



Therese Macher, BSc

Einfluss des High-Density-Lipoprotein (HDL)- Remodellierungs-Faktors Endotheliale Lipase (EL) auf die Stickstoffmonoxid (NO)-induzie- rende Aktivität des Serums

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

Masterstudium Biochemie und Molekulare Biomedizin

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuer

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Saša Frank

Medizinische Universität Graz

Institut für Molekularbiologie und Biochemie

Graz, März 2017

DANKSAGUNG

Da es aufgrund meiner Berufstätigkeit nicht selbstverständlich war, dass ich meine Masterarbeit auch an meinem Arbeitsplatz – dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz – durchführen konnte, möchte ich mich insbesondere bei meinem wissenschaftlichen Betreuer und auch Vorgesetzten Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Saša Frank bedanken. Für die Betreuung im Labor danke ich Snežana Radulović und Irene Schilcher.

Für alles andere danke ich Jochen!

EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

Kurzfassung

Arteriosklerose und die damit verbundenen Folgeerscheinungen zählen weltweit betrachtet zu den häufigsten Todesursachen. Die genaue Pathogenese der Arteriosklerose, bei der es sich um eine chronisch entzündliche Gefäßerkrankung handelt, ist noch nicht vollständig geklärt. Zwei Lipoproteine namens Low-Density Lipoprotein (LDL) und High-Density Lipoprotein (HDL) stehen im Fokus der Arterioskleroseforschung. Während LDL Cholesterin zu den peripheren Geweben transportiert, ist HDL – umgangssprachlich auch als das „gute Cholesterin“ bezeichnet – für den Rücktransport des Cholesterins (RCT) zur Leber zuständig. Neben seiner wichtigen Rolle im RCT hat HDL einen positiven Einfluss auf die endotheliale Funktion, was primär auf die Produktion des gefäßrelaxierenden Faktors Stickstoffmonoxid (NO) durch das Enzym endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) zurückzuführen ist.

Verschiedene Serumenzyme sowie Rezeptoren wirken auf das HDL und führen zur ständigen Veränderung der HDL-Zusammensetzung und -Größe. Dieser dynamische Prozess wird als HDL-Remodellierung bezeichnet und kann sich auf die Funktionalität des HDLs auswirken. Ein Enzym, das zur HDL-Remodellierung beiträgt ist die Endotheliale Lipase (EL). EL spaltet bevorzugt die HDL-gebundenen Phospholipide, was zur Entstehung kleinerer sogenannter EL-HDL Partikel, freien Fettsäuren (FFS) und Lyso Phosphatidylcholin (LysoPCs) führt. Entzündliche Erkrankungen konnten mit einer erhöhten EL-Expression assoziiert werden. Daher könnte EL einen Einfluss auf atherogene Prozesse haben.

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte der Effekt von EL auf die eNOS und NO-induzierende Kapazität des Serums und ApoB-depletierten Serums (als HDL-Ersatz) untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde humanes Vollserum auf EL-überexprimierende HepG2-Zellen, für 8 Stunden unter Zellkulturbedingungen modifiziert. Die eNOS und NO-induzierende Kapazität wurde in vaskulären endothelialen EA.hy926-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden EA.hy926-Zellen mit EL-modifizierten-Serum und -ApoB-depletierten-Serum für 5 und 16 Stunden inkubiert. Im Fokus der anschließenden Untersuchungen stand dabei der von HDL vermittelte eNOS Signalweg. Die Bindung von HDL an den endothelialen SRB1 Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, die zur Phosphorylierung der Proteinkinase Akt (PAkt) und in weiterer Folge zur Phosphorylierung von eNOS (PeNOS) durch PAkt und zur NO Produktion führt.

Die densitometrische Auswertung der Proteinexpression nach 16-stündiger Inkubation von EL-modifizierten ApoB-depletierten Serum ergab eine signifikante Zunahme der PAkt Proteinexpression und eine signifikante Erniedrigung in der PeNOS Proteinexpression. Ebenso führte die

5-stündige EL-ApoB-depletierte Seruminkubation von Ea.hy926-Zellen zu einer signifikanten Erniedrigung der PeNOS Proteinexpression. Die Untersuchungen des Effekts von EL auf die eNOS Aktivität und NO Produktion führten ebenso zu einer signifikanten Erniedrigung der eNOS Aktivität und NO Produktion nach 16-stündiger EL-modifizierter ApoB-depletierter Seruminkubation.

Aufgrund der Ergebnisse lässt sich daraus schließen, dass die Modifikation von Vollserum durch EL zur Erniedrigung der eNOS- und NO-induzierenden Kapazität von EL-modifizierten ApoB-depletierten-Serums führt. Das kann auf die Generierung kleinerer EL-HDL Partikel oder auf die Entstehung lipolytischer Produkte (FFS und LysoPCs) zurückzuführen sein. Einerseits können die kleineren EL-HDL Partikel die Bindung an den endothelialen SRB1 Rezeptor negativ beeinflussen und andererseits kann es sein, dass die lipolytischen Produkte mit eNOS interagieren und seine Aktivität verändern.

Abstract

Arteriosclerosis and its complications are the leading cause of death worldwide. The pathogenesis of this disease is still unknown, but two lipoproteins called LDL and HDL are associated with arterogenesis. LDL delivers cholesterol to peripheral tissues whereas HDL – known as good cholesterol – plays a major role in the reverse cholesterol transport (RCT). Moreover HDL exerts direct beneficial effect on the vascular endothelium, primarily by activating the production of the major vascular relaxing factor NO. Different serum enzymes and receptors permanently modify HDL composition and size – a dynamic process known as HDL-remodelling. One of these modifying enzymes – endothelial lipase (EL) – preferentially hydrolyzes phospholipids within HDL generating smaller EL-HDL particles and lipolytic products. Inflammatory diseases are associated with an increased EL expression and EL may contribute to atherogenic process.

The aim of the study was to examine whether EL, by acting on the whole serum, alters the effect of serum and apoB-depleted serum (a surrogate of HDL) on endothelial eNOS activity and NO bioavailability. Therefore endothelial Ea.hy926-cells were treated with EL-modified or control serum or -apoB-depleted serum for 5 or 16 hours. The study focused on the HDL induced eNOS signaling pathway which includes the subsequent phosphorylation of the signaling proteins Akt (PAkt) and eNOS (PeNOS) leading to NO production.

While the expression of PeNOS was significantly decreased following the 16 hours treatment of EA.hy926 cells with EL-modified apoB-depleted serum, the PAkt protein levels were significantly upregulated compared to control incubations. In line with the decreased PeNOS protein expression, eNOS activity and NO production were also significantly decreased in cells treated with EL-modified apoB-depleted serum, compared to control incubations, for 16 hours.

Based on our results we conclude that EL, by acting on the whole serum decreases eNOS and NO inducing capacity of apoB-depleted Serum (16 h-incubation) most likely by remodelling of HDL into smaller HDL particles or by generating lipolytic products.

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	Lipoproteine	1
1.1.1	Struktur und Funktion	1
1.1.2	Stoffwechsel	2
1.1.2.1	Exogener Lipidstoffwechselweg	3
1.1.2.2	Endogener Stoffwechselweg	3
1.2	High-density Lipoprotein (HDL)	5
1.2.1	Struktur und Subklassen	5
1.2.1.1	Wichtige Komponenten des HDL-Proteoms	7
1.2.1.2	Wichtige Komponenten des HDL-Lipidoms	9
1.2.2	Biosynthese und Stoffwechsel	11
1.2.3	Anti-atherogene Effekte	13
1.2.3.1	Stimulierung der NO Produktion	14
1.2.3.2	Anti-oxidative Eigenschaften	14
1.2.4	Pathophysiologische Rolle	15
1.2.4.1	Endotheliale Dysfunktion	15
1.2.4.2	Exkurs: Arteriosklerose	16
1.3	Endotheliale Lipase (EL)	18
1.3.1	EL und HDL Metabolismus	18
1.3.2	EL und RCT	19
1.3.3	EL und Arteriosklerose	20
1.4	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)	22
1.4.1	NOS Isoformen und Lokalisation	22
1.4.2	NO Synthese	22
1.4.3	eNOS Signalwege	24
1.4.3.1	Kalziumabhängige eNOS Aktivierung	24
1.4.3.2	eNOS Interaktion mit Caveolin-1	25
1.4.3.3	eNOS Phosphorylierung	26
1.4.3.4	HDL und die Aktivierung des eNOS Signalwegs	27
1.4.4	Pathophysiologische Rolle	28
1.4.4.1	eNOS Dysfunktion	29
1.4.4.2	eNOS Entkopplung und NO Inaktivierung	30
2	ZIELSETZUNG	32

3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Zelllinien.....	34
3.2	Virus	34
3.3	Reagenzien.....	34
3.4	Zellkulturroutine.....	35
3.5	EL-Adenovirus Überexpression und Serum Modifikation.....	35
3.6	ApoB Serum Depletion.....	35
3.7	Zellkulturexperimente - Inkubation von EA.hy926-Zellen mit EV und EL-modifizierten Serum und -ApoB-depletierten Serum	36
3.8	Western Blot.....	37
3.9	Messung der eNOS Aktivität.....	39
3.10	Messung der Nitrit Produktion mittels HPLC.....	39
3.11	Statistische Auswertung	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Lipidgehalt des EV- und EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums	40
4.2	Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die Phosphorylierung von eNOS	41
4.3	Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die Phosphorylierung von Akt	42
4.4	Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die eNOS-Aktivität	43
4.5	Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die NO Produktion	44
5	DISKUSSION.....	45

1 Einführung

1.1 Lipoproteine

In Abhängigkeit von ihrer Struktur verfügen Lipide über sehr unterschiedliche physiologische Funktionen. So dienen z. B. Triglyzeride dem Körper als Energiespeicher, Zellmembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht und darüber hinaus verwendet der Körper Lipide zur Biosynthese von Hormonen. Damit Lipide im Blut und somit im wässrigen Milieu transportiert werden können assoziieren sie mit speziellen Transportproteinen – den Apolipoproteinen – zu sog. Lipoprotein-Komplexen.¹ Die Hauptfunktion der Lipoproteine besteht darin Lipide, – hauptsächlich Triglyzeride (TG), freies Cholesterin, Cholesterinester und Phospholipide – im Körper zu transportieren.²

1.1.1 Struktur und Funktion

Es existieren vier Lipoprotein-Hauptklassen, die sich aufgrund ihrer Lipid- und Apolipoprotein-Komposition voneinander unterscheiden (siehe Tabelle 1). Chylomikronen (CM) und Very-Low-Density Lipoproteine (VLDL) verfügen über einen hohen Triglyceridgehalt, während Low-Density Lipoproteine (LDL) und High-Density Lipoproteine (HDL) zu den Cholesterinreichen Lipoproteinen zählen.³

Table I. Classes of plasma lipoproteins and their characteristics.

Lipoprotein	Density (g/dl)	Diameter (nm)	Origin	Lipid composition (%)	Major Functions
Chylomicrons	<0.95	75-1200	Intestine	TG:80-90 Chol:2-7 PL:3-9	Transport of dietary TGs
Very low density lipoproteins	<0.95-1.006	30-80	Liver	TG:55-80 Chol:5-15 PL:10-20	Transport of endogenously synthesized TGs
Intermediate density lipoproteins	1.006-1.019	25-35	Metabolism of VLDL	TG:20-50 Chol:20-40 PL:15-25	Transport of endogenous Cholesterol
Low density lipoproteins	1.019-1.063	18-25	Metabolism of VLDL and IDL	TG:5-15 Chol:40-50 PL:10-14	Transport of cholesterol esters of hepatic and intravascular origin
High density lipoproteins	1.063-1.21	5-12	Liver, intestine, intravascular metabolic reactions	TG: 5-10 Chol:15-25 PL:20-30	Facilitates removal of Cholesterol from extra-hepatic tissues

*Apolipoproteins make up the rest.

Abbreviations: TGs; triglycerides, Chol: cholesterol, PL; phospholipids.

Tabelle 1: Lipoproteinklassen und ihre Eigenschaften (online verfügbar unter: http://jpma.org.pk/full_article_text.php?article_id=4665)

¹ Vgl. Löffler: Basiswissen Biochemie, 2005, 159

² Vgl. Aizawa et al: Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism, 2015, 10299)

³ Vgl. Löffler: Basiswissen Biochemie, 2005, 208

Bezugnehmend auf die Lipoprotein-Struktur besitzt der HDL-Partikel eine polare Oberfläche aus amphiphatischen Phospholipiden, Apolipoproteinen und freiem Cholesterin sowie einen apolaren Kern bestehend aus Triglyzeriden und Cholesterinestern.

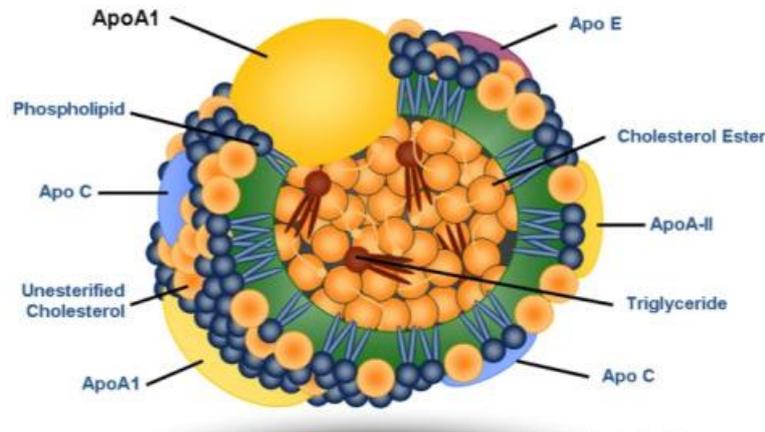


Abbildung 1: Struktur des Lipoproteins HDL (online verfügbar unter: <http://169.237.124.48/FFHI/prog/lnp/proj/comp>)

Bei den Apolipoproteinen handelt es sich um amphiphatische Proteine, die dabei helfen, die Lipoprotein Struktur zu stabilisieren. Außerdem agieren sie als Liganden und unterstützen Enzymreaktionen als Co-Faktoren. Zu den Apolipoproteinen zählen Apolipoprotein A (ApoA), Apolipoprotein B (ApoB), ApoC und ApoE. Aufgrund ihrer biologischen und strukturellen Eigenschaften kann zwischen austauschbaren und nicht austauschbaren Apolipoproteinen unterschieden werden. Bei ApoB₁₀₀ handelt es sich um ein nicht austauschbares Protein, welches irreversibel mit LDL und VLDL Partikeln assoziiert ist, während ApoA-I zu den mobilen Proteinen zählt. Das austauschbare Protein ApoC-II unterstützt als Co-Faktor die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL), welche Triglyzeride im Kern von CM und VLDL Partikeln hydrolysiert, während ApoC-III ihre Funktion inhibiert. Die austauschbaren Apolipoproteine befinden sich hauptsächlich auf der Oberfläche von CM, VLDL und HDL-Partikeln.⁴

1.1.2 Stoffwechsel

Der Stoffwechsel der Lipoproteine umfasst einen exogenen und endogenen Stoffwechselweg. Beim exogenen Stoffwechselweg werden die Nahrungslipide durch die Dünndarmepithelzellen absorbiert, wohingegen die Lipoproteine beim exogenen Stoffwechselweg hauptsächlich von der Leber oder den Dünndarmepithelzellen synthetisiert werden.

⁴ Vgl. Aizawa et al: Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism, 2015, 10299-10301

1.1.2.1 Exogener Lipidstoffwechselweg

Nahrungsfette bestehen überwiegend aus Triglyzeriden (TG) und enthalten außerdem Phospholipide (PL), Sphingolipide, Cholesterinester (CE) und freies Cholesterin (FC). Damit die Lipide vom Darm aufgenommen werden können, müssen sie zuvor – mit Ausnahme des freien Cholesterins – in ihre Grundbausteine zerlegt werden. Dies erfolgt durch hydrolytische Spaltung der Esterbindungen durch Esterasen. Bei der Spaltung von TGs durch die pankreatische Triacylglycerinlipase entsteht ein Mix aus Fettsäuren, Glycerin und Monoacylglycerinen. Zusammen mit anderen Lipiden, lipidlöslichen Vitaminen und Gallensäuren bilden sie Micellen und können so von der Darmschleimhaut aufgenommen werden. In den Dünndarmepithelzellen erfolgt die Resynthese der TGs, danach bilden sie zusammen mit anderen Lipiden und ApoB₄₈ naszierende CMs und gelangen über die Lymphe in den Blutkreislauf.⁵ Die wachsenden CMs nehmen dort ApoC-II und ApoE von HDL-Partikeln auf und werden so zu reifen CMs. Die TGs in den CMs werden von der Lipoproteinlipase (LPL), welche in den Endothelzellen der Blutgefäße lokalisiert ist, zu Monoacylglycerin und zwei freien Fettsäuren hydrolysiert. Die Fettsäuren werden von den peripheren Geweben aufgenommen, während die übriggebliebenen CM-Reste (sogenannte Remnants) über ApoE und Remnant-Rezeptor-Bindung von den Leberzellen aufgenommen und dort in den Lysosomen hydrolysiert werden.⁶

1.1.2.2 Endogener Stoffwechselweg

Die Leber ist das zentrale Organ des endogenen Stoffwechsels. Sie ist im Stande, aus Glucose TGs und Cholesterin zu synthetisieren, welche in VLDL verpackt werden.⁷ VLDL besteht hauptsächlich aus Cholesterin und ApoB₁₀₀. Die Formation von VLDL beginnt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit dem Einbau von TGs durch das Mikrosomale-Transfer-Protein (MTP). Nach dem weiteren Einbau von CEs und ApoE erfolgt die Exozytose der naszierenden VLDL Partikel in die Blutbahn, wo sie noch mehr ApoE und ApoC von HDL Partikeln aufnehmen. Die reifen VLDL Partikel werden von LPL hydrolysiert. Während ApoC-II für die Aktivierung von LPL verantwortlich ist, beeinträchtigt ApoC-III die LPL Aktivität und vermindert die Aufnahme von VLDL Remnants (sogenanntes IDL) durch die Leberzellen. Die durch Degradierung der VLDL Partikel freigesetzten Fettsäuren dienen dem Muskel- und Fettgewebe als Energielieferant und als Energiespeicher in Form von Fett. Die übriggebliebenen IDL-Par-

⁵ Vgl. Löffler: Basiswissen Biochemie, 2005, 160-161

⁶ Vgl. Aizawa et al: Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism, 2015, 10301-10302

⁷ Vgl. Löffler: Basiswissen Biochemie, 2005, 161

tikel können nun von der Leber durch Interaktion von ApoE mit dem Remnant Rezeptor aufgenommen oder von der Hepatischen Lipase (HL) zu LDL hydrolysiert werden. Die LDL Partikel enthalten überwiegend Cholesterin und können über Interaktion von ApoB₁₀₀ mit dem LDL Rezeptor vom peripheren Gewebe oder der Leber durch Endozytose internalisiert und anschließend in Lysosomen hydrolysiert werden. Für den Rücktransport des Cholesterins aus dem peripheren Gewebe ist HDL verantwortlich.

ApoA-I ist die Hauptproteinkomponente des HDLs und wird von der Leber oder den Dünndarmzellen synthetisiert und sekretiert. Durch die Bindung an den ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1), der als zelluläre Cholesterin-Efflux-Pumpe fungiert, wird ApoA-I mit PLs und FC angereichert.⁸ Die weitere Lipidanreicherung an CE erfolgt durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT), wodurch HDL kugelförmig wird, gefolgt von einem kontinuierlichem Lipidaustausch mit anderen Lipoproteinen (VLDL/LDL) durch das Cholesterin Ester Transfer Protein (CETP) und Phospholipid Transfer Protein (PLTP).⁹ Zusammenfassend kann das HDL-Cholesterin entweder direkt – über Aufnahme durch den Scavenger-Rezeptor B1 (SRB1) – zur Leber zurücktransportiert werden oder indirekt durch den zuvor erwähnten Transfer auf LDL oder VLDL durch CETP.

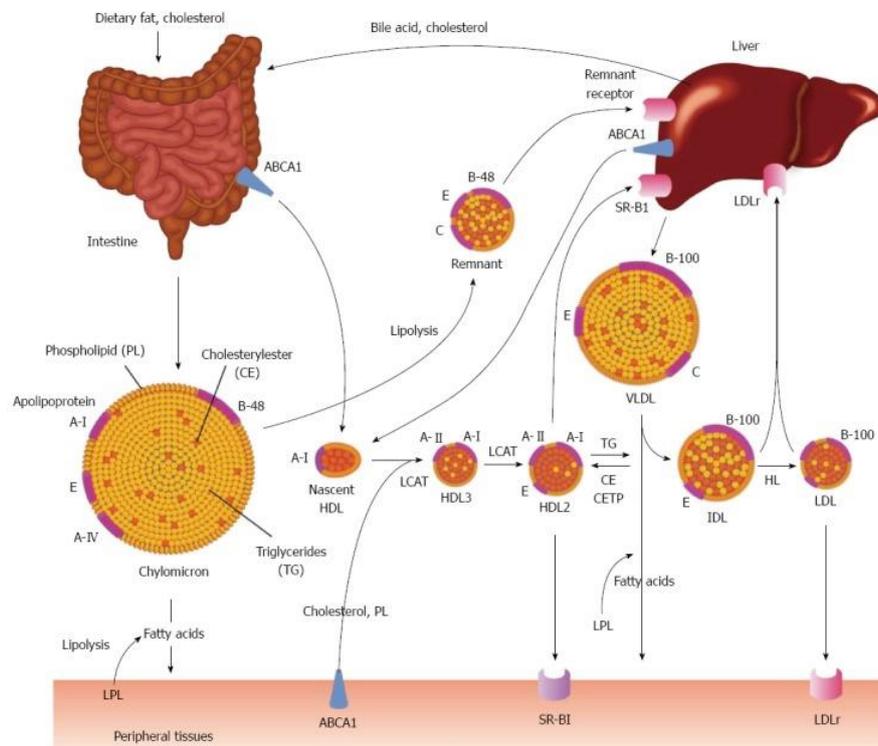


Abbildung 2: Stoffwechsel der Lipoproteine (unverändert übernommen aus: Aizawa, Yoshio et al.: Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. World Journal of Gastroenterology 2015; 21(36):10299-10313. Doi:10.3748/wjg.v21.i36.10299.)

⁸ Vgl. Aizawa et al: Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism, 2015, 10299-10302

⁹ Vgl. Kratzer et al: High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease, 2014, 351

1.2 High-density Lipoprotein (HDL)

1.2.1 Struktur und Subklassen

HDL ist ein sehr kleines Lipoprotein, dessen Hülle aus PL, freien Cholesterin und stabilisierenden Apolipoproteinen (2-7 pro Partikel) besteht und einen Lipidkern aus CE und TG besitzt. Während des HDL-Stoffwechsels kommt es durch mehrere Enzyme und durch Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren zu zahlreichen Modifikationen seiner Komponenten.¹⁰

Im Vergleich zu anderen Lipoproteinen, handelt es sich bei HDL um einen sehr kleinen, dichten und proteinreichen Partikel mit einer Durchschnittsgröße von 8-10 nm und einer Dichte von 1.063-1.21 g/ml. Je nach Lipidzusammensetzung kann der HDL-Partikel scheiben- oder kugelförmig sein. In seiner pseudomizellaren Form besteht er hauptsächlich aus polaren Lipiden und wird durch Apolipoproteine wasserlöslich gemacht. Darüber hinaus ist HDL mit zahlreichen Proteinen assoziiert, die häufig in verschiedenen Isoformen vorliegen und sehr einfach post-translational modifiziert werden können. Als Folge dieser zahlreichen Kompositionsmöglichkeiten ist der HDL Partikel in seinem strukturellen, chemischen und biologischen Verhalten sehr heterogen.

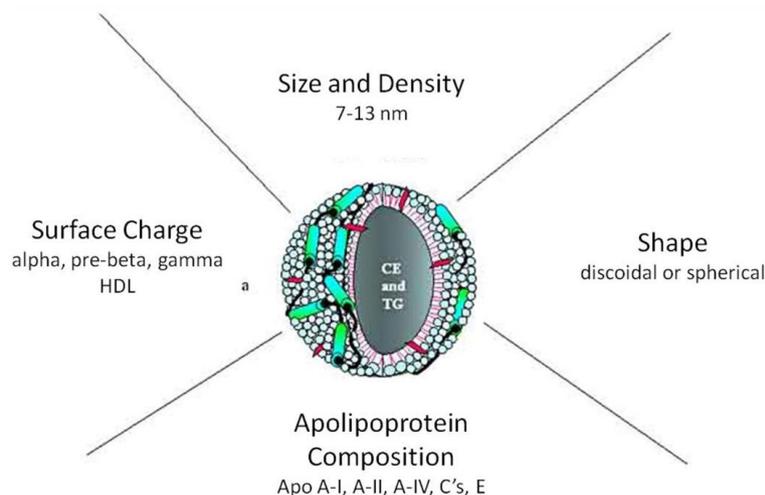


Abbildung 3: HDL Partikel sind aufgrund ihrer Komposition heterogen: Natives HDL unterscheidet sich aufgrund seiner Oberflächenladung, Größe und Dichte, Form und Apolipoprotein Komposition. (unverändert übernommen aus: Eun Ji Chung, Matthew Tirrell: Recent Advances in Targeted, Self-Assembling Nanoparticles to Address Vascular Damage Due to Atherosclerosis. *Adv Healthc Mater* 2015; 4(16): 2408–2422. doi:10.1002/adhm.201500126)

¹⁰ Vgl. Kratzer et al: High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease, 2014, 351

Es existieren mehrere HDL-Subklassen, welche sich in ihrer Dichte, Größe, Form sowie in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung unterscheiden. Generell wird zwischen der lipidreichen und weniger dichten Subklasse HDL2 und der proteinreichen und daher dichteren Subklasse HDL3 unterschieden. Die zwei Haupt-Subklassen können durch Ultrazentrifugation aufgetrennt und mittels Gelelektrophorese aufgrund der Größenunterschiede noch weiter fraktioniert werden. So konnten zwei HDL2 und drei HDL3 Subklassen identifiziert werden: HDL3c mit 7.2-7.8 nm, HDL3b mit 7.8-8.2 nm, HDL3a mit 8.2-8.8 nm sowie HDL2a mit 8.8-9.7 nm und HDL2b mit 9.7-12.0 nm Durchmesser. Darüber hinaus gibt es noch eine weitere Unterscheidung der HDL Partikel aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladung und Form. So werden die zirkulierenden HDL Partikel auch als α -HDL bezeichnet, während die naszierenden, diskoidalen und lipidarmen HDL Partikel in Form von Pre β -HDL existieren.

Bezüglich der Proteinkomponenten kann HDL auch noch in Partikel untergliedert werden, die ApoA-I und ApoA-II (LpA-I:A-II) oder nur ApoA-I (LpA-I) enthalten.¹¹

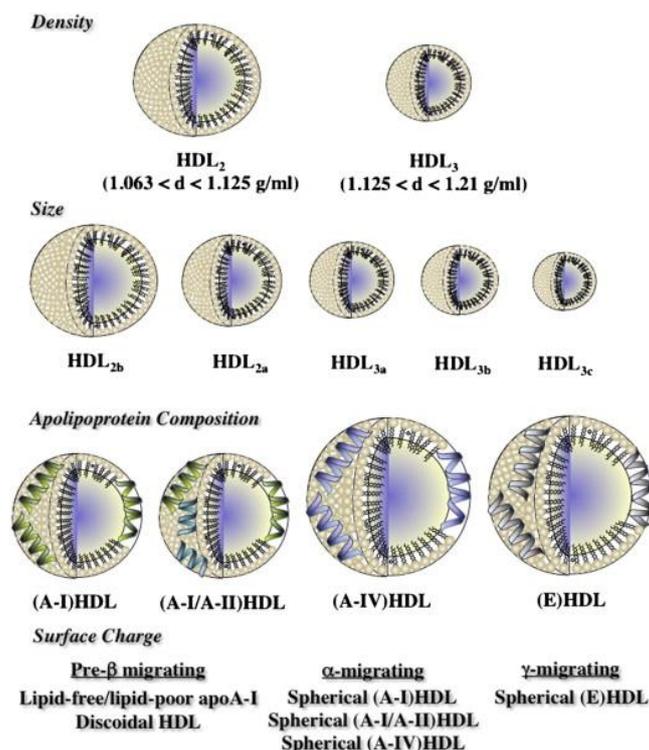


Abbildung 4: Unterscheidung der HDL Partikel aufgrund ihrer Dichte, Größe, Apolipoprotein-zusammensetzung und Oberflächenladung (unverändert übernommen aus: Rye K, Barter P. Predictive value of different HDL particles for the protection against or risk of coronary artery disease. Biochemica et Biophysica Acta 2012; 473-480. doi:10.1016/j.bbailip.2011.10.012)

¹¹ Vgl. Kontush et al: Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components, 2015, 4-5

1.2.1.1 Wichtige Komponenten des HDL-Proteoms

Die HDL Proteine lassen sich in mehrere Gruppen unterteilen, welche Apolipoproteine, Enzyme, Lipidtransfer Proteine, Akut-Phase Proteine, Komplement Komponenten, Proteinase Inhibitoren und noch weitere Proteine inkludieren. Dabei nehmen die Apolipoproteine und Enzyme als funktionelle HDL Komponenten eine Schlüsselrolle ein. Die Komposition des HDL Proteoms variiert jedoch mit der Methode der HDL-Isolierung. So kann es beispielsweise bei der Ultrazentrifugation aufgrund der Verwendung hochkonzentrierter Salzlösungen zum Verlust von Proteinen kommen, während andere Methoden der HDL-Isolierung (Gel Filtrierung, Immun-Affinitäts-Chromatographie, Präzipitation) zu einer erheblichen Kontamination mit Plasma Proteinen führen können. Außerdem kann es bei der HDL-Isolierung aufgrund von unphysiologischen Bedingungen (z.B. extremer pH und Ionenstärke bei der Immunaффinitäts-Trennung) auch zur Modifizierung der HDL-Struktur oder -Komposition kommen.¹²

Bezüglich der Proteinzusammensetzung besteht HDL hauptsächlich aus den Proteinen ApoA-I (70 % der Proteinmasse) und ApoA-II (15-25 % der Proteinmasse). Die restlichen 10–15 % der Proteinmasse setzen sich aus kleinen amphipatischen Proteinen zusammen, welche ApoC, ApoE, ApoD, ApoM und ApoA-IV sowie Enzyme und Lipid-Transfer-Proteine, wie LCAT und CETP, inkludieren. Aktuelle Studien des Proteoms konnten bis zu 75 verschiedene Proteine im isolierten humanen HDL nachweisen.¹³

Apolipoproteine

ApoA-I ist das wichtigste strukturelle und funktionelle HDL-Protein. Es interagiert mit zellulären Rezeptoren, ist für die Aktivierung von LCAT verantwortlich und verhilft dem HDL-Partikel zu seinen vielseitigen anti-atherogenen Eigenschaften. Frei zirkulierendes ApoA-I ist ein amphipatisches Protein, das über keine Glykosilierungen oder Disulfidbrücken verfügt. Es bindet daher leicht Lipide und verfügt über detergenten-ähnliche Eigenschaften. Außerdem bewegt es sich mühelos zwischen den Lipoproteinen und kommt auch auf CM und VLDL vor.

ApoA-II ist hydrophober als ApoA-I und zirkuliert als Homodimer. Es wird hauptsächlich von der Leber aber auch vom Dünndarm synthetisiert.

Die kleinen und austauschbaren **ApoC** Proteine werden von der Leber synthetisiert. **ApoC-I** ist das kleinste Apolipoprotein, welches mit HDL und VLDL assoziiert ist und leicht zwischen

¹² Vgl. Kontush et al: Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components, 2015, 7-9

¹³ Vgl. Davidson et al: Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: Relevance to antioxidative function, 2009, 2

diesen ausgetauscht werden kann. Aufgrund seiner stark positiven Ladung kann es freie Fettsäuren binden und die Aktivität verschiedener Proteine modulieren, die am HDL-Stoffwechsel beteiligt sind. So ist ApoC-I in die LCAT Aktivierung und Inhibierung von HL und CETP involviert. **ApoC-II** ist für die Aktivierung mehrerer Triglyzerid-Lipasen (u.a. LPL) verantwortlich und kommt in HDL und VLDL vor. **ApoC-III** kommt vorwiegend in VLDL und nur sehr gering in HDL vor. Es inhibiert die Lipasen LPL und HL und reduziert die Aufnahme von CMs durch die Leber.

Enzyme

LCAT katalysiert die Veresterung von Cholesterin zu Cholesterinester hauptsächlich in HDL aber auch in ApoB-enhaltenden Partikeln. Etwa 75 % der LCAT-Plasmaaktivität sind auf HDL zurückzuführen. Das LCAT-Gen wird vor allem in der Leber exprimiert, kommt aber auch im Gehirn und in den Hoden vor.

Zur Familie der **Paroxonasen (PONs)** zählen die kalzium-abhängigen Laktonasen PON1, PON2 und PON3. Im Blutkreislauf ist **PON1** fast ausschließlich mit HDL assoziiert. Für die Bindung sind die PLs auf der HDL Oberfläche zuständig, welche zur Erkennung eine hydrophobe Anfangssequenz im sekretierten PON1 benötigen. Humanes PON1 wird hauptsächlich von der Leber, aber auch von den Nieren und dem Darm synthetisiert. Die Hydrolyse von Homocystein Thiolacton wird von PON1 katalysiert.

Lipid Transfer Proteine

PLTP wird unter anderen von der Plazenta, dem Herzen und dem Gehirn synthetisiert. Es ist hauptsächlich mit HDL assoziiert und konvertiert es in größere oder kleinere Partikel. Außerdem spielt es beim extrazellulären Phospholipid Transport und bei der Akut-Phase Reaktion der angeborenen Immunabwehr eine Rolle und kann Lipopolysaccharide (LPS) binden.

CETP kommt vorwiegend in der Leber und dem Fettgewebe vor. Es bewegt sich zwischen HDL und ApoB-enhaltenden Lipoproteinen und erleichtert dabei den bidirektionalen Austausch von CEs und TGs.¹⁴

¹⁴ Vgl. Kontush et al: Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components, 2015, 10-13

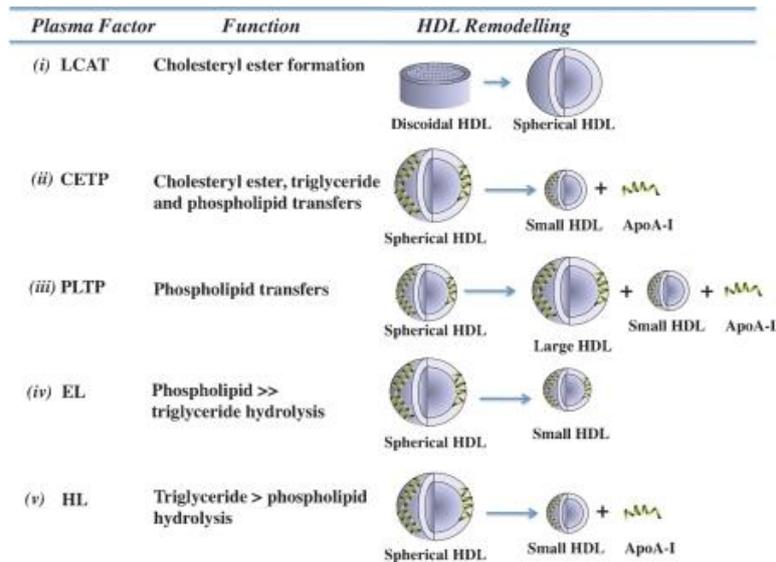


Abbildung 5: Übersicht über HDL-remodellierende Faktoren (unverändert übernommen aus: Rye KA, Bursil CA, Lambert G et al. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. J Lipid Res. 2009;50:S195-200. doi: 10.1194/jlr.R800034-JLR200)

1.2.1.2 Wichtige Komponenten des HDL-Lipidoms

Phospholipide

Phosphatidylcholin (PC) ist das häufigste Phospholipid im Plasma welches mit 32 -35 mol % auch den größten Gesamtlipidanteil in HDL einnimmt. Es ist ein Strukturprotein mit gleicher Verteilung in allen HDL Subpopulationen. PCs mit den Kohlenstoffketten 16:0/18:2, 18:0/18:2 und 16:/20:4 kommen im HDL am Häufigsten vor und sind im Vergleich zu anderen Lipoproteinen reich an ungesättigten Fettsäuren.

Lyso Phosphatidylcholin (LysoPC) ist eine wichtige PL-Subklasse in HDL, die durch Spaltung von PCs durch Phospholipasen wie LCAT entsteht. LCAT bindet bevorzugt kleine und dichte HDL-Partikel, da diese im Vergleich zu großen und leichten HDL Partikeln etwa doppelt so viele LysoPCs enthalten. LysoPCs entstehen auch vermehrt bei pro-atherogenen Prozessen und werden daher als Biomarker für Entzündungen eingesetzt. Die Mehrheit der HDL-LysoPCs enthält gesättigte Fettsäuren mit Ketten aus 16 und 18 Kohlenstoffatomen die unter allen PCs von LCAT bevorzugt werden. Außerdem sind beachtliche Mengen der Serum LysoPCs an Albumin gebunden.

PE (Phosphatidylethanolamin) kommt in HDL eher in geringen Mengen vor.

Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidsäure (PA) und Cardiolipin sind negativ geladene PLs in HDL und können sich deutlich auf dessen Netto Oberflächenladung auswirken. Der Anteil dieser Lipide kann dabei die Interaktionen des Lipoproteins mit Lipasen, Membranproteinen, der extrazellulären Matrix und

anderen Proteinkomponenten beeinflussen, da diese Interaktionen größtenteils ladungsabhängig sind.

Sphingolipide

SM (Sphingomyelin) ist ein Strukturlipid, das die Oberflächenstabilität verbessert. Es ist das häufigste Sphingolipid in zirkulierenden HDL Partikeln, welches hauptsächlich von TG-reichen Lipoproteinen abstammt. Anders als negativ geladenes PC, sind kleine und dichte HDL-Partikel bis zu 30 % ärmer an SM, was sich im geringen Vorkommen von SM im wachsenden HDL-Partikel – einem Vorläufer von HDL3c – widerspiegelt.

Unter den **Lysosphingolipiden** spielt **S1P** eine Hauptrolle in der Gefäßbiologie. Es bindet interessanterweise bevorzugt kleine und dichte HDL Partikel.

Neutral Lipide

Freie Sterole in der HDL-Oberfläche regulieren die Löslichkeit des Partikels. Unter den Sterolen dominiert das **Cholesterin**, was auf die Hauptfunktion der Lipoproteine – den Cholesterintransport – zurückzuführen ist. Andere Sterole kommen weniger häufig vor. Freies Cholesterin, das Sphingomyelin bevorzugt, bindet besonders gerne große und leichte HDL-Partikel.

CE (Cholesterinester) entstehen im Plasma-HDL hauptsächlich (bis zu 80 %) durch Transveresterung von PL und Cholesterin durch LCAT. Die sehr hydrophoben Lipide bilden den Lipidkern des HDLs und machen rund 36 mol % des Gesamtlipidanteils von HDL aus.

Die **TGs** im HDL enthalten vorwiegend Öl-, Palmitin- und Linolsäuren und repräsentieren etwa 3 mol % der Gesamtlipide im HDL.

Zu den weniger bioaktiven Lipiden in HDL zählen **Diaglyceride (DAG)**, **Monoglyceride (MAG)** und **freie Fettsäuren (FFA)**.

Studien des Lipidoms haben gezeigt, dass negativ geladene Lipide (PS, PA) und S1P bevorzugt kleine und dichte HDL Partikel binden, wohingegen SM und Ceramide bevorzugt große und leichte HDL-Partikel binden. Das Lipidom gibt Auskunft über den Stoffwechsel und die Funktion von Lipoproteinen und spielt bei der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle. Es kann neue Biomarker für die Einschätzung des kardiovaskulären Risikos liefern.¹⁵

¹⁵ Vgl. Kontush et al: Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components, 2015, 23-28

1.2.2 Biosynthese und Stoffwechsel

Sekretierung und Lipidanreicherung von ApoA-I

Die HDL Biosynthese beginnt mit der Synthese und Sekretion von ApoA-I, der Hauptprotein-komponente von HDL, durch die Leber und den Dünndarm. Die zweithäufigste Proteinkompo-nente ApoA-II wird hauptsächlich von der Leber synthetisiert und ihre Sekretion führt zur Ent-stehung einer HDL Subklasse welche ApoA-I und ApoA-II enthält. Nach der Sekretion des lipidarmen ApoA-I Partikels reichert dieser sehr schnell Cholesterin und Phospholipide von Hepatozyten und Enterozyten an. Die initiale Lipidierung von lipidarmen ApoA-I wird von ABCA1 mediiert und führt zur Entstehung von naszierenden HDL. „Loss of function“ Mutati-onen in beiden Allelen des ABCA1 Gens führen zur seltenen Tangiers Krankheit, welche durch extrem niedrige HDL-Cholesterin Werte gekennzeichnet ist und zu einer Anhäufung von Mak-rophagen in Geweben führt, da der ABCA1-medierte Efflux von Cholesterin und PLs beeinträchtigt ist. Studien zufolge weisen Träger dieser Mutation ein erhöhtes Risiko für CAD auf. Der naszierende HDL Partikel wächst dann durch die Aufnahme von PLs und freien Cholesterin von extrahepatischen Gewebe weiter. Hierbei spielt der Makrophagen RCT eine besondere Rolle, denn durch ihn kommt es zur Entfernung von überschüssigen freien Cholesterin aus lip-idbeladenen Schaumzellen in arteriosklerotischen Plaques. Der Cholesterin Efflux von den Makrophagen kann durch passive Diffusion oder aktiv durch ABCA1 und den ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) erfolgen. ABCA1 mediiert primär den Cholesterinefflux zu lipidarmen ApoA-1, während ABCG1 hauptsächlich für den Cholesterinefflux von Makropha-gen zu reifen HDL-Partikeln zuständig ist. Das unveresterte Cholesterin wird dabei von Mak-rophagen mit Hilfe des ABCG1 Transporters auf das naszierende HDL übertragen.

Phospholipidanreicherung von HDL

Nach der ersten Lipidanreicherung nimmt HDL zusätzlich Phospholipide und Apolipoproteine (wie ApoC-III) durch die von PLTP vermittelte Hydrolyse von triglyzeridreichen Lipoprotei-nen auf. Durch die Anreicherung an PLs wird HDL nun zum Substrat für LCAT. Darüber hin-aus fördert PLTP die Fusion von kleinen HDL3 Partikeln, was zur Entstehung größerer HDL2 Partikel führt. Studien an Menschen zeigten, dass bestimmte genetische Variationen – soge-nannte „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) – am PLTP Locus, die zu einer verminderten PLTP Masse und Aktivität führen, mit einem geringeren kardiovaskulären Risiko einhergehen und das trotz einer geringeren HDL Plasmakonzentration. Diese Studien führen zur Annahme,

dass eine erhöhte Phospholipidierung des HDLs nicht unbedingt zu einer Reduzierung des kardiovaskulären Risikos beiträgt, obwohl sie zu einer Erhöhung des HDL-Cholesterin Levels führen könnte.

Veresterung des HDL-assoziierten Cholesterins durch LCAT

Nach dem Cholesterinefflux und Phospholipidtransfer vom peripheren Gewebe ausgehend wird ein Teil des HDL-assoziierten freien Cholesterins von LCAT verestert, was zur Entstehung des hydrophoben Kerns in HDL führt und maßgeblich zu dessen Reifung beiträgt.

HDL-Cholesterin Aufnahme durch die Leber

Die Hauptfunktion des nun reifen HDL-Partikels besteht im Rücktransport von Cholesterin zur Leber, wo es als Gallensäure ausgeschieden wird. Der sogenannte Reverse Cholesterin Transport (RCT) zur Leber kann direkt oder indirekt durch den Transfer von CE auf ApoB enthaltende Lipoproteine (VLDL und LDL) erfolgen. Beim direkten RCT erfolgt die selektive Aufnahme von CE und FC durch den hepatischen SRB1 Rezeptor während der indirekte RCT vom Transportprotein CETP vermittelt wird. CETP ist dabei für den Transfer von CE auf VLDL oder LDL im Austausch gegen TGs verantwortlich. VLDL und LDL werden anschließend durch den hepatischen LDL Rezeptor aus dem Kreislauf entfernt.¹⁶

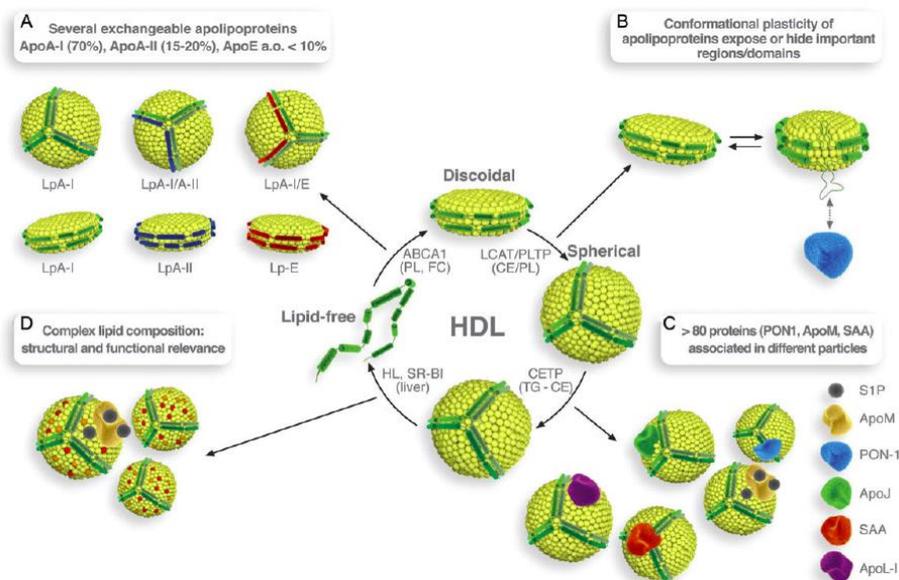


Abbildung 6: HDL Komplexität und Heterogenität (unverändert übernommen aus: Kratzer et al. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. Cardiovascular Research 2014; 103:350-361. doi: 10.1093/cvr/cvu139)

¹⁶ Vgl. Besler et al: Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease, 2012, 252-257

1.2.3 Anti-atherogene Effekte

Das Endothel bekleidet die innerste Schicht von Blut- und Lymphgefäßen. Abgesehen von seiner Barrierefunktion ist es wesentlich für den Erhalt der vaskulären Homöostase verantwortlich. Zu den Funktionen des Endothels zählen die Kontrolle des Gefäßtonus, die Rekrutierung von Immunzellen, die Hämostase und die Angiogenese.¹⁷ HDL verfügt über vielseitige gefäßschützende Eigenschaften und ist daher maßgeblich am Erhalt der endothelialen Funktion beteiligt. Zu diesen Funktionen zählen vor allem der Rücktransport von Cholesterin (RCT), die Stimulierung der NO Produktion, sowie seine anti-oxidativen und -inflammatorischen Eigenschaften.¹⁸ Die Bindung von gesunden HDL an den SRB1 Rezeptor führt zur eNOS Aktivierung und NO Produktion, wodurch die Adhäsion von Monozyten reduziert und die endotheliale Reparatur gefördert wird. Außerdem verhindert das HDL-gebundene Enzym PON1 die Entstehung oxidiertes Lipide und Lipoproteine wie Malondialdehyd (MDA).¹⁹

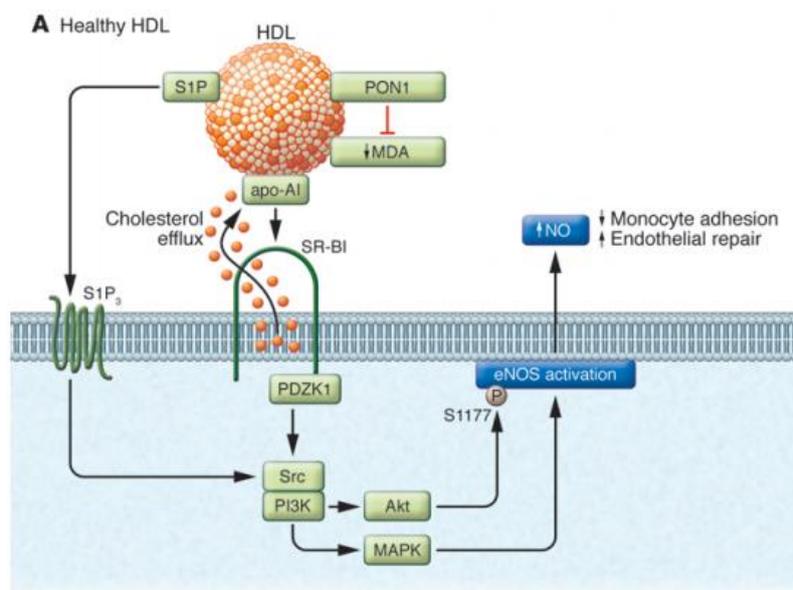


Abbildung 7: HDL-vermittelte eNOS Aktivierung (unverändert übernommen aus: Chieko Mineo, Philip W. Shaul: PON-dering differences in HDL function in coronary artery disease. J Clin Invest. 2011. 121(7):2545-8. doi: 10.1172/JCI57671)

¹⁷ Vgl. Kratzer et al: High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease, 2014, 350

¹⁸ Vgl. Norata und Catapano: Molecular mechanism responsible for the anti-inflammatory and protective effect of HDL on the endothelium, 2005, 119

¹⁹ Vgl. Mineo et al: PON-dering differences in HDL function in coronary artery disease. J Clin Invest. 2011. 121(7):2546

1.2.3.1 Stimulierung der NO Produktion

Die Produktion von NO durch die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) ist ein sensibel regulierter Prozess und ist wichtig für den Erhalt der vaskulären Homöostase. Dass die NO Produktion durch HDL moduliert wird, konnte in vitro durch Studien an menschlichen Endothelzellen, in vivo an Mausmodellen und in Menschen durch Infusion von rekonstituierten HDL (rHDL) demonstriert werden. HDL stimulierte dabei die endotheliale eNOS Aktivität direkt über Bindung an den SRB1 Rezeptor.²⁰ Endotheliales NO spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gefäßtonus und der Gefäßstruktur. Abgesehen von der gefäßrelaxierenden Eigenschaft wirkt NO auch anti-thrombotisch, anti-koagulierend, anti-inflammatorisch und pro-fibrinolytisch. Die Bindung von HDL über ApoA-I an den endothelialen SRB1-Rezeptor führt zur Tyrosin-Kinase-Src-vermittelten Aktivierung der Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K), welche dann in weiterer Folge Akt und den MAP Kinase Signalweg aktiviert. Zusätzlich induziert auch die Bindung von HDL-assoziierten LysoPLs an den Lysophospholipidrezeptor S1P3 die NO Produktion und dürfte so teilweise zur Gefäßrelaxation beitragen.

Studien zufolge ist das HDL-assoziierte Enzym PON1 eine wichtige Determinante für die NO-induzierende Kapazität von HDL. So führte die Inhibierung von PON1 in gesunden Individuen zu einer Beeinträchtigung der HDL stimulierten NO Produktion.²¹

1.2.3.2 Anti-oxidative Eigenschaften

Die HDL-Hauptproteinkomponenten ApoA-I und ApoA-II sowie PON1 sind allgemein dafür bekannt, über anti-oxidative Eigenschaften zu verfügen. HDL ist daher in der Lage, die oxidative Modifikation von LDL zu verhindern. Über LDL werden hauptsächlich Cholesterin und Phospholipide zu den peripheren Geweben transportiert. Navab et al fanden heraus, dass normal zirkulierendes LDL immer auch kleine Mengen an Lipid Hydroperoxiden – abstammend vom Lipoxygenaseweg – befördert. In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Hauptproteinkomponente in HDL – ApoA-1 – in der Lage ist, die LDL Lipid Hydroperoxide in vitro nach Injektion in Mäusen und in vivo nach Infusion in Menschen, wieder zu entfernen. Außerdem fand man heraus, dass HDL CE-O(O)H (Cholesterinester Hydroperoxid) selektiv und schnell von den Leberzellen entfernt werden. Die anti-oxidative Funktion von HDL erklärt sich dadurch, dass es in der Lage ist, oxidierte Moleküle zu binden und abzutransportieren.

²⁰ Vgl. Kratzer et al: High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease, 2014, 351

²¹ Vgl. Besler et al: Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease, 2012, 262-257-258

Zusätzlich verfügt HDL auch über Enzyme die für die Zerstörung von Lipid Hydroperoxiden in LDL zuständig sind. Zu diesen Enzymen zählen unter anderen Paroxonase-1 (PON-1) und Paroxonase-3 (PON-3). Außerdem konnte gezeigt werden, dass HDL Phospholipid Hydroperoxide, bei gleichzeitiger Oxidierung von ApoA-I Methionin Resten, zu Hydroxiden reduziert werden. Dieser Mechanismus funktioniert unabhängig von PON. Auch die HDL-Enzyme „Plättchenaktivierender Faktor Acetylhydrolase“ (PAF-AH) und LCAT verfügen über anti-oxidative Eigenschaften da sie im Stande sind oxidierte Phospholipide zu entfernen.²²

1.2.4 Pathophysiologische Rolle

1.2.4.1 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist zwischen den Blutgefäßen und dem Blutstrom lokalisiert und in der Lage mechanische und hormonelle Stimuli zu detektieren. Als Antwort darauf setzt es Agentien frei, die die Vasomotor Funktion, Entzündungsprozesse und die Hämostase regulieren. Zu den gefäßrelaxierenden und vom Endothel produzierten Substanzen zählen unter anderen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin. Gefäßkontrahierend wirken hingegen u. a. Endothelin-1 (-ET-1), Angiotensin II (Ang II) und die Gruppe der Reaktiven Oxygen Spezies (ROS). Unter den inflammatorischen Modulatoren befinden sich das interzelluläre Adhäsions Molekül-1 (ICAM-1), das vaskuläre Adhäsions Molekül-1 (VCAM-1) und der Nekrose Faktor Kappa B (NF-KB). Die Regulation der Hämostase beinhaltet Faktoren wie zum Beispiel Fibrinogen. Endotheliale Dysfunktion ist mit einer Beeinträchtigung der Gefäßrelaxation, pro-inflammatorischen und pro-thrombotischen Prozessen assoziiert. Die Dysfunktion ist ein frühes pathophysiologisches Ereignis in der Entstehung der Arteriosklerose und steht in Verbindung mit Krankheiten wie Hypertension, chronischen Nierenerkrankungen, Diabetes und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, dass Patienten mit diesen Erkrankungen aufweisen. Eine niedrige NO Bioverfügbarkeit kann VCAM-I durch Induktion von NF-KB hochregulieren. Ebenso kann ROS und oxidiertes LDL (oxLDL) die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen hochregulieren. Reduzierte NO-Levels induzieren MCP1 und führen zur Rekrutierung von Phagozyten.²³ Die Veränderungen des HDL Proteoms und Lipidoms können sich auf die HDL Funktionalität auswirken. Darüber hinaus können physikochemische Eigenschaften des HDLs seine anti-inflammatorische Kapazität beeinflussen. So sind zum Beispiel die kleineren und dichten

²² Vgl. Barter et al: Antiinflammatory properties of HDL, 2004, 765-766

²³ Vgl. Norata und Catapano: Molecular mechanism responsible for the anti-inflammatory and protective effect of HDL on the endothelium, 2005, 120

HDL3 Subfraktionen im Vergleich zu größeren und weniger dichten HDL2 Subfraktionen in der Lage, die TNF- induzierte VCAM-1 Expression in Endothelzellen zu inhibieren. Die HDL-Proteinkomposition von gesunden Individuen unterscheidet sich von CAD-Patienten. So konnte in Mäusen nach Endotoxin Verabreichung und bei Menschen nach einer Herzoperation beobachtet werden, dass sich die Proteinkomposition des HDLs während der akuten Entzündungsphase veränderte. Über Veränderungen des HDL-Lipidoms ist eher wenig bekannt. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass der Anteil der PC Spezies von HDL Einfluss auf seine anti-inflammatorische Aktivität nimmt.²⁴

1.2.4.2 Exkurs: Arteriosklerose

Bei Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch entzündliche Krankheit. Charakteristisch für diese Erkrankung ist die Akkumulierung von Makrophagen und T-Lymphozyten in der arteriellen Intima, einhergehend mit einer erhöhten Plasmakonzentration an Entzündungsmarkern. Im Anfangsstadium kommt es zur Adhäsion von Monozyten an das Endothel, welches aufgrund von Verletzungen oder anderer Ursachen verschiedene Adhäsionsproteine wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin, exprimiert. CAD Patienten weisen eine erhöhte Plasmakonzentration dieser Adhäsionsproteine auf. E-Selektin wird von Endothelzellen als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine, über den Transkriptionsfaktor NF-KB, exprimiert. Es ermöglicht den Leukozyten ein erstes loses Anhaften am Endothel, bevor sie durch VCAM-1 und ICAM-1 fester binden können. Die gebundenen Monozyten differenzieren nun zu Makrophagen, bevor sie aufgrund der Expression von Chemokinen, wie dem „Monocyte Chemotactic Protein“ (MCP-1), in den subendothelialen Raum abwandern. Makrophagen exprimieren eine Reihe an Scavenger Rezeptoren und sind so in der Lage, (modifiziertes) LDL zu binden und zu internalisieren. Durch die Aufnahme von LDL werden die Makrophagen zu sogenannten Schaumzellen. Die Tatsache, dass HDL die Expression von Adhäsionsmolekülen und MCP-1 verhindern kann, ist von außerordentlich großer Bedeutung.²⁵

Die subendotheliale Einlagerung von Lipoproteinen und Immunzellen markiert das erste Stadium der sogenannten Plaque Formation und ist noch reversibel. Erfolgt jedoch keine entsprechende Immunantwort schreitet die Plaque Formation mit der Entstehung und Einwanderung der Schaumzellen und der Proliferation von glatten Muskelzellen voran. Die Muskelzellen

²⁴ Vgl. Besler et al: Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease, 2012, 262-263

²⁵ Vgl. Barter et al: Antiinflammatory properties of HDL, 2004, 766-767

synthetisieren die extrazellulären Matrix Moleküle (ECM) Kollagen, Elastin und Proteoglykane, die zur Entstehung einer fibrösen Kapsel über der arteriosklerotischen Plaque, beitragen. Bei Ruptur der arteriosklerotischen Plaque entsteht ein Thrombus, der im Falle einer Embolie, zum plötzlichen Tod führen kann.²⁶

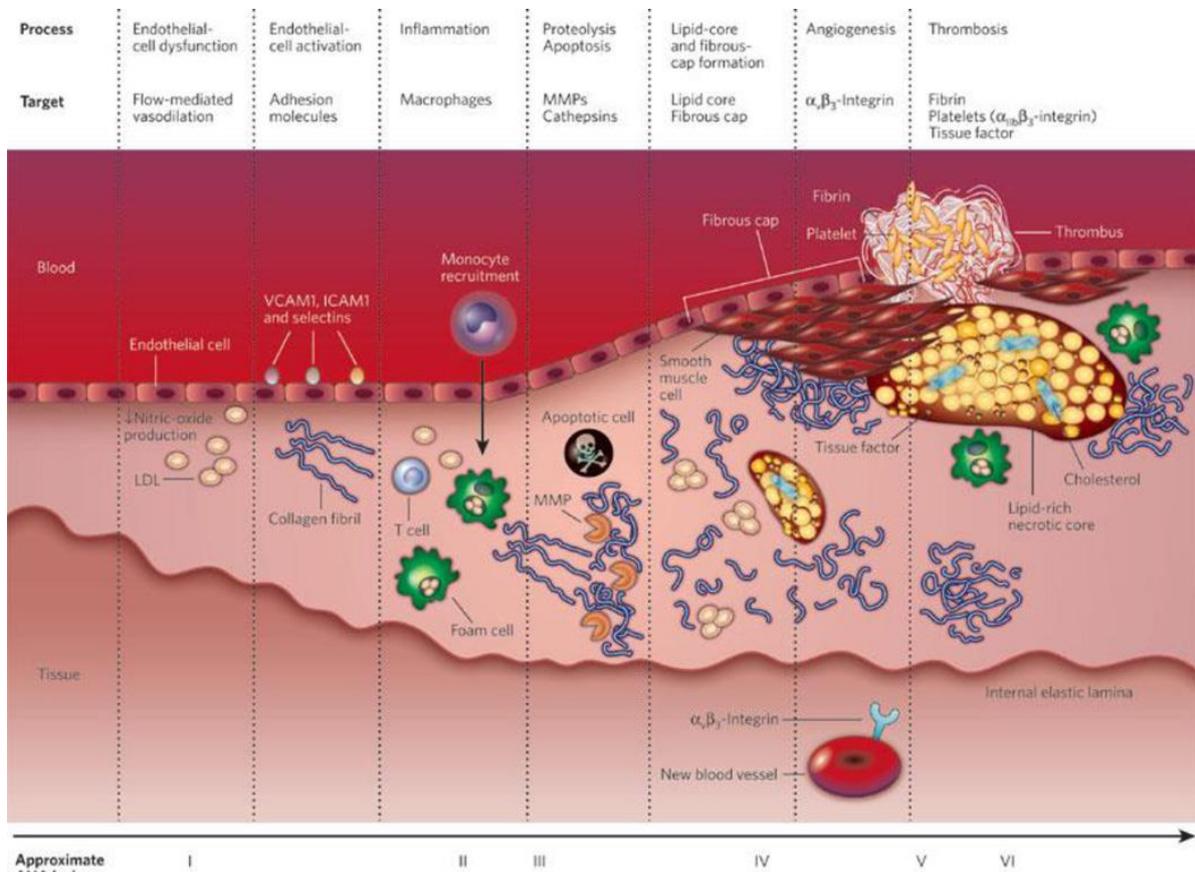


Abbildung 8: Entstehung einer arteriosklerotischen Läsion (unverändert übernommen aus: Eun Ji Chung, Matthew Tirrell: Recent Advances in Targeted, Self-Assembling Nanoparticles to Address Vascular Damage Due to Atherosclerosis. *Adv Healthc Mater* 2015; 4(16): 2408–2422. doi:10.1002/adhm.201500126)

²⁶ Vgl: Chung, Eun Ji et al.: Recent Advances in Targeted, Self-Assembling Nanoparticles to Address Vascular Damage Due to Atherosclerosis, 2015; 2-3

1.3 Endotheliale Lipase (EL)

Mehrere Moleküle regulieren den Cholesterin Gehalt von HDL (HDL-C). Dazu zählen die Enzyme HL und die endotheliale Lipase (EL), die Transport Proteine CETP und PLTP sowie LCAT. Das Serum HDL-C Level wird zum Teil durch Lipasen reguliert. Diese Lipasen besitzen hochkonservierte Strukturdomänen und metabolisieren TGs und PLs. Zu den ersten bekannten Mitgliedern der TG Lipasen Familie zählten HL und LPL, welche in die Aufnahme und den Metabolismus von Lipiden in zirkulierenden Lipoproteinen involviert sind. LPL bevorzugt TG-reiche Lipoproteine während HL die Lipoproteine IDL, LDL und HDL als Substrat bevorzugt und so ihre Größe und ihr biochemisches Verhalten beeinflusst. Im Jahr 1999 kam es zur Entdeckung eines weiteren Mitglieds der TG Lipasen Familie – welche über eine beachtliche molekulare Homologie mit LPL (44%) und HL (41%) verfügt – die sogenannte Endotheliale Lipase. Diese verfügt jedoch primär über eine Phospholipase A1 Aktivität.²⁷ Die Endotheliale Lipase (EL) – kodiert durch das LIPG Gen – zählt wie HL und LPL zur Familie der TG-Lipasen und wird hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen sekretiert. Außerdem konnte seine Expression in der Plazenta, Lunge, den Schilddrüsen, Hoden, der Leber, den Nieren und in Makrophagen nachgewiesen werden.²⁸ EL verfügt über ein Molekulargewicht von 68 kDa und ist über Heparan-Sulfat Proteoglykane (HSPG) an die Oberfläche von Endothelzellen gebunden. Es verfügt über eine Art Brückenfunktion, da es die Bindung und Aufnahme von HDL, so wie die selektive Aufnahme von CE erleichtert.²⁹ Die gewebespezifische Expression von EL unterscheidet sich von LPL und HL. LPL wird unter anderem im Muskel, Fettgewebe, Herz, Gehirn und Makrophagen exprimiert, während HL nur von der Leber synthetisiert wird und dort bleibt oder zu Endothelzellen von Eierstöcken und adreneregen Drüsen transportiert wird.³⁰

1.3.1 EL und HDL Metabolismus

Der RCT spielt eine zentrale Rolle für die atheroprotektive Eigenschaft von HDL. HL und EL sind negative Regulatoren des Plasma HDL-C Levels. Durch ihre Triglyzeridase und Phospholipase-Aktivität sind sie im Stande den TG und PL Gehalt im HDL zu reduzieren. Während HL jedoch über eine stark ausgeprägte Triglyzeridase und nur leichte Phospholipase-Aktivität verfügt, verwendet EL primär Phospholipide als Substrat.³¹

²⁷ Vgl. Choi et al: Endothelial Lipase: a new lipase on the block, 2002, 1763, 1767

²⁸ Vgl. Annema und Tietge: Role of hepatic lipase and endothelial lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport, 2011, 261

²⁹ Vgl. Riederer et al: Impact of endothelial lipase on cellular lipid composition, 2012, 1003

³⁰ Vgl. Choi et al: Endothelial Lipase: a new lipase on the block, 2002, 1765

³¹ Vgl. Annema und Tietge: Role of hepatic lipase and endothelial lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport, 2011, 257

EL erleichtert die Bindung von HDL und die Aufnahme von HDL Cholesterinester. Aufgrund seiner Phospholipase-Aktivität spaltet es Lipoprotein-assoziierte Phospholipide hauptsächlich in HDL-Phosphatidylethanolamin (HDL-PE) und -Phosphatidylcholin (HDL-PC) und generiert vorwiegend gesättigte freie Fettsäuren (FFA) und sn-1 Lyso sn-2 Acyl Lysophospholipide (LysoPLs). Durch seine schwach ausgeprägte Lysophospholipase-Aktivität ist es in der Lage einen Teil der generierten LysoPLs noch weiter zu spalten, wobei ungesättigte FFA freigesetzt werden.³²



Abbildung 9: HDL Modifikation durch EL

Die Adenovirus-vermittelte Überexpression von EL führt aufgrund einer dosisabhängigen Erhöhung der katabolischen Rate von HDL assoziierten Apolipoproteinen sowie CEs zu einer Verminderung der HDL-C und ApoA-I Levels. Umgekehrt zeigten „loss of function“ Studien mit EL-KO-Mäusen oder Antikörper-vermittelter Inhibierung von EL, eine gesteigerte Konzentration an PLs, Apo-A1 und HDL-C im Plasma was auf eine verlangsamte katabolische Rate zurückzuführen war. Außerdem konnte eine Verschiebung zu größeren HDL-Partikeln festgestellt werden. Demzufolge scheinen die metabolischen Effekte von der katalytischen EL-Aktivität abhängig zu sein.

Die Untersuchungen von 510 gesunden Menschen mit einer genetischen Veranlagung für CAD zeigten eine positive Korrelation zwischen der EL-Plasmakonzentration und kleinen HDL-Partikeln. Des Weiteren konnten genetische Untersuchungen von Menschen demonstrieren, dass bestimmte genetische Variationen beziehungsweise Mutationen des LIPG-Gens mit einer verminderten oder erhöhten HDL-C Konzentration im Plasma assoziiert sein können.³³

1.3.2 EL und RCT

Es gibt bisher nicht viele aussagekräftige Studien über die Auswirkungen von EL auf den HDL-vermittelten Cholesterin-Efflux (erster Schritt im RCT). In vitro konnte bei einer verminderten EL Expression in Makrophagen eine Abnahme des Effluxes auf Apo A-I beobachtet werden,

³² Vgl. Riederer et al.: Impact of endothelial lipase on cellular lipid composition, 2012, 1003

³³ Vgl. Annema und Tietge: Role of hepatic lipase and endothelial lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport, 2011, 261-262

wohingegen eine EL-Überexpression zum gegenteiligen Effekt führte. Sowohl die Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität, als auch die der Brücken-Funktion von EL behinderten teilweise den Makrophagen Cholesterin-Efflux. Im Gegenteil dazu, zeigte die Modifikation der Efflux Akzeptoren von EL keine Auswirkungen auf den ABCA1 abhängigen Cholesterin-Efflux, wohingegen eine andere Gruppe eine 63 %-ige Zunahme des ABCA1 vermittelten Cholesterin-Effluxes zum HDL in EL-überexprimierenden Mäusen feststellen konnte. Jedoch konnte auch ein gesteigerter Efflux in EL^{-/-} Mäusen und ein additiver Effekt in doppelt EL/HL-KO-Mäusen beobachtet werden.

Beim SRB1 vermittelten Cholesterin-Efflux wies EL-modifiziertes HDL und Serum eine geringere Kapazität für diesen Prozess auf. Obwohl EL den Cholesterin Effluxes sehr variabel moduliert, konnte im zweiten Schritt beim RCT – der Aufnahme von HDL-C in die Leber – eindeutig eine Verbesserung der HDL-C Aufnahme festgestellt werden. Trotz allem blieb der Hauptweg der Cholesterinausscheidung in Form biliärer Sterole in EL-überexprimierenden Mäusen unverändert.³⁴

1.3.3 EL und Arteriosklerose

Bisherige Studien über die Rolle von EL bei der Entstehung von Arteriosklerose sind kontrovers. In einer Studie führte die Inaktivierung von EL in ApoE^{-/-} Mäusen zu einer 70 %-igen Reduktion arteriosklerotischer Läsionen. Interessanterweise führte das Fehlen von EL zu einer erhöhten Konzentration von anti-atherogenen-HDL und pro-atherogenen VLDL- und LDL-C im Plasma. Die Forschungsgruppe vermutet eine reduzierte Monozytenadhäsion an den Gefäßwänden über HSPG Moleküle als Grund für die geringere Entwicklung arteriosklerotischer Plaques in den ApoE/EL^{-/-} Mäusen.

In einer weiteren Studie konnten keine Auswirkungen auf die Größe der arteriosklerotischen Läsionen und ihren Makrophagen Gehalt in EL exprimierenden oder EL^{-/-} Mäusen weder mit einem ApoE^{-/-} noch mit LDLR^{-/-} Hintergrund, festgestellt werden. Aber auch in diesen Studien ließ sich eine leichte Zunahme des Cholesterins in HDL und ApoB-enthaltenden Lipoproteinen feststellen.

Entzündungen spielen bei der Entwicklung von Arteriosklerose eine Hauptrolle und es gibt eine Verbindung zu EL.³⁵ In Endothelzellen wurde beobachtet, dass es bei Entzündungen zu einer

³⁴ Vgl. Annema und Tietge: Role of hepatic lipase and endothelial lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport, 2011, 262

³⁵ Vgl. Annema und Tietge: Role of hepatic lipase and endothelial lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport, 2011, 263

Zunahme der EL-Expression kam, wenn die Zellen Interleukin-1 β (IL-1 β) oder dem Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ausgesetzt wurden. Des Weiteren stellte man fest, dass die EL Protein Masse und Aktivität in Patienten mit subklinischer Entzündung, wie es beim metabolischen Syndrom und koronarer Arteriosklerose der Fall ist, erhöht ist.³⁶

In Menschen wurde auch der Zusammenhang zwischen genetischen Varianten des EL Gens und Arteriosklerose untersucht. Beispielsweise untersuchte man in 2 kleinen Fallstudien in China und Japan die häufige Thr111Ile EL-Variante, wobei ein geringeres Risiko für CVD festgestellt wurde. Allerdings zeigten in vitro Versuche keinen Unterschied zum EL-Wildtyp. Drei darauffolgende Studien innerhalb der kaukasischen Bevölkerungsgruppe konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Thr111Ile-Variante und dem kardiovaskulären Risiko nachweisen. Neuere Studien untersuchten fünf Single Nucleotide Polymorphismen (SNP) im LIPG-Gen und nur die Thr111Ile Variante wies erhöhte HDL-C und Apo-A1 Levels, sowie eine höhere Konzentration an größeren HDL Partikeln auf. Doch für keinen der fünf untersuchten EL-Polymorphismen konnte ein erhöhtes Arteriosklerose Risiko nachgewiesen werden. Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse sind weitere Studien nötig, um eine Verbindung zwischen der Konzentration und/oder Aktivität von EL im Plasma mit Arteriosklerose herstellen zu können.³⁷

³⁶ Vgl. Riederer et al.: Impact of endothelial lipase on cellular lipid composition, 2012, 1003

³⁷ Vgl. Annema und Tietge: Role of hepatic lipase and endothelial lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport, 2011, 263

1.4 Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS)

Das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) wird von drei NO Synthasen hergestellt. ENOS ist für die Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion von großer Bedeutung. Es ist für die Gefäßrelaxation und die Regulierung des Blutdrucks zuständig und verfügt außerdem über gefäßschützende und anti-atheriosklerotische Eigenschaften. Es verhindert beispielsweise die Adhäsion von Blutplättchen und Leukozyten an der Gefäßwand und kontrolliert das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur. Kardiovaskuläre Risikofaktoren können jedoch zu oxidativen Stress, zur eNOS Entkopplung und zur endothelialen Dysfunktion führen.³⁸

1.4.1 NOS Isoformen und Lokalisation

Drei verschiedene NO Synthasen (NOS) katalysieren die Produktion von NO aus L-Arginin: neuronale NOS (oder NOS-1), zytokin-induzierte NOS (iNOS oder NOS-2) und endotheliale NOS (eNOS oder NOS-3). Obwohl iNOS durch Lipopolysaccharide (LPS) und Zytokine induziert werden kann und nNOS in den Blutgefäßen lokalisiert ist, ist eNOS in der Regel die Hauptquelle für die endotheliale NO Produktion. eNOS ist auch in Caveolae lokalisiert, dabei handelt es sich um kleine Einstülpungen der Plasmamembran, welche das Protein Caveolin-1 beherbergen. eNOS verfügt über eine Caveolin-Bindungsdomäne und befindet sich so in unmittelbarer Nähe zu mehreren Signalmolekülen. Andererseits stellt die Bindung mit Caveolin ein Hindernis für die Bindung von Calcium-Calmodulin (CaM) und somit zur eNOS Aktivierung dar.³⁹

1.4.2 NO Synthese

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein freies Radikal und stellt einen äußerst vielseitigen Mediator im Kardiovaskulären-, Nerven- und Immunsystem dar. Seine physiologischen als auch pathologischen Effekte sind teilweise auf seine Reaktivität zurückzuführen, da es in der Lage ist, Biomoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren zu modifizieren. Außerdem agiert es als Signalmolekül, indem es Metalloproteine über spezifische Eisen(II)- oder Zink(II)-enthaltende Domänen bindet. Innerhalb dieser Domänen reagiert NO mit den Metallionen und moduliert dabei die Konformation und Aktivität des ganzen Signalproteins.⁴⁰ Alle drei NO produzierenden NOS Isoformen sind Homodimere, besitzen eine C-terminale Reduktase- und N-terminale Oxygenase-Domäne und nützen L-Arginin als Substrat, um NO herzustellen. Dazu benötigen

³⁸ Vgl. Förstermann et al.: Nitric oxide synthase: regulation and function, 2011, 829, 834

³⁹ Vgl. Vanhoutte et al.: Thirty years of saying NO, 2016, 375-376

⁴⁰ Vgl. Eroglu et al.: Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics, 2016, 2

sie Sauerstoff und reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Co-Substrat, sowie Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN) und 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄) als Cofaktoren. NOS Dimere übertragen Elektronen von NADPH über die Flavine FAD und FMN in der C-terminalen Reduktase Domäne zum Häm in der N-terminalen Oxygenase-Domäne. Die Oxygenase Domäne bindet auch den essentiellen Cofaktor BH₄, molekularen Sauerstoff (O₂) und das Substrat L-Arginin. NOS Monomere sind nur im Stande Elektronen von reduziertem NADPH auf FAD und FMN zu übertragen, wobei ihre Kapazität molekularen Sauerstoff zu Superoxid (O₂⁻) zu reduzieren, begrenzt ist. Die Monomere können zwar Calmodulin (CaM) binden, was den Elektronentransfer innerhalb der Reduktasedomäne erleichtert, jedoch sind sie nicht in der Lage, die Cofaktoren BH₄ oder das Substrat L-Arginin zu binden, um die NO Produktion zu katalysieren. In der Gegenwart von Häm kann NOS jedoch ein funktionelles Dimer ausbilden. Häm ist für den Elektronentransfer von den Flavinen zum Häm des gegenüberliegenden Monomers essentiell.

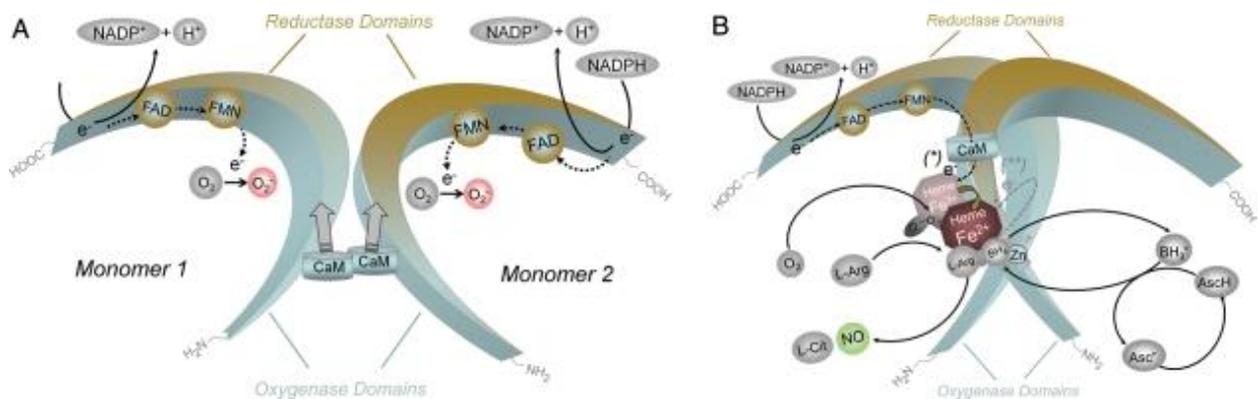


Abbildung 10: Struktur und katalytischer Mechanismus funktioneller NOS (unverändert übernommen aus: Ulrich Förstermann, William Sessa. Nitric oxide synthase: regulation and function. In: European Heart Journal 2012; 33:829-837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304)

Während iNOS Calmodulin mit sehr hoher Affinität bindet, benötigen nNOS und eNOS eine erhöhte Ca²⁺ Konzentration für die CaM Bindung. Wenn das Substrat L-Arginin und der Cofaktor BH₄ in ausreichender Konzentration vorhanden sind, koppeln intakte NOS Dimere die Häm und O₂ Reduktion zur Herstellung von NO. Dabei wird L-Arginin zu L-Citrullin und NO oxidiert. Im Detail sind für die NO Produktion zwei Schritte notwendig. Im ersten Schritt wird L-Arginin zu N^o-Hydroxy-L-Arginin hydroxyliert. Im zweiten Schritt wird N^o-Hydroxy-L-Arginin von NOS zu L-Citrullin und NO oxidiert. Der wichtigste, durch NO stimulierte Signalweg ist die Aktivierung der löslichen Guanin Cyclase und die Generierung des Second Messengers cGMP. ⁴¹

⁴¹ Vgl. Förstermann et al.: Nitric oxide synthase: regulation and function, 2011, 829-831

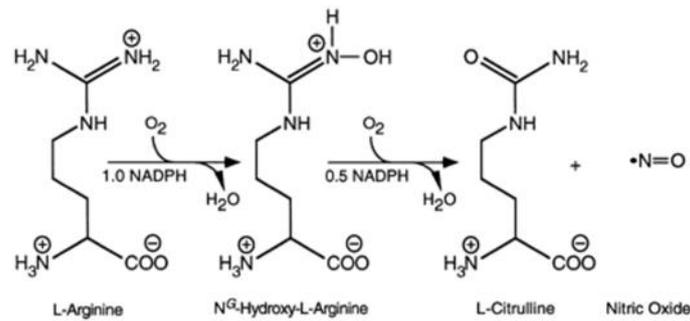


Abbildung 11: eNOS katalysierte Reaktion (unverändert übernommen aus: Penelope Andrew, Bernd Mayer. Enzymatic function of nitric oxide synthases Cardiovasc Res. 1999;43(3):521-531. doi:10.1016/S0008-6363(99)00115-7)

1.4.3 eNOS Signalwege

Endothelzellen kontrollieren die Gefäßspannung durch Freisetzung von NO. Die eNOS-Aktivität hängt von der Kalziumkonzentration und von post-translationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) ab.⁴²

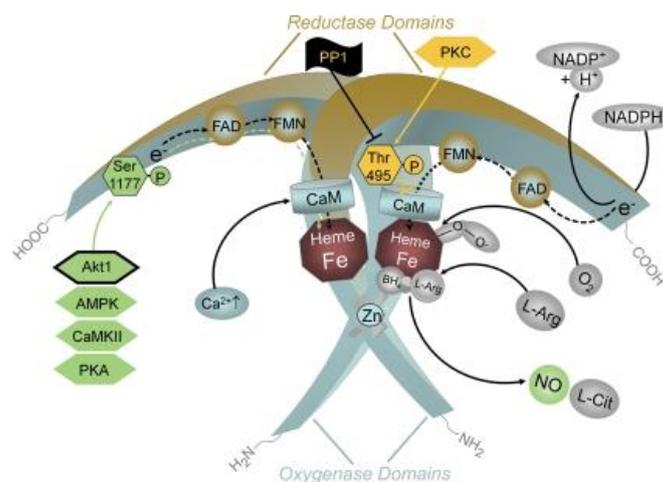


Abbildung 12: Regulierung der endothelialen NOS Aktivität durch intrazelluläres Ca^{2+} und Phosphorylierung (unverändert übernommen aus: Ulrich Förstermann, William Sessa. Nitric oxide synthase: regulation and function. In: European Heart Journal 2012; 33:829-837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304)

1.4.3.1 Kalziumabhängige eNOS Aktivierung

Kalzium aktiviertes Calmodulin ist für die Regulierung der eNOS Aktivität von großer Bedeutung. ENOS synthetisiert NO in einem bestimmten Rhythmus, wobei die eNOS Aktivität bei Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration erheblich zunimmt. Durch Kalzium wird die

⁴² Vgl. Vanhoutte et al.: Thirty years of saying NO, 2016, 375

Calmodulin Bindung mit dem Enzym induziert.⁴³ Für die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration sind neurohumorale Mediatoren verantwortlich. Sie binden und aktivieren bestimmte Rezeptoren auf der endothelialen Zellmembran. Wie in den meisten Zellen sind die Rezeptoren mit G-Proteinen gekoppelt. Bestimmte Agonisten wie Catecholamine oder Serotonin verursachen beispielsweise die Aktivierung von eNOS durch Gi Proteine. Die G-Proteine sind an die Phospholipase C (PLC) gekoppelt, welche Inositol Triphosphat (IP₃) synthetisiert, das anschließend den IP₃-Rezeptor auf dem Sarko/Endoplasmatischen Retikulum (SR) bindet und zur Kalzium Freisetzung führt. Dieser Prozess wird durch das IP₃-Rezeptor gekoppelte und kalziumbindende Protein S100A1 erleichtert. Die Ca²⁺ Depletion des SR aktiviert Kalziumkanäle wie Orail 1, Transient Receptor Potential Vanilloid 1 und 4“ (TRPV1 und TRPV4) sowie T-Typ Kalzium Kanäle, durch die der extrazelluläre Kalziumeinstrom stattfindet. Zusätzlich kommt es zur Bindung des Ryanodin-Rezeptors der am SR lokalisiert ist und ebenso zur Ca²⁺ Freisetzung beiträgt. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt somit weiter an. Beide - IP₃- und Ryanodin-Rezeptoren – werden durch eine gesteigerte Kalziumkonzentration im unteren Konzentrationsbereich aktiviert, eine höhere Ca²⁺ Konzentration löst jedoch einen negativen Feedback Mechanismus aus. Das lokal erhöhte Ca²⁺ wird von den Mitochondrien aufgenommen und führt dort zur Aktivierung des Natrium/Kalzium Austausches, was eine rhythmische (oszillatorische) Kalziumfreisetzung zur Folge hat. Die mitochondrielle Kalziumfreisetzung aktiviert IP₃- und Ryanodin Rezeptoren und führt zur weiteren Kalziumfreisetzung durch das SR in die perinukleare Region und zur Verteilung des Kalzium Signals. Der Kalziumeinstrom durch TRP und T-Typ Kalzium Kanäle kann auch direkt durch neurohumorale Mediatoren, Shear Stress und Hypoxie erfolgen.

Ca²⁺ gebundenes Calmodulin bindet die Calmodulin Bindestelle von eNOS und erleichtert den Elektronenfluss von der Reduktase- zur Oxygenase-Domäne, was die NO Freisetzung initiiert. Der Ca²⁺-Calmodulin Komplex aktiviert zusätzlich Protein Kinasen (PK) und vereinfacht so die post-translationale Modifikation der eNOS Aktivierung. Eine ähnliche kalzium-abhängige eNOS Aktivierung kann mit Zugabe von Ionophoren (z. B. A23187) erreicht werden.⁴⁴

1.4.3.2 eNOS Interaktion mit Caveolin-1

Caveolae sind Einstülpungen der Plasmamembran welche für die Bindung und Organisation von verschiedenen Signalproteinen von Bedeutung sind. Die strukturelle Hauptkomponente der Caveolae besteht aus Cholesterin und Strukturproteinen wie den Caveolinen (Caveolin-1, -2, -

⁴³ Vgl. Förstermann et al.: Nitric oxide synthase: regulation and function, 2011, 833

⁴⁴ Vgl. Vanhoutte et al.: Thirty years of saying NO, 2016, 376-378

3). Über das Protein Caveolin-1 binden zahlreiche Signalproteine wie z. B. Untereinheiten der G-Proteine, PI3K und Tyrosin Kinasen der Src-Proteinfamilie an die Membran. Die subzelluläre eNOS Lokalisation ist umstritten. Berichten zufolge ist eNOS mit dem Golgi Apparat assoziiert, wohingegen andere eNOS in der Plasmamembran oder teilweise/exklusiv in den Caveolen lokalisiert sehen. Die Wahrheit liegt wohl irgendwo dazwischen. Das Co-Färben von Endothelzellen mit Antikörpern gegen eNOS und Caveolin-1 hat zweifelsfrei gezeigt, dass nicht alle eNOS Moleküle mit Caveolin-1 assoziiert sind.⁴⁵ Die Rekrutierung von CaM und das Hitzeschock-Protein hsp90 können die Bindung zwischen Caveolin-1 und eNOS auflösen und eNOS aktivieren.⁴⁶

1.4.3.3 eNOS Phosphorylierung

Bei der posttranslationalen Modifikation kann das Anfügen einer Phosphatgruppe an eNOS durch Kinasen, die eNOS Aktivität verändern. Das Phosphat kann durch Protein Phosphatasen (PP) wieder entfernt werden. Der Ort der Phosphorylierung hat unterschiedliche Auswirkungen, so führt die Phosphorylierung des Ser1177 zur Aktivierung, während diese am Thr495 zur Inhibierung des Enzyms führt. Die Proteinkinasen (PK) PKA, PKB (Akt), AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase), CaMK II (Calmodulin-Kinase II) und ERK1/2 (Extracellular-signal Regulated Kinase) phosphorylieren eNOS am Ser1177 als Antwort auf diverse Stimuli (z. B. Adiponectin, Östrogen, Zunahme im Shear Stress oder Insulin), wohingegen Rho-Kinase und PKC eNOS durch Phosphorylierung am Thr495 inhibieren.

Verschiedene PPs sind im Stande, bestimmte Stellen zu dephosphorylieren. PP1 Subtypen dephosphorylieren Thr495 und werden durch erhöhte Kalziumkonzentration oder PKA aktiviert, wohingegen PP2A Subtypen das Enzym aufgrund verschiedener Stimuli (Aldosteron, CRP und Ceramid) am Ser1177-Rest desphosphorylieren.

Shear Stress und Agonisten wie bestimmte Hormone (Adiponectin und Insulin) oder Wachstumsfaktoren (VEGF) sind im Stande, durch ihre spezifische Rezeptorbindung die eNOS Phosphorylierung zu initiieren. Das geschieht über Aktivierung des PI3K abhängigen PDK1/2 Signalweges und stimuliert Kinasen wie PKA, AMPK, CaMKII oder Akt, welche dann eNOS phosphorylieren.⁴⁷

⁴⁵ Vgl. Fleming und Busse: Signal transduction of eNOS activation, 1999, 534

⁴⁶ Vgl. Förstermann et al.: Nitric oxide synthase: regulation and function, 2011, 833

⁴⁷ Vgl. Vanhoutte et al.: Thirty years of saying NO, 2016, 378

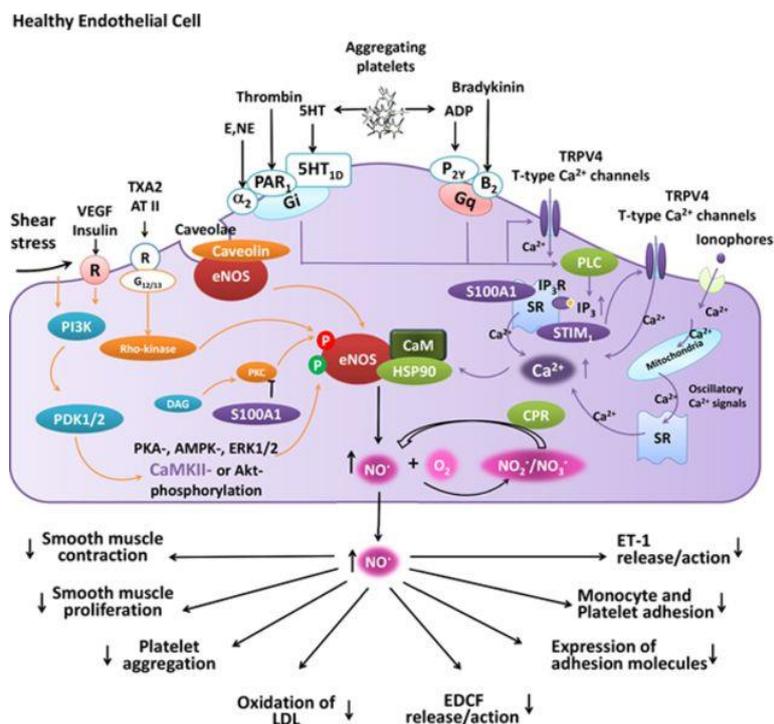


Abbildung 13: Stickstoffmonoxidproduktion durch Endothelzellen (unverändert übernommen aus: Paul Vanhoutte, Yingzi Zhao et al.: Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. *Circulation Research* 2016, 119:375-396. doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306531)

1.4.3.4 HDL und die Aktivierung des eNOS Signalwegs

HDL stimuliert die endotheliale eNOS Aktivität über den SRB1 Rezeptor und ist mit einem Cholesterin Efflux in Richtung des ApoA-1 gebundenen HDL assoziiert. SRB1 besitzt eine Cholesterin Sensor Domäne, wobei eine einzige Mutation in dieser Domäne den HDL-induzierten Signalweg beeinträchtigt, aber nicht den Cholesterin Efflux in Richtung des HDLs verändert. Der SRB1 vermittelte Signalweg involviert die sequentielle Aktivierung der Src Tyrosin Kinase, PI3K, Akt Kinase und Erk1/2 MAPK, was zur Phosphorylierung von eNOS am Ser1177 führt. Die C-terminale SRB1 Interaktion mit PDZK1 ist für die Signaltransduktion erforderlich. Abgesehen von der eNOS Aktivierung initiiert der Signalweg weitere anti-atherogene endotheliale Funktionen.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur eNOS Aktivierung involviert das HDL-assozierte Sphingosin 1 Phosphat (S1P). HDL/ApoM-gebundenes S1P leitet das Signal über S1P1/P3-Rezeptoren weiter, die in den Caveolen lokalisiert sind. EL könnte die S1P Freisetzung von HDL vermitteln und die Rezeptorbindung vereinfachen. S1P1/P3 initiieren die Signalweiterleitung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, was zur Aktivierung des PI3K, Akt und MAPK

1.4.4.1 eNOS Dysfunktion

Die NO Produktion ist ein sehr komplexer Prozess und erfordert die Aktivierung von Membranrezeptoren, das Öffnen von Kalziumkanälen und die Interaktion mit intrazellulären Mechanismen für die eNOS Stimulierung. All diese Prozesse setzen voraus, dass eNOS als Dimer vorliegt, sowie dass seine Kofaktoren und sein Substrat in ausreichender Menge vorhanden sind. Unter normalen Umständen funktioniert dieses System optimal, jedoch mit zunehmenden Alter und unter pathologischen Bedingungen (vor allem bei Adipositas, Diabetes mellitus und Hypertension) wird die NO vermittelte Gefäßrelaxation beeinträchtigt und bereitet die Basis der endothelialen Dysfunktion. Die Dysfunktion ist äußerst facettenreich und kann nicht nur mit reduzierter eNOS Aktivität erklärt werden.⁵⁰

Abnormale Kopplung der endothelialen Membranrezeptoren

Eine selektive Dysfunktion der Gi-Protein-abhängigen Relaxation bei chronischer Hypercholesterinämie wird auf eine erhöhte ROS Produktion und oxLDLs zurückgeführt, die die Gi-abhängige Kopplung von Zellmembranrezeptoren und die eNOS Aktivierung stören.

Reduzierte Verfügbarkeit des Substrats

L-Arginin, der Vorläufer von NO, wird in gesunden Erwachsenen normalerweise in ausreichender Menge de novo aus L-Citrullin synthetisiert. Eine zu geringe L-Citrullin und L-Arginin Verfügbarkeit, besonders in Kombination, kann zur NO Defizienz beitragen. Zu einem Engpass kommt es, wenn der für die NO Synthese zuständige L-Arginin Transporter nicht vorhanden ist, oder der L-Arginin Abbau durch die Arginase beschleunigt wird. Denn L-Arginin dient auch als Substrat für Arginasen – Enzyme des Harnstoffzyklus in den Blutgefäßen – die die Hydrolyse von L-Arginin zu Urea und Ornithin katalysieren. Auch die Induktion von iNOS bei Infektionen, bei chronischen Entzündungen und in Tumoren führt zur gesteigerten NO Produktion, diese konkurriert so mit eNOS um das Substrat und beschleunigt seine S-Nitrosylierung, die auf das Enzym inhibierend wirkt.

Reduzierte Verfügbarkeit des Kofaktors

Die Biosynthese von BH₄ aus Sepiapterin erfolgt mit Hilfe von Enzymen, die bei Mutation oder Deletion zu einer nicht ausreichenden Produktion des Kofaktors führen und die NO-vermittelte Gefäßrelaxation verringern. Ebenso mindert die erhöhte Oxidation von BH₄ zu BH₂ die Bioverfügbarkeit des Kofaktors, was bei Frauen in der Postmenopause, Diabetes mellitus, verlängerter

⁵⁰ Vgl. Vanhoutte et al.:Thirty years of saying NO, 2016, 391

Exposition gegenüber Cortison oder Aldosteron, Hypertension und bei Entzündungen beobachtet werden konnte.

Vorhandensein endogener Inhibitoren

Erhöhte Konzentrationen von eNOS Inhibitoren – im Speziellen ADMA – verdrängen L-Arginin als bevorzugtes Substrat und schränken die NO Produktion ein. Die Produktion von ADMA (Beiprodukt der Protein Methylierung im Cytoplasma) kann unter anderen bei Zunahme an oxidativen Stress und höheren Konzentration an oxLDL beschleunigt sein.

Reduzierte Protein Dimerisierung

Die dimere eNOS Struktur ist für seine Funktion essentiell. Eine Zunahme an eNOS Monomeren konnte bei zunehmenden Alter, Diabetes mellitus, Hypoxie, Hyperlipidämie und erhöhten oxidativen Stress beobachtet werden. Eine S-Nitrosylierung am Cys94 und Cys99 (post-translationale Modifikation) zerstört die dimere eNOS Struktur. Dazu kann es bei maximaler eNOS Aktivität (als eine Art negativer Feedback Loop oder bei iNOS Induktion während entzündlichen Prozessen) und ROS kommen. Andere Faktoren die zur Destabilisierung des Dimers beitragen inkludieren unter anderen reduzierte BH₄ und L-Arginin Konzentrationen.⁵¹

1.4.4.2 eNOS Entkopplung und NO Inaktivierung

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CAD) werden mit endothelialer Dysfunktion und erhöhter Produktion von ROS (Reactive Oxygen Species) assoziiert. Die eNOS Entkopplung und NADPH Oxidasen spielen bei der Entstehung von ROS eine wichtige Rolle. Es existieren mehrere Superoxid- (O₂⁻) produzierende Isoformen der NADPH Oxidasen, die in den Gefäßwänden lokalisiert sind. Die molekulare Basis der endothelialen Dysfunktion bei Gefäßerkrankungen umfasst die Inaktivierung von NO und die eNOS Entkopplung:

Aufgrund von erhöhten oxidativen Stress ist die Expression der NADPH Oxidase durch PKC hochreguliert und generiert O₂⁻. Gleichzeitig ist auch die eNOS Expression erhöht, was auf die Produktion von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder die Kinase PKC zurückzuführen ist. Die Produkte der NADPH Oxidase und eNOS – O₂⁻ und NO – reagieren miteinander, was zur Entstehung von toxischen Peroxynitrit (ONOO⁻) führt. ONOO⁻ kann den Kofaktor BH₄ zu Trihydrobiopterin Radikal (BH₃[•]) oxidieren, der in weiterer Folge zu Dihydrobiopterin (BH₂) disproportionieren kann. Resultierend daraus wird die Sauerstoff- und O₂-Reduktion durch eNOS von

⁵¹ Vgl. Vanhoutte et al.: Thirty years of saying NO, 2016, 385-388

der NO Formation getrennt, und funktionelles eNOS wird zu einem dysfunktionellen Superoxid produzierenden Enzym, das zu oxidativen Stress beiträgt. Die eNOS-Umwandlung von einem NO zu einem O_2^- produzierenden Enzym wird als NOS Entkopplung bezeichnet. Die BH_4 Oxidierung zum BH_3^{\cdot} Radikal oder zu BH_2 reduziert außerdem die Affinität des Substrates L-Arginin für NO. Es konnte gezeigt werden, dass die NO Produktion von eNOS stark von der intrazellulären BH_4 Konzentration abhängig ist und Studien belegen, dass die BH_4 Konzentrationen in Modellen für kardiovaskuläre Erkrankungen und in Patienten mit endothelialer Dysfunktion reduziert sind.⁵²

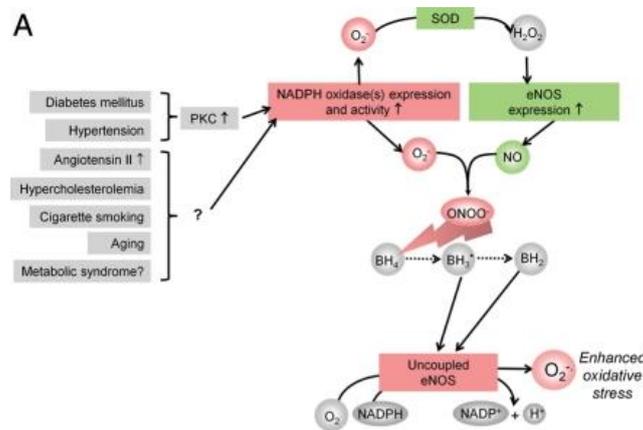


Abbildung 15: eNOS Entkopplung (unverändert übernommen aus: Ulrich Förstermann, William Sessa. Nitric oxide synthase: regulation and function. In: European Heart Journal 2012; 33:829-837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304)

⁵² Vgl. Förstermann et al.: Nitric oxide synthase: regulation and function, 2011, 835-836

2 Zielsetzung

HDL verfügt über vielerlei gefäßschützende Funktionen, die in erster Linie auf die Stimulierung des gefäßrelaxierenden Faktors Stickstoffmonoxid (NO) durch die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) zurückzuführen sind. Verschiedene Serumenzyme und Rezeptoren die auf das HDL wirken führen zur ständigen Veränderung der HDL-Zusammensetzung und -Größe (sogenannte HDL-Remodellierung), was sich auf die Funktionalität des HDLs auswirken kann. Das Enzym Endotheliale Lipase (EL) konvertiert HDL aufgrund seiner Phospholipase Aktivität in kleinere HDL-Partikel (sog. EL-HDL). Dabei werden die HDL gebundenen Phospholipide zu freien Fettsäuren und LysoPCs gespalten. Entzündliche Erkrankungen konnten mit einer EL-Überexpression assoziiert werden, daher könnte EL einen Einfluss auf atherogene Prozesse haben.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen der Endothelialen Lipase auf die Zusammensetzung und NO-induzierende-Kapazität des humanen Serums und des ApoB-depletierten Serums (als HDL-Ersatz) zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden EA.hy926-Endothelzellen mit EL-modifiziertem Serum und -ApoB-depletiertem Serum für 5 und 16 Stunden inkubiert um anschließend den Phosphorylierungszustand von Akt und eNOS, sowie die eNOS-Aktivität und NO-Produktion zu untersuchen.

3 Material und Methoden

HDL stimuliert die endotheliale eNOS Aktivität über Bindung des Rezeptors SRB1, was über die sequentielle Aktivierung der Src Tyrosin Kinase, PI3K, Akt Kinase und Erk1/2 (MAPK) zur Phosphorylierung von eNOS am Ser1177 führt. Zur Untersuchung des Effekts von EL auf die eNOS und NO induzierende Kapazität des Serums und ApoB-depletierten Serums wurde der Phosphorylierungszustand von eNOS und Akt sowie die Auswirkungen von EL auf die eNOS Aktivität und NO Produktion nach 5- und 16-stündiger Seren-Inkubation untersucht.

Im ersten Schritt wurden HepG2-Zellen für 2 Stunden mit einem EV- und EL-Adenovirus infiziert. Anschließend wurde humanes Serum für 8 Stunden durch die EV- und EL-überexprimierenden HepG2-Zellen modifiziert. Aus etwa der Hälfte des EV- und EL-modifizierten Serums wurde anschließend ApoB-depletiertes Serum hergestellt. Im nächsten Schritt wurden EA.hy926-Endothelzellen mit dem EV- und EL-modifizierten Serum und -ApoB-depletierten Serum für 5 und 16 Stunden inkubiert, um im Anschluss daran den Phosphorylierungszustand der Signalproteine Akt und eNOS mittels Westernblot die eNOS Aktivität mittels radioaktiven Assay und die NO Produktion mittels HPLC zu untersuchen.

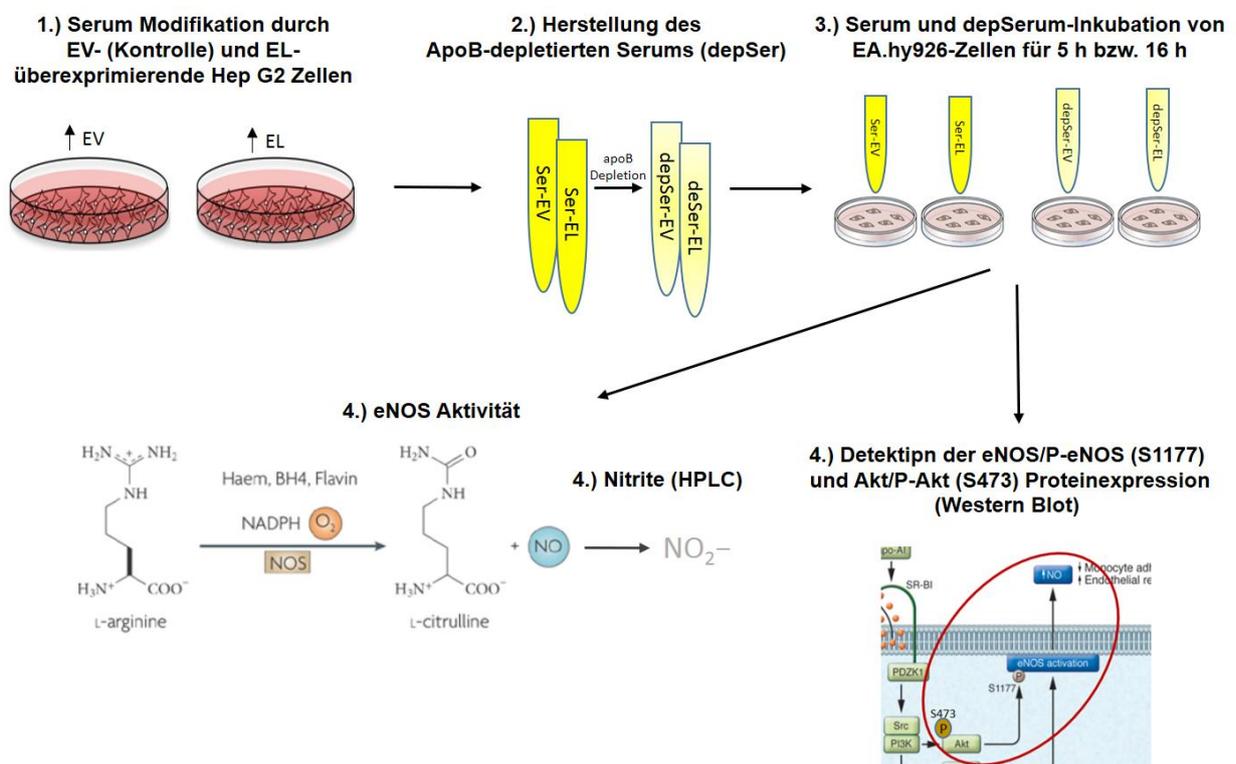


Abbildung 16: Übersicht über die Reihenfolge der Experimente

3.1 Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Gewebe
Hep G2	Homo sapiens	„Liver hepatocellular carcinoma“
EA.hy926	Homo sapiens	„Endothelial hybrid“

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

3.2 Virus

Virus	Beschreibung
Empty-Virus (EV) (29.4.2015)	Adenovirus-Leervektor als Kontrolle eingesetzt, hergestellt am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz nach der Methode von Strauss et al., 2002
Endothelial Lipase-Adenovirus (EL) (März 2015)	Rekombinanter Adenovirus für die Expression der endothelialen Lipase in kultivierten HepG2-Zellen; hergestellt am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Medizinischen Universität Graz nach der Methode von Strauss et al., 2002

Tabelle 3: Verwendete Adenoviren

3.3 Reagenzien

Hersteller	Reagenzien
Gibco	DMEM (1X)
Gibco	DPBS (1X)
Gibco	Fetal Bovine Serum
PAA	Trypsin EDTA (1X)
PAA	Penicillin/Streptomycin (100X)
PAA	HAT (50X)
Diasys Diagnostic Systems GmbH	Totalcholesterin Kit
Diasys Diagnostic Systems GmbH	Triglycerid Kit
Diasys Diagnostic Systems GmbH	Phospholipid Kit
Peqlab	Protein Ladder IV (10 - 170 kDa Standard)
Thermo Scientific	Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

3.4 Zellkulturroutine

Die Kultivierung der EA.hy926- und Hep G2-Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ in „Dulbecco's modified eagle medium“ (DMEM) unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin und Streptomycin. EA.hy926-Zellen wurden zusätzlich mit 1 % Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) und 1 % L-Glutamin supplementiert und alle zwei Tage mit 0,025 % Trypsin 1:3 gesplittet. HepG2-Zellen wurden zwei Mal pro Woche mit 0,05 % Trypsin 1:3 passagiert.

3.5 EL-Adenovirus Überexpression und Serum Modifikation

Für die EL-Serummodifikation wurden HepG2 Zellen mit EV- und EL-Adenovirus überexprimiert. Dazu wurden etwa 24 Stunden vor der Virusinfektion 2 Millionen HepG2-Zellen in 60 mm Dishes ausplattiert. Am Tag der Virusinfektion wurden die Zellen mit DMEM ohne FBS (-DMEM) gewaschen und mit vorgewärmten EV-(MOI 20) und EL-(MOI 20) Virusmedium für 2 Stunden infiziert. Danach wurde das Virusmedium mit DMEM Vollmedium ersetzt und die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 8 Stunden mit 50 % Serum inkubiert. Dazu wurden die Zellen etwa 24 Stunden nach der Virusinfektion mit -DMEM gewaschen und mit je 1,8 ml 50 % Serum (humanes gepooltes Serum mit -DMEM verdünnt 1:1/v/v) pro 60 mm Dish versehen. Nach 8 Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurde das modifizierte Serum gesammelt, zentrifugiert und der Überstand bis zum nächsten Tag bei 4°C für die Herstellung des ApoB-depletierten Serums gelagert.

3.6 ApoB Serum Depletion

Die Hälfte des modifizierten Serums wurde zur Herstellung des ApoB-depletierten Serums verwendet. Die Depletion diente zur Entfernung aller ApoB-enthaltender Lipoproteine (VLDL und LDL) und erfolgte durch Präzipitation. Das ApoB-depletierte Serum wurde somit stellvertretend für HDL eingesetzt. Die Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 400 µl Depletionsbuffer (200 mM Glycin und 20 % Polyethylenglycol) zu 1 ml des EV- und EL-modifizierten Serums. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Ansatz bei 10.000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und anschließend der nun ApoB-freie Überstand gesammelt.

3.7 Zellkulturexperimente - Inkubation von EA.hy926-Zellen mit EV und EL-modifizierten Serum und -ApoB-depletierten Serum

- **Zur Bestimmung der Proteinexpression mittels Westernblot**

Etwa 24 Stunden vor der Inkubation wurden je 76.000 EA.hy926-Zellen/well in eine 24-well Platte ausplattiert. Für die Inkubation wurden die konfluenten Zellen 2 x mit 0,5 ml 1xPBS gewaschen und anschließend mit 10 % EL- und EV-modifizierten Serums sowie -ApoB-depletierten Serum bei 37°C für 5 oder 16 Stunden inkubiert.

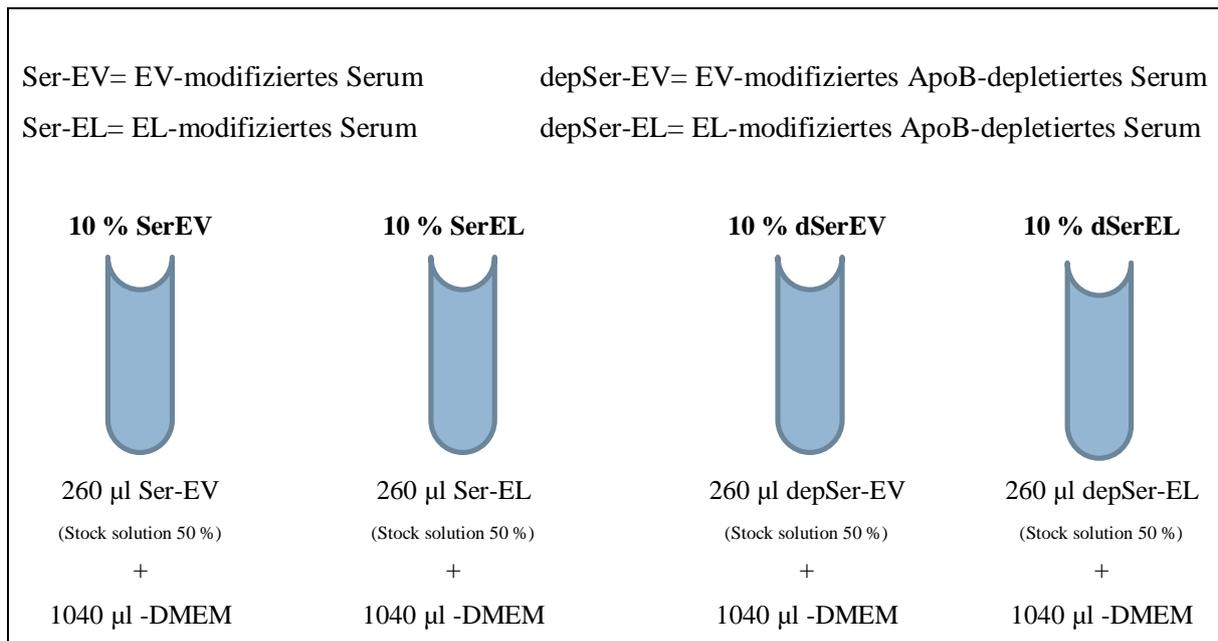


Tabelle 5: Protokoll zur Herstellung für das 10 % EV- und EL- Serum sowie für das 10 % EV- und EL-ApoB-depletierte Serum

10 % Ser-EV	10 % Ser-EL	10 % depSer-EV	10 % depSer-EL
10 % Ser-EV	10 % Ser-EL	10 % dSer-EV	10 % depSer-EL
10 % Ser-EV	10 % Ser-EL	10 % dSer-EV	10 % depSer-EL

Tabelle 6: Pipettierschema der 24-well Platte (76.000 Zellen/well)

Nach 5 bzw. 16 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis platziert, mit 0,5 ml eiskalten 1xPBS gewaschen und danach mit 90 µl eiskalten RIPA Buffer (unter Zugabe von 1 mM Natrium orthovanadate und 1 µl/10⁶ Zellen Protease Inhibitor Cocktail) lysiert. Danach wurden die Lysate in vorgekühlte 1,5 ml Röhren überführt und bei 13 000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden dann in neue 1,5 ml Röhren überführt. 10 µl des Proteinlysats wurden für die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Assay eingesetzt.

- **Zur Messung der NO Bioverfügbarkeit (NO-Produktion)**

Etwa 24 Stunden vor der Inkubation wurden je 38.000 EA.hy926-Zellen/well in eine 48-well Platte ausplattiert. Die konfluenten Zellen wurden mit 10% EL- und EV-modifizierten Serum sowie -ApoB-depletierten Serum bei 37°C für 5 oder 16 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3 x mit warmen 1xPBS gewaschen und 15 Minuten mit 100 µM Histamin inkubiert. Der Überstand wurde danach für die Nitritmessung gesammelt.

- **Zur Messung der eNOS Aktivität**

Etwa 24 Stunden vor der Inkubation wurden je 250.000 Zellen/well in eine 6-well Platte ausplattiert. Die konfluenten Zellen wurden mit 10% EL- und EV-modifizierten Serum sowie -ApoB-depletierten Serum bei 37°C für 5 oder 16 Stunden inkubiert.

3.8 Western Blot

Um die Auswirkung der EL Überexpression auf den eNOS Signalweg zu untersuchen, wurde die Proteinexpression der eNOS, der eNOS Phosphorylierung am Ser1177, der Akt, der Akt Phosphorylierung am Ser473 und für die Normalisierung – die Proteinexpression des Housekeeping-Gens Alpha-Tubulin – densitometrisch bestimmt. Dafür wurden 6 µg Protein 1:6 mit Probenbuffer (enthält 20% beta-Mercaptoethanol) gemischt und anschließend bei 95°C auf einem Thermomixer für 5 Minuten inkubiert. Das gesamte Volumen wurde dann in die Probenaschen eines 10 % Trenngels überführt. Die anschließende Proteinauftrennung durch Gelelektrophorese erfolgte bei 175 V für 90 Minuten. Das Blotting der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte bei 300 mA für 90 Minuten. Die Membran wurde anschließend zur PeNOS, eNOS sowie zur PAkt, Akt und Alpha Tubulin Detektion entsprechend der jeweiligen Proteingröße zugeschnitten. Die PeNOS-Membran wurde in 10 % BSA, die PAkt-Membran in 10% Milch und die eNOS-, Akt- sowie Alpha-tubulin-Membranen in 5 % BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt. Nach dem Blocken erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C und am nächsten Tag wurden die Membranen 6x mit 5 ml Waschbuffer gewaschen. Zum Schluss erfolgte die Zugabe des Horseradish Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers für 2 Stunden, gefolgt von der zuvor erwähnten Waschprozedur. Die densitometrische Proteindetektion mittels Chemilumineszenz aufgrund der Peroxidase Reaktion durch Zugabe von 4 ml HRP Substrat, erfolgte mit dem Gerät ChemiDoc Imager und der Software Imagelab.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Proteingröße
Purified Mouse Anti-eNOS/NOS Type III	BD Biosciences	1:1000	140 kDa
Purified Mouse Anti-eNOS (pS 1177)	BD Biosciences	1:1000	140 kDa
Alpha-Tubulin (11H10) Rabbit mAb	Cell Signaling	1:1000	52 kDa
Phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signaling	1:1000	60 kDa
Akt Antibody	Cell Signaling	1:1000	60 kDa
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako	1:5000	
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako	1:2000	

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

10 % SDS-Gel

10 % Trenngel

Acrylamid:Bis	2900 µl
1,5M Tris	2170 µl
Aqua dest.	3530 µl
10% SDS	86 µl
Temed	4,36 µl
10% Ammoniumpersulfat	76 µl
6,4 % Ladegel	
Acrylamid:Bis	326 µl
0,5M Tris	500 µl
Glycerin	1650 µl
10% SDS	21,5 µl
Temed	3 µl
10% Ammoniumpersulfat	19 µl
Bromphenolblau	5 µl

Tabelle 8: Protokoll zur Herstellung des 10%-igen SDS-Gels

SDS-Laufpuffer
30,3 g/L Tris, 150,1 g/L Glycin, 10,1 g/L SDS
Waschpuffer
10 g/L Tween 20, 180 g/L NaCl, 200 ml/L 1M TRIS HCl pH7,4
Probenpuffer
12 g/L SDS, 60 mg/L Bromphenol Blue, 47 ml/L Glycerol, 12 ml/L Tris pH6.8, 20 ml/L Mercaptoethanol
Blotting Puffer
28 g/L Tris, 143 g/L Glycin, 200 ml/L MeOH

Tabelle 9: Protokoll zur Herstellung der Puffer

3.9 Messung der eNOS Aktivität

Zur Untersuchung des Effekts von EL auf die eNOS Aktivität wurde die Konversion von L-[³H]Arginin in L-[³H]Citrullin gemessen. Nach der 5 oder 16-stündigen Seren Inkubation wurden die Zellen gewaschen und bei 37°C mit 50 mM Tris Puffer (pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl₂, 5 % v/v FBS), der radiotivgelabeltes L-[2,3-³H]Arginin (~106 dpm) und 100 µM Histamin (oder Kalzium Ionophor A23187 0.5 µM) inkludierte, inkubiert. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten durch das Waschen der Zellen mit ungelabelten 50 mM Tris Puffer (pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ und 0,1 mM EGTA) gestoppt. Bei der darauffolgenden Zelllyse mit 0.01 N HCL wurde ein Aliquot für die Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität zurückgelegt. Zu den restlichen Lysaten wurden 200 mM Natrium Acetat Puffer (pH 13,0) hinzugefügt, der 10 mM L-Citrullin enthielt. Die Trennung von L-[³H]Citrullin und L-[³H]Arginin erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie.

3.10 Messung der Nitrit Produktion mittels HPLC

Nitrit als Indikator für die NO Produktion wurde mittels fluorimetrischer HPLC gemessen. Dafür wurden nach der 5- und 16-stündigen Seren-Inkubation je 100 µl Zellmedium oder physiologische Salzlösung (PSS) gesammelt und mit 2,3-Diaminonaphthalen (DAN) derivatisiert. Nitrit reagiert dabei mit DAN zu 2,3 Naphtotriazol (NAT). Die eNOS spezifischen Nitritwerte wurden aus der Subtraktion der Nitritwerte unter Zugabe von 100 µM L-NNA (eNOS Inhibitor) vom totalen Nitritgehalt der Proben ermittelt.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPadPrism (Version 6.01). Die Ergebnisse wurden aus zumindest 3 unabhängigen Experimenten berechnet. Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert ± Standardfehler (S.E.M). Statistische Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet und die Wahrscheinlichkeit P<0,05 (*), P<0,01 (**) und P<0,001 (***) als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Lipidgehalt des EV- und EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums

Der Lipidgehalt (PC, PI, LysoPC und TG) des EV- und EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums wurde mittels LC-MS von Thomas Eichmann an der Karl-Franzens-Universität Graz gemessen. Verglichen wurde immer die Lipidkonzentration von Ser-EL mit Ser-EV (Kontrolle) und von depSer-EL mit depSer-EV (Kontrolle). Die Untersuchungen ergaben eine signifikante Erniedrigung der Phospholipide PC (A) und PI (B) im Ser-EL und depSerEL, was auf die hohe Phospholipase-Aktivität von EL zurückzuführen ist. Übereinstimmend mit der verringerten PL-Konzentration ist der Gehalt an LysoPCs aufgrund der Hydrolyse der PLs zu freien Fettsäuren und LysoPCs im Ser-EL und depSer-EL signifikant erhöht (C). Da EL auch über eine geringe Triglyzeridlipase-Aktivität verfügt, ist ebenso eine signifikant verringerte Triglyzerid-Konzentration im depSer-EL zu beobachten (D). Der TG-Gehalt im Ser-EL ist nur leicht und nicht signifikant erniedrigt, was auf den hohen TG-Anteil im VLDL zurückzuführen sein dürfte.

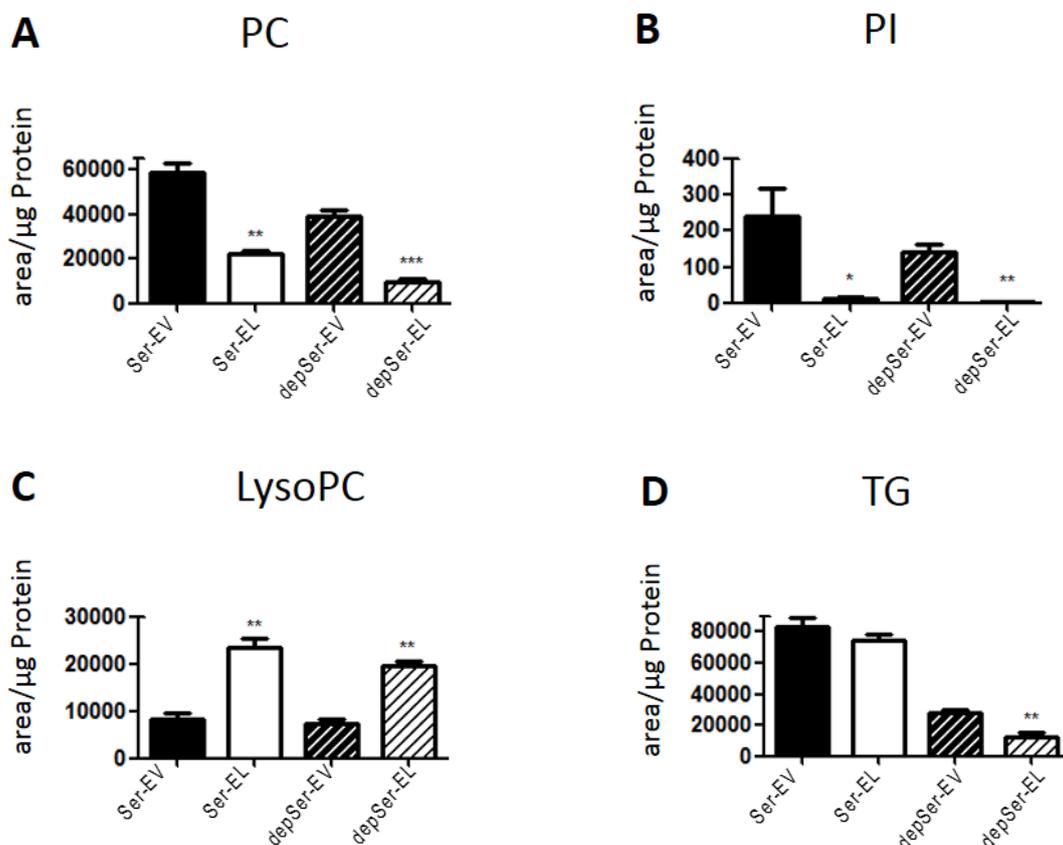


Abbildung 17: Lipidgehalt des EV- und EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums.

4.2 Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die Phosphorylierung von eNOS

Durch Bindung an den endothelialen SRB1-Rezeptor aktiviert HDL den eNOS Signalweg. Die Aktivierung der Proteinkinase Akt führt zur Phosphorylierung von eNOS am Serin1177 (PeNOS). Die Ergebnisse zeigen den Effekt von EL auf die PeNOS Proteinexpression. Die densitometrische Analyse der Westernblots ergab nach 5- und 16-stündiger Seren-Inkubation eine signifikante Erniedrigung der PeNOS Proteinexpression im depSer-EL.

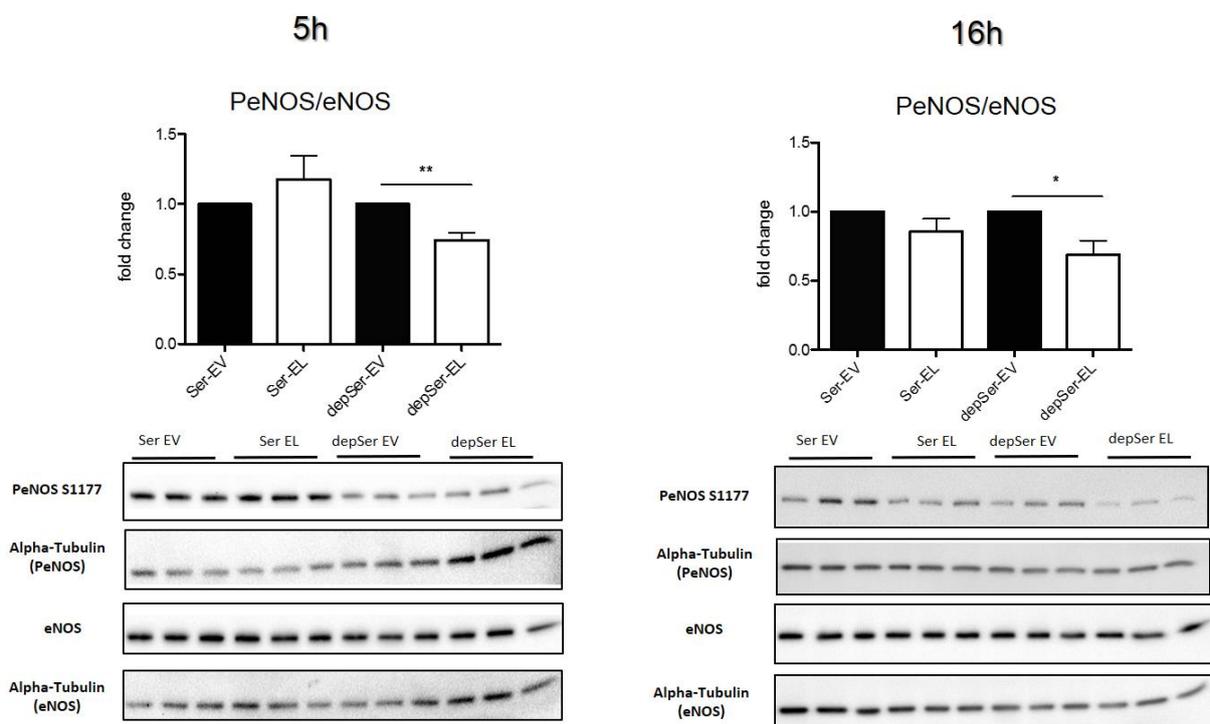


Abbildung 18: PeNOS Proteinexpression nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum.

4.3 Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die Phosphorylierung von Akt

Der eNOS Signalweg inkludiert die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt am Serin473 (PAkt) durch PI3K. Die 5-stündige Seren-Inkubation zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression. Die 16-stündige Inkubation führte jedoch zu einer signifikanten Erhöhung der PAkt Proteinexpression im depSer-EL.

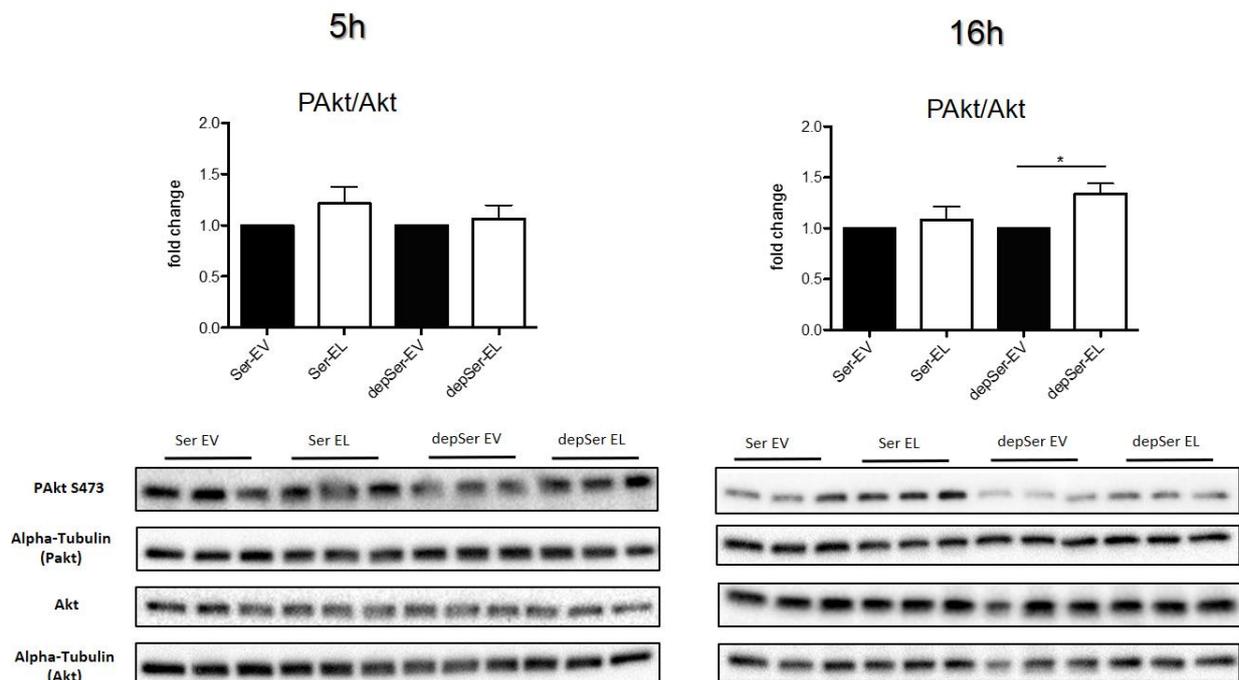


Abbildung 19: PAkt Proteinexpression nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum..

4.4 Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die eNOS-Aktivität

Die Phosphorylierung von eNOS am Serin1177 durch PAkt führt zur Aktivierung des Enzyms und zur NO Produktion. Das Substrat L-Arginin wird von eNOS bei Vorhandensein aller benötigten Cofaktoren zu L-Citrullin und NO umgesetzt. Im Experiment wurde die Konversion von L-[³H]Arginin zu L-[³H]Citrullin gemessen.

Die eNOS Aktivität war sowohl nach 5- als auch 16-stündiger Inkubation von Endothelzellen mit depSer-EL signifikant erniedrigt. Ebenso führte die 16-stündige Inkubation mit Ser-EL zu einer signifikanten Erniedrigung der eNOS-Aktivität.

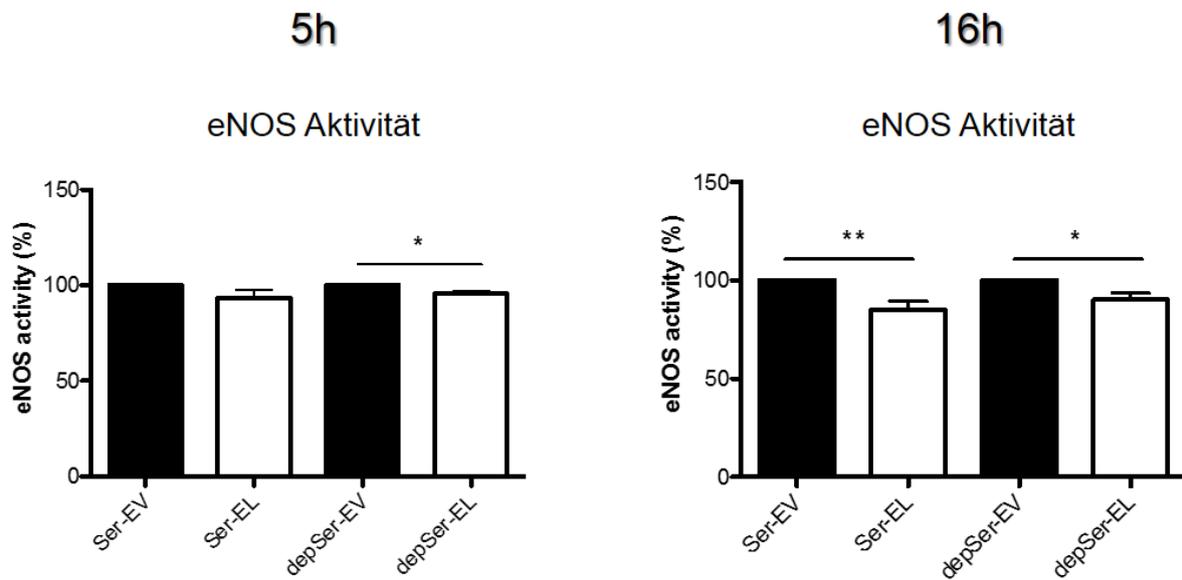


Abbildung 20: eNOS Aktivität nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA-hy926-Endothelzellen mit EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum.

4.5 Effekt des EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die NO Produktion

Bei diesem Zellkulturexperiment wurde der Effekt des EV- und EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums auf die eNOS katalysierte NO Produktion untersucht. Nitrit als Indikator für die NO Produktion wurde mittels fluorimetrischer HPLC gemessen.

Bei der 5-stündigen Ser-EL- und depSer-EL-Inkubation von Ea.hy926-Endothelzellen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Nitrit-Konzentrationen nachgewiesen werden. Jedoch konnte beim 16-stündigen Experiment eine signifikante Erniedrigung des Nitrit-Gehalts im depSer-EL festgestellt werden.

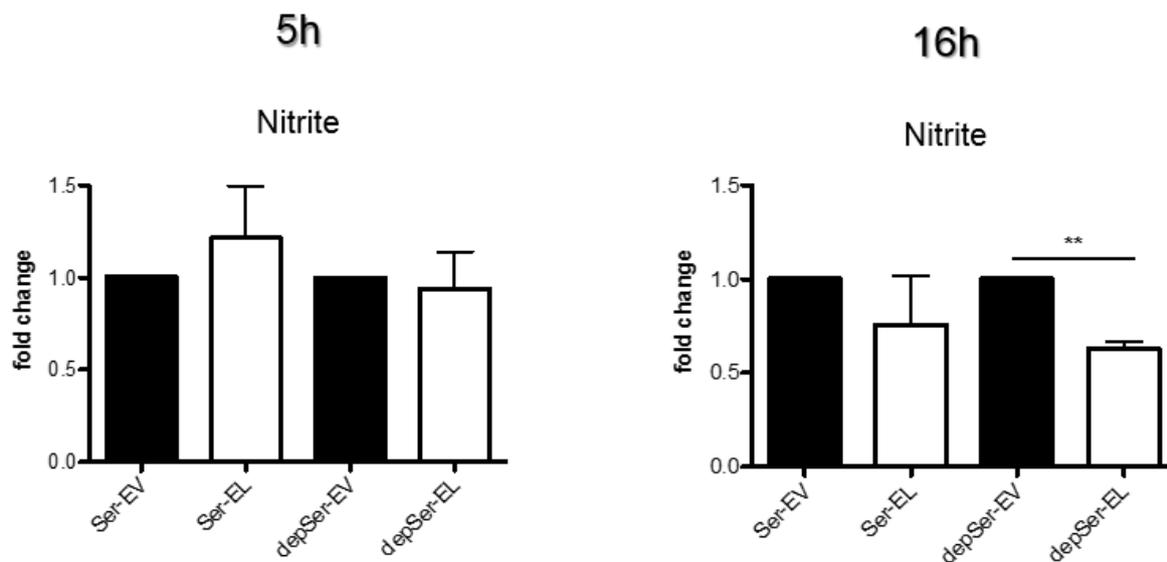


Abbildung 21: NO Produktion nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt von EL auf die eNOS und NO-induzierende Kapazität von EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum (als HDL-Ersatz) untersucht werden. Dazu wurden EA.hy926-Endothelzellen für 5 oder 16 Stunden mit EV- und EL-modifizierten Serum und -ApoB-depletierten Serum inkubiert.

Parameter		Inkubation mit EL-modifizierten Serum (Ser-EL)/-ApoB-depletierten Serum (depSer-EL)
PAkt/Akt	↑	depSer-EL 16h
PeNOS/eNOS	↓	depSer-EL 5h und 16 h
eNOS Aktivität	↓	Ser-EL 5h und Ser-EL/depSer-EL 16h
NO Produktion	↓	depSer-EL 16h

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchung der PAkt- und PeNOS-Proteinexpression nach 5- oder 16-stündiger Inkubation von Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum und -ApoB-depletierten Serum führte in Zellen, welche 16 Stunden mit EL-modifizierten ApoB-depletierten Serum behandelt wurden, zu einer signifikanten Erhöhung der PAkt-Proteinexpression und zu einer signifikant verringerten PeNOS-Proteinexpression. Ebenso führte die 5-stündige Inkubation mit EL-modifizierten ApoB-depletierten Serum zu einer signifikanten Erniedrigung der PeNOS-Proteinexpression. Da eine erhöhte Phosphorylierung von Akt auch zu einer erhöhten Phosphorylierung von eNOS durch PAkt führen sollte, stehen die beiden Ergebnisse jedoch im Widerspruch zueinander. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte die Dephosphorylierung von eNOS durch die Serin/Threonin-spezifische Protein Phosphatase 2A (PP2A) sein. Protein Phosphatase 2 Subtypen sind in der Lage, eNOS aufgrund diverser Stimuli am Serin1177 zu dephosphorylieren. Es wäre daher sinnvoll, die 16-stündige Inkubation mit EL-modifizierten ApoB-depletierten Serum unter Zugabe eines PP2A-Inhibitors wie Okadasäure zu wiederholen. Okadasäure sollte die Dephosphorylierung von eNOS verhindern und zu einer Erhöhung der PeNOS Proteinexpression führen.



Abbildung 22: Inhibierung von PP2A durch Okadasäure

Die Messung der eNOS-Aktivität und NO Produktion nach 16-stündiger Inkubation von Endothelzellen mit EL-modifizierten ApoB-depletierten Serum ergab eine signifikante Erniedrigung der eNOS-Aktivität und NO-Produktion. Dieses Ergebnis stimmt auch mit der verringerten PeNOS Proteinexpression nach 16-stündiger Inkubation mit EL-modifizierten ApoB-depletierten Serum überein.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die 16-stündige Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EL-modifizierten-ApoB-depletierten Serum zu einer signifikanten Erniedrigung der PeNOS Proteinexpression, eNOS Aktivität und NO Produktion führt. Daraus lässt sich ableiten, dass die EL-vermittelte Modifikation von humanen Vollserum, die eNOS-aktivierende und NO-induzierende Kapazität des ApoB-depletierten-Serums verringert. Das kann auf die veränderte Struktur und Funktionalität von HDL oder auf die Entstehung lipolytischer Produkte (freie Fettsäuren und LysoPCs) zurückzuführen sein. Durch die HDL-Remodellierung und die damit verbundene Entstehung kleinerer HDL-Partikel, kann die Bindung des SRB1-Rezeptors beeinträchtigt werden, wie in einer Studie von Gauster et al über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von EL-modifiziertem HDL (EL-HDL) gezeigt werden konnte. Gauster et al kamen zu dem Ergebnis, dass EL die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften von HDL so verändert, dass sowohl die Bindungskapazität von HDL an den SRB1-Rezeptor als auch der SRB1-vermittelte Cholesterin-Efflux beeinträchtigt werden.⁵³ Außerdem konnte anhand von Experimenten mit PC-depletiertem und -angereichertem HDL demonstriert werden, dass sich der PC-Gehalt von HDL auf die ApoA-I-Konformation⁵⁴ auswirkt und die Bindung von HDL an den SRB1-Rezeptor beeinflusst.⁵⁵ Hierbei ist anzumerken, dass beispielsweise auch Methoden wie die ApoB-Depletion und HDL-Isolation mittels Ultrazentrifugation unter unphysiologischen Bedingungen stattfinden und zu einer (künstlichen) Modifizierung des HDLs beitragen können. Die beeinträchtigte Bindung von EL-HDL an den SRB1-Rezeptor kann daher Auswirkungen auf die Stimulierung der NO-Produktion haben. Letztendlich kann aber auch die Entstehung von freien Fettsäuren und LysoPCs bei der Hydrolyse der Phospholipide im HDL durch EL eine Rolle spielen, da die lipolytischen Produkte mit eNOS interagieren und seine Enzymaktivität beeinflussen

⁵³ Vgl. Gauster et al.: Endothelial lipase-modified high-density lipoprotein exhibits diminished ability to mediate SR-BI (scavenger receptor B type I)-dependent free-cholesterol efflux, 2004, 75

⁵⁴ Vgl. Collet et al.: Differential effects of lecithin and cholesterol on the immunoreactivity and conformation of apolipoprotein A-I in high density lipoprotein, 1991, 9145

⁵⁵ Vgl. Liadaki et al.: Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I, 2000, 21262

können. In einer Studie von Kozina et al in vaskulären endothelialen EA.hy926-Zellen über die Auswirkung von LysoPC 18:1 auf die NO-Bioverfügbarkeit konnte eine verminderte basale NO Produktion durch LysoPC 18:1 nachgewiesen werden. Dabei kam es auch zur partiellen Zerstörung des aktiven eNOS-Dimers und in Folge zur eNOS Entkopplung sowie zu einer erhöhten ROS-Entstehung.⁵⁶

Zusammenfassend kann die signifikant verringerte eNOS-aktivierende und NO-produzierende Kapazität des EL-modifizierten ApoB-depletierten Serums auf die HDL-Remodellierung und die damit verbundene Entstehung von EL-HDL oder lipolytischen Produkten zurückzuführen sein. In weiteren Experimenten sollte daher der Effekt des EL-HDLs getrennt von den lipolytischen Produkten untersucht werden, denn nur so ist es möglich die Rolle des EL-HDLs und der lipolytischen Produkte zu klären.

⁵⁶ Vgl. Kozina et al.: Oleoyl-Lysophosphatidylcholine Limits Endothelial Nitric Oxide Bioavailabilities by Induction of Reactive Oxygen Species, 2014, 1

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lipoproteinklassen und ihre Eigenschaften.....	1
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	34
Tabelle 3: Verwendete Adenoviren.....	34
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien	34
Tabelle 5: Protokoll zur Herstellung für das 10 % EV- und EL- Serum sowie für das 10 % EV- und EL-ApoB-depletierte Serum	36
Tabelle 6: Pipettierschema der 24-well Platte.....	36
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	38
Tabelle 8: Protokoll zur Herstellung des 10% -igen SDS-Gels	38
Tabelle 9: Protokoll zur Herstellung der Puffer	38
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Lipoproteins HDL	2
Abbildung 2: Stoffwechsel der Lipoproteine	4
Abbildung 3: HDL Partikel sind aufgrund ihrer Komposition heterogen: Natives HDL unterscheidet sich aufgrund seiner Oberflächenladung, Größe und Dichte, Form und Apolipoprotein Komposition.	5
Abbildung 4: Unterscheidung der HDL Partikel aufgrund ihrer Dichte, Größe, Apolipoproteinzusammensetzung und Oberflächenladung	6
Abbildung 5: Übersicht über HDL-remodellierende Faktoren	9
Abbildung 6: HDL Komplexität und Heterogenität	12
Abbildung 7: HDL-vermittelte eNOS Aktivierung	13
Abbildung 8: Entstehung einer arteriosklerotischen Läsion	17
Abbildung 9: HDL Modifikation durch EL	19
Abbildung 10: Struktur und katalytischer Mechanismus funktioneller NOS	23
Abbildung 11: eNOS katalysierte Reaktion	24
Abbildung 12: Regulierung der endothelialen NOS Aktivität durch intrazelluläres Ca ²⁺ und Phosphorylierung	24
Abbildung 13: Stickstoffmonoxidproduktion durch Endothelzellen	27
Abbildung 14: Wege der HDL-vermittelten Signaltransduktion zur Aufrechterhaltung der endothelialen Funktion	28
Abbildung 15: eNOS Entkopplung	31
Abbildung 16: Übersicht über die Reihenfolge der Experimente	33
Abbildung 17: Lipidgehalt des EV- und EL-modifizierten Serums und -ApoB-depletierten Serums.	40
Abbildung 18: PeNOS Proteinexpression nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum.	41
Abbildung 19: PAkt Proteinexpression nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum.	42
Abbildung 20: eNOS Aktivität nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum	43
Abbildung 21: NO Produktion nach 5- und 16-stündiger Inkubation von EA.hy926-Endothelzellen mit EV- und EL-modifizierten Serum- und -ApoB-depletierten Serum.	44
Abbildung 22: Inhibierung von PP2A durch Okadasäure	45

Literaturverzeichnis

Aizawa, Yoshio; Seki, Nobuyoshi; Nagano, Tomohisa; Abe, Hiroshi: Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. In: *World Journal of Gastroenterology* 2015, 21(36):10299-10313. Doi:10.3748/wjg.v21.i36.10299.

Annema, Wijtske; Tietge, Uwe J. F.: Role of Hepatic Lipase and Endothelial Lipase in High-Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport. In: *Curr Atheroscler Rep* 2011, 13(3):257-265. Doi:10.1007/s11883-011-0175-2.

Barter, Philip; Nicholls, Stephen; Rye, Kerry-Anne et al.: Antiinflammatory Properties of HDL. In: *Circulation Research* 2004, 95(8):764-772. doi:10.1161/01.RES.0000146094.59640.13.

Besler, Christian; Lüscher, Thomas; Landmesser, Ulf: Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. In: *EMBO Molecular Medicine* 2011, 4:251-268. Doi:10.1002/emmm.201200224.

Besler, Christian; Heinrich, Kathrin; Roher, Lucia; Doerries, Carola; Riwanto, Meliana; Shih, Diana M. et al.: Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. In: *The Journal of Clinical Investigation* 2011, 121(7):2693-2708. Doi:10.1172/JCI42946.

Choi, Sungshin Y.; Hirata, Ken-ichi; Ishida, Tatsuro; Quertermous, Thomas; Cooper, Allen D.: Endothelial lipase: a new lipase on the block. In: *Journal of Lipid Research* 2002, 43:1763-1769. Doi:10.1194/jlr.R200011-JLR200.

Chung, Eun Ji; Tirrell, Matthew : Recent Advances in Targeted, Self-Assembling Nanoparticles to Address Vascular Damage Due to Atherosclerosis. In: *Adv Healthc Mater* 2015, 4(16): 2408–2422. doi:10.1002/adhm.201500126.

Collet, X; Perret, B; Simard, G; Raffai, E; Marcel, YL: Differential effects of lecithin and cholesterol on the immunoreactivity and conformation of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. In: *J Biol Chem* 1991, 266(14):9145-52.

Fleming, Ingrid; Busse, Rudi: Signal transduction of eNOS activation. In: *Cardiovascular Research* 1999, 43:532-541.

Förstermann, Ulrich; Sessa, William: Nitric oxide synthase: regulation and function. In: *European Heart Journal* 2012, 33:829-837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.

Gauster, Martin; Oskolkova, Olga; Innerlohinger, Josef; Glatter, Otto; Knipping, Gabriele; Frank, Sasa: Endothelial lipase-modified high-density lipoprotein exhibits diminished ability to mediate SR-BI (scavenger receptor B type I)-dependent free-cholesterol efflux. In: *Biochem. J.* 2004, 382:75-82.

Kontush, Anatol; Lindahl, Mats; Lhomme, Marie et al.: Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* 2015; 224:3-51. doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_1.

Kozina, Andrijana; Opresnik, Stefan; Sze Ka Wong, Michael et al.: Oleoyl-Lysophosphatidylcholine Limits Endothelial Nitric Oxide Bioavailabilities by Induction of Reactive Oxygen Species. In: PLoS ONE 2014; 9(11):1-20. Doi:10.1371/journal.pone.0113443.

Kratzer, Adelheid; Giral, Hector; Landmesser, Ulf: High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. In: Cardiovascular Research 2014, 103:350-361. doi: 10.1093/cvr/cvu139.

Liadaki, KN; Liu, T; Xu, S; Ishida, BY et al.: Binding of high density lipoprotein (HDL) and discoidal reconstituted HDL to the HDL receptor scavenger receptor class B type I. Effect of lipid association and APOA-I mutations on receptor binding. In: J Biol Chem. 2000, 275(28):21262-71. DOI:10.1074/jbc.M002310200.

Mineo, Chieko und Shaul Philip W.: PON-dering differences in HDL function in coronary artery disease. In: J Clin Invest. 2011. 121(7):2545-8. doi: 10.1172/JCI57671

Norata, Giuseppe; Catapano, Alberico: Molecular mechanisms responsible for the anti-inflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. In: Vascular Health and Risk Management 2005, 1(2):119-129.

Riederer, Monika; Köfeler, Harald; Lechleitner, Margarete; Tritscher, Michaela; Frank, Sasa: Impact of endothelial lipase on cellular lipid composition. In: Biochimica et Biophysica Acta 2012, 1003-1011. Doi:10.1016/j.bbailip.2012.03.006.

Vanhoutte, Paul M.; Zhao, Yingzi; Xu, Aimin; Leung, Susan W.S.: Thirty Years of Saying NO: Sources, Fate, Actions, and Misfortunes of the Endothelium-Derived Vasodilator Mediator. In: Circulation Research 2016, 119:375-396. Doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306531.