

sion von LDL-Rezeptoren und führt auf diesem Weg zur Senkung des Plasmacholesterins. Bisher war die Bestimmung von Pravastatin nur mittels aufwendiger GC/MS-Methoden möglich. Hier wird eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Pravastatin im Plasma vorgestellt.

Die Proben wurden mittels Festphasenextraktion an Bond-Elut-Cartridges extrahiert. Triamcinolonacetat diente als interner Standard. Die Trennung erfolgte an einer C8-Matrix (250* 4 mm). Der Eluent enthielt Methanol, Acetonitril und Wasser.

Die Methode ist linear im Bereich von 5 bis 50 ng/mL Pravastatin. Der Variationskoeffizient von Lauf zu Lauf hängt von der Pravastatin-Konzentration ab, liegt aber für den gesamten Meßbereich unter 12%.

Vier gesunde Probanden erhielten eine orale Einzeldosis von 60 mg Pravastatin, und die Plasmakonzentration des Pharmakons wurde bis 5 Stunden nach der Einnahme in Intervallen von einer halben Stunde bestimmt. Um die intra-individuelle Reproduzierbarkeit des Konzentrationsverlaufs zu bestimmen, wurde ein Proband dreimal an verschiedenen Tagen untersucht. Die maximale Plasmakonzentration von Pravastatin wurde etwa eine Stunde nach oraler Einnahme gefunden, und die Plasmahalbwertszeiten lagen zwischen 1,0 und 1,5 h. Intraindividuell waren die Profile gut reproduzierbar. Inter-individuell gab es deutliche Unterschiede im Verlauf der Pravastatinkonzentrationen.

Die hier entwickelte HPLC-Methode eignet sich zur Bestimmung von Pravastatin im Plasma. Sie liefert pharmakokinetische Daten, die mit GC/MS-Messungen exzellent übereinstimmen.

P 15

Genetische Marker bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

W. März¹, M. Proft¹, R. Siekmeier¹, Sabine Cezanne¹, J. Schreier², J. Kähler², H. Kronenberger², W. Schneider², M. Kaltenbach² und W. Groß¹

¹Gustav Embden-Zentrum der Biologischen Chemie und ²Zentrum der Inneren Medizin, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Genetische Polymorphismen der Apolipoproteine B und E sind mit der Höhe des Plasma- und LDL-Cholesterins assoziiert.¹ Einige Beobachtungen sprechen dafür, daß Variationen der Apolipoproteingene neben dem Lipoproteinmuster direkt das Koronarrisiko beeinflussen könnten.

In dieser Studie wurden Lipoproteine, Apolipoproteine (kinetische Nephelometrie), Lipoprotein (a) (RIA), ApoE-Phänotypen (Immuno-blotting) und ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus des ApoB-Gens (XbaI, polymerase chain reaction) bei 108 Patienten mit angiografisch gesicherter koronärer Herzkrankheit (KHK) und einer altersgleichen Kontrollgruppe (n = 58) untersucht. Verteilung der XbaI-Genotypen (X1/X1, X1/X2, X2/X2) und ApoE-Phänotypen sowie die Mittelwerte der Lipoproteine und Apolipoproteine [g/L] sind in der Tabelle zusammengefaßt:

	X1/X1	X1/X2	X2/X2	E2/2	E3/2	E3/3	E4/3	E4/2	E4/4
KHK [%]	28,7	45,4	25,9	0	11,1	53,7	31,5	0,9	2,8
Kontr. [%]	24,1	48,3	27,6	3,5	15,5	55,2	22,4	3,5	0

	C	TG	LDL-C	HDL-C	ApoA-I	ApoA-II	ApoB	Lp(a) ¹
KHK	2,12	1,61	1,43	0,37	1,26	0,52	0,92	0,23
Kontr.	2,16	1,08	1,47	0,47	1,47	0,47	0,88	0,115

¹Median

Gesamt- und LDL-Cholesterin (C) diskriminieren nicht zwischen Patienten mit KHK und Gesunden. In der Verteilung der ApoB-Genotypen gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven. Allerdings war das X2-Allel in der Kontrollgruppe positiv mit Triglyceriden (TG), LDL-C und ApoB sowie invers mit HDL-C und ApoA-I assoziiert. Das ApoE4-Allel fand sich bei Pa-

tienten mit KHK deutlich häufiger als im Kontrollkollektiv. Ausgeprägte Unterschiede wurden bei TG und beim HDL-C beobachtet. ApoA-I war bei Patienten mit KHK erniedrigt, ApoA-II lag im Normbereich. Der Median des Lp(a) war in der Patientengruppe doppelt so hoch wie bei Gesunden. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des ApoE-Polymorphismus sowie des Lp(a) als Risikoindikatoren. Die Relevanz genetischer Variation am ApoB-Locus bedarf weiterer Untersuchungen.

Schrifttum:

1. BRESLOW, J. L.: *Physiol. Rev.* 68, 85-132 (1988).

P 16

Charakterisierung des Gens für ApoE5-Frankfurt mittels Polymerase Chain Reaction, Restriction Isotyping und Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

W. März, V. Ruzicka und W. Groß
Gustav Embden-Zentrum der biologischen Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main

Apolipoprotein E (ApoE) ist Ligand des ApoB,E-Rezeptors. Es moduliert den Katabolismus triglyceridreicher Lipoproteine und ist an der Regulation der LDL-Konzentration beteiligt. Am ApoE-Locus kennt man die drei häufigen Allele $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$. Der Polymorphismus beruht auf Substitutionen der Aminosäuren 112 und 158. ApoE4 enthält Arginin, ApoE2 enthält Cystein an beiden Positionen. ApoE3 enthält Cystein an Position 112 und Arginin an Position 158. In vivo wird ApoE4 schneller katabolisiert als ApoE2 und ApoE3. Dies führt zu einem erhöhten Flux von Remnant-Cholesterin in die Leber, einer Suppression von LDL-Rezeptoren und einer Erhöhung des Plasmacholesterins. Hier wird über eine Variante des ApoE berichtet, in der es offensichtlich durch Einführung einer zusätzlichen positiven Ladung in ein ApoE4-Molekül zu einer Hypercholesterinämie kommt.

Bei dem 43jährigen Patienten lag neben der Hypercholesterinämie lediglich eine essentielle Hypertonie vor. Die Lipoproteinanalyse ergab: Cholesterin (C) 2,66 g/l, Triglyceride (TG) 1,91 g/L, VLDL-C 0,34 g/L, VLDL-TG 1,05 g/L, IDL-C 0,26 g/L, LDL-C 1,85 g/L, HDL-C 0,47 g/L, ApoA-I 1,38 g/L, ApoB 1,29 g/L. Im Immunblot war der ApoE-Phänotyp des Patienten 5/3. In der SDS-PAGE hatte ApoE5 das gleiche Molekulargewicht wie ApoE3.

Mittels polymerase chain reaction (PCR) wurde ein 244 bp langes Fragment des ApoE-Gens amplifiziert und mit HhaI verdaut (1). Auf diese Weise ergab sich als scheinbarer Genotypus $\epsilon 4/\epsilon 3$. Damit handelt es sich bei ApoE5-Frankfurt um ein mutiertes $\epsilon 4$ -Allel. Durch vollständige PCR-Amplifikation der Exone 3 und 4 des ApoE-Gens und Analyse der Amplifikate mittels Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE) konnte die für ApoE5-Frankfurt verantwortliche Mutation dem vierten Exon des ApoE Gens zugewiesen werden. ApoE5-Frankfurt unterscheidet sich damit von einer kürzlich beschriebenen ApoE-Mutante (2), bei der durch eine einzelne Aminosäuresubstitution (Glu₃ -> Lys) zwei zusätzliche Ladungen in ein ApoE3-Molekül eingeführt wurden.

Die Charakterisierung des Gens für ApoE5-Frankfurt illustriert die Leistungsfähigkeit der TGGE in der Diagnostik genetischer Stoffwechseldefekte. Die TGGE trennt Nukleinsäuren aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens. Gegenüber anderen Verfahren der Genomanalyse setzt sie a priori keine Kenntnisse über Lage oder Art einer Mutation voraus. Sie ermöglicht den Nachweis nahezu jeder Punktmutation in Segmenten bis zu etwa 400 bp Länge. Die Methode ist einfach und erlaubt einen hohen Probendurchsatz. Sie stellt damit eine effiziente Screeningmethode im Vorfeld der DNA-Sequenzierung dar.

Schrifttum:

1. HIXSON, J. E., VERNIER, D. T.: *J. Lipid Res.* 31, 545-548 (1990).
2. TAJIMA, S., YAMAMURA, T., YAMAMOTO, A.: *J. Biochem.* 104, 48-52 (1988).