

Aus der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert)

**Korrelation des Makrophagen-Cholesterin-
Efflux mit dem Risiko für eine Koronare
Herzkrankheit und der Lipoprotein-Subklassen-
Verteilung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Henning Jansen

aus Lingen (Ems)

Lübeck 2010

1. Berichtstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Patrick Diemert
Berichtstatter / Berichtstatterin:	Prof. Dr. med. Norbert Guldner
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2011
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	09.06.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Fettstoffwechsel	6
1.1.1 Lipoproteine und deren Aufgaben	6
1.2 Antiatherogene Wirkungen des HDL	8
1.2.1 HDL und Arteriosklerose	8
1.2.2 HDL und endotheliale Funktionen	9
1.3 Mechanismen und Bedeutung des Makrophagen-Cholesterin-Efflux	9
1.3.1 Entstehung arteriosklerotischer Plaques	10
1.3.2 Der Reverse-Cholesterin-Transport	10
1.3.3 Makrophagen-Cholesterin-Efflux und Arteriosklerose	14
1.4 Zielsetzung und Fragestellung	15
2. Patienten, Material und Methoden	16
2.1 Patienten	16
2.2 Material	16
2.2.1 Chemikalien	16
2.2.2 Geräte	17
2.3 Methoden	17
2.3.1 Blutgewinnung	17
2.3.2 Ansetzen des 10%-igen Nährmediums	17
2.3.3 Zellisolation	18
2.3.4 Zelldifferenzierung	19
2.3.5 Isotopische Messung des Cholesterin-Efflux (Tag 7)	19
2.3.6 Bestimmung der Plasma-Lipide	20
2.3.7 Bestimmung der Lipoprotein-Subklassen	20
2.3.8 Herzkatheteruntersuchung	21

2.3.9 Statistische Auswertung	21
3. Ergebnisse	23
3.1 Patientengut	23
3.2 Korrelation des Makrophagen-Cholesterin-Efflux mit dem Plasma-HDL und der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung	24
3.3 Beziehung zwischen dem Cholesterin-Efflux und einer obstruktiven KHK ..	27
4. Diskussion.....	30
4.1 Studiendesign und Zellkultivierung	30
4.2 Zusammenhang zwischen dem Makrophagen-Cholesterin Efflux und HDL- Plasmawerten.....	30
4.3 Lipoprotein-Subklassen Analyse mittels NMR Spektroskopie.....	31
4.4 Zusammenhang zwischen Makrophagen-Cholesterin-Efflux und einer KHK	32
4.5 Die Rolle der ATP-abhängigen Transporter ABCA1 und ABCG1	33
4.6 Limitationen der Studie.....	34
5. Zusammenfassung	35
6. Literaturverzeichnis.....	36
7. Anhang	43
7.1 Danksagung	43
7.2 Lebenslauf.....	44
7.3 Eidesstattliche Erklärung.....	46

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	<i>ATP-binding-casette-A1</i>
ABCG1	<i>ATP-binding-casette-G1</i>
ABCG4	<i>ATP-binding-casette-G4</i>
ACAT	Acetyltransferase
Apo-AI	Apolipoprotein-AI
bpm	<i>beats per minute</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CETP	Cholesterinester Transfer Protein
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
FBS	<i>foetal bovine serum</i>
g	Erdschwerebeschleunigung, $9,81\text{m/s}^2$
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Konfidenzintervall
LAD	<i>left anterior descending artery</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LCX	<i>left circumflex artery</i>
LXR	<i>liver x receptor</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
min	Minuten
NMR	<i>nuklear magnetic resonance</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RCA	<i>right coronary artery</i>
RPMI	<i>rosewell park memorial institute medium</i>
S-1-P	<i>sphingosin-1-phosphat</i>
SPC	<i>sphingosylphosphorylcholin</i>
SR-BI	<i>scavenger-rezeptor-BI</i>
StdDev	Standardabweichung
VCAM1	<i>vascular-cell-adhesion-molecule-1</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit werden Zusammenhänge zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux, der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung sowie dem Risiko einer stenosierenden koronaren Herzkrankheit (KHK) an einem Kollektiv von Herzkatheter-Patienten untersucht. In diesem ersten Kapitel soll zunächst ein Überblick über den Fettstoffwechsel im menschlichen Körper eine Einführung in die Materie bieten (Abschnitt 1.1.). Im darauf folgenden Abschnitt 1.2. wird auf die besondere Rolle des *high density lipoproteins* (HDL) in Hinblick auf seine atherogene Eigenschaft eingegangen. Ferner werden in einem weiteren Abschnitt 1.3. die Mechanismen und die Bedeutung des Makrophagen-Cholesterin-Efflux dargestellt.

1.1 Fettstoffwechsel

1.1.1 Lipoproteine und deren Aufgaben

Lipoproteine dienen Lipiden als Transportproteine im lipophoben Medium des Blutplasmas. Entsprechend ihres Proteingehaltes lassen sich *very low density lipoproteins* (VLDL), *low density lipoproteins* (LDL) und HDL unterscheiden. Eine Dichte unterhalb der der VLDL zeigen schließlich die lipidreichen Chylomikronen. Das Verhältnis von Lipiden zu Proteinen und die Dichte nehmen angefangen bei den Chylomikronen über die VLDL- und LDL-Partikel bis hin zu den HDL- Partikeln zu. Genau gegenläufig verhalten sich die jeweiligen Größen der einzelnen Lipoproteine, welche angefangen bei den HDL- Partikeln über die LDL- und VLDL-Partikel bis zu den Chylomikronen zunehmen.

Die unterschiedliche Proteinzusammensetzung der Lipoproteine wird in ihrem elektrophoretischen Verhalten deutlich. Chylomikronen zeigen keine elektrophoretische Beweglichkeit, LDL wandert mit der β -Globulin-Fraktion und HDL mit der α -Globulin- Fraktion. Sie werden demnach auch als β -bzw. als α -Lipoproteine bezeichnet. Die VLDL-Partikel wandern in der Elektrophorese den β -Globulinen voraus und werden daher in der Literatur auch als prä- β -Lipoproteine bezeichnet (Rainwater, 1998).

Mit der Nahrung aufgenommenes Cholesterin wird im Jejunum mit Hilfe von Gallensalzen in resorbierbare Mizellen umgewandelt. Nach diesem Prozess, welcher als Solubilisation bezeichnet wird, gelangen die Mizellen an die Oberfläche der Bürstensaummembran der Enterozyten. Hier ist das Transportprotein Niemann-Pick-C1-like-1 (NPC1L1) lokalisiert, das für die Aufnahme des Cholesterins über die zytoplasmatische Membran verantwortlich ist. Dieser Transporter ist in den letzten Jahren als therapeutisches Ziel der Cholesterin-Absorptionshemmer Ezetimibe identifiziert worden und findet seitdem Beachtung in der Behandlung der Hypercholesterinämien (Altmann *et al.*, 2004). Via NPC1L1 aufgenommenes Cholesterin gelangt zunächst in das zytoplasmatische Zellkompartiment und von dort aus zum endoplasmatischen Retikulum, wo Cholesterin mit Hilfe der Cholesterin- Acyltransferase 2 (ACAT2) verestert wird. Triacylglyceride, freies Cholesterin, Cholesterinester und Phosphoglyceride werden mit den Apolipoproteinen A I (apoA-I) und A II zu Chylomikronen verbunden und abschließend durch Exozytose in die Mesenterial-Lymphe sezerniert. Über den *Ductus thoracicus* und den linken Venenwinkel gelangen die triacylglycerinreichen Partikel schließlich in das Blutsystem (Müller, 1980).

Auch an anderer Stelle entstehen triacylglycerinreiche Lipoproteine. In der Leber werden Triacylglyceride, freies Cholesterin, Cholesterinester und Phosphoglyceride zu VLDL-Partikeln assembliert und von den Hepatozyten in den Blutkreislauf sezerniert (Janero *et al.*, 1984).

An den Endothelzellen der Kapillaren findet sich die Lipoproteinlipase, welche die Spaltung von Triacylglycerin zu Glycerin und Fettsäuren aus Chylomikronen und VLDL katalysiert. Die entstandenen Fettsäuren werden von den extrahepatischen Geweben aufgenommen und metabolisiert. Glycerin gelangt zur Leber und von dort aus in den Stoffwechsel (Merkel *et al.*, 2002). Das Überbleibsel des Chylomikronenabbaus, welches auch als *remnant* bezeichnet wird, gelangt zur Leber, wo eine Internalisierung mit Hilfe des LDL-Rezeptors gelingt (Brown und Goldstein, 1979). Aus den VLDL-Partikeln entstehen über Intermediärpartikel (IDL) in der Leber die cholesterinreichen LDL-Partikel. Diese haben die Aufgabe Cholesterin von der Leber zu extrahepatischem Gewebe zu transportieren (Marsh, 1971). In der Plasmamembran der Zielzelle findet sich der LDL-Rezeptor, der LDL spezifisch bindet (Brown und Goldstein, 1979). Dieser internalisiert durch

Endozytose des LDL und die darin enthaltenen Lipide. Im endoplasmatischen Retikulum beeinflusst Cholesterin nun zwei Prozesse. Zum einen wird die Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), welche für die Cholesterinbiosynthese entscheidend ist, reduziert (Naseem *et al.*, 1980). Zum anderen aktiviert Cholesterin die ACAT, welche eine Veresterung des Cholesterins katalysiert. Auf diese Weise entstehen Cholesterinester, die die Speicherform des Cholesterin in den Zielzellen darstellen (Gavigan und Knight, 1983).

1.2 Antiatherogene Wirkungen des HDL

1.2.1 HDL und Arteriosklerose

Arteriosklerotische Erkrankungen gelten als die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen. Niedrige Konzentrationen des HDL-Cholesterins sind ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen und sie zeigen eine inverse Korrelation zu dem Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu leiden (Rhoads *et al.*, 1976). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass niedrige HDL-Plasmawerte die häufigste Fettstoffwechselstörung bei Männern mit einer KHK sind. Sie finden sich bei 50 Prozent der betroffenen Patienten (Genest *et al.*, 1991). Klinische Studien belegen, dass eine medikamentöse Erhöhung der HDL-Plasmawerte durch Fibrate bei Patienten mit bestehender KHK eine geringere Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse zur Folge hat (Frick *et al.*, 1987; Rubins *et al.*, 1999). Diese Studien zeigen die bisher beste Evidenz für die medikamentöse Erhöhung der HDL-Plasmaspiegel. Epidemiologische Studien demonstrieren ferner, dass die Erhöhung der HDL Cholesterin-Konzentration um 1 mg/dl mit einer Reduzierung des kardiovaskulären Risikos um 2 bis 3 Prozent assoziiert ist (Gordon *et al.*, 1981; Assmann und Schulte, 1987; Assmann und Schulte, 1992). Interessant in diesem Zusammenhang erscheint eine Untersuchung, bei der apoA-I als Hauptbestandteil von HDL direkt in die Koronarien appliziert wurde. Mittels intravaskulärem Ultraschall ließ sich eine Abnahme arteriosklerotischer Plaques nach apoA-I-Infusion feststellen (Nissen *et al.*, 2003). Diese Studien legen nahe, dass neben der Senkung des LDL-Cholesterins beispielsweise mittels des

Einsatzes von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine), HDL als ein therapeutischer Angriffspunkt in der Prävention der KHK angesehen werden kann.

1.2.2 HDL und endotheliale Funktionen

Eine endotheliale Dysfunktion ist durch das Fehlen von *nitric oxide* (NO), einem potenten Vasodilatator, und einer gesteigerten Affinität der endothelialen Oberfläche für Leukozyten charakterisiert. Sie lässt sich häufig in frühen Stadien der Arterioskleroseentstehung beobachten (Assmann und Gotto, 2004). Einige Studien beschreiben einen günstigen Effekt des HDL bezüglich der endothelialen Funktion: So findet sich bei Patienten, die an einer Hypercholesterinämie leiden, eine verminderte NO-abhängige Vasodilatation im Vergleich zu Patienten, die einen normalen Cholesterinspiegel aufweisen. Die endotheliale Funktion im Sinne einer Gefäßdilataion konnte jedoch durch Infusion von cholesterinfreiem HDL wieder hergestellt werden (Spieker *et al.*, 2002). Dass HDL die Aktivität der *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) steigert, dadurch die Freisetzung von NO erhöht und somit die Vasodilatation bewirkt, konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden und scheint gut belegt (Yuhanna *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002).

Die Entdeckung, dass HDL die Produktion von NO generiert, während apoA-I keinen Effekt auf das Endothel zeigt, legt die Vermutung nahe, dass HDL bestimmte stimulierende Agenzien enthält, die die NO-Produktion stimulieren (Assmann und Gotto, 2004). Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass HDL bioaktive Lysosphingolipide an sich bindet, wie beispielsweise *Sphingosin-1-Phosphat* (S-1-P), *Sphingosylphosphorylcholin* (SPC) und *Lysosulfat* (Nofer *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2001; Nofer *et al.*, 2004). Die untersuchten intrazellulären Signaltransduktionen, ausgelöst von HDL und Lysosphingolipiden, zeigten eine große Ähnlichkeit: diese Substanzen waren genau wie HDL in der Lage, eine Vasodilatation herbeizuführen und Apoptose zu verhindern. Ausgehend von diesen Ergebnissen und der Tatsache, dass sich Lysosphingolipide als lipophile Substanzen an HDL gebunden präsentieren, lässt sich vermuten, dass Lysosphingolipide als Bestandteil des HDL eine wichtige vasoprotektive Wirkung besitzen.

1.3 Mechanismen und Bedeutung des Makrophagen-Cholesterin-Efflux

1.3.1 Entstehung arteriosklerotischer Plaques

Schon früh in der Entwicklung einer arteriosklerotischen Gefäßveränderung wandern Monozyten durch das geschädigte einschichtige Endothel in die Intima, wo sie unter dem Einfluss der *Macrophage colony-stimulating factor-* (M-CSF-) Wirkung zu Makrophagen differenzieren (Mauldin *et al.*, 2006). Bei diesem Vorgang wird inflammatorischen Prozessen eine besondere Rolle zugesprochen. Es gibt Anhalte, dass diese Inflammation vor allem durch LDL ausgelöst wird, welches zuvor mittels Sauerstoffintermediärprodukten und weiteren Enzymen oxidiert wurde (Berliner *et al.*, 1995). Oxidiertes LDL wird von *Scavenger* Rezeptoren der Klassen *B1* (SR-B1) und *CD36* auf Makrophagen erkannt und in die subendothelialen Zellen eingeschleust (Sun *et al.*, 2007) Des Weiteren geben auch die aus dem Chylomikronenabbau entstandenen *remnants* ohne vorangegangene Oxidation Cholesterin an Makrophagen ab (Botham *et al.*, 2007). Ferner phagozytieren Makrophagen freies Cholesterin und verestern dieses mit Hilfe der ACAT1 (Chang *et al.*, 2001). Der Schritt der Veresterung ist notwendig, da freies Cholesterin eine toxische Wirkung auf Zellen ausübt und schließlich zur Apoptose der cholesterinaufnehmenden Zellen führt (Tabas, 2004). Aus der Aufnahme und Speicherung von Cholesterin entstehen die nach ihrem Aussehen bezeichneten Schaumzellen (de Villiers, 1999). Diese Zellen im subendothelialen Raum bilden durch Akkumulation zu sogenannten *fatty streaks* die erste morphologische Veränderung, die zur Arteriosklerose führen kann (Pearson *et al.*, 1977). Nekrotisierung und Apoptose der Schaumzellen führt weiterhin zur Bildung arteriosklerotischer Plaques.

1.3.2 Der Reverse-Cholesterin-Transport

Der Reverse-Cholesterin-Transport beschreibt den Transport von Cholesterin aus peripheren Zellen hin zur Leber mit Hilfe des HDL. HDL fungiert dabei als Akzeptor für überschüssiges Cholesterin. Dieser komplexe Transportmechanismus wird mit Hilfe verschiedenener Enzyme und transmembranöser Transporter katalysiert und reguliert. So wurde schon früh die

Bedeutung der Lecithin-Cholesterin-Acetyltransferase (LCAT) für den Reversen-Cholesterin-Transport entdeckt und damit ein erster Baustein des komplexen Transportsystemes hin zur Leber gefunden. Dieses Enzym verestert freies Cholesterin an der Oberfläche von HDL-Partikeln und ermöglicht so die Aufnahme von Cholesterin in die HDL-Partikel (Glomset, 1968).

Die Hypothese, dass HDL bzw. seine Bestandteile apoA-I oder apoE als Akzeptoren für das in den Makrophagen akkumulierte Cholesterin fungieren kann, ist inzwischen weit verbreitet. Als ein für die Aufnahme des Cholesterin wichtiger ATP-abhängiger Transporter ist *ATP-Binding-Casette-A1* (ABCA1) identifiziert worden, welcher als defektes Molekül eine wichtige Rolle bei der Tangier-Erkrankung spielt (Bodzioch *et al.*, 1999). Diese rezessiv vererbte, seltene Erkrankung geht mit einer Anhäufung von Lipiden und massiver Schaumzellbildung in verschiedenen Organen einher. Die HDL-Spiegel im Plasma der betroffenen Patienten sind häufig nicht messbar. Hieraus ergibt sich, dass ABCA1 eine wichtige Rolle bei der Generierung der HDL-Partikel zukommt. Die Steuerung der ABCA1-Gen-Expression unterliegt dem nukleären *liver x receptor* (LXR), welcher an den ABCA1-Promoter bindet, dadurch eine Expression des Proteins herbeiführt und somit den Cholesterin-Efflux aus den Schaumzellen steigert. Ferner werden freies Cholesterin und Phospholipide über ABCA1 transportiert. Im Plasma zirkulierende lipid-freie oder lipid-arme apoA-I-Partikel binden an die extrazellulären Domänen des Transporters und werden daraufhin mit Cholesterin und Phospholipiden angereichert (Wang *et al.*, 2001). Über diesen Mechanismus der Lipidaufnahme entstehen aus den vornehmlich in der Leber produzierten apoA-I-Partikeln sogenannte prä- β -HDL-Partikel. Die entstandenen prä- β -HDL-Partikel können wiederum als Cholesterin-Akzeptoren wirken, wodurch die größeren und lipidreicheren HDL₃- und HDL₂-Moleküle entstehen (siehe Abbildung 1.1). Diese Anreicherung wird durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase möglich, welche an apoA-I gebunden aufgenommenes Cholesterin verestert. Der Cholesterintransport mittels ABCA1 ist jedoch spezifisch für an den ABC-Transporter gebundene Apolipoproteine. Die Cholesterinübertragung auf die lipidreicheren HDL₃ und HDL₂ -Moleküle erfolgt über vielfache Wege. Es wurden die ABC-Transporter ABCG1 und ABCG4 identifiziert, die diese Aufgabe teilweise übernehmen (Wang *et al.*, 2004). ABCG1 und ABCG4 werden ebenso wie ABCA1 über den LXR gesteuert exprimiert und

zeigen in Makrophagen eine hohe Expression. Die Stimulation dieses Rezeptors kann durch synthetische Liganden geschehen. Sie erhöhen die HDL-Plasmaspiegel und hemmen die Entwicklung von Arteriosklerose im Mausmodell (Joseph *et al.*, 2002). Zusätzlich zu den ABC-Transportern diffundiert Cholesterin entlang des Konzentrationsgefälles aus den lipidangereicherten Makrophagen auf die HDL-Partikel. Ferner spielt der SR-BI eine Rolle bei der Cholesterinübertragung im reversen Cholesterin-Transport. Er erleichtert zum einen die Aufnahme des Cholesterins aus den Makrophagen und katalysiert zum anderen die Abgabe an die Hepatozyten (Connelly und Williams, 2004). SR-BI ist in der Vergangenheit in zahlreichen Untersuchungen zum Cholesterintransport Beachtung geschenkt worden. SR-BI steuert in den Hepatozyten die selektive Aufnahme, was bedeutet, dass Cholesterin aus den HDL-Partikeln aufgenommen wird, die HDL-Proteine, wie apoA-I, jedoch nicht in die Hepatozyten gelangen. Eine erhöhte Expression des Rezeptors in der Leber reduzierte die HDL-Plasmaspiegel im Zuge einer gesteigerten hepatischen Aufnahme via SR-BI (Rigotti *et al.*, 1997; Varban *et al.*, 1998; Brundert *et al.*, 2005). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell zeigen, dass eine hepatische SR-BI Expression den Cholesterin-Efflux aus Makrophagen erhöht. Umgekehrt zeigte sich bei defizitärem SR-BI ein reduzierter Efflux (Zhang *et al.*, 2005). Trotz der Vielzahl von bekannten Transportmechanismen des Cholesterin-Efflux aus Makrophagen konnte die genaue quantitative Verteilung der einzelnen Wege bislang nicht ausreichend aufgeklärt werden (Cuchel und Rader, 2006).

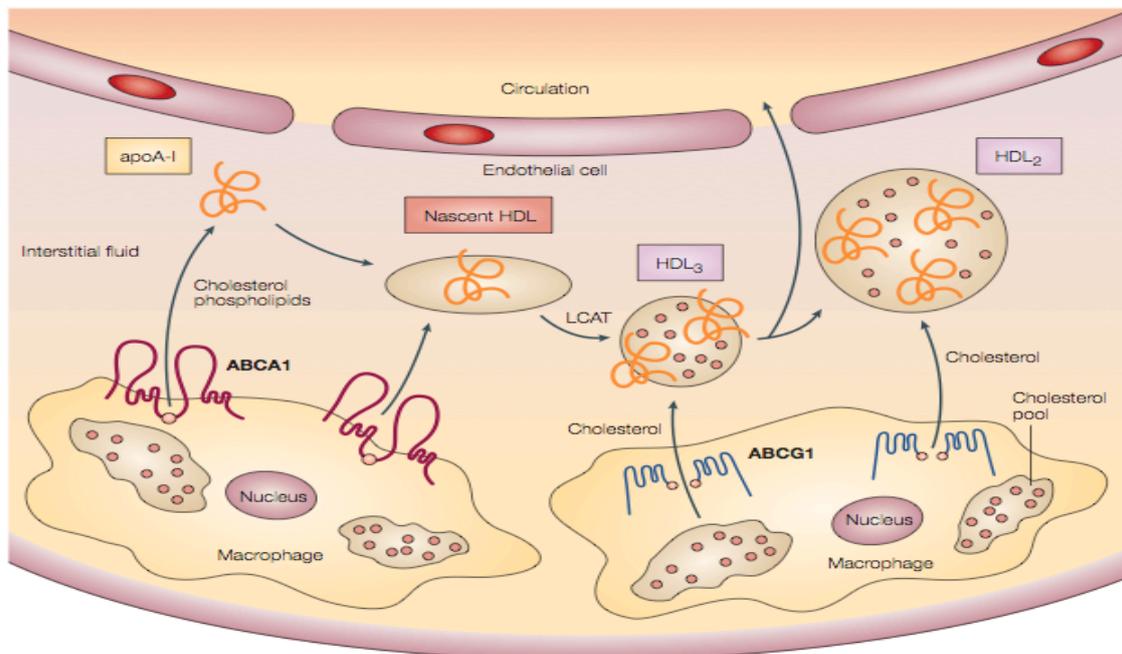


Abbildung 1.1: ABC-Transporter vermittelter Cholesterin-Efflux und Bildung von HDL-Partikeln in der Gefäßwand (Abbildung aus Linsel-Nitschke und Tall, *Nature Reviews* 2005)

Den lipidreichen HDL₃- und HDL₂-Molekülen stehen schließlich nach der Cholesterinaufnahme über die beschriebenen Mechanismen zwei metabolische Wege bevor: Auf dem direkten Wege werden Cholesterinester aus den HDL-Partikeln selektiv von den Hepatozyten und Steroidhormon produzierenden Zellen über den erwähnten SR-BI aufgenommen und anschließend in die Gallenflüssigkeit sezerniert (Meyers und Kashyap, 2004). Auf dem indirekten Wege können Cholesterinester aus den HDL-Partikeln gegen Triglyceride aus LDL und VLDL ausgetauscht werden. Dieser Transport wird durch das Cholesterinester-Transfer-Protein (CETP) ermöglicht. Geschätzte 50 Prozent der Cholesterinester werden über diesen Austausch mittels LDL und VLDL zur Leber transportiert und dort über den LDL-Rezeptor in die Hepatozyten internalisiert. Die neu entstandenen triglyceridreichen HDL-Partikel können durch die hepatische und endotheliale Lipase hydrolysiert werden; auf diesem Wege entstehen wiederum kleinere HDL-Moleküle, welche erneut am Cholesterin-Transport partizipieren können (Lewis und Rader, 2005).

1.3.3 Makrophagen-Cholesterin-Efflux und Arteriosklerose

Die besondere Bedeutung des ABCA1-Transporters in der Entstehung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen ist anhand mehrerer Untersuchungen nachvollziehbar. Fibroblasten von Patienten, die an der Tangier-Erkrankung leiden, weisen in einem ex-vivo-Experiment ein nahezu vollständiges Fehlen von apo-AI vermitteltem Cholesterin- und Phospholipid-Efflux auf (Marcil *et al.*, 1999). Betroffene Patienten zeigen daher bereits in jungen Jahren verstärkt arteriosklerotische Erscheinungen (Soumian *et al.*, 2005).

In einer Untersuchung von Hautbiopsien von Patienten mit familiär bedingt niedrigem HDL (familiäre Hypoalphalipoproteinämie) zeigten sich bezüglich des Cholesterin-Efflux ähnliche Ergebnisse (Mott *et al.*, 2000). Ferner zeigte eine Arbeitsgruppe bei Patienten mit niedrigen HDL-Plasmaspiegeln einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen apo-AI vermitteltem Cholesterin-Efflux aus Fibroblasten, Mutationen im ABCA1-Gen und der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis (van Dam *et al.*, 2002). Die Entdeckung von ABCA1 als defektes Molekül bei der Tangier-Erkrankung und die Untersuchung des ABCA1 vermittelten Efflux haben wichtige Erklärungen zum Verständnis des Transporterproteins geliefert. Genetische Untersuchungen haben jedoch belegt, dass eine Mutation des ABCA1-Gens nur in maximal 10 Prozent der Patienten mit extrem niedrigen HDL-Werten vorliegt und die Bedeutung für die Mehrzahl der Patienten mit Arteriosklerose und / oder niedrigem HDL somit eine eher untergeordnete Rolle spielt (Cohen *et al.*, 2004).

Der Frage, ob der Cholesterin-Efflux aus Fibroblasten auf apo-AI und HDL mit der Gesamtkonzentration des HDL im Zusammenhang steht, ist eine weitere Arbeitsgruppe nachgegangen. Hierbei fand sich keine Korrelation zwischen dem Cholesterin-Efflux auf apo-AI und der HDL-Plasmakonzentration. Der Efflux auf HDL wies jedoch eine signifikante Korrelation mit der HDL-Plasmakonzentration auf (Hovingh *et al.*, 2003). Der Cholesterin-Efflux auf HDL könnte daher, bezogen auf die HDL-Plasmaspiegel, eine quantitativ wichtigere Funktion erfüllen als der ABCA1 abhängige Cholesterin-Efflux auf apo-AI.

Die bereits erwähnten ATP-abhängigen Transporter ABCG1 und ABCG4 ermöglichen den Cholesterin-Efflux aus Makrophagen auf HDL als Akzeptor (Wang *et al.*, 2004). Von Interesse ist ein Knockout-Maus-Modell für ABCG1 (Kennedy *et al.*, 2005). Die Mäuse zeigten eine massive Akkumulation von

Schaumzellen bei jedoch normalen HDL-Plasmawerten. Entnommene Peritoneal-Makrophagen zeigten keinen messbaren Cholesterin-Efflux auf HDL. Dies deutet darauf hin, dass es auch bei normalen HDL-Plasmaspiegeln zu arteriosklerotischen Veränderungen infolge des gestörten Cholesterin-Efflux kommen könnte.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Eine Untersuchung des Zusammenhanges von Cholesterin-Efflux und der Lipoprotein-Subklassen sowie des Arterioskleroserisikos bei normolipidämischen Patienten ist bisher nicht erfolgt. Möglicherweise ergibt sich aus dem genauen Aufschluss der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie ein deutlicheres Verständnis über die komplexen Mechanismen des Reversen-Cholesterin-Transportes. Aufgrund der Kohärenz zwischen Cholesterin-Efflux aus Makrophagen und der Bildung von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen scheint es sinnvoll, die Schwere der arteriosklerotischen Veränderungen zu berücksichtigen, um den klinischen Bezug zu den Untersuchungen herzustellen. Eine Beurteilung anhand der Herzkatheteruntersuchung lässt eine Eingliederung der Arteriosklerose zu.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Fragestellung, ob der Makrophagen-Cholesterin-Efflux, wie in der Reversen-Cholesterin-Transport Hypothese behauptet, eine Relevanz für das KHK Risiko bei normolipidämischen Patienten darstellt.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Im Zeitraum von Oktober 2005 bis Juni 2007 sind insgesamt 142 Patienten stichprobenartig ausgewählt worden, an der Untersuchung zum Cholesterin-Efflux aus Makrophagen teilzunehmen. Davon waren 107 Männer und 35 Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 66 Jahre. Hierbei handelte es sich um Patienten, die elektiv zu einer koronarangiographischen Untersuchung in das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, kamen. Soweit bekannt, war keiner der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit einem anderen Studienteilnehmer verwandt.

Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom, entzündlichen Prozessen oder bekannten Neoplasien wurden ausgeschlossen.

Alle teilnehmenden Patienten gaben nach einer ausführlichen Aufklärung ihr Einverständnis, an der Studie teilzunehmen.

Das Studienprotokoll ist im Rahmen des Lübecker Registers von Patienten mit struktureller Herzerkrankung von der Lübecker Ethikkommission geprüft und bewilligt worden.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Humanes HDL ₂	Biodesign International
Humanes apo-AI	Biodesign International
Sodium Pyruvat	Invitrogen
2-Mercaptoethanol	Sigma
Penicillin-Streptolysin	Invitrogen
TO- 901317	Sigma
Tritium-Cholesterin	Amersham

Nyco Prep	Progen
<i>rosewell park memorial institute medium</i> (RPMI)	
mit Glutamax	Invitrogen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (Hepes)	
	Omni Life Science
Human Serum AB	Cambrex
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	Invitrogen
<i>bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma
<i>foetal bovine serum</i> (FBS)	Invitrogen

2.2.2 Geräte

Vakuumpumpe „EcoVac“	Schütt
Brutschrank	Binder
Zentrifuge „Varifuge“	Heraeus
Arbeitsbench	Biowizard
Elektronische Pipettierhilfe	Hamilton
Multiwellschalen	Primaria
50ml Falcon Röhrchen	Sarstedt
Pipetten	Sarstedt

2.3 Methoden

2.3.1 Blutgewinnung

Den nüchternen Patienten wurden unmittelbar vor der Katheterisierung 15 ml Blut aus der punktierten Arteria femoralis über die liegende Schleuse durch den jeweiligen Untersucher abgenommen.

2.3.2 Ansetzen des 10%-igen Nährmediums

Zunächst wurde das Serum (Human Serum AB), welches tiefgekühlt gelagert wird, aufgetaut. Anschließend wurde eine Komplementinaktivierung zur Verringerung unspezifischer Reaktionen bei 60°C für 30 min durchgeführt. Die Zusammensetzung des Nährmediums sieht beispielhaft wie folgt aus:

1. 225 ml RPMI
2. 25 ml Serum
3. 2,5 ml Penicillin / Streptolysin
4. 2,5 ml Pyruvat

Das Serum entstammte einem männlichen Spender mit der Blutgruppe AB Rhesus negativ. Die selbe Charge wurde während der gesamten Studie verwendet. Die Zugabe von Penicillin / Streptolysin dient der Abtötung pathogener Keime, die das Medium kontaminieren könnten. Pyruvat stellt eine Nährstoffquelle für die sich differenzierenden Zellen dar.

2.3.3 Zellisolation

Periphere mononukleare Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können mit Hilfe einer isopyknischen Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und abgestorbenen Zellen getrennt werden (Barr *et al.*, 1977). Zur Gewinnung von peripheren mononuklearen Zellen (PBMC) wurden jeweils 15 ml Blut in einem 50 ml Falcon-Röhrchen auf 20 ml des Separationsmedium (Nyco Prep) ohne Vermischung mit Hilfe einer Serumpipette geschichtet und für 30 Minuten bei 20 °C und 800g zentrifugiert. Nyco Prep ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Separationsschicht passieren. Granulozyten dringen in die Phase ein, während sich Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten in der Interphase ansammeln (siehe Abbildung 2.1). Nach der Zentrifugation wurde die Interphase vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgetragen, in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit 20ml *rosewell park memorial institute medium* (RPMI) 1640 zweimal gewaschen, um Reste des Separationsmediums und anderer Zellen zu entfernen. Hierzu wurde jeweils für 5 Minuten bei 20 °C bei 800g zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde anschließend mit 6 ml Nährmedium (s.o.) zweimal resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, so dass schließlich 500.000 Zellen pro well auf eine 12-well-Platte gleichmäßig pipettiert wurden. Nach einer Stunde wurden die nicht adhärennten Zellen durch vorsichtiges Spülen mit entfernt. Die PBMC zeichnen sich durch ihre Fähigkeit, am Nährboden zu haften, aus. Ihr Medium wurde 24 Stunden und 4 Tage nach der Zellisolation gewechselt.

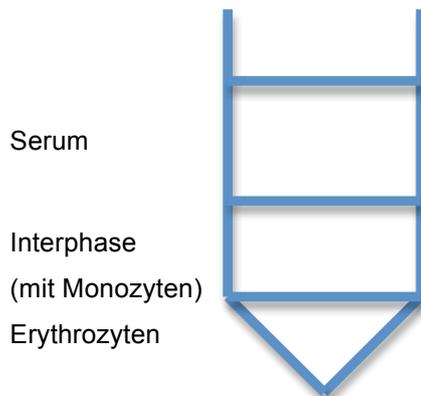


Abbildung 2.1: Ergebnis der isopygnischen Zentrifugation

2.3.4 Zelldifferenzierung

Die Zellen unterliefen im Verlaufe der siebentägigen Kultivierung für Makrophagen typische morphologische Veränderungen wie die Ausbildung von Pseudopodien und die Vermehrung des Zytoplasmas. Anhand dieser Kriterien zeigte sich die Entwicklung der Makrophagen aus den Monozyten. Diese Differenzierung verlief ohne die Zugabe von Zytokinen, die die Differenzierung katalysieren können.

2.3.5 Isotopische Messung des Cholesterin-Efflux (Tag 7)

Bei der verwendeten ^3H -Cholesterin-Stocklösung handelt es sich um einen verdünnten Ansatz aus dem Nährmedium RPMI und ^3H -markiertem FBS-Cholesterin. Insgesamt wurden aus praktikablen Gründen Lösungen mit 10ml hergestellt.

Zu 10ml RPMI, die durch ein Wasserbad auf einer konstanten Temperatur von 35 C° gehalten wurden, wurden innerhalb von zwei Minuten 100 μl des ^3H -markierten FBS-Cholesterins unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers hinzugegeben. Das langsame Pipettieren sowie die Durchmischung während des Vorganges sind nötig um ein Kristallisieren des Cholesterins in dem hydrophilen Milieu zu verhindern.

Für die Cholesterin-Efflux Messung wurde die Stocklösung auf eine 1:10 Lösung verdünnt, d.h. 45ml RPMI wurden mit 5ml der Stocklösung vermischt.

2.3.6 Cholesterin-Efflux Messung

Nach sieben Tagen der Zellkultivierung wurden die Makrophagen mit der ^3H -markiertem FBS-Cholesterin-Lösung und dem LXR-Agonisten T0901317, der als Ligand für den Kernrezeptor die Aktivierung von ABCA1, ABCG1 und ABCG 4 vermittelt, für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit dem Puffer *phosphate buffered saline* (PBS) gewaschen und mit RPMI, welches 0,2% *bovine serum albumin* (BSA) als Zusatz enthält, für 30 Minuten versehen. Im nächsten Schritt wurden als Akzeptoren für den Cholesterin-Efflux zu jeweils vier wells apoA-1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), HDL 2 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder als Kontrolle BSA (0,2%) zugegeben. Der zelluläre Efflux des Cholesterins auf die Akzeptoren wurde nach 24 Stunden gestoppt, indem das jeweilige Medium (500 μl) den Ansätzen entnommen wurde und die in das Medium freigesetzte Radioaktivität bestimmt wurde. Die Zellen aus den Ansätzen wurden mit 500 μl 0,1 N Natriumhydroxid lysiert und die Zellen assoziierte Radioaktivität im β -Zähler gemessen .

400 μl jeder zu messender Probe wurden mit 3ml Szintillationslösung versehen und der Tritiumgehalt der Lösung gemessen. Dabei regt die beim Zerfall des Tritiumions entstehende β -Strahlung die fluorogene Substanz der Szintillationslösung an. Die Anzahl der Fluoreszenzimpulse wurde dann als *beats per minute* (bpm) in einem Szintillationszähler bestimmt.

Der zelluläre Efflux wurde festgelegt als der prozentuale Anteil der Gesamtradioaktivität der Zellen, welcher in das Medium abgegeben wurde.

2.3.7 Bestimmung der Plasmalipide

Blutproben aller Patienten wurden während der Herzkatheteruntersuchung entnommen und im Zentrallabor des Universitätskrankenhauses Schleswig-Holstein Campus Lübeck auf Plasmalipide (LDL, HDL und Triglyceride) hin untersucht. Hierbei kamen standardisierte fluoremtrische Methoden zum Einsatz.

2.3.8 Bestimmung der Lipoprotein-Subklassen

Die Aufschlüsselung der Lipoproteine in ihre Subklassen liefert einen wichtigen prognostischen Faktor für die Entstehung und Progression arteriosklerotischer

Veränderungen (Otvos *et al.*, 2006; Freedman *et al.*, 1998). Die Firma Lipofit GmbH aus Regensburg führte die Analyse der Lipoprotein Subklassen mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie für diese Studie durch. Hierzu wurden Plasmaproben aller teilnehmenden Patienten tiefgekühlt nach Regensburg versandt und dort untersucht.

Die NMR-Spektroskopie ermittelt anhand der magnetischen Resonanzen der terminalen Methylgruppen der Lipide (hauptsächlich Cholesterinester und Triglyzeride) die Größe und Anzahl der verschiedenen Lipoproteinpartikel. Auf diese Weise können bis zu 16 Subklassen unterschieden werden. Eine sogenannte Dekonvolutionsanalyse des ermittelten NMR-Spektrums führt mit Hilfe eines Computersystems zur Bestimmung von Anzahl und Größe der einzelnen Lipoproteinsubklassen. Eine erste Anwendung der NMR-Spektroskopie für die Lipoprotein-Analyse findet sich bei Otvos *et al.* 1991 (Otvos *et al.*, 1991).

2.3.9 Herzkatheteruntersuchung

Die Herzkatheteruntersuchungen fanden im Zentralklinikum des Universitätskrankenhauses Schleswig-Holstein Campus Lübeck statt. Verwendet wurden Röntgengeräte der Firma Siemens sowie das jodhaltige Kontrastmittel Imeron. Sämtliche Untersuchungsfilm wurden von zwei invasiv tätigen Kardiologen, welche die biochemischen Untersuchungsergebnisse nicht kannten, im Hinblick auf eine stenosierende KHK hin validiert.

Koronarien mit Stenosen der großen epikardialen Gefäße (LAD, LCX, RCA), die mehr als 50 % des Gefäßlumens einnahmen, galten als stenosierend. Als Kontrolle wurden Koronarbefunde definiert, die lediglich Wandunregelmäßigkeiten, einzelne nicht stenosierende Plaques oder unauffällige Kranzgefäße zeigten.

2.3.10 Statistische Auswertung

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms SPSS in der aktuellen Version vorgenommen. Hierbei wurde zur Ermittlung einer Korrelation zwischen dem Cholesterin-Efflux der Pearson-Korrelation-Koeffizient angewandt. Der Zusammenhang zwischen dem Cholesterin-Efflux und der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung wird durch den Spearman-Korrelation-Koeffizienten beschrieben. Eine multivariate Regressionsanalyse, die für die

kardialen Risikofaktoren Alter und männliches Geschlecht adjustiert wurde, zeigt die Beziehung zwischen Cholesterin-Efflux und obstruktiver KHK.

3. Ergebnisse

3.1 Patientengut

142 Patienten (107 Männer und 35 Frauen) wurden in die Studie eingeschlossen. Hiervon zeigten 90 Patienten (63,4%) im koronarangiographischen Untersuchungsbefund eine stenosierende koronare Herzkrankheit (KHK), bei der mehr als 50 % des Gefäßlumens in einem Segment oder in mehreren Segmenten eingengt war. Die verbleibenden 52 Patienten (36,6%) zeigten entweder Wandunregelmäßigkeiten, einzelne Plaques oder unauffällige Kranzgefäße. Die genauen Charakteristika der Patientenpopulation sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die durchschnittlichen Plasmawerte des HDL-Cholesterins, LDL-Cholesterins und des Gesamtcholesterins waren innerhalb der normalen Grenzen. Weder die Plasmalipide noch die Lipoprotein-Partikel-Konzentration wiesen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der von einer stenosierenden KHK betroffenen Patienten und der nicht betroffenen Patienten auf. Ein hohes Alter war jedoch ebenso ein statistisch signifikanter Risikofaktor für das Vorliegen einer stenosierenden KHK ($p=0,001$) wie das männliche Geschlecht ($p= 0,003$) (siehe Tabelle1).

Charakteristika, Risikofaktoren	Gesamt		Stenosierende KHK		Ø sten. KHK		p-Wert
	mean	StD	mean	StD	mean	StD	
n	142		90		52		
Alter	66	11	68	9	62	11	0,001
Männlich (%)	75		83		62		0,003
BMI	28,5	5	28,8	4,9	27,9	5	ns
Hypertonie (%)	24		24		14		ns
Diabetes (%)	8		21		9		ns
Rauchen (%)	6		24		8		ns
Gesamtcholesterin	5	1,3	4,9	1,2	5,4	1,4	ns
LDL (mmol/l)	2,9	0,9	2,9	0,9	3,1	0,9	ns
HDL (mmol/l)	1,4	0,4	1,4	0,3	1,4	0,4	ns
Triglyzeride (mmol/l)	1,7	0,9	1,9	0,9	1,9	1	ns

Tabelle 1a: Charakteristika der Patientenpopulation (Jansen et al., 2009).

mean= Mittelwert, StD= Standardabweichung, ns= nicht signifikant

Partikelkonzentration (nmol/l)	Gesamt		Stenosierende KHK		Ø sten. KHK		p-Wert
	mean	95%KI	mean	95%KI	mean	95%KI	
Chylo. [B] (>150nm)	0,86	0,1	0,93	0,12	0,74	0,1	ns
Chylo. [A] (100-150nm)	0,05	110,0	0,04	0,02	0,06	0,0	ns
Chylo. Rem. (80-100nm)	1,82	0,4	2,04	0,44	1,42	0,3	ns
VLDL [B] (60-80nm)	11,72	1,8	13,21	1,95	9,09	51,4	ns
VLDL [A] (40-60nm)	0,93	0,6	1,27	0,76	0,33	0,2	ns
IDL (30-40nm)	49,14	18,8	56,44	21,1	36,18	13,9	ns
LDL [E] (25-30nm)	101,45	10,6	103,27	11	98,2	9,8	ns
LDL [D] (22-25nm)	96,2	15,2	102,64	16,9	84,75	11,2	ns
LDL [C] (22-25nm)	157,49	21,6	161,72	23,2	149,98	18,8	ns
LDL [B] (19-21nm)	76,8	15,6	72,18	14	85	18,2	ns
LDL [A] (16-19nm)	50,3	12,2	46,17	12,53	57,64	11,7	ns
HDL [D] (13-16nm)	378,68	66,3	355,12	63,8	420,51	70,9	ns
HDL [C] (10-13nm)	964,55	149,8	974,3	155,5	947,24	140,6	ns
HDL [B] (8,5-10nm)	1262,69	202,2	1352,65	218,3	1102,97	170,8	ns
HDL [A] (7nm-8,5nm)	470,5	113,3	455,66	113,4	496,85	114,3	ns

Tabelle 1b: Ergebnisse der NMR Spektroskopie (Jansen et al., 2009)

3.2 Korrelation des Makrophagen-Cholesterin-Efflux mit dem Plasma HDL und der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung

Die Ergebnisse des Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf apoA-I und HDL 2 wurden mit den Plasmaspiegeln des HDL und der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung verglichen. Hierbei ergab sich kein Zusammenhang zwischen den Efflux Ergebnissen für apoA-I (*Pearson correlation coefficient* $r=0,08$; $p=0,37$) sowie HDL 2 ($r=-0,01$; $p=0,87$) und den HDL Plasmawerten für das Gesamt-HDL der untersuchten Patienten (siehe Abbildung 3. 1). Des weiteren fand sich keine Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und den Plasmaspiegeln für das Gesamtcholesterin, Gesamt-LDL Cholesterin und den Triglyceriden.

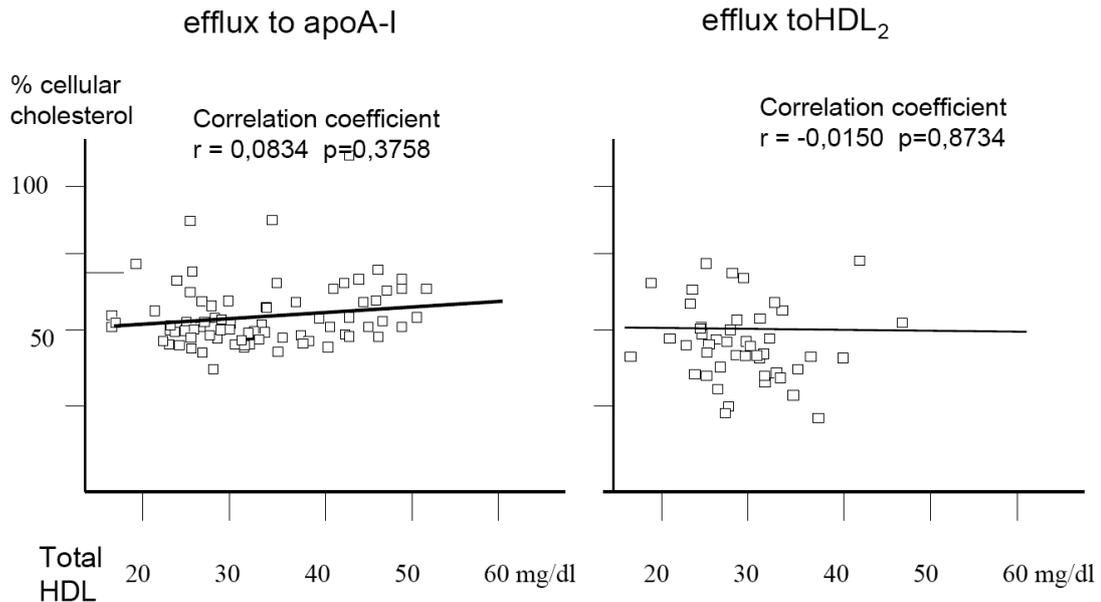


Abbildung 3.1: Korrelation zwischen Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf apoA-I (linkes Diagramm) und HDL₂ (rechtes Diagramm) und HDL Plasmaspiegeln aus Blutproben, die zum Zeitpunkt der Koronarangiographie gewonnen wurden. Der Cholesterin-Efflux wird in Prozent der Gesamtradioaktivität der Zellen ausgedrückt durch Messung der Radioaktivität des Mediums nach 24 Stunden (Jansen et al., 2009).

Während mit der Gesamt-HDL-Fraktion und LDL-Fraktion keine signifikante Korrelation bestand, ergab sich jedoch eine signifikante Korrelation zwischen dem quantitativen Makrophagen-Cholesterin-Efflux und der Partikelkonzentration mehrerer Lipoprotein-Subklassen. Generell lässt sich festhalten, dass der Cholesterin-Efflux invers mit der Größe der Lipoprotein-Partikel korrelierte. So war die Korrelation positiv für die kleineren und cholesterinreicheren Lipoprotein-Subklassen (HDL[A] bis HDL[D] und LDL [A] bis LDL [E]). Die im Vergleich größeren und triglyceridreicheren Partikel (Chylomikronen, VLDL und IDL) wiesen dagegen eine negative Korrelation auf (siehe Abbildung 3.2).

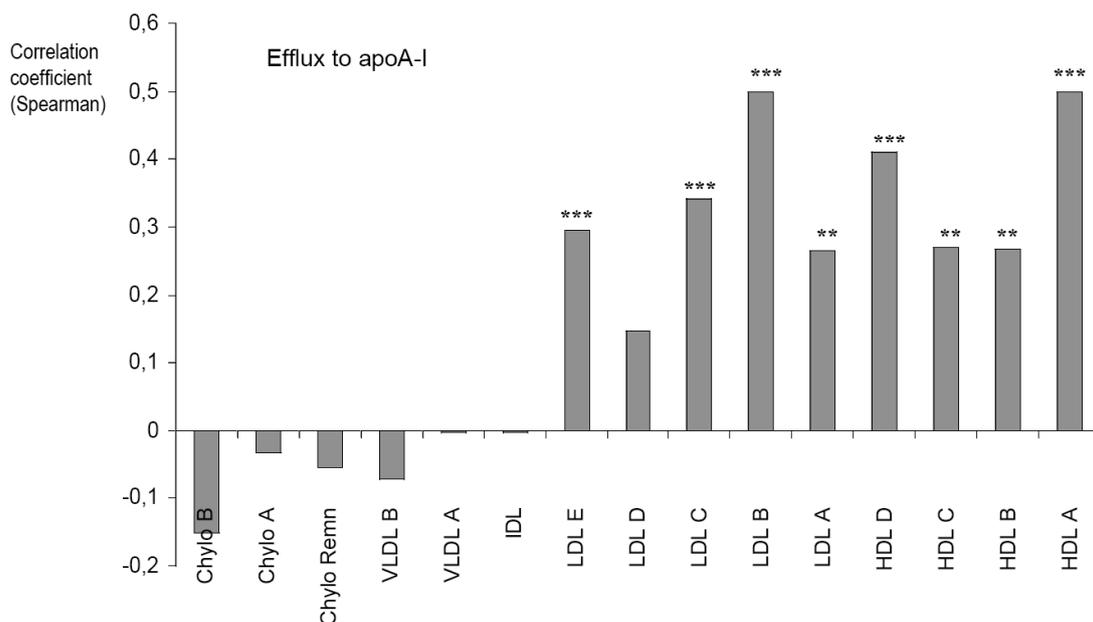
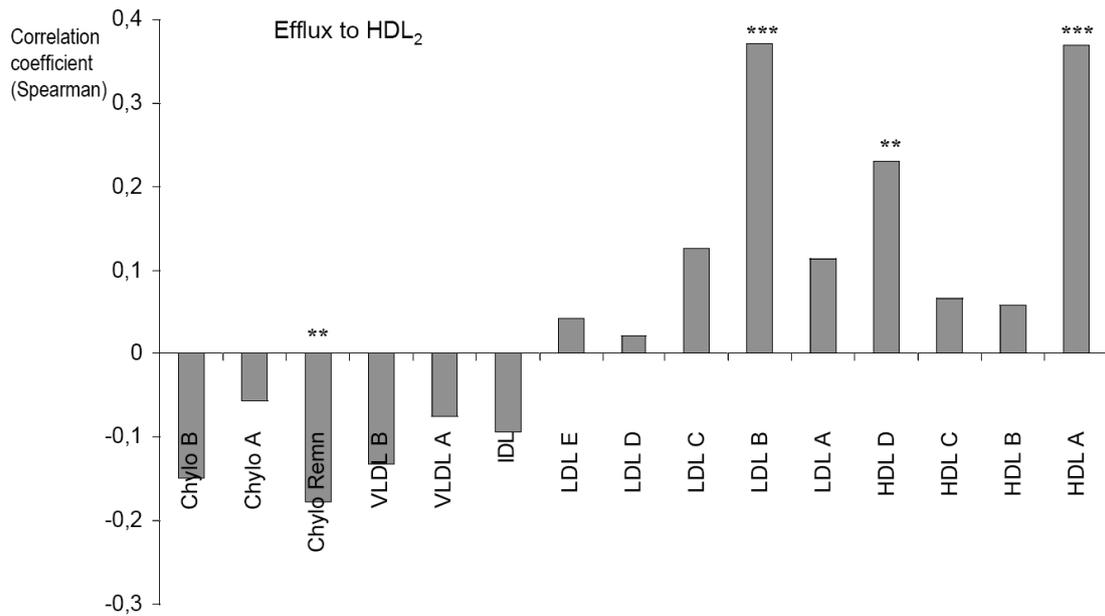


Abbildung 3.2: Korrelation zwischen dem quantitativen Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf HDL₂ (oben) und apoA-I (unten) und der Partikelkonzentration mehrerer Lipoprotein-Subklassen gemessen mittels NMR-Spektroskopie. Die Korrelation wird mit Hilfe des Spearman-Korrelation-Koeffizienten auf der y-Achse angegeben.

Der zelluläre-Cholesterin-Efflux wird in Prozent der Gesamtradioaktivität der Zellen ausgedrückt durch Messung der Radioaktivität des Mediums nach 24 Stunden (Jansen et al., 2009).

** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Die statistisch größte Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf apoA-I und HDL 2 ergab sich für die kleinste Gruppe der HDL Partikel (HDL[A]: $r=0,50$; $p=0,0001$ für den Efflux auf apoA-I und $r=0,37$; $p=0,0001$ für den Efflux auf HDL 2). Diese Korrelation ist in der Abbildung 3.3 dargestellt.

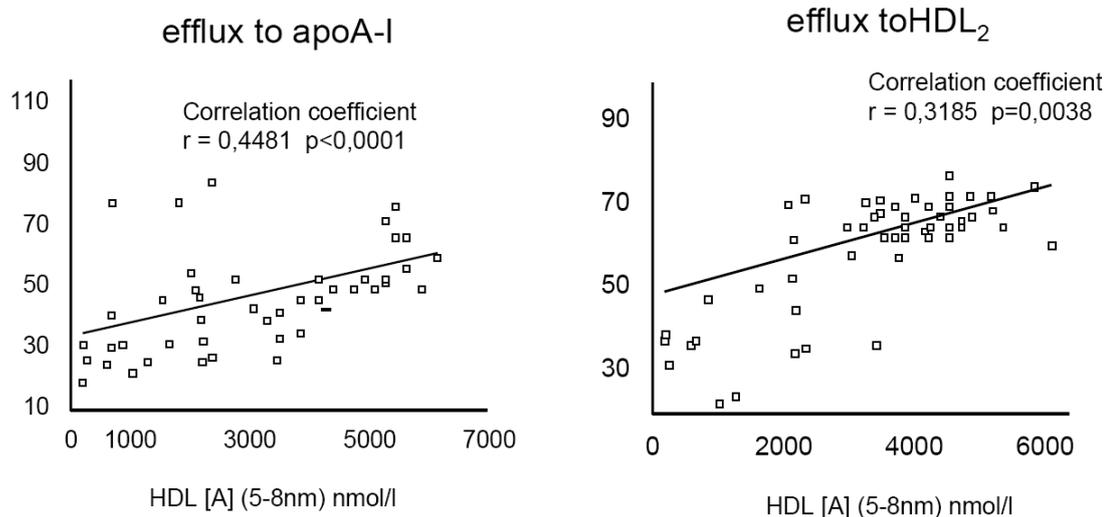


Abbildung 3.3: Korrelation zwischen dem quantitativen Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf apoA-I (linkes Diagramm) und HDL₂ (rechtes Diagramm) und dem Vorkommen kleinster HDL Partikel (7-8,5 nm per NMR-Spektroskopie) (Jansen et al., 2009).

3.3 Beziehung zwischen dem Cholesterin-Efflux und einer obstruktiven KHK

Die Entstehung arteriosklerotischer Plaques wird häufig mit einem defekten Efflux Mechanismus in Verbindung gebracht (Kennedy et al., 2005). Die Analysen im vorhandenen Patientengut sollten diesen Zusammenhang näher beleuchten, weshalb hier der Zusammenhang zwischen der Quantität des Makrophagen-Cholesterin-Efflux und den Patienten ohne signifikante Koronarstenosen und solchen Patienten, die unter einer obstruktiven KHK litten, verglichen wurde. Der zelluläre Efflux wurde festgelegt als der prozentuale Anteil der Gesamtradioaktivität der Zellen, welcher in das Medium abgegeben wurde.

Für den Cholesterin-Efflux auf HDL₂ ergab sich so bei der von einer stenosierenden KHK betroffenen Patientengruppe (n=90) im Mittelwert ein Wert von 46,1 % (95% KI: 5,0%, StdDev: 18,5) des zellulären Cholesterins, welches in das Medium freigesetzt wurde. Im Vergleich dazu fand sich bei der Gruppe mit unauffälligen Koronarien (n=52) ein prozentualer Efflux von 50,9% (95% KI: 2,8%, StdDev: 13,7%) .

Für den Cholesterin-Efflux auf apoA-I als Akzeptor zeigte sich im Mittel ein zellulärer Efflux von 29,8% in der Gruppe der von einer stenosierenden KHK betroffenen Patienten (95% KI: 4,2 %, StdDev: 15,6) im Vergleich zu 31,3% (95% KI: 3,0 %, StdDev: 14,35) in der Patientengruppe mit blanden Koronarien (siehe Abbildung 3.4).

Männliches Geschlecht und Alter gelten als Ergebnis vieler großer Kohortenstudien als bekannte Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Marma AK *et al*, 2009). Dieser Zusammenhang findet sich ebenso in unserem Patientenstamm (siehe auch unter 3.1 Patientengut). Eine Regressionsanalyse zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen stenosierender KHK und Makrophagen-Cholesterin-Efflux wurde daher für diese beiden Risikofaktoren adjustiert. Nach Adjustierung fand sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen HDL₂ vermitteltem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und einer stenosierenden KHK (p=0,02, siehe Abbildung 3.4).

Eine ähnliche inverse Korrelation zwischen apoA1 vermitteltem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und einer stenosierenden KHK zeigte den selben Trend wie für HDL₂, jedoch keine statistische Signifikanz.

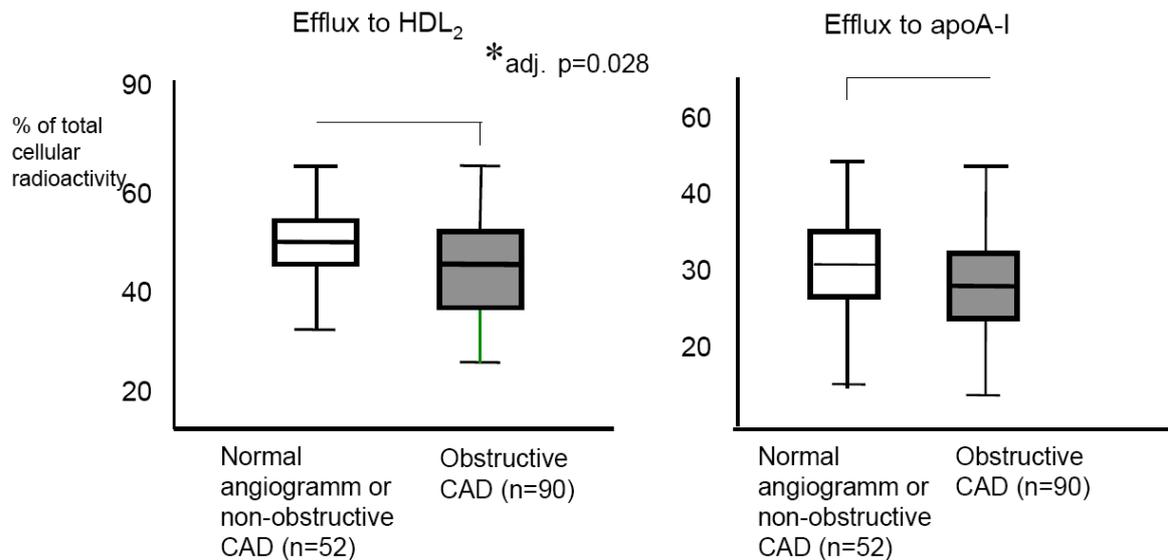


Abbildung 3.4: Vergleich des Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf HDL₂ und apoA-I mit dem Koronarstatus der Patienten. Eine obstruktive KHK wurde definiert als eine Lumeneinengung um >50% in einer oder mehrerer Koronararterien.

Angezeigt werden der durchschnittliche Efflux, 95% Konfidenzintervall (Boxen) und die Standardabweichung (Fehlerbalken).

* = $p=0,025$ für den Cholesterin-Efflux auf HDL₂ bei Patienten mit einer stenosierenden KHK versus der Kontrolle in einer univariaten Regressionsanalyse, die für die Risikofaktoren Alter und Geschlecht adjustiert wurde (Jansen et al., 2009).

4. Diskussion

4.1 Studiendesign und Zellkultivierung

Nach der Hypothese des Reversen-Cholesterin-Transportes stellt der Makrophagen-Cholesterin-Efflux das initiale Ereignis bei der Bildung von HDL dar und kann möglicherweise die anti-atherogenen Eigenschaften dieses Lipoproteines erklären. Die bisher publizierten Studien zum zellulären Efflux beim Menschen umfassten bisher jedoch größtenteils eine geringe Anzahl von Probanden, die unter familiär geringen HDL Spiegel n litten (Marcil *et al.*, 1999, Soumian *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu diesen Studien untersucht diese Arbeit ein Patientenkollektiv mit normalen Cholesterinspiegeln (HDL und LDL). Innerhalb dieser Gruppe wurde die Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und der Plasmalipide sowie der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung und dem angiographischen Befund untersucht. Voraussetzung für diese Untersuchung war die Annahme, dass menschliche Zellen auch nach der *ex-vivo* Isolation ihre Funktion behalten. Die Funktion ist demnach bereits genetisch determiniert und durch die Kultivierung nicht beeinflussbar. Diese Annahme erlaubt das vorliegende Studiendesign und die Möglichkeit, den Cholesterin-Efflux nach siebentägiger Isolation der Makrophagen zu messen und mit den Lipidwerten bzw. den koronarangiographischen Befunden zu vergleichen.

4.2 Zusammenhang zwischen Makrophagen-Cholesterin-Efflux und HDL-Plasmawerten

Im Gegensatz zu vorherigen Studien, die ausschliesslich Patienten mit familiär niedrigen HDL Spiegel n untersuchten (Soro-Paavonen *et al.*, 2007, Kiss *et al.*, 2007), fand sich in der hier vorgestellten Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und den Plasma-HDL-Konzentrationen. Eine mögliche Erklärung für diesen fehlenden Zusammenhang könnte sein, dass der Cholesterin-Efflux aus Makrophagen nur einen geringen Anteil an der Generierung von HDL Partikeln in einem normolipidämischen Patientengut im Vergleich zu einer Patiengruppe mit niedrigen HDL Werten besitzt. Tierexperimente haben

ebenso gezeigt, dass der Einfluss des Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf den Gesamt HDL Spiegel nur sehr gering ist (Aiello *et al.*, 2002, Haghpassand *et al.*, 2001, Downes *et al.*, 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen somit die These, dass Organe wie die Leber oder quergestreifte Muskulatur eine quantitativ wichtigere Rolle zur Determinierung der quantitativen HDL Werte spielen als der Makrophagen-Cholesterin-Efflux.

Der Makrophagen-Efflux kann jedoch die Bildung von Schaumzellen verhindern und könnte daher besonders wichtig sein.

4.3 Lipoprotein-Subklassen-Analyse mittels NMR Spektroskopie

Um die genauen Auswirkungen des Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf den reversen Cholesterin-Transport zu eruieren, erscheint es sinnvoll, neben den Plasma HDL Werten eine genauere Analyse der Lipoprotein-Subklassen mittels NMR Spektroskopie vorzunehmen. Diese Untersuchung erfolgte bei allen teilnehmenden Patienten. In großen klinischen Studien zeigte sich, dass die NMR Spektroskopie der Plasmalipide eine zuverlässige Methode zur Detektierung der Lipoprotein-Subklassen darstellt (Freedman DS, 1998). In der zitierten Studie wurden von 158 Plasmaproben die Lipoprotein-Subklassen mittels NMR Spektroskopie und mittels Lipoproteinelektrophorese ermittelt, wobei sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse fand.

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine inverse Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und der Partikelgröße einzelner Lipoprotein-Subklassen aus der NMR Spektroskopie. Während die Konzentration der größeren triglyceridreichen Lipoproteine wie Chylomicron *remnants* oder VLDL negativ mit dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux korrelierte, fand sich eine starke positive Korrelation mit den kleineren, cholesterinreicheren Lipoproteinen der HDL- und LDL-Fraktionen. Die Ergebnisse gelten insbesondere für die kleinen HDL-Partikel, bei denen die Korrelation besonders stark ausfiel. Diese HDL-Partikel, gemessen mit der NMR Spektroskopie, entsprechen den prä- β -HDL-Partikeln, wie sie aus der Lipoproteinelektrophorese bekannt sind. Es wird angenommen, dass diese prä- β -HDL-Partikel die präferentiellen Akzeptoren für den reversen

Cholesterin-Transport sind und dabei den Transportern ABCA1 und ABCG1 eine entscheidende Rolle zukommt (Favari E *et al.*, 2009).

Der gefundene inverse Zusammenhang zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und den größeren triglyceridreichen Lipoproteinen passt ebenfalls in den Kontext physiologischer Modelle. Plasma HDL Spiegel, die Veränderungen des HDL durch den reversen Cholesterin-Transport und die lipolytischen Aktivitäten der Lipoprotein Lipase korrelieren negativ mit der Konzentration der triglyceridreichen Lipoproteine (Patsch J, 1998).

Eine Messung der Lipoprotein-Subklassen könnte somit das dynamische System des reversen Cholesterin-Transportes besser reflektieren als statisch gemessenes Gesamt-HDL und –LDL.

Der klinische Nutzen einer Lipoprotein-Subklassen-Analyse mittels NMR zur Risikostratifizierung in der Klinik ist bisher noch nicht erwiesen. Neuere Untersuchungen, die den klinischen Nutzen der NMR Spektroskopie der Lipoproteine beleuchten, sehen die NMR Spektroskopie im Hinblick auf die Risikoevaluation kardiovaskulärer Ereignisse als vergleichbar, jedoch nicht überlegen gegenüber der konventionellen Lipoproteinelektrophorese an. So entspringt diese Kenntnis einer prospektiven Studie, in der 27 673 Patientinnen über 11 Jahre hin auf das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse verfolgt wurden, wobei die Lipoproteine der Studienteilnehmerinnen zu Beginn mittels NMR Spektroskopie bestimmt wurden (Mora S *et al.*, 2009).

4.4 Zusammenhang zwischen Makrophagen-Cholesterin-Efflux und einer KHK

Makrophagen-Cholesterin-Efflux wird nach der reversen Cholesterin-Transport Hypothese eine protektive Wirkung im Hinblick auf die Entstehung bzw. Rückbildung arteriosklerotischer Plaques zugeschrieben (Kennedy *et al.*, 2005). Der klinische Zusammenhang zwischen einer angiographisch nachweisbaren KHK und dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux ist jedoch bislang noch nicht untersucht worden. Daher ist in dieser Arbeit eruiert worden, ob ein quantitativer Unterschied im Makrophagen-Cholesterin-Efflux zwischen der Gruppe der von einer KHK betroffenen Patienten und der Gruppe der Patienten, bei denen sich

angiographisch Wandunregelmäßigkeiten, einzelne Plaques oder unauffällige Kranzgefäße zeigten, besteht. Nachdem für die beiden bekannten Risikofaktoren Alter und männliches Geschlecht adjustiert worden war, zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf HDL₂ und dem Vorhandensein einer obstruktiven KHK. Diese Ergebnisse deuten die klinische Relevanz des Reversen-Cholesterin-Transportes an und weisen gleichzeitig auf den Makrophagen-Cholesterin-Transport als unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung einer KHK hin.

4.5 Die Rolle der ATP-abhängigen Transporter ABCA1 und ABCG1

Die Präparation der Monozyten bzw. der sich differenzierenden Makrophagen geschah in der gleichen Art und Weise, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass die Zellen durch Umwelteinflüsse in ihrer Entwicklung gestört wurden. Ebenso scheint es wenig wahrscheinlich, dass pathologische Zustände (z.B. Entzündungen) oder die Beeinflussung durch Medikamente in vivo ihre Auswirkungen auf die Monozyten auch über die Zellisolation hinaus beibehalten. Die Funktion der für den Cholesterin-Efflux wichtigen Transporter ABCA1 und ABCG1 scheint vielmehr genetisch determiniert, wie beispielsweise die Pathogenese der Tangier Erkrankung belegt (Rust *et al.*, 1999). ABCA1 wird hauptsächlich die Funktion des Cholesterin- und Phospholipid Transportes auf apoA-I zugeschrieben, das als das initiiierende Substrat des reversen Cholesterin-Transportes angesehen werden kann und aus dem über das prä- β -HDL HDL₃ entsteht (Wang *et al.*, 2001). Der Cholesterin-Transport auf HDL₃ wird indes vornehmend über ABCG1 sowie weitere nicht Transporter bedingte Wege vermittelt, so dass HDL₂ generiert wird. Aus dieser Sichtweise heraus könnte die HDL₃ Konzentration, die auf dem Cholesterin-Transport mittels ABCA1 auf apoA-I beruht, mit der generellen Fähigkeit der Zellen, HDL zu produzieren, korrelieren. Ferner ist es denkbar, dass die Expressionen der Transporter ABCA1 und ABCG1 parallel reguliert werden, so dass die Cholesterinabgabe aus den Makrophagen suffizient gesteuert wird. In der vorliegenden Arbeit fand sich eine statistisch

signifikante inverse Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux auf HDL₂ und dem einer stenosierenden KHK, während der Efflux auf apoA-I keine statistisch signifikante inverse zu einer KHK aufwies. Der Efflux auf apoA-I zeigte die gleiche Tendenz, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Eine mögliche Ursache wäre eine mangelnde *power*, da der apoA-I Efflux quantitativ kleiner ist als der des HDL. Diese Ergebnisse deuten in der Zusammenschau mit den bekannten Transportfunktionen an, dass dem Transporter ABCG1 eine wichtigere Bedeutung bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques zukommt als dem Transporter ABCA1.

4.6 Limitationen der Studie

Die vorliegende Arbeit unterliegt einigen Limitationen, die in Betracht gezogen werden müssen, um die Ergebnisse zu deuten. So sind die Kultivierung von Makrophagen und die Cholesterin-Efflux-Messungen sehr kosten- und arbeitsintensiv, weshalb es schwierig erscheint, größere Fallzahlen zu generieren. In diese Studie wurden 142 Patienten eingeschlossen, was zum derzeitigen Wissensstand die größte derart angelegte Studie darstellt. Obwohl im Hinblick auf die Assoziation des Makrophagen-Cholesterin-Efflux mit der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung und die Assoziation des Makrophagen-Cholesterin-Efflux mit dem Vorkommen einer stenosierenden KHK signifikante Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen gefunden wurden, bedarf es Replikationen der Ergebnisse in unabhängigen Kollektiven, um die Rolle des Makrophagen-Cholesterin-Efflux als kardiovaskulären Risikofaktors zu evaluieren.

Ex-vivo-Studien reflektieren genetisch determinierte Mechanismen, sind jedoch gleichzeitig anfällig für vielfältige Störfaktoren, beispielsweise die Behandlung der Zellen oder das artifizielle Milieu. Ferner spielen die Serumfaktoren für den Efflux eine Rolle und werden hierbei nicht erfasst.

Eine genetische Determination des Efflux ist plausibel. Genetische Faktoren wie *single nucleotide polymorphism* oder die Genexpression wurden bisher nicht erfasst.

5. Zusammenfassung

Nach der Reversen-Cholesterin-Transport Hypothese verhindert der Makrophagen-Efflux die Bildung von arteriosklerotischen Schaumzellen und ermöglicht so die Ausscheidung von überschüssigem Cholesterin. Vorangegangene Studien mit Patienten, die an seltenen familiären Störungen mit niedrigem HDL litten, haben bereits den Verdacht erweckt, dass verminderter zellulärer Cholesterin-Efflux einen Risikofaktor für das Auftreten einer Arteriosklerose darstellt. Bisher ist jedoch der Zusammenhang zwischen Makrophagen-Cholesterin-Efflux, Lipidprofilen und einer KHK in einem normolipidämischen Patientenkollektiv wenig untersucht. Es ergibt sich daher die Fragestellung, ob der Cholesterin-Efflux aus humanen Makrophagen mit dem Risiko für eine koronare Herzkrankheit und der Lipoproteine im Blut korreliert. In der vorliegenden Arbeit wurde zu diesem Zwecke der Makrophagen-Cholesterin-Efflux von 142 normolipidämischen Patienten, die sich einer Koronarangiographie unterzogen, ex-vivo gemessen. Monozyten wurden aus Blutproben, welche zum Zeitpunkt der Koronarangiographie gewonnen wurden, isoliert und differenzierten sich in einer siebentägigen Kultivierung zu Makrophagen. Anschließend wurde der Efflux von ^3H -markiertem Cholesterin auf die hinzugefügten Akzeptoren apoA-I und HDL₂ gemessen. Der quantitative Cholesterin-Efflux wurde mit der Lipoprotein-Subklassen-Verteilung aus einer Magnetresonanz Spektroskopie der Patientenplasmen und der Ausdehnung einer koronaren Herzkrankheit korreliert. Der Makrophagen-Cholesterin-Efflux korrelierte positiv mit der Partikelkonzentration der kleineren HDL- und LDL Partikeln, jedoch nicht mit den Gesamtplasma-Konzentrationen des HDL- oder LDL Cholesterins. Festgestellt werden konnte ferner eine inverse Korrelation zwischen dem Makrophagen-Cholesterin-Efflux und der Konzentration der größeren und triglyceridreichen Partikeln (VLDL und Chylomikronen). Makrophagen von Patienten mit einer stenosierenden koronaren Herzkrankheit besaßen einen geringeren Cholesterin-Efflux als solche von Patienten ohne signifikante Stenosen im Koronarangiogramm. Obwohl die Efflux-Untersuchungen als ein ex-vivo-Assay in einem artifiziellem System stattfanden, sprechen die Ergebnisse dennoch für eine protektive Rolle des Makrophagen-Cholesterin-Efflux im Hinblick auf eine koronare Herzkrankheit.

6. Literaturverzeichnis

Aiello RJ, B. D. (2002). Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002 (22(4)), 630-637.

Altmann, S., Davis, H. J., Zhu, L., Yao, X., Hoos, L., Tetzloff, G., et al. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* (303), 1149-50.

Assmann, G., & Gotto, A. J. (2004). HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* (109), III8-14.

Assmann, G., & Schulte, H. (1992). Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am. J. Cardiol.* (70), 733-7.

Assmann, G., & Schulte, H. (1987). The Prospective Cardiovascular Münster Study: prevalence and prognostic significance of hyperlipidemia in men with systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* (59), 9G-17G.

Berliner, J., Navab, M., Fogelman, A., Frank, J., Demer, L., Edwards, P., et al. (1995). Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* (91), 2488-96.

Bodzioch, M., Orso, E., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., et al. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics* , 347-51.

Botham, K., Moore, E., De Pascale, C., & Bejta, F. (2007). The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants. *Biochem. Soc. Trans.* (35), 454-8.

Brown, M., & Goldstein, J. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (76(7)), 3330-7.

- Brundert, M., Ewert, A., Heeren, J., Behrendt, B., Ramakrishnan, R., Greten, H., et al. (2005). Scavenger receptor class B type I mediates the selective uptake of high-density lipoprotein-associated cholesteryl ester by the liver in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (25), 143-48.
- Chang, T., Chang, C., Lin, S., Yu, C., Li, B., & Miyazaki, A. (2001). Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr. Opin. Lipidol.* (12), 289-296.
- Cohen, J., Kiss, R., Pertsemlidis, A., Marcel, Y., McPherson, R., & Hobbs, H. (2004). Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* (305), 869-72.
- Connelly, M., & Williams, D. (2004). Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* (15), 287-95.
- Copper, A. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* (11), 2173-92.
- Cuchel, M., & Rader, D. (2006). Macrophage Reverse Cholesterol Transport: Key to the Regression of Atherosclerosis? *Circulation* (113), 2548-55.
- de Villiers, W., & EJ, S. (1999). Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.* , 740-6.
- Downes M, V. M.-W. (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol. Cell.* (11(4)), 1079-1092.
- Favari E, C. L. (2009). Small discoidal pre-beta-HDL are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry* (48(46)), 11067-74.
- Freedman DS, O. J. (1998). Relation of Lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* (18(7)), 1046-53.

Frick, M., Elo, O., Haapa, K., Heinonen, O., Heinsalmi, P., Helo, P., et al. (1987). Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* (317), 1237-45.

Gavigan, S., & Knight, B. (1983). The effects of low-density lipoprotein and cholesterol on acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity in membranes from cultured human fibroblasts. *Biochem. J.* (216(1)), 93-100.

Genest, J., McNamara, J., Salem, D., & Schaefer, E. (1991). Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* (67), 1185-9.

Gordon, T., Kannel, W., Castelli, W., & Dawber, T. (1981). Lipoproteins, cardiovascular disease, and death. The Framingham study. *Arch. Intern. Med.* (141), 1128-31.

Glomset, JA (1968). The plasma lecithins: cholesterol acethyltransferase reaction. *J. Lipid. Res.* 9(2), 155-167

Haghighi M, B. P. (2001). Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J. Clin. Invest* (108(9)), 1315-1320.

Hovingh, G., Van Wijland, M., Brownlie, A., Bisioendial, R., Hayden, M., Kastelein, J., et al. (2003). The role of the ABCA1 transporter and cholesterol efflux in familial hypoalphalipoproteinemia. *J. Lipid Res.* (44), 1251-5.

Jansen, H., Linsel-Nitschke, P., Aherrahou, Z., Belz, S., et al. (2009). Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Lipids Health Dis.*, Apr 6; 8:14.

Joseph, S., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M., Collins, A., Laffitte, B., et al. (2002). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (99), 7604-9.

Kennedy, M., Barrera, G., Nakamura, K., Baldan, A., Tarr, P., Fishbein, M., et al. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* (1), 121-31.

Kimura, T., Sato, K., Kuwabara, A., Tomura, H., Ishiwara, M., Kobayashi, I., et al. (2001). Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* (276(34)), 31780-5.

Kiss RS, K. N. (2007). Genetic etiology of isolated low HDL syndrome: incidence and heterogeneity of efflux defects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (27(5)), 1139-1145.

Lewis, G., & Rader, D. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* (96), 1221-1232.

Linsel-Nitschke und A. Tall (2005). HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Rev.* (3), 193-205.

Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S., Roomp, K., Zhang, L., Yu, L., et al. (1999). Mutations in the ABC1 gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet* (354), 1341-6.

Marsh, J. (1971). Biosynthesis of plasma lipoproteins. *Biochem. Soc. Symp.* (33), 89-98.

Mauldin, J., Srinivasan, S., & Mulya, A. (2006). Reduction in ABCG1 in Type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J Biol. Chem.* , 21216-24.

Merkel, M., Eckel, R., & Goldberg, I. (2002). Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J. Lipid Res.* (12), 1997-2006.

Meyers, C., & Kashyap, M. (2004). Pharmacologic elevation of high-density lipoproteins: recent insights on mechanism of action and atherosclerosis protection. *Curr. Opin. Cardiol.* (19), 366-373.

Mora S, O. J. (2009). Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation* (119(7)), 931-939.

Mott, S., Yu, L., Marcil, M., Boucher, B., Rondeau, C., & Genest, J. J. (2000). Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: role of the ABCA1 gene mutations. *Atherosclerosis* (152), 457-68.

Naseem, S., Khan, M., Jakobson, M., Nair, P., & Heald, F. (1980). The influence of dietary cholesterol and fat on the homeostasis of cholesterol metabolism in early life in the rat. *Pediatr. Res.* (14(9)), 1061-6.

Nissen, S., Tsunoda, T., Tuzcu, E., Schoenhagen, P., Cooper, C., Yasin, M., et al. (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* (290), 2292-300.

Nofer, J., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, A., et al. (2001). Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J. Biol. Chem.* (276(37)), 34480-5.

Nofer, J., van der Giet, M., Tölle, M., Wolinska, I., von Wnuck Lipinski, K., Baba, H., et al. (2004). HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J. Clin. Invest.* (113(4)), 509-13.

Otvos JD., Jeyarajah E., Bennett DW. (1991). Quantification of Plasma Lipoproteins by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Clin. Chem.* 37/3, 377-386

Patsch, J. (1998). Influence of lipolysis on chylomicron clearance and HDL cholesterol levels. *Eur. Heart. J.* (19), H2-6.

Pearson, T., Kramer, E., Solez, K., & Heptinstall, R. (1977). The human atherosclerotic plaque. *Am. J. Pathol.* , 657-64.

Rainwater, D. (1998). Electrophoretic separation of LDL and HDL subclasses. *Methods Mol. Biol.* (110), 137-51.

Rhoads, G., Gulbrandsen, C., & Kagan, A. (1976). Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N. Engl. J. Med.* (294), 293-8.

Rigotti, A., Trigatti, B., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J., & Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (94), 12640-15.

Rubins, H., Robins, S., Collins, D., Fye, C., Anderson, J., Elam, M., et al. (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.* (341), 410-8.

Rust S, R. M.-C.-F.-B. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics* (22), 352-355.

Soumian, S., Albrecht, C., Davies, A., & Gibbs, R. (2005). ABCA1 and atherosclerosis. (10), 109-19.

Spieker, L., Sudano, I., Hürlimann, D., Lerch, P., Lang, M., Binggelli, C., et al. (2002). High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* (105), 1399-402.

Sun, B., Boyanovsky, B., Connelly, M., Shridas, P., van der Westhuyzen, D., & Webb, N. (2007). Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J. Lipid. Res.* (48), 2560-70.

Tabas, I. (2004). Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* (11), S12-6.

vam Dam, M., de Groot, E., Clee, S., Hovingh, G., Roelants, R., Brooks-Wilson, A., et al. (2002). Association between increased arterial-wall thickness and

impairment in ABCA1-driven cholesterol efflux: an observational study. *Lancet* (359), 37-42.

Varban, M., Rinninger, F., Wang, N., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J., Fang, O., et al. (1998). Targeted mutations reveal a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (95), 4619-24.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., & Tall, A. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (101), 9774-9.

Wang, N., Silver, D., Thiel, C., & Tall, A. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J. Biol. Chem.* , 23742-7.

Zhang, Y., Da Silva, J., Reilly, M., Billheimer, J., Rothblat, G., & Rader, D. (2005). Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest.* (115), 2870-74.

7.1 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle ist dies Herr Prof. Dr. med. H. Schunkert, der mir freundlicherweise dieses interessante Thema zur Bearbeitung überlassen hat und mir die Arbeitsmaterialien zur Seite gestellt hat.

In gleicher Weise gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. med. P. Linsel-Nitschke, der mich während meiner gesamten Arbeit von Anfang an exzellent betreute und mir in vielen Gesprächen und Anleitungen stets geduldig zur Seite stand. Schließlich danke ich ihm auch für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich der Molekulargenetischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II und vor allem den Medizinisch Technischen Assistentinnen Frau Ragna Selle und Frau Stephanie Belz für ihre Unterstützung in der Laborarbeit danken.

Ferner danke ich der Firma LipoFit aus Regensburg, insbesondere Herrn Dr. Fritz Huber, für die Durchführung der NMR-Spektroskopie.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei den Patienten, die sich zur Teilnahme an den Untersuchungen bereit erklärt haben und den Ärzten, die das Untersuchungsmaterial sichergestellt haben.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Henning Christian Carsten Jansen
 Anschrift: Pleskowstrasse 14, 23564 Lübeck
 Geburtsdatum, -ort: 15. Juli 1982 in Lingen (Ems)
 Familienstand: ledig

Ausbildung

Schule

1989 – 1993 Grundschulbesuch in Freren
 1993 – 2002 Franziskusgymnasium Lingen (Ems)
 Juni 2002 Abitur

Zivildienst

2002 – 2003 Deutsches Rotes Kreuz, Lingen (Ems)
 Ausbildung zum Rettungssanitäter

Studium

2003 – 2005 Studium der Humanmedizin in Lübeck
 August 2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Seit 2005 Fortsetzung des Studiums in Lübeck
 November 2009 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinisch-praktische Ausbildung während des Studiums

Famulaturen

März 2006 Innere Medizin, UK-SH, Campus Lübeck
 September 2006 Urologie/ Chirurgie, Universitätsklinik Tartu, Estland
 Stipendium der Universität zu Lübeck
 März 2007 Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Jansen, Freren
 September 2007 Anästhesie und Intensivmedizin, Meran, Südtirol
 Oktober 2007 Neurologie Poliklinik, UK-SH, Campus Lübeck
 März 2008 Chirurgie, Elisabeth-Krankenhaus, Thuine

Praktisches Jahr

08/2008 – 12/2008 Innere Medizin, Department of Veterans Affairs Medical
 Center,
 Northport, New York, USA
 12/2008 – 03/2009 Chirurgie, Kantonsspital Zug, Baar, Schweiz
 04/2009 – 07/2009 Anästhesie und Intensivmedizin, Itzehoe

Veröffentlichungen

Jansen H , Linsel-Nitschke P, Aherrarhou Z, Belz S, Mayer B, Lieb W, Huber F, Kremer W, Kalbitzer HR, Erdmann J, Schunkert H: Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. Lipids in health and disease, 2009 Apr 6;8:14

Teilnahme an der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim 2007, mit Präsentation eines Posters zu oben genanntem Thema

Berufserfahrung

Seit Januar 2010	Anstellung als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Direktor: Prof. Dr. med. H. Schunkert
------------------	--

Sprachen

Englisch	fließend in Wort und Schrift
Latein	Großes Latinum

Freizeitengagement

Musik	Klavier, Kirchenorgel, Ausbildung zum nebenamtlichen Kirchenmusiker (C-Kantor) während der Schulzeit Nebentätigkeit als C-Kantor während der Schulzeit und des Studiums
Sport	Hochseesegeln, Rennradfahren, Studentischer Vorsitzender des Akademischen Seglervereins Greifswald zu Lübeck e.V. 2004 – 2007

7.3 Eidesstattlicher Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Ich versichere, dass ich nicht vorher oder gleichzeitig anderenorts einen Zulassungsantrag gestellt oder die Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen habe.

Ich bestätige, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 04-041 vom 22.04.2010) genehmigt wurden.