

# Vitamin-C-Mangel verursacht Atherosklerose durch die Ablagerung von Lipoprotein(a) in der Gefäßwand von transgenen Mäusen

John Cha, Aleksandra Niedzwiecki und Matthias Rath, Dr. Rath Research Institute, Santa Clara, CA, USA

## Zusammenfassung

**Lipoprotein(a), kurz Lp(a), ist eine Variante des LDL-Moleküls, die zusätzlich das klebrige Eiweiß Apoprotein(a), kurz Apo(a), enthält. Lp(a) ist ein entscheidender Risikofaktor für die Herz-Kreislauf-Erkrankung beim Menschen. Lp(a) findet sich im Stoffwechsel von Menschen und Menschenaffen, aber nur selten in niederen Säugetieren. Eine genaue Kenntnis des Vorteils, den dieses Molekül offensichtlich in der Entwicklungsgeschichte hatte, sollte zu einem besseren Verständnis seiner physiologischen Rolle beitragen. Wir haben ein neuartiges Tiermodell (transgene Mäuse) entwickelt, das sich durch zwei Merkmale des menschlichen Stoffwechsels auszeichnet: die Produktion von Lp(a) und der Verlust der körpereigenen Produktion von Vitamin C (Ascorbat).**

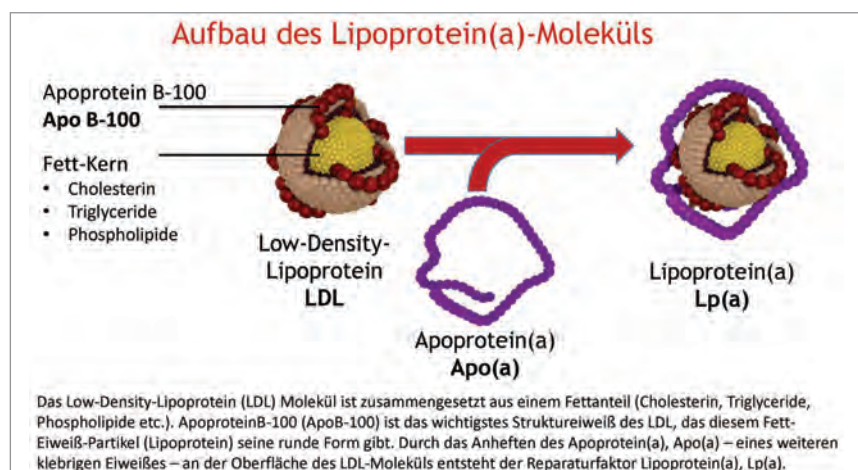
**Wir zeigen hier, dass ein Mangel an Vitamin C in der Nahrung den Blutspiegel von Lp(a) erhöht. Sowohl ein chronischer Mangel an Vitamin C als auch eine vollständige Erschöpfung der Vitamin-C-Reserven im Körper (Skorbut) führen zur Ablagerung von Lp(a)-Molekülen in den Blutgefäßen – ein Prozess, der mit der Entwicklung von atherosklerotischen Plaques einhergeht. Diese Ergebnisse zeigen, dass Vitamin-C-Mangel in der Nahrung ein Risikofaktor für die Entwicklung der Atherosklerose ist, unabhängig von der Fettaufnahme mit der Nahrung. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass Lp(a) als mobiles Reparaturmolekül einer Strukturschwäche der Blutgefäßwände entgegenwirkt, ein Merkmal von Vitamin-C-Mangel und Skorbut.**

## Einleitung

Lp(a) ist einer der wichtigsten genetisch festgelegten Risikofaktoren der Herz-Kreislauf-Erkrankung des Menschen, von Herzinfarkt, Schlaganfall und anderen Formen dieser Erkrankung.<sup>1,2</sup>

Lp(a) setzt sich zusammen aus einem Low-Density-Lipoprotein (LDL) und einem riesigen Glycoprotein – dem Apolipoprotein(a), kurz Apo(a). Das Apolipoprotein(a)-Molekül ist über schwefelhaltige Aminosäurepaare (Disulfidbrücken) an das wichtigste Struktureiweiß des LDL-Moleküls, Apolipoprotein B-100, kurz ApoB, gebunden.<sup>3</sup>

Lp(a) sammelt sich innerhalb der atherosklerotischen Ablagerungen an<sup>4</sup> und bindet an verschiedene Bestandteile des Bindegewebes, der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel Fibronectin, Laminin und andere.<sup>5</sup> Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Apo(a)-Eiweiß die Vermehrung von glatten Muskelzellen beschleunigt.<sup>6</sup> Durch seine Strukturähnlichkeit (Homologie) mit dem Eiweiß Plasminogen<sup>7</sup> (das bei der Auflösung von Blutgerinnseln eine entscheidende Rolle spielt) bindet das Apo(a)-Molekül vermehrt an Fibrinogen und Fibrin (dem entscheidenden Strukturbestandteil der Blutgerinnsel). Das Lp(a)-Molekül übt daher eine stark hemmende Wirkung auf die Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) aus. Aus diesem Grund wurde Lp(a) auch als das „lange vermisste Bindeglied“ zwischen der Entstehung von Atherosklerose und Thrombose bezeichnet.<sup>8</sup> Obwohl viele Eigenschaften dieses Moleküls seit seiner Entdeckung vor



einem halben Jahrhundert<sup>9</sup> entschlüsselt wurden, ist seine physiologische Bedeutung bislang noch kaum verstanden.<sup>10</sup>

Lp(a) wird fast ausschließlich im Stoffwechsel von Menschen und Menschenaffen gefunden. Das Auftreten des Apo(a)-Gens wurde auf etwa 40 Millionen Jahren vor unserer Zeit datiert, ungefähr der Zeitpunkt in der Entwicklungsgeschichte, als die Altweltaffen und Neuweltaffen voneinander getrennt wurden.<sup>7</sup> Dieser Zeitpunkt fällt mit dem Verlust der körpereigenen Produktion von Vitamin C zusammen, die durch eine Genmutation für das Enzym Gulonolacton-Oxidase (Gulo) in unseren Vorfahren verursacht wurde.<sup>11</sup>

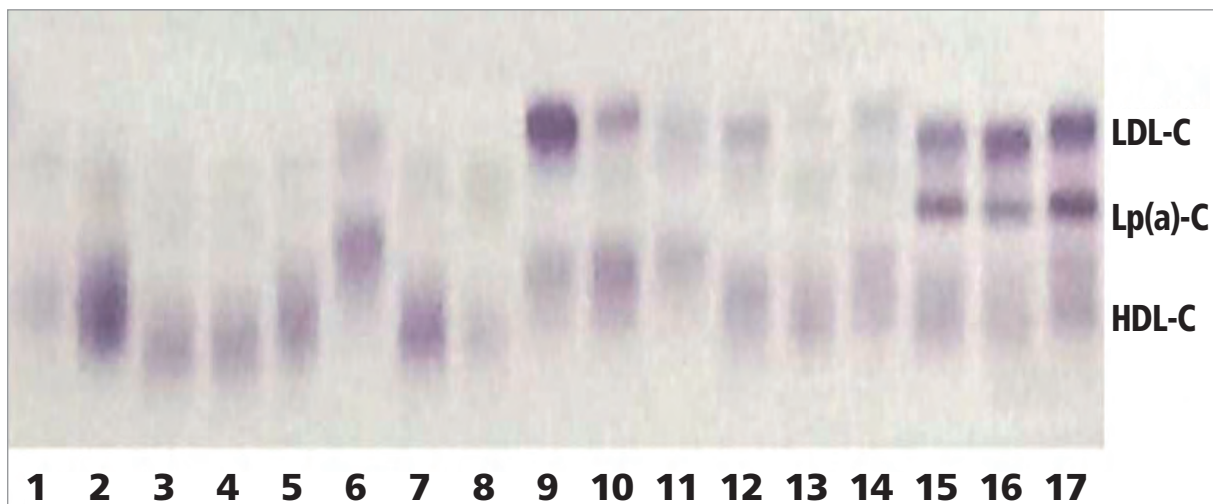
Das entwicklungsgeschichtliche Zusammentreffen dieser beiden genetischen Veränderungen (Mutationen) im Stoffwechsel unserer Vorfahren führte zu der Hypothese, dass diese beiden genetischen Mutationen im Zusammenhang stehen könnten.<sup>12</sup> Der Verlust der körpereigenen Vitamin-C-Synthese führte dazu, dass unsere Vorfahren fortan der Skorbut-Krankheit ausgesetzt waren. Diese Vitaminmangel-Krankheit ist gekennzeichnet durch eine Hemmung der Kollagen-Synthese und einem daraus resultierenden Verlust der Stabilität des Bindegewebes mit massivem (hämorrhagischem) Blutverlust als häufigste Todesursache.

In Zeiten einer Schwächung des Bindegewebes durch Langzeit-Mikronährstoffmangel hatte das

Apo(a)-Molekül große Vorteile: die Länge seiner Aminosäurenkette (Primärstruktur) ist größer als das Kollagen-Molekül, es hat eine hemmende Wirkung auf die Blutgerinnsel-Auflösung (Fibrinolyse) und bindet hervorragend an verschiedene Strukturbestandteile des Bindegewebes. Mit all diesen Funktionen könnte das Apo(a) als Reparaturmolekül nützlich gewesen sein, indem es der durch Vitamin-C-Mangel und Skorbut verursachten Schwächung des Bindegewebes entgegenwirkte.

Um diese Hypothese zu testen, haben wir ein genetisch verändertes (transgenes) Mausmodell entwickelt, das dem menschlichen Stoffwechsel in Bezug auf zwei spezifische Erbmerkmale gleich ist: dem Verlust der körpereigenen Vitamin-C-Synthese und der Produktion von menschlichem Lp(a). Von besonderem Interesse für uns war die Frage, ob der Verlust der Bindegewebsstruktur der Blutgefäße in der Folge von Langzeit-Vitamin-C-Mangel dazu führt, dass es in den Blutgefäßwänden zu einer Ablagerung von Lp(a)-Molekülen und zur Entwicklung von Atherosklerose kommt. Darüber hinaus untersuchten wir, ob eine Nahrungsergänzung mit größeren Mengen Vitamin C diesen Krankheitsprozess verhindern kann.

## Material und Methoden (siehe Anhang)



**Abbildung 1.** Darstellung des Lipoprotein-Cholesterin-Profiles unterschiedlicher, genetisch veränderter (transgener) Mäuse. Serum zufällig ausgewählter zuvor genetisch bestimmter männlicher Mäuse, die kein Vitamin C produzieren konnten (Gulo-/Mutanten) sowie weibliche Mäuse (Hintergrundstamm), transgene Mäuse, die lediglich die Lp(a)-Proteine (also Apo(a) und ApoB-100) enthielten („single human transgen“), sowie Mäuse, die beide Genveränderungen hatten, also sowohl die Einstellung der Vitamin-C-Synthese (Gulo<sup>-/-</sup>) als auch die Produktion der Lp(a)-Proteine (Apo(a) und ApoB-100), also Gulo<sup>-/-</sup>; Apo(a)<sup>+</sup>; ApoB-100<sup>+</sup>, für Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup>. Die Lipoproteine im Mäuseserum wurde elektrophoretisch getrennt und deren Cholesterinanteil, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, visualisiert. Die Expression der Proteine Apo(a) bzw. humanes ApoB-100 wurde, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, mit einem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) visualisiert. Bei der Alphabande am unteren Ende der Banden handelt es sich um HDL-Cholesterin (**HDL-C**). Die Betabande, die am weitesten oben zu sehen ist, ist LDL-Cholesterin (**LDL-C**). Die intensive Prä-Betabande unterhalb von LDL in den Bahnen 15-17 ist Lp(a)-Cholesterin (**Lp(a)-C**). Bahnen: 1 und 2 - männliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; 3 und 4 - weibliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; 5 und 6 - männliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; Apo(a)<sup>+</sup>; 7 und 8 - weibliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; Apo(a)<sup>+</sup>; 9 und 10 - männliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; ApoB-100<sup>+</sup>; 11 und 12 - weibliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; ApoB-100<sup>+</sup>; 13 und 14 - männliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; Apo(a)<sup>+</sup>; ApoB-100<sup>+</sup>; 15, 16, und 17 weibliche Mäuse, Gulo<sup>-/-</sup>; Apo(a)<sup>+</sup>; ApoB-100<sup>+</sup>.

## Ergebnisse

### Ein transgenes Mausmodell zur Untersuchung von Atherosklerose bei Menschen

Die Autoren entwickelten durch schrittweise vorgenommene Kreuzungen, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, einen neuen transgenen Mäusestamm, der im Körper der Mäuse menschliches Lp(a) produziert. Gleichzeitig wurde die körpereigene Produktion von Vitamin C durch eine genetische Deaktivierung des Enzyms für L-Gulonolactonoxidase (Gulo<sup>-/-</sup>) gehemmt.

Beide humane Proteine, die das Lp(a)-Molekül aufbauen, Apo(a) und ApoB-100, wurden in den Seren doppelt transgener Apo(a)<sup>+</sup>; ApoB-100<sup>+</sup>; Gulo<sup>-/-</sup>-Mäuse nachgewiesen. Die Präsenz kompletter Lp(a)-Partikel, also mit Fett(Lipid)-Anteil, wurde, wie in „Material und Methoden“ beschrieben, im Serum dieses Mäusestamms mittels elektrophoretischer Lipoprotein-Trennung und Cholesterin-Visualisierung (**Abbildung 1**) nachgewiesen.

Transgene Mäusemodelle, die menschliches Lp(a) produzieren, waren bereits zuvor entwickelt worden<sup>15, 16</sup>, jedoch wichen diese Tiermodelle vom menschlichen Organismus ab, da sie – anders als wir Menschen – körpereigenes Vitamin C synthetisierten.

### Vitamin C beeinflusst die Blut(Plasma)-Konzentrationen von Fetten (Lipiden) und Lipoproteinen

Die Autoren wählten vier verschiedene Konzentrationen für die Vitamin-C-Zufuhr mittels Futter bzw. Wasser entsprechend einer täglichen Vitamin-C-Aufnahme pro Maus von 0 mg, 0,15 mg, 0,3 mg und 2,75 mg (s. „Material und Methoden“).

Diese Vitamin-C-Dosierungstufen wurden gewählt, um die Festigkeit des Bindegewebes, insbesondere im Gefäßsystem, zu variieren.

Wie aus **Tabelle 1** ersichtlich ist, stand die Aufnahme von Vitamin C in direktem Zusammenhang mit der Blutserum-Konzentration dieses Vitamins, wobei keine geschlechtsabhängigen Unterschiede auftraten.

Die Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mäuse mit der höchsten Vitamin-C-Zufuhr (2,75 mg/Tag) hatten mittlere Vitamin-C-Blutkonzentrationen von mehr als 50 µM. Dieser Wert liegt geschlechtsunabhängig nahe an dem, der für freilebende Mäuse beschrieben wurde (ca. 63 µM). Nach sechs Wochen, in denen den Tieren kein Vitamin C durch das Futter zugeführt wurde, fiel die Vitamin-C-Blutkonzentration bei männlichen Mäusen auf 3 µM ab. Allerdings wurden bei weiblichen

| Maus-Genotyp                 |   | Gulo <sup>-/-</sup> |                     | Gulo <sup>-/-</sup> ; Lp(a) <sup>+</sup> |                     |               |
|------------------------------|---|---------------------|---------------------|--|---------------------|---------------|
|                              |   | 2,75 mg/Tag         | 0 mg/Tag*           | 0,15 mg/Tag                              | 0,30 mg/Tag         | 2,75 mg/Tag   |
| Ascorbinsäure in der Nahrung |   |                     |                     |  |                     |               |
| Ascorbinsäure im Serum       | M | NG                  | <b>3,0 ± 6,9</b>    | <b>5,1 ± 3,6</b>                         | <b>10,4 ± 3,1</b>   | 50,0 ± 12,5   |
|                              | F | NG                  | <b>7,9 ± 8,5</b>    | <b>3,2 ± 1,9</b>                         | <b>5,0 ± 1,7</b>    | 53,5 ± 10,1   |
| Gesamt-C                     | M | 101,6 ± 6,4         | <b>140,6 ± 17,0</b> | 112,3 ± 25,9                             | 124,3 ± 26,4        | 112,6 ± 7,9   |
|                              | F | 88,2 ± 11,3         | 139,3 ± 25,4        | 103,2 ± 16,6                             | 96,3 ± 23,6         | 105,1 ± 23,3  |
| LDL-C                        | M | 7,5 ± 0,71          | <b>97,4 ± 14,3</b>  | 24,6 ± 15,9                              | 28,9 ± 11,2         | 26,6 ± 13,7   |
|                              | F | 7,3 ± 0,5           | <b>84,5 ± 26,9</b>  | 14,8 ± 6,3                               | 19,2 ± 10,3         | 20,3 ± 9,1    |
| HDL-C                        | M | 60,3 ± 5,1          | <b>41,2 ± 7,9</b>   | 62,6 ± 28,6                              | 67,9 ± 18,1         | 68,0 ± 13,2   |
|                              | F | 47,1 ± 5,7          | 46,2 ± 11,7         | 38,3 ± 9,8                               | 39,8 ± 10,1         | 45,2 ± 10,5   |
| Lp(a)-C                      | M | 0                   | <b>2,0 ± 1,7</b>    | <b>18,1 ± 10,5</b>                       | 13,7 ± 3,9          | 11,5 ± 4,4    |
|                              | F | 0                   | <b>8,6 ± 5,7</b>    | <b>45,0 ± 12,6</b>                       | 30,2 ± 13,3         | 33,1 ± 10,9   |
| TG                           | M | 231,2 ± 58,0        | <b>320,3 ± 71,8</b> | <b>562,7 ± 134,4</b>                     | <b>590,4 ± 94,7</b> | 445,5 ± 104,3 |
|                              | F | 199,4 ± 82,3        | 411,0 ± 136,4       | 436,7 ± 107,7                            | 354,0 ± 77,9        | 423 ± 125,0   |
| h-Apo(a)                     | M | 0                   | <b>0</b>            | <b>26,1 ± 43,5</b>                       | <b>12,3 ± 13,2</b>  | 0,3 ± 0,91    |
|                              | F | 0                   | <b>6,7 ± 8,9</b>    | <b>100,4 ± 36,9</b>                      | 69,3 ± 28,5         | 75,5 ± 21,6   |
| h-ApoB                       | M | 0                   | 79,1 ± 22,9         | 97,9 ± 83,1                              | <b>93,2 ± 42,5</b>  | 60,1 ± 31,7   |
|                              | F | 0                   | 106,4 ± 50,8        | <b>70,8 ± 28,1</b>                       | 52,5 ± 25,9         | 41,5 ± 16,5   |

Gesamt-C = Gesamtcholesterin; LDL-C = Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin; HDL-C = High-Density-Lipoprotein-Cholesterin; Lp(a)-C = Lipoprotein(a)-Cholesterin; TG = Triglyceride; h-Apo(a) = humanes Apolipoprotein(a); h-ApoB = humanes-Apolipoprotein B; NG = nicht gemessen. Lipide und Lipoprotein sind in mg/dl angegeben, Vitamin C (Ascorbinsäure) in µmol.

\*Mittelwert für n = 7-9 Mäuse, bei allen anderen Gruppen ein Mittelwert aus n = 10-12. Ergebnisse nach 6 Wochen Fütterung. Die fettgedruckten Werte sind statistisch signifikante (p<0.05) Unterschiede im Vergleich zu Mäusen mit hoher Vitamin-C-Supplementierung.

**Tabelle 1.** Serumkonzentrationen von Vitamin C, Lipiden und Lipoproteinen bei Gulo<sup>-/-</sup> und Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mäusen bei unterschiedlicher Supplementierung von Vitamin C in der Nahrung

Mäusen, die kein Vitamin C in der Nahrung erhielten, unterschiedliche Vitamin-C-Blutkonzentrationen festgestellt. 3 Tiere wiesen 0  $\mu\text{M}$  auf, und der Mittelwert betrug 7,9  $\mu\text{M}$ .

Normale freilebende (Wildtyp-)Mäuse mit körpereigener Vitamin-C-Synthese haben ein Lipoproteinprofil, das sich umgekehrt zum menschlichen Stoffwechsel verhält. High-Density Lipoprotein (HDL) ist das wichtigste Fett/Cholesterin-Transportmolekül im Plasma von Wildtyp-Mäusen, wohingegen Low-Density Lipoprotein (LDL) und Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL) eine untergeordnete Rolle spielen.

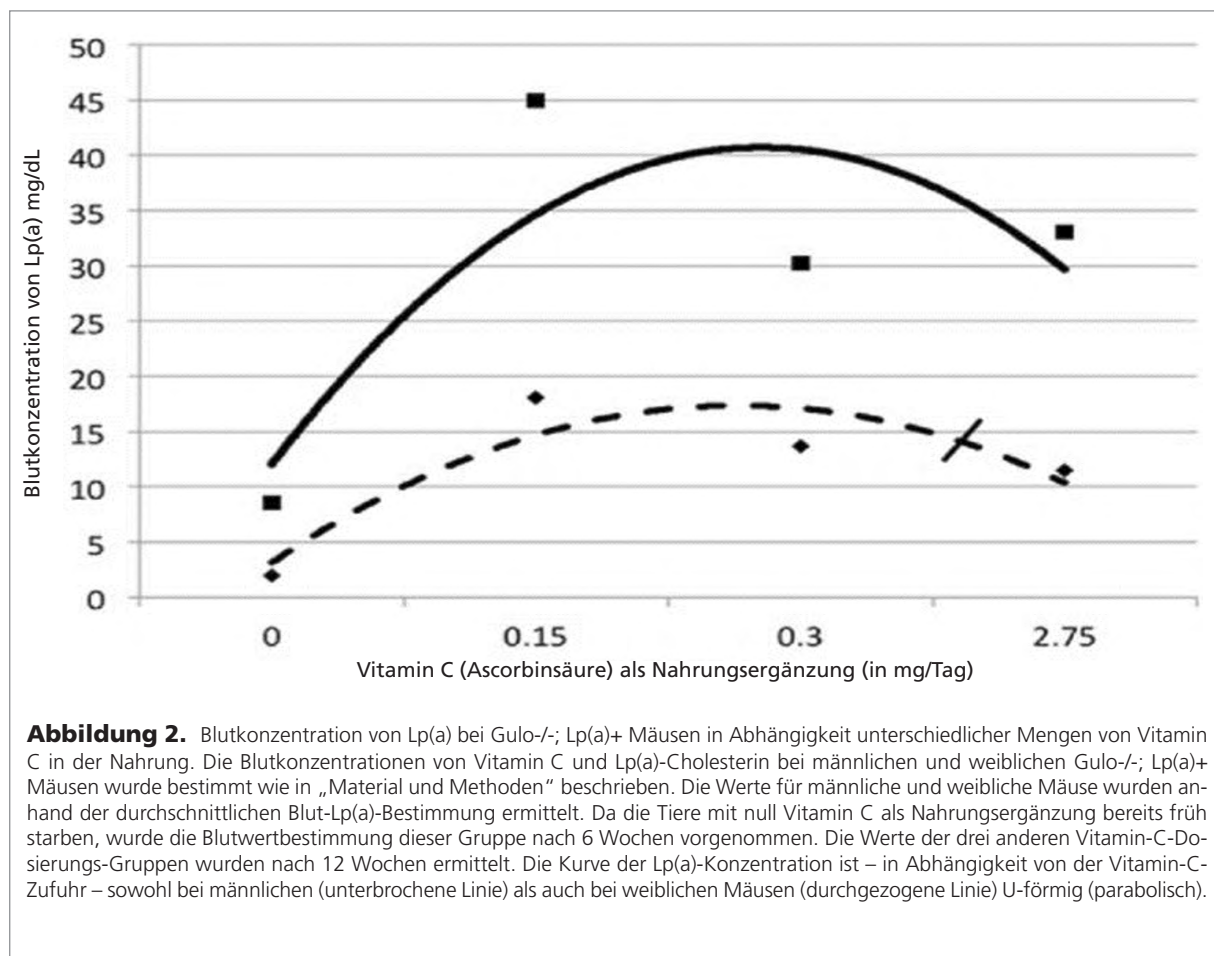
Im Gegensatz dazu haben Gulo-/-; Lp(a)+ Mäuse bei einer Ernährung ohne Vitamin C eine signifikant erhöhte Gesamtcholesterin-Konzentration im Blut, und LDL wird in dieser Situation zur größten Lipoprotein-Untergruppe (Fraktion).

Das hier vorgestellte transgene Tiermodell Gulo-/-; Lp(a)+ ermöglichte es, zum ersten Mal die Wirkung einer Vitamin-C-Nahrungsergänzung, insbesondere auf Lp(a)-Blutkonzentrationen, zu untersuchen – und zwar bei Tieren, die nicht in der Lage sind, Vitamin C selbst herzustellen. Bei niedrig dosierter Nahrungsergänzung von Vitamin C wurde eine eindeutige (signifikante) Zunahme der Lp(a)-Konzentration im Blut nachgewiesen.

Wurde allerdings über 6 Wochen überhaupt kein Vitamin C zugeführt – Bedingungen, die dem Skorbut beim Menschen entsprechen –, nahm die Konzentration von Lp(a) im Blut signifikant ab. Dies ist am ehesten durch einen Zusammenbruch der gesamten Eiweißproduktion (vor allem in der Leber) unter diesen extremen Stoffwechselbedingungen zu erklären.

Ferner wurden bei gleicher Vitamin-C-Aufnahme und vergleichbarem Alter signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede der Lp(a)-Konzentration im Blut nachgewiesen: Weibliche Mäuse hatten signifikant höhere Lp(a)-Werte als männliche Tiere (**Abbildung 2**).

Da das Lipoprotein LDL (und sein Struktureiweiß ApoB) auch im Mäuse-Stoffwechsel eine Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Studie bei transgenen Gulo-/-; Lp(a)+ Mäusen zwischen der ursprünglichen Blutkonzentration von Maus-ApoB und menschlichem ApoB-100 unterschieden. Der weitaus größte Teil des im Blut dieser transgenen Mäuse zirkulierenden ApoB ist menschliches ApoB-100, von dem ein bedeutender Anteil in der Lp(a)-Fraktion nachgewiesen wurde. Wie auch bei der Blutkonzentration von Lp(a) hing die Blutkonzentration von menschlichem ApoB-100 in diesem Tiermodell von der Höhe des Vitamin-C-Gehalts der Nahrung ab (**Abbildung 3**).



### Vitamin-C-Mangel verursacht Ablagerung von Lp(a) in den Gefäßwänden

Vitamin C ist essentiell für die Hydroxylierung von Lysin und Prolin, die eine notwendige Bedingung für die optimale Vernetzung von Kollagen und Elastin und damit für den Erhalt der Stabilität der Gefäßwände ist<sup>17</sup>. Das Gulo-/-; Lp(a)+ Modell ermöglicht die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Vitamin-C-Mangel und der Entwicklung der Atherosklerose (Atherogenese), zu deren typischen Kennzeichen die Ablagerung von Lp(a) in den Gefäßwänden gehört.

Wie auch beim Skorbut des Menschen führt in diesem Mausmodell eine Ernährung ohne jegliches Vitamin C zu einem erheblichen Verlust der Stabilität des Bindegewebes der Blutgefäßwände. Das Einreißen der Endothelschicht, eine Schädigung der darunterliegenden Barriere (Basalmembran) und die strukturelle Auflösung der Bindegewebsmoleküle verlaufen parallel mit der Entwicklung von Skorbut<sup>18</sup>.

In unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, dass das frühe Auftreten von Atherosklerose begleitet war von der Lp(a)-Ablagerung in den innersten Schichten (Intima) sowie in tieferen Schichten der Blutgefäßwände. Bei altersgleichen Mäusen mit hoher Vitamin-C-Dosierung trat keine Atherosklerose auf. Ebenso konnte in diesem Fall in den Gefäßwänden fast kein Lp(a) nachgewiesen werden.

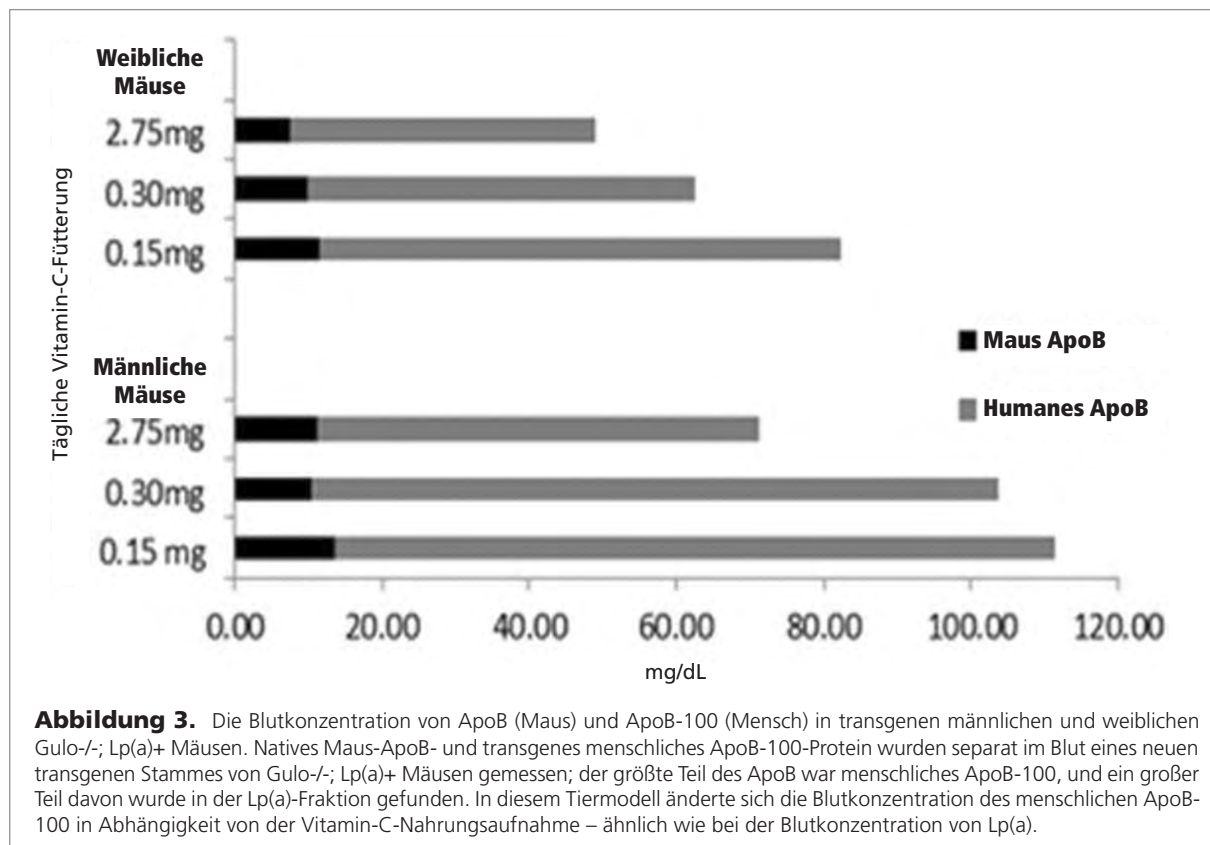
Die mikroskopischen Aufnahmen in **Abbildung 4-1** zeigen histologische Serienschritte der Aortenwur-

zel (unmittelbar am Herzen angrenzender Bereich der Hauptschlagader). Dabei handelte es sich um Mäuse, denen kein Vitamin C (**Abbildung 4-1A, 4-1C, 4-1E, 4-1G**) bzw. ausreichende Mengen dieses Vitamins zugeführt wurde (**Abbildung 4-1B, 4-1D, 4-1F, 4-1H**).

In der Arterienwand von Tieren, die unter Vitamin-C-Mangelversorgung litten, ging die Zerstörung der Elastin-Moleküle in der Blutgefäßwand mit der Ablagerung von Lp(a)-Molekülen einher. Dies konnte Anhand von Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Antikörper (immunhistochemisch) nachgewiesen werden, wobei eine gleichzeitige Ablagerung (Co-Lokalisierung) von Apo(a) (**Abbildung 4-1C**) und ApoB-100 (**Abbildung 4-1E**) sowie von Fibrinogen (**Abbildung 4-1G**) festgestellt wurde.

Die Neigung zum Anhaften (Affinität) von Apo(a) an verschiedene Bindegewebsmoleküle wurde bereits durch andere Forschergruppen in künstlichen Zellsystemen (*in vitro*) gezeigt. Im lebenden Organismus von Tieren (*in vivo*) waren jedoch derartige Untersuchungen bisher nicht durchgeführt worden.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sich bei Vitamin-C-Mangel die Lp(a)-Moleküle in den strukturell geschädigten Bereichen der Gefäßwände anhäufen. Die parallele Ablagerung (Co-Lokalisierung) von Apo(a) und Fibrinogen (**Abbildung 4-1G**) in der Arterienwand von Vitamin-C-verarmten Mäusen unterstreicht die Bedeutung von Lp(a) als Faktor, der die Auflösung von Fibrin-Molekülen (Fibrinolyse) hemmt. Mit dieser Eigen-



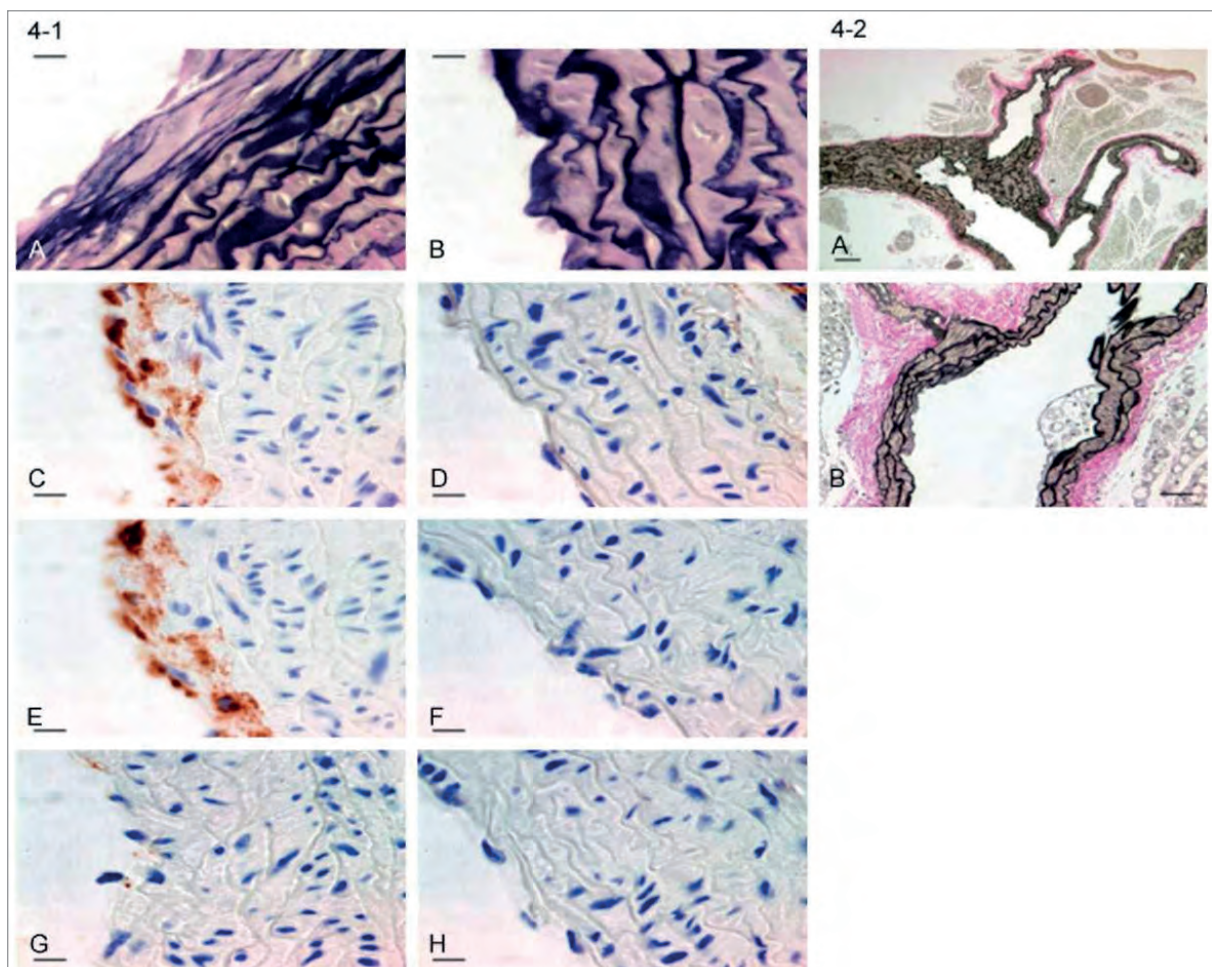
schaft, die durch die Strukturähnlichkeit (Homologie) von Apo(a) mit dem Fibrinolyse-Molekül Plasminogen bedingt ist, wirken die Lp(a)-Moleküle einem drohenden, skorbutbedingten Blutverlust entgegen.

Diese Ergebnisse belegen auch, dass bereits nach einer 12-wöchigen Vitamin-C-Unterversorgung (Hypoascorbämie) umfassende atherosklerotische Ablagerungen entstehen können. Und wie beim Menschen entstehen diese atherosklerotischen Plaques vorzugsweise in Bereichen der Gefäßwand, die hohem Blutdruck (hämodynamischem Druck) und starken Scherkräften (Turbulenzen an Abzweigungsstellen) ausgesetzt sind, d.h. insbesondere in der herznahen (proximalen) Aorta und deren Ästen (**Abbildung 4-2A, 4-2B**).

### **Lp(a)-Ablagerungen in den Gefäßwänden in Abhängigkeit von Vitamin-C-Zufuhr**

Aus Untersuchungen bei Menschen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist bekannt, dass je größer die atherosklerotischen Ablagerungen sind, umso mehr Lp(a) in den Gefäßwänden deponiert ist<sup>4</sup>. Allerdings waren in diesen früheren Untersuchungen keine Vitamin-C-Konzentrationen gemessen worden.

In der vorliegenden Untersuchung mittels Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mäusen konnte erstmals gezeigt werden, dass es bei Vitamin-C-Mangel in der Nahrung zu ausgeprägten atherosklerotischen Plaques mit umfangreichen Ablagerungen von Lp(a) in den Gefäß-



**Abbildung 4.** Ein Mangel an Vitamin C in der Nahrung führt zur Strukturschwäche der Arterienwand und fördert die Ablagerung von Lp(a) in den Gefäßwänden.

**Abbildung 4-1.** Immungefärbte Schnitte der Aortenwurzel weiblicher Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mäuse nach 6 Wochen ohne Zufuhr von Vitamin C (A, C, E, G) bzw. bei Vitamin-C-Supplementierung mit 2,75 mg pro Tag (B, D, F, H). A und B: Elastica-Van-Gieson-Färbung; C und D: Immunfärbung auf humanem Apo(a); E und F: Immunfärbung für menschliches ApoB-100; G und H: Immunfärbung auf Fibrinogen. Maßstabsbalken = 10 µm.

**Abbildung 4-2.** Elastica-Van-Gieson-Färbung atherosklerotischer Plaques in den Verzweigungen der schlagadernahen A. subclavia sinistra in niedriger und hoher Vergrößerung (Abbildungen 4-2A und B). Die Aufnahmen wurden von der Arterie einer 10 Monate alten weiblichen Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Maus nach 12 Wochen mit niedriger Vitamin-C-Zufuhr (0,15 mg/dl) gemacht. Abbildung 4-2A: Maßstabsbalken = 200 µm. 4-2 B: Maßstabsbalken = 50 µm.

wänden kommt. Umgekehrt verhindert eine optimale Vitamin-C-Versorgung die Plaquebildung und Lp(a)-Ablagerung weitestgehend (**Abbildung 5**).

Die Lp(a)-Ablagerungen wurden anhand einer Einstufungs-Skala (Score) von 0 (keine Ablagerungen) bis zum Maximalwert von 3 bewertet. Bei völligem Fehlen von Vitamin C in der Nahrung (0 mg/dl) bzw. suboptimaler (0,15 mg/dl) Vitamin-C-Zufuhr in der Nahrung bildeten sich bei beiden Geschlechtern deutliche Ablagerungen von Lp(a) in den Gefäßwänden.

Im Gegensatz dazu führte in dieser Untersuchung die maximale Nahrungsergänzung mit Vitamin C (2,75 mg/dl) zu einer deutlichen Abnahme der Lp(a)-Ablagerungen in den Gefäßwänden der entsprechenden Mäuse. Bei weiblichen Gulo-/-; Lp(a)+ Mäusen konnten noch Spuren von Lp(a) in den Gefäßwänden nachgewiesen werden (Score <1). Bei männlichen Mäusen mit hoher Vitamin-C-Versorgung wurde die Ablagerung von Lp(a) in den Gefäßwänden vollständig verhindert (Score = 0).

## Diskussion

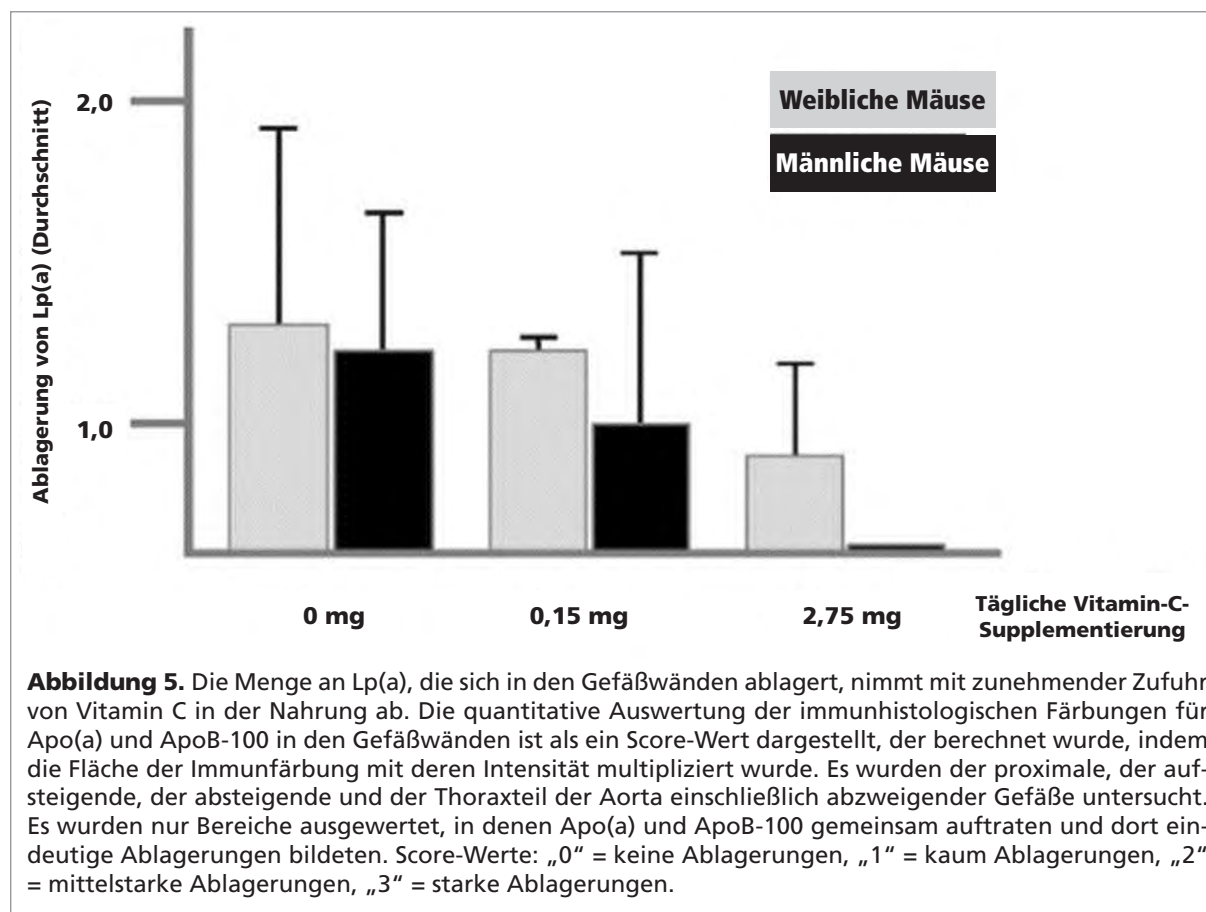
Während bei den meisten Tieren die Atherosklerose nur in Ausnahmefällen auftritt, stellt sie bei uns Menschen (*Homo sapiens*) die Todesursache Nummer eins dar. Zwei genetisch festgelegte Merkmale des menschlichen Stoffwechsels, die mit der Entste-

hung von Herz-Kreislauf-Krankheiten in Verbindung gebracht wurden, sind 1. Vitamin-C-Mangel aufgrund des Verlusts der Fähigkeit, Vitamin C selbst synthetisieren zu können und 2. das Auftreten von Lp(a). Da diese beiden genetischen Ereignisse in etwa zur selben Zeit – vor etwa 40 Millionen Jahren – auftraten, liegt ein Zusammenhang zwischen ihnen nahe<sup>12</sup>. Lipoprotein(a) würde demnach als wichtiges Reparaturmolekül den möglicherweise tödlichen Auswirkungen eines vollständigen Vitamin-C-Mangels – vor allem das Verbluten bei Skorbut – entgegenwirken.

Bisher stand der Wissenschaft kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung, um einen Zusammenhang zwischen Vitamin-C-Mangel und Lp(a) im lebenden System (*in vivo*) zu untersuchen. Anhand der bislang zur Verfügung stehenden Tiermodelle konnten diese beiden Stoffwechsel-Merkmale nur getrennt untersucht werden.

In früheren Experimenten war bereits gezeigt worden, dass bei genetisch veränderten Mäusen, deren Vitamin-C-Synthese unterbunden wurde (*Gulo*-/-) – ohne dass sie jedoch Lp(a) produzierten –, eine Vitamin-C-Mangelernährung zu einer Struktur-schwäche der Gefäßwände und zu einer Erhöhung der Cholesterinspiegel im Blut führte<sup>19</sup>.

Andere Experimente hatten gezeigt, dass genetisch veränderte (*transgene*) Mäuse, die humanes Lp(a) herstellen konnten, ein Futter mit hohem Fettanteil



**Abbildung 5.** Die Menge an Lp(a), die sich in den Gefäßwänden ablagert, nimmt mit zunehmender Zufuhr von Vitamin C in der Nahrung ab. Die quantitative Auswertung der immunhistologischen Färbungen für Apo(a) und ApoB-100 in den Gefäßwänden ist als ein Score-Wert dargestellt, der berechnet wurde, indem die Fläche der Immunfärbung mit deren Intensität multipliziert wurde. Es wurden der proximale, der aufsteigende, der absteigende und der Thoraxteil der Aorta einschließlich abzweigender Gefäße untersucht. Es wurden nur Bereiche ausgewertet, in denen Apo(a) und ApoB-100 gemeinsam auftraten und dort eindeutige Ablagerungen bildeten. Score-Werte: „0“ = keine Ablagerungen, „1“ = kaum Ablagerungen, „2“ = mittelstarke Ablagerungen, „3“ = starke Ablagerungen.

benötigten, um eine Atherosklerose auszulösen. Dies lag sehr wahrscheinlich daran, dass die körpereigene Synthese von Vitamin C eine Schädigung der Gefäßwände durch das Lp(a) Molekül verhindert, die eine Vorbedingung für Atherosklerose ist<sup>15</sup>.

Das neu entwickelte und hier untersuchte Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Maus-Modell hingegen gestattete zum ersten Mal eine Untersuchung der Interaktion dieser beiden Stoffwechselmerkmale – Vitamin-C-Mangel bei gleichzeitiger Lp(a)-Produktion – im Hinblick auf die Entstehung der Atherosklerose.

Es zeigte sich, dass bei Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mäusen eine unzureichende Nahrungszufuhr von Vitamin C zu einem Anstieg der Blutkonzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Lp(a) führte. Der Anstieg der Lp(a)-Konzentration im Serum war unter diesen Vitamin-C-Mangelbedingungen eindeutig, d.h. er erreichte ein hohe statistische Signifikanz.

Dagegen war eine Ernährung komplett ohne Vitamin C mit einer Senkung der Blutkonzentration dieses Lipoproteins verbunden, was durch den Zusammenbruch der gesamten Stoffwechsellistung bei ausgeprägtem Skorbut zu erklären ist.

Unter Vitamin-C-Unterversorgung nimmt der Anteil der Lp(a)-Moleküle am Gesamtprofil der Lipoproteine deutlich zu. Dagegen fällt unter den Bedingungen des vollständigen Fehlens von Vitamin C in der Nahrung der Anteil der Lp(a)-Moleküle ab, und der LDL-Anteil wird zum Hauptanteil des Lipoprotein-Profiles. Dieses Ergebnis spricht für eine Art „Notfall-Rolle“ des Lp(a) – solange kein ausgeprägter Skorbut vorliegt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Geschlechtern bezüglich der Blutkonzentration von Lp(a) beobachtet. Weibliche Mäuse wiesen bei vergleichbarem Alter und vergleichbarer Vitamin-C-Zufuhr grundsätzlich viel höhere Lp(a)-Konzentrationen auf als die männlichen Tiere. Das Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Modell macht es nunmehr möglich, im Detail den Grund dieses geschlechtsspezifischen Unterschiedes zu untersuchen, wobei neue Erkenntnisse zur Rolle des Lp(a) gefunden werden dürften.

Diese Untersuchungen mit einem Tiermodell, das den menschlichen Stoffwechsel im Hinblick auf zwei Schlüsselfaktoren kopiert, können neue Erkenntnisse über den Zusammenhang von Risikofaktoren im Blut und der Entstehung von Atherosklerose beim Menschen erzielen.

Die hier gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass erhöhte Blutkonzentrationen von Lp(a) nicht unbedingt eine primäre Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen sein müssen, sondern – im Gegenteil – bereits eine Folge der Zerstörung des Bindegewebes der Arterienwand im Verlauf der entstehenden Atherosklerose-Erkrankung sind.

Besonders interessant war die Frage, ob im Verlauf einer Vitamin-C-Mangelernährung Lp(a)-Moleküle in den Gefäßwänden abgelagert werden. Die gewebebezogenen (morphologischen) Veränderungen der Gefäßwände bei Vitamin-C-Mangel (Hypoascorbämie) und Skorbut sind charakterisiert durch den Abbau der Bindegewebsmoleküle und den Verlust der Barrierefunktion der Endothelzellschicht. Große Lücken zwischen den Endothelzellen ermöglichen das Eindringen von Reparaturfaktoren (Makromolekülen) in die Blutgefäßwand, die normalerweise – von einer intakten Endothelzellschicht – daran gehindert würden.

Die vorliegenden Daten zeigen eine erhöhte Ablagerung von Lp(a) in den Gefäßwänden von Mäusen bei Hypoascorbämie und Skorbut. Dagegen sind Lp(a)-Moleküle bei Tieren mit Vitamin-C-reicher Ernährung nur in Spuren und nur bei weiblichen Tieren nachzuweisen – ohne dass es zur Bildung von atherosklerotischen Plaques kommt.

Besonders hervorzuheben ist, dass sich die in dieser Studie festgestellten Ablagerungen ohne jegliche Fetтанreicherung der Nahrung bildeten, wie es bei anderen Tiermodellen erforderlich ist, um Atherosklerose überhaupt auslösen zu können.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass die strukturelle Schädigung der Gefäßwände bei Vitamin-C-Unterversorgung und Skorbut an sich schon ausreicht, um eine Ablagerung von Lp(a) und die Entstehung von Atherosklerose zu bewirken.

Bemerkenswerterweise wird Lp(a) in Gefäßwänden von Tieren mit vollständigem Fehlen von Nahrungs-Vitamin-C (Skorbut) abgelagert, obwohl deren Lp(a)-Blutkonzentration unter dieser extremen Stoffwechsellage stark abnahm. Es liegt daher nahe, dass Lp(a) vorwiegend in Bereichen der Arterienwand abgelagert wird, die einen besonderen (Reparatur-)Bedarf haben, wie er beispielsweise durch drohendes Verbluten bei Skorbut gegeben ist.

Die Untersuchungsergebnisse lassen darauf schließen, dass Lp(a) die Funktion eines mobilen Reparaturmoleküls hat, das sich in Bereichen der Gefäßwand ablagert, in denen sich im Rahmen einer Vitamin-C-Unterversorgung ein erhöhter Reparaturbedarf zeigt. Diese Beobachtung könnte auch die erhöhte Bindungsfähigkeit des Apo(a)-Moleküls an Bestandteile der Arterienwand erklären. Dadurch würde einer durch Vitamin-C-Mangel verursachten fortschreitenden Strukturschwäche des Bindegewebes entgegengewirkt.

Hervorzuheben ist auch, dass sich die Lp(a)-Moleküle in den Gefäßwänden der untersuchten Tiere mit Hypoascorbämie und Skorbut fast ausschließlich im Bindegewebe – also außerhalb von Zellen (extrazellulär) – ablagerten. Intakte Lp(a)-Moleküle – mit vollständigem Fett- und Proteinanteil – spielen daher eine potentielle Rolle innerhalb der strukturell



geschädigten Gefäßwände. Diese Ergebnisse bestätigen ähnliche Befunde bei Atherosklerose beim Menschen<sup>4, 20</sup>.

Überdies bietet die einzigartige Struktur des Apo(a)-Moleküls mit seiner Homologie zu Plasminogen einen Vorteil, indem es der Auflösung von Blutgerinnseln (Fibrinolyse) und massivem (hämorrhagischem) Blutverlust entgegenwirkt, was bei drohendem Skorbut eine lebensrettende Eigenschaft sein kann.

Durch Andocken an die Bindungsstellen, die sonst von dem gerinnungsauflösenden Eiweiß Plasmin eingenommen werden, verhindert Apo(a) den Plasminabbau von Fibrin und wirkt einem drohenden Blutverlust entgegen<sup>7</sup>. Die in dieser Studie beobachtete gemeinsame Ablagerung (Co-Lokalisierung) von Lp(a) und Fibrinogen innerhalb der geschädigten Gefäßwände bestätigt diese potentielle Rolle. Außerdem liefert das Lp(a)-Molekül durch seinen LDL-Anteil wichtige Fettmoleküle für die Reparatur und Neubildung von Zellen – eine ebenfalls wichtige Funktion zur Reparatur einer geschwächten Arterienwand.

Das hier vorgestellte neue Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mausmodell bietet die Möglichkeit, die Atherosklerose-Entstehung beim Menschen zu untersuchen, da es besondere Stoffwechsel-Merkmale imitiert, die nur beim Menschen vorkommen. Das zurzeit vorherrschende Modell zur Entstehung der Atherosklerose postuliert einen hohen Blutfettspiegel (Hyperlipidämie)<sup>21</sup> und andere allgemeine (systemische) Risikofaktoren<sup>22, 23</sup> als Voraussetzung für eine Atherosklerose. Logisch gesehen würden diese Modelle allerdings zu einer (generalisierten) Form der Atherosklerose führen, die alle Organe sowie die Gliedmaßen betrifft und daher zwangsläufig zur sogenannten „peripheren Gefäßkrankheit“ führen muss.

Mit dem neuen Mausmodell ist es möglich zu untersuchen, warum die Herz-Kreislauf-Erkrankung beim Menschen vorwiegend lokal auftritt und zwar an Orten mit erhöhtem mechanischen Stress (hämodynamische Belastung).

Darüber hinaus kann anhand dieses Tiermodells auch die Frage untersucht werden, wie es bei Menschen mit normalen Blutfettspiegeln (normolipämischen Patienten) zu Herz-Kreislauf-Krankheiten kommen kann.

Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass die vorliegende Studie wichtige Ereignisse in der Entwicklungsgeschichte (Evolution) des Menschen simuliert. Nach dem Verlust der Fähigkeit, Vitamin C selbst zu synthetisieren, war das Überleben unserer Vorfahren – ja der gesamten menschlichen Spezies – immer wieder durch Skorbut-Epidemien bedroht. Daher hatten diejenigen unter unseren Vorfahren einen Vorteil, die das Reparatur-Molekül Lp(a) in ihren Genen trugen und daher in ihrem Körper selbst produzieren konnten. Mit Hilfe dieses Reparaturmoleküls konnten sie wirksam einem massiven

Blutverlust durch skorbutgeschädigte Blutgefäßwände entgegenwirken. Dagegen verbluteten ihre Artgenossen, die diesen Reparaturfaktor nicht in sich trugen, schon im Kindesalter.

Dieses neue Mausmodell sowie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung ermutigen zur weiteren Erforschung der Rolle von Vitamin C und anderen Ernährungsfaktoren bei der Vorbeugung der Herz-Kreislauf-Erkrankung.

**Danksagungen:** Für die professionelle Durchführung bestimmter Untersuchungen danken wir Phil A. Guadagno und Dr. Rita Ellerbrook (Serumlipoprotein-Elektrophoresen) und IDEXX Reference Laboratories (Gefäßhistopathologie). Earl Rainey danken wir für die hervorragende Fürsorge bei der artgerechten Haltung der Versuchstiere. Die Arbeit wurde finanziert durch die Dr. Rath Health Foundation, einer Nonprofit-Organisation.

**Anmerkung:** Die vorliegende deutsche Übersetzung wurde von einem der Autoren, Dr. Rath, redigiert. Dabei wurde Wert darauf gelegt, dass der Text auch für interessierte Laien verständlich ist. Die erklärenden Textpassagen weichen daher vom englischen Originaltext etwas in der Form – jedoch nicht im Inhalt – ab. Der Abschnitt ‚Material und Methoden‘ blieb unverändert. Der Originaltext der Studie ist online unter [www.ajcd.us/files/ajcd0007056.pdf](http://www.ajcd.us/files/ajcd0007056.pdf) einsehbar.

**Korrespondenzadresse:** Dr. Aleksandra Niedzwiecki, 1260 Memorex Drive, Santa Clara, CA 95050, USA. Tel: +1-408-567-5000; Fax: 408-748-1726; E-Mail: [a.niedz@drath.com](mailto:a.niedz@drath.com)

## Literatur

<sup>1</sup> Dahlen GH, Guyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto Jr. AM. Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 1986; 74: 758-65.

<sup>2</sup> Zenker G, Kolfringer P, Bone G, Niederkorn K, Pfeiffer K, Jurgens G. Lipoprotein(a) as a strong indicator for cerebrovascular disease. *Stroke* 1986; 17: 942-5.

<sup>3</sup> Lawn R.M. Lipoprotein(a) in heart disease. *Sci Am* 1992; 266: 54-60.

<sup>4</sup> Rath M, Niendorf A, Reblin T, Dietel M, Krebber HJ, Beisiegel U. Detection and quantification of lipoprotein(a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 579-92.

<sup>5</sup> Van der Hoek YY, Sangrar W, Cote GP, Kastelein JJ, Koschinsky ML. Binding of recombinant apolipoprotein(a) to extracellular matrix proteins. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1792-8.

<sup>6</sup> Grainger DJ, Kemp PR, Liu AC, Lawn RM, Metcalfe JC. Activation of transforming growth factor- $\beta$  is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 1994; 370: 460-2.

<sup>7</sup> McLean JW, Tomlison JE, Kuang W-J, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330: 132-7.

<sup>8</sup> Brown MS, Goldstein JL. Plasma lipoproteins: teaching old dogmas new tricks. *Nature* 1987; 330: 113-4.

<sup>9</sup> Berg K. A new serum type system in man - the Lp system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963; 59: 369-82.

<sup>10</sup> Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med* 2013; 273: 6-30.

<sup>11</sup> Nishikimi M, Udenfriend S. Immunologic evidence that the gene for L-gulonono-gamma-lactone oxidase is not expressed in animals subject to scurvy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 2066-8.

<sup>12</sup> Rath M, Pauling L. Hypothesis: Lipoprotein(a) is a surrogate for ascorbate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6204-7.

<sup>13</sup> Acquati F, Hammer R, Ercoli B, Mooser V, Tao R, Ronicke V, Michalich A, Chiesa J, Taramelli R, Hobbs HH, Muller H-J. Transgenic mice expressing a human apolipoprotein(a) allele. *J Lipid Res* 1999; 40: 994-1006.

<sup>14</sup> Guadagno PA, Summers-Bellin EG, Harris WS, Day-spring TD, Thiselton DL, Stanovick B, Warnick GR, McConnel JP. Validation of a lipoprotein(a) particle concentration assay by quantitative lipoprotein immunofixation electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2015; 439: 219-24.

<sup>15</sup> Lawn RM, Wade DP, Hammer RE, Chiesa G, Verstuyft JG, Rubin EM. Atherogenesis in transgenic mice expressing human apolipoprotein(a). *Nature* 1992; 360: 670-2.

<sup>16</sup> Rouy D, Duverger N, Lin SD, Emmanuel F, Houdebine L-M, Deneffe P, Vigilietta C, Gong E, Rubin EM, Hughes SP. Apolipoprotein(a) yeast artificial chromosome transgenic rabbits: lipoprotein(a) assembly with human and rabbit apolipoprotein B. *J Biol Chem* 1998; 273: 1247-51.

<sup>17</sup> Pinnell SR. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med* 1985; 58: 553-9.

<sup>18</sup> Gore I, Fujinami T, Shirahama T. Endothelial changes produced by ascorbic acid deficiency in guinea pigs. *Arch Pathol* 1965; 80: 371-6.

<sup>19</sup> Maeda N, Hagihara H, Nakata Y, Hiller S, Wilder J, Reddick R. Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 841-6.

<sup>20</sup> Niendorf A, Rath M, Wolf K, Peters S, Arps H, Beisiegel U, Dietel M. Morphological detection and quantification of lipoprotein(a) deposition in atheromatous lesions of human aorta and coronary arteries. *Virchows Arch Pathol Anat Histopathol* 1990; 417: 105-11.

<sup>21</sup> Brown MS, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci Am* 1984; 251: 58-66.

<sup>22</sup> Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Wit-zum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-24.

<sup>23</sup> Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med* 1986; 314: 488-500.

## Anhang

### Material und Methoden

#### *Haltung der Mäuse*

Alle Tiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen bei einem Tageszyklus von jeweils 12 h Licht / 12 h Dunkelheit in Mikroisolator Käfigen gehalten. Alle Prozeduren wurden unter Einhaltung der erforderlichen Sorgfalt bei der Haltung von Labortieren durchgeführt; dabei wurde ein Protokoll befolgt, das von einem institutionsinternen Komitee zur Überprüfung der Tiersicherheit genehmigt war. Bei Gulo-/- Mäusen, die nicht in der Lage waren, Ascorbinsäure (Vitamin C) selbst zu synthetisieren, wurde diese dem Futter beigefügt. Sofern nicht anders angegeben, wurde Vitamin C in doppelt destilliertem Trinkwasser zur Verfügung gestellt, das 150 mg/l Ascorbinsäure (Sigma) und 0,01 mM EDTA (Sigma) sowie 10 g/l Saccharose enthielt. Das Wasser wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Zusätzlich wurde Vitamin C in Futter verabreicht, das mit 500 ppm l-Ascorbylpoliphosphat angereichert war; es wurde von Test Diet® gemahlen und war erhältlich unter dem Namen Modified Custom Lab Diet #5A38. Während der Studie fraßen die Mäuse pro Tag durchschnittlich 4 g Futter und tranken in diesem Zeitraum 5 ml Wasser.

#### *Erzeugung der human Lp(a)+; Gulo-/- Mäuse*

Als Ausgangsstämme für die Kreuzung zur Erzeugung von BALB/cBy-Gulo-/- Mäusen dienten: der Stamm BALB/cBy-Gulosfx/J, eine Spontanmutation, mapped auf den Gulonolactonoxidase-Locus, ein Gen, das für die Vitamin-C-Synthese benötigt wird. Mäuse vom Stamm Gulo-/- wurden erzeugt aus heterozygoten Gulo+/- Eltern (The Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA). Human Apo(a) Mäuse wurden bezogen von den Mutant Mouse Regional Resource Centers (MMRRC) (Columbia, MO, USA), die von den NIH unterstützt werden. Human Apo B-100 Mäuse wurden von Taconic Farms, Inc. (Hudson, NY, USA) im Rahmen eines Universitäts-Forschungsvertrages bezogen.

Kreuzung zur Erzeugung von Gulo-/-; Lp(a)+ Mäusen: Human Apo(a) und Human ApoB-100 Mäuse mit dem Wildtyp des Gulo-Locus wurden separat zur Erzeugung von Gulo-/-; Mäusen verwendet, um zwei experimentelle parentale Mausstämme zu erzeugen, Gulo-/-; human Apo(a)+ und Gulo-/- human ApoB-100+. Anschließend wurden die neu erzeugten parentalen Mäuse der beiden Stämme gekreuzt, um den neuen Mausstamm zu erzeugen: Gulo-/-; human Apo(a)+; human ApoB-100+, der als „Gulo-/-; Lp(a)+“ Stamm bezeichnet wird.

#### *Genotypisierung*

Die Genotypisierung auf den Gulo-Locus und dessen Homozygotie sowie auf das Vorliegen von huma-

nem ApoB-100 und humanem Apo(a) wurde mittels PCR mit Taqman FAM Probe Real Time-PCR bei Transnetyx (Cordova, TN, USA) anhand von DNA, die mittels Standardtechniken aus Schwanzspitzengewebeproben isoliert worden war, vorgenommen.

#### *Transgenexpression auf der Proteinebene*

ApoB-100-Protein in Mäuseserum wurde mit dem AssayMax Human Apolipoprotein Enzymimmunoassay (Assaypro, St. Charles, MO, USA) bestimmt, der spezifisch für humanes ApoB-100 ist und keine Kreuzreaktionen mit Maus-ApoB oder anderen Apolipoproteinen (Apo AI, Apo C, Apo E) eingeht. Protein Apo(a) in Mäuseserum wurde mit dem Lp(a) Enzymimmunoassay (IBL International GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt, der spezifisch für humanes Apo(a) ist und keine Kreuzreaktionen mit Plasminogen oder LDL eingeht. Damit können alle bekannten Isoformen von Apo(a) nachgewiesen werden. Protein Apo(a) in Serum wurde nachgewiesen in Gulo<sup>-/-</sup> Mäusen, die das Apo(a) Gen enthielten und solchen, die Apo(a)-und humanes ApoB-100-Gen enthielten, nicht aber in Gulo<sup>-/-</sup> Mäusen ohne das Transgen und ebenfalls nicht in Gulo<sup>-/-</sup> Mäusen mit ausschließlich humanem ApoB-100. Diese Ergebnisse bestätigen die Expression und Translation des humanen Transgens Apo(a) zum Serumprotein Apo(a).

Das Protein Apo(a) wurde im Serum männlicher und weiblicher Mäuse vor der Pubertät nachgewiesen. Bei männlichen Mäusen ist nach der Pubertät die Expression des Proteins Apo(a) deutlich, mitunter sogar vollständig unterdrückt, möglicherweise aufgrund der gestiegenen Testosteron-Konzentration. Es wurde bereits zuvor gezeigt, dass die Expression von Apo(a) bei männlichen Mäusen wiederhergestellt werden kann durch Kastration, kontinuierliche Infusion des Wachstumshormons über eine osmotische Pumpe oder durch biochemische Modulation durch chemische, biologische oder in der Nahrung enthaltene Induktoren<sup>13</sup>.

Lp(a)-Partikel sind zusammengesetzt aus humanem Protein Apo(a), das über Disulfidbindungen an humanes ApoB-100 (LDL) gebunden ist. Das Vorhandensein von Lp(a)-Partikeln im Serum transgener Gulo<sup>-/-</sup>; Lp(a)<sup>+</sup> Mäuse wurde elektrophoretisch mittels der Methode von Helena (Beaumont, TX, USA), SPIFE Cholesterin Profiling, nachgewiesen<sup>14</sup>. Bei Anwendung dieser Methode befindet sich die Lp(a)-Cholesterin-Bande in einer spezifischen Migrationsweite zwischen den Banden von LDL-Cholesterin und HDL-Cholesterin. Es kann im Serum von Gulo<sup>-/-</sup> Mäusen, die Lp(a)-Gene enthalten, nachgewiesen werden, nicht aber im Serum von Mäusen des Genotyps Gulo<sup>-/-</sup>, Apo(a)<sup>+</sup>; Gulo<sup>-/-</sup>, oder ApoB-100<sup>+</sup>; Gulo<sup>-/-</sup>, dies bestätigt, dass sowohl humanes ApoB-100 als gleichzeitig Apo(a) dazu nötig sind, dass über Disulfidgruppen gebundenes Lp(a) im Serum vorliegt. Humanes Apo(a) allein kann kein Lp(a) produzieren und bindet nicht an Maus-LDL. Weiterhin führten

die Autoren Immunfixierungsgelelektrophoresen (IFE) mit humanspezifischem anti-Apo(a)- und anti-ApoB-100-Antikörpern im Health Diagnostic Laboratory, Inc. (Richmond, VA, USA) durch. Weitere Ergebnisse zu den Partikeln zusammen mit der Lipoprotein-Cholesterin-Belastung bestätigten umfassend das Vorliegen von Protein Apo(a), humanem ApoB-100-Protein und disulfid-gebundenem Lp(a) in diesen Mäuseseren.

#### *Fütterung mit Vitamin C (Ascorbinsäure)*

Über einen Zeitraum von 12 Wochen erhielten in etwa gleich alte Mäuse Trinkwasser mit zusätzlich 30 mg/l bzw. 60 mg/l Vitamin C und 0,01 mM EDTA sowie 10 g Saccharose/l, aber kein weiteres Vitamin C im Futter, zur Zuführung von etwa 0,15 mg bzw. 0,30 mg Vitamin C pro Tag. Andere in etwa gleich alte Mäuse erhielten 6 Wochen lang normales destilliertes Wasser und unsupplementiertes Futter, sodass diesen Mäusen kein Vitamin C zugeführt wurde. Mäuse, die nicht in der Lage sind, Vitamin C selbst zu synthetisieren, sterben innerhalb von 8 Wochen ohne Vitamin-C-Zufuhr. Eine vollständige Nahrungsergänzung mit 2,75 mg Vitamin C pro Tag wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zum Endpunkt der Studie waren die Tiere durchschnittlich 40 Wochen alt.

#### *Vitamin-C-Bestimmung*

Die Serumkonzentration von Vitamin C wurde mit dem Ferric Reducing Ascorbate Assay (FRASC) Kit (Biovision, Milpitas, CA, USA) in Serum aus Plasma bestimmt. Das entsprechende Blut wurde durch Herzpunktion gewonnen, um arterielles Blut zu erhalten.

#### *Cholesterinbestimmung*

Die Gesamtserumcholesterinkonzentration (mg/dl) wurde bei einzelnen Tieren mit dem Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Colorimetric Kit II (Biovision, Milpitas, CA, USA) bestimmt. Die quantitative Bestimmung der Lipoprotein-Cholesterin-Fraktion (mg/dl) wurde vorgenommen, indem die relativen Fraktionswerte aus den Lipoprotein-Cholesterin-Profilen auf die Gesamtcholesterinkonzentration bezogen wurden.

#### *Triglyceridbestimmung*

Die Triglyceride im Serum wurden mit dem Triglyceride Quantitation Colorimetric/Fluorimetric Kit (Biovision, Milpitas, CA, USA) bestimmt. Triglycerid-Ladung wurde als nicht identisch mit VLDL-Cholesterin-Ladung bzw. VLDL-Masse bzw. Teilchenzahl gewertet.

#### *Bestimmung von ApoB in Mäusen*

Die Konzentration von ApoB in Mäuseserum wurde mit dem mausspezifischen (Mus musculus) ELISA Kit

for Apolipoprotein B (APOB) (Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA) bestimmt. Der Verdünnungsfaktor wurde korrigiert.

#### *Histologische Untersuchungen*

Die Arterien von Mäusen wurden nach Entfernung des Plasmas unter einem Seziernmikroskop in eiskaltem PBS-Puffer geerntet und zurechtgeschnitten. A. brachiocephalia, linke Karotide, A. subclavia sinistra, rechte Karotide und A. subclavia dextra wurden alle gemeinsam an einem Stück mit der Thoraxarterie am Bogen entnommen und in 10 % neutralgepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Frontalschnitte des gesamten Baums durchgeführt, wobei alle Teile in einer Ebene zu liegen kamen. Es wurden Färbungen mit Hämatoxylin und Eosin und Elastica-Van-Gieson durchgeführt (IDEXX, Sacramento, CA, USA). Spezielle Beachtung wurde Proben gewidmet, bei denen eine Abtragung des Endothels, eine Hyperplasie der Intima, subendotheliale Verdickungen, Elastindesorganisation, atherosklerotische Plaques und prä-aneurysmale Strukturen auftraten. Diese Blocks wurden geschnitten und mit üblichen immunhistochemischen Methoden mit positiven und negativen Antikörperkontrollen gefärbt auf human Apo(a), human Apo B-100 und Fibrinogen (Histotox Labs, Inc., Boulder, CO, USA).

#### *Statistische Analysen*

Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben, siehe Ergebnisse. Die Daten wurden mit dem t-Test für unabhängige Proben analysiert.  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert.

## **Glossar**

#### *Transgene Mäuse*

Mäuse, deren Erbgut (Gene) künstlich verändert wurde – in diesem Fall, um sie in zwei entscheidenden Merkmalen dem menschlichen Stoffwechsel anzupassen.

#### *Atherosklerotische Ablagerung*

Unter Arteriosklerose versteht man die Verdickung der Arterienwand, die vor allem durch die Ablagerungen von Fetten, Gerinnungseiweißen und anderen Blutbestandteilen sowie durch Zellwucherungen innerhalb der Arterienwand charakterisiert ist. Ihre häufigste Ursache ist chronischer Nährstoffmangel.

#### *Extrazelluläre Matrix*

Die extrazelluläre Matrix (Extrazellulärmatrix, Interzellulärsubstanz, EZM, engl. extracellular matrix, ECM) ist der nicht-zelluläre Anteil des Gewebes. Er besteht vor allem aus Kollagen, Elastin und anderen Bindegewebsmolekülen.

#### *Fibronektin*

Fibronektin ist ein Glykoprotein (verzuckertes Eiweiß) der extrazellulären Matrix, das in vielen physiologischen Abläufen, unter anderem bei der Gewebsreparatur sowie der Zellwanderung eine wichtige Rolle spielt.

#### *Laminin*

Die Laminine sind kollagenähnliche Glykoproteine und ein Bestandteil der extrazellulären Matrix.

#### *Plasminogen*

Plasminogen wird als Vorstufe von Plasmin von der Leber synthetisiert und in die Blutbahn ausgeschüttet. Die Hauptaufgabe des Plasmins ist die Fibrin-spaltung, also die Auflösung von Blutgerinnseln. Man kann Plasmin als die Fibrin-Schere im Gerinnungssystem bezeichnen.

#### *Fibrin/Fibrinogen/Fibrinolyse*

Das Fibrinogen ist ein Protein, das in der Leber gebildet und ins Blutplasma ausgeschüttet wird. Fibrinogen wird bei der Blutgerinnung in Fibrin umgewandelt, das zusammen mit zellulären Elementen des Blutes, namentlich den Thrombozyten, den Thrombus bildet. Fibrinolyse (Fibrin-spaltung) ist die Bezeichnung für die körpereigene Auflösung eines Blutgerinnsels (Thrombus) durch das Enzym Plasmin.

#### *Thrombose*

Eine Thrombose ist eine Gefäßerkrankung, bei der sich ein Blutgerinnsel (Thrombus) in einem Blutgefäß, in der Regel einer Vene, bildet. Gerinnungsvorgänge finden jedoch überall statt, z.B. auch im Extrazellulärraum der Blutgefäßwände.

#### *Hämorrhagische Blutung*

Massive Blutungen im Körper eines Patienten, die nicht selten zum Tod durch Verbluten führen.