinen Metaboliten Betain- und Phosphocholin bei CF-Patienten. Da der Syntheseweg von Cholin über Betain in den PEMT-Pathway unter anderem von Geschlechtshormonen abhängig ist, zeigten sich bei der weiblichen Probandin P1 veränderte Konzentrationen im Vergleich zu den übrigen männlichen Studienteilnehmern: die Cholin- und Betain-Konzentrationen waren stark erniedrigt, die Phosphocholin-Konzentration leicht erhöht. Die Kinetiken von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin und [Methyl-D<sub>9</sub>]Betain waren bei Gesunden und CF-Patienten jedoch identisch, ein Indikator für einen primär ungestörten Metabolismus von Cholin. Ihre Konzentrationen erreichten während der Infusion (0 – 3 h) ein Maximum und verschwanden innerhalb weiterer 3 – 6 h aus dem Blutplasma. Der Speichermetabolit [Methyl-D<sub>9</sub>]Phosphocholin war 9 h nach Infusionsbeginn bis zum Ende der Untersuchung (72 h) nachweisbar, beweisend für die nachhaltige Anreicherung von Cholin im Gewebe, welche eine effiziente Substitution zur Auffüllung der Gewebe-Pools ermöglicht.

Die nativen Phospholipid- und PC-Konzentrationen im Blutplasma der CF-Patienten waren signifikant vermindert ohne wesentliche Unterschiede im molekularen Pattern des PCs im Vergleich zu den Kontrollen. Die Sekretion neu synthetisierter PC-Komponenten ins Blut war bei den CF-Patienten erniedrigt, die Triglyceridkonzentrationen und deren Fettsäurezusammensetzung hingegen waren bei beiden Studiengruppen gleich, sodass man bei CF von einer

## 6. Zusammenfassung

selektiven Störung der PC-Homöostase und hepatischen Sekretion sprechen kann.

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass die Anreicherung von [Methyl-D<sub>9</sub>]Cholin im Plasma-PC unverändert war, die Absolutkonzentrationen des markierten PCs jedoch erniedrigt. Dies bedeutet, dass bei CF weniger die Synthese als die PC-Sekretion ins Plasma, d. h. die Sekretion von VLDL gestört ist. Im Kontext des hohen PC-Turnovers über den enterohepatischen Kreislauf der Galle – bis zu 50 % des PC-Leberpools pro Tag – und die fäkalen PC- und Cholin-Verluste könnte das bedeuten, dass durch den Cholinmangel nicht genügend PC für die VLDL-Bildung und den Triglycerid-Export sowie für die Membranhomöostase der Leber zur Verfügung steht. Damit sind pathophysiologisch sowohl eine Hepatosteatose und möglicherweise auch strukturelle und funktionelle Schäden der CF-Leber (Steatohepatitis, Cholestase) aus dem Cholinmangel erklärbar.

Diese Ergebnisse implizieren daher die Perspektive weitergehender Untersuchungen und einer Cholin-Substitution, um die Hepatosteatose und ggfs. schwere Schäden an der CF-Leber zu verhindern.

## 7. Anhang

### Kap. 3.2.2./ 3.2.3.: Laborwerte

Tabelle 39: Laborwerte der Kontrollprobanden und CF-Patienten  
Rot sind die Werte markiert, die außerdem des Referenzbereiches liegen.

	Kontrollprobanden P1 – P4				CF-Patienten CF1 – CF3		
	P1	P2	P3	P4	CF1	CF2	CF3
Leukozyten (/µl) (4000 – 9400)	5300	5300	5830	4290	5850	8760	8830
Erythrozyten (Mio/µl) (3,4 – 6,3)	4,34	4,80	5,30	4,60	5,32	4,41	5,42
Hb (g/dl) (12 – 18)	11,5	13,9	16,0	13,2	15,9	13,2	16,1
MCH (pg) (28 – 33)	26,5	29,0	30,2	28,7	29,9	29,9	29,7
MCHC (g/dl) (33 – 36)	33,1	33,9	34,6	34,1	34,3	33,9	33,7
MCV (fl) (80 – 96)	80,0	85,5	87,2	84,2	87,1	88,0	88,1
Thrombozyten (Tausd/µl) (100 – 350)	264	253	208	215	199	310	328
INR (1,0 – 1,4)	0,8	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0
PTT (sec) (20 – 36)	27	29	32	28	26	24	27
Kreatinin (mg/dl) (0,8 – 1,4)	0,8	0,9	1,1	1,0	0,9	1,3	0,9
Harnstoff (mg/dl) (20 – 45)	20	23	33	35	34	62	46
Harnsäure (mg/dl) 2,5 – 6,8)	4,1	4,1	8,4	5,9	5,3	12,1	6,8
Bilirubin gesamt (mg/dl) (< 1,2)			1,7	0,8	1,1	0,3	0,3
Bilirubin direkt (mg/dl) (< 0,3)			0,4	0,2	0,4	0,1	0,0
Eiweiß (g/dl) (6,0 – 8,0)	8,0	7,5	8,0	7,6	6,8	8,6	8,3
Cholesterin (mg/dl) (140 – 200)	199		215	157	103	115	126
Triglyceride (mg/dl) (60 – 180)	136		121	79	43	60	167
GOT/AST (U/l)	24	32	25	25	32	22	31

## 7. Anhang

(< 52)								
GPT/ALT (U/l) (< 50)	12	18	24	30		32	25	31
LDH (U/l) (< 245)		159	166	132		193	107	159
AP (U/l) (< 130)	47	38	83	49		86	70	84
GGT (U/l) (< 66)	5	9	18	9		29	21	16
Amylase (U/l) (< 53)						72	36	37
Lipase (U/l) (< 60)						11	14	14
Cholinesterase (kU/l) (4,9 – 12)						8,6	5,8	8,8
HbA1c (%) (4,2 – 6,2)						7,2	5,3	6,1
CRP (mg/dl) (< 0,5)						0,02	4,46	0,06

### Kap. 4.1.1. Originaldaten

Tabelle 40: Originaldaten der endogenen Cholin-Konzentrationen

Endogene Cholin-Konzentrationen (Mittelwerte $\pm$ SD in $\mu\text{mol/l}$ )			
	Probanden		
t (h)	P1	P2 – P4	CF1 – CF3
0	7,98	9,88 $\pm$ 3,25	7,08 $\pm$ 1,60
1	5,30	8,23 $\pm$ 1,65	6,49 $\pm$ 2,26
2	5,41	8,60 $\pm$ 1,15	6,12 $\pm$ 2,16
3	6,80	8,33 $\pm$ 1,10	6,84 $\pm$ 1,71
6	8,89	8,96 $\pm$ 0,50	8,17 $\pm$ 2,23
9	5,49	7,78 $\pm$ 0,65	6,42 $\pm$ 2,99
24	7,22	7,39 $\pm$ 0,94	5,70 $\pm$ 1,15
33	5,78	6,14 $\pm$ 0,89	4,93 $\pm$ 0,58
48	8,16	8,00 $\pm$ 2,52	5,91 $\pm$ 1,11
72	6,28	8,58 $\pm$ 1,94	6,29 $\pm$ 1,50
Mittelwert	6,73	8,19 $\pm$ 1,08	6,40 $\pm$ 1,27

Tabelle 41: Originaldaten der endogenen Betain-Konzentrationen

Endogene Betain-Konzentrationen (Mittelwerte $\pm$ SD in $\mu\text{mol/l}$ )			
	Probanden		
t (h)	P1	P2 – P4	CF1 – CF3
0	10,75	27,02 $\pm$ 7,26	21,73 $\pm$ 9,38
1	9,07	28,37 $\pm$ 7,84	22,04 $\pm$ 9,66
2	8,76	28,08 $\pm$ 8,18	19,83 $\pm$ 7,21
3	9,64	25,97 $\pm$ 3,43	21,45 $\pm$ 6,36

## 7. Anhang

6	11,62	28,99 ± 4,41	24,73 ± 7,55
9	10,36	32,15 ± 5,97	24,89 ± 7,73
24	15,91	35,10 ± 6,62	24,33 ± 8,16
33	10,23	30,36 ± 11,44	21,73 ± 2,36
48	15,09	30,26 ± 7,33	22,48 ± 3,39
72	13,48	30,93 ± 4,30	21,91 ± 8,42
Mittelwert	11,49	29,72 ± 5,97	22,51 ± 6,78

### Kap. 4.3.1.: PC-Konzentration im Blutplasma

Es sei  $x_i$  das Produkt aus den beiden Faktoren  $a_i$  und  $b_i$ .

Für die arithmetischen Mittelwerte gelte:

$$\bar{a} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i$$

$$\bar{b} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n b_i$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i * b_i$$

Für das Produkt der arithmetischen Mittelwerte  $\bar{a}$  und  $\bar{b}$  gelte:

$$\bar{a} * \bar{b} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i * \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n b_i = \frac{1}{n^2} \left[ \sum_{i=1}^n a_i * \sum_{i=1}^n b_i \right] = \frac{1}{n^2} \left[ \sum_{i=1}^n (a_i * b_i) + \sum_{i=1}^n \sum_{\substack{j=1 \\ i \neq j}}^n (a_i * b_j) \right]$$

Was nicht gleich dem arithmetischen Mittelwert des Produktes ist:

$$\bar{a} * \bar{b} \neq \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n a_i * b_i = \bar{x}$$

## 8. Verzeichnisse

### 8.1. Literaturverzeichnis

1. Orfei, E., *Review of pathology of the liver*. Loyola University of Chicago, Stritch School of Medicine, Department of Pathology.
2. Jungermann, K. and N. Katz, *Functional specialization of different hepatocyte populations*. *Physiol Rev*, 1989. **69**(3): p. 708-64.
3. Katz, N.R., *Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus*. *J Nutr*, 1992. **122**(3 Suppl): p. 843-9.
4. Ginsberg, H.N., *Lipoprotein physiology*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998. **27**(3): p. 503-19.
5. Dombrowsky, H., et al., *Molecular species compositions of lung and pancreas phospholipids in the cftr(tm1HGU/tm1HGU) cystic fibrosis mouse*. *Pediatr Res*, 2003. **53**(3): p. 447-54.
6. Bernhard, W., et al., *Mass spectrometric analysis of surfactant metabolism in human volunteers using deuteriated choline*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(1): p. 54-8.
7. Pynn, C.J., et al., *Specificity and rate of human and mouse liver and plasma phosphatidylcholine synthesis analyzed in vivo*. *Journal of lipid research*, 2011. **52**(2): p. 399-407.
8. Redinger, R.N. and D.M. Small, *Bile composition, bile salt metabolism and gallstones*. *Archives of internal medicine*, 1972. **130**(4): p. 618-30.
9. Kennedy, E.P. and S.B. Weiss, *The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides*. *J Biol Chem*, 1956. **222**(1): p. 193-214.
10. DeLong, C.J., et al., *Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(42): p. 29683-8.
11. Lands, W.E., et al., *Selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylcholine by rat liver microsomes*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(24): p. 14968-72.
12. Burdge, G.C., F.J. Kelly, and A.D. Postle, *Synthesis of phosphatidylcholine in guinea-pig fetal lung involves acyl remodelling and differential turnover of individual molecular species*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1166**(2-3): p. 251-7.
13. Li, Z. and D.E. Vance, *Phosphatidylcholine and choline homeostasis*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(6): p. 1187-94.
14. Vance, D.E., C.J. Walkey, and Z. Cui, *Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase from liver*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1348**(1-2): p. 142-50.
15. Walkey, C.J., et al., *Disruption of the murine gene encoding phosphatidylethanolamine N-methyltransferase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(24): p. 12880-5.
16. Chen, A.H., et al., *Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine excretion is increased in children with cystic fibrosis and is associated with plasma homocysteine, S-adenosylhomocysteine, and S-adenosylmethionine*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(3): p. 686-91.
17. Yang, E.K., et al., *Rat and human mammary tissue can synthesize choline moiety via the methylation of phosphatidylethanolamine*. *Biochem J*, 1988. **256**(3): p. 821-8.
18. Blusztajn, J.K., S.H. Zeisel, and R.J. Wurtman, *Developmental changes in the activity of phosphatidylethanolamine N-methyltransferases in rat brain*. *The Biochemical journal*, 1985. **232**(2): p. 505-11.
19. Nishimaki-Mogami, T., Z. Yao, and K. Fujimori, *Inhibition of phosphatidylcholine synthesis via the phosphatidylethanolamine methylation pathway impairs*

## 8. Verzeichnisse

- incorporation of bulk lipids into VLDL in cultured rat hepatocytes.* J Lipid Res, 2002. **43**(7): p. 1035-45.
20. Tessitore, L., E. Sesca, and D.E. Vance, *Inactivation of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 in aflatoxin-induced liver cancer and partial reversion of the neoplastic phenotype by PEMT transfection of hepatoma cells.* Int J Cancer, 2000. **86**(3): p. 362-7.
  21. DeLong, C.J., A.M. Hicks, and Z. Cui, *Disruption of choline methyl group donation for phosphatidylethanolamine methylation in hepatocarcinoma cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 17217-25.
  22. Tessitore, L., et al., *Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinomas.* Oncology, 2003. **65**(2): p. 152-8.
  23. Colombo, C., et al., *Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome.* Hepatology, 2002. **36**(6): p. 1374-82.
  24. Yates, A.A., S.A. Schlicker, and C.W. Sutor, *Dietary Reference Intakes: the new basis for recommendations for calcium and related nutrients, B vitamins, and choline.* Journal of the American Dietetic Association, 1998. **98**(6): p. 699-706.
  25. Shronts, E.P., *Essential nature of choline with implications for total parenteral nutrition.* J Am Diet Assoc, 1997. **97**(6): p. 639-46, 649; quiz 647-8.
  26. Ranaldi, S., et al., *Lid opening and unfolding in human pancreatic lipase at low pH revealed by site-directed spin labeling EPR and FTIR spectroscopy.* Biochemistry, 2009. **48**(3): p. 630-8.
  27. Arrese, M., M. Ananthanarayanan, and F.J. Suchy, *Hepatobiliary transport: molecular mechanisms of development and cholestasis.* Pediatric research, 1998. **44**(2): p. 141-7.
  28. Cohen, D.E., *Hepatocellular transport and secretion of biliary phospholipids.* Seminars in liver disease, 1996. **16**(2): p. 191-200.
  29. Innis, S.M. and D. Hasman, *Evidence of choline depletion and reduced betaine and dimethylglycine with increased homocysteine in plasma of children with cystic fibrosis.* The Journal of nutrition, 2006. **136**(8): p. 2226-31.
  30. Vance, D.E., *Role of phosphatidylcholine biosynthesis in the regulation of lipoprotein homeostasis.* Current opinion in lipidology, 2008. **19**(3): p. 229-34.
  31. Watkins, S.M., X. Zhu, and S.H. Zeisel, *Phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase activity and dietary choline regulate liver-plasma lipid flux and essential fatty acid metabolism in mice.* J Nutr, 2003. **133**(11): p. 3386-91.
  32. Innis, S.M., et al., *Choline-related supplements improve abnormal plasma methionine-homocysteine metabolites and glutathione status in children with cystic fibrosis.* Am J Clin Nutr, 2007. **85**(3): p. 702-8.
  33. Innis, S.M., et al., *Increased plasma homocysteine and S-adenosylhomocysteine and decreased methionine is associated with altered phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in cystic fibrosis.* J Pediatr, 2003. **143**(3): p. 351-6.
  34. Lloyd-Still, J.D., S.B. Johnson, and R.T. Holman, *Essential fatty acid status and fluidity of plasma phospholipids in cystic fibrosis infants.* The American journal of clinical nutrition, 1991. **54**(6): p. 1029-35.
  35. Rogiers, V., et al., *Abnormal fatty acid pattern of the plasma cholesterol ester fraction in cystic fibrosis patients with and without pancreatic insufficiency.* Eur J Pediatr, 1983. **141**(1): p. 39-42.
  36. Rogiers, V., et al., *Long chain non-esterified fatty acid pattern in plasma of cystic fibrosis patients and their parents.* Pediatric research, 1980. **14**(9): p. 1088-91.



## 8. Verzeichnisse

37. Hunt, A.N., et al., *Highly saturated endonuclear phosphatidylcholine is synthesized in situ and collocated with CDP-choline pathway enzymes*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8492-9.
38. Hunt, A.N., et al., *A comparison of the molecular specificities of whole cell and endonuclear phosphatidylcholine synthesis*. FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 89-93.
39. Possmayer, F., et al., *Surface activity in vitro: role of surfactant proteins*. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, 2001. **129**(1): p. 209-20.
40. Serrano, A.G. and J. Perez-Gil, *Protein-lipid interactions and surface activity in the pulmonary surfactant system*. Chemistry and physics of lipids, 2006. **141**(1-2): p. 105-18.
41. Tanford, C., *Amphiphile orientation: physical chemistry and biological function*. Biochem Soc Trans, 1987. **15 Suppl**: p. 1S-7S.
42. Clements, J.A., *Surface tension of lung extracts*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, 1957. **95**(1): p. 170-2.
43. Pattle, R.E., *Properties, function and origin of the alveolar lining layer*. Nature, 1955. **175**(4469): p. 1125-6.
44. Macklin, C.C., *The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes*. Lancet, 1954. **266**(6822): p. 1099-1104.
45. Uddin, M. and B.D. Levy, *Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation*. Progress in lipid research, 2011. **50**(1): p. 75-88.
46. Salmon, J.A. and G.A. Higgs, *Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators*. British medical bulletin, 1987. **43**(2): p. 285-96.
47. Tso, P. and J.A. Balint, *Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics*. Am J Physiol, 1986. **250**(6 Pt 1): p. G715-26.
48. Shepherd, J., *Lipoprotein metabolism. An overview*. Drugs, 1994. **47 Suppl 2**: p. 1-10.
49. Spector, A.A., *Plasma lipid transport*. Clinical physiology and biochemistry, 1984. **2**(2-3): p. 123-34.
50. Large, V., et al., *Metabolism of lipids in human white adipocyte*. Diabetes Metab, 2004. **30**(4): p. 294-309.
51. Bernhard, W., et al., *Increased palmitoyl-myristoyl-phosphatidylcholine in neonatal rat surfactant is lung specific and correlates with oral myristic acid supply*. Journal of applied physiology, 2011. **111**(2): p. 449-57.
52. Mason, T.M., *The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1998. **35**(6): p. 461-87.
53. Burdge, G.C., A.N. Hunt, and A.D. Postle, *Mechanisms of hepatic phosphatidylcholine synthesis in adult rat: effects of pregnancy*. Biochem J, 1994. **303 ( Pt 3)**: p. 941-7.
54. Burdge, G.C. and A.D. Postle, *Phospholipid molecular species composition of developing fetal guinea pig brain*. Lipids, 1995. **30**(8): p. 719-24.
55. Burdge, G.C. and A.D. Postle, *Selective changes to phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine molecular species in the developing fetal guinea pig liver and plasma*. Reprod Nutr Dev, 2004. **44**(6): p. 571-82.
56. Hadders-Algra, M., et al., *Prenatal and early postnatal fatty acid status and neurodevelopmental outcome*. J Perinat Med, 2007. **35 Suppl 1**: p. S28-34.
57. Postle, A.D., et al., *The composition of individual molecular species of plasma phosphatidylcholine in human pregnancy*. Early Hum Dev, 1995. **43**(1): p. 47-58.
58. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults*. Reprod Nutr Dev, 2005. **45**(5): p. 581-97.

## 8. Verzeichnisse

59. Cetin, I. and B. Koletzko, *Long-chain omega-3 fatty acid supply in pregnancy and lactation*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2008. **11**(3): p. 297-302.
60. Hamilton, J.A., et al., *Brain uptake and utilization of fatty acids, lipids and lipoproteins: application to neurological disorders*. *J Mol Neurosci*, 2007. **33**(1): p. 2-11.
61. Perez-Chacon, G., et al., *Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1791**(12): p. 1103-13.
62. Brock, T.G. and M. Peters-Golden, *Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis*. *ScientificWorldJournal*, 2007. **7**: p. 1273-84.
63. Lieber, C.S., *Hepatic, metabolic, and nutritional disorders of alcoholism: from pathogenesis to therapy*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2000. **37**(6): p. 551-84.
64. Noga, A.A. and D.E. Vance, *A gender-specific role for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21851-9.
65. Guan, Z.Z., et al., *Activity of phosphatidylethanolamine-N-methyltransferase in brain affected by Alzheimer's disease*. *Neurochem Int*, 1999. **34**(1): p. 41-7.
66. Zeisel, S.H., *Gene response elements, genetic polymorphisms and epigenetics influence the human dietary requirement for choline*. *IUBMB life*, 2007. **59**(6): p. 380-7.
67. Zhu, X., et al., *Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline*. *Biochem J*, 2003. **370**(Pt 3): p. 987-93.
68. Zhao, Y., et al., *Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(13): p. 8258-65.
69. Kazachkov, M., et al., *Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling*. *Lipids*, 2008. **43**(10): p. 895-902.
70. Chen, X., et al., *Identification and characterization of a lysophosphatidylcholine acyltransferase in alveolar type II cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(31): p. 11724-9.
71. Innis, S.M. and A.G. Davidson, *Cystic fibrosis and nutrition: linking phospholipids and essential fatty acids with thiol metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 2008. **28**: p. 55-72.
72. Phorecky, L.A. and B.S. Baliga, *Formation of phenylethanolamine N-methyl transferase complexes as an intermediate of the methylation of norepinephrine*. *Biochemical pharmacology*, 1972. **21**(21): p. 2859-66.
73. Jenne, D.E., A.S. Olsen, and M. Zimmer, *The human guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) gene maps to a syntenic region on 19p13.3, homologous to band C of mouse chromosome 10, but GAMT is not mutated in jittery mice*. *Biochemical and biophysical research communications*, 1997. **238**(3): p. 723-7.
74. Pfeifer, G.P., et al., *Purification and characterization of mammalian DNA methyltransferases by use of monoclonal antibodies*. *The Journal of biological chemistry*, 1985. **260**(25): p. 13787-93.
75. da Costa, K.A., et al., *Elevated serum creatine phosphokinase in choline-deficient humans: mechanistic studies in C2C12 mouse myoblasts*. *The American journal of clinical nutrition*, 2004. **80**(1): p. 163-70.
76. Kovanen, P.T., E.A. Nikkila, and T.A. Miettinen, *Regulation of cholesterol synthesis and storage in fat cells*. *Journal of lipid research*, 1975. **16**(3): p. 211-23.
77. Robinson, D.S., *Plasma triglyceride metabolism*. *Journal of clinical pathology. Supplement*, 1973. **5**: p. 5-10.

## 8. Verzeichnisse

78. Zimmermann, R., et al., *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. **306**(5700): p. 1383-6.
79. Vaughan, M., J.E. Berger, and D. Steinberg, *Hormone-Sensitive Lipase and Monoglyceride Lipase Activities in Adipose Tissue*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 401-9.
80. Hollenberg, C.H., M.S. Raben, and E.B. Astwood, *The lipolytic response to corticotropin*. Endocrinology, 1961. **68**: p. 589-98.
81. Zechner, R., et al., *Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores*. J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 3-21.
82. Goldberg, I.J. and M. Merkel, *Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D388-405.
83. Luiken, J.J., et al., *Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins*. Lipids, 1999. **34 Suppl**: p. S169-75.
84. Collins, F.S., *Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications*. Science, 1992. **256**(5058): p. 774-9.
85. Ratjen, F. and G. Döring, *Cystic fibrosis*. Lancet, 2003. **361**(9358): p. 681-9.
86. Rommens, J.M., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1059-65.
87. Riordan, J.R., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1066-73.
88. Boujaoude, L.C., et al., *Cystic fibrosis transmembrane regulator regulates uptake of sphingoid base phosphates and lysophosphatidic acid: modulation of cellular activity of sphingosine 1-phosphate*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35258-64.
89. Crawford, I., et al., *Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(20): p. 9262-6.
90. Trezise, A.E. and M. Buchwald, *In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Nature, 1991. **353**(6343): p. 434-7.
91. Engelhardt, J.F., et al., *Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus*. Nature genetics, 1992. **2**(3): p. 240-8.
92. Hoogeveen, A.T., et al., *Immunological localization of cystic fibrosis candidate gene products*. Experimental cell research, 1991. **193**(2): p. 435-7.
93. Bear, C.E., et al., *Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*. Cell, 1992. **68**(4): p. 809-18.
94. Stutts, M.J., et al., *CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels*. Science, 1995. **269**(5225): p. 847-50.
95. Gulbins, E. and P.L. Li, *Physiological and pathophysiological aspects of ceramide*. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 2006. **290**(1): p. R11-26.
96. Grassme, H., J. Riethmuller, and E. Gulbins, *Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains*. Progress in lipid research, 2007. **46**(3-4): p. 161-70.
97. Uhlig, S. and E. Gulbins, *Sphingolipids in the lungs*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2008. **178**(11): p. 1100-14.
98. Schutze, S., T. Machleidt, and M. Kronke, *The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction*. Journal of leukocyte biology, 1994. **56**(5): p. 533-41.
99. Liu, Y., et al., *Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation*. The Journal of clinical investigation, 2000. **106**(8): p. 951-61.
100. Kerem, E., *Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy*. Pediatr Pulmonol, 2005. **40**(3): p. 183-96.

## 8. Verzeichnisse

101. Rowntree, R.K. and A. Harris, *The phenotypic consequences of CFTR mutations*. Annals of human genetics, 2003. **67**(Pt 5): p. 471-85.
102. Kerem, B., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1073-80.
103. Cheng, S.H., et al., *Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis*. Cell, 1990. **63**(4): p. 827-34.
104. Jonsdottir, B., H. Bergsteinnsson, and O. Baldursson, *[Cystic fibrosis--review]*. Laeknabladid, 2008. **94**(12): p. 831-7.
105. Mickle, J.E. and G.R. Cutting, *Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis*. Med Clin North Am, 2000. **84**(3): p. 597-607.
106. McKone, E.F., et al., *Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study*. Lancet, 2003. **361**(9370): p. 1671-6.
107. de Gracia, J., et al., *Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis*. Thorax, 2005. **60**(7): p. 558-63.
108. McKone, E.F., C.H. Goss, and M.L. Aitken, *CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis*. Chest, 2006. **130**(5): p. 1441-7.
109. Park, H.W., et al., *Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> and its role in pancreatic bicarbonate secretion*. Gastroenterology, 2010. **139**(2): p. 620-31.
110. Abrams, C.K., et al., *Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency*. The Journal of clinical investigation, 1984. **73**(2): p. 374-82.
111. Youngberg, C.A., et al., *Comparison of gastrointestinal pH in cystic fibrosis and healthy subjects*. Digestive diseases and sciences, 1987. **32**(5): p. 472-80.
112. Lowe, M.E., *Structure and function of pancreatic lipase and colipase*. Annual review of nutrition, 1997. **17**: p. 141-58.
113. Matel, J.L. and C.E. Milla, *Nutrition in cystic fibrosis*. Semin Respir Crit Care Med, 2009. **30**(5): p. 579-86.
114. Moskowitz, S.M., et al., *Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders*. Genet Med, 2008. **10**(12): p. 851-68.
115. Oliveira, M.C., et al., *Effect of meconium ileus on the clinical prognosis of patients with cystic fibrosis*. Braz J Med Biol Res, 2002. **35**(1): p. 31-8.
116. Della Casa Muttini, E., et al., *[Neonatal cystic fibrosis: report of 2 cases]*. Acta Biomed Ateneo Parmense, 2000. **71 Suppl 1**: p. 785-8.
117. Festen, C., et al., *Neonatal jaundice in cystic fibrosis: a conservative approach is not always justified*. Zeitschrift fur Kinderchirurgie : organ der Deutschen, der Schweizerischen und der Osterreichischen Gesellschaft fur Kinderchirurgie = Surgery in infancy and childhood, 1988. **43**(2): p. 106-7.
118. Döring, G. and E. Gulbins, *Cystic fibrosis and innate immunity: how chloride channel mutations provoke lung disease*. Cell Microbiol, 2009. **11**(2): p. 208-16.
119. Aspin, N., et al., *Mucociliary clearance in cystic fibrosis*. Modern problems in paediatrics, 1976. **19**: p. 199-206.
120. Stutman, H.R. and M.I. Marks, *Pulmonary infections in children with cystic fibrosis*. Seminars in respiratory infections, 1987. **2**(3): p. 166-76.
121. Postle, A.D., et al., *Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(1): p. 90-8.
122. Ali, B.R., *Is cystic fibrosis-related diabetes an apoptotic consequence of ER stress in pancreatic cells?* Med Hypotheses, 2009. **72**(1): p. 55-7.
123. Fischman, D. and V.K. Nookala, *Cystic fibrosis-related diabetes mellitus: etiology, evaluation, and management*. Endocr Pract, 2008. **14**(9): p. 1169-79.

## 8. Verzeichnisse

124. Ntimbane, T., et al., *Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress*. Clin Biochem Rev, 2009. **30**(4): p. 153-77.
125. Feranchak, A.P. and R.J. Sokol, *Cholangiocyte biology and cystic fibrosis liver disease*. Seminars in liver disease, 2001. **21**(4): p. 471-88.
126. Feranchak, A.P., *Hepatobiliary complications of cystic fibrosis*. Curr Gastroenterol Rep, 2004. **6**(3): p. 231-9.
127. Colombo, C., *Liver disease in cystic fibrosis*. Current opinion in pulmonary medicine, 2007. **13**(6): p. 529-36.
128. Diwakar, V., L. Pearson, and S. Beath, *Liver disease in children with cystic fibrosis*. Paediatric respiratory reviews, 2001. **2**(4): p. 340-9.
129. Brigman, C. and A. Feranchak, *Liver involvement in cystic fibrosis*. Curr Treat Options Gastroenterol, 2006. **9**(6): p. 484-96.
130. Colombo, C., et al., *Liver disease in cystic fibrosis*. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, 2006. **43 Suppl 1**: p. S49-55.
131. Bhardwaj, S., et al., *Hepatobiliary abnormalities and disease in cystic fibrosis: epidemiology and outcomes through adulthood*. Journal of clinical gastroenterology, 2009. **43**(9): p. 858-64.
132. Williams, S.M., et al., *Ultrasound evaluation of liver disease in cystic fibrosis as part of an annual assessment clinic: a 9-year review*. Clin Radiol, 2002. **57**(5): p. 365-70.
133. Fustik, S., et al., *Screening for liver disease in cystic fibrosis: analysis of clinical and genetic risk factors for its development*. Turk J Pediatr, 2008. **50**(6): p. 526-32.
134. Wells, G.D., et al., *Skeletal muscle metabolism in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia*. Pediatric research, 2011. **69**(1): p. 40-5.
135. Divangahi, M., et al., *Lack of CFTR in skeletal muscle predisposes to muscle wasting and diaphragm muscle pump failure in cystic fibrosis mice*. PLoS genetics, 2009. **5**(7): p. e1000586.
136. Khemiri, M., et al., *[Clinical characteristics and outcome of cystic fibrosis: report of 16 cases]*. Tunis Med, 2008. **86**(6): p. 567-72.
137. Derichs, N., et al., *Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data*. Thorax, 2010. **65**(7): p. 594-9.
138. Sermet-Gaudelus, I., et al., *Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2010. **182**(7): p. 929-36.
139. Littlewood, J.M. and S.P. Wolfe, *Control of malabsorption in cystic fibrosis*. Paediatric drugs, 2000. **2**(3): p. 205-22.
140. Lloyd-Still, J.D., et al., *Bioavailability and safety of a high dose of docosahexaenoic acid triacylglycerol of algal origin in cystic fibrosis patients: a randomized, controlled study*. Nutrition, 2006. **22**(1): p. 36-46.
141. Aldamiz-Echevarria, L., et al., *Persistence of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis despite nutritional therapy*. Pediatric research, 2009. **66**(5): p. 585-9.
142. Peters, S.A. and C.J. Rolles, *Vitamin therapy in cystic fibrosis--a review and rationale*. Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 1993. **18**(1): p. 33-8.
143. Jagannath, V.A., et al., *Vitamin K supplementation for cystic fibrosis*. Cochrane database of systematic reviews, 2011(1): p. CD008482.
144. Congden, P.J., et al., *Vitamin status in treated patients with cystic fibrosis*. Archives of disease in childhood, 1981. **56**(9): p. 708-14.
145. Scambi, C., et al., *Preliminary evidence for cell membrane amelioration in children with cystic fibrosis by 5-MTHF and vitamin B12 supplementation: a single arm trial*. PloS one, 2009. **4**(3): p. e4782.

## 8. Verzeichnisse

146. Ramalle-Gomara, E., et al., *Cystic fibrosis mortality trends in Spain among infants and young children: 1981-2004*. Eur J Epidemiol, 2008. **23**(8): p. 523-9.
147. Strausbaugh, S.D. and P.B. Davis, *Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology*. Clin Chest Med, 2007. **28**(2): p. 279-88.
148. Vender, R.L., *Cystic fibrosis lung disease in adult patients*. Postgrad Med, 2008. **120**(1): p. 64-74.
149. Herrmann, U., G. Dockter, and F. Lammert, *Cystic fibrosis-associated liver disease*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010. **24**(5): p. 585-92.
150. Lu, B.R. and C.O. Esquivel, *A review of abdominal organ transplantation in cystic fibrosis*. Pediatr Transplant, 2010.
151. Desmond, C.P., et al., *The benign course of liver disease in adults with cystic fibrosis and the effect of ursodeoxycholic acid*. Liver Int, 2007. **27**(10): p. 1402-8.
152. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
153. Bartlett, G.R., *Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids*. J Biol Chem, 1959. **234**(3): p. 469-71.
154. Burdge, G.C., et al., *A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction*. Br J Nutr, 2000. **84**(5): p. 781-7.
155. Postle, A.D., *Method for the sensitive analysis of individual molecular species of phosphatidylcholine by high-performance liquid chromatography using post-column fluorescence detection*. J Chromatogr, 1987. **415**(2): p. 241-51.
156. Bernhard, W., et al., *High-performance liquid chromatographic analysis of phospholipids from different sources with combined fluorescence and ultraviolet detection*. Analytical biochemistry, 1994. **220**(1): p. 172-80.
157. Bender, R., S. Lange, and A. Ziegler, *[Common significance tests]*. Deutsche medizinische Wochenschrift, 2007. **132 Suppl 1**: p. e24-5.
158. Bender, R., A. Ziegler, and S. Lange, *[Analysis of variance]*. Deutsche medizinische Wochenschrift, 2007. **132 Suppl 1**: p. e57-60.
159. Bender, R. and S. Lange, *[What is the p-value?]*. Deutsche medizinische Wochenschrift, 2007. **132 Suppl 1**: p. e15-6.
160. Lever, M., et al., *Sex differences in the control of plasma concentrations and urinary excretion of glycine betaine in patients attending a lipid disorders clinic*. Clinical biochemistry, 2007. **40**(16-17): p. 1225-31.
161. Schwab, U., et al., *Orally administered betaine has an acute and dose-dependent effect on serum betaine and plasma homocysteine concentrations in healthy humans*. J Nutr, 2006. **136**(1): p. 34-8.
162. Collinsova, M., et al., *Inhibition of betaine-homocysteine S-methyltransferase causes hyperhomocysteinemia in mice*. J Nutr, 2006. **136**(6): p. 1493-7.
163. Finkelstein, J.D., W. Kyle, and B.J. Harris, *Methionine metabolism in mammals. Regulation of homocysteine methyltransferases in rat tissue*. Arch Biochem Biophys, 1971. **146**(1): p. 84-92.
164. Ratnam, S., et al., *Effects of diabetes and insulin on betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in rat liver*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E933-9.
165. Slow, S., et al., *Plasma dependent and independent accumulation of betaine in male and female rat tissues*. Physiol Res, 2009. **58**(3): p. 403-10.
166. Lever, M. and S. Slow, *The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism*. Clinical biochemistry, 2010. **43**(9): p. 732-44.

## 8. Verzeichnisse

167. Lever, M., et al., *Homocysteine, glycine betaine, and N,N-dimethylglycine in patients attending a lipid clinic*. *Metabolism: clinical and experimental*, 2005. **54**(1): p. 1-14.
168. Freedman, S.D., et al., *Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(6): p. 560-9.
169. Waite, K.A., N.R. Cabilio, and D.E. Vance, *Choline deficiency-induced liver damage is reversible in Pemt(-/-) mice*. *J Nutr*, 2002. **132**(1): p. 68-71.

### 8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen.....	VI
Tabelle 2: Funktionen der Leber.....	2
Tabelle 3: Prozentuale PC-Zusammensetzung von Surfactant [6] und Plasma [7], bestimmt über MS.....	2
Tabelle 4: Lipoproteinklassen [4].....	15
Tabelle 5: Klasse I bis V-Mutationen [100, 101].....	28
Tabelle 6: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Probengewinnung der Plasmen.....	35
Tabelle 7: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Phospholipid-Extraktion ..	35
Tabelle 8: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Phospholipidquantifizierung .....	35
Tabelle 9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Festphasenextraktion der Plasmaunterphasen.....	35
Tabelle 10: Verwendete Geräte und Verbrauchsmittel für die Aufarbeitung der Proben zur Gaschromatographie.....	36
Tabelle 11: Verwendete Chemikalien.....	36
Tabelle 12: Verwendete Lösungsmittel.....	37
Tabelle 13: Verwendete Standardsubstanzen.....	37
Tabelle 14: Daten der Kontrollprobanden.....	38
Tabelle 15: Daten der CF-Patienten.....	39
Tabelle 16: Daten der Kontrollprobanden und CF-Patienten im Vergleich.....	40
Tabelle 17: Pipettierschema Phospholipidextraktion nach Bligh & Dyer.....	42
Tabelle 18: Pipettierschema Aufarbeitung Oberphase.....	42
Tabelle 19: Pipettierschema Phospholipidquantifizierung.....	44
Tabelle 20: Pipettierschema Phospholipidextraktion der Plasmalipide.....	45
Tabelle 21: Pipettierschema: Aufarbeitung der Triglyceride für Gaschromatographie ..	47
Tabelle 22: Bestandteile des HPLC-Geräts, Merck, Hitachi, Darmstadt.....	48
Tabelle 23: Formel der PC-Zusammensetzung und –Konzentration.....	49
Tabelle 24: Massenspektrometer und Lösungsmittel.....	53
Tabelle 25: Masse-Ladungs-Verhältnis der Phosphatidylcholinderivate.....	54
Tabelle 26: Massen-Ladungs-Verhältnisse (m/z) der molekularen PC-Spezies.....	54
Tabelle 27: MS-Analytik der wässrigen Metabolite.....	56
Tabelle 28: Masse-Ladungs-Verhältnis der wässrigen Metabolite.....	56
Tabelle 29: Bestandteile des GC-Gerätes.....	57
Tabelle 30: Endogene Cholin, Betain und Phosphocholin-Konzentrationen im Blutplasma.....	61
Tabelle 31: Phospholipid-Konzentrationen im Blutplasma.....	65
Tabelle 32: Phosphatidylcholin-Konzentrationen im Blutplasma.....	65
Tabelle 33: Zusammensetzung der PC-Spezies im Blutplasma, aufgeteilt nach mono- /di-unsaturierte und polyunsaturierte PC-Spezies.....	67

## 8. Verzeichnisse

Tabelle 34: Konzentration mono- und diunsaturierter PC-Spezies sowie polyunsaturierter (PUFA) PC-Spezies.....	68
Tabelle 35: Phosphatidylcholin-Konzentrationen im Blutplasma .....	69
Tabelle 36: Gruppeneinteilung der PC-Spezies entsprechend ihrer Fettsäurereste.....	70
Tabelle 37: Konzentrationen der Triglyceride im Blutplasma .....	79
Tabelle 38: Verhältnis der Phosphatidylcholine zu Triglyceriden im Blutplasma .....	80
Tabelle 39: Laborwerte der Kontrollprobanden und CF-Patienten .....	91
Tabelle 40: Originaldaten der endogenen Cholin-Konzentrationen.....	92
Tabelle 41: Originaldaten der endogenen Betain-Konzentrationen.....	92

### 8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leberazinus [1].....	1
Abbildung 2: Strukturformel von deuteriertem Cholin .....	6
Abbildung 3: Strukturformel des Ceramids .....	9
Abbildung 4: Strukturformel eines Glycerophospholipids .....	10
Abbildung 5: Phospholipide (R) mit den jeweiligen Kopfgruppen .....	11
Abbildung 6: Fettsäuren mit ihrem Trivial- und chemischen Namen .....	12
Abbildung 7: Fettsäuresynthese .....	13
Abbildung 8: Synthese von Phosphatidsäure .....	17
Abbildung 9: PL- und TAG-Synthese .....	18
Abbildung 10: Kennedy-Pathway.....	19
Abbildung 11: Lands-Zyklus.....	20
Abbildung 12: PEMT-Pathway .....	21
Abbildung 13: Homozystein-Methionin-Stoffwechselweg.....	21
Abbildung 14: Strukturformel von Phosphatidylcholin.....	23
Abbildung 15: Strukturformel eines Triglycerids.....	24
Abbildung 16: Synthese von Triacylglyceriden (TAG) .....	25
Abbildung 17: Lipolyse.....	26
Abbildung 18: Studienablauf .....	40
Abbildung 19: Phospholipidextraktion nach Bligh & Dyer.....	42
Abbildung 20: Phospholipidquantifizierung .....	43
Abbildung 21: Festphasenextraktion der Plasmalipide.....	45
Abbildung 22: Aufarbeitung der Triglyceride für Gaschromatographie .....	46
Abbildung 23: Beispiel für HPLC-Chromatogramm (P1, t = 6 h) .....	50
Abbildung 24: Phosphocholin.....	53
Abbildung 25: Beispiel für Massenspektren (P1 t = 24 h) .....	55
Abbildung 26: Beispiel für GC-Chromatogramm (P1 t = 24 h).....	58
Abbildung 27: Endogene Cholin- (A), Betain- (B) und Phosphocholin-Konzentrationen (C) im Blutplasma.....	60
Abbildung 28: D <sub>9</sub> -Cholin- (A), D <sub>9</sub> -Betain- (B) und D <sub>9</sub> -Phosphocholin-Konzentrationen (C) im Blutplasma.....	62
Abbildung 29: D <sub>9</sub> -Cholin- (A), D <sub>9</sub> -Betain- (B) und D <sub>9</sub> -Phosphocholin-Anreicherung (C) 64	
Abbildung 30: PL-Konzentrationen im Zeitverlauf .....	64
Abbildung 31 : PL- und PC-Konzentrationen im Blutplasma.....	66
Abbildung 32: Zusammensetzung des Gesamt-PC: Molekulare PC-Spezies .....	67
Abbildung 33: Konzentrationen der molekularen PC-Spezies .....	68
Abbildung 34: Endogene PC-Konzentrationen im Blutplasma im Zeitverlauf (A) und gesamt (B) .....	70



## 8. Verzeichnisse

Abbildung 35: Zusammensetzung des endogenen PCs.....	71
Abbildung 36: Konzentrationen der endogenen PC-Spezies.....	72
Abbildung 37: Zusammensetzung der molekularen D <sub>9</sub> - und D <sub>3</sub> -PC-Spezies .....	73
Abbildung 38: D <sub>9</sub> - (A) und D <sub>3</sub> - (B) PC-Konzentrationen im Blutplasma.....	75
Abbildung 39: Konzentrationen des [Methyl-D <sub>9</sub> ]-PCs aufgeteilt nach Gruppen .....	76
Abbildung 40: Konzentrationen des [Methyl-D <sub>3</sub> ]-PCs aufgeteilt nach Gruppen .....	76
Abbildung 41: D <sub>9</sub> -PC- (A) und D <sub>3</sub> -PC- (B) -Anreicherung.....	77
Abbildung 42: De-novo-Pathway und PEMT-Pathway .....	78
Abbildung 43: D <sub>3</sub> /D <sub>6</sub> -Ratio .....	79
Abbildung 44: Zusammensetzung der Triglycerid-Fettsäuren im Blutplasma .....	80

## **9. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. med. Dr. rer. physiol. Wolfgang Bernhard für die interessante Themenstellung, die den Grundstein dieser Arbeit legte, sowie für die engagiert Betreuung und Unterstützung bei deren Durchführung. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. C. Poets bedanken, in dessen Abteilung diese Arbeit entstanden ist. Zudem möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe, insbesondere Frau V. Müller sowie Herr Dr. rer. nat. C. Pynn für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung danken.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn Blumenstock herzlich bedanken.

Meiner Familie, meinen Freunden sowie Joachim Seitz möchte für die emotionale Unterstützung, Geduld und Verständnis während der Jahre intensiver Arbeit danken.