

Lehrstuhl für Translationale Kardio-Renale Medizin
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes
Univ.-Prof. Dr. Dr. Thimoteus Speer

Guanidinyliertes Apolipoprotein C3 verursacht vaskuläre und renale Schädigung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes
2022

Tamim Sarakpi

Geboren am 09. November 1995 in Meißen

Vorbemerkung

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form einer Originalarbeit publiziert (SCHUNK et al., 2021a). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer und Dr. med. Stefan J. Schunk betreut. Der Text und die Abbildungen dieser Dissertationsschrift sind daher in weiten Teilen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeiten.

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird anstatt ‚Patient*innen‘ in dieser Arbeit der Begriff ‚Patienten‘ verwendet.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	12
2. Abstract	14
3. Einleitung.....	15
3.1 Chronische Nierenerkrankung.....	15
3.1.1 Definition.....	15
3.1.2 Epidemiologie	16
3.1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen	16
3.1.4 Kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	17
3.2 Urämische Dyslipidämie.....	18
3.2.1 Charakteristika/Definition	18
3.2.2 High-density Lipoprotein (HDL)	19
3.2.3 Low-density-Lipoprotein	19
3.2.4 Triglyceride	20
3.3 Triglycerid-reiche Lipoproteine	21
3.3.1 Triglycerid-Stoffwechsel allgemein und bei chronischer Nierenerkrankung	21
3.3.2 Apolipoprotein C3 (ApoC3)	22
3.3.2.1 Effekte von ApoC3 auf den Triglyceridstoffwechsel	22
3.3.2.2 Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch ApoC3.....	23
3.3.3 Posttranslationale Lipoproteinmodifikationen	24
3.3.3.1 Oxidierung.....	24
3.3.3.2 Carbamylierung.....	25
3.4 Fragestellung	25
4. Methoden.....	27
4.1 Materialien	27
4.1.1 Antikörper	27
4.1.2 Experimentelle Modelle: Zelllinien	27
4.1.3 Kommerzielle Assays und Kits	27
4.1.4 Experimentelle Modelle: Organismen/Stämme	28
4.1.5 Medien, Lösungen, Puffer	28
4.1.6 Geräte.....	29
4.1.7 Software	30
4.1.8 Chemikalien und sonstige Reagenzien	30
4.1.9 Verbrauchsmaterialien	32
4.2 Mäuse	33
4.3 Zelllinien.....	33
4.4 CARE FOR HOME Studie	33
4.5 Massenspektrometrie und Proteomanalyse	34

4.6	<i>Ex vivo</i> Guanidinylierung von ApoC3	34
4.7	Zweidimensionale Proteomanalyse von Gewebe	35
4.8	Isolation von Monocyten	35
4.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	37
4.10	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	38
4.11	Fluoreszenzmarkierung von ApoC3 unter Verwendung von Atto-488	39
4.12	Konfokalmikroskopie	39
4.13	Durchflusszytometrie	40
4.14	Histologie und Immunfluoreszenz	41
4.14.1	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	41
4.14.2	Sirius-Rot Färbung	43
4.14.3	Immunfluoreszenz-Färbung	43
4.15	Niereninsuffizienzmodell mittels Adenindiät bei Mäusen	45
4.16	Humanisierte Mäuse	46
4.17	Carotisschädigungsmodell bei Mäusen	47
4.18	Unilaterales Ureterschädigungsmodell bei Mäusen	47
4.19	Quantifizierung und statistische Analyse	48
5.	Ergebnisse	49
5.1	Identifikation von posttranslationaler Guanidinylierung von ApoC3	49
5.2	Entstehung der Guanidinylierung	50
5.3	CKD induziert die Guanidinylierung von ApoC3 <i>In Vivo</i>	52
5.4	Guanidinyliertes ApoC3 induziert Inflammation	54
5.5	Guanidinyliertes ApoC3 hemmt die vaskuläre Regeneration und fördert Nierenschädigung bei humanisierten Mäusen	58
5.6	Guanidinyliertes ApoC3 ist mit kardiovaskulären und renalen Ereignissen assoziiert	61
5.6.1	Assoziation zwischen gApoC3 und kardiovaskulären Risikofaktoren	64
5.6.2	Assoziation zwischen gApoC3 und Lipoprotein-Konzentrationen bzw. Inflammationsmarkern	65
5.6.3	Assoziation zwischen gApoC3 und kardiovaskulären und renalen Endpunkten.	67
5.6.4	Zusammenhang zwischen gApoC3 Intensität und Trajekturen der eGFR	69
6.	Diskussion	72
6.1	Triglyceride und ApoC3 bei kardiovaskulären Erkrankungen	72
6.1.1	Epidemiologische Evidenz	72
6.1.2	Genetische Evidenz	74
6.1.3	Experimentelle Evidenz	75
6.2	Alternative Inflammationaktivierung durch ApoC3	76
6.3	Posttranslationale Modifikationen bei CKD	77
6.4	Posttranslationale Modifikation von Lipoproteinen	78

6.4.1	Oxidierung	78
6.4.2	Carbamylierung	79
6.4.3	Guanidinylierung	80
6.5	Therapeutische Modulation der Triglyceride und ApoC3	80
6.5.1	Fibrate	81
6.5.2	Niacin.....	82
6.5.3	Omega-3-Fettsäuren.....	82
6.5.4	Antisense Nukleotide	83
6.6	Limitationen der Studie	84
6.7	Ausblick	85
6.7.1	Therapeutische Modulation posttranslationaler Modifikation	85
6.7.2	Anti-inflammatorische Therapieansätze	85
6.7.3	Zusammenfassung	86
7.	Lebenslauf	87
7.1	Persönliche Daten.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7.2	Beruflicher Werdegang	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7.3	Schulbildung, Ausbildung/Studium.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.	Publikationen	88
9.	Literaturverzeichnis.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	- Darstellung des Metabolismus von Triglycerid-reichen Lipoproteinen.	22
Abbildung 2	- Schematische Darstellung der Zellen vor und nach Zentrifugation.	36
Abbildung 3	- Relative Massen-Signal Intensitäten von nativem ApoC3, ApoC3 von Gesunden und ApoC3 von CKD-Patienten.	49
Abbildung 4	- Relative gApoC3 Massen-Signal Intensitäten von 543 CKD Patienten.	50
Abbildung 5	- 3-dimensionale Darstellung der Struktur von humanen ApoC3.	50
Abbildung 6	- Relative Massen-Signal Intensitäten von ApoC3 nach Inkubation von Plasma mit Methylisoharnstoff, Guanidin oder Harnstoff.	51
Abbildung 7	- Chemische Reaktion bei der Entstehung von guanidinyliertem Lysin.	51
Abbildung 8	- Relative Intensität des Massen-Signals von gApoC3 nach Inkubation von ApoC3.	52
Abbildung 9	- Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs - Adenindiät.	52
Abbildung 10	- Serumkreatinin bzw. Serumharnstoff nach 2 Wochen Standarddiät oder Adenindiät.	53
Abbildung 11	- Repräsentative Darstellung von 2-dimensionalen Proteomanalysen.	53
Abbildung 12	- Anzahl von guanidinylierten Lysinresten in ApoC3 im Plasma von Mäusen nach Standard-Diät oder Adenin-Diät.	54
Abbildung 13	- Bestimmung von IL-1 β bzw. IL-6 nach Stimulation von humanen Monocyten.	55
Abbildung 14	- Bestimmung der Superoxid-Produktion nach Stimulation von humanen Monocyten.	55
Abbildung 15	- Repräsentative Darstellung nach durchflusszytometrischer Analyse von Monocyten nach Inkubation mit Atto-488-nApoC3/ Atto-488-gApoC3.	56
Abbildung 16	- Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von transfizierten HEK-Zellen nach Inkubation mit Atto-488-nApoC3/ Atto-488- gApoC3.	57
Abbildung 17	- Repräsentative Darstellung konfokalmikroskopischer Aufnahmen humaner Monocyten nach Inkubation mit Atto-488-nApoC3 / Atto-488-gApoC3.	57
Abbildung 18	- Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs des perivaskulären Carotisschädigungsmodells in humanisierten Mäusen.	58
Abbildung 19	- Re-endothelialisiertes Areal eine Woche nach perivaskulärer Carotisschädigung bei humanisierten NOD-SCID Mäusen nach Injektion von nApoC3 / gApoC3.	59
Abbildung 20	- Schematische Darstellung des Ablaufs einer unilateralen Ureterligatur in humanisierten NOD-SCID-Mäusen mit Injektion von PBS/ApoC3.	59
Abbildung 21	- Sirius-rot Färbung von histologischen Nierengewebsschnitten nach Durchführung einer UUO in humanisierten NOD-SCID Mäusen und Injektion von nApoC3 / gApoC3.	60
Abbildung 22	- Nierengewebsschnitte nach Durchführung einer UUO in humanisierten NOD-SCID Mäusen und Injektion von nApoC3 / gApoC3.	61
Abbildung 23	- Schematische Darstellung der Teilnehmer der CARE FOR HOME Studie.	62
Abbildung 24	- Darstellung der gApoC3 Intensität in verschiedenen Subgruppen.	65
Abbildung 25	- Darstellung der Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL-C, HDL-C, Triglyceriden, ApoC3, hsCRP und Serum Amyloid A in Abhängigkeit der in Tertiale eingeteilten gApoC3 Intensität.	66
Abbildung 26	- Assoziation zwischen dem Risiko für den kombinierten kardiovaskulären Endpunkt und der gApoC3 Massen-Signal Intensität der 543 CKD Patienten der CARE FOR HOME Studie.	67

Abbildung 27 - Assoziation zwischen dem Mortalitätsrisiko und der gApoC3 Massen-Signal Intensität der 543 CKD Patienten der CARE FOR HOME Studie.....	68
Abbildung 28 - Assoziation zwischen dem Risiko für den kombinierten renalen Endpunkt und der gApoC3 Massen-Signal Intensität der 543 CKD Patienten der CARE FOR HOME Studie.	68
Abbildung 29 - Darstellung der prozentualen Änderung der eGFR im Rahmen der Nachbeobachtung der 543 Patienten aus der CARE FOR HOME Studie. ..	69
Abbildung 30 - Assoziation von gApoC3 Massen-Signal Intensität und der Veränderung der eGFR in Trajekturen-Gruppen.....	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	- Kriterien zur Einteilung einer chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO	16
Tabelle 2	- Klassischen und CKD-spezifische kardiovaskuläre Risikofaktoren.	18
Tabelle 3	- Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundäntikörper.....	27
Tabelle 4	- Auflistung der verwendeten Zelllinien.	27
Tabelle 5	- Auflistung der verwendeten kommerziellen Assays und Kits.	27
Tabelle 6	- Auflistung der verwendeten Mausstämme.....	28
Tabelle 7	- Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen, Puffer.....	29
Tabelle 8	- Auflistung der verwendeten Geräte.	30
Tabelle 9	- Auflistung der verwendeten Software.	30
Tabelle 10	- Auflistung der verwendeten Chemikalien und sonstige Reagenzien.	32
Tabelle 11	- Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	32
Tabelle 12	- Abfolge der Färbung von ApoC3 inkubierten humanen Monocyten.	40
Tabelle 13	- Zusammenfassung der verwendeten Färbungen	41
Tabelle 14	- Entparaffinierung und Rehydratation der Präparate.	42
Tabelle 15	- Entwässerung und Fixierung der Präparate.	42
Tabelle 16	- Reihe zur Färbung, Entwässerung, Fixierung der Präparate.	43
Tabelle 17	- Immunfluoreszenz-Färbung Tag 1.....	44
Tabelle 18	- Immunfluoreszenz-Färbung Tag 2.....	45
Tabelle 20	- Multinominale logistische Regressionsanalyse der Assoziation zwischen den Tertialen der gApoC3 Intensität und den Trajektoren -Gruppen	71

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG-1	ATP-binding cassette sub-family G member 1
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AD	Adenin-Diät
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AMI	Akuter Myokardinfarkt
ApoA1	Apolipoprotein A-I
ApoB	Apolipoprotein B
ApoC2	Apolipoprotein C-II
ApoC3	Apolipoprotein C-III
ApoE	Apolipoprotein E
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD (caspase activation and recruitment domain)
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass Index
CD	Cluster of Differentiation
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CKD	Chronische Nierenerkrankung
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin
(hs)CRP	(hoch sensitives) C-reaktives Protein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DETC	Diethyldithiocarbamat
DKK3	Dickkopf-3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-TM7	Epidermal growth factor-seven transmembrane
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERN	Extended release niacin
ESR	Elektronenspin-Resonanz
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetales Kälberserum

gApoC3	guanidinyliertes Apolipoprotein C-III
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HDL	High density Lipoprotein
HDL-C	Cholesterinanteil von HDL
HEPES-Puffer	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer
HRP	Meerrettichperoxidase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL	Interleukin
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KHB	Krebs-HEPES Puffer
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left anterior descending artery
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low density Lipoprotein
LDL-C	Cholesterinanteil von LDL
LOX-1	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptor 1
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharide
MPO	Myeloperoxidase
NLRP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
nApoC3	natives Apolipoprotein C-III
NLR	NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptor
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Notch3	Neurogenic locus notch homolog protein 3
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCSK9	Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PLTP	Phospholipid-Transferprotein

PON-1	Paraoxonase-1
PRR	Pattern recognition receptor
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SAA	Serumamyloid A
SCN ⁻	Thiocyanat-Ion
SD	Standard-Diät
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SEM	Standard error of the mean
sER	Glattes endoplasmatisches Retikulum
SHARP	Study of Heart and Renal Protection
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNB	Tris-NaCl-blocking buffer
VLDL	Very-low density Lipoprotein
WT	Wildtyp
YB-1	Y box binding protein 1

1. Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankungen und kardiovaskuläre Erkrankungen zählen in der westlichen Bevölkerung zu den häufigsten Todesursachen und sind in der Allgemeinbevölkerung weit verbreitet. Die Erforschung der pathophysiologischen Grundlagen der Entstehung und der Progression von chronischen Nierenerkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere im Zusammenhang mit Inflammation, sind von großem Interesse. In bisherigen Publikationen konnte gezeigt werden, dass Apolipoprotein C-III einen alternativen Signalweg des NLR family pyrin domain containing 3 Inflammasoms in humanen Monocyten aktiviert und dadurch sterile Inflammation induziert. Des Weiteren konnte in verschiedenen Vorpublikationen die Relevanz von posttranslationalen Modifikationen als wesentlichen Faktor bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen und der Entstehung von Inflammation gezeigt werden.

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob auch Apolipoprotein C-III posttranslationale Proteinmodifikationen aufweist und wie diese dessen (patho)physiologische Effekte modulieren.

Wir konnten mithilfe der Massenspektroskopie eine posttranslationale Guanidinylierung von Lysinresten des Apolipoproteins C-III bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung nachweisen. Die Guanidinylierung von Apolipoprotein C-III verstärkt seine proinflammatorischen Effekte signifikant. Diesen Befund konnten wir nicht nur in Zellkultur *in vitro* nachweisen, sondern auch *in vivo* mithilfe von relevanten tierexperimentellen Krankheitsmodellen evaluieren. In etablierten Nieren- und Herzschädigungsmodellen konnten wir zeigen, dass guanidinyliertes Apolipoprotein C-III bei Organschädigung in der Niere akkumuliert. Außerdem konnten wir in humanisierten Mäusen in einem vaskulären Schädigungsmodell und einem Nierenfibrosemodell zeigen, dass guanidinyliertes Apolipoprotein C-III die vaskuläre Regeneration hemmt und Nierenschädigung aggraviert. Letztlich konnte die klinische Relevanz der experimentellen Entdeckungen in der prospektiven klinischen CARE FOR HOME-Studie bei 543 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung bestätigt werden. Es bestand eine signifikante Assoziation zwischen der massenspektroskopisch gemessenen Intensität an guanidinyliertem Apolipoprotein C-III und dem Erreichen von kardiovaskulären und renalen Endpunkten sowie dem Mortalitätsrisiko der Patienten.

Zusammenfassend zeigt die Studie in der posttranslationalen Guanidinylierung von Apolipoprotein C-III einen proinflammatorischen Prozess von klinischer Relevanz, der bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung auftritt. Guanidinyliertes Apolipoprotein C-III stellt dabei nicht nur einen potentiellen diagnostischen Biomarker zur Evaluation der

Prognose von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und kardiovaskulären Erkrankungen dar, sondern ist durch seine proinflammatorische Wirkung mit Aggravierung einer Organschädigung, auch ein potentiell therapeutisches Target in der Behandlung von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung.

2. Abstract

Chronic kidney disease and cardiovascular disease are among the leading causes of death in the Western populations and are highly prevalent in the general population. Studying the pathophysiological events in the development and progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease, particularly in the context of inflammation, is of great interest. Previous publications have shown that apolipoprotein C-III activates an alternative signalling pathway of the NLR family pyrin domain containing 3 inflammasome in human monocytes and, thereby, induces sterile inflammation. Furthermore, several previous publications have demonstrated the relevance of post-translational protein modifications as a major factor in various pathophysiological processes and the development of inflammation.

The aim of the present study was to screen apolipoprotein C-III for the presence of posttranslational protein modifications and to study on how they modulate its (patho)physiological effects.

Using mass spectroscopy, we identified posttranslational guanidinylation of lysine residues of apolipoprotein C-III in patients with chronic kidney disease. We have demonstrated that guanidinylation of apolipoprotein C-III significantly potentiates its proinflammatory effects *in vitro* in cell culture experiments as well *in vivo* using relevant murine disease models. In established kidney and heart injury models, we demonstrated that guanidylated apolipoprotein C-III accumulates within kidney upon organ injury. Furthermore, using humanized mice in a vascular injury model and a model for kidney fibrosis, we demonstrated that guanidylated apolipoprotein C-III inhibits vascular regeneration and aggravates renal injury. Finally, the clinical relevance of the experimental findings was confirmed in the prospective CARE FOR HOME clinical trial including 543 patients with chronic kidney disease. There was a significant association between the mass spectroscopically measured intensity of guanidylated apolipoprotein C-III and the occurrence of cardiovascular and renal endpoints, as well as the risk of mortality in chronic kidney disease patients.

In conclusion, this study reveals that posttranslationally guanidylated apolipoprotein C-III triggers proinflammatory effects of clinical relevance occurring in patients with chronic kidney disease. Guanidylated apolipoprotein C-III does not only represent a diagnostic biomarker for the evaluation of the prognosis of patients with chronic kidney disease, but also a potential therapeutic target for the treatment of patients with chronic kidney disease.

3. Einleitung

3.1 Chronische Nierenerkrankung

3.1.1 Definition

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist durch das Vorhandensein einer pathologischen Veränderung der Struktur und/oder Funktion der Nieren über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten definiert. Hierbei stellt bisher die glomeruläre Filtrationsrate den besten Parameter zur Abschätzung der Nierenfunktion dar. Basierend auf den Leitlinien der KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) ist eine chronische Nierenerkrankung als ein persistierender Abfall der glomerulären Filtrationsrate unter eine eGFR von 60 ml/min/1,73m² und/oder eine Erhöhung der Albuminurie über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten definiert (KDIGO, 2012). Weitere Marker für eine chronische Nierenerkrankung sind ein abnormales Urinsediment, tubulär bedingte Elektrolytstörungen oder krankheitsrelevante histologische Veränderungen. Zur Einteilung der chronischen Nierenerkrankung nach dem Schweregrad der Erkrankung und der damit assoziierten Mortalität werden die glomeruläre Filtrationsrate sowie die Ausprägung der Albuminurie verwendet. Hierdurch erfolgt die Einteilung in Stadium G1-G5 bzw. A1-A3 (**Tabelle 1**), wobei im Stadium 5 eine terminale Nierenerkrankung vorliegt. In diesem Stadium ist die exkretorische, endokrine und metabolische Nierenfunktion nicht mehr ausreichend, um eine adäquate Regulation des Körpers zu gewährleisten.

Zu den Hauptursachen der chronischen Nierenerkrankung zählen - insbesondere in Ländern mit einem hohen und mittleren Einkommen – der Diabetes mellitus Typ II und die arterielle Hypertonie. Eine weitere Ursache für die Entstehung und Progression einer chronischen Nierenerkrankung stellen Glomerulonephritiden dar. Diese sind bei jungen Menschen die häufigste Ursache für das Auftreten einer chronischen Nierenerkrankung (G.B.D.CKD COLLABORATORS, 2020; KALANTAR-ZADEH et al., 2021; WEBSTER et al., 2017; XIE et al., 2018).

eGFR Kategorien			Albuminurie Kategorien		
Stadium	Beschreibung	eGFR (ml/min/1,73m ²)	Stadium	Beschreibung	Albuminurie (mg/g Kreatinin)
G1	Normal/hoch	≥90	A1	Normal bis gering erhöht	<30
G2	Gering erniedrigt	60-89	A2	Moderat erhöht	30-300
G3a	Gering bis moderat	45-59	A3	Stark erhöht	>300

	erniedrigt			
G3b	Moderat bis stark erniedrigt	30-44		
G4	Stark erniedrigt	15-29		
G5	Nierenversagen	<15		

Tabelle 1 - Kriterien zur Einteilung einer chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO-Leitlinien(KDIGO, 2012).

3.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung steigt seit Jahren weltweit an. In den Jahren 2007-2017 kam es zu einer Zunahme der Prävalenz um etwa 25 %. Damit leidet insbesondere in Ländern mit mittlerem bis hohem Einkommen jeder zehnte Mensch unter einer chronischen Nierenerkrankung. Dies spiegelt sich auch in den weltweiten Todesfällen durch die chronische Nierenerkrankung wider. Im Jahr 2012 waren schätzungsweise 864.226 der weltweiten Todesfälle (bzw. 1,5% der weltweiten Todesfälle) der chronischen Nierenerkrankung zuzuordnen (G.B.D.CKD COLLABORATORS, 2020). Basierend auf Schätzungen der WHO verstarben im Jahr 2016 1.180.000 Menschen an einer Erkrankung der Nieren, die überwiegende Mehrheit dieser Todesfälle entfiel auf chronische Nierenerkrankungen. Damit stellen Nierenerkrankungen die zwölft häufigste Todesursache weltweit dar, wobei die Prävalenz weiterhin ansteigt (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Menschen mit einer chronischen Nierenerkrankung haben ein deutlich erhöhtes Risiko für einen vorzeitigen Tod. Dieses Risiko liegt etwa 10-mal so hoch wie das Risiko des Fortschreitens der Erkrankung zur terminalen Nierenerkrankung mit daraus resultierender Dialysepflichtigkeit. Das Mortalitätsrisiko steigt dabei mit abnehmender Nierenfunktion exponentiell an und ist zu einem großen Anteil mit dem Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse verbunden (G.B.D.CKD COLLABORATORS, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018, 2021). Auch die Anzahl an dialysepflichtigen Patienten in Deutschland steigt seit Jahren stetig an. Dabei benötigen jedes Jahr etwa 5000 neue Patienten eine permanente Nierenersatztherapie. Im Jahr 2016 gab es in Deutschland etwa 81.000 Dialysepatienten (GIRNDT et al., 2016; STATISTISCHES BUNDESAMT, 2021).

3.1.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Unter kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) werden verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, welche das Gefäßsystem und/oder das Herz betreffen oder davon ausgehen. Das Spektrum der kardiovaskulären Erkrankungen beinhaltet die koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Herzinsuffizienz, valvuläre Herzerkrankungen und Arrhythmien. Basierend auf den Erhebungen der WHO stellte die ischämische Herzerkrankung im Jahr 2016 mit 16,6% die mit Abstand häufigste

Todesursache dar (G.B.D.CKD COLLABORATORS, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018, 2021). Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eng mit chronischen Nierenerkrankungen assoziiert, dabei stellen chronische Nierenerkrankungen einen der stärksten Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen dar. Dieser Zusammenhang ist hoch komplex und bisher nicht vollumfassend verstanden, basiert jedoch nicht alleine auf klassischen, gemeinsamen Risikofaktoren. Die chronische Nierenerkrankung stellt einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Ein Großteil der Todesfälle durch die chronische Nierenerkrankung ist durch kardiovaskuläre Ereignisse bedingt (G.B.D.CKD COLLABORATORS, 2020; KALANTAR-ZADEH et al., 2021; NORDESTGAARD et al., 2007). Die kardiovaskuläre Mortalität von Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung nimmt mit Fortschreiten der Erkrankung exponentiell zu. So weisen Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung im Stadium 3 bereits ein doppelt so hohes Mortalitätsrisiko, in Stadium 4 bereits ein dreimal so hohes Risiko verglichen mit der Normalbevölkerung. Dies führt zu einer ausgeprägten Reduktion der Lebenserwartung von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung. Ein 30 Jahre alter Patient mit einer chronischen Nierenerkrankung im Stadium 3B, 4 bzw. 5 weist eine Reduktion der Lebenserwartung von 17, 25 bzw. 29 Jahren im Vergleich zu gleichaltrigen Personen mit normaler Nierenfunktion auf (GANSEVOORT et al., 2013; GIRNDT et al., 2016).

3.1.4 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Dem Spektrum der kardiovaskulären Erkrankungen liegt eine Vielzahl an traditionellen Risikofaktoren zugrunde (**Tabelle 2**). Dazu zählen klassischerweise Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus, Rauchen, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, familiäre Disposition und Bewegungsmangel. Diese traditionellen Risikofaktoren können durch das Vorhandensein einer chronischen Nierenerkrankung beeinflusst werden. Als Beispiel können Nierenerkrankungen nicht nur durch arterielle Hypertonie ausgelöst werden, sondern diese auch verursachen. Es zeigte sich zudem in einer Studie, dass das kardiovaskuläre Risiko durch Hypertonie bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung deutlich stärker ansteigt, als bei solchen mit einer normalen Nierenfunktion (GANSEVOORT et al., 2013). Des Weiteren zeigt sich, dass eine koronare Herzkrankheit bei einer chronischen Nierenerkrankung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit mehrere und insbesondere kleinere Gefäße betrifft und dabei mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für koronare Mikro- und Makrokalzifikationen einhergeht (SPEER et al., 2021). Die kardiovaskulären Risikofaktoren stellen gleichzeitig auch Risikofaktoren für die Entstehung und Progression einer chronischen Nierenerkrankung dar. Jedoch zeigt sich, dass auch nach Adjustierung für die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, die chronische Nierenerkrankung einen relevanten, unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt. Hierbei spielen einige nicht

traditionelle, nierenspezifische Mechanismen eine entscheidende Rolle. Hierzu zählen die Art der Nierenerkrankung, Proteinurie, Anämie, Überwässerung, Störungen im Calcium- und Phosphathaushalt, oxidativer Stress, Inflammation, endotheliale Dysfunktion, thrombogene Faktoren, Urämietoxine, Elektrolytstörungen und urämische Dyslipidämie (SPEER et al., 2021).

Klassische (traditionelle) Risikofaktoren	CKD-spezifische (nicht-traditionelle) Risikofaktoren
Alter	Art der Nierenerkrankung
Geschlecht	Proteinurie
Diabetes mellitus	Anämie
Rauchen	Überwässerung
Arterielle Hypertonie	Abnormaler Calcium-Phosphathaushalt
Hypercholesterinämie	Oxidativer Stress
Familiäre Disposition	Inflammation
Bewegungsmangel	Endotheliale Dysfunktion
	Thrombogene Faktoren
	Urämietoxine
	Elektrolytstörungen
	Urämische Dyslipidämie

Tabelle 2 – Gegenüberstellung von klassischen (traditionellen) und CKD-spezifischen (nicht traditionellen) kardiovaskulären Risikofaktoren.

3.2 Urämische Dyslipidämie

3.2.1 Charakteristika/Definition

Die urämische Dyslipidämie fasst vielfältige Störungen des Lipidstoffwechsels bei chronischer Nierenerkrankung zusammen. Dabei beschreibt sie ein spezifisches Muster von Lipoproteinen bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung. Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung weisen klassischerweise normale LDL-C Plasmaspiegel bei reduzierten HDL-C Plasmaspiegeln sowie hohe Plasmaspiegel von Triglyceriden und Lipoprotein(a) auf. Der Metabolismus, die Struktur und die Funktion der Lipoproteine sind bei diesen Patienten entscheidend verändert. Durch die veränderte Struktur spielen die Lipoproteine eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der chronischen Nierenerkrankung und insbesondere bei den damit assoziierten pathophysiologischen Prozessen in der Entstehung von Niereninsuffizienz-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen. Die urämische Dyslipidämie lässt sich klar von der Dyslipidämie bei nephrotischem Syndrom

abgrenzen. Letztere geht mit erhöhten LDL-C- und Triglyceridplasmaspiegeln bei normalen HDL-C Plasmaspiegeln einher (SPEER et al., 2021).

3.2.2 High-density Lipoprotein (HDL)

HDL-Partikel stellen eine heterogene Klasse an Lipoproteinen dar, welche eine komplexe Lipid- und Proteinzusammensetzung besitzen. Im Fettstoffwechsel spielen sie eine Rolle bei dem Rücktransport von Cholesterin aus dem peripheren Gewebe zur Leber. Dies erfolgt entweder direkt oder indirekt durch eine Übertragung auf LDL. Des Weiteren findet eine direkte Interaktion zwischen HDL und verschiedenen Zellentypen statt, insbesondere mit Endothelzellen zur Erhaltung der endothelialen Integrität und Funktion (SPEER et al., 2021). Man unterscheidet zwischen dem HDL-Cholesterin (HDL-C), was in der klinischen Routine bestimmt wird, und den ganzen HDL-Partikeln. Apolipoprotein A-I stellt das Hauptstrukturprotein der HDL-Partikel dar. HDL dient als Transporter für Cholesterin. Dabei interagiert es direkt mit Hepatocyten, um eine Aufnahme von Cholesterin in die Hepatocyten zu induzieren. Die Struktur des HDLs von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung unterscheidet sich von dem Nierengesunder. Insbesondere kommt es durch die Veränderung des Proteoms von HDL zur Über- bzw. Unterexpression von verschiedenen Enzymen und damit zu einem veränderten Metabolismus (LAUFS et al., 2020; SPEER et al., 2021). In der Dallas Heart Studie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Kapazität von HDL für den Cholesterin-Rücktransport mit dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und der Gesamtmortalität assoziiert ist. Zudem wurde nachgewiesen, dass es bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zu einer erhöhten Konzentration von SAA im HDL Partikel kommt, was dessen Effekte auf das vaskuläre System moduliert (ZEWINGER et al., 2015). Außerdem akkumuliert symmetrisches Dimethylarginin im HDL Nierenerkrankter, was dessen vasoprotektive Eigenschaften beeinflusst (SPEER et al., 2013). Zusammenfassend ist die Niereninsuffizienz-abhängige Veränderung von HDL mit einem veränderten Proteom und dem Verlust der vasoprotektiven Funktion von HDL und damit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, koronarer Herzkrankheit und einer erhöhten Mortalität assoziiert (VICTOR et al., 2004; ZEWINGER et al., 2015; ZEWINGER et al., 2017a).

3.2.3 Low-density-Lipoprotein

LDL dient dem Transport von Cholesterin aus der Leber in das periphere Gewebe. Dabei besteht es aus Cholesterin, Proteinen und Phospholipiden. Es wird in der Leber beim Abbau von VLDL synthetisiert. Apolipoprotein B stellt das Hauptstrukturprotein von LDL dar. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung liegen die LDL-C-Plasmaspiegel meist im

normalen Bereich. Allerdings ist die Struktur und damit der Metabolismus von LDL bei diesen Patienten verändert. In der Allgemeinbevölkerung stellen erhöhte LDL-C-Plasmaspiegel einen unabhängigen Risikofaktor für Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen dar (CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS et al., 2012). Während experimentelle Ansätze eine pathophysiologische Rolle von modifiziertem LDL bei Niereninsuffizienz-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen und Mortalität zeigen, ist dieser Effekt bei Patienten mit niedriger GFR deutlich weniger ausgeprägt als erwartet (TONELLI et al., 2013). Terminale Nierenerkrankungen gehen unter anderem durch Urämietoxine, Elektrolytverschiebungen und Hypervolämie mit einem deutlich erhöhten Risiko für Herzversagen und plötzlichen Herztod durch Arrhythmien einher. In der SHARP-Studie konnte eine Assoziation zwischen erhöhten LDL-C-Spiegeln und kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gezeigt werden. Jedoch stellte sich weder eine Assoziation zwischen der Senkung von LDL-C mit dem Progress einer chronischen Nierenerkrankung, noch einem besseren Outcome durch die Gabe von Simvastatin/Ezetimib dar (HAYNES et al., 2014). Interessanterweise war jedoch in einer aktuellen Studie mit über 600.000 Teilnehmern hohes LDL-C mit einem erhöhten Risiko für CKD assoziiert (EMANUELSSON et al., 2019). Bei chronischer Nierenerkrankung konnten verschiedene Veränderungen der Lipidzusammensetzung von LDL nachgewiesen werden, es konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung überwiegend zur Bildung von LDL-Partikeln mit niedrigerer Dichte kommt. Aufgrund ihrer gesteigerten Fähigkeit zur Infiltration der arteriellen Intima, wird bei diesen Partikeln eine erhöhte Atherogenität vermutet (BOWDEN et al., 2011) (GARDNER et al., 1996).

3.2.4 Triglyceride

Triglyceride bestehen aus einem Glycerin-Molekül, das mit drei Fettsäuren verbunden ist. Die Hypertriglyceridämie ist nicht nur eine häufige Ursache für Pankreatitiden, sie spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen. Dabei liegt die Prävalenz einer milden bis moderaten Hypertriglyceridämie in der Bevölkerung etwa bei 10% der Erwachsenen. Die Prävalenz einer Hypertriglyceridämie nimmt dabei parallel zur Prävalenz von Fettleibigkeit und Diabetes mellitus Typ II zu (LAUFS et al., 2020). Eine Hypertriglyceridämie ist definiert als eine Störung des Fettstoffwechsels mit Triglycerid-Spiegeln von über 180 mg/dl im Blut. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung treten meist erhöhte Triglycerid-Plasmaspiegel auf. Dabei ist deren Höhe mit dem Stadium der Nierenerkrankung assoziiert und bei Dialysepatienten am stärksten erhöht. In mehreren Metaanalysen, die auf der Copenhagen City Heart Studie basierten, konnte eine starke Assoziation zwischen einer Erhöhung der Nüchtern-Triglyceride und einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkte, ischämische Herzerkrankung, Schlaganfälle und

Mortalität gezeigt werden (NORDESTGAARD, VARBO, 2014) (MADSEN et al., 2018). Es zeigte sich zudem, dass ein nüchtern gemessener Triglycerid-Plasmaspiegel von 580 mg/dl im Vergleich zu einem Spiegel von 70 mg/dl mit einem fünffach erhöhten Risiko für Myokardinfarkt, dreifach erhöhten Risiko für ischämische Herzerkrankung und ischämischen Schlaganfall sowie einem verdoppelten Risiko für Mortalität einhergeht (LAUFS et al., 2020; NORDESTGAARD, VARBO, 2014; SPEER et al., 2021). Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS), die unter einer Statintherapie stehen, stellen erhöhte Triglyceride unabhängig von LDL-C einen Prädiktor für das kardiovaskuläre Risiko dar (SCHWARTZ et al., 2015).

3.3 Triglycerid-reiche Lipoproteine

3.3.1 Triglycerid-Stoffwechsel allgemein und bei chronischer Nierenerkrankung

Der Transport von Triglyceriden erfolgt überwiegend durch Chylomikronen und VLDL. Nach Aufnahme von Triglyceriden über die Nahrung erfolgt die Bildung von Chylomikronen im Darm. Diese werden anschließend über das lymphatische System in die venöse Blutstrombahn geleitet. Die endogene Aufnahme von Triglyceriden zum Beispiel nach Freisetzung aus Lysosomen oder nach *de novo* Lipogenese erfolgt über VLDL. Anschließend findet die Lipoproteinlipase-vermittelte Freisetzung von freien Fettsäuren mit Aufnahme durch das Fett- und Muskelgewebe statt. Die sogenannten Remnants der Chylomikronen werden von der Leber verstoffwechselt. Hier erfolgt im Anschluss die Bildung von VLDL. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Chylomikronen sind diese nur postprandial messbar. Im nüchternen Zustand stellt VLDL den Hauptträger von Triglyceriden dar. Die Produktion von VLDL wird durch freie Fettsäuren und Insulin angeregt. Die Lipoproteinlipase kann Triglyceride im VLDL hydrolysieren. Dadurch kommt es zur Entstehung von IDL, die übrig gebliebenen Triglyceride werden wiederum von der hepatischen Lipase hydrolysiert. Des Weiteren erfolgt ein CETP-vermittelter Austausch von Triglyceriden gegen Cholesterinester von HDL, dadurch entsteht aus IDL LDL. Diese werden anschließend wieder in die Leber aufgenommen. Die LPL-vermittelte Lipolyse von triglyceridreichen Lipoproteinen wird durch verschiedene Apolipoproteine der Leber vermittelt, eines davon ist ApoC3. Dieses inhibiert die Aktivität der Lipoproteinlipase (ROSENSON et al., 2014) (HAAS et al., 2013). Triglyceridreiche Lipoproteine spielen eine Rolle in der Entstehung von Atherosklerose. Dabei können die großen VLDL-Partikel zwar nicht direkt die arterielle Wand erreichen, aber kleinere cholesterinreiche Remnants von VLDL stehen im Verdacht, im subendothelialen Schichten von Blutgefäßen zu akkumulieren. Dort können sie durch die Freisetzung von freien Fettsäuren, Monoacylglycerol und anderen

Molekülen eine Inflammationsreaktion induzieren (LAUFS et al., 2020; NORDESTGAARD, VARBO, 2014; SPEER et al., 2021). **Abbildung 1** stellt den Metabolismus von Triglyceridreichen Lipoproteinen schematisch dar.

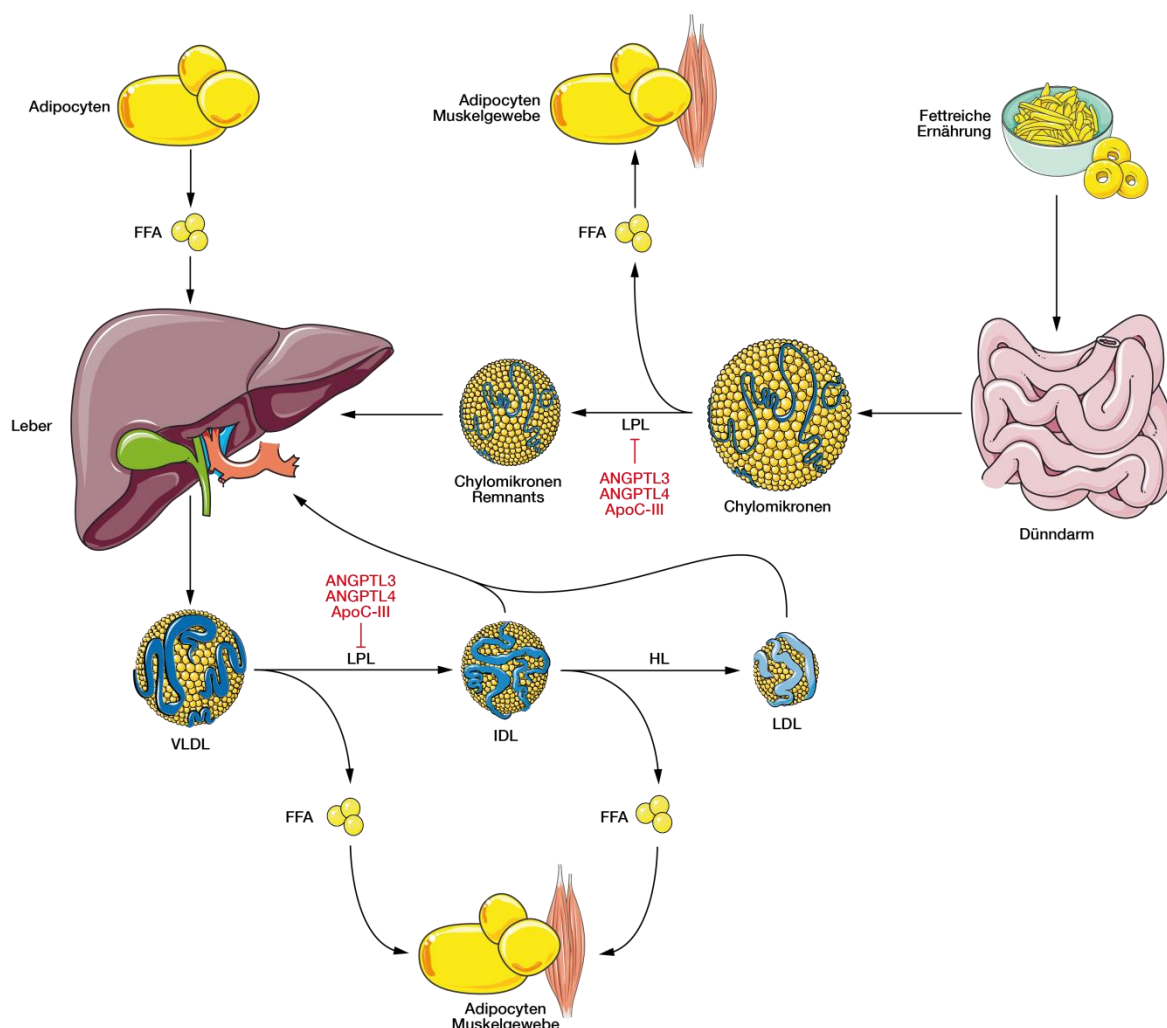


Abbildung 1 - Darstellung des Metabolismus von Triglyceridreichen Lipoproteinen. FFA, Freie Fettsäuren. LPL, Lipoproteinlipase. ANGPTL3, Angiopoietin-like protein-3. ANGPTL4, Angiopoietin-like protein-4. HL, Hepatische Lipase. Abbildung von Univ.-Prof. Dr. Dr. T. Speer.

3.3.2 Apolipoprotein C3 (ApoC3)

3.3.2.1 Effekte von ApoC3 auf den Triglyceridstoffwechsel

ApoC3 wird überwiegend in der Leber und zu Teilen im Darm synthetisiert und ist ein Hauptbestandteil von VLDL. Zudem ist es in Chylomikronen und HDL nachweisbar. Im Fettstoffwechsel wirkt es inhibierend auf die LPL und verhindert durch die Interaktion mit ApoE die Wiederaufnahme von Chylomikronen und VLDL-Remnants in die Leber. Durch die Inhibition der LPL kommt es zur Verringerung der LPL-abhängigen Lipolyse von triglyceridreichen Lipoproteinen und damit zu gesteigerten Triglycerid-Plasmaspiegeln. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung sind die ApoC3-Level gesteigert. Dadurch kommt es bei diesen Patienten zu einer reduzierten Aktivität von LPL und damit zu einer

Steigerung der Triglycerid-Plasmaspiegel. Aktuelle Studien zeigen eine signifikante Assoziation zwischen ApoC3-Spiegeln und Mortalität. In der LURIC Studie wiesen Patienten mit erhöhten ApoC3-Spiegeln in einer Nachbeobachtungsperiode von 9,9 Jahren zudem deutlich erhöhte systemische Inflammationsmarker auf (ZEWINGER et al., 2020). Demzufolge stellt ApoC3 ein potentiell therapeutisches Target in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen und der chronischen Nierenerkrankung dar. Passend dazu konnten neuere Studien demonstrieren, dass Loss-of-function Mutationen im *APOC3* Genlocus nicht nur mit einer deutlichen Reduktion von Triglycerid-Plasmaspiegeln, sondern auch mit einem reduzierten Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und ischämischen Herzinfarkten einhergehen. Außerdem konnte durch die Hemmung von ApoC3 mittels Antisense-Nucleotiden bei Patienten mit Hypertriglyceridämie eine deutliche Reduktion der Triglycerid-Plasmaspiegel erreicht werden. In epidemiologischen Studien konnten erhöhte ApoC3 Plasmaspiegel als unabhängiger Risikofaktor für koronare Herzerkrankung und Atherosklerose etabliert werden (GRAHAM et al., 2013; JIN et al., 2016; JOHNSON, 2004; KHETARPAL et al., 2017; OLIVIERI et al., 2003; OLIVIERI et al., 2002; SILBERNAGEL et al., 2020).

3.3.2.2 Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch ApoC3

Bei der Entstehung von verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen spielt sterile Inflammation eine wichtige Rolle. Diese wird insbesondere durch eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems vermittelt, was zur Entstehung einer sterilen Inflammation führt (LEEMANS et al., 2014; ZEWINGER et al., 2020). Das angeborene Immunsystem detektiert Pathogene durch verschiedene „pattern recognition receptors“ (PRRs). Diese erkennen unterschiedliche mikrobielle Strukturen, die „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) wie zum Beispiel bakterielle Wandbestandteile wie Lipopolysaccharide. PRRs können aber auch durch endogene Substanzen, die beispielsweise bei Zellschädigung freigesetzt werden, aktiviert werden. Diese bezeichnet man als „danger-associated molecular patterns“ (LAMKANFI, DIXIT, 2014). Eine essentielle Rolle bei der sterilen Inflammation spielen verschiedene Inflammasom-Komplexe, die zu den „pattern recognition receptors“ zählen und sowohl durch endogene und als auch durch exogene Stimulanzen aktiviert werden können. Eines der bisher am besten untersuchten Inflammasome stellt das NLRP3 Inflammasom dar. Es handelt sich dabei um einen multimeren Proteinkomplex aus NLRP3, ASC und Caspase-1, welcher nach seiner Aktivierung über verschiedene Signalwege, Pro-Formen von Zytokinen in ihre aktive Form prozessiert. Hier sind insbesondere IL-1 β und IL-18 zu nennen. Die klassische Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen erfolgt durch zwei unabhängige Signale, die im ersten Schritt zur Expression der Inflammasombestandteile und im zweiten Schritt zu deren Zusammensetzung und Aktivierung führen (LAMKANFI, DIXIT, 2014). Die kanonische

Inflammasom-Aktivierung basiert auf der Bildung von Pyroptosom-Formationen, dem inflammatorischen Zelltod der Pyroptose und Kaliumausstrom. Es konnten jedoch alternative Signalwege, die auf humane Monocyten begrenzt sind, demonstriert werden. Die alternative Aktivierung basiert im Gegensatz zur klassischen Inflammasom-Aktivierung auf dem TLR4-TRIF-RIPK1-FADD-CASP8-Signalweg und benötigt keine zweistufige Aktivierung (GAIDT et al., 2016). Ein Trigger der alternativen Aktivierung des Inflammasoms in humanen Monocyten ist ApoC3 (ZEWINGER et al., 2020). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass ApoC3 in humanen Monocyten über einen alternativen Signalweg das NLRP3-Inflammasoms aktiviert und so eine systemische Inflammation hervorruft. Über diesen Signalweg hemmt ApoC3 die Regeneration von arteriellen Läsionen und fördert die Entwicklung von Nierenschädigungen. Dieser Zusammenhang ist insbesondere bei allen Erkrankungen, die mit erhöhten Plasmaspiegeln von ApoC3 assoziiert sind, relevant. Dazu gehören die chronische Nierenerkrankung, die koronare Herzerkrankung, der Myokardinfarkt und Diabetes mellitus II (ZEWINGER et al., 2020).

3.3.3 Posttranslationale Lipoproteinmodifikationen

Posttranslationale Modifikationen beschreiben einen Prozess, bei dem Proteine nach abgeschlossener Translation verändert werden. Sie gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Interesse, da sich in verschiedenen Studien eine Assoziation zwischen diesen Veränderungen und Krankheitsbildern wie Atherosklerose, Diabetes mellitus und chronischer Nierenerkrankung gezeigt haben (OK et al., 2005) (WANG et al., 2007) (HORKKO et al., 1994). Dabei wurden verschiedenste Modifikationen beschrieben, darunter Glykosylierung, Oxidation, Nitrosylierung, Acetylierung, Carbamylierung und Guanidinylierung.

3.3.3.1 Oxidierung

Oxidativer Stress und Inflammation sind wesentliche Faktoren für die Ausbildung von posttranslationalen Modifikationen. Oxidativer Stress entsteht durch einen Überschuss an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). An der Regulation des Gleichgewichts zwischen Bildung und Abbau der ROS ist eine Vielzahl von enzymatischen und nicht-enzymatischen Prozessen beteiligt. ROS stellen einen wichtigen Bestandteil des unspezifischen Abwehrsystems dar. Jedoch können hohe ROS Konzentrationen negative Effekte auf Funktion und Struktur von Gewebe haben. Das urämische Milieu bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung führt durch die Akkumulation von harnpflichtigen Substanzen zu gesteigertem oxidativen Stress und begünstigt somit oxidative Prozesse. Dementsprechend sind bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung die Plasmaspiegel von oxidiertem LDL (oxLDL) deutlich erhöht (CACHOFEIRO et al., 2008). Die Oxidation von LDL wird im Plasma durch die ebenfalls zirkulierenden Antioxidantien verhindert. Der

überwiegende Anteil der Oxidation von LDL findet im subendothelialen Raum statt (NORDESTGAARD, VARBO, 2014). Die Aufnahme von LDL in den subendothelialen Raum wird durch endotheliale Dysfunktion gefördert, diese ist wiederum bei erhöhtem oxidativen Stress gesteigert. Oxidativer Stress reduziert hierbei die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, beeinflusst dadurch die vaskuläre Funktion und ermöglicht den Eintritt von LDL in die arterielle Gefäßwand (MUNZEL et al., 1997).

3.3.3.2 Carbamylierung

Eine weitere posttranslationale Modifikation stellt die Carbamylierung dar (WANG et al., 2007). Cyanat und Isocyanat können Aminosäuren von Proteinen und andere Moleküle carbamylieren und dadurch deren Struktur und Funktion verändern. Carbamylierte Proteine finden sich in Neutrophilen, Monocyten und Erythrocyten sowie im Nierengewebe von CKD-Patienten (KRAUS, KRAUS, 2001). Carbamylierte Proteine von urämischen Patienten zeigen einen Verlust oder eine Änderung ihrer biologischen Aktivität. Darauf basierend wird vermutet, dass die Carbamylierung von Proteinen einen Faktor der Toxizität des urämischen Milieus darstellt (WANG et al., 2007). Das für die Carbamylierung notwendige Cyanat wird entweder enzymatisch durch die Myeloperoxidase (MPO) produziert oder entsteht nicht-enzymatisch durch den Zerfall von Harnstoff als Stoffwechselendprodukt beim Abbau von Aminosäuren (BAUM, 2021). Die MPO ist ein Enzym, das von Leukocyten sezerniert wird und einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort darstellt. Es konnte demonstriert werden, dass der Prozess der Carbamylierung bei renaler Dysfunktion und Urämie auftritt und dabei durch die MPO beschleunigt wird. Dieser Inflammations-abhängige Prozess spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Atherosklerose (NICHOLLS, HAZEN, 2005). Die MPO-katalysierte Carbamylierung von Proteinen konnte in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Dort zeigt sie sich im Vergleich zu normalem arteriellem Gewebe deutlich ausgeprägter. Die dabei zugrundeliegenden chemischen Prozesse basieren auf dem MPO/H₂O₂/SCN⁻-System von Leukocyten. Dabei sind die Plasmaspiegel von SCN⁻ abhängig von der Ernährung und unter anderem bei Rauchern deutlich erhöht. Auch die Carbamylierung von ApoB stellt eine häufige posttranslationale Modifikation von LDL dar, diese tritt bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung gehäuft auf, jedoch nicht bei Gesunden. Zudem induziert carbamyliertes LDL eine endotheliale Dysfunktion, einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose (SPEER et al., 2014) (WANG et al., 2007) (LIU et al., 2016).

3.4 Fragestellung

Aktuelle Studien heben zunehmend die sterile Inflammation als einen entscheidenden Faktor der Entstehung und dem Fortschreiten von Erkrankungen wie Atherosklerose, Diabetes

mellitus Typ II, chronischer Nierenerkrankung und kardiovaskulären Erkrankungen hervor. Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse sind von großem Interesse, da sie entscheidend für die Entwicklung von neuen prognostischen, präventiven und therapeutischen Instrumenten sind. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, posttranslationale Protein-Modifikationen im ApoC3 zu identifizieren und deren (patho)physiologische Relevanz *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Krankheitsmodellen zu untersuchen.

4. Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Antikörper

Name	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Primär-Antikörper			
Anti-DKK3 Antikörper	Hase	Abcam #ab187532	1:100
Anti-F4/80 Antikörper (BM8)	Maus	eBioscience #14-4801-82	1:100
Anti-Ly6G/Ly6C Antikörper (RB6-8C5)	Maus	eBioscience #14-5931-82	1:100
Sekundär-Antikörper			
Goat anti-Rat IgG (H+L) Antikörper, Biotin	Ziege	Invitrogen #31830	1:200
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Antikörper, Biotin	Ziege	Invitrogen #31820	1:200

Table 3 - Auflistung der verwendeten Primär- und Sekundärintikörper.

4.1.2 Experimentelle Modelle: Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
HEK-Blue hTLR2 Zellen	Invivogen #hkb-htlr2
HEK-Blue hTLR4 Zellen	Invivogen #hkb-htlr4

Table 4 - Auflistung der verwendeten Zelllinien.

4.1.3 Kommerzielle Assays und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Humaner IL1-beta/II-1F2 DuoSet ELISA	R&D systems #DY201
Humaner IL-6 DuoSet ELISA	R&D systems #DY206
CD14 MicroBeads, Human	Miltenyi Biotec #130-050-201

Table 5 - Auflistung der verwendeten kommerziellen Assays und Kits.

4.1.4 Experimentelle Modelle: Organismen/Stämme

Mausstamm	Lieferant
C57BL/6J	Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
NOD.CB17/Prkdcscid/scid/Rj	Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich

Table 6 - Auflistung der verwendeten Mausstämme.

4.1.5 Medien, Lösungen, Puffer

Medien, Lösungen, Puffer	Details
Draq5	1µl Draq5 250 µl 1 % BSA
Hunger-Medium	RPMI GlutaMax Penicillin/Streptomycin 10mM HEPES
Hunger-Medium (Makrophagenstimulation)	RPMI GlutaMax 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10 mM HEPES
Krebs-HEPES Puffer (KHB)	Noxygen, Elzach
Natriumbicarbonat-Puffer	NaHCO ₃
Natrium-Citratpuffer	2,941 g Sodiumcitrat 1000 ml destilliertes Wasser 500 µl Tween 20 pH 6,0
PBS/EDTA (Monocytenisolation)	PBS 0,5 M EDTA
Phosphat bufferd saline (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2-7,4 0,2 µm gefiltert
Reagenzverdünnungslösung	PBS 1 % BSA pH 7,2-7,4 0,2 µm gefiltert
Stopplösung	H ₂ SO ₄
Substratlösung	1:1 Gemisch aus H ₂ O ₂ und Tetramethylbenzidine

TNB Blocking Puffer	1,576 g Tris-HCL 0,876 g NaCl 100 ml destilliertes Wasser pH 7,5 0,5 g Blocking Reagenz
Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween® pH 7,2-7,4
Vollmedium (HEK-Zellen)	DMEM 4,5 g/l Glukose 10 % FBS 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 100 µg/ml Normocin 2 mM L-Glutamin
Vollmedium (PBMC-Kultur)	RPMI GlutaMax 10 % Fetales bovines Serum 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10 mM HEPES

Table 7 - Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen, Puffer.

4.1.6 Geräte

Produkt	Hersteller
Anästhesie-System Fluovac	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
CO ₂ -Inkubator Serie CB	Binder, Tuttlingen
ESR-Spektrometer e-scan	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Megafuge 1.0R	Heraeus instruments, Osterode
MACS Separator	Milteny Biotec Inc., Deutschland
Microplate Reader sunrise-basic	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikroplatten (DY990)	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Mikrozentrifuge PicoFuge II	Stratagene, CA, USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Optima XPN 90 Ultracentrifuge mit Ultrazentrifugenrotor Typ 70.1 Ti	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Pipettierhilfe Pipetman	Gilson International, Limburg an der Lahn
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Pipettierhilfe Swift PET	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
Plattenversiegelungsgerät (DY992)	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Präzisionswaage PCB 100-3 (0,001 g)	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Semi-Mikrowaage R 160P-D1 (0,00001 g)	Sartorius AG, Göttingen
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Zeiss Axio Imager 2	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Zeiss LSM 900	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland

Tabelle 8 - Auflistung der verwendeten Geräte.

4.1.7 Software

Software	Hersteller
Image J 1.52a	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Prism 8 for MacOS	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
SPSS Statistics Version 25	IBM, Endicott, New York, USA
Stata/IC 15.1	StataCorp, College Station, Texas USA
WinEPR Aquisition Program	Bruker BioSpin, Billerica, Massachusetts, USA
ZEN 3.0 (Blue edition)	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland

Tabelle 9 - Auflistung der verwendeten Software.

4.1.8 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Chemikalien und sonstige Reagenzien	Hersteller
1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin (CMH)	Noxygen, Elzach
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Adenin-Diät (0,2%)	Altromin International, Deutschland
Alpha-Cyano-4-hydroxycimtsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumchlorid-Lösung	Carl Roth, Deutschland
Apolipoprotein C3	Hölzel Diagnostika, Deutschland

Aqua dest.	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
ATTO-488-NHS-Ester	ATTO-TEC, Siegen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	VWR International GmbH, Darmstadt
Chromogen AEC	VWR International GmbH, Darmstadt
Deferoxamin (DFO)	Noxygen, Elzach
Dexpanthenol-Augensalbe	Bayer AG, Deutschland
Diethyldithiocarbamat (DETC)	Noxygen, Elzach
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Eosinpulver	Sigma Aldrich, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Evan's Blau	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Formaldehyd	Sigma Aldrich, Deutschland
Goldchlorid-Lösung	Sigma Aldrich, Deutschland
Guanidinhydrochlorid-Lösung	Sigma Aldrich, Deutschland
Harnstoff	Sigma Aldrich, Deutschland
HRP-konjugiertes Streptavidin	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Isofluran	Baxter International, Deerfield, IL, USA
KETAVET	Zoetis, New Jersey, USA
Lichtgrün-SF Lösung	Sigma Aldrich, Deutschland
Lipopolysaccharide (LPS)	InvivoGen, Kalifornien, USA
Methylisoharnstoffbisulfat-Lösung	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumthiosulfat-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Periodsäure-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Peroxidase	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Pikro-Siriusrot-Lösung	VWR International GmbH, Darmstadt
ROMPUN (2%)	Bayer AG, Deutschland
RPMI, Glutamax	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll)	GE Healthcare, Illinois, USA

saures Hämlaun nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat/Methenamin-Borat Lösung	Sigma Aldrich, Deutschland
Standardfutter	Altromin International, Deutschland
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypsin	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Vectashield Mounting-Medium mit DAPI	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Table 10 - Auflistung der verwendeten Chemikalien und sonstige Reagenzien.

4.1.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6/0 Prolene Fäden	B. Braun, Melsungen, Deutschland
7/0 Prolene Fäden	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Aspirationspipette (2 ml)	Sarstedt, Newton, NC, USA
Deckgläser (50x24 mm)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Newton, NC, USA
Falcon-Zentrifugationsröhrchen (15 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Falcon-Zentrifugationsröhrchen (50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Indium-Zinnoxid beschichtete Träger	Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland
Microplatte (96-well) Microlon 200 (Med. Bindung, U-Boden)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Mikro-Kapillaren	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Neubauer "improved" Zählkammer	Biochrom AG, Berlin
Spitzen für Multipipette(50/100 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
TipOne Filterspitzen (10/20/100/200/1000 µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland
Zellkulturplatte (12-well)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturplatte (6-well)	TPP Switzerland, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	SPL Life sciences, Korea

Table 11 - Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

4.2 Mäuse

C57Bl/6J-Wildtypmäuse (WT) von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) wurden für die Durchführung des Niereninsuffizienzmodells mittels Adenin-Diät eingesetzt. Immuninkompetente NOD.CB17/Prkdcscid/scid/Rj Mäuse wurden von Janvier erworben. Die zugrundeliegende Mutation unterdrückt die Lymphocyten-differenzierung und damit die Ausbildung von B- und T- Lymphocyten. Zudem wird die Funktion von antigen-präsentierenden Zellen, myeloiden Zellen und NK-Zellen unterdrückt. Demzufolge ist dieser Mausstamm für die Transplantation von fremden Immunzellen, wie sie bei den Experimenten mit humanisierten Mäusen notwendig sind, optimal geeignet. Die NOD-SCID Mäuse wurden im Rahmen des Nierenfibrosemodells durch unilaterale Ureterligatur sowie im perivaskulären Carotisschädigungsmodell eingesetzt.

Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Instituts für Klinisch Experimentelle Chirurgie am Universitätsklinikum des Saarlandes unter Standardbedingungen gehalten. Alle Tierexperimente wurden durch das zuständige Landesamt für Verbraucherschutz genehmigt (Genehmigungsnummer 34/2014 und 21/2015).

4.3 Zelllinien

HEK293-Zellen, die mit humanem *Tlr2* bzw. *Tlr4* Genen transfiziert wurden, wurden von Invivogen erworben. Die Transfektion erfolgte dabei jeweils durch ein pUNO-*Tlr2* bzw. pUNO-*Tlr4*-Plasmid, welches das entsprechende Gen beinhaltet. Die Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert, welches 4,5 g/l Glukose, 10 % FBS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Normocin (Invivogen) und 2 mM L-Glutamin enthält.

4.4 CARE FOR HOME Studie

Die CARE FOR HOME Studie (Nummer der Zustimmung der Ethikkommission 54/04) beinhaltet Patienten mit bestätigter chronischer Nierenerkrankung im Stadium G2-4 basierend auf den KDIGO Leitlinien (KDIGO, 2012), die in der nephrologischen Ambulanz am Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert wurden. Die Patienten waren mindestens 18 Jahre alt. Ausschlusskriterien waren aktive maligne Erkrankungen, klinisch manifeste Infektionen, aktive immunsuppressive Therapie, Zustand nach Nierentransplantation und/oder bestätigte akute Nierenschädigung. In die aktuelle Analyse wurden 543 Patienten eingeschlossen, die über einen mittleren Zeitraum von 5,3 Jahren nachbeobachtet wurden. Es wurden jährliche Vorstellungen mit laborchemischer Bestimmung der eGFR durchgeführt. Die Plasmaproben zur proteomischen Analyse wurden morgens nüchtern entnommen und sofort bei -80 °C bis zur Durchführung der Analysen gelagert. Der kombinierte primäre kardiovaskuläre Endpunkt wurde als das Auftreten eines auf Atherosklerose-bedingten kardiovaskulären Ereignisses (akuter Myokardinfarkt, chirurgische oder interventionelle

koronare, cerebrovaskuläre, oder peripher-arterielle Revaskularisation, Apoplex mit Symptomatik ≥ 24 Stunden, Amputation oberhalb des Knöchels) oder Tod definiert. Der kombinierte primäre renale Endpunkt wurde als Abfall der eGFR auf $\leq 50\%$ der initial errechneten glomerulären Filtrationsrate, dem Erreichen einer terminalen Nierenerkrankung mit Notwendigkeit eines Nierenersatzverfahrens oder Tod definiert.

4.5 Massenspektrometrie und Proteomanalyse

Diese Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation in unserem SFB TRR 219 durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Vera Jankowski am Institut für Molekulare Herz-Kreislauf-Forschung (IMCAR) an der RWTH Aachen durchgeführt. Die Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) stellt ein Werkzeug zur Analyse der Zusammensetzung von allen Arten von Biomolekülen dar. Dadurch ist es möglich, gezielt die Zusammensetzung und Veränderung von einzelnen Proteinen zu analysieren und posttranslationale Modifikationen zu identifizieren. Im ersten Schritt wurden 30 μg Protein durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend das Gel mittels Commassie Brilliant Blue G-250 (BioRad, München, Deutschland) gefärbt. Danach erfolgte basierend auf der Gelelektrophorese die Aufteilung nach Gewicht in zwei Gruppen 0-20 kDa und 20-37 kDa und anschließend die Aufreinigung. Im Anschluss wurden die Proteine mittels Trypsin verdaut, aufgearbeitet und auf die MALDI Zielplatte aufgebracht. Als MALDI Matrix wurde Alpha-Cyano-4-hydroxymizsäure verwendet. Die Massenspektrometrieanalyse wurde unter Verwendung von MALDI-time of flight/time of flight (TOF/TOF) Massenspektrometer (Ultrareflex III; Bruker Daltonic, Deutschland) und MALDI-RapifleX-Massenspektrometer (Bruker-Daltonic, Deutschland) durchgeführt. Dabei war ersteres mit einem Laser mit einer Wiederholungsrate von 100-200 Hertz ausgestattet. Die abgebildeten Spektren bilden im Durchschnitt 200 Einzelaufnahmen ab (BONK, HUMENY, 2001; DOLL, BURLINGAME, 2015; FIEDLER, 2021; JAISSON et al., 2011). Kalibrierte und beschriftete Spektren des analysierten ApoC3 wurden der Datenbanksuche Swiss-Prot (<http://www.expasy.org>) unterzogen, dabei wurde die Software Bruker Bio-Tool 3.2 und Mascot 2.2 search engine (Matrix Science Ltd, London, UK) verwendet (NAGIN et al., 2018).

4.6 *Ex vivo* Guanidinylierung von ApoC3

Ex vivo sollten verschiedene Wege für die Entstehung von guanidinyliertem ApoC3 ermittelt werden. Dazu erfolgte die Inkubation von ApoC3 mit verschiedenen Substanzen. Zunächst wurde 1 mg einer ApoC3-Lösung in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in destilliertem Wasser gelöst und über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur mit 1 mM Methylisoharnstoffbisulfat-Lösung, 1 mM Guanidinhydrochlorid-Lösung oder 1 mM Harnstoff inkubiert. Anschließend wurden die ApoC3-Präparationen gegen Phosphatpuffer dialysiert.

Danach wurde das modifizierte ApoC3 für massenspektrometrische Analysen genutzt (KIMMEL, 1967; NAGIN et al., 2018). Das gleiche Procedere wurde für die Herstellung von gApoC3 für die weiterführende Verwendung in unseren Experimenten genutzt. Die verwendeten Konzentrationen von Methylisoharnstoffbisulfat lagen hierbei bei 10 mM bzw. 1 M. Zur Analyse von konzentrationsabhängigen Unterschieden durch die Inkubation von ApoC3 mit Harnstoff wurde eine Konzentrationsreihe mit ansteigenden Harnstoffkonzentrationen durchgeführt. Dafür wurde 1 mg ApoC3 mit einer Konzentration von 50 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst und bei Raumtemperatur über 24 Stunden mit 0 mg/dl, 50 mg/dl, 100 mg/dl und 200 mg/dl Harnstoff inkubiert. Danach erfolgte wie oben beschrieben eine Dialyse.

4.7 Zweidimensionale Proteomanalyse von Gewebe

Die Durchführung der zweidimensionalen Proteomanalyse von Gewebeschnitten wurde ebenfalls durch die Arbeitsgruppe von Frau Professor Vera Jankowski, Leiterin der Massenspektrometrie basierten Bioanalytik des IMCAR am Universitätsklinikum Aachen durchgeführt. Gefrorene Nierenabschnitte wurden auf spezielle, zuvor mit Polylysin beschichtete, Träger (Indium-Zinnoxid beschichtete Träger) aufgebracht. Anschließend erfolgte der Protein-Verdau mittels Trypsin und das Auftragen einer Matrix für die Durchführung der Massenspektrometrie (Alpha-Cyano-4-hydroxymethylsäure). Die Beschichtung mit Trypsin und der Matrixsubstanz erfolgte jeweils mit einem speziellen Sprayer für Massenspektrometrie (HTX TM-Sprayer: TMSP-M3). Die Schnitte wurden mit Rapiflex im positiven Reflektormodus gemessen, dabei wurde ein Messbereich von 500-3200 Da und ein Messgitter von 30 µm verwendet. Die Bildanalysen erfolgten mit SCiLS Lab 2020b Software. Die MS/MS Spektren wurden mit dem Rapiflex erstellt, anschließend erfolgte der Abgleich der Peptidsequenzen mit einer entsprechenden Datenbank (SwissProt). Hierbei wurde die Mascot 2.2 Software und die Software Bruker Bio-Tool 3.2 genutzt.

4.8 Isolation von Monocyten

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Technik basiert auf der unterschiedlichen Dichte von verschiedenen Zellen des Blutes. Hierfür wird Vollblut mit PBS/EDTA verdünnt und über gelöstes Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (=Ficoll) überschichtet. Anschließend erfolgt die Zentrifugation zur Aufteilung der verschiedenen Zellarten. Ficoll dient hierbei als Trennmedium für die verschiedenen Zellen (Abbildung 2). Dabei ist es aufgrund seiner hohen Molekülmasse kaum osmotisch wirksam und somit gut für die Dichtegradientenzentrifugation geeignet. Zur Trennung der PBMCs von Granulocysten und Erythrocyten wird hierbei die Dichte des Trennmediums auf 1,077 g/ml angesetzt. Die

Erythrocyten und Granulozyten können aufgrund ihrer höheren Dichte die Ficoll-Phase passieren, während sich die PBMCs mit einer Dichte unter 1,077 g/ml auf die Ficoll-Phase auflagern (**Abbildung 2**).

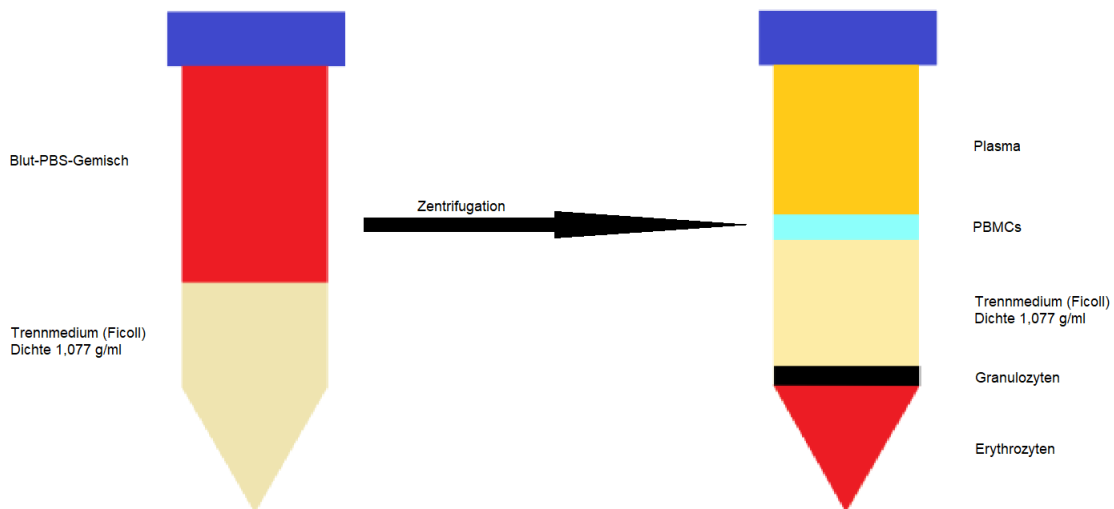


Abbildung 2 – Schematische Darstellung der Zellen vor und nach Zentrifugation.

Initial wurden 18 ml Vollblut durch Hinzugabe von PBS/EDTA auf ein Volumen von 35 ml adjustiert und anschließend vorsichtig über 15 ml Ficoll Lösung überschichtet. Dabei war genau darauf zu achten, dass es nicht zur Vermischung zwischen dem Blut und dem Trennmedium kam. Anschließend erfolgte die Zentrifugation über 30 Minuten bei 400 g und Raumtemperatur. Dies diente zur Aufteilung der verschiedenen Zellen basierend auf ihrer Dichte. Um zu verhindern, dass es zur Vermischung von verschiedenen Zellen kam, musste die Zentrifugation ohne zusätzliche Beschleunigung oder Abbremsung erfolgen. Die entstehende PBMC-Interphase wurde vorsichtig abpipettiert. Dabei war darauf zu achten, möglichst kein Ficoll mitzunehmen. Die gewonnenen Zellen wurden in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und erneut mit PBS/EDTA auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung durch mehrmaliges waschen und zentrifugieren mittels PBS/EDTA-Lösung um verbliebene Thrombocyten zu entfernen. Hierfür erfolgte in drei Schritten jeweils die Zentrifugation mit 400 g, 300 g und 140 g. Die Reduktion der Drehzahl diente dazu, um möglichst einen geringen Zellschaden zu verursachen. Die Zentrifugation erfolgte dabei jeweils über zehn Minuten bei 4 °C. Nach der Zentrifugation erfolgte jeweils das Absaugen des Überstandes und das erneute Auffüllen mit PBS/EDTA auf 50 ml. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde ebenfalls der Überstand abgesaugt. Hiernach erfolgte die Lyse der verbliebenen Erythrocyten durch osmotische Lyse. Die Zellen wurden dafür mit 2 ml PBS/EDTA aufgefüllt und anschließend wird 6 ml eisgekühlte Ammoniumchlorid-Lösung hinzugefügt. Es erfolgte die Inkubation bei 4 °C über zehn Minuten, anschließend die erneute

Zentrifugation bei 400 g und 4 °C über 15 Minuten. Hiernach wurde erneut der Überstand abgesaugt und das finale Zellpellet mit vorgewärmtem Vollmedium auf 10 ml aufgefüllt. Nach erfolgter Isolation der PBMCs wurde eine Probe der Suspension mit Trypanblau-Lösung gefärbt und die Zellzahl mikroskopisch mittels Zählkammer bestimmt. Trypanblau färbt tote Zellen aufgrund des Verlustes der Integrität ihrer Zellmembran blau. Vitale Zellen werden nicht angefärbt und erscheinen lichtmikroskopisch hell. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau vermischt. Von diesem Gemisch wurden wiederum 10 µl zur Auszählung verwendet. Hierfür kam eine Neubauerzählkammer zum Einsatz. Diese beinhaltet 0,1 µl pro Quadranten, sodass durch Auszählung und Hochrechnung eine Quantifizierung der Zellen pro Mikroliter möglich war. Zur Berechnung der Zellzahl wurde folgende Formel verwendet.

$$\text{Zellzahl pro } \mu\text{l} = \frac{\text{Zellzahl in den Quadranten}}{4} * 10 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor berechnete sich hierbei aus dem verwendeten Verhältnis aus Zellsuspension zu Trypanblau. In diesem Fall lag ein 1:10 Verhältnis vor, sodass der Verdünnungsfaktor gleich 10 war.

Im Anschluss an die Isolation wurden eine Million der isolierten Zellen in Zellmedium (RPMI GlutaMax, 10% fetales bovines Serum, Penicillin, Streptomycin, 10mM HEPES) überführt und anschließend zur Durchführung eines ELISA auf 96 Well Mikrotiterplatten ausgesät. Nach einer Stunde wurden die nicht-adhärenenten Zellen entfernt und das Medium durch ein Hunger-Medium (RPMI GlutaMax, Penicillin/Streptomycin, 10mM HEPES) ersetzt. Hiernach wurden die Zellen über 16 h mit 50 µg/ml nativem oder guanidinyliertem ApoC3 inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Durchführung eines ELISA wie weiter unten beschrieben (vgl. 4.9).

4.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) stellt ein immunologisches Standardverfahren zum Nachweis und Quantifizierung von bestimmten Molekülen dar. Ein klassisches Verfahren stellt der Sandwich-ELISA dar. Hierbei wird die zu analysierende Probe an eine antikörperbeschichtete Platte gebunden und anschließend mittels eines weiteren Enzymgekoppelten Antikörpers markiert. Dieses Enzym löst wiederum eine Farbreaktion aus, die zur Quantifizierung notwendig ist. Die enzymatische Farbreaktion wird genutzt, um photometrisch die Konzentration der gesuchten Substanz zu bestimmen. Dazu wird die Absorption mit der einer Standardreihe verglichen, deren Konzentration bekannt ist.

Die Zytokinkonzentration im Überstand von humanen Monocyten wurde mit kommerziell erhältlichen ELISA Sets (Humaner Il1-beta/Il-1F2 DuoSet ELISA Humaner Il-6 DuoSet ELISA)

durchgeführt. Zur Quantifizierung von IL-1 β bzw. IL-6 wurden zunächst die 96 Well Mikrotiterplatten vorbereitet. Dazu wurden die entsprechenden Capture Antikörper für IL-1 β bzw. IL-6 mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2-7,4) auf eine Konzentration von 4 μ g/ml verdünnt und anschließend die Mikrotiterplatte mit 100 μ l pro Well beschichtet. Die Platte wurde nun über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte mittels Waschpuffer (0,05% Polysorbat 20 in PBS pH 7,2-7,4) dreimal gewaschen. Hiernach wurde die Platte mit 300 μ l Reagenzlösung (1% BSA in PBS, pH 7,2-7,4, 0,2 μ m gefiltert) pro Well geblockt und für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde der bereits beschriebene Waschvorgang wiederholt. Zur Durchführung des Assays wurden pro Well 100 μ l des Überstandes der PBMCs bzw. des Standards in Reagenzlösung gegeben und anschließend für zwei Stunden inkubiert. Es erfolgte erneut der oben beschriebene Waschvorgang. Danach wurden pro Well 100 μ l des in Reagenzlösung suspendierten Detektionsantikörpers für IL-1 β (250 ng/ml) gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Es folgte erneut der oben beschriebene Waschvorgang. Jetzt wurden 100 μ l Streptavidin-HRP zu jedem Well hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde der bekannte Waschvorgang durchgeführt. Nun wurden 100 μ l der Substratlösung (1:1 Mischung aus Farbreagenz A (H₂O₂) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin)) in jedes Well gegeben. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Platte in diesem Schritt keinem direkten Licht ausgesetzt wurde. Nach 20 Minuten wurden 50 μ l pro Well Stopplösung (2N H₂SO₄) hinzugefügt und vorsichtig durch Schwenken vermischt. Im Anschluss erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte (Wellenlänge: 450 nm, Referenz: 540 nm). Anhand der photometrischen Daten konnte nun basierend auf Vergleichen mit einer Standardkurve die Bestimmung der IL-1 β - bzw. IL-6- Konzentration erfolgen.

4.10 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz-(ESR-)Spektroskopie stellt ein Verfahren dar, bei dem die Wechselwirkung zwischen magnetischen und elektrostatischen Feldern mit ungepaarten Elektronen der zu untersuchenden Substanzen genutzt wird. Daraus werden charakteristische Spektren erzeugt. Dabei wird der Eigendrehimpuls (Spin) von ungepaarten Elektronen genutzt, um den Elektronen ein magnetisches Moment zu verleihen. Die daraus resultierenden Absorptionsspektren werden genutzt, um chemische Verbindungen, die ungepaarte Elektronen enthalten, voneinander zu unterscheiden. Da ungepaarte Elektronen als freie Radikale hochreaktiv sind und somit eine sehr geringe Halbwertszeit besitzen, um ausreichend zu akkumulieren, sind sie nicht direkt detektierbar. Deshalb müssen sie durch Kopplung an stabilere Träger mit längerer Halbwertszeit – sogenannte Spin traps – detektierbar gemacht werden. Es handelt sich dabei in der Regel um organische Moleküle, die in der Lage sind, Radikale zu binden (ROHN, KROH, 2005).

Zur Bestimmung der Superoxidproduktion als Marker für zellulären oxidativen Stress wurde als Spin trap 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin (CMH) verwendet. Die wie oben beschriebenen isolierten PBMCs wurden in 200 µl Krebs-HEPES Puffer (KHB) suspendiert. Dieser enthielt zusätzlich 25 µM Deferoxamin (Noxygen) und 5 µM Diethyldithiocarbamat (DETC) als Chelatoren, um ungebundenes Eisen zu binden. CMH (200 µM, 6 µl pro 200 µl KHB) wurde hinzugefügt und die Zellen anschließend mit ApoC3 (50 µg/ml) oder LPS (100 ng/ml) über eine Stunde bei 37 Grad Celsius und 5% Kohlenstoffdioxid inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Überstandes mit dem Bruker e-scan Spektrometer (Bruker Biospin) gemessen. Im Detail wurde hierfür die Suspension blasenfrei in eine Mikrokapillare aspiriert und diese anschließend mit einem Versiegelungskitt verschlossen. Die Messung erfolgte mit einer Mikrowellenleistung von 18,11 mW und einer Modulationsamplitude von 2,3 G. Das Magnetfeld wurde dabei wie folgt konfiguriert: center field 3484,5 g sweep time 5,24 s, field sweep 16 G. Jede Probe wurde hierbei insgesamt fünfmal gemessen, zudem erfolgten Messungen zur Berechnung des Hintergrundsignals, dazu wurden 48,5 µl KHB-Chelatorenlösung (25 µM Deferoxamin, 5 µM Diethyldithiocarbamat) mit 1,5 µl CMH (200 µM) vermischt.

4.11 Fluoreszenzmarkierung von ApoC3 unter Verwendung von Atto-488

Atto-488 ist ein Fluoreszenzmarker, der besonders zur Einzelmoleküldetektion und Durchflusszytometrie geeignet ist.

Zur Fluoreszenzmarkierung von ApoC3 wurde 1 mg ApoC3 in PBS auf ein Volumen von 170 µl verdünnt. Anschließend wurde Atto-488 in Natriumbicarbonat-Puffer (1 M pH 8,5) gelöst und hinzugefügt. Die Lösung wurde nun für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde das markierte ApoC3 durch Gelfiltration aufgereinigt.

4.12 Konfokalmikroskopie

Anders als ein konventionelles Lichtmikroskop beleuchtet ein Konfokalmikroskop nur einen kleinen Ausschnitt eines Präparates. Es entstehen optische Schnittbilder des Präparates. Diese ermöglichen es, einzelne Schichten des jeweiligen Gewebes zu analysieren.

Humane Monocyten wurden hierfür auf Kammerobjektträger ausgesät und für eine Stunde (37°C, 5% CO₂) mit Atto-488-ApoC3 bzw. Atto-488-ApoC3 inkubiert. Die genaue Abfolge der Färbung ist in **Tabelle 12** aufgelistet.

Reagenz	Inkubationszeit	Bedingung
PBS	Spülen	Waschschritt
PBS	Spülen	Waschschritt

50 µg/ml Atto-488-nApoC3 bzw. Atto-488-gApoC3	60 Minuten	37°C, 5% CO ₂ Inkubation (g)ApoC3
4% Paraformaldehyd	20 Minuten	Fixierung
PBS	Spülen	Waschschritt
PBS	Spülen	Waschschritt
0,1 % Triton X-100	15 Minuten	Permeabilisierung
PBS	Spülen	Waschschritt
PBS	Spülen	Waschschritt
1 % BSA	30 Minuten	Blocken von unspezifischen Bindungsstellen
20 µM Draq5 (1 µl in 250 µl 1 % BSA)	15 Minuten	37°C
PBS	Spülen	Waschschritt

Tabelle 12 - Abfolge der Färbung von ApoC3 inkubierten humanen Monocyten. Falls nicht anders aufgeführt bei RT und im Dunkeln.

Draq5 ist ein DNA-Farbstoff, der Färbung der Nuclei eingesetzt wurde. Die Bilder wurden im Anschluss mittels Konfokalmikroskop aufgenommen und mithilfe der ZEN-Software ausgewertet. Die verschiedenen Gruppen wurden verblindet analysiert.

4.13 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik zur Untersuchung und Charakterisierung von Zellen. Sie basiert auf dem laminaren Fluss von Zellen in einer Trägersubstanz durch eine Küvette. Dabei ist der Durchmesser der Küvette so gering, dass die Zellen sich einzeln hintereinander aufreihen. Die Zellen werden nun mittels Laser angestrahlt, das Streulicht und das reflektierte Licht werden von Detektoren aufgenommen. In Abhängigkeit von der Verteilung des Lichtes lassen sich Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zelle schließen. Zur weiteren Differenzierung besteht die Möglichkeit, zelluläre Proteine mit Fluorochrom-markierten Antikörpern zu markieren. Diese werden wiederum durch die Strahlung des Lasers angeregt und emittieren selbst Strahlung mit einer charakteristischen Wellenlänge. Durch die Verwendung von verschiedenen Fluorochromen mit unterschiedlichen Wellenlängen ist es möglich, verschiedene Antigene der Zellen zu markieren und zu differenzieren. Hierfür kommen verschiedene teildurchlässige Spiegel und Filter zum Einsatz um das Licht von verschiedenen Wellenlängen auf die entsprechenden Detektoren zu isolieren.

Die bereits oben beschriebenen HEK293-Zellen oder PBMCs wurden mit Atto-488-markiertem ApoC3/gApoC3 (50 µg/ml) für eine Stunde inkubiert (37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann in 500 µl FACS-

Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurden sie mittels FACS (BD FACSCanto II) wie oben beschrieben analysiert. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software FlowJo Software.

4.14 Histologie und Immunfluoreszenz

Es kamen verschiedene Standardfärbungen zum Einsatz, diese wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt. Zum Einsatz kamen Hämatoxylin/Eosin Färbung, Picro-Siriusrot Färbung und Gomori-Trichromfärbung. **Tabelle 13** fasst die verwendeten Färbungen mit Zuordnung von Funktion und Darstellung in der Mikroskopie zusammen.

Färbung	Funktion	Ergebnis
Hämatoxylin/Eosin	Übersichtsfärbung	Zellkerne dunkelblau, Zellplasma zartrosa-rot
Sirius-Rot	Kollagenfärbung	Zellkerne braun-schwarz, Muskulatur, Zytoplasma gelb, Kollagen rot
Gomori-Trichromfärbung	Kollagenfärbung	kollagenes Bindegewebe grün, Zellkerne schwarz, Muskulatur blaßrot
F4/80	Makrophagen	Antigen rot, Zellkerne blau
Ly-6G/Ly-6C	Neutrophile Granulocyten	Antigen rot, Zellkerne blau
DKK3	Tubulärer Stressmarker	Antigen rot, Zellkerne blau

Tabelle 133 - Zusammenfassung der verwendeten Färbungen mit Zuordnung von Funktion und Darstellung in der Mikroskopie

4.14.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung dient in erster Linie als Übersichtsfärbung zur morphologischen Untersuchung der Gewebeschnitte. Sie färbt basophile Strukturen wie DNA, Zellkerne, Ribosome und das rER blau und azidophile Strukturen wie Proteine Zytoplasma, Mitochondrien, das sER und Kollagen rot.

Zur Durchführung der Färbung wurden die vom Paraffinblock angefertigten Schnitte (3 µm) auf einen Objektträger übertragen. Anschließend wurden sie im Brutschrank bei 57 °C für 30 Minuten angetrocknet. Hiernach erfolgte die Färbung. Dazu wurden die Schnitte, wie in **Tabelle 14** dargestellt, aufgearbeitet. Xylol diente zur Entparaffinierung der Schnitte, die absteigende Alkoholreihe in Verbindung mit dem destillierten Wasser zur Rehydratation.

Reagenz	Inkubationszeit
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten
100 % Alkohol	5 Minuten
100 % Alkohol	5 Minuten
90 % Alkohol	5 Minuten
80 % Alkohol	5 Minuten
70 % Alkohol	5 Minuten
Destilliertes Wasser	5 Minuten

Tabelle 14 - Entparaffinierung und Rehydratation der Präparate.

Nach der Rehydratation erfolgte die Färbung mit saurem Hämalaun nach Mayer für zehn Minuten. Dadurch wurden initial sowohl Zellkern als auch Zellplasma rot eingefärbt. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation in Leitungswasser für 15 Minuten. Die hierin enthaltenen Mineralspuren führten zu einer pH-Verschiebung vom sauren Milieu zum Neutralpunkt. Dadurch gab das Zellplasma den basischen Farbstoff ab, während die Zellkerne ihn behielten und sich dabei von rotbraun zu blau färben. Nun wurde das Präparat über eine Minute in Eosinlösung (0,1%) gegeben. Die angesäuerte Lösung führte zur Färbung von Zellplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern. Die Zellkerne nahmen den sauren Farbstoff aufgrund der Verschiebung des Milieus nicht mehr auf.

Danach erfolgte das Abspülen mit destilliertem Wasser. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung und Fixierung des Präparates wie in **Tabelle 15** dargestellt.

Reagenz	Inkubationszeit
Destilliertes Wasser	Spülen
70 % Alkohol	Spülen
80 % Alkohol	Spülen
90 % Alkohol	Spülen
100 % Alkohol	5 Minuten
100 % Alkohol	5 Minuten
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten

Tabelle 15 - Entwässerung und Fixierung der Präparate.

Abschließend wurde das Präparat mit Eindeckmedium überschichtet und mit einem Deckglas verschlossen.

4.14.2 Sirius-Rot Färbung

Die Sirius-Rot Färbung dient zur Färbung von kollagenem Bindegewebe. Dabei wird die natürliche Doppelbrechung von kollagenem Bindegewebe verstärkt. In Kombination mit Polarisationsmikroskopie dient sie als selektives Verfahren zur Erfassung von Kollagenfasern.

Die Färbung erfolgte in mehreren Schritten, diese sind in **Tabelle 16** abgebildet.

Reagenz	Inkubationszeit
Eisenhämatoxylin nach Weigert	2 Minuten
Eosinlösung (0,1 %)	1 Minute
Leitungswasser	Spülen
Destilliertes Wasser	Spülen
Pikro-Siriusrot-Lösung	60 Minuten
Verdünnte Essigsäure	Spülen
100 % Alkohol	5 Minuten
100 % Alkohol	5 Minuten
Xylol	10 Minuten
Xylol	10 Minuten

Tabelle 16 - Reihe zur Färbung, Entwässerung, Fixierung der Präparate.

Das grob disperse Siriusrot färbt das lockere Bindegewebe an, während die fein disperse Pikrinsäure die dicht strukturierte Muskulatur markiert. Durch die erneute Ansäuerung der Zellkerne bewirkt die Pikrinsäure zudem die Farbänderung der Zellkerne von blau auf dunkelbraun.

In diesem Fall wurde keine schrittweise Konzentrationssteigerung angewandt, da niedrige Alkoholkonzentrationen zu einer Auslösung des Farbstoffes geführt hätten. Das Präparat wurde mit Eindeckmedium überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt. Als Ergebnis der Färbung zeigten sich die Zellkerne braun-schwarz, Muskulatur und Zytoplasma gelb und Kollagen rot.

4.14.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die immunhistochemische Färbung mit F4/80 Antikörpern dient zur Markierung von Makrophagen. Das F4/80 Antigen ist ein Oberflächenrezeptor, der zur EGF-TM7 Familie gehört. Es wird auf der Mehrheit der ausgewachsenen Makrophagen exprimiert, jedoch auch auf peritonealen Eosinophilen, Langerhanszellen und anderen dendritischen Zellen. Die immunhistochemische Färbung mit Ly-6G/Ly-6C-Antikörpern dient zur Markierung von

neutrophilen Granulocyten. Ly-6G ist auch als Myeloid-Differenzierungsantigen Gr1 bekannt, dieses tritt im Rahmen der Entwicklung der Myeloidzellreihen im Knochenmark auf. Auch Monocyten exprimieren es vorübergehend, jedoch nur während ihrer Entwicklung im Knochenmark. Dickkopf-3 ist ein Stressmarker der von tubulären Epithelzellen exprimiert wird. Er ist mit einem zeitnahen Risiko für das Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung und das Auftreten eines akuten Nierenversagens assoziiert (SCHUNK et al., 2021b). Die Quantifizierung der DKK3-positiven Areale dient somit als Marker für einen ablaufenden pathologischen Prozess im betroffenen Nierengewebe. Die immunhistochemische Färbung erfolgt durch DKK3-Antikörper.

Die immunhistologische Färbung erfolgte jeweils nach der ABC-Methode mit Tyramidverstärkung. Hierbei wurde der Avidin-Biotin-Komplex verwendet, der im weiteren Verlauf an den biotinylierten Sekundär-Antikörper bindete. Durch die Amplifikation mit biotinyliertem Tyramid wurde eine Verstärkung des initial schwachen Signals bewirkt. Zudem erfolgte bei dieser Technik die Eindeckung mit dem Kernfarbstoff DAPI um zusätzlich die Zellkerne blau zu färben. Die Arbeitsschritte des ersten Tages sind in **Tabelle 17** dargestellt.

Reagenz	Inkubationszeit	Bedingung
	60 Minuten	56°C
Xylol	10 Minuten	
Xylol	10 Minuten	
100 % Alkohol	5 Minuten	
100 % Alkohol	5 Minuten	
90 % Alkohol	5 Minuten	
80 % Alkohol	5 Minuten	
70% Alkohol	5 Minuten	
Destilliertes Wasser	1 Minute	
1% H ₂ O ₂	5 Minuten	
Destilliertes Wasser	1 Minute	
Na-Citratpuffer	20 Minuten	95°C
Na-Citratpuffer	10 Minuten	Abkühlen
Destilliertes Wasser	4 Minuten	
PBS	5 Minuten	
TNB-Puffer	30 Minuten	
Primärer Antikörper (1:100)	über Nacht	4°C, feuchte Kammer

Tabelle 17 - Immunfluoreszenz-Färbung Tag 1.

Die Primärantikörper stellten hierbei wie oben beschrieben jeweils Anti-Mouse F4/80 Antigen purified (rat IgG2a), (e Bioscience); Anti-Mouse ly-6G (GR-1) purified (rat IgG2b, kappa) (e Bioscience) bzw. Anti-DKK3 (Abcam) dar. Die Verdünnung der Antikörper auf die Zielkonzentration (1:100) erfolgte mit TNB. Nach der Inkubation über Nacht wurde die Färbung am zweiten Tag, wie in **Tabelle 18** abgebildet, fortgeführt.

Reagenz	Inkubationszeit	Bedingung
	60 Minuten	37°C
PBS	10 Minuten	
Sekundärer Antikörper (1:200)	45 Minuten	
PBS	10 Minuten	
Streptavidin-Merretichperoxidase	30 Minuten	
PBS	10 Minuten	
Tyramid-Gebrauchslösung	10 Minuten	
PBS	10 Minuten	
Texas-Red	30 Minuten	37°C
PBS	10 Minuten	
Mounting Medium with DAPI		Eindecken

Tabelle 18 - Immunfluoreszenz-Färbung Tag 2.

Bei den Sekundären Antikörpern handelte es sich um biotinylierte Detektionsantikörper jeweils Goat anti rabbit (Invitrogen) (DKK3) bzw. Goat anti rat (Invitrogen) (F4/80 und Ly-6G/Ly-6C) mit einer Verdünnung von 1:200 in TNB. Nach der erfolgten Färbereihe wurden die Schnitte bei 4°C über 24 Stunden in einer Schachtel lichtgeschützt ausgehärtet. Als Endergebnis stellten sich die Antigen-Antikörper-Komplexe in der Fluoreszenzmikroskopie rot dar, die Zellkerne blau.

Die Bilder wurden mittels Zeiss Axio Imager 2 angefertigt und der Software ZEN ausgewertet. Die Ly6G, F4/80 und DKK3 Expression wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Dabei wurde zur Quantifizierung der positiven Areale die Software Image J verwendet. Die verschiedenen Gruppen wurden verblindet analysiert.

4.15 Niereninsuffizienzmodell mittels Adenindiät bei Mäusen

C57Bl6/J-Mäuse wurden basierend auf einem klassischen Niereninsuffizienzmodell einer Adenindiät (0,2%, Altromin) zugeführt. Die Kontrollgruppe wurde währenddessen mit

Standardfutter (Altromin) gefüttert. Es erfolgte gemäß den geltenden Tierschutzrichtlinien ein engmaschiges Monitoring der Tiere mit regelmäßigen Gewichtskontrollen. Nach 14 Tagen erfolgte die Euthanasie mit anschließender Entnahme der Nieren. Die gewonnenen Organe wurden aufgeteilt und jeweils in Formalin fixiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.16 Humanisierte Mäuse

Die Isolation von PBMCs von gesunden menschlichen Spendern erfolgte wie oben beschrieben. Die isolierten Zellen wurden durch magnetische Zellseparation weiter aufgeteilt, um ausschließlich Monocyten zu erhalten. Hierfür wurden humane CD14 MicroBeads (an Magnetpartikel gekoppelte Antikörper - Miltenyi Biotec) verwendet. CD14 wird in hohem Maße auf Monocyten exprimiert, in niedrigerem Maße auf Granulocyten und manchen dendritischen Zellpopulationen. Für die Zellseparation wurden im ersten Schritt die zu isolierenden Zellen mithilfe eines Antikörpers gegen CD14 markiert. Diese Antikörper waren wiederum an spezielle Magnetpartikel gekoppelt, die es im weiteren Verlauf ermöglichten, die Zellen beim Durchfluss durch ein magnetisches Feld zurückzuhalten. Die Zellen verblieben dadurch in der Durchflusssäule, während alle unmarkierten Zellen aussortiert wurden. Im Detail wurde nach Bestimmung der Zellzahl (vgl. Zellzählung Neubauer-Zählkammer unter 4.8) die Zellsuspension bei 300 g für zehn Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand komplett abpipettiert. Nun wurde das Zellpellet in 80 µl Pufferlösung pro 10^7 Zellen resuspendiert. Dazu wurden 20 µl der CD14 MicroBeads pro 10^7 Zellen gegeben. Die Suspension wurde gründlich durchmischt und anschließend für 15 Minuten bei 2-8 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1-2 ml Puffer pro 10^7 Zellen gewaschen und für zehn Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun erneut abpipettiert. Die Zellen wurden jetzt in 500 µl Pufferlösung resuspendiert. Die Säule für die magnetische Separation wurde im magnetischen Feld des MACS Separators platziert. Es wurden 3 ml Pufferlösung in die LS Säule gefüllt. Anschließend wurde die Zellsuspension eingefüllt. Die unmarkierten Zellen liefen nun durch die Säule hindurch, während die markierten Zellen zurückgehalten wurden. Nun wurde die LS Säule jeweils dreimal mit 3 ml Pufferlösung gewaschen. Im Anschluss wurde die LS Säule aus dem Separator entfernt und über einem Falcon platziert. Die LS Säule wurde mit 5 ml Pufferlösung gefüllt. Danach wurde der zugehörige Kolben genutzt, um die magnetisch markierten Zellen aus der LS Säule zu lösen. Zum Abschluss wurden die separierten Zellen durchflusszytometrisch auf Ihre Reinheit überprüft. Die Zellen wurden sofort nach Isolation in NOD-SCID Mäuse transplantiert (vgl. 4.17, 4.18).

4.17 Carotisschädigungsmodell bei Mäusen

Das Modell der perivaskulären Carotisschädigung ist ein klassisches vaskuläres Schädigungsmodell. Das Modell ermöglicht es, den Einfluss von verschiedenen Stimulanzen auf die Re-Endothelialisierung nach vaskulärer Schädigung zu untersuchen.

Das Modell erfolgte bei immuninkompetenten NOD-SCID Mäusen. Die Narkose wurde mittels Isofluran durchgeführt. Nach Applikation von Dexpanthenol-Augensalbe, um ein Austrocknen der Augen während des Eingriffs zu verhindern, wurden die Mäuse auf einer Wärmematte platziert, um eine Hypothermie zu vermeiden. Die linke Arteria carotis communis wurde operativ freigelegt und anschließend elektrisch mittels bipolarer Pinzette geschädigt. Dabei wurde über eine Strecke von 4 mm jeweils 2 Sekunden pro Millimeter ein elektrischer Strom von 2 W angewandt. Nach sorgfältigem Vernähen der Wunde erfolgte eine Injektion von CD14⁺ humanen Monocyten (10⁷ Zellen) (vgl. 4.16) und nApoC3 bzw. cApoC3 (50 µg/ml Blutvolumen) über die Schwanzvene. Eine Woche nach Injektion erhielten die Tiere eine intravenöse Evans Blau-Injektion, um die deendothelialisierten Bereiche der A. carotis zu färben. Nach 45 Minuten erfolgte die Euthanasie und die A. carotis wurden entnommen. Abschließend wurde das reendothelialisierte Areal mikroskopisch quantifiziert (ZEWINGER et al., 2020).

4.18 Unilaterales Ureterschädigungsmodell bei Mäusen

Das Modell der unilateralen Ureterligatur ist ein häufig angewandtes tierexperimentelles Nierenschädigungsmodell, bei dem es durch die gezielte Ligation eines Ureters zu einer einseitigen Nierenschädigung kommt.

Die unilaterale Ureterligatur erfolgte bei immuninkompetenten NOD-SCID Mäusen. Die Narkose wurde mittels Isofluran durchgeführt. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde Dexpanthenol-Augensalbe appliziert. Die Mäuse wurden auf einer Wärmematte platziert, um eine Hypothermie zu vermeiden. Nach Einleitung der Narkose mittels Isofluran erfolgte das gründliche Desinfizieren des OP-Gebietes und die Fixierung der Maus in Rückenlage. Hiernach erfolgte eine Inzision am unteren, linken Abdomen. Der Ureter wurde freigelegt und anschließend mit 6/0 Prolene-Nähten ligiert. Die Wunde wurde sorgfältig verschlossen. Anschließend erfolgte die intravenöse Injektion von 10⁷ PKH67 markierten CD14⁺ humanen Monocyten (vgl. 4.16) über die Schwanzvene. Die Injektion erfolgte zusammen mit nApoC3 bzw. gApoC3 (50 µg/ml Blutvolumen). Die Mäuse wurden nach fünf Tagen euthanasiert und die Nieren für die histologischen Analysen entnommen (ZEWINGER et al., 2020).

4.19 Quantifizierung und statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten unter der Verwendung von SPSS Version 25.0 und STATA IC 15 mit den Paketen „postrcspline“ und „traj“. Graphische Darstellungen wurden mithilfe von GraphPad Prism erstellt. Die in der experimentellen Studie abgebildeten Balkendiagramme geben jeweils den Mittelwert \pm den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Die statistischen Unterschiede wurden mittels Student's t-Test (zwei Gruppen) oder Varianzanalysen (mehr als zwei Gruppen) und Dunnett's Post-hoc-Tests analysiert, um das Signifikanzniveau zu ermitteln. In den klinischen Studien wurden die normalverteilten Daten als Mittelwert \pm SD dargestellt. Nicht-normalverteilte Daten wurden als Median mit Interquartilsabstand abgebildet. Um die statistischen Unterschiede zwischen den stetigen Variablen zu ermitteln, wurden One-Way ANOVA Tests verwendet. Die nichtlineare Assoziation zwischen der Intensität von gApoC3 und Mortalität, kardiovaskulären oder renalen Endpunkten wurde durch die Verwendung von Restricted cubic splines mit drei Knoten (0,000; 0,007; 0,0162) analysiert. Hierbei gibt die zentrale schwarze Linie den Mittelwert an und das umgebende graue Areal das zugehörige 95%-Konfidenzintervall. Die einzelnen Spikes zeigen die individuelle Verteilung der Messwerte. Die Analysen wurden für Alter, Geschlecht, prävalente kardiovaskuläre Erkrankungen, BMI, systolischen Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie adjustiert. Zusätzlich wurden Cox-Regressionsanalysen für die jeweiligen Endpunkte durchgeführt. Die Patienten wurden dabei in Abhängigkeit von der Intensität von gApoC3 in der Massenspektrometrie in Tertiale eingeteilt. Des Weiteren wurde für diese Gruppen die Assoziation zwischen ApoC3- bzw. Triglyceridplasmaspiegeln und Mortalität bzw. dem Erreichen der kardiovaskulären bzw. renalen Endpunkte (vgl. 4.4) mittels Cox-Regressionsanalysen analysiert. Um eine Assoziation zwischen der gApoC3 Intensität und jährlichen Veränderungen der errechneten glomerulären Filtrationsrate im Rahmen der Beobachtungsperiode darzustellen, wurden Gruppen-basierten Trajekturen der errechneten GFR erstellt. Dazu wurde das STATA Paket „traj“ verwendet. Die Herangehensweise basiert auf dem SAS PROC TRAJ Procedure (NAGIN et al., 2018), welches einem semiparametrischen Model für longitudinale Daten unter der Verwendung von maximaler Wahrscheinlichkeitsmethodik entspricht. Die optimale Anzahl von Gruppen wurde dabei mithilfe des Bayesschen Informationskriteriums ermittelt. Anschließend wurden multinominale logistische Regressionsanalysen durchgeführt, um die Assoziation zwischen der Intensität an gApoC3 und der Zugehörigkeit zu verschiedenen Trajekturengruppen zu ermitteln. Die Gruppe 1 wurde dabei als Referenz verwendet. Die Analysen wurden für Alter, Geschlecht, Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, BMI, systolischem Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie adjustiert. Ein zweiseitiger Signifikanzwert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

5.1 Identifikation von posttranslationaler Guanidinylierung von ApoC3

Wir führten im ersten Schritt Proteomanalysen von ApoC3 von gesunden Personen, Patienten mit chronischer Nierenerkrankung sowie isoliertem, nativem ApoC3 durch, mit dem Ziel posttranslationale Proteinmodifikationen von ApoC3 zu identifizieren. **Abbildung 3** zeigt die entsprechenden Massenspektrometrie-Analysen. Hierbei ließ sich am ApoC3 von Patienten mit CKD eine posttranslationale Guanidinylierung von Lysinresten nachweisen. Bei gesunden Personen und nativem ApoC3 traten diese nicht auf.

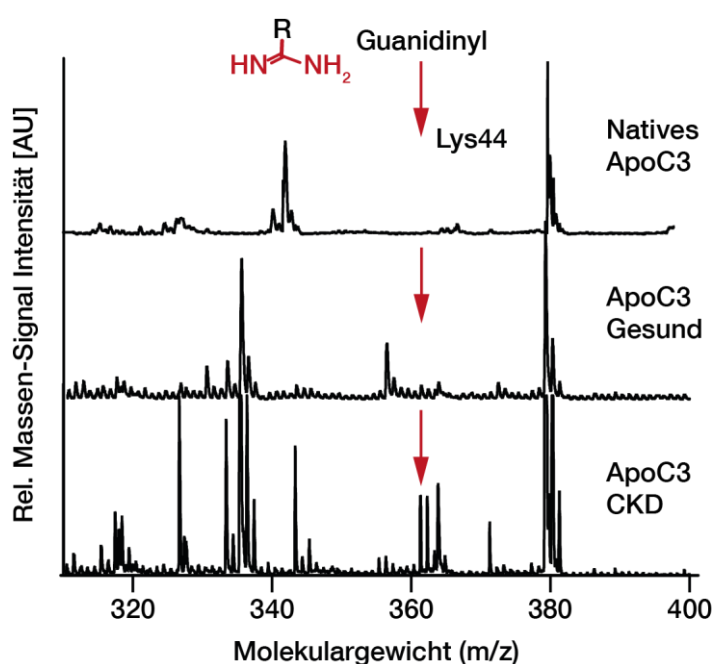


Abbildung 3 - Relative Massen-Signal Intensitäten von nativem ApoC3, ApoC3 von Gesunden und ApoC3 von CKD-Patienten. Die roten Pfeile markieren den guanidinylierten Lysinrest 44. *Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021*

Wie in **Abbildung 4** dargestellt, wurde die Intensität des Massen-Signals von gApoC3 in einem Patientenkollektiv von 543 CKD-Patienten bestimmt und nach der eGFR der Patienten aufgeschlüsselt. Es kommt zur Darstellung, dass die Intensität des Massen-Signals von gApoC3 bei Patienten mit einer eGFR unterhalb von 30 ml/min/1,73m² im Vergleich zu solchen mit einer GFR oberhalb von 60 ml/min/1,73m² signifikant erhöht war.

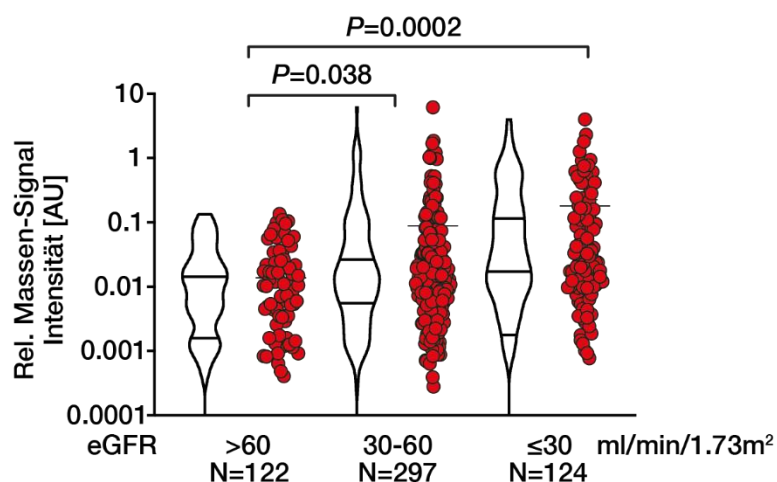


Abbildung 4 - Relative gApoC3 Massen-Signal Intensitäten von 543 CKD Patienten aufgeteilt nach ihrer eGFR entsprechend der KDIGO-Leitlinien (KDIGO, 2012).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Abbildung 5 stellt die 3-dimensionale Struktur von humanem ApoC3 dar. Dabei sind die Lysinreste, an denen die posttranslationale Guanidinylierung nachgewiesen wurde markiert.

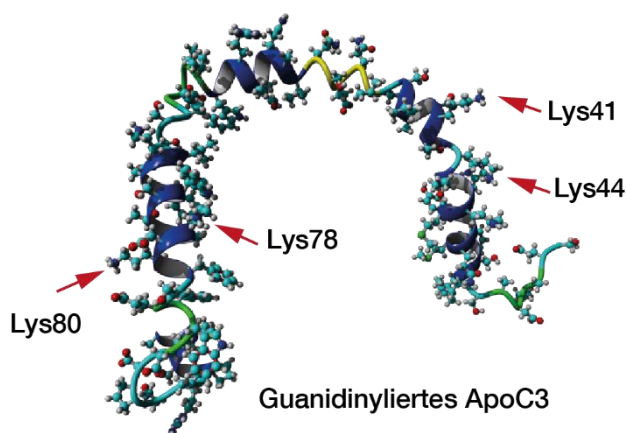


Abbildung 5 - 3-dimensionale Darstellung der Struktur von humanen ApoC3. Die roten Pfeile markieren Lysinreste an denen posttranslationale Guanidinylierungen nachgewiesen wurden.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.2 Entstehung der Guanidinylierung

In einem weiteren Schritt sollten die Mechanismen untersucht werden, die bei einer CKD zur Guanidinylierung von ApoC3 führen. Hierzu wurde *ex vivo* natives ApoC3 mit Methylisoharnstoff, Guanidin und Harnstoff inkubiert und dann die Guanidinylierung mittels Massenspektrometrie quantifiziert. Bei allen vorgenannten drei Substanzen handelt es sich um Stoffe, die als klassische Urämietoxine bekannt sind und bei Nierenkranken im Blut akkumulieren. **Abbildung 6** zeigt Massenspektrometrie-Analysen von ApoC3 nach Inkubation mit Methylisoharnstoff, Guanidin oder Harnstoff. Es zeigte sich anhand der Intensität der Masseanalysen, dass durch die Inkubation mit allen drei Substanzen *ex vivo*

eine Guanidinylierung von ApoC3 induziert werden konnte. Diese ist jeweils durch einen roten Pfeil markiert. Bei Inkubation mit Harnstoff zeigte sich zudem eine Carbamylierung, wie sie bereits in verschiedenen Vorpublikationen beschrieben wurde (WANG et al., 2007). Die Guanidinylierung von ApoC3 mithilfe von Methylisoharnstoff wurde auch für alle weiteren *in vitro* und *in vivo* Experimente genutzt.

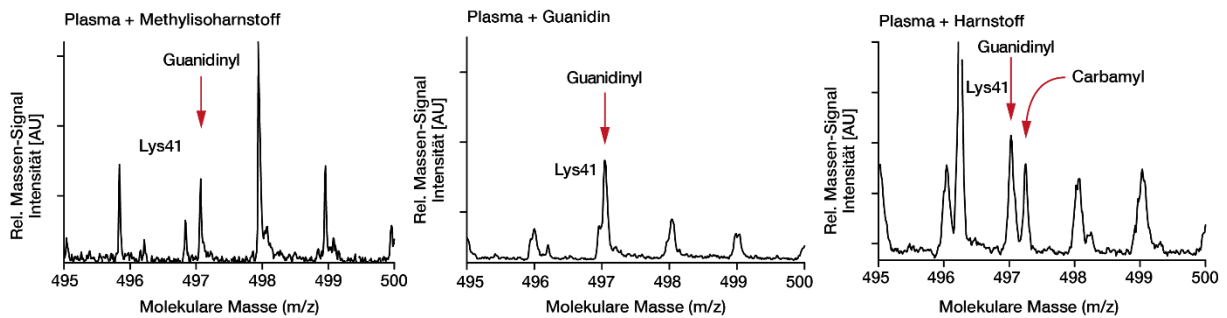


Abbildung 6 - Relative Massen-Signal Intensitäten von ApoC3 nach Inkubation von Plasma mit Methylisoharnstoff (1 mM), Guanidin (1 mM) oder Harnstoff (1 mM) mit Markierung von Guanidinylierung/Carbamylierung an Lysinresten. Die Inkubation erfolgte jeweils für 24 Stunden bei Raumtemperatur.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Der chemische Prozess der Guanidinylierung von Lysinresten ist in **Abbildung 7** dargestellt. Durch die ablaufende Reaktion kommt es zur Anlagerung einer Guanidin-Gruppe an Lysin mit Bildung von Homoarginin, also guanidinyliertem Lysin.

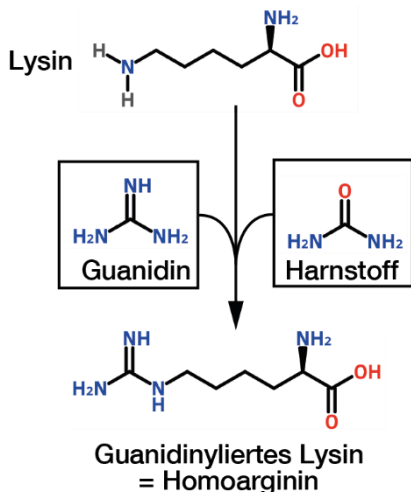


Abbildung 7 - Chemische Reaktion bei der Entstehung von guanidinyliertem Lysin (Homoarginin) durch Guanidin und Harnstoff.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Wir konnten zudem nachweisen, dass es durch Inkubation von nApoC3 mit steigenden und pathophysiologisch relevanten Harnstoffkonzentrationen zu einer dosisabhängigen Zunahme der Guanidinylierung von ApoC3 kam (**Abbildung 8**). Dabei konnte in der Massenspektrometrie in der Negativkontrolle ohne Harnstoff keine Guanidinylierung von ApoC3 nachgewiesen werden.

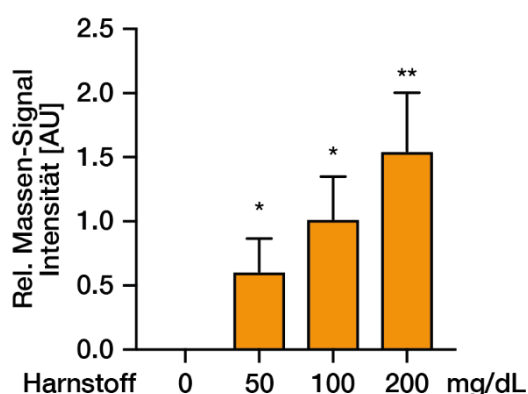


Abbildung 8 - Relative Intensität des Massen-Signals von gApoC3 nach Inkubation von ApoC3 (50 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Harnstoff (50 mg/dl, 100 mg/dl, 200 mg/dl). Die Inkubation erfolgte jeweils für 24 Stunden bei Raumtemperatur (n=4 pro Gruppe).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.3 CKD induziert die Guanidinylierung von ApoC3 *In Vivo*

Im nächsten Schritt wollten wir ermitteln, ob eine Niereninsuffizienz auch in einem murinen System zur Guanidinylierung führt. Hierfür wendeten wir ein klassisches Niereninsuffizienzmodell an, indem Mäuse einer Adenindiät (AD) unterzogen wurden, welches in **Abbildung 9** schematisch dargestellt ist.

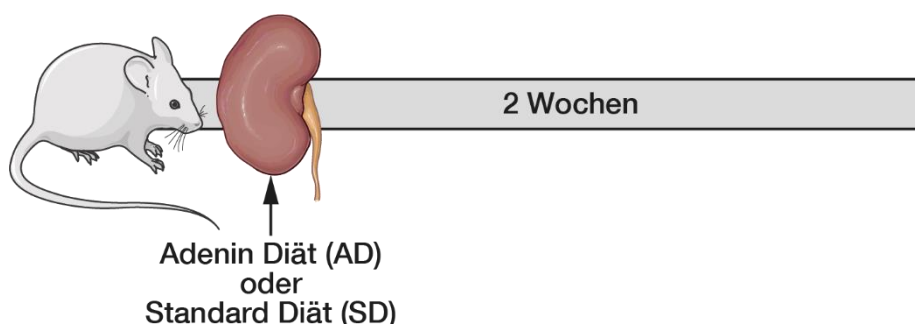


Abbildung 9 - Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs. C57Bl6/J-Mäuse erhielten für 2 Wochen eine Adenindiät (0,2 %) oder Standard Diät. Danach erfolgt die Euthanasie.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Die Wirksamkeit des verwendeten Niereninsuffizienzmodells wurde laborchemisch durch die Messung des Serumkreatinins sowie des Serumharnstoffs als relevante Nierenretentionsparameter nachgewiesen. In **Abbildung 10** ist das Serumkreatinin bzw. der Serumharnstoff nach zwei Wochen Adenindiät bzw. einer Standarddiät gegenübergestellt. Die Adenindiät führte bei beiden Parametern im Vergleich zur Standarddiät (SD) zu einem signifikanten Anstieg.

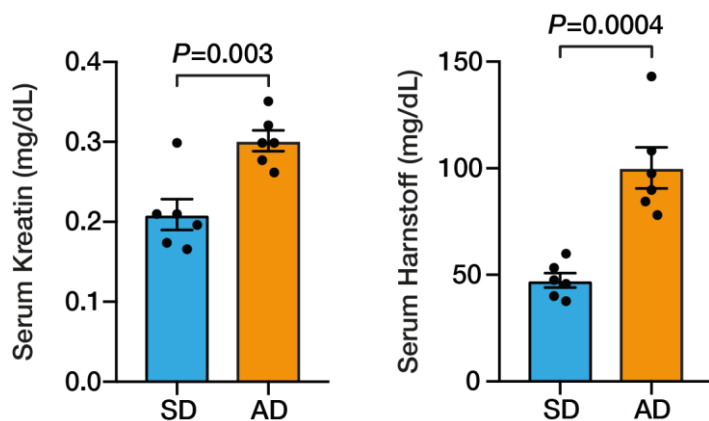


Abbildung 10 - Serumkreatinin bzw. Serumharnstoff nach 2 Wochen Standarddiät (SD) oder Adenindiät (AD) ($n=6$ pro Gruppe).

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Die **Abbildung 11** zeigt repräsentative Abbildungen von 2D-Proteomanalysen mit Darstellung des FLK*GYWSK* (m/z 1113,6) Fragmentes in den histologischen Schnitten der Niere. Bei Tieren, die eine Adenindiät erhalten haben, wurde eine deutliche Akkumulation von gApoC3 nachgewiesen. Dieser Effekt war in der Kontrollgruppe bei Tieren mit Standarddiät nicht zu beobachten.

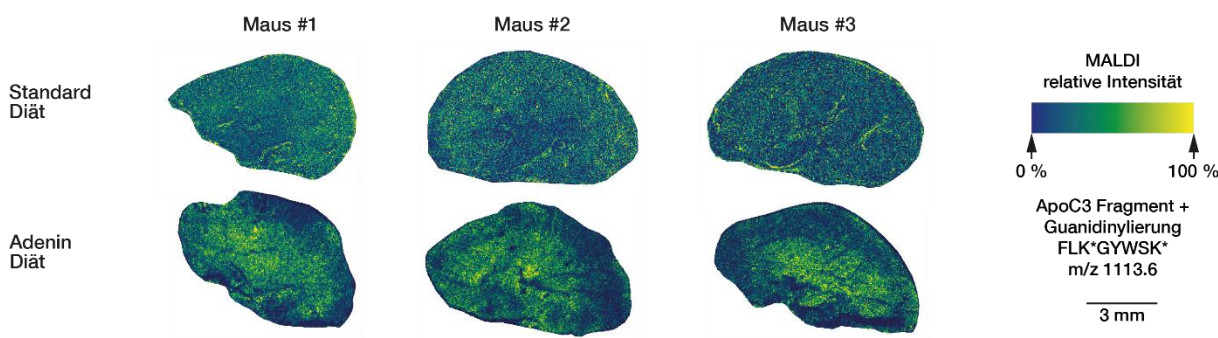


Abbildung 11 - Repräsentative Darstellung von 2-dimensionalen Proteomanalysen in denen das gApoC3 Fragment FLK*GYWSK* (m/z 1113,6) in Nieren nach Standard-Diät oder Adenin-Diät dargestellt ist ($n=3$ pro Gruppe).

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Wir konnten zusätzlich nachweisen, dass auch im Serum von Mäusen, die eine Adenindiät erhielten, nach zwei Wochen eine signifikante Anzahl von Lysinresten von ApoC3 guanidinyliert war. Im Plasma von Mäusen in der Standarddiät-Gruppe ließen sich hingegen keine Guanidinylierungen am ApoC3 nachweisen (**Abbildung 12**).

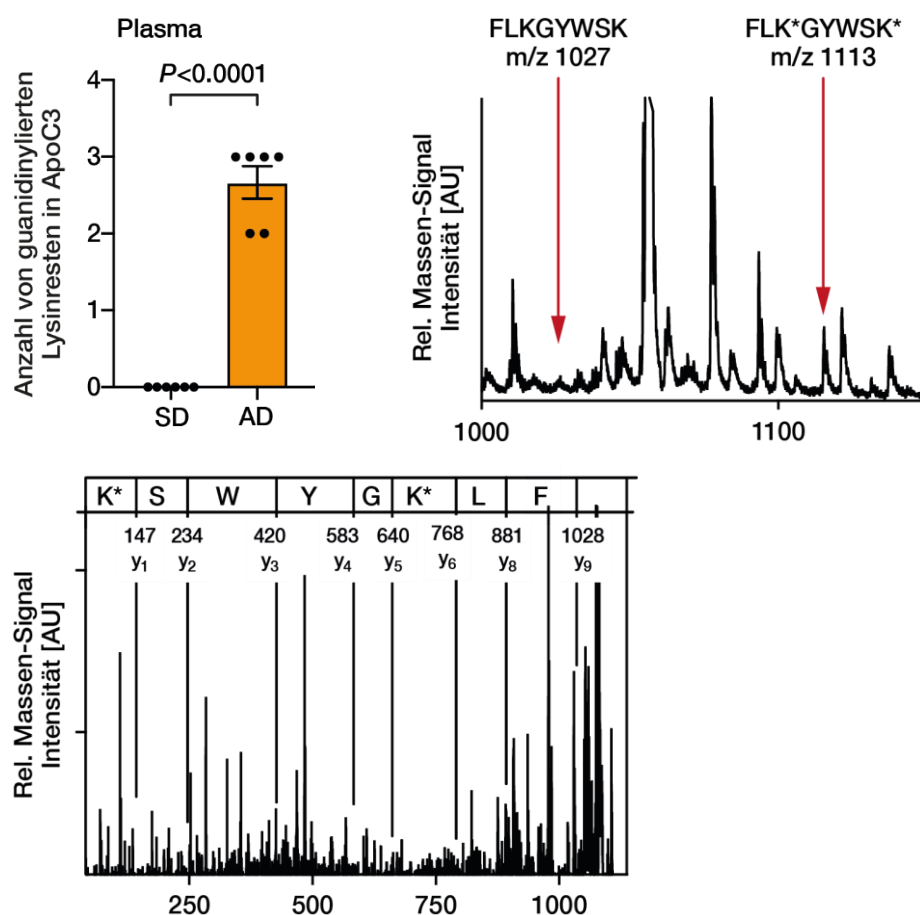


Abbildung 12 - Anzahl von guanidinylierten Lysinresten in ApoC3 im Plasma von Mäusen nach Standard-Diät oder Adenin-Diät für 2 Wochen ($n=6$ pro Gruppe). Repräsentatives Protein-Fingerprinting von ApoC3 aus dem Serum einer Maus nach 2 Wochen AD. Die roten Pfeile markieren jeweils das unmodifizierte Peptid FLKGYWSK (1027 Da) bzw. das modifizierte Peptid FLK*GYWSK* (1113 Da) von ApoC3. Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.4 Guanidinyliertes ApoC3 induziert Inflammation

Abbildung 13 stellt die Konzentration von IL-1 β bzw. IL-6, die mittels ELISA aus dem Überstand von humanen Monocyten gemessen wurden, dar. Die humanen Monocyten wurden zuvor jeweils entweder mit LPS, nApoC3 oder gApoC3 inkubiert. gApoC3 wurde hierfür mit Methylisoharnstoff in aufsteigender Konzentration guanidinyliert. In unstimulierten Monocyten kam es zu keiner relevanten Ausschüttung von IL-1 β . Die restlichen Gruppen zeigten jeweils eine gesteigerte Ausschüttung von IL-1 β . Diese war nach Stimulation mit nApoC3 deutlich höher als in der LPS Gruppe. Im direkten Vergleich zu nApoC3 führte die Inkubation mit carbamylisiertem ApoC3 (cApoC3) zu keinem relevanten Unterschied. Nach Stimulation der humanen Monocyten mit gApoC3 kam es jedoch in Abhängigkeit von der verwendeten Methylisoharnstoff-Konzentration und damit in Abhängigkeit von der Stärke der Guanidinylierung zu einer signifikant stärkeren Ausschüttung von IL-1 β . Diese Konstellation zeigte sich in ähnlicher Form auch für IL-6.

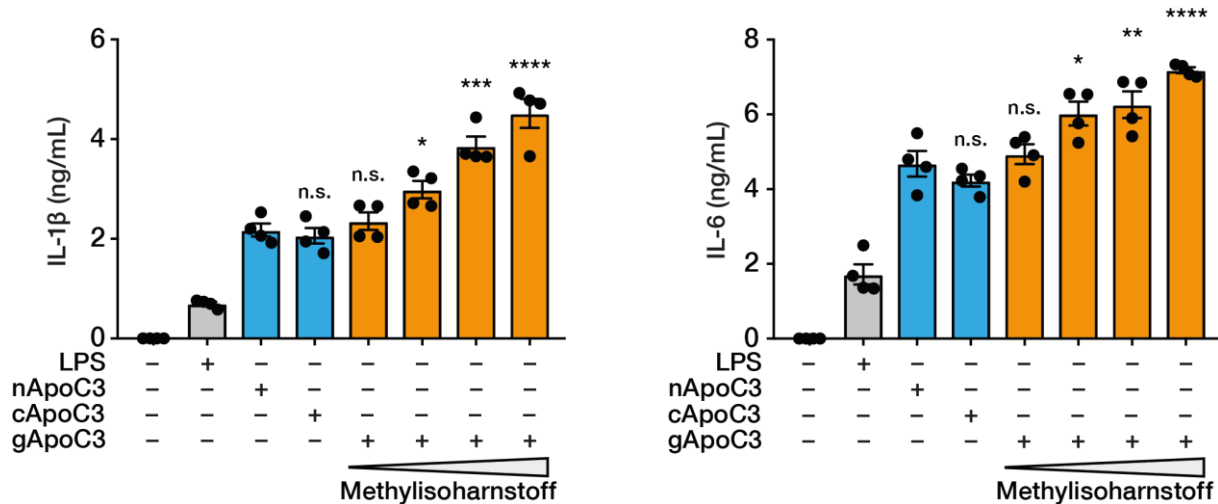


Abbildung 13 - Bestimmung von IL-1β bzw. IL-6 nach Stimulation von humanen Monocyten mit LPS (10 ng/ml, 16 h), nApoC3 (50 µg/ml, 16 h), cApoC3 (50 µg/ml, 16 h Inkubation) oder gApoC3 (50 µg/ml, 16 h Inkubation). gApoC3 ist dabei nach der zur Herstellung verwendeten Methylisoharnstoffkonzentration (1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M Inkubation 24 h, RT) in aufsteigender Konzentration aufgeteilt (n=6 pro Gruppe).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Aktuelle Publikationen konnten zeigen, dass die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle bei der ApoC3-vermittelten Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms spielt (ZEWINGER et al., 2020). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde im nächsten Schritt die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies von humanen Monocyten nach Stimulation mit LPS, nApoC3, cApoC3 oder gApoC3 mithilfe der Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie bestimmt (**Abbildung 14**). Hierbei zeigte sich, dass gApoC3 eine deutlich stärkere Produktion von Superoxid induziert als nApoC3 oder cApoC3.

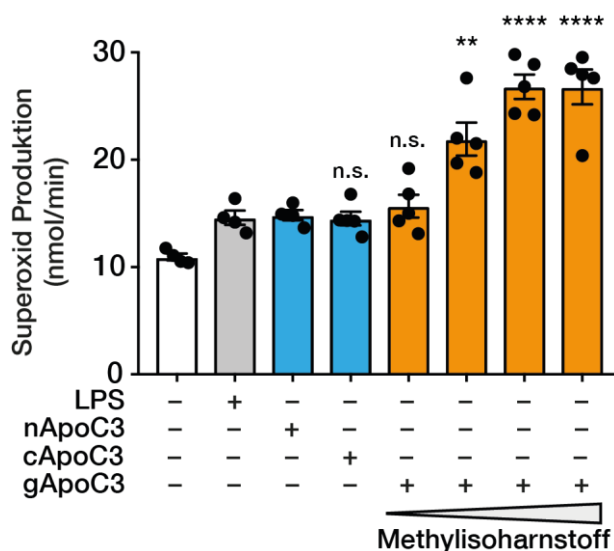


Abbildung 14 - Bestimmung der Superoxid-Produktion nach Stimulation von humanen Monocyten mit LPS (10 ng/ml, 16 h), nApoC3 (50 µg/ml, 16 h), cApoC3 (50 µg/ml, 16 h) oder gApoC3 (50 µg/ml, 16 h). gApoC3 ist dabei nach der zur Herstellung verwendeten Methylisoharnstoffkonzentration (1 mM, 10 mM, 100 mM, 1 M, Inkubation 24 h, RT) in aufsteigender Konzentration aufgeteilt (n=6 pro Gruppe).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Um eine mögliche Veränderung der Bindung von ApoC3 an humane Monocyten durch eine Guanidinylierung zu analysieren, wurden humane Monocyten mit Atto-488-markiertem nApoC3 bzw. gApoC3 inkubiert. **Abbildung 15** zeigt die durchflusszytometrisch quantifizierte Intensität von Atto-488 und damit die Bindung von ApoC3 an die Monocyten. Hierbei zeigte sich, dass die Guanidinylierung zu einer gesteigerten Bindung des ApoC3 an humane Monocyten führte.

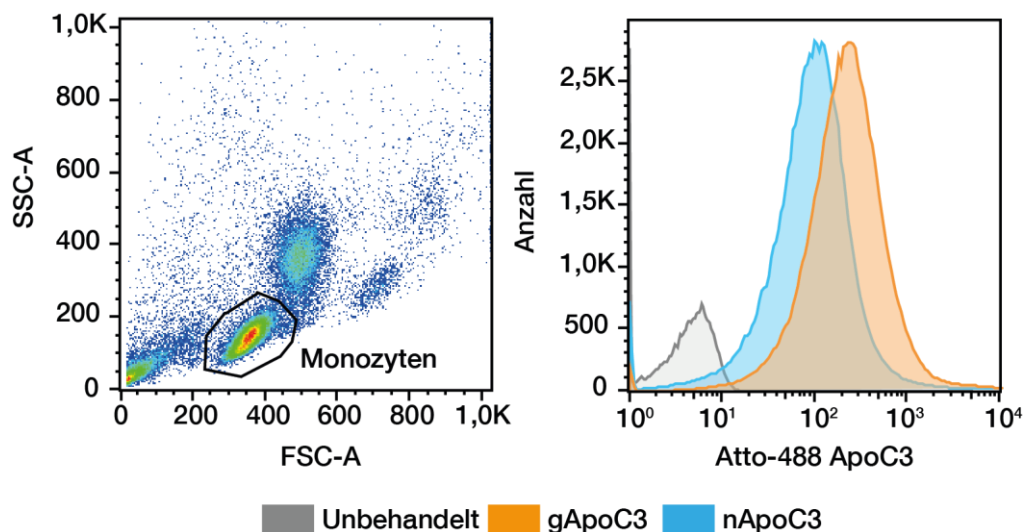


Abbildung 15 - Repräsentative Darstellung nach durchflusszytometrischer Analyse von Monocyten nach Inkubation mit Atto-488-nApoC3/ Atto-488-gApoC3 (50 µg/ml, 37°C, 1 h). Repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Die proinflammatorischen Effekte von ApoC3 werden unter anderem durch TLR2 und TLR4 vermittelt (ZEWINGER et al., 2020). Um den Effekt der Guanidinylierung auf die Bindung an diese Rezeptoren zu ermitteln, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) eingesetzt, die zuvor entweder mit *Tlr2* oder *Tlr4* Konstrukten transfiziert wurden. Durch die Transfektion exprimieren diese Zellen den jeweiligen Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Die transfizierten Zellen wurden nun jeweils mit Atto-488-markiertem nApoC3 bzw. gApoC3 inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 16** dargestellt. Während die Guanidinylierung auf die Bindung von ApoC3 an TLR2 keinen nachweisbaren Effekt aufwies, kam es im Vergleich zu nApoC3 zu einer deutlich gesteigerten Bindung von gApoC3 an TLR4.

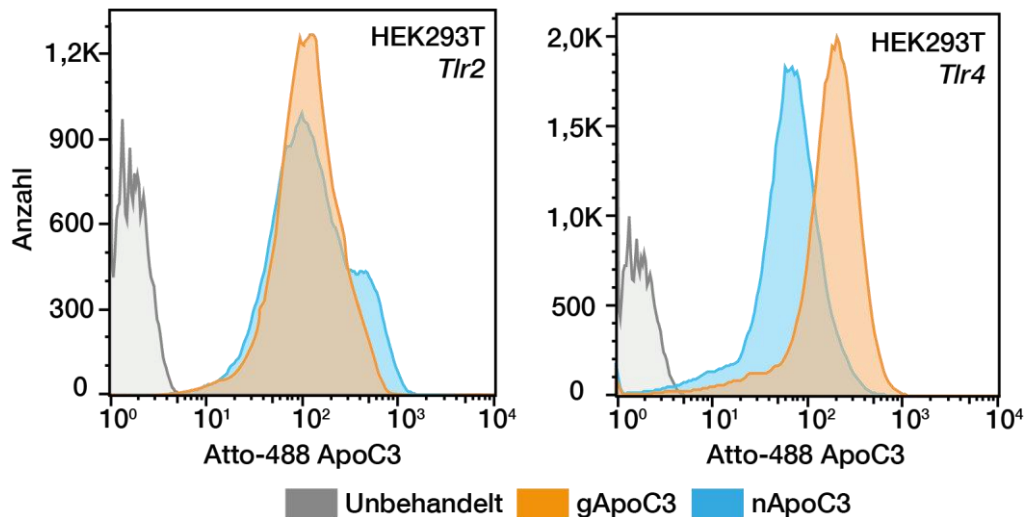


Abbildung 16 - Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von transfizierten HEK-Zellen (TLR2/TLR4) nach Inkubation mit Atto-488-nApoC3/ Atto-488-gApoC3 (50 µg/ml, 37°C, 1 h). Repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Die verstärkte Bindung von gApoC3 wurde zudem mittels Konfokalmikroskopie bestätigt.

Abbildung 17 zeigt repräsentative konfokalmikroskopische Abbildungen von humanen Monocyten, die mit Atto-488-gelabeltem nApoC3 bzw. gApoC3 inkubiert wurden. Die Aufnahmen zeigten dabei eine im Vergleich zum nApoC3 deutlich höhere Akkumulation von gApoC3 in humanen Monocyten.

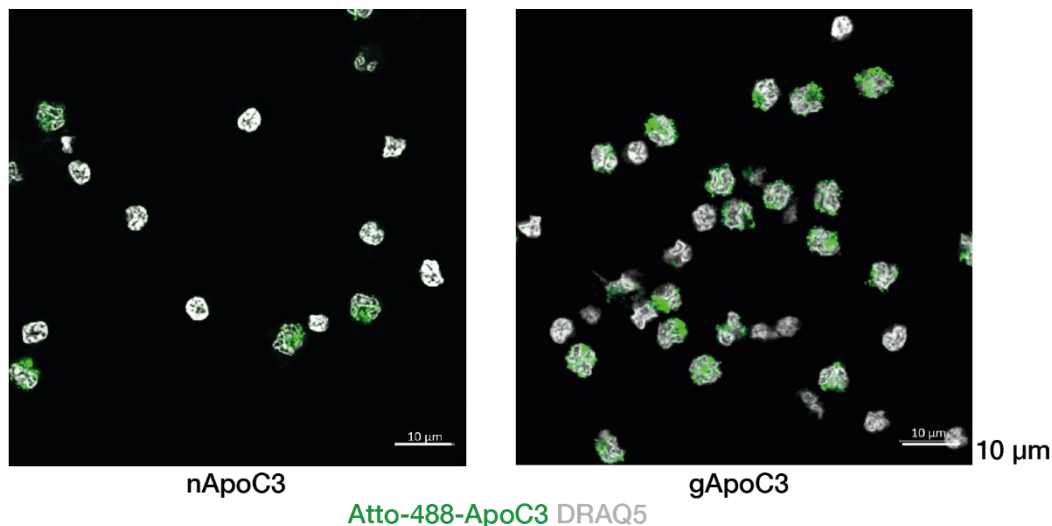


Abbildung 17 - Repräsentative Darstellung konfokalmikroskopischer Aufnahmen humaner Monocyten nach Inkubation mit Atto-488-nApoC3 / Atto-488-gApoC3 (50 µg/ml, 37°C). Repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.5 Guanidinyliertes ApoC3 hemmt die vaskuläre Regeneration und fördert Nierenschädigung bei humanisierten Mäusen

Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die ApoC3 vermittelte alternative Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auf das humane System beschränkt ist (ZEWINGER et al., 2020). Um nun die Relevanz der experimentellen Befunde in Krankheitsmodellen zu untersuchen, wurden humanisierte Mäuse verwendet.

Zunächst sollte hier der Einfluss von gApoC3 auf die vaskuläre Regeneration untersucht werden. **Abbildung 18** zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsablaufes. Immuninkompetente Mäuse wurden im ersten Schritt einer perivaskulären Carotisschädigung unterzogen. Anschließend erfolgte die Transplantation von humanen CD14⁺ Monozyten. Zusätzlich erhielten die Mäuse eine Injektion von nApoC3, gApoC3 bzw. PBS als Kontrollgruppe. Eine Woche nach Transplantation wurde Evans Blau injiziert und anschließend wurden die Tiere euthanasiert. Im Anschluss quantifizierten wir lichtmikroskopisch das re-endothelialisierte Areal der geschädigten A. carotis.

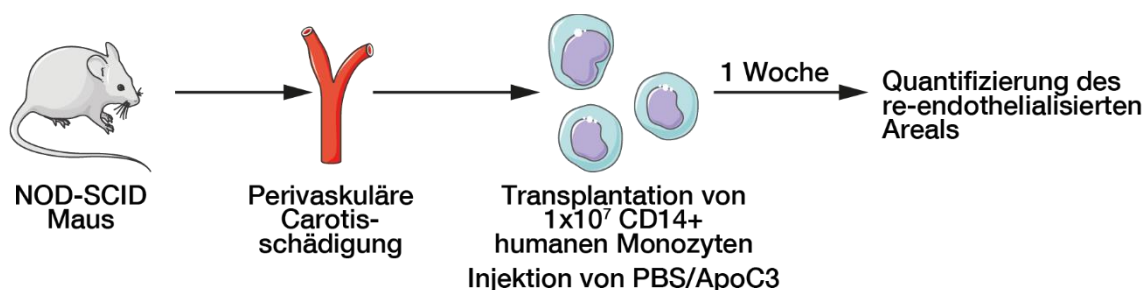


Abbildung 18 - Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes des perivaskulären Carotisschädigungsmodells in humanisierten Mäusen. Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Die **Abbildung 19** zeigt das re-endothelialisierte Areal eine Woche nach Durchführung des perivaskulären Carotis-Schädigungsmodells dar. Der Prozess der Re-Endothelialisierung bei der Gruppe, die gApoC3 erhalten haben, wurde deutlich stärker unterdrückt, als bei der Gruppe, die nApoC3 erhalten haben. Die Inhibition der Re-Endothelisation war hierbei von der verwendeten Methylisoharnstoffkonzentration abhängig. Je höher die zur gApoC3 Herstellung verwendete Methylisoharnstoffkonzentration war, also je stärker die Guanidinylierung von ApoC3 ausgeprägt war, desto stärker wurde die Re-Endothelisation unterdrückt (Abbildung 19)

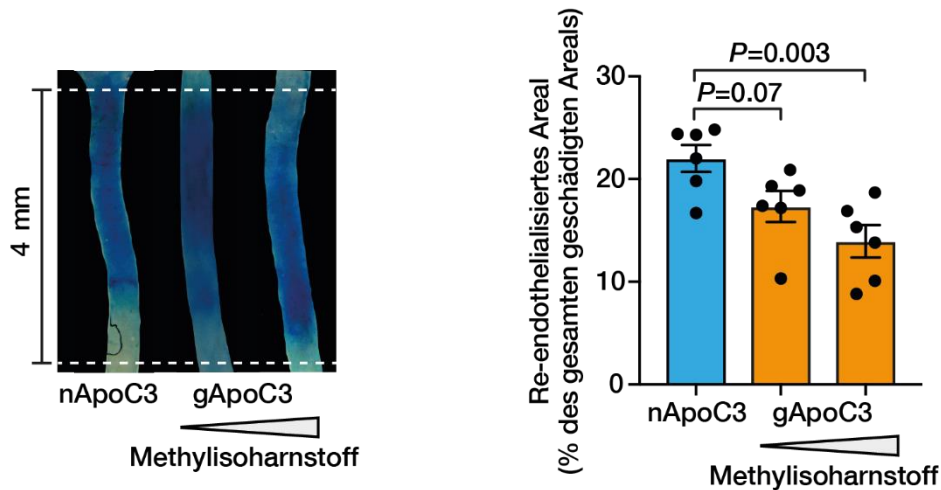


Abbildung 19 - Re-endothelialisiertes Areal eine Woche nach perivaskulärer Carotisschädigung bei humanisierten NOD-SCID Mäusen nach Injektion von nApoC3 / gApoC3 (jeweils 50 µg/ml Blutvolumen) nach Inkubation mit aufsteigender Methylisoharnstoffkonzentration (10 mM / 1 M, Inkubation über 24 h bei Raumtemperatur, n=6 pro Gruppe)
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Als zweites Krankheitsmodell wurde eine unilaterale Ureterligatur als klassisches Fibrosemodell der Niere durchgeführt (**Abbildung 20**). Direkt nach Durchführung der Ureterligatur wurden die Tiere mit humanen CD14⁺ Monozyten transplantiert und erhielten je nach Gruppe PBS, nApoC3 oder gApoC3. Fünf Tage nach Transplantation erfolgte die Euthanasie der Tiere mit Explantation der Nieren und Anfertigung von histologischen Schnitten.

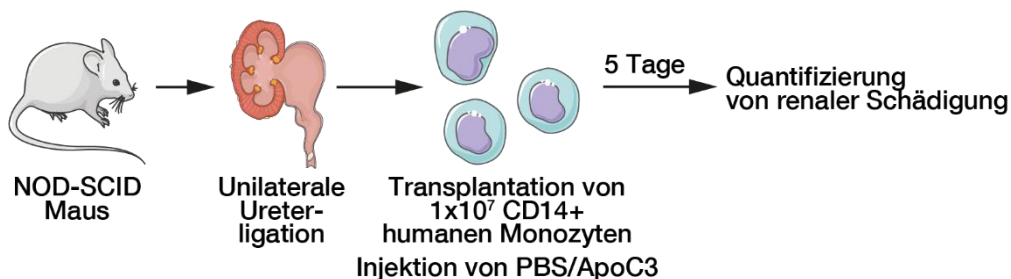


Abbildung 20 - Schematische Darstellung des Ablaufs einer unilateralen Ureterligatur in humanisierten NOD-SCID-Mäusen mit Injektion von PBS/ApoC3.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Abbildung 21 zeigt die angefertigten Sirius-rot gefärbten Nierengewebsschnitte. Die Nieren der mit gApoC3 behandelten Mäuse wiesen eine deutlich ausgeprägtere Fibrosebildung auf als die der nApoC3-Gruppe. Die Fläche der fibrotischen Areale war hierbei von der Methylisoharnstoff-Konzentration, die zur Herstellung des gApoC3 verwendet wurde, abhängig. Eine höhere Konzentration ging dabei mit einer verstärkten Fibrosebildung einher.

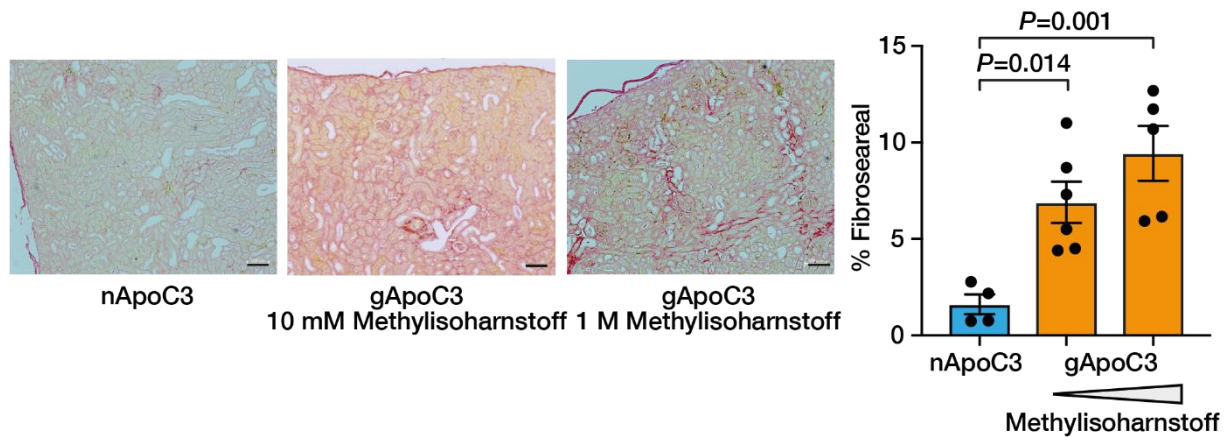


Abbildung 21 - Sirius-rot Färbung von histologischen Nierengewebschnitten 5 Tage nach Durchführung einer UUO in humanisierten NOD-SCID Mäusen und Injektion von nApoC3 / gApoC3 (jeweils 50 µg/ml Blutvolumen) mit ansteigenden Methylisoharnstoffkonzentrationen (10 mM/ 1 M Inkubation über 24 h bei Raumtemperatur), Darstellung des prozentualen Fibroseareals nach Gruppen, (n=4-6 pro Gruppe).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Zudem wurde die Akkumulation von F4/80-positiven Makrophagen und Ly6G-positiven neutrophilen Granulocyten sowie die Expression des tubulären Stressmarkers DKK3 (SCHUNK et al., 2021b) nach Immunfluoreszenz-Färbung quantifiziert (**Abbildung 22**). Hier zeigte sich im Vergleich zu nApoC3 nach Applikation von gApoC3 eine signifikant gesteigerte entzündliche Zellinfiltration und eine gesteigerte Expression von DKK3. Diese war von der Stärke der Guanidinylierung (verwendete Methylisoharnstoff-Konzentration) abhängig.

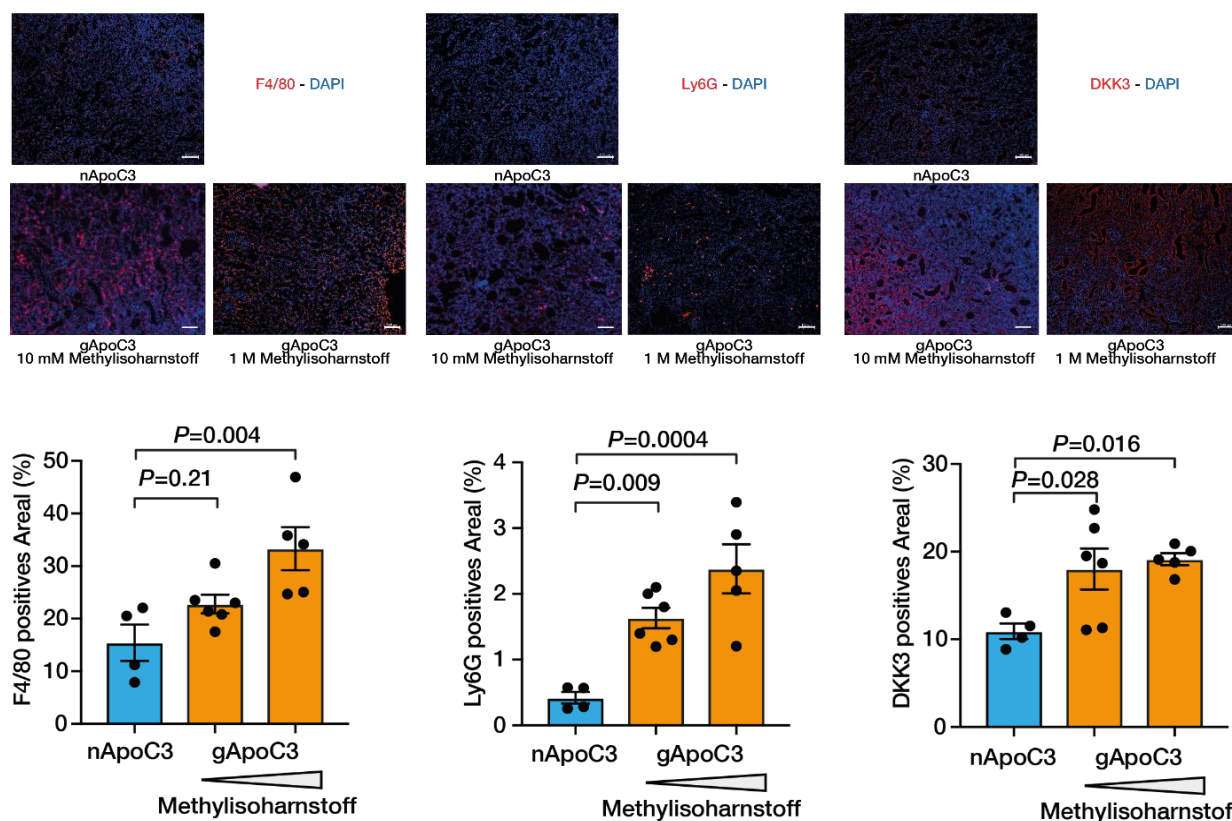


Abbildung 22 - Nierengewebsschnitte 5 Tage nach Durchführung einer UUO in humanisierten NOD-SCID Mäusen und Injektion von nApoC3 / gApoC3 (jeweils 50 µg/ml Blutvolumen) mit ansteigenden Methylisoharnstoffkonzentrationen (10 mM/1 M Inkubation über 24 h bei Raumtemperatur). Renale Expression von F4/80, Ly6G, DKK3 (n=4-6 pro Gruppe).
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.6 Guanidinyliertes ApoC3 ist mit kardiovaskulären und renalen Ereignissen assoziiert

Die in den experimentellen Modellen nachgewiesenen Ergebnisse sollten nun an einem relevanten Patientenkollektiv auf ihre klinische Relevanz überprüft werden. Hierzu wurde die Guanidinylierung von ApoC3 im Plasma von CKD-Patienten quantifiziert, die in die prospektive CARE FOR HOME Studie eingeschlossen wurden (**Abbildung 23**). Von 575 Patienten mit einer CKD im Stadium G2-4 nach KDIGO-Leitlinien (KDIGO, 2012), die in der nephrologischen Ambulanz der Universität des Saarlandes vorstellig waren, wurden 30 Patienten wegen fehlender Follow-up Informationen ausgeschlossen. Zwei weitere Patienten wurden ausgeschlossen, weil keine Plasmaproben zur Quantifizierung von gApoC3 zur Verfügung standen. Bei den restlichen 543 Patienten wurden Messungen der gApoC3 Massen-Signal Intensität durchgeführt und im Follow-up auf eine Assoziation mit klinischen Endpunkten evaluiert.

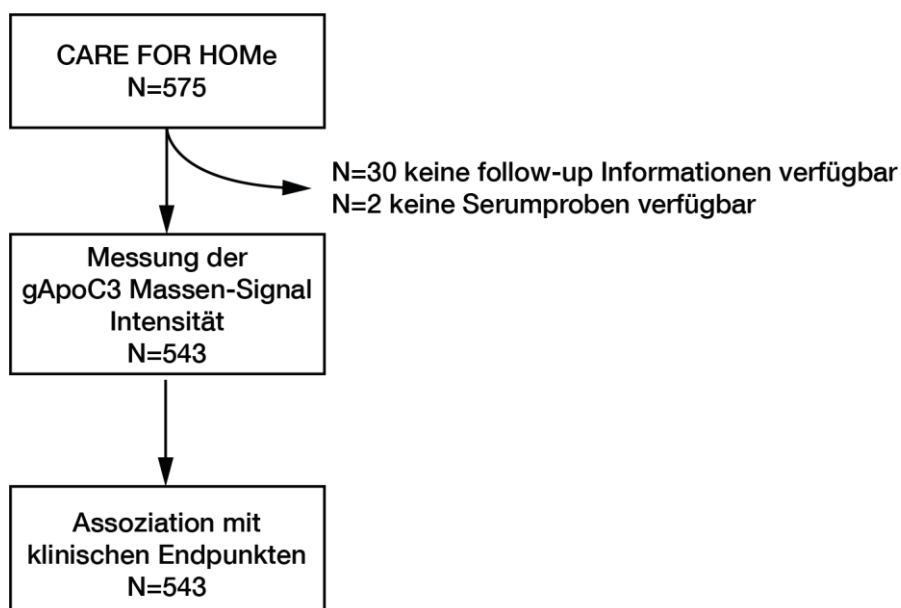


Abbildung 23 - Schematische Darstellung der Teilnehmer der CARE FOR HOME Studie.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Für die folgenden Analysen wurden die Patienten anhand der Intensität von gApoC3 in Tertiale eingeteilt. In **Tabelle 19** sind die Baseline-Charakteristika der Patienten dargestellt. Hier zeigte sich unter anderem, dass Patienten mit gApoC3 im höchsten Tertial im Schnitt älter waren, einen höheren systolischen Blutdruck hatten, mehr systemische Inflammation (hsCRP) sowie eine stärker eingeschränkte Nierenfunktion aufwiesen, als Patienten mit einer niedrigen gApoC3 Intensität.

	Gesamt (N=543)	gApoC3 Intensität			P
		≤0.001 (N=190)	0.002-0.017 (N=168)	>0.017 (N=185)	
Alter (Jahre)	65.5±12.2	63.4±12.9	66.2±11.8	66.9±11.5	0.013
Geschlecht (% männlich)	58.0	55.8	53.0	64.9	0.058
Body mass index (kg/m ²)	30.4±5.9	30.3±5.5	30.9±5.5	30.3±5.4	0.484
systolischer Blutdruck (mmHg)	152±24	149±24	153±23	155±25	0.041
diastolischer Blutdruck (mmHg)	85±13	84±12	86±13	86±13	0.397

Phosphat (mg/dl)	3.4±0.7	3.3±0.6	3.3±0.6	3.4±0.8	0.077
Gesamtcholesterin (mg/dl)	190±44	191±40	189±47	189±42	0.795
Triglyceride (mg/dl)	135 (93)	133 (95)	133 (86)	144 (106)	0.567
ApoC3 (mg/dl)	112.8 (91.6)	111.2 (110.9)	108.0 (76.9)	121.3 (119.8)	0.077
LDL-Cholesterin (mg/dl)	113±37	114±34	112±40	113±35	0.788
HDL-Cholesterin (mg/dl)	52±17	52±17	53±17	50±17	0.351
hoch sensitives C-reaktives Protein (mg/l)	1.56±0.62	1.43±0.53	1.45±0.49	1.71±0.67	<0.001
Kreatinin (mg/dl)	45.5±18.1	49.5±17.9	47.2±17.5	41.7±17.9	<0.001
geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1.73m²)	55 (36)	50 (28)	50 (27)	63 (49)	<0.001
Harnstoff (mg/dl)	32 (186)	27.0 (155.3)	25.0 (114.9)	45.3 (248.4)	0.061
Albuminurie (mg/g Kreatinin)	214.6 (486.6)	137.8 (294.6)	210.7 (431.8)	315.1 (925.5)	<0.001
N-terminales-pro B-natriuretisches Peptid (ng/ml)	32.2	27.4	33.9	35.7	0.194
Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen (%)	10.1	14.2	7.1	8.6	0.062
Raucher (%)	38.9	38.9	36.9	40.5	0.782
Diabetes mellitus (%)	65.5±12.2	63.4±12.9	66.2±11.8	66.9±11.5	0.013

Schleifendiuretika (%)	43.9	33.7	47.0	51.6	0.001
Thiazide (%)	51.1	51.3	49.4	52.4	0.849
Aldosterone Antagonisten (%)	22.0	18.5	25.0	22.7	0.321
Betablocker (%)	69.6	61.1	76.2	72.2	0.005
Angiotensin-Rezeptorblocker (%)	50.3	49.5	51.2	50.3	0.949
ACE-Hemmer (%)	35.2	38.9	28.6	37.3	0.092
Calcium Antagonisten (%)	51.9	52.1	48.2	55.1	0.429
Statine (%)	52.9	51.6	58.9	48.6	0.141
Andere Lipidsenkende Therapien (%)	10.7	9.5	12.5	10.3	0.636
Antidiabetische Therapie (%)	31.5	29.5	32.7	32.4	0.757

*Tabelle 19 – Baseline-Charakteristika der Teilnehmer der prospektiven CARE FOR HOME Studie (n=543) nach gApoC3 Intensität in der Massenspektrometrie in Tertiale eingeteilt.
Tabelle entnommen aus Schunk et al. JASN 2021*

5.6.1 Assoziation zwischen gApoC3 und kardiovaskulären Risikofaktoren

Abbildung 24 stellt die Assoziation zwischen der Intensität von gApoC3 und verschiedenen Parametern dar. Hierbei zeigte sich, dass Patienten mit einer KHK eine höhere gApoC3 Intensität aufwiesen, aber kein Zusammenhang zwischen der gApoC3 Intensität und anderen klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus oder Dyslipidämie bestand.

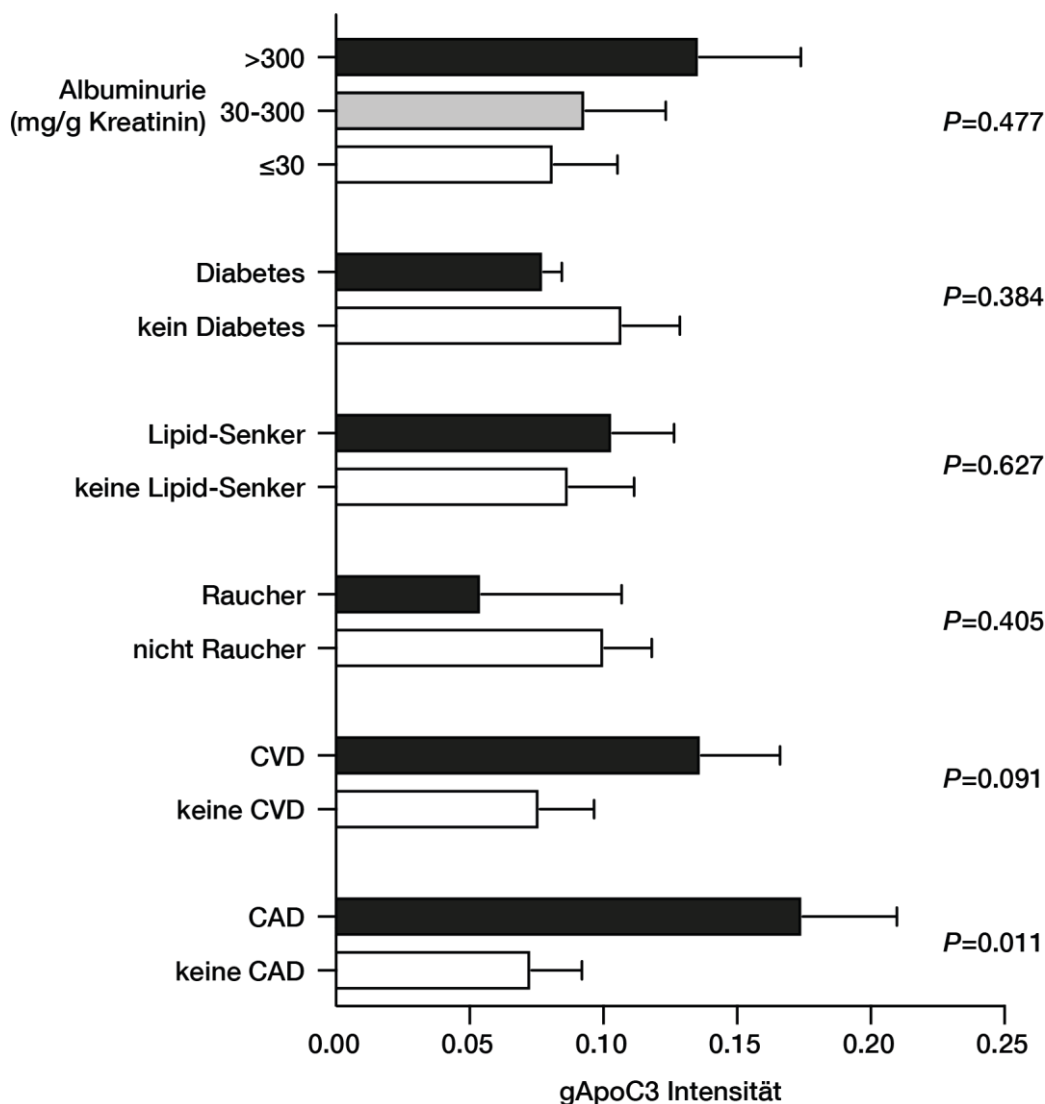


Abbildung 24 - Darstellung der gApoC3 Intensität in verschiedenen Subgruppen (Albuminurie, Diabetes mellitus, Einnahme von Lipid-Senkern, Raucher, CVD und CAD) der Teilnehmer der CARE FOR HOME Studie n=543. Adjustiert für Alter, Geschlecht, BMI, systolischer Blutdruck, eGFR. CVD, kardiovaskuläre Erkrankung. CAD, koronare Herzkrankheit.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.6.2 Assoziation zwischen gApoC3 und Lipoprotein-Konzentrationen bzw. Inflammationsmarkern

Es zeigte sich zudem keine Assoziation zwischen der gApoC3 Intensität und der Plasma-Konzentrationen von Gesamt-Cholesterin, LDL-C, HDL-C, Triglyceriden und ApoC3 selbst (**Abbildung 25**). Allerdings zeigte sich, dass eine höhere gApoC3 Intensität mit erhöhten hsCRP und Serum Amyloid A (SAA) Konzentrationen - also systemischer Inflammation – assoziiert war.

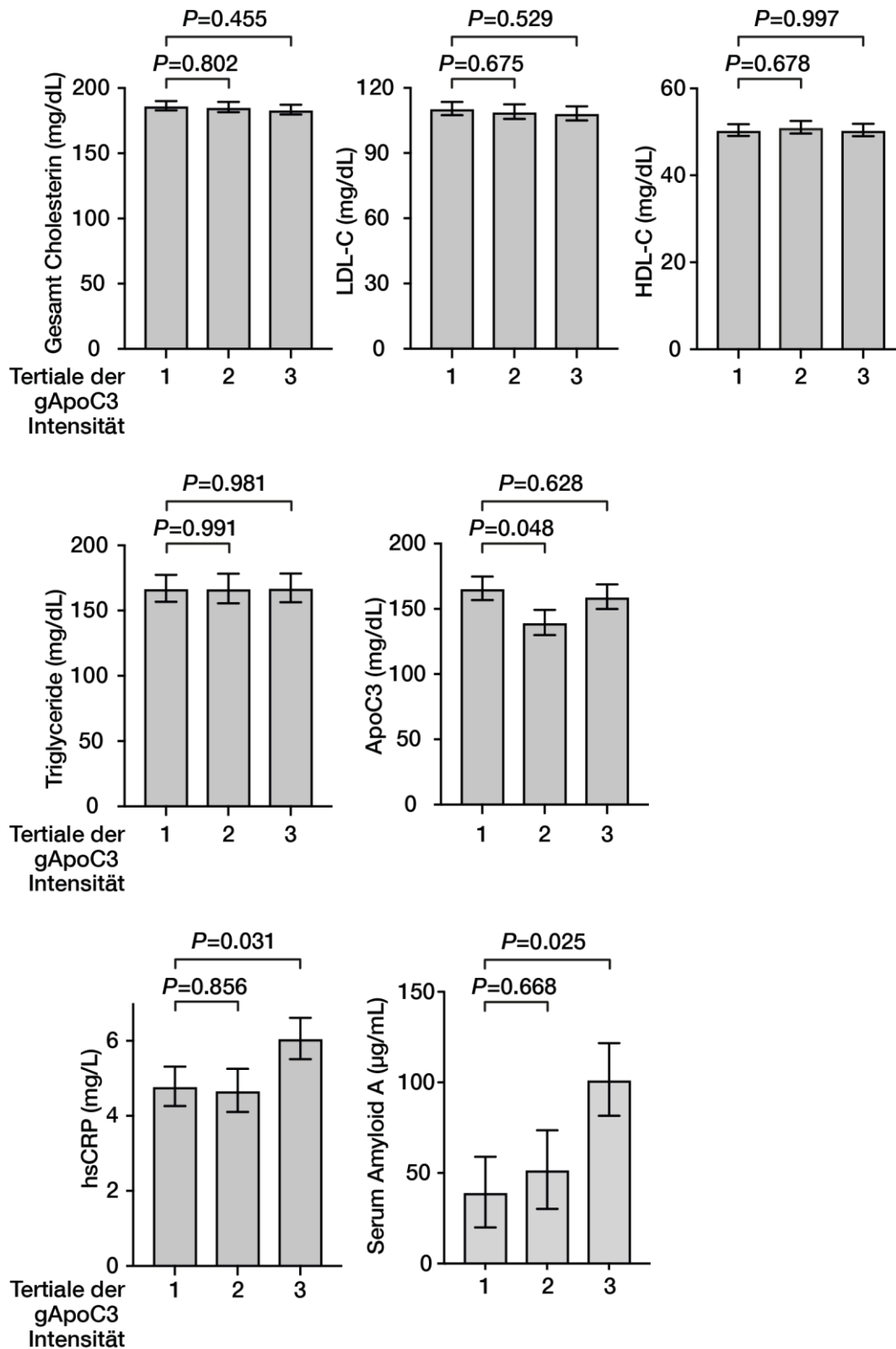


Abbildung 25 - Darstellung der Plasmakonzentrationen von Gesamtcholesterin, LDL-C, HDL-C, Triglyceriden, ApoC3, hsCRP und Serum Amyloid A in Abhängigkeit der in Tertiale eingeteilten gApoC3 Intensität. Adjustiert für Alter, Geschlecht, prävalente kardiovaskuläre Erkrankungen, BMI, systolischer Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie n=543. Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.6.3 Assoziation zwischen gApoC3 und kardiovaskulären und renalen Endpunkten.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der gApoC3 Intensität und den unterschiedlichen Endpunkten in der CARE FOR HOME Studie wurden Restricted Cubic Spline Plots erstellt. **Abbildung 26** zeigt den Zusammenhang zwischen der gApoC3 Intensität und dem Risiko für den kombinierten kardiovaskulären Endpunkt. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer erhöhten gApoC3 ein signifikant erhöhtes Risiko für das Erreichen des kardiovaskulären Endpunktes innerhalb des Beobachtungszeitraums aufwiesen.

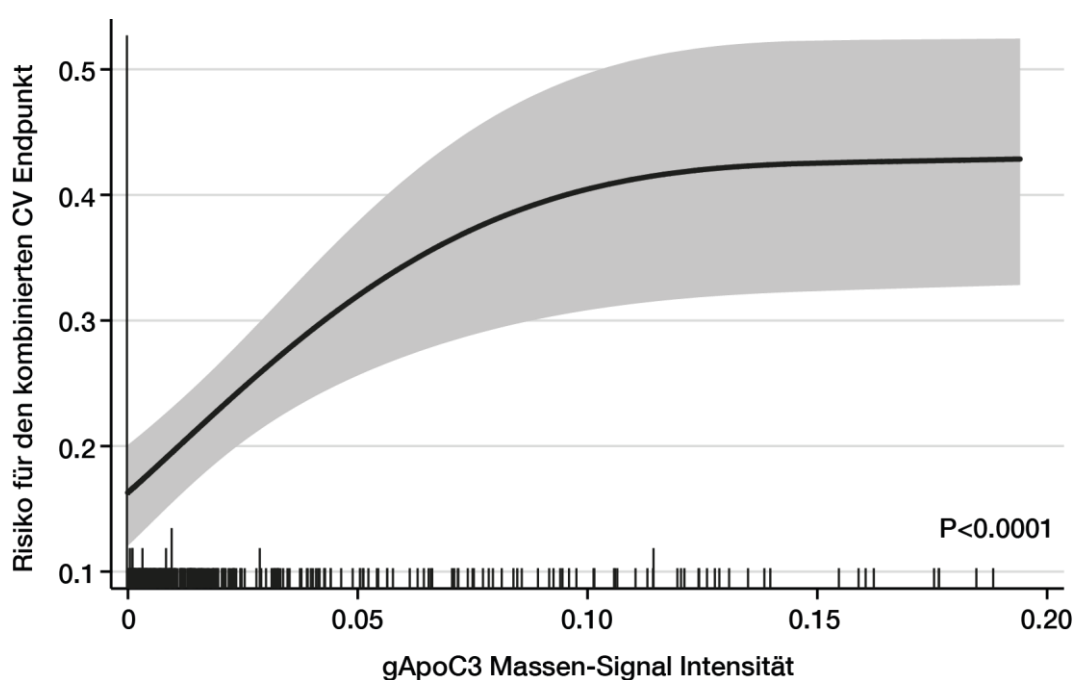


Abbildung 26 - Assoziation zwischen dem Risiko für den kombinierten kardiovaskulären Endpunkt und der gApoC3 Mass-Signal Intensität der 543 CKD Patienten der CARE FOR HOME Studie dargestellt als eines Restricted Cubic Spline Plot. Die schwarze Linie markiert das Risiko für den kombinierten kardiovaskulären Endpunkt, das hellgraue Areal das zugehörige 95%-Konfidenzintervall. Die einzelnen Spikes zeigen die individuelle Verteilung der Mass-Signal Intensität von gApoC3. Adjustiert für Alter, Geschlecht, Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, BMI, systolischem Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Gleiches galt für den Zusammenhang zwischen der gApoC3 Intensität und der Gesamt-Mortalität (**Abbildung 27**). Auch hier zeigte sich, dass eine höhere gApoC3 Intensität mit einem signifikant erhöhten Risiko der Patienten assoziiert war, im Nachbeobachtungszeitraum zu versterben.

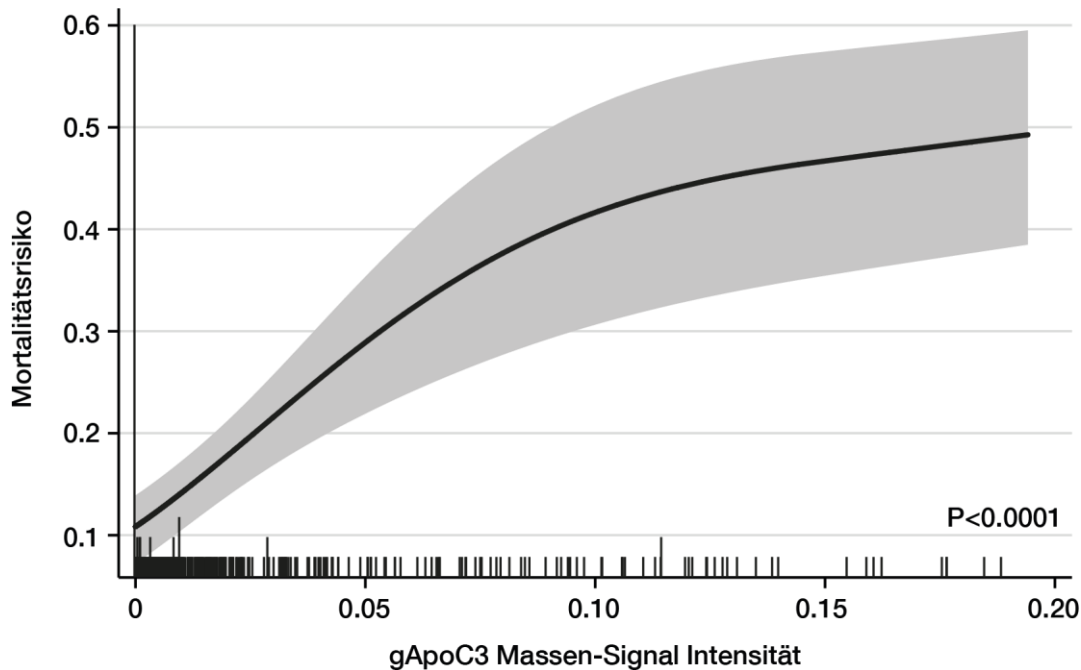


Abbildung 27 - Assoziation zwischen dem Mortalitätsrisiko und der gApoC3 Massen-Signal Intensität der 543 CKD Patienten der CARE FOR HOME Studie dargestellt als Restricted Cubic Spline Plot. Die schwarze Linie markiert das Mortalitätsrisiko, das hellgraue Areal das zugehörige 95%-Konfidenzintervall. Die einzelnen Spikes zeigen die individuelle Verteilung der Massen-Signal Intensität von gApoC3. Adjustiert für Alter, Geschlecht, Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, BMI, systolischem Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Ebenso konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen der gApoC3 Intensität und dem Risiko für den kombinierten renalen Endpunkt bestehend nachweisen (**Abbildung 28**).

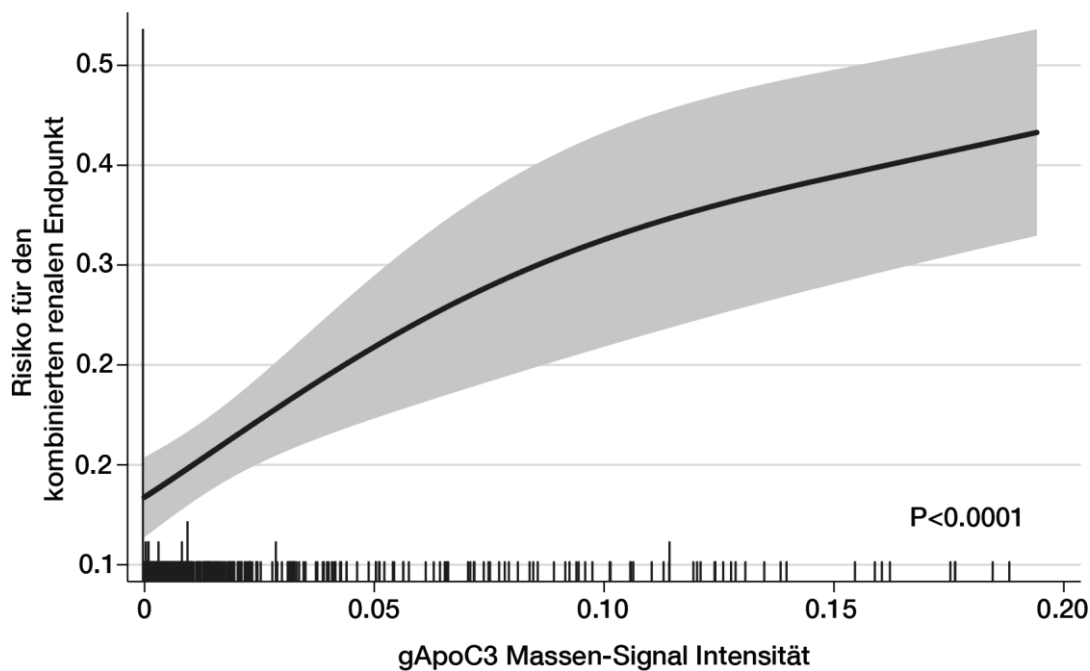


Abbildung 28 - Assoziation zwischen dem Risiko für den kombinierten renalen Endpunkt und der gApoC3 Massen-Signal Intensität der 543 CKD Patienten der CARE FOR HOME Studie dargestellt als Restricted Cubic Spline Plot. Die schwarze Linie markiert das Risiko für den kombinierten renalen Endpunkt, das hellgraue Areal das zugehörige 95%-Konfidenzintervall. Die einzelnen Spikes zeigen die individuelle Verteilung der Massen-Signal Intensität von gApoC3. Adjustiert für Alter, Geschlecht, Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen,

BMI, systolischem Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie.
Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

5.6.4 Zusammenhang zwischen gApoC3 Intensität und Trajekturen der eGFR

In der CARE for HOME Studie erfolgten jährliche Follow-Up Visiten, bei denen die eGFR quantifiziert wurde. Um nun unterschiedliche Muster der Veränderung der Nierenfunktion im Follow-Up bei den Studienteilnehmern zu identifizieren, wurden Trajekturen der eGFR generiert. 23,1 % der Patienten zeigten eine konstante glomeruläre Filtrationsrate, 58,9 % der Patienten einen Abfall der glomerulären Filtrationsrate und 16,1 % einen raschen Abfall der glomerulären Filtrationsrate. Die restlichen <2% der Patienten wiesen einen Anstieg der eGFR auf. Dieser ist am ehesten im Rahmen eines reversiblen akuten Nierenversagens zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses zu erklären. Die durchschnittliche jährliche Änderung der eGFR lag in der Referenzgruppe bei $0,7 \pm 1,4$ ml/min/1,73 m², in der Gruppe mit abfallender eGFR bei $-1,3 \pm 1,4$ ml/min/1,73 m² und in der Gruppe mit rasch abfallender eGFR bei $-3,5 \pm 1,7$ ml/min/1,73 m² (**Abbildung 29**).

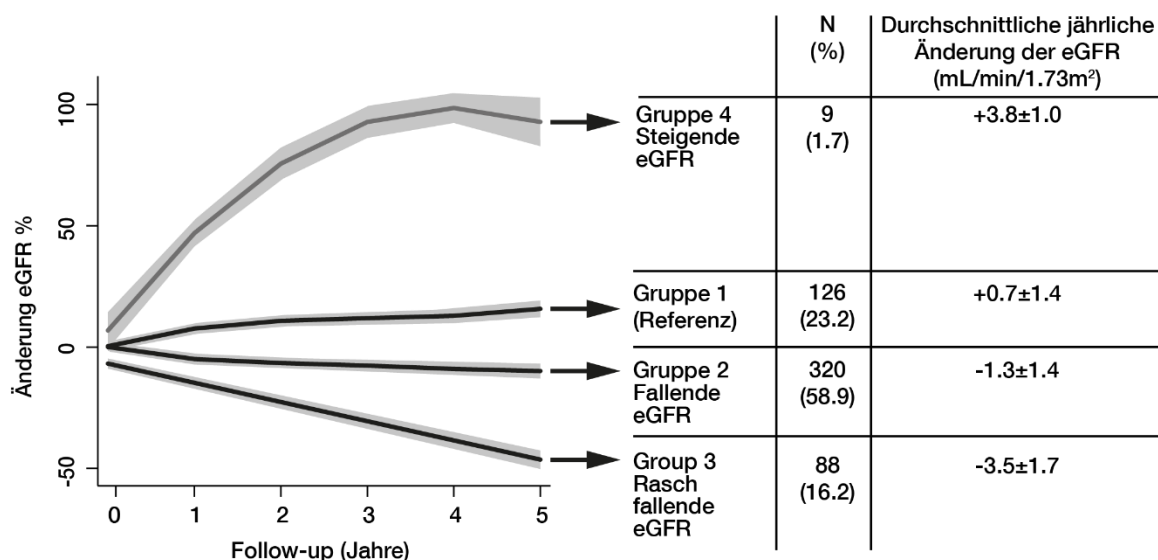


Abbildung 29 - Darstellung der prozentualen Änderung der eGFR im Rahmen der Nachbeobachtung der 543 Patienten aus der CARE FOR HOME Studie mittels Gruppen-basiertem Trajekturen-Modelling (4 Gruppen, Gruppe 1 stabile GFR, Gruppe 2 abfallende GFR, Gruppe 3 rasch abfallende GFR, Gruppe 4 ansteigende GFR). Darstellung der durchschnittlichen jährlichen Änderung der eGFR als schwarze Linie mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervall als hellgraues Areal. Adjustiert für Alter, Geschlecht, Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, BMI, systolischem Blutdruck, Raucheranamnese, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie. Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Nun wurde der Zusammenhang zwischen der gApoC3 Intensität und dem Risiko für eine im Verlauf abfallende bzw. rasch abfallende eGFR mittels multinominaler logistischer Regression untersucht (**Abbildung 30**). Patienten mit einer gApoC3 Intensität im dritten Tertial wiesen dabei ein signifikant höheres Risiko für eine abfallende bzw. rasch abfallende eGFR auf als Patienten mit einer gApoC3 Intensität im ersten Tertial (**Tabelle 20**).

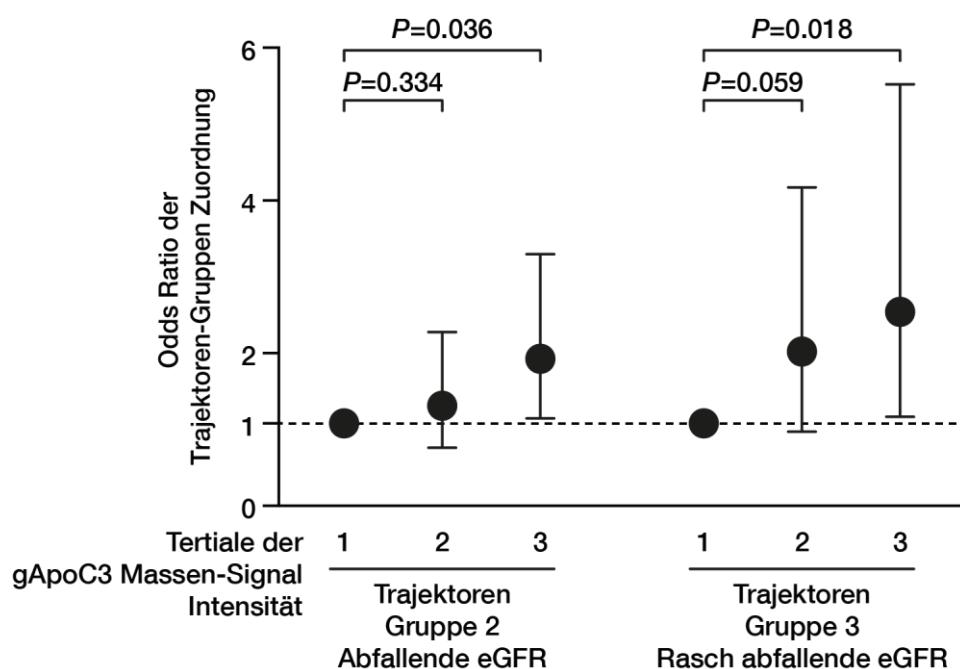


Abbildung 30 - Assoziation von gApoC3 Massen-Signal Intensität und der Veränderung der eGFR in Trajekturen-Gruppen, adjustiert für Alter, Geschlecht, CVD, BMI, systolischer Blutdruck, Raucherstatus, Diabetes mellitus, eGFR, Albuminurie.

Abbildung entnommen aus Schunk et al. JASN 2021

Model	Tertiale der gApoC3 Intensität	Risiko für die Zuordnung zu Trajekturen Gruppe 2		Risiko für die Zuordnung zu Trajekturen Gruppe 3	
		HR (95 % CI)	P	HR (95 % CI)	P
Nicht-Adjustiert	1	Referenz		Referenz	
	2	1.37 (0.81-2.33)	0.238	2.13 (1.08-4.17)	0.031
	3	1.75 (1.03-2.94)	0.039	3.13 (1.52-6.25)	0.002
Adjustiert 1	1	Referenz		Referenz	
	2	1.28 (0.76-2.17)	0.346	2.17 (1.10-4.35)	0.026
	3	1.75 (1.02-2.86)	0.042	3.03 (1.43-6.25)	0.003
Adjustiert 2	1	Referenz		Referenz	
	2	1.22 (0.71-2.08)	0.460	1.96 (0.98-4.00)	0.058
	3	1.64 (0.96-2.86)	0.071	2.63 (1.23-5.56)	0.012
Adjustiert 3	1	Referenz		Referenz	

	2	1.32 (0.76-2.27)	0.334	2.00 (0.97-4.17)	0.059
	3	1.82 (1.04-3.23)	0.036	2.56 (1.18-5.56)	0.018
Adjustiert 4	1	Referenz		Referenz	
	2	1.10 (0.61-2.00)	0.751	2.04 (0.98-4.25)	0.057
	3	2.01 (1.05-3.87)	0.037	2.74 (1.25-5.99)	0.012

Tabelle 190 – Multinominale logistische Regressionsanalyse der Assoziation zwischen den Tertialen der gApoC3 Intensität und den Trajekturen -Gruppen der eGFR n=543. Die Referenzkategorie ist jeweils Tertial 1.

Adjustiert 1: adjustiert für Alter und Geschlecht.

Adjustiert 2: adjustiert für Alter, Geschlecht, prävalente CVD, BMI, systolischer Blutdruck, Raucherstatus und Diabetes mellitus.

Adjustiert 3: adjustiert für Alter, Geschlecht, prävalente CVD, BMI, systolischer Blutdruck, Raucherstatus, Diabetes mellitus, eGFR und Albuminurie; Adjustiert 4 adjustiert für Alter, Geschlecht, prävalente CVD, BMI, systolischer Blutdruck, Raucherstatus, Diabetes mellitus, Albuminurie und Triglyceride.

6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals die Guanidinylierung von ApoC3 als posttranslationale Modifikation bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die zugrundeliegenden pathophysiologischen Abläufe analysiert. Die Bildung von gApoC3 in einem urämischen Milieu konnte durch Inkubation mit Harnstoff induziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die posttranslationale Modifikation von ApoC3 zu einer gesteigerten Bindung an humane Monocyten führt. Des Weiteren ließ sich dieser Prozess auf eine verstärkte Bindung von gApoC3 an TLR4 zurückführen. Die Guanidinylierung von ApoC3 führte dadurch zu einer Steigerung der ApoC3-induzierten Ausschüttung von inflammatorischen Markern. Sowohl in den experimentellen Daten als auch in einer prospektiven klinischen Studie konnte eine deutliche Assoziation von gApoC3 mit dem Auftreten und Fortschreiten von kardiovaskulären Erkrankungen und Nierenschädigung demonstriert werden. gApoC3 fördert die Nierenschädigung und hemmt die vaskuläre Regeneration.

6.1 Triglyceride und ApoC3 bei kardiovaskulären Erkrankungen

6.1.1 Epidemiologische Evidenz

ApoC3 spielt eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel von triglyceridreichen Lipoproteinen. Die Hauptfunktion besteht dabei in der Inhibierung der Lipoprotein Lipase und der hepatischen Lipase, wodurch die Wiederaufnahme von Triglyceriden in die Leber unterdrückt wird. Allerdings wird vermutet, dass die Inhibition der hepatischen Clearance durch ApoC3 einen wesentlichen Einfluss auf die ApoC3 assoziierte Hypertriglyceridämie hat (MENDIVIL et al., 2010).

Eine Hypertriglyceridämie ist mit verschiedenen pathologischen Prozessen assoziiert, unter anderem mit Insulinresistenz, metabolischem Syndrom, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen (GORDTS et al., 2016). In einer zeigte sich, dass HDL, welches ApoC3 enthielt, mit einem erhöhten Risiko für Koronare Herzkrankheit assoziiert war, während HDL ohne ApoC3 mit einem niedrigeren Risiko verbunden war (JENSEN et al., 2018). Passend hierzu konnte nachgewiesen werden, dass ApoC3 im HDL von Patienten mit koronarer Herzkrankheit akkumuliert und das so verändertes HDL die endotheliale Apoptose fördert (RIWANTO et al., 2013). Aktuelle Studien zeigen signifikant erhöhte ApoC3-Plasmaspiegel bei Patienten mit AMI oder CKD. In der LURIC-Studie konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit erhöhten ApoC3-Spiegeln deutlich erhöhte systemische Inflammationsmarker wie hsCRP aufwiesen. Erhöhte ApoC3 Spiegel waren zudem mit einem signifikant erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert. Demzufolge stellt sich ApoC3 als

potentiell wichtiges therapeutisches Target in der Behandlung von CVD und CKD dar (ZEWINGER et al., 2017b; ZEWINGER et al., 2020).

Hierzu passend konnten wir zeigen, dass die posttranslationale Guanidinylierung von ApoC3, die bei CKD-Patienten auftritt, zur gesteigerten Inflammation führt. Hohe Intensitäten der Guanidinylierung von ApoC3 sind dabei mit signifikant erhöhtem hsCRP und Serum-Amyloid A als systemische Inflammationsmarker assoziiert. Außerdem sind sie mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko und erhöhtem Mortalitätsrisiko assoziiert.

Erhöhte Konzentrationen von Triglyceriden stellen einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Aufgrund von unterschiedlichen Outcomes bei verschiedenen Studien zur Assoziation von Triglyceriden, triglyceridreichen Lipoproteinen und kardiovaskulären Risiko (CHAPMAN et al., 2011), besteht bis heute Unklarheit über adäquate Therapieempfehlungen bei Patienten mit milder bis moderater Hypertriglyceridämie (HEGELE et al., 2014). Dabei zeigen große Beobachtungsstudien, dass erhöhte Triglyceridplasmaspiegel und niedrige HDL-C-Plasmaspiegel mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert sind. Die genaue Rolle, die Remnants von triglyceridreichen Lipoproteinen bei der Entstehung von Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen spielen, bleibt jedoch weiterhin ein Thema von großem Interesse (CHAPMAN et al., 2011). In verschiedensten Studien zeigen sich Triglyceride als signifikanten Prädiktor für die koronare Herzkrankheit, dabei kommt es jedoch durch die Verwendung von unterschiedlichen Messmethoden zu sehr variablen Ergebnissen, die am ehesten die Assoziation von Triglyceriden mit verschiedenen Krankheitsbildern unterschätzen (AUSTIN, 1991). Verschiedene große Assoziationsstudien zeigen dabei wiederholt eine deutliche Assoziation zwischen erhöhten Triglyceridspiegeln und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Myokardinfarkte, ischämische Herzerkrankung und Mortalitätsrisiko (BLANKENHORN et al., 1990; HODIS et al., 1994; HOKANSON, AUSTIN, 1996).

ApoC3 spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Triglyceriden und triglyceridreichen Lipoproteinen. Dabei legen sowohl experimentelle als auch klinische Daten eine Dysregulation des Fettstoffwechsels durch erhöhte ApoC3-Spiegel nahe (CHAN et al., 2006; CHAN et al., 2008). Eine erhöhte ApoC3 Produktion ist ein typisches Merkmal bei Patienten mit Hypertriglyceridämie und ist mit einem atherogenen Lipoproteinprofil assoziiert. In unserer aktuellen Studie war die Guanidinylierung von ApoC3 nicht mit einem veränderten Lipoproteinprofil assoziiert. Diese Ergebnisse legen unterschiedliche Effekte von nApoC3 und gApoC3 nahe. Die Assoziation von intensiver modifiziertem gApoC3 und erhöhtem kardiovaskulären Risiko, sowie erhöhtem Mortalitätsrisiko scheint nicht mit Hypertriglyceridämie oder der Veränderung der Zusammensetzung der Lipoproteine

assoziiert zu sein. Vielmehr führt die Guanidinylierung von ApoC3 in erster Linie zu einer Modulierung seiner proinflammatorischen Eigenschaften durch eine verstärkte Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen.

6.1.2 Genetische Evidenz

Die genetische Prädisposition für die Entwicklung einer Hypertriglyceridämie basiert in der Regel nicht auf monogenetischen Ursachen, sondern auf multi- oder polygenetischer Grundlage. Dabei gibt es häufige DNA-Varianten, die mit kleiner Effektstärke einhergehen und seltene DNA-Varianten, die mit einer großen Effektstärke einhergehen (HEGELE et al., 2014). ApoC3 ist an der Entstehung von einem weiten Spektrum an relevanten Krankheitsbildern beteiligt. In den letzten Jahren zeigt sich verstärkt, dass die ausgeprägte Varianz von Triglyceridplasmaspiegeln in der Bevölkerung stark mit genetischen Variationen in den *Apoc3*- und *Apoc5*-Genen assoziiert ist. Das *Apoc3*-Gen wird in großem Maße in der Leber und mit geringerem Anteil im Darm exprimiert. Es konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass ein Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in der Promotorregion von *Apoc3* bei jungen Männern mit einer erniedrigten Insulinantwort im oralen Glukosetoleranztest einhergeht. Dadurch zeigt sich eine interessante Verknüpfung zwischen Hypertriglyceridämie und Insulinresistenz (VAN DIJK et al., 2004). Auch der T-455C Polymorphismus im *Apoc3*-Gen, der mit der Insulinantwort assoziiert ist, hat einen Einfluss auf Triglycerid- und ApoC3-Plasmaspiegel. In einer Studie zur Ermittlung des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit metabolischem Syndrom waren die ApoC3-Spiegel bei Patienten mit metabolischem Syndrom signifikant erhöht. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines metabolischen Syndroms korrelierte mit erhöhten ApoC3-Spiegeln. Des Weiteren wiesen Patienten mit metabolischem Syndrom und koronarer Herzkrankheit deutlich höhere ApoC3-Spiegel auf als Patienten mit metabolischem Syndrom ohne koronare Herzkrankheit. Patienten mit metabolischem Syndrom und der -455C Variante hatten eine vielfach erhöhte Wahrscheinlichkeit unter koronarer Herzkrankheit zu leiden. Zusammenfassend zeigt sich somit eine relevante Assoziation zwischen Gain-of-Function ApoC3-Polymorphismen und dem KHK-Risiko bei Patienten mit metabolischem Syndrom (MILLER et al., 2007; OLIVIERI et al., 2003; OLIVIERI et al., 2002). Die Assoziation von verschiedenen Polymorphismen im *Apoc3* Genlocus mit dem Verlust der Regulation von ApoC3 durch Insulin ist durchaus relevant, da es durch die Überexpression von ApoC3 zur Entwicklung von Hypertriglyceridämie kommen kann (LI et al., 1995). Die bisher beschriebene Assoziation von ApoC3 und dem Auftreten von verschiedenen Pathologien bezieht sich in erster Linie auf die Veränderung des ApoC3- bzw. Triglyceridplasmaspiegels. In unserer aktuellen Studie konnten wir erstmals zeigen, dass bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung eine posttranslationale Guanidinylierung von ApoC3 auftritt. Diese ist wiederum mit gesteigerter Inflammation und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko

assoziiert. Erst kürzlich wurden Gain-of-Function Varianten von *Apoc3* beschrieben, die im Vergleich zum Wildtyp mit 30 % höheren Plasmakonzentrationen von ApoC3 und 60 % höheren Nüchtern-Triglycerid-Plasmakonzentrationen einhergehen. Diese Polymorphismen sind mit dem Auftreten von nicht-alkoholischer Fettleber und Insulinresistenz assoziiert (PETERSEN et al., 2010). In einer genomweiten Assoziationsstudie konnten heterozygote Träger einer Null-Mutation im *Apoc3*-Gen identifiziert werden. Diese wiesen im Vergleich zu Nicht-Trägern um 50 % niedrigere ApoC3 Plasmaspiegel auf. Bei den Trägern der Mutation zeigten sich zudem niedrigere Triglyceridspiegel und LDL-C-Spiegel sowie erhöhte Konzentrationen von HDL-C. Damit verbunden waren bei diesen Patienten Kalzifikationen der Koronararterien deutlich seltener als bei vergleichbaren nicht-Trägern (POLLIN et al., 2008). Passend dazu konnten neuere Studien zeigen, dass Loss-of-Function Mutationen von *Apoc3* nicht nur mit einer deutlichen Reduktion der Triglyceride, sondern auch mit einem reduzierten Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und Herzinfarkten einhergehen (JORGENSEN et al., 2014) und zudem mit einem reduzierten Risiko für koronare Herzkrankheit assoziiert sind (TG et al., 2014). Die Analyse von Loss-of Function und Gain-of-Function Mutationen im *Apoc3*-Gen ist für die Entwicklung von möglichen Behandlungsstrategien von großem Interesse. Das deutlich reduzierte kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit einer Loss-of-Function Mutation im *Apoc3*-Gen ist auch im Hinblick auf mögliche Therapiekonzepte von Bedeutung. Die Möglichkeit der Reduktion des kardiovaskulären Risikos durch eine gezielte Reduktion von ApoC3 oder eine gezielte Prävention von posttranslationalen Modifikationen könnten relevante Behandlungsstrategien in der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen darstellen.

6.1.3 Experimentelle Evidenz

Es konnte gezeigt werden, dass bei LPL-defizienten Mäusen ApoC3 zu einer Steigerung der Triglyceridspiegel führt (GORDTS et al., 2016). Bei transgen veränderten Mäusen, mit 100 Kopien des *Apoc3*-Gens kam es zur verstärkten Expression von ApoC3 mit deutlich erhöhten ApoC3-Spiegeln und damit zu schweren Hypertriglyceridämien (ITO et al., 1990).

Bei der familiären Chylomikronämie kommt es durch eine genetische Störung zu einem Defekt der Lipoproteinlipase und dadurch zu schwerer Hypertriglyceridämie und rezidivierenden Pankreatitiden. Patienten mit dieser Störung wurden mit einem Inhibitor der *Apoc3*-RNA behandelt. Hierunter zeigten sich sowohl die ApoC3-Spiegel, als auch die Triglyceridspiegel deutlich regredient. Dadurch konnte ein LPL unabhängiger Signalweg von ApoC3 in der Regulation des Triglyceridmetabolismus demonstriert werden (GAUDET et al., 2015; GAUDET et al., 2014). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine starke Assoziation zwischen ApoC3 und Faktor VIIa-AT besteht. Demzufolge führen erhöhte ApoC3- Spiegel zu einer erhöhten pro-thrombotischen Aktivierung des Gerinnungssystems (MARTINELLI et al.,

2019). Auch bei der Entstehung und Progression von Diabetes mellitus Typ II zeigt sich eine Assoziation mit ApoC3. Erhöhte ApoC3-Plasmaspiegel gehen dabei mit einer erhöhten Insulinresistenz einher. Dabei konnte experimentell gezeigt werden, dass eine Insulinresistenz der Pankreasinseln eine lokale Produktion von ApoC3 fördern kann, die wiederum die Funktion und das Überleben der pankreatischen β -Zellen reduziert. Hierbei spielt auch die Hyperglykämie eine wichtige Rolle, da sie die Genexpression von *ApoC3* in der Leber steigert. ApoC3 stellt damit eine Verbindung zwischen Insulinresistenz und β -Zell-Versagen dar (AVALL et al., 2015). Die Überexpression von humanem *ApoC3* in Mäusen führt zur Hypertriglyceridämie. Dabei zeigt sich eine Korrelation zwischen den ApoC3- und Triglycerid-Konzentrationen. Die erhöhte Konzentration an Triglyceriden ließ sich hierbei auf eine Erhöhung der Anzahl an VLDL-großen Partikeln zurückführen, die mehr Triglyceride und ApoC3 enthielten und dabei weniger ApoE (VAN DIJK et al., 2004). Interessanterweise konnte kürzlich in verschiedenen tierexperimentellen Ansätzen demonstriert werden, dass ein ApoC2 mimetisches Peptid durch die Aktivierung der LPL und der Antagonisierung der triglyceridsteigernden Wirkung von ApoC3, die Senkung von Plasmatriglyceridspiegeln verursachte (WOLSKA et al., 2020). Neben dem beschriebenen Einfluss von ApoC3 auf Insulinresistenz und Hypertriglyceridämie konnte vor Kurzem auch die Assoziation von ApoC3 mit steriler Inflammation demonstriert werden (ZEWINGER et al., 2020). In unserer aktuellen Studie konnten wir nun eine Verknüpfung von CKD und Inflammation durch die posttranslationale Modifikation von ApoC3 nachweisen. In dem urämischen Milieu von CKD Patienten kommt es zur posttranslationalen Guanidinylierung von ApoC3 und damit zu gesteigerter Inflammation. Die Induktion eines urämischen Milieus bei Mäusen führt zur Bildung und Akkumulation von gApoC3 im Nierengewebe. Wir konnten zudem am tierexperimentellen Modell zeigen, dass gApoC3 in humanisierten Mäusen die vaskuläre Regeneration hemmt und eine Nierenschädigung fördert.

6.2 Alternative Inflammasomaktivierung durch ApoC3

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich nachweisen, dass ApoC3 durch die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, basierend auf einem alternativen Signalweg in humanen Monocyten, zur Induktion von steriler Inflammation führt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass ApoC3 konzentrationsabhängig eine Ausschüttung von IL-1 β von humanen Monocyten verursacht. Die Ausschüttung von IL-1 β ist dabei NLRP3-abhängig. Durch die Stimulation von humanen Monocyten mit ApoC3 kommt es zu einer Heterodimerisierung von TLR2 und TLR4 und damit zu einer Aktivierung des alternativen Signalweges (ZEWINGER et al., 2020). Wir konnten demonstrieren, dass die Guanidinylierung von ApoC3 zu einer gesteigerten Bindung von ApoC3 an TLR4 führt und dadurch zur gesteigerten Inflammation beiträgt. Eine essentielle Rolle bei der Signalkaskade der alternativen Inflammasomaktivierung spielt die Produktion von Superoxid-Radikalen. Diese werden durch

die Inkubation von humanen Monocyten mit ApoC3 deutlich vermehrt produziert. Zudem wird die ApoC3-medierte Inflammasom-Aktivierung durch die Vorbehandlung der Monocyten mit Antioxidantien fast vollständig aufgehoben. Passend zur gesteigerten Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und der gesteigerten Bindung von gApoC3 an humane Monocyten konnten wir in dieser Arbeit nachweisen, dass gApoC3 eine gesteigerte Produktion von Superoxiden bewirkt und damit Inflammation fördert. In tierexperimentellen Modellen konnte an humanisierten Mäusen gezeigt werden, dass eine Substitution von ApoC3 in einem vaskulären Schädigungsmodell zu einer Hemmung der vaskulären Regeneration führt. Zudem konnte anhand von einem klassischen Nierenfibrosemodell demonstriert werden, dass ApoC3 die Ausbildung einer Nierenschädigung fördert. In einem Patientenkollektiv von CKD Patienten traten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich höhere Plasmakonzentrationen von ApoC3 auf. Dabei zeigte sich eine Assoziation zwischen höheren Plasmakonzentrationen und Mortalität (ZEWINGER et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die TLR2- Aktivierung eine ROS-Produktion in Monocyten und Makrophagen hervorrufen kann (WEST et al., 2011). Auch in weiteren Studien konnte demonstriert werden, dass TLR2 die endotheliale ROS Produktion stimuliert (SPEER et al., 2013). Die gesteigerte endotheliale ROS-Produktion spielt auch bei der Vermittlung von anderen inflammatorischen Signalwegen eine essentielle Rolle. So wird durch carbamyliertes LDL über eine Aktivierung des Lectin-like oxidized low-density lipoprotein Rezeptors-1 (LOX-1) die endotheliale ROS-Produktion angeregt, carbamyliertes LDL ist wiederum mit erhöhtem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und Mortalität assoziiert (HOLY et al., 2016; SPEER et al., 2014; TAO et al., 2016). Unsere Studie identifiziert mit der Guanidinylierung von ApoC3 eine weitere posttranslationale Modifikation, die mit gesteigerter Inflammation, erhöhtem kardiovaskulären Risiko und erhöhtem Mortalitätsrisiko assoziiert ist.

6.3 Posttranslationale Modifikationen bei CKD

Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung kommt es durch das Fortschreiten der Erkrankung zur Akkumulation von verschiedenen Urämietoxinen. Diese sind wiederum an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt (WANG et al., 2007). Durch diese Modifikationen ist es möglich, dass verschiedene Toxine mit einer erhöhten Affinität an modifizierte Trägerproteine binden können und somit ein erhöhtes molekulares Gewicht erhalten. Dadurch können diese Toxine einer glomerulären Filtration entgehen bzw. im Rahmen der Dialysetherapie nicht entfernt werden. Urämietoxine können wiederum selbst zum Fortschreiten der chronischen Nierenerkrankung und zur Induktion von verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen führen. Posttranslationale Modifikationen spielen somit eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von CKD und CVD. Sie können jedoch potentiell auch als Biomarker für diese Erkrankungen dienen (GAJJALA et al., 2015). In unserer aktuellen Studie konnte die Akkumulation von gApoC3 tierexperimentell in einem

Niereninsuffizienzmodell und bei CKD Patienten nachgewiesen werden. Dabei konnten wir eine Assoziation der Intensität der posttranslationalen Modifikation von ApoC3 und dem kardiovaskulären und renalen Outcome aufzeigen. CKD Patienten mit hohen gApoC3 Intensitäten wiesen dabei ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Verschlechterung bzw. rasche Verschlechterung ihrer Nierenfunktion auf.

Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Urämie-bedingten Veränderungen auf die Entstehung und Progression von CKD und CVD stellt der Nachweis von symmetrischen Dimethylarginin (SDMA) im HDL von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung dar. Durch diese Modifikation kommt es zur Transformation von physiologischem HDL zu einem abnormalen Lipoprotein. Es konnte gezeigt werden, dass dieses abnormale HDL durch die Aktivierung von TLR2 zu endothelialer Dysfunktion und Hypertension beiträgt (SPEER et al., 2013). In weiteren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass das akute Phase Protein Serumamyloid A die Eigenschaften von HDL verändert und damit seine positiven Effekte beeinträchtigt. Bei hohen Plasma-Konzentrationen von SAA zeigen hohe HDL-C Konzentrationen mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (ZEWINGER et al., 2015).

6.4 Posttranslationale Modifikation von Lipoproteinen

Unsere Aktuelle Studie befasst sich mit dem Auftreten und dem Effekt der posttranslationalen Guanidinylierung von ApoC3. Wie wir bereits aus verschiedenen Studien wissen, stellen posttranslationale Modifikationen von Lipoproteinen einen wesentlichen Faktor in der Entstehung und Progression von CKD und CVD dar. Dabei führt unter anderem das urämische Milieu bei der chronischen Nierenerkrankung zu posttranslationalen Modifikationen, die im Anschluss wiederum zum Fortschreiten der pathologischen Prozesse beitragen. Die bisher am besten beschriebenen posttranslationalen Modifikationen beziehen sich auf die Oxidierung und Carbamylierung von Lipoproteinen.

6.4.1 Oxidierung

Das Hauptstrukturprotein von LDL Apolipoprotein B ist anfällig für posttranslationale Modifikationen. Dabei gilt oxidiertes LDL (oxLDL) als ein wichtiger Baustein in der Entstehung von Atherosklerose. Durch die Interaktion mit LOX-1 kommt es zur endothelialen Dysfunktion, endothelialen Leukocytenadhäsion, Schaumzellbildung, Plaquestabilisierung, Plättchenaggregation und myokardialen Ischämie. Die Plasmakonzentrationen von oxLDL sind bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung aufgrund des urämischen Milieus und damit gesteigertem systemischen oxidativen Stress erhöht. Dieser Effekt wird auch dadurch verstärkt, dass die antioxidative Funktion von HDL, die bei gesunden Menschen eine Oxidation von LDL verhindert, bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung eingeschränkt ist. Diese Wirkung von HDL wird bei gesunden Menschen durch die Arylesterase Aktivität

des HDL-assoziierten Enzyms Paraoxonase-1 (PON-1) vermittelt. Durch die Vermittlung von antioxidativen Prozessen spielt PON-1 eine entscheidende Rolle für die antiinflammatorische Wirkung von HDL. Durch die antioxidative Wirkung von HDL wird unter anderem die Oxidierung von LDL verhindert. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung ist die Aktivität von PON-1 sowie der Serum Arylesterase reduziert. Dadurch verliert HDL die Fähigkeit zur Prävention von oxidativen Prozessen, was wiederum zur vermehrten Akkumulation von oxidiertem LDL und schlussendlich zur Förderung des Progresses von CKD und CVD führt (KENNEDY et al., 2013; MORENA et al., 2000). Zudem führen posttranslationale Modifikationen von LDL zur Veränderung der Proteinstruktur und zu einer veränderten Bindung an verschiedenen Rezeptoren wie LOX-1, was eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der proatherogenen Effekte von oxLDL spielt (WANG et al., 2007; WOLSKA et al., 2020).

6.4.2 Carbamylierung

Eine weitere posttranslationale Modifikation von Lipoproteinen bei der CKD stellt die Carbamylierung dar. Es konnte gezeigt werden, dass eine posttranslationale Modifikation durch Carbamylierung von Proteinen bei Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung eine vaskuläre Dysfunktion fördert (CARRACEDO et al., 2011). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass carbamylierte Lipoproteine proatherogene Eigenschaften besitzen. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde die Relevanz der Carbamylierung von Proteinen ermittelt. Hierfür wurde der Zusammenhang zwischen der Konzentration an Protein-gebundenem Homocitrullin - als Produkt bei der Carbamylierung von Lysinresten – mit der Prävalenz von atherosklerotischer Koronarer Herzkrankheit evaluiert. Es zeigte sich, dass eine starke, unabhängige Assoziation zwischen Protein-gebundenem Homocitrullin und der Prävalenz von koronarer Herzkrankheit und kardiovaskulären Erkrankungen besteht (WANG et al., 2007). Erhöhte Spiegel von carbamylisiertem LDL waren zudem mit kardiovaskulären Ereignissen und Mortalität bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung assoziiert (SPEER et al., 2014). Mechanistisch kommt es im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung zur Akkumulation von carbamylisiertem LDL und zur Interaktion von carbamylisiertem LDL und Endothelzellen. Dadurch wird Apoptose, oxidativer Stress und Autophagie induziert. Des Weiteren kann carbamylisiertes LDL in Makrophagen die Bildung von Schaumzellformationen fördern (APOSTOLOV et al., 2013; APOSTOLOV et al., 2011; BOSE et al., 2016; OK et al., 2005). Auch die Carbamylation von ApoA1 und ApoC3 in HDL tritt bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung wesentlich häufiger auf als bei gesunden Kontrollgruppen (CHANG et al., 2018). Durch diese posttranslationale Modifikation gehen die vasoprotektiven Eigenschaften von HDL verloren. Carbamylisiertes HDL inhibiert unter anderem die endotheliale Migration, Proliferation und Angiogenese (SUN et al., 2016). Die

posttranslationale Modifikation von Lipoproteinen führt somit durch unterschiedliche Pathomechanismen zur Erhöhung des kardiovaskulären Risikos.

6.4.3 Guanidinylierung

Als weitere posttranslationale Modifikation konnte die Guanidinylierung von Albumin bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung identifiziert werden. Das posttranslational modifizierte Albumin zeigte dabei Veränderungen in der Bindungskapazität für Indoxylsulfat. Bei Indoxylsulfat handelt es sich um ein hydrophobes Urämietoxin, welches bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung akkumuliert (RUETH et al., 2015). Fibrinogen von Dialysepatienten weist ebenfalls posttranslationale Modifikationen durch Glykosylierung und Guanidinylierung auf. Diese Modifikationen spielen eine Rolle bei der Bildung von Fibrinkoageln. Modifiziertes Fibrinogen bildet dabei im Vergleich zu unmodifiziertem Fibrinogen deutlich dünnere Fasern und dadurch dichtere Koagel aus. Diese prothrombotische Koagelstruktur stellt einen unabhängigen Risikofaktor für Mortalität dar. Somit handelt es sich hierbei um einen relevanten Effekt, der zumindest in Teilen auf der posttranslationalen Modifikation von Fibrinogen basiert (SCHUETT et al., 2017). Als weiteres Beispiel für relevante Guanidinylierungen konnte im Serum von Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (SLE) eine posttranslationale Guanidinylierung von Y-box binding protein1 (YB-1) nachgewiesen werden. Diese Modifikation korrelierte dabei mit der Krankheitsaktivität und ging mit einer gesteigerten Aktivierung des Notch-3 Signalweges in T-Lymphocyten einher. Die Depletion von Notch-3 im Lupus-Tiermodell führte zu einer Aggravierung der Erkrankung mit signifikant erhöhter Mortalität, sodass der YB-1:Notch-3 Signalkaskade eine protektive Wirkung bei SLE zugeschrieben wird. In diesem Zusammenhang zeigt die posttranslationale Guanidinylierung von YB-1 eine protektive Wirkung (BREITKOPF et al., 2020). In unserer aktuellen Studie konnten wir die posttranslationale Guanidinylierung von ApoC3 beschreiben. Die Guanidinylierung von ApoC3 führt durch eine gesteigerte Bindung an TLR4 zu einer erhöhten Bindung an humane Monocyten. Dadurch verstärkt die Guanidinylierung die proinflammatorischen Effekte von ApoC3.

6.5 Therapeutische Modulation der Triglyceride und ApoC3

Die Wirksamkeit von Lipidsenkern wie Statinen, Ezetimib und PCSK9-Inhibitoren ist seit Jahren bekannt und ihre Relevanz in der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen unumstritten. Während der Effekt bei diesen Präparaten primär der Senkung des LDL-C zugeschrieben wird, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Senkung der Triglyceride auf die kardiovaskuläre Risikoreduktion hat. In der Literatur gibt es insbesondere für die Wirksamkeit von Fibraten, Niacin und Omega-3-Fettsäuren kontroverse Berichte. Mit der Antisense-Nukleotid-Inhibition existiert zudem eine neue gezielte Behandlungsstrategie bei

der Therapie der Hypertriglyceridämie. In den letzten Jahren etabliert sich zudem Inflammation zunehmend als essentieller Faktor bei der Entstehung und der Progression von kardiovaskulären Erkrankungen. Somit spielt auch die antiinflammatorische Wirkung der einzelnen Behandlungsstrategien eine wesentliche Rolle (ROSS, 1999) (HANSSON, 2005) (LIBBY et al., 2009).

6.5.1 Fibrate

Fibrate beeinflussen sowohl Plasma-Triglyceridspiegel, als auch HDL-C-Spiegel. Dabei konnte gezeigt werden, dass sie effektiv Triglycerid-Level senken und dabei HDL-C steigern und somit das kardiovaskuläre Risiko bei Patienten mit sehr hohen Triglycerid-Plasmaspiegeln senken konnten (ROBINS et al., 2001; RUBINS et al., 1999). Es sollte hierbei beachtet werden, dass in verschiedenen Studien die zusätzliche Gabe von Fibraten in Kombination mit Statinen im Vergleich zur Monotherapie mit Statinen keine weitere Risikoreduktion für das kardiovaskuläre Risiko erbrachten (LAUFS et al., 2020). Bei der Therapie mit Fibraten sollte außerdem beachtet werden, dass eine Behandlung mit Fibraten mit einer Abnahme der Nierenfunktion assoziiert ist. Insbesondere bei Patienten mit einer eGFR unterhalb von 30 ml/min/1.73m² besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für eine Nierenfunktionsverschlechterung (LIPSCOMBE, BARGMAN, 2001; LIPSCOMBE et al., 2001). Bisher ist jedoch unklar, ob es sich hierbei um eine echte Nierenfunktionsverschlechterung, oder lediglich um einen Anstieg der Serumkreatinin-Werte durch eine gesteigerte Kreatininproduktion handelt (SICA, 2009). Zudem ist ein großer Anteil der Risikoreduktion für kardiovaskuläre Ereignisse mit den gesteigerten HDL-C-Plasmaspiegeln assoziiert, wobei HDL von Patienten mit fortgeschrittener Nierenerkrankung seine vasoprotektiven Wirkungen verliert (SPEER et al., 2013). Passend hierzu konnte in post-hoc Analysen der ‚Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes‘ (ACCORD)-Studie, die die Wirksamkeit von Statinen gegen eine Kombination aus Statinen und Fenofibraten untersucht hat, gezeigt werden, dass eine zusätzliche Therapie mit Fenofibraten keinen Effekt auf das Outcome von Patienten mit CKD aufwies. Bei Patienten mit normaler Nierenfunktion und Diabetes mellitus Typ II war die zusätzliche Gabe von Fenofibraten mit einer deutlich reduzierten kardiovaskulären Mortalität assoziiert (PAPADEMETRIOU et al., 2017). Basierend auf diesen Gesichtspunkten sollten Fibrate bei CKD-Patienten nur bei massiv erhöhten Triglyceridplasmaspiegeln (e.g. >1000 mg/dl) erwogen werden und dabei eine individuelle Nutzen-Risiken-Abwägung erfolgen. Aktuell läuft mit der PROMINENT-Studie (Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides IN patients With diabetes) eine Phase 3 klinische Studie zur Evaluation des selektiven Peroxisom Proliferator Aktivierten Rezeptor (PPAR) - Modulators Pemafibrat. Die Studie schließt etwa 10.000 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus und Hypertriglyceridämie ein (ARAKI et al., 2018). In unserer aktuellen Studie konnten wir zeigen, dass die

posttranslationale Modifikation von ApoC3 in primär nicht mit einer Veränderung des Lipidprofils, sondern mit gesteigerter Inflammation einhergeht. Die Guanidinylierung von ApoC3 tritt bei Patienten mit urämischem Milieu auf. Gerade bei Patienten mit fortgeschrittener chronischer Nierenerkrankung ist die Behandlungsmöglichkeit mit Fibraten jedoch sehr eingeschränkt. Zur Therapie dieses Patientenkollektivs werden somit in Zukunft andere antiinflammatorische Behandlungsstrategien benötigt werden.

6.5.2 Niacin

In der ‚Atherothrombosis Intervention in Metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: impact on Global Health outcomes‘ (AIM-HIGH)-Studie wurde ein Patientenkollektiv mit manifester atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankung und atherogener Dyslipidämie mit hohem kardiovaskulärem Risiko eingeschlossen. Bei diesen Patienten wurde untersucht, ob die Gabe von Extended release niacin (ERN) zusätzlich zur bereits etablierten Therapie mit Statinen und einem Baseline LDL-C von 71 mg/dl zur Reduktion von kardiovaskulären Events führt. Die Behandlung mit ERN führte im Vergleich zur Placebogruppe zwar zur deutlichen Reduktion der Triglycerid-Plasmaspiegel, ging allerdings nicht mit einer signifikanten Reduktion des kardiovaskulären Risikos einher (INVESTIGATORS, 2011; INVESTIGATORS et al., 2011; PROBSTFIELD et al., 2018). Eine post hoc Analyse der AIM-High-Studie befasste sich mit einer Subgruppe von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung. Die Gabe von ERN war im Vergleich zu Placebo mit einer signifikanten Reduktion der Triglycerid-Spiegel und einem Anstieg des HDL-C verbunden. Es zeigte sich jedoch, dass die Gabe von ERN zusätzlich zu Simvastatin im Rahmen der Sekundärprävention auch in diesem Patientenkollektiv keine Verbesserung des kardiovaskulären Outcomes oder der renalen Funktion hervorrief und zudem mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert war (KALIL et al., 2015). Auch die Erfahrungen mit der Therapie von Niacin zeigen, dass eine reine Senkung der Triglycerid-Plasmaspiegel nicht zwangsläufig mit einem besseren kardiovaskulären Outcome der Patienten einhergeht. In diesem Zusammenhang stellt sich erneut die Notwendigkeit weiterer Behandlungsstrategien zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos dar.

6.5.3 Omega-3-Fettsäuren

Omega-3-Fettsäuren senken Triglycerid-Plasmaspiegel sowohl bei Patienten mit als auch ohne chronische Nierenerkrankung. Bisher konnte jedoch die Gabe von niedrigen Dosen bis 1 g/d keine Reduktion des kardiovaskulären Risikos zeigen. Eine Meta-Analyse, die insgesamt zehn Studien und 77.917 Personen einschloss, konnte keine Empfehlung zur Gabe von niedrigen Dosen an Omega-3-Fettsäuren in der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen abgeben (AUNG et al., 2018). Auch in weiteren Studien konnte kein verbessertes kardiovaskuläres Outcome durch die Supplementierung mit Omega-3

Fettsäuren gezeigt werden (MANSON et al., 2019). In der REDUCE-IT Studie wurde der Effekt von höheren Dosen Omega-3-Fettsäuren getestet. Hierfür erhielten Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko und erhöhten Triglycerid-Plasmaspiegeln zusätzlich zur Statintherapie (LDL-C Baseline Median 75 mg/dl) 4 g Icosapent-Ethyl pro Tag. In diesem Patientenkollektiv konnte durch die Gabe von Icosapent-Ethyl eine signifikante Reduktion des kardiovaskulären Risikos im Vergleich zur Placebogruppe gezeigt werden. Die REDUCE-IT Studie konnte somit einen Benefit durch die Gabe von Icosapent-Ethyl zeigen, wies aber explizit daraufhin, dass diese Ergebnisse nicht auf die allgemeine Supplementierung von Omega-3-Fettsäuren anwendbar seien. Diese erbrachten in den bisherigen Studien keinen klinischen Vorteil. Zudem sollte darauf hingewiesen werden, dass das positive Outcome auch durch weitere Faktoren als die Senkung der Triglycerid-Level verursacht wurde, da die positiven Ergebnisse auch unabhängig von den Triglycerid-Plasmaspiegeln in der Baseline waren (BHATT et al., 2019). Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die in der Placebogruppe verwendeten Mineral-Öl Präparate für den signifikanten Unterschied verantwortlich waren, da unter anderem eine verminderte Resorption von Statinen sowie der verzeichnete CRP Anstieg von über 30 % diskutiert wurde. Letztendlich wird vermutet, dass die ausgeprägte kardiovaskuläre Risikoreduktion, die in der REDUCE-IT Studie gezeigt wurde, nicht vollständig durch die Effekte des Mineralöls zu erklären sind und dass somit eine tatsächliche Risikoreduktion durch die Einnahme von Icosapent-Ethyl bestehen könnte ((FDA), 2019). In der STRENGTH-Studie zur Wirksamkeit von Hochdosis Omega-3 Fettsäuren in der 13.078 Patienten mit hohem kardiovaskulärem Risiko und adäquater Statintherapie eingeschlossen wurden, erfolgte die Gabe von Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Die Studie wurde bereits frühzeitig abgebrochen, da statistische Analysen keine Reduktion des kardiovaskulären Risikos durch die Gabe dieser Omega-3-Fettsäure-Kombination zeigen konnten (NICHOLLS et al., 2020). Die Frage, ob eine Gabe von verschiedenen Omega-3-Fettsäure-Kombinationen mit einem reduzierten kardiovaskulären Risiko einhergeht, bleibt somit weiterhin umstritten.

6.5.4 Antisense Nukleotide

Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass durch *ApoC3* Antisense-Oligonukleotide selektiv ApoC3 und damit Triglyceridplasmaspiegel gesenkt werden konnten (GRAHAM et al., 2013) (GAUDET et al., 2015). In diesem Rahmen konnte zudem gezeigt werden, dass die Inhibition von ApoC3 gut vertragen wurde und nicht mit einer Hepatotoxizität assoziiert war. Die ApoC3 Inhibition zeichnete sich damit als potentiell therapeutisches Target zur Kardioprotektion ab (GRAHAM et al., 2013; MILONAS, TZIOMALOS, 2019). In einer klinischen Phase II Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Antisense-Inhibition von *ApoC3* bei Patienten mit Hypertriglyceridämie eine deutliche Reduktion der Triglycerid-Level verursachte (GAUDET et al., 2015). Im Rahmen

der klinischen Phase III APPROACH-Studie reduzierte das gegen ApoC3 gerichtete Antisense-Nukleotid Volanesorsen die ApoC3-Plasmaspiegel um bis zu 84% sowie die durchschnittlichen Triglyceridplasmaspiegel um 77%, ohne dabei schwere Nebenwirkungen zu verursachen. In dieser Studie wurden 66 Patienten mit familiärem Chylomikronämie Syndrom (FCS) eingeschlossen und erhielten wöchentlich subkutane Injektionen von 300 mg Volanesorsen oder Placebo. Als relevante Nebenwirkungen wurden Thrombozytopenien und Reaktionen an der Injektionsstelle beschrieben (WITZTUM et al., 2019a; WITZTUM et al., 2019b). Die COMPASS-Studie stellt eine weitere klinische Phase III Studie dar, in der Patienten mit einer multifaktoriellen Chylomikronämie mit Volanesorsen oder Placebo behandelt wurden. Volanesorsen konnte auch in dieser Studie eine signifikante Reduktion der Triglyceridplasmaspiegel bewirken im Gegensatz zu der APPROACH-Studie zeigte sich hier nur ein Fall einer Thrombozytopenie (GOUNI-BERTHOLD et al., 2021). Aktuell wird ein Next-Generation Oligonukleotid, das ApoC3 als Ziel hat, entwickelt (AKCEA-APOCIII-L_{RX}). In einer bisherigen Phase 1/2a Studie mit gesunden Freiwilligen mit milder Hypertriglyceridämie konnte eine Reduktion der Triglycerid-Plasmaspiegel von 65% erzielt werden. Zudem traten in diesem Rahmen keine relevanten Nebenwirkungen auf. Aktuell läuft mit der Phase-III-BALANCE-Studie eine weitere Studie mit Gabe von AKCEA-APOCIII-L_{RX} zur Therapie von Patienten mit familiärem Chylomikronämiesyndrom (IONIS PHARMACEUTICALS, 2020). Im Gegensatz zur bisherigen Zielsetzung der Therapie von Patienten mit familiären Chylomikronämiesyndrom ist die langfristige Zielsetzung beim Einsatz von Antisense-Inhibitoren von ApoC3 die Reduktion des kardiovaskulären Risikos bei Hochrisiko-Patienten. Die bisherigen Studien zur gezielten Antisense-Inhibition von ApoC3 beziehen sich in erster Linie auf die Senkung von ApoC3- und Triglyceridplasmaspiegeln. Wie wir in unserer Studie zeigen konnten, spielt neben der jeweiligen Plasmakonzentration auch eine inflammatorische Komponente eine entscheidende Rolle bei der Reduktion des kardiovaskulären Risikos. Es konnte bereits demonstriert werden, dass ApoC3 in der Lage ist, einen alternativen Signalweg des NLRP3-Inflammasoms zu aktivieren (ZEWINGER et al., 2020). In unserer aktuellen Studie konnten wir zudem nachweisen, dass die posttranslationale Modifikation von ApoC3 diesen Effekt durch eine gesteigerte Bindung an humane Monocyten verstärkt und dadurch mit gesteigerter Inflammation und erhöhtem kardiovaskulären Risiko assoziiert ist. Die gezielte Antisense-Inhibition von ApoC3 stellt somit eine interessante potentielle Behandlungsmethode zur Inhibition von systemischer Inflammation dar. Eine mögliche Reduktion von systemischer Inflammation durch die Gabe von Antisense-Inhibitoren von ApoC3 sollte im Rahmen weiterer Studien untersucht werden.

6.6 Limitationen der Studie

Die aktuelle Studie hat verschiedene Limitationen. Zunächst wurden im Rahmen unserer klinischen Studien ausschließlich kaukasische Patienten eingeschlossen. Demzufolge kann

keine generelle Aussage für andere Ethnizitäten getroffen werden. Da die Relevanz der Guanidinylierung von ApoC3 im Rahmen dieser Studie erstmals gezeigt werden konnte, gibt es bisher keine spezifische Therapie zur Inhibierung der Guanidinylation. Der Beweis, dass eine gezielte Therapie, die auf die Guanidinylierung von ApoC3 abzielt, einen positiven klinischen Effekt zeigt, konnte dementsprechend bisher nicht erbracht werden und wird in zukünftigen Studien untersucht werden müssen.

6.7 Ausblick

6.7.1 Therapeutische Modulation posttranslationaler Modifikation

Die Erforschung der Entstehung und der Bedeutung von posttranslationalen Modifikationen stellt ein interessantes Themenfeld der Zukunft dar. In bisherigen Studien konnte die vielfältige Beteiligung von posttranslationalen Modifikationen sowohl als Marker als auch als Antreiber bei der Entstehung und dem Progress von kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen werden. Der Fortschritt in verschiedenen Technologien unter anderem der Massenspektroskopie ermöglicht es pathophysiologische Prozesse bis zur Molekularebene zu analysieren und hierdurch krankheitsrelevante posttranslationale Modifikationen aufzudecken. Des Weiteren können basierend auf diesen Ergebnissen sowohl experimentelle als auch klinische Studien genutzt werden, um die Relevanz dieser Modifikationen zu evaluieren. Wie unter anderem in unserer aktuellen Studie gezeigt werden konnte, handelt es sich bei diesen Modifikationen nicht um rein deskriptive Befunde, sondern um pathophysiologisch relevante Faktoren, die sowohl mit einem schlechteren kardiovaskulären Outcome als auch mit erhöhter Mortalität einhergehen. Aus bisherigen Studien ist bekannt, dass verschiedene Aminosäuren die Carbamylierung von LDL hemmen konnten (SPEER et al., 2014). Der Einsatz von Aminosäuren stellt somit auch für die Prävention von posttranslationaler Guanidinylierung einen potentiellen therapeutischen Ansatz dar. Ein weiterer entscheidender Ansatz ist die Reduktion von Risikofaktoren für die Entstehung von posttranslationalen Modifikationen wie Inflammation, oxidativer Stress und urämischer Dyslipidämie. Die Untersuchung von weiteren relevanten posttranslationalen Modifikationen und die Entwicklung von möglichen diagnostischen und therapeutischen Strategien stellt eine spannende Aufgabe der zukünftigen Forschung dar.

6.7.2 Anti-inflammatorische Therapieansätze

Die Rolle der Inflammation bei der Entstehung und dem Progress von kardiovaskulären Erkrankungen ist von großem Interesse. In den letzten Jahren konnten mehrere Studien die entscheidende Bedeutung von Inflammation bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und als mögliches therapeutisches Target zeigen. Insbesondere konnte in der CANTOS-Studie, COLCOT, sowie in der LODOCO2- Studie demonstriert werden, dass die Reduktion von Inflammation mit einem besseren kardiovaskulären Outcome bei

Patienten mit einem hohen kardiovaskulären Risiko assoziiert ist (NIDORF et al., 2020; RIDKER et al., 2017; TARDIF et al., 2019). Die CANTOS-Studie konnte als erste Studie im großen Maßstab nachweisen, dass eine antiinflammatorische Therapie mit einem reduzierten kardiovaskulären Risiko einhergeht. Die Gabe von Canakinumab, einem gegen Interleukin-1 β gerichteter Antikörper, führte zu einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit frischem Herzinfarkt. In der COLCOT-Studie und der LODOCO2-Studie konnte gezeigt werden, dass die breit antiinflammatorisch wirksame Substanz Colchicin, ebenfalls das kardiovaskuläre Risiko von Patienten mit manifester kardiovaskulärer Erkrankung senkt.

6.7.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend baut unsere aktuelle Studie auf bisherigen Ergebnissen auf, die zeigen konnten, dass ApoC3 zur Aktivierung eines alternativen Signalweges des NLRP3-Inflammasoms in humanen Monocyten führt. Die posttranslationale Guanidinylierung von ApoC3 führte hierbei zu einer verstärkten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, dadurch zur Steigerung von Inflammation und somit letztlich zu einem schlechteren kardiovaskulären Outcome der Patienten. In Zusammenschau aus den experimentellen und klinischen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei guanidinyliertem ApoC3 nicht nur um einen potentiellen diagnostischen Marker handelt, der es ermöglicht, Aussagen über die Prognose und das kardiovaskuläre Risiko von Patienten mit CKD und CVD zu treffen, sondern dass die posttranslationale Guanidinylierung von ApoC3 auch ein potentiell therapeutisches Target darstellt. Bisher gibt es keine gezielten Therapiestrategien zur Inhibition von posttranslationalen Modifikationen, sodass hier vor allem die Reduktion von bekannten traditionellen und nicht-traditionellen Risikofaktoren in der kardiovaskulären Prävention zum Einsatz kommt. Die Entwicklung von gezielten therapeutischen Methoden zur Inhibition von posttranslationalen Modifikationen und damit zur Reduktion von Inflammation und damit des kardiovaskulären Risikos stellt einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Studien dar.

7. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

8. Publikationen

Guanidinylated Apolipoprotein C3 (ApoC3) Associates with Kidney and Vascular Injury. Schunk SJ, Hermann J, Sarakpi T, Triem S, Lellig M, Hahm E, Zewinger S, Schmit D, Becker E, Möllmann J, Lehrke M, Kramann R, Boor P, Lipp P, Laufs U, März W, Reiser J, Jankowski J, Fliser D, Speer T, Jankowski V. **J Am Soc Nephrol.** 2021 Sep 29;32(12):3146-60. doi: 10.1681/ASN.2021040503. Online ahead of print. PMID: 34588185

Interleukin-1 α Is a Central Regulator of Leukocyte-Endothelial Adhesion in Myocardial Infarction and in Chronic Kidney Disease.

Schunk SJ, Triem S, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Becker E, Hütter G, Wrublewsky S, Küting F, Hohl M, Alansary D, Prates Roma L, Lipp P, Möllmann J, Lehrke M, Laschke MW, Menger MD, Kramann R, Boor P, Jahnen-Dechent W, März W, Böhm M, Laufs U, Niemeyer BA, Fliser D, Ampofo E, Speer T. **Circulation.** 2021 Sep 14;144(11):893-908. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.053547. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34192892

Measurement of urinary Dickkopf-3 uncovered silent progressive kidney injury in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Schunk SJ, Beisswenger C, Ritzmann F, Herr C, Wagner M, Triem S, Hütter G, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Honecker A, Mahadevan P, Boor P, Wagenpfeil S, Jörres R, Watz H, Welte T, Vogelmeier CF, Gröne HJ, Fliser D, Speer T, Bals R. **Kidney Int.** 2021 Nov;100(5):1081-1091. doi: 10.1016/j.kint.2021.06.029. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34237325

Genetically determined NLRP3 inflammasome activation associates with systemic inflammation and cardiovascular mortality. Schunk SJ, Kleber ME, März W, Pang S, Zewinger S, Triem S, Ege P, Reichert MC, Krawczyk M, Weber SN, Jaumann I, Schmit D, Sarakpi T, Wagenpfeil S, Kramann R, Boerwinkle E, Ballantyne CM, Grove ML, Tragante V, Pilbrow AP, Richards AM, Cameron VA, Doughty RN, Dubé MP, Tardif JC, Feroz-Zada Y, Sun M, Liu C, Ko YA, Quyyumi AA, Hartiala JA, Tang WHW, Hazen SL, Allayee H, McDonough CW, Gong Y, Cooper-DeHoff RM, Johnson JA, Scholz M, Teren A, Burkhardt R, Martinsson A, Smith JG, Wallentin L, James SK, Eriksson N, White H, Held C, Waterworth D, Trompet S, Jukema JW, Ford I, Stott DJ, Sattar N, Cresci S, Spertus JA, Campbell H, Tierling S, Walter J, Ampofo E, Niemeyer BA, Lipp P, Schunkert H, Böhm M, Koenig W, Fliser D, Laufs U, Speer T; eQTLGen consortium; BIOS consortium. **Eur Heart J.** 2021 May 7;42(18):1742-1756. doi: 10.1093/eurheartj/ehab107. PMID: 33748830

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer der mich im Rahmen der gesamten Arbeit betreut, beraten, unterstützt und geführt hat. Durch seine herausragende Unterstützung wurde nicht nur die Fertigstellung dieser Arbeit, sondern auch mein Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht. Ich möchte zudem meinem Betreuer Dr. Stefan Schunk danken, der mich bei der bei der Durchführung der gesamten Arbeit betreut hat.

Ein großer Dank gilt außerdem der Arbeitsgruppe, die maßgeblich an den Experimenten aus dieser Dissertation beteiligt war. Vielen Dank an unsere MTAs Caroline Abbosh, Claudia Noll und Sarah Triem. Insbesondere Frau Ellen Becker möchte ich hierbei hervorzuheben, die mir das Arbeiten in einem Labor mit einer riesigen Vielzahl an verschiedenste Techniken und experimentellen Abläufen beigebracht hat und sich immer Zeit für meine vielen Fragen genommen hat. Auch ein besonderer Dank gilt Frau Andrea Lothschütz, die mich bei den verschiedensten organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten beraten und unterstützt hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meinen Eltern Dr. Bassam Sarakpi und Dr. Kerstin Ulrich, sowie meinem Bruder Yamen Sarakpi. Sie haben mich über die Jahre auf meinem Weg durch mein Studium, in den Berufseinstieg und zur Vervollständigung dieser Arbeit begleitet und waren dabei stets eine große Unterstützung.

9. Literaturverzeichnis

1. (FDA) FaDA (2019). Endocrinologic and Metabolic Drugs Advisory Committee Meeting
2. Apostolov EO, Ray D, Alobuia WM, Mikhailova MV, Wang X, Basnakian AG, Shah SV (2011) Endonuclease G mediates endothelial cell death induced by carbamylated LDL. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1997-2004
3. Apostolov EO, Ok E, Burns S, Nawaz S, Savenka A, Shah S, Basnakian AG (2013) Carbamylated-oxidized LDL: proatherosclerotic effects on endothelial cells and macrophages. *J Atheroscler Thromb* 20:878-892
4. Araki E, Yamashita S, Arai H, Yokote K, Satoh J, Inoguchi T, Nakamura J, Maegawa H, Yoshioka N, Tanizawa Y, Watada H, Suganami H, Ishibashi S (2018) Effects of Pemafibrate, a Novel Selective PPAR α Modulator, on Lipid and Glucose Metabolism in Patients With Type 2 Diabetes and Hypertriglyceridemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Diabetes Care* 41:538-546
5. Aung T, Halsey J, Kromhout D, Gerstein HC, Marchioli R, Tavazzi L, Geleijnse JM, Rauch B, Ness A, Galan P, Chew EY, Bosch J, Collins R, Lewington S, Armitage J, Clarke R, Omega-3 Treatment Trialists C (2018) Associations of Omega-3 Fatty Acid Supplement Use With Cardiovascular Disease Risks: Meta-analysis of 10 Trials Involving 77917 Individuals. *JAMA Cardiol* 3:225-234
6. Austin MA (1991) Plasma triglyceride and coronary heart disease. *Arterioscler Thromb* 11:2-14
7. Avall K, Ali Y, Leibiger IB, Leibiger B, Moede T, Paschen M, Dicker A, Dare E, Kohler M, Ilegems E, Abdulreda MH, Graham M, Crooke RM, Tay VS, Refai E, Nilsson SK, Jacob S, Selander L, Berggren PO, Juntti-Berggren L (2015) Apolipoprotein CIII links islet insulin resistance to beta-cell failure in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E2611-2619
8. Baum H (2021). Myeloperoxidase. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*
9. Bhatt DL, Steg PG, Miller M, Brinton EA, Jacobson TA, Ketchum SB, Doyle RT, Jr., Juliano RA, Jiao L, Granowitz C, Tardif JC, Ballantyne CM, Investigators R-I (2019) Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* 380:11-22
10. Blankenhorn DH, Alaupovic P, Wickham E, Chin HP, Azen SP (1990) Prediction of angiographic change in native human coronary arteries and aortocoronary bypass grafts. Lipid and nonlipid factors. *Circulation* 81:470-476
11. Bonk T, Humeny A (2001) MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist* 7:6-12
12. Bose C, Shah SV, Karaduta OK, Kaushal GP (2016) Carbamylated Low-Density Lipoprotein (cLDL)-Mediated Induction of Autophagy and Its Role in Endothelial Cell Injury. *PLoS One* 11:e0165576
13. Bowden RG, Wilson RL, Beaujean AA (2011) LDL particle size and number compared with LDL cholesterol and risk categorization in end-stage renal disease patients. *J Nephrol* 24:771-777
14. Bretkopf DM, Jankowski V, Ohl K, Hermann J, Hermert D, Tenbrock K, Liu X, Martin IV, Wang J, Groll F, Grone E, Floege J, Ostendorf T, Rauen T, Raffetseder U (2020) The YB-1:Notch-3 axis modulates immune cell responses and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 97:289-303
15. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, Luno J (2008) Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl*:S4-9
16. Carracedo J, Merino A, Briceno C, Soriano S, Buendia P, Calleros L, Rodriguez M, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R (2011) Carbamylated low-density lipoprotein

- induces oxidative stress and accelerated senescence in human endothelial progenitor cells. *FASEB J* 25:1314-1322
17. Chan DC, Watts GF, Nguyen MN, Barrett PH (2006) Apolipoproteins C-III and A-V as predictors of very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B-100 kinetics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:590-596
 18. Chan DC, Watts GF, Ooi EM, Ji J, Johnson AG, Barrett PH (2008) Atorvastatin and fenofibrate have comparable effects on VLDL-apolipoprotein C-III kinetics in men with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1831-1837
 19. Chang CT, Shen MY, Hsieh JY, Chang CM, Liao HY, Chen FY, Hsu CY, Yang CY, Chen CJ (2018) Increased electronegativity of high-density lipoprotein in uremia patients impairs its functional properties and is associated with the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 278:147-155
 20. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, Andreotti F, Boren J, Catapano AL, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Nordestgaard BG, Ray KK, Reiner Z, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, European Atherosclerosis Society Consensus P (2011) Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 32:1345-1361
 21. Cholesterol Treatment Trialists C, Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes EH, Voysey M, Gray A, Collins R, Baigent C (2012) The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 380:581-590
 22. Doll S, Burlingame AL (2015) Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications. *ACS Chem Biol* 10:63-71
 23. Emanuelsson F, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A, Benn M (2019) Impact of LDL Cholesterol on Microvascular Versus Macrovascular Disease: A Mendelian Randomization Study. *J Am Coll Cardiol* 74:1465-1476
 24. Fiedler H (2021). posttranlacionale Modifikation. In *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*
 25. G.B.D.CKD Collaborators (2020) Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 395:709-733
 26. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, Robertson AA, Cooper MA, Graf T, Hornung V (2016) Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* 44:833-846
 27. Gajjala PR, Fliser D, Speer T, Jankowski V, Jankowski J (2015) Emerging role of post-translational modifications in chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 30:1814-1824
 28. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP (2013) Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* 382:339-352
 29. Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM (1996) Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 276:875-881
 30. Gaudet D, Brisson D, Tremblay K, Alexander VJ, Singleton W, Hughes SG, Geary RS, Baker BF, Graham MJ, Crooke RM, Witztum JL (2014) Targeting APOC3 in the familial chylomicronemia syndrome. *N Engl J Med* 371:2200-2206
 31. Gaudet D, Alexander VJ, Baker BF, Brisson D, Tremblay K, Singleton W, Geary RS, Hughes SG, Viney NJ, Graham MJ, Crooke RM, Witztum JL, Brunzell JD, Kastelein JJ (2015) Antisense Inhibition of Apolipoprotein C-III in Patients with Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* 373:438-447
 32. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A (2016) The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int* 113:85-91

33. Gordts PL, Nock R, Son NH, Ramms B, Lew I, Gonzales JC, Thacker BE, Basu D, Lee RG, Mullick AE, Graham MJ, Goldberg IJ, Crooke RM, Witztum JL, Esko JD (2016) ApoC-III inhibits clearance of triglyceride-rich lipoproteins through LDL family receptors. *J Clin Invest* 126:2855-2866
34. Gouni-Berthold I, Alexander VJ, Yang Q, Hurh E, Steinhagen-Thiessen E, Moriarty PM, Hughes SG, Gaudet D, Hegele RA, O'Dea LSL, Stroes ESG, Tsimikas S, Witztum JL, group Cs (2021) Efficacy and safety of volanesorsen in patients with multifactorial chylomicronaemia (COMPASS): a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 9:264-275
35. Graham MJ, Lee RG, Bell TA, 3rd, Fu W, Mullick AE, Alexander VJ, Singleton W, Viney N, Geary R, Su J, Baker BF, Burke J, Crooke ST, Crooke RM (2013) Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein C-III reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans. *Circ Res* 112:1479-1490
36. Haas ME, Attie AD, Biddinger SB (2013) The regulation of ApoB metabolism by insulin. *Trends Endocrinol Metab* 24:391-397
37. Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685-1695
38. Haynes R, Lewis D, Emberson J, Reith C, Agodoa L, Cass A, Craig JC, de Zeeuw D, Feldt-Rasmussen B, Fellstrom B, Levin A, Wheeler DC, Walker R, Herrington WG, Baigent C, Landray MJ, Group SC, Group SC (2014) Effects of lowering LDL cholesterol on progression of kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 25:1825-1833
39. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, Boren J, Bruckert E, Catapano AL, Descamps OS, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT, Masana L, Pajukanta P, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Santos RD, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, Wiklund O, European Atherosclerosis Society Consensus P (2014) The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:655-666
40. Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Alaupovic P, Pogoda JM, LaBree L, Hemphill LC, Krams DM, Blankenhorn DH (1994) Triglyceride- and cholesterol-rich lipoproteins have a differential effect on mild/moderate and severe lesion progression as assessed by quantitative coronary angiography in a controlled trial of lovastatin. *Circulation* 90:42-49
41. Hokanson JE, Austin MA (1996) Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 3:213-219
42. Holy EW, Akhmedov A, Speer T, Camici GG, Zewinger S, Bonetti N, Beer JH, Luscher TF, Tanner FC (2016) Carbamylated Low-Density Lipoproteins Induce a Prothrombotic State Via LOX-1: Impact on Arterial Thrombus Formation In Vivo. *J Am Coll Cardiol* 68:1664-1676
43. Horkko S, Huttunen K, Korhonen T, Kesaniemi YA (1994) Decreased clearance of low-density lipoprotein in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 45:561-570
44. Investigators A-H (2011) The role of niacin in raising high-density lipoprotein cholesterol to reduce cardiovascular events in patients with atherosclerotic cardiovascular disease and optimally treated low-density lipoprotein cholesterol: baseline characteristics of study participants. The Atherothrombosis Intervention in Metabolic syndrome with low HDL/high triglycerides: impact on Global Health outcomes (AIM-HIGH) trial. *Am Heart J* 161:538-543
45. Investigators A-H, Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, McBride R, Teo K, Weintraub W (2011) Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 365:2255-2267
46. Ionis Pharmaceuticals I (2020). A Study of AKCEA-APOCIII-LRx Administered to Patients With Familial Chylomicronemia Syndrome (FCS) (BALANCE)
47. Ito Y, Azrolan N, O'Connell A, Walsh A, Breslow JL (1990) Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. *Science* 249:790-793

48. Jaisson S, Pietrement C, Gillery P (2011) Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. *Clin Chem* 57:1499-1505
49. Jensen MK, Aroner SA, Mukamal KJ, Furtado JD, Post WS, Tsai MY, Tjonneland A, Polak JF, Rimm EB, Overvad K, McClelland RL, Sacks FM (2018) High-Density Lipoprotein Subspecies Defined by Presence of Apolipoprotein C-III and Incident Coronary Heart Disease in Four Cohorts. *Circulation* 137:1364-1373
50. Jin JL, Guo YL, Li JJ (2016) Apoprotein C-III: A review of its clinical implications. *Clin Chim Acta* 460:50-54
51. Johnson LR (2004) *Encyclopedia of gastroenterology* (Amsterdam ; Boston, Academic Press).
52. Jorgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2014) Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease. *N Engl J Med* 371:32-41
53. Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, Neuen BL, Perkovic V (2021) Chronic kidney disease. *Lancet* 398:786-802
54. Kalil RS, Wang JH, de Boer IH, Mathew RO, Ix JH, Asif A, Shi X, Boden WE (2015) Effect of extended-release niacin on cardiovascular events and kidney function in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. *Kidney Int* 87:1250-1257
55. KDIGO (2012) *Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. *Kidney Int* 2013
56. Kennedy DJ, Tang WH, Fan Y, Wu Y, Mann S, Pepoy M, Hazen SL (2013) Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc* 2:e000104
57. Khetarpal SA, Zeng X, Millar JS, Vitali C, Somasundara AVH, Zaroni P, Landro JA, Barucci N, Zavadoski WJ, Sun Z, de Haard H, Toth IV, Peloso GM, Natarajan P, Cuchel M, Lund-Katz S, Phillips MC, Tall AR, Kathiresan S, DaSilva-Jardine P, Yates NA, Rader DJ (2017) A human APOC3 missense variant and monoclonal antibody accelerate apoC-III clearance and lower triglyceride-rich lipoprotein levels. *Nat Med* 23:1086-1094
58. Kimmel JR (1967) Guanidination of proteins).
59. Kraus LM, Kraus AP, Jr. (2001) Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia. *Kidney Int Suppl* 78:S102-107
60. Lamkanfi M, Dixit VM (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157:1013-1022
61. Laufs U, Parhofer KG, Ginsberg HN, Hegele RA (2020) Clinical review on triglycerides. *Eur Heart J* 41:99-109c
62. Leemans JC, Kors L, Anders HJ, Florquin S (2014) Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 10:398-414
63. Li WW, Dammerman MM, Smith JD, Metzger S, Breslow JL, Leff T (1995) Common genetic variation in the promoter of the human apo CIII gene abolishes regulation by insulin and may contribute to hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 96:2601-2605
64. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on A (2009) Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54:2129-2138
65. Lipscombe J, Bargman JM (2001) Fibrate-induced increase in blood urea and creatinine. *Nephrol Dial Transplant* 16:1515
66. Lipscombe J, Lewis GF, Cattran D, Bargman JM (2001) Deterioration in renal function associated with fibrate therapy. *Clin Nephrol* 55:39-44
67. Liu J, Qian C, Cao X (2016) Post-Translational Modification Control of Innate Immunity. *Immunity* 45:15-30
68. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG (2018) Unmet need for primary prevention in individuals with hypertriglyceridaemia not eligible for statin therapy according to European Society of Cardiology/European Atherosclerosis Society guidelines: a contemporary population-based study. *Eur Heart J* 39:610-619

69. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, Gibson H, Albert CM, Gordon D, Copeland T, D'Agostino D, Friedenberg G, Ridge C, Bubes V, Giovannucci EL, Willett WC, Buring JE, Group VR (2019) Marine n-3 Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *N Engl J Med* 380:23-32
70. Martinelli N, Baroni M, Castagna A, Lunghi B, Stefanoni F, Tosi F, Croce J, Udali S, Woodhams B, Girelli D, Bernardi F, Olivieri O (2019) Apolipoprotein C-III Strongly Correlates with Activated Factor VII-Anti-Thrombin Complex: An Additional Link between Plasma Lipids and Coagulation. *Thromb Haemost* 119:192-202
71. Mendivil CO, Zheng C, Furtado J, Lel J, Sacks FM (2010) Metabolism of very-low-density lipoprotein and low-density lipoprotein containing apolipoprotein C-III and not other small apolipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:239-245
72. Miller M, Rhyne J, Chen H, Beach V, Ericson R, Luthra K, Dwivedi M, Misra A (2007) APOC3 promoter polymorphisms C-482T and T-455C are associated with the metabolic syndrome. *Arch Med Res* 38:444-451
73. Milonas D, Tziomalos K (2019) Experimental therapies targeting apolipoprotein C-III for the treatment of hyperlipidemia - spotlight on volanesorsen. *Expert Opin Investig Drugs* 28:389-394
74. Morena M, Cristol JP, Dantoine T, Carbonneau MA, Descomps B, Canaud B (2000) Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 15:389-395
75. Munzel T, Heitzer T, Harrison DG (1997) The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz* 22:158-172
76. Nagin DS, Jones BL, Passos VL, Tremblay RE (2018) Group-based multi-trajectory modeling. *Stat Methods Med Res* 27:2015-2023
77. Nicholls SJ, Hazen SL (2005) Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1102-1111
78. Nicholls SJ, Lincoff AM, Garcia M, Bash D, Ballantyne CM, Barter PJ, Davidson MH, Kastelein JJP, Koenig W, McGuire DK, Mozaffarian D, Ridker PM, Ray KK, Katona BG, Himmelmann A, Loss LE, Rensfeldt M, Lundstrom T, Agrawal R, Menon V, Wolski K, Nissen SE (2020) Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High Cardiovascular Risk: The STRENGTH Randomized Clinical Trial. *JAMA* 324:2268-2280
79. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, Eikelboom JW, Schut A, Opstal TSJ, The SHK, Xu XF, Ireland MA, Lenderink T, Latchem D, Hoogslag P, Jerzewski A, Nierop P, Whelan A, Hendriks R, Swart H, Schaap J, Kuijper AFM, van Hessen MWJ, Saklani P, Tan I, Thompson AG, Morton A, Judkins C, Bax WA, Dirksen M, Alings M, Hankey GJ, Budgeon CA, Tijssen JGP, Cornel JH, Thompson PL, LoDoCo2 Trial I (2020) Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med* 383:1838-1847
80. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A (2007) Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298:299-308
81. Nordestgaard BG, Varbo A (2014) Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet* 384:626-635
82. Ok E, Basnakian AG, Apostolov EO, Barri YM, Shah SV (2005) Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease. *Kidney Int* 68:173-178
83. Olivieri O, Stranieri C, Bassi A, Zaia B, Girelli D, Pizzolo F, Trabetti E, Cheng S, Grow MA, Pignatti PF, Corrocher R (2002) ApoC-III gene polymorphisms and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res* 43:1450-1457
84. Olivieri O, Bassi A, Stranieri C, Trabetti E, Martinelli N, Pizzolo F, Girelli D, Friso S, Pignatti PF, Corrocher R (2003) Apolipoprotein C-III, metabolic syndrome, and risk of coronary artery disease. *J Lipid Res* 44:2374-2381
85. Papademetriou V, Lovato L, Tsioufis C, Cushman W, Applegate WB, Mottle A, Punthakee Z, Nylen E, Doumas M, Group AS (2017) Effects of High Density Lipoprotein Raising Therapies on Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2

- Diabetes Mellitus, with or without Renal Impairment: The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study. *Am J Nephrol* 45:136-145
86. Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, Dziura J, Lifton RP, Shulman GI (2010) Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 362:1082-1089
 87. Pollin TI, Damcott CM, Shen H, Ott SH, Shelton J, Horenstein RB, Post W, McLenithan JC, Bielak LF, Peyser PA, Mitchell BD, Miller M, O'Connell JR, Shuldiner AR (2008) A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science* 322:1702-1705
 88. Probstfield JL, Boden WE, Anderson T, Branch K, Kashyap M, Fleg JL, Desvigne-Nickens P, McBride R, McGovern M, Investigators A-H (2018) Cardiovascular outcomes during extended follow-up of the AIM-HIGH trial cohort. *J Clin Lipidol* 12:1413-1419
 89. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ, Group CT (2017) Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 377:1119-1131
 90. Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, Perisa D, Heinrich K, Altwegg L, von Eckardstein A, Luscher TF, Landmesser U (2013) Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation* 127:891-904
 91. Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB, Trial V-HSGVAH-DLI (2001) Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *JAMA* 285:1585-1591
 92. Rohn S, Kroh LW (2005) Electron spin resonance--a spectroscopic method for determining the antioxidative activity. *Mol Nutr Food Res* 49:898-907
 93. Rosenson RS, Davidson MH, Hirsh BJ, Kathiresan S, Gaudet D (2014) Genetics and causality of triglyceride-rich lipoproteins in atherosclerotic cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 64:2525-2540
 94. Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
 95. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J (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* 341:410-418
 96. Rueth M, Lemke HD, Preisinger C, Krieter D, Theelen W, Gajjala P, Devine E, Zidek W, Jankowski J, Jankowski V (2015) Guanidinylation of albumin decreased binding capacity of hydrophobic metabolites. *Acta Physiol (Oxf)* 215:13-23
 97. Schuett K, Savvaidis A, Maxeiner S, Lysaja K, Jankowski V, Schirmer SH, Dimkovic N, Boor P, Kaesler N, Dekker FW, Floege J, Marx N, Schlieper G (2017) Clot Structure: A Potent Mortality Risk Factor in Patients on Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 28:1622-1630
 98. Schunk S, Hermann J, Sarakpi T, Triem S, Lellig M, Hahm E, Zewinger S, Schmit D, Becker E, Mollmann J, Lehrke M, Kramann R, Boor P, Lipp P, Laufs U, Marz W, Reiser J, Jankowski J, Fliser D, Speer T, Jankowski V (2021a) Guanidinylated Apolipoprotein C3 (ApoC3) Associates with Kidney and Vascular Injury. *J Am Soc Nephrol*
 99. Schunk SJ, Floege J, Fliser D, Speer T (2021b) WNT-beta-catenin signalling - a versatile player in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol* 17:172-184
 100. Schwartz GG, Abt M, Bao W, DeMicco D, Kallend D, Miller M, Mundl H, Olsson AG (2015) Fasting triglycerides predict recurrent ischemic events in patients with acute coronary syndrome treated with statins. *J Am Coll Cardiol* 65:2267-2275

101. Sica DA (2009) Fibrate therapy and renal function. *Curr Atheroscler Rep* 11:338-342
102. Silbernagel G, Scharnagl H, Kleber ME, Hoffmann MM, Delgado G, Stojakovic T, Gary T, Zeng L, Ritsch A, Zewinger S, Speer T, Schunkert H, Landmesser U, Marz W, Grammer TB (2020) Common APOC3 variants are associated with circulating ApoC-III and VLDL cholesterol but not with total apolipoprotein B and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 311:84-90
103. Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, Shroff R, Kuschnerus K, Krankel N, Kania G, Zewinger S, Akhmedov A, Shi Y, Martin T, Perisa D, Winnik S, Muller MF, Sester U, Wernicke G, Jung A, Gutteck U, Eriksson U, Geisel J, Deanfield J, von Eckardstein A, Luscher TF, Fliser D, Bahlmann FH, Landmesser U (2013) Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2. *Immunity* 38:754-768
104. Speer T, Owala FO, Holy EW, Zewinger S, Frenzel FL, Stahli BE, Razavi M, Triem S, Cvija H, Rohrer L, Seiler S, Heine GH, Jankowski V, Jankowski J, Camici GG, Akhmedov A, Fliser D, Luscher TF, Tanner FC (2014) Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction. *Eur Heart J* 35:3021-3032
105. Speer T, Ridker PM, von Eckardstein A, Schunk SJ, Fliser D (2021) Lipoproteins in chronic kidney disease: from bench to bedside. *Eur Heart J* 42:2170-2185
106. Statistisches Bundesamt (2021). Behandlungsverfahren bei Dialysepatientinnen und -patienten (Anzahl). Gliederungsmerkmale: Jahre, Region
107. Sun JT, Yang K, Lu L, Zhu ZB, Zhu JZ, Ni JW, Han H, Chen N, Zhang RY (2016) Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function. *Am J Physiol Renal Physiol* 310:F511-517
108. Tao Y, Xiong Y, Wang H, Chu S, Zhong R, Wang J, Wang G, Ren X, Yu J (2016) APOC3 induces endothelial dysfunction through TNF-alpha and JAM-1. *Lipids Health Dis* 15:153
109. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, Pinto FJ, Ibrahim R, Gamra H, Kiwan GS, Berry C, Lopez-Sendon J, Ostadal P, Koenig W, Angoulvant D, Gregoire JC, Lavoie MA, Dube MP, Rhainds D, Provencher M, Blondeau L, Orfanos A, L'Allier PL, Guertin MC, Roubille F (2019) Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 381:2497-2505
110. Tg, Hdl Working Group of the Exome Sequencing Project NHL, Blood I, Crosby J, Peloso GM, Auer PL, Crosslin DR, Stitzel NO, Lange LA, Lu Y, Tang ZZ, Zhang H, Hindy G, Masca N, Stirrups K, Kanoni S, Do R, Jun G, Hu Y, Kang HM, Xue C, Goel A, Farrall M, Duga S, Merlini PA, Asselta R, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Yin W, Reilly D, Speliotes E, Fox CS, Hveem K, Holmen OL, Nikpay M, Farlow DN, Assimes TL, Franceschini N, Robinson J, North KE, Martin LW, DePristo M, Gupta N, Escher SA, Jansson JH, Van Zuydam N, Palmer CN, Wareham N, Koch W, Meitinger T, Peters A, Lieb W, Erbel R, Konig IR, Kruppa J, Degenhardt F, Gottesman O, Bottinger EP, O'Donnell CJ, Psaty BM, Ballantyne CM, Abecasis G, Ordovas JM, Melander O, Watkins H, Orho-Melander M, Ardissino D, Loos RJ, McPherson R, Willer CJ, Erdmann J, Hall AS, Samani NJ, Deloukas P, Schunkert H, Wilson JG, Kooperberg C, Rich SS, Tracy RP, Lin DY, Altshuler D, Gabriel S, Nickerson DA, Jarvik GP, Cupples LA, Reiner AP, Boerwinkle E, Kathiresan S (2014) Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease. *N Engl J Med* 371:22-31
111. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns B, Klarenbach S, Pannu N, James M, Hemmelgarn B, Alberta Kidney Disease N (2013) Association between LDL-C and risk of myocardial infarction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 24:979-986
112. van Dijk KW, Rensen PC, Voshol PJ, Havekes LM (2004) The role and mode of action of apolipoproteins CIII and AV: synergistic actors in triglyceride metabolism? *Curr Opin Lipidol* 15:239-246
113. Victor RG, Haley RW, Willett DL, Peshock RM, Vaeth PC, Leonard D, Basit M, Cooper RS, Iannacchione VG, Visscher WA, Staab JM, Hobbs HH, Dallas Heart Study I (2004) The Dallas Heart Study: a population-based probability sample for the

- multidisciplinary study of ethnic differences in cardiovascular health. *Am J Cardiol* 93:1473-1480
114. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, Reynolds WF, Topol EJ, DiDonato JA, Hazen SL (2007) Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med* 13:1176-1184
115. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P (2017) Chronic Kidney Disease. *Lancet* 389:1238-1252
116. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Walsh MC, Choi Y, Shadel GS, Ghosh S (2011) TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472:476-480
117. Witztum JL, Gaudet D, Freedman SD, Alexander VJ, Digenio A, Williams KR, Yang Q, Hughes SG, Geary RS, Arca M, Stroes ESG, Bergeron J, Soran H, Civeira F, Hemphill L, Tsimikas S, Blom DJ, O'Dea L, Bruckert E (2019a) Volanesorsen and Triglyceride Levels in Familial Chylomicronemia Syndrome. *N Engl J Med* 381:531-542
118. Witztum JL, Geary RS, O'Dea L (2019b) Volanesorsen, Familial Chylomicronemia Syndrome, and Thrombocytopenia. Reply. *N Engl J Med* 381:2584
119. Wolska A, Lo L, Sviridov DO, Pourmoussa M, Pryor M, Ghosh SS, Kakkar R, Davidson M, Wilson S, Pastor RW, Goldberg IJ, Basu D, Drake SK, Cougnoux A, Wu MJ, Neher SB, Freeman LA, Tang J, Amar M, Devalaraja M, Remaley AT (2020) A dual apolipoprotein C-II mimetic-apolipoprotein C-III antagonist peptide lowers plasma triglycerides. *Sci Transl Med* 12
120. World Health Organization (2018). GLOBAL HEALTH ESTIMATES 2016 SUMMARY TABLES: GLOBAL DEATHS BY CAUSE, AGE AND SEX, 2000-2016
121. World Health Organization (2021). Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability
122. Xie Y, Bowe B, Mokdad AH, Xian H, Yan Y, Li T, Maddukuri G, Tsai CY, Floyd T, Al-Aly Z (2018) Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney Int* 94:567-581
123. Zewinger S, Drechsler C, Kleber ME, Dressel A, Riffel J, Triem S, Lehmann M, Kopecky C, Saemann MD, Lepper PM, Silbernagel G, Scharnagl H, Ritsch A, Thorand B, de las Heras Gala T, Wagenpfeil S, Koenig W, Peters A, Laufs U, Wanner C, Fliser D, Speer T, Marz W (2015) Serum amyloid A: high-density lipoproteins interaction and cardiovascular risk. *Eur Heart J* 36:3007-3016
124. Zewinger S, Kleber ME, Rohrer L, Lehmann M, Triem S, Jennings RT, Petrakis I, Dressel A, Lepper PM, Scharnagl H, Ritsch A, Thorand B, Heier M, Meisinger C, de Las Heras Gala T, Koenig W, Wagenpfeil S, Schwedhelm E, Boger RH, Laufs U, von Eckardstein A, Landmesser U, Luscher TF, Fliser D, Marz W, Meinitzer A, Speer T (2017a) Symmetric dimethylarginine, high-density lipoproteins and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 38:1597-1607
125. Zewinger S, Kleber ME, Tragante V, McCubrey RO, Schmidt AF, Direk K, Laufs U, Werner C, Koenig W, Rothenbacher D, Mons U, Breitling LP, Brenner H, Jennings RT, Petrakis I, Triem S, Klug M, Filipis A, Blankenberg S, Waldeyer C, Sinning C, Schnabel RB, Lackner KJ, Vlachopoulou E, Nygard O, Svingen GFT, Pedersen ER, Tell GS, Sinisalo J, Nieminen MS, Laaksonen R, Trompet S, Smit RAJ, Sattar N, Jukema JW, Groesdonk HV, Delgado G, Stojakovic T, Pilbrow AP, Cameron VA, Richards AM, Doughty RN, Gong Y, Cooper-DeHoff R, Johnson J, Scholz M, Beutner F, Thiery J, Smith JG, Vilmundarson RO, McPherson R, Stewart AFR, Cresci S, Lenzini PA, Spertus JA, Olivieri O, Girelli D, Martinelli NI, Leiberer A, Saely CH, Drexel H, Mundlein A, Braund PS, Nelson CP, Samani NJ, Kofink D, Hofer IE, Pasterkamp G, Quyyumi AA, Ko YA, Hartiala JA, Allayee H, Tang WHW, Hazen SL, Eriksson N, Held C, Hagstrom E, Wallentin L, Akerblom A, Siegbahn A, Karp I, Labos C, Pilote L, Engert JC, Brophy JM, Thanassoulis G, Bogaty P, Szczeklik W, Kaczor M, Sanak M, Virani SS, Ballantyne CM, Lee VV, Boerwinkle E, Holmes MV, Horne BD, Hingorani A, Asselbergs FW, Patel RS, consortium G-C, Kramer BK, Scharnagl

- H, Fliser D, Marz W, Speer T (2017b) Relations between lipoprotein(a) concentrations, LPA genetic variants, and the risk of mortality in patients with established coronary heart disease: a molecular and genetic association study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5:534-543
126. Zewinger S, Reiser J, Jankowski V, Alansary D, Hahm E, Triem S, Klug M, Schunk SJ, Schmit D, Kramann R, Korbel C, Ampofo E, Laschke MW, Selejan SR, Paschen A, Herter T, Schuster S, Silbernagel G, Sester M, Sester U, Assmann G, Bals R, Kostner G, Jahnen-Dechent W, Menger MD, Rohrer L, Marz W, Boehm M, Jankowski J, Kopf M, Latz E, Niemeyer BA, Fliser D, Laufs U, Speer T (2020) Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 21:30-41

Tag der Promotion: 12.06.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Thimoteus Speer

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Boehm