



Irene Schilcher, BSc

HIGH DENSITY LIPOPROTEIN UND ENDOTHELIALE LIPASE IN PATIENTEN MIT KORONARER HERZKRANKHEIT

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (MSc)
Masterstudium Biochemie und Molekulare Biomedizin

eingereicht an der
Technischen Universität Graz

Betreuer

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

Institut

Institut für Molekularbiologie und Biochemie
Medizinische Universität Graz

Graz, Jänner 2015

VORWORT

Meine Masterarbeit zur Erlangung meines akademischen Grades an der Technischen Universität Graz habe ich an der Medizinischen Universität in Graz, am Institut für Molekularbiologie und Biochemie verfasst.

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei einigen Menschen für deren Unterstützung zu bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Saša Frank für die fortlaufende Unterstützung bei meiner Arbeit aussprechen.

Weiters möchte ich mich auch bei den KollegenInnen im Labor, im Speziellen bei Andrijana, Margarete und Stefan bedanken, die mir stets bei allen Fragen mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind und mich sehr unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch meinen Freundinnen Daniela, Magdalena und Stephanie, Lukas, Tamara und Sandra, die mich in schwierigen Situationen unterstützt und mich während des Studiums immer wieder aufgebaut haben.

Ein herzlicher Dank gebührt besonders meiner gesamten Familie, die mich immer motivierten und ohne deren Hilfe und Fürsorge das Studium und das Verfassen meiner Masterarbeit nicht möglich gewesen wäre.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre 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 entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

Datum

Unterschrift

ZUSAMMENFASSUNG

Studien zeigten eine reziproke Korrelation zwischen der Plasmakonzentration des High Density Lipoproteins (HDL) und der Inzidenz von arteriosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen. Die endotheliale Lipase (EL) spielt eine wichtige Rolle im HDL Metabolismus, wodurch einerseits eine Reduktion des HDL Plasmaspiegels und der HDL Partikelgröße und andererseits eine Modifizierung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von HDL entstehen.

In dieser Masterarbeit wurde der Zusammenhang zwischen der EL Plasmakonzentration, welche mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen wurde, und den anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Fähigkeiten, wie auch die Lipid- und Proteinkomposition des HDLs von 76 Patienten mit stabiler koronarer Arterienerkrankung (sCAD) analysiert. Ebenfalls erfolgte eine Untersuchung der Wirkung von EL auf HDL, wobei HDL von gesunden und freiwilligen Spendern *in vitro* auf EL und LacZ überexprimierenden HepG2 Zellen modifiziert wurde. Danach wurde die HDL Zusammensetzung und die anti-inflammatorische Aktivität von EL-HDL und LacZ-HDL überprüft.

Die anti-inflammatorische Aktivität wurde durch die Messung der TNF- α (tumor necrosis factor α) induzierten ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1) Expression in kultivierten Endothelzellen bestimmt. Hierbei konnte keine Korrelation zwischen der EL Plasmakonzentration und der anti-inflammatorischen Aktivität des HDLs in sCAD Patienten festgestellt werden. Weiters konnte ein leichter, nicht-signifikanter Trend für eine positive Korrelation zwischen der Arylesterase und der anti-oxidativen Aktivität von HDL und der EL Plasmakonzentration detektiert werden. Die positive Korrelation zwischen der Arylesterase Aktivität von PON1 (Paraoxonase 1) und der anti-oxidativen Kapazität von war statistisch signifikant. Es gab keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den HDL assoziierten Apolipoproteinen und der EL Plasmakonzentration. Ein Trend für eine positive Korrelation wurde sowohl für die Phospholipide und als auch für das freie Cholesterin und der EL Plasmakonzentration detektiert. Eine signifikante positive Korrelation konnte für den Totalcholesteringehalt und der EL Plasmakonzentration festgestellt werden. Bei der Untersuchung der HDL Größe konnte kein Unterschied zwischen den Patienten mit hoher und niedriger EL Plasmakonzentration registriert werden. In den *in vitro* Experimenten wurde nach Behandlung des HDLs mit EL, eine Reduktion des HDL Phospholipidgehaltes und der HDL Partikelgröße beobachtet. EL modifiziertes HDL (EL-HDL) und Kontroll-HDL (LacZ-HDL) waren in Bezug auf den ApoA-I, PON1 und ApoM Gehalt sowie auf die anti-inflammatorische Aktivität gleich.

Basierend auf diesen Resultaten, schließen wir daraus, dass die Wirkung von EL auf HDL bei Menschen mit pathologischen Erkrankungen (CAD) bzw., welche unter medikamentöser Be-

handlung stehen, sich von jenen Effekten in gesunden Menschen, Mausmodellen und Zellkultur unterscheiden. Die beobachtete positive Korrelation zwischen der EL Plasmakonzentration und dem Totalcholesteringehalt des HDLs in sCAD Patienten könnte durch einen verminderten Einfluss von Cholesterinester-Transferprotein (CETP) oder einen erhöhten Einfluss von Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) auf das HDL oder durch eine verminderte selektive Aufnahme von HDL-Cholesterinestern durch Scavenger Rezeptor B1 (SR-BI) erklärt werden.

ABSTRACT

Studies have shown an inverse correlation between the plasma concentration of high density lipoprotein (HDL) and the incidence of atherosclerotic cardiovascular disease. Endothelial lipase (EL) plays an important role in HDL metabolism, whereby on one hand it decreases HDL plasma levels and particle size and on the other hand modulates the structural and functional properties of HDL.

In this master thesis we examined the relationship between EL plasma concentration, measured by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), and the anti-inflammatory and anti-oxidative capacity as well as the composition of HDL obtained from 76 patients with stable coronary artery disease (sCAD). In order to further investigate the impact of EL on HDL, HDL from plasma of healthy volunteers was modified *in vitro* through exposure to EL and LacZ expressing HepG2 cells, after which HDL composition and anti-inflammatory activity of EL- and LacZ- modified HDL was determined.

The anti-inflammatory activity was determined by measuring tumor necrosis factor α (TNF- α) induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1) expression in cultured endothelial cells. No correlation was found between EL plasma concentration and anti-inflammatory activity of HDL from sCAD patients. Furthermore, there was a slight non-significant trend towards a positive correlation between the arylesterase and anti-oxidative activity of HDL and EL plasma concentration. The positive correlation between the arylesterase activity of paraoxonase-1 (PON1) and the anti-oxidative capacity of HDL was statistically significant. There was no statistically significant relationship between the HDL associated apolipoproteins and the EL plasma concentration. We detected a trend of a positive correlation for phospholipids and free cholesterol and a significant positive correlation for total cholesterol content with the EL plasma concentration. There was no difference in the HDL size between patients with high and low EL plasma concentration. In the *in vitro* experiments, we found a decrease in the HDL-phospholipid content and the HDL particle size after the treatment of HDL with EL. EL modified HDL (EL-HDL) and control HDL (LacZ-HDL) were similar regarding ApoA-I, PON1 and ApoM content as well as anti-inflammatory activity.

Based on these results, we concluded that the impact of EL on HDL in humans under pathological condition (CAD) and medication differs from effects described in healthy humans, mouse models and cell culture. The observed positive correlation between the total cholesterol content and the EL plasma concentration in sCAD patients could be due a decreased cholesteryl ester transfer protein (CETP) or increased lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) action on HDL or a decreased selective uptake of HDL-CE via scavenger receptor class B type I (SR-BI).

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Lipoproteine	1
1.1.1	Struktur der Lipoproteine	1
1.1.2	Metabolismus der Lipoproteine	3
1.2	High density Lipoprotein (HDL)	5
1.2.1	HDL Struktur	5
1.2.2	HDL Heterogenität	6
1.2.3	HDL Biosynthese	6
1.2.4	HDL Katabolismus – reverser Cholesterintransport	8
1.2.5	Biologische und funktionelle Diversität von HDL	10
1.2.5.1	HDL- medierte Makrophagen Cholesterin Efflux	10
1.2.5.2	Cholesterin Efflux	11
1.2.5.3	Stimulation der endothelialen NO Produktion	13
1.2.5.4	Anti-oxidative Aktivität	14
1.2.5.5	Arteriosklerose und die Anti-inflammatorische Aktivität von HDL	16
1.2.5.6	weitere Anti-atherogene Eigenschaften	17
1.2.6	HDL Dysfunktion	17
1.3	Endotheliale Lipase (EL)	18
1.3.1	EL und HDL Metabolismus	19
1.3.2	Auswirkungen von EL auf RCT	20
1.3.3	Beeinflussung von EL auf Entzündungen	21
1.3.4	EL und Arteriosklerose	22
2	Zielsetzung	24
3	Materialien und Methoden	25
3.1	Verwendete Zellelinien	25
3.2	Verwendete Viren	25
3.3	Zellkultur	25
3.3.1	Splitten der Zellen	26
3.3.2	Infektion der Zellen mit rekombinanten Adenoviren	26
3.3.3	Modifikation von HDL auf den Zellen	27

3.4	Isolierung von HDL mittels Ultrazentrifugation	27
3.4.1	Isolierung aus Plasma und Medium	27
3.4.2	Isolierung von HDL aus Serum von sCAD Patienten	28
3.5	Patienten	28
3.6	Anti-inflammatorischer Assay	29
3.7	Anti-oxidativer Assay	30
3.8	Arylesterase Aktivität Assay	30
3.9	Messung der Lipid- und Proteinkomposition	31
3.10	Nicht denaturierende Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese	31
3.11	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese – Western Blot	31
3.12	Bestimmung der Proteinkonzentration und Lipidkomposition	33
3.13	Statistische Auswertung	34
4	Resultate	35
4.1	sCAD Patienten	35
4.1.1	Anti-inflammatorische Kapazität	35
4.1.1.1	Optimierung des Assays	35
4.1.1.2	Anti-inflammatorische Kapazität von sCAD Patienten	36
4.1.2	Arylesterase Aktivität	37
4.1.3	Anti-oxidative Kapazität	38
4.1.4	Protein- und Lipidzusammensetzung	40
4.1.5	Nachweis der HDL Größe	42
4.2	Charakterisierung des in vitro EL-modifizierten HDL	43
4.2.1	Protein- und Lipidkomposition des durch EL modifizierten HDL	43
4.2.2	ApoM-, PON1- und ApoA-I-Gehalt des modifizierten HDL	44
4.2.3	Größe des modifizierten HDL	46
4.2.4	Anti-inflammatorische Wirkung von EL modifizierten HDL	47
5	Diskussion	48

1 EINLEITUNG

1.1 LIPOPROTEINE

Lipoproteine dienen dem Transport von Lipiden („Fette“), welche für den Stoffwechsel und für die Energieversorgung des menschlichen Körpers von großer Bedeutung sind. Da die wichtigsten Lipide wie Cholesterin, Triglyzeride, Phospholipide und freie Fettsäuren nicht wasserlöslich sind, werden diese von spezifischen Proteinen gebunden und in Lymphe, Plasma oder für den intermediären Austausch befördert.

1.1.1 STRUKTUR DER LIPOPROTEINE

Lipoproteine sind eine Kombination aus Lipiden und Proteinen. Der Kern solcher Partikel besteht aus Lipiden, hauptsächlich aus Triglyzeriden (TG) und Cholesterinestern (CE). Die Plasmamembran wird von Phospholipiden (PL), freiem Cholesterin (FC) und Apolipoproteinen aufgebaut. Apolipoproteine sind entweder integrale Membranproteine oder an der Außenseite der Membran fixiert. Diese Plasmamembranproteine erfüllen verschiedenste Aufgaben wie Stabilisierung und Transport der Lipoproteine, Vermittlung der Aufnahme der Lipoproteine in die Zellen (Apo B und E) und beeinflussen spezielle Enzymaktivitäten (ApoA-I, CII, CIII), welche am Stoffwechsel der Lipoproteine eine Rolle spielen.

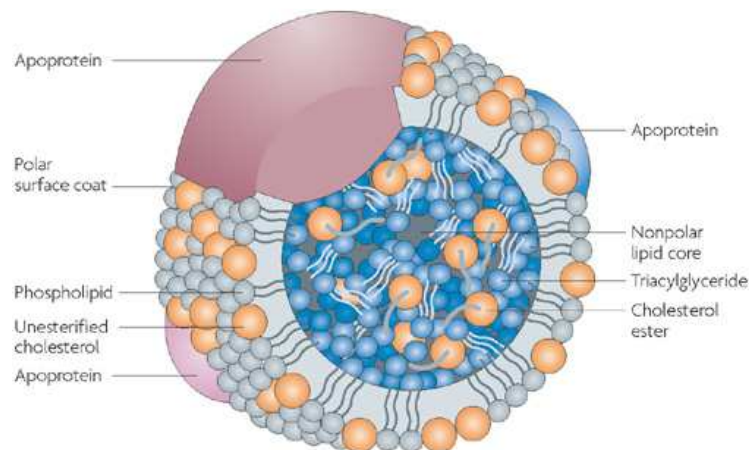


Abbildung 1: Die allgemeine Zusammensetzung der Lipoproteine

Der Kern besteht hauptsächlich aus Triacylglyceriden und Cholesterinestern und ist von einer Membran umgeben, welche sich aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoproteinen zusammensetzt.
(unverändert übernommen aus: Wasan et al., *Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery*, 2008)

Die unterschiedlichen Lipoproteine variieren in ihrer Zusammensetzung, wobei deren relativer Anteil an Lipiden und Proteinen für die Dichte des Lipoproteinpartikels entscheidend ist.^{1,2} Demnach können diese in fünf Klassen eingeteilt werden. Nach abnehmender Größe und zunehmender Dichte werden die Lipoproteine wie folgt gegliedert:

- ⊗ Chylomikronen und Chylomikronen-Reste
- ⊗ Very low density lipoprotein (VLDL)
- ⊗ Intermediate density lipoprotein (IDL)
- ⊗ Low density lipoprotein (LDL)
- ⊗ High density lipoprotein (HDL)

Wie aus Tabelle 1 entnommen werden kann, steigt der Proteinanteil zwischen den Chylomikronen und HDL an.^{3,4}

Tabelle 1: Eigenschaften und Zusammensetzung der unterschiedlichen Lipoproteinklassen (unverändert übernommen aus: Karlson Biochemie und Pathobiochemie)

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte [g]	< 0,95	0,95 – 1,006	1,006 – 1,019	1,019 – 1,063	1,063 – 1,210
Durchmesser [nm]	75 – 1200	30 – 80	25 – 35	18 – 25	5 – 12
Masse [kDa]	~ 400.000	10.000 – 80.000	5.000 – 10.000	~ 2.300	175 – 360
Protein [%]	1,5 – 2,5	5 – 10	15 – 20	20 – 25	40 – 55
PL [%]	7 – 9	15 – 20	22	15 – 20	20 – 35
TG [%]	84 – 89	50 – 65	22	7 – 10	3 – 5
FC [%]	1 – 3	5 – 10	8	7 – 10	3 – 4
CE [%]	3 – 5	10 – 15	30	35 – 40	12
Apolipoproteine	AI, AII, B48, CI, CII, CIII, E	B100, CI, CII, CIII, E	B100, CIII, E	B100	AI, AII, CI, CII, CIII, D, E
Bildungsort	Darmmucosa	Leber	Plasma aus VLDL	Plasma aus VLDL	Leber, Darmmucosa

¹ {Biggerstaff 2004}

² {Krebs 2005}

³ {Karlson 2005}

⁴ {Koolman 2009}

1.1.2 METABOLISMUS DER LIPOPROTEINE

Der Unterschied dieser verschiedenen Lipoproteinklassen liegt nicht nur in deren Komposition, sondern auch in der Art und Weise ihrer Entstehung und Funktion. Grundsätzlich wird zwischen dem exogenen und endogenen Stoffwechsel unterschieden. Beim exogenen Stoffwechsel setzen sich die Lipoproteine aus den über die Nahrung aufgenommenen Lipiden zusammen. Werden die Lipoproteine aus den in der Leber synthetisierten Lipiden gebildet, spricht man vom endogenen Stoffwechselweg.

Die Chylomikronen sind für die Beförderung der Triacylglycerine, welche mit der Nahrung aufgenommen werden, vom Darm zu den Geweben zuständig. Ihre Bildung erfolgt in der Darmmucosa und anschließend werden sie über die Lymphe ins Blut transportiert. Nachdem die Chylomikronen ins Blut gelangt sind, kommt es zu einer Veränderung der Oberfläche. Der Abbau der Chylomikronen wird durch den Transfer von Apolipoprotein E und C von HDL auf die Chylomikronen initiiert. Eine wichtige Rolle spielt auch das Apolipoprotein CII, welches ein Kofaktor für die Lipoproteinlipase (LPL) ist. Durch die Lipoproteinlipase werden die Triacylglycerine hydrolysiert. Dieser Prozess erfolgt vorwiegend an der Gefäßwand der peripheren Blutgefäße im Muskel und Fettgewebe. Die durch den Abbau freigesetzten Fettsäuren und Glycerine werden von den Zellen aufgenommen. Die Aufnahme der Fettsäuren erfolgt vorwiegend durch das extrahepatische Gewebe. Das Glycerin wird zur Leber transportiert und dort phosphoryliert, wodurch es in den Stoffwechsel eingeschleust werden kann. Beim Abbau der Chylomikronen durch die LPL kommt es zu einem Verlust der Triacylglycerine von 70 bis 90%. Weiters geht ein großer Teil des Apolipoproteins A und Cholesterinanteiles verloren. Diese beiden Komponenten sind bei der Bildung des discoidalen HDL involviert. Durch den Abbau entstehen aus den Chylomikronen die Chylomikronen-Reste, welche schlussendlich von der Leber aus dem Blut beseitigt werden.

VLDLs, die in der Leber gebildet und an das Blut abgegeben werden, sind für den Transport der Triacylglycerine, Phospholipide und Cholesterin (=endogene Lipide) zu verschiedenen Geweben zuständig. Zunächst erfolgt auch hier eine HDL-medierte Anreicherung mit den Apolipoproteinen E und CII. Diese Lipoproteinklasse wird ebenfalls durch den Kontakt mit der LPL abgebaut und in IDL und anschließend in LDL umgewandelt.

Die LDL Partikel besitzen den größten Anteil an Cholesterin und Cholesterinestern, welche von der Leber in die extrahepatischen Gewebe befördert werden. Eine wichtige Funktion dieser Partikel ist die Regulierung der Cholesterinbiosynthese im extrahepatischen Gewebe. Wenn die

Cholesterinzufuhr durch LDL gering ist, kommt es zu einer erhöhten Cholesterinbiosynthese. Dafür muss das LDL zunächst mit einem spezifischen Rezeptor (LDL Rezeptor) an der Plasmamembran der Zielzelle interagieren. Diese Interaktion des LDL Rezeptors mit dem LDL wird durch das Apolipoprotein B₁₀₀ gesteuert, wodurch es anschließend zu einer Einschleusung der LDL Partikeln durch Endozytose kommt. Nach der Bildung von Vesikeln und Verschmelzung dieser mit den Lysosomen wird das LDL Großteils abgebaut. Das Cholesterin und andere Lipide werden jedoch von den Zellen weiter verwertet. Durch das freie Cholesterin kommt es zu einer Beeinflussung von zwei Enzymen an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) der Zellen. Einerseits kommt es zu einer Reduktion der Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, wodurch die Geschwindigkeit der Cholesterinbiosynthese gesenkt wird. Andererseits wird die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) aktiviert, was zu einer Veresterung des Cholesterins und in weiterer Folge zu einer Speicherung in den „lipid-droplets“ (Fetttröpfchen) der Zellen führt. Somit ist der LDL-Rezeptor für die Bindung und Aufnahme der cholesterinreichen LDL Partikel verantwortlich, wodurch die Cholesterinkonzentration im Plasma und die Cholesterinbiosynthese gesenkt werden.

Die Entstehung der HDL Partikel erfolgt ebenso in der Leber. Ihre Funktion beruht darauf, dass sie das in den extrahepatischen Geweben gebildete und überschüssige Cholesterin zurück in die Leber befördern (=reverser Cholesterintransport). Im Laufe des Transportes wird das Cholesterin durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) acyliert, wodurch die entstehenden Cholesterinester im Kern der Lipoproteine transportiert werden können. Weiters wird der Abbau der Chylomikronen und VLDLs durch den Austausch von Lipiden und Apolipoproteinen, welcher mit Hilfe von HDL initiiert wird, gefördert.^{5,6}

⁵ {Koolman 2009}

⁶ {Petrides 1998}

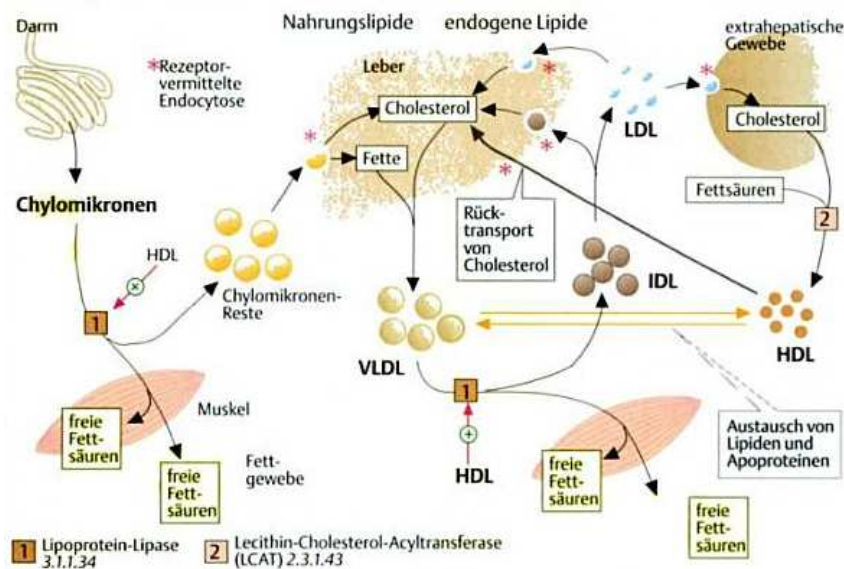


Abbildung 2: Die Transportfunktionen bzw. der Stoffwechsel der verschiedenen Lipoproteinklassen

Die Chylomikronen werden in der Darmmucosa gebildet und werden über die Lymphe in das Blut transportiert. Der Abbau der Chylomikronen wird durch den Transfer von Apolipoprotein E und C von HDL auf die Chylomikronen initiiert. Durch die LPL werden die Triglyzeride hydrolysiert und die durch den Abbau gebildeten freien Fettsäuren werden zu den Zellen transportiert. Durch den Abbau entstehen aus den Chylomikronen die Chylomikronen-Reste, welche anschließend von der Leber abgebaut werden. VLDL wird in der Leber gebildet und durch die LPL in IDL und LDL umgewandelt. Die LDL Partikel besitzen den größten Anteil an Cholesterin und Cholesterinestern, welche von der Leber in die extrahepatischen Gewebe befördert werden. Die Entstehung des HDLs erfolgt ebenso in der Leber. Des-sen wichtigste Funktion ist der Transport von überschüssigem Cholesterin vom extrahepatischen Gewebe zurück zur Leber. Das Cholesterin wird von LCAT acyliert, wodurch die entstehenden Cholesterinestern im Kern von HDL transportiert werden kann. Weiters wird der Abbau von Chylomikronen und VLDLs durch HDL initiiert. (unverändert übernommen aus: Koolman, Taschenatlas Biochemie des Menschen, 2009)

1.2 HIGH DENSITY LIPOPROTEIN (HDL)

1.2.1 HDL STRUKTUR

Im Vergleich zu den anderen Lipoproteinklassen sind HDLs kleine, dichte und proteinreiche Partikel. Diese bestehen vorwiegend aus Phospholipiden (PL), Cholesterinestern (CE), Triglyzeriden (TG) und Proteinen. Die unterschiedlichen Lipidklassen erfüllen individuelle Funktionen. Mit Hilfe der PL's wird die Oberfläche der HDL Partikel als „Lipidmonolayer“ gebildet. Der hydrophobe Lipidkern hingegen besteht aus CE und TG. Unveresterte Sterole, vorwiegend Cholesterin, befinden sich hauptsächlich an der Oberfläche, können jedoch auch teilweise bis in den Kern hineinragen.⁷ Die HDL assoziierten Proteine können in vier Hauptuntergruppen unterteilt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen Apolipoproteinen (Apo), Enzyme, Lipid-Transferproteinen und kleinen Proteinen. Zu den dominierenden Apolipoproteinen gehört das ApoA-I gefolgt von ApoA-II. Die restliche Proteinmasse von HDL setzt sich aus kleineren amphi-

⁷ {Kontush 2013}

phatischen und austauschbaren Proteinen wie dem ApoC, ApoE, ApoD, ApoM und ApoA-IV zusammen. Weiters findet man Enzyme und Lipid-Transferproteine wie der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), dem Cholesterinester Transferprotein (CETP) und der Paraoxonase-1 (PON1).⁸

1.2.2 HDL HETEROGENITÄT

HDLs werden strukturell und funktionell gesehen als sehr heterogene Partikel bezeichnet, wobei sich diese in Bezug auf ihre Dichte, Größe, elektrophoretische Mobilität, Lipidzusammensetzung und Apolipoproteinanteil unterscheiden. Demzufolge können HDL Partikel aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften und mit Hilfe von verschiedensten Techniken in unterschiedliche Subklassen fraktioniert werden. Humanes HDL kann aufgrund der Dichte mittels Ultrazentrifugation in zwei Subfraktionen eingeteilt werden – dem weniger dichten HDL₂ und dem dichteren HDL₃. Diese zwei Untergruppen können wiederum hinsichtlich ihrer Größe in HDL_{2b} (10,6nm), HDL_{2a} (9,2nm), HDL_{3a} (8,4nm), HDL_{3b} (8,0nm) und HDL_{3c} (7,6nm) unterteilt werden. Bezüglich der elektrophoretischen Mobilität kommt das naszierende HDL als pre β -HDL vor, wohingegen HDL₂ und HDL₃ als α oder pre α -HDL existiert. Bei denen im Plasma vorkommenden HDL Partikeln handelt es sich meistens um das α -HDL. Pre β -HDL besteht vorwiegend aus ApoA-I und PL mit kleinen Mengen an Cholesterin und kann weiters in pre β ₁, pre β ₂ und pre β ₃ HDL Partikel untergliedert werden. Basierend auf der Apolipoproteinzusammensetzung wird zwischen LpA-I+A-II, welches ApoA-I und ApoA-II beinhaltet und LpA-I, welches nur ApoA-I trägt, unterschieden. Die Mehrheit der LpA-I Partikel besitzen die gleiche Dichte und Größe wie HDL₂, wohingegen LpA-I+A-II im Zusammenhang mit HDL₃ steht.⁹

1.2.3 HDL BIOSYNTHESE

Die HDL Biosynthese beschreibt die Synthese und Sekretion der bedeutenden Proteinkomponenten des HDLs. Dieser Prozess ist durch die extrazelluläre Entstehung von Lipiden, wie Phospholipiden und Cholesterin und der Erzeugung des reifen HDL Partikels gekennzeichnet. Naszierende HDL Partikel werden von der Leber und vom Darm synthetisiert. Zunächst wird lipidfreies ApoA-I und ApoA-II gebildet. Dabei wird ApoA-I sowohl von Leber und Darm erzeugt, ApoA-II hingegen wird nur von der Leber synthetisiert. Das gebildete ApoA-II ist schlussendlich für die Entwicklung einer HDL Untergruppe verantwortlich, welche ApoA-I und ApoA-II beinhaltet. Für die Bildung des naszierenden HDLs findet eine initiale Lipidanreicherung des lipidfreien

⁸ {Kontush 2012}

⁹ {Rothblat 2010}

ApoA-I durch den ATP-binding Cassette AI Transporter (ABCA1) statt. In diesem Prozess werden PLs und freies Cholesterin (FC) auf das lipidfreie ApoA-I transferiert. Unverestertes Cholesterin wird ebenso von Makrophagen mit Hilfe des ATP-binding cassette GI (ABCG1)Transporters auf das naszierende HDL transportiert. Einerseits sind Leber und Darm sehr wichtig für die erste Lipidanreicherung von ApoA-I, andererseits stammt der größte Teil der Lipidmasse des HDLs von anderen Geweben, wie zum Beispiel Fettgewebe, Skelettmuskel und Haut sowie auch von anderen Lipoproteinen. Durch das Phospholipid-Transferprotein (PLTP) kommt es zu einer Anreicherung des HDLs mit Lipiden, vor allem PLs. In diesem Vorgang wird der TG Kern von TG-reichen Lipoproteinen, wie zum Beispiel VLDL, mittels LPL hydrolysiert, wodurch PLs (auch Apolipoproteine) an der Oberfläche verloren gehen und auf die HDL Partikel transferiert werden. Die Entwicklung des reifen HDLs benötigt ebenso die Veresterung von Cholesterin durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), wodurch Cholesterinester (CE) und der hydrophobe Kern gebildet werden. LCAT wird in erster Linie durch ApoA-I aktiviert und transferiert eine Acyl-Kette der PLs auf das unveresterte Cholesterin an der Oberfläche des HDL Partikels. Diese produzierten CEs gelangen anschließend in den Partikelkern, wodurch eine Partikelvergrößerung stattfindet. Durch diese Prozesse kommt es zur Formierung von einem naszierenden, lipid-armen HDL zu einem reifen und lipid-reichen HDL.^{10,11}

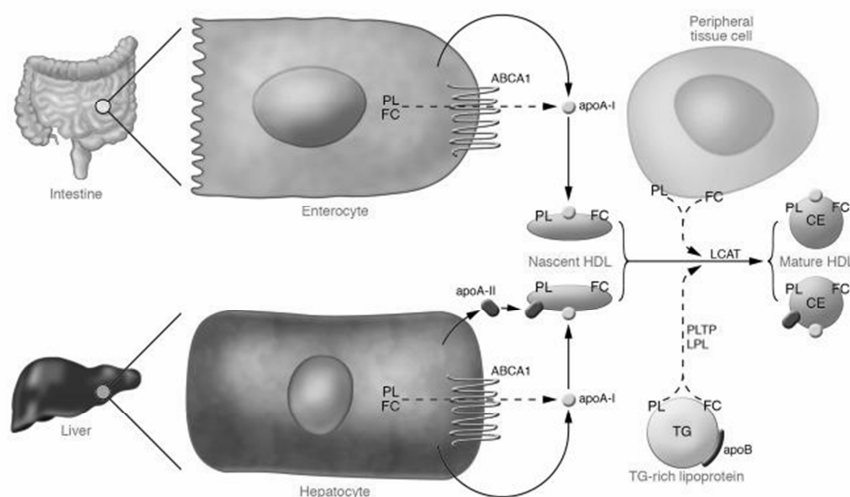


Abbildung 3: HDL Synthese

Darm und Leber synthetisieren ApoA-I, welches in einer lipid-armen Form sekretiert wird. Anschließend kommt es zu einer schnellen Anreicherung mit PLs und freiem Cholesterin (FC) durch ABCA1, wodurch das naszierende HDL gebildet wird. Auf das naszierende HDL werden mehr Lipide von peripherem Gewebe und anderen Lipoproteinen angelagert. Weiters kommt es zur Bildung von CEs durch LCAT und zur Bildung des reifen HDL Partikels. (unverändert übernommen aus: Rader, 2006)

¹⁰ {Rader 2006}

¹¹ {Fujimoto 2010}

1.2.4 HDL KATABOLISMUS – REVERSER CHOLESTERINTRANSPORT

Nach Bildung der reifen HDL Partikel kommt es zum Rücktransport von CEs zur Leber. Dies erfolgt entweder direkt über den scavenger receptor class BI (SR-BI) oder indirekt über Transfer von CEs zu LDLs oder VLDLs mit Hilfe des CE Transferproteins (CETP). Der Lipidgehalt der HDL Partikel wird durch die Enzyme Hepatische Lipase (HL), Endotheliale Lipase (EL) und durch die Transferproteine PLTP und CETP verändert, wodurch der HDL Katabolismus beeinflusst wird.¹²

EL und HL spielen eine wichtige Rolle im HDL Metabolismus. Beide gehören zur Triglyzerid-Lipase Familie, besitzen aber unterschiedliche Funktionen. EL wird hauptsächlich von den Endothelzellen der Gefäße sekretiert und wirkt direkt am Ort der Sekretion. EL hat eine hohe Phospholipase A1 und eine geringe Triglyzerid-Lipase Aktivität, wodurch die HDL Partikel verändert und verkleinert werden. Im Gegensatz zu EL, wird die HL durch die Leber produziert und besitzt beides, Phospho- und Triglyzerid-Lipase Aktivität. Dieses Enzym verursacht ebenfalls die Umwandlung der HDLs in kleinere Partikel, aber zusätzlich auch die Freisetzung von lipid-armen ApoA-I.¹³

Das HDL-Cholesterin (HDL-C) wird über direkte oder indirekte Wege aus dem Kreislauf entfernt. Der direkte Mechanismus erfolgt über SR-BI, wohingegen der indirekte über das CETP gesteuert wird.

Der am meisten erforschte Mechanismus für die direkte Aufnahme von HDL-C durch die Leber wird durch den Rezeptor SR-BI gesteuert. Bei diesem Prozess handelt es sich um eine selektive Aufnahme des HDL-C (unverestert und verestert), da es zu keiner Degradierung der HDL Apolipoproteine kommt. Durch die Bindung von HDL an SR-BI kommt es zu einer Formierung eines Komplexes, welcher durch einen hydrophoben Kanal gekennzeichnet ist. Durch diesen Kanal können die Cholesterinmoleküle diffundieren. Da größere HDL Partikel besser an den Rezeptor binden können, sind diese effektiver und unterstützen den Cholesterinefflux. Studien haben gezeigt, dass die SR-BI mediierte Internalisierung der gesamten HDL Partikel mit einer Beseitigung von HDL-C und Rücksekretion von kleinen und cholesterinverminderten HDLs einhergeht. Die CEs des HDLs werden dadurch über die Leber aufgenommen, wo diese dann in Form von Gallensäure ausgeschieden werden. Ebenfalls kann das HDL-C direkt von den Hepatozyten über ApoE und ApoA-I Rezeptoren eingeschleust und abgebaut werden.

Weiters gibt es noch einen alternativen Weg, durch welchen HDL-C metabolisiert und zur Leber transportiert wird. Dieser Vorgang wird durch das CETP gesteuert. CETP transportiert TG von

¹² {Rader 2008}

¹³ {Yasuda 2010}

ApoB-enhaltenden Lipoproteinen wie VLDL und LDL auf die HDL Partikel im Austausch gegen HDL-CE. Demzufolge kommt es zu einer Verminderung der CEs und zu einer Anreicherung von TG in HDLs, wodurch es als Substrat für die HL wirkt. Durch den CETP-medierten CE Transfer und der HL-medierten Hydrolyse von TG und PL kommt es zur Verkleinerung der HDL Partikel, welche dadurch bevorzugt an den SR-BI Rezeptor binden. Die ApoB-enhaltenden Lipoproteine werden anschließend über die LDLR-medierte Endozytose aus dem Kreislauf entfernt.

Studien von gesunden Probanden haben außerdem gezeigt, dass kleine HDL-CE direkt von der Leber aufgenommen und als Gallensäure ausgeschieden werden können.^{14,15} Neben der Entfernung von HDL-CE durch die Leber hat sich auch ein nicht-biliärer reverser Cholesterintransportweg entwickelt. Bei diesem Vorgang wird das HDL-C in den Darm durch die Enterozyten und mit Hilfe von ABCG5 und ABCG8 freigesetzt.^{16,17}

Ein weiterer Mechanismus für den RCT ist die sogenannte „wässrige Diffusion“. Cholesterinmoleküle sind wasserlöslich und können somit von Zellmembranen auf einen Akzeptor durch den Prozess der „wässrigen Diffusion“ transferiert werden. Dieser Vorgang inkludiert die Desorption von Cholesterinmolekülen von lipid- und wasserhaltigen Spenderzwischenflächen und die Diffusion dieser Moleküle durch die wässrige Phase, bis diese miteinander kollidieren und durch einen Akzeptor absorbiert werden. Die „wässrige Diffusion“ ist ein einfacher Diffusionsprozess, in welchem der Cholesterintransfer passiv erfolgt und durch einen Gradienten aufgrund der Cholesterinkonzentration gesteuert wird. Es wurde festgestellt, dass wenn ein Lipoprotein wie HDL, welches Cholesterin enthält, mit Zellen inkubiert wird, ein bidirektionaler Flux des Cholesterins zwischen den HDL Partikeln und den Plasmamembranen der Zellen erfolgt.¹⁸

Zusammenfassend wird als „reverser Cholesterintransport“ (RCT) derjenige Prozess bezeichnet, indem es zu einer HDL-medierten Entfernung von überschüssigem Cholesterin aus dem peripheren Gewebe kommt, welches anschließend über die Leber ausgeschieden wird. Durch die Beseitigung von CEs werden die HDL Partikel kleiner, können rezirkulieren und in weiterer Folge neues Cholesterin aufnehmen und wieder zur Leber transportieren.

¹⁴ {Assmann 2004}

¹⁵ {Rader 2006}

¹⁶ {Temel 2010}

¹⁷ {Rothblat 2010}

¹⁸ {Yancey 2003}

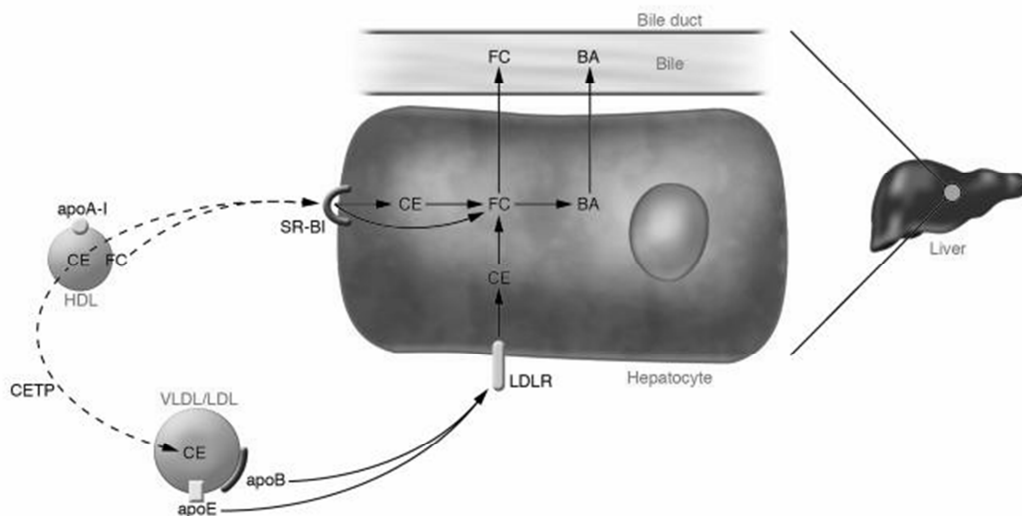


Abbildung 4: HDL-mediierter reverser Cholesterintransport

HDL-CE und freies Cholesterin können direkt und selektiv über die Leber mittels SR-BI aufgenommen werden. Alternativ werden die HDL-CEs auf ApoB-enhaltenden Lipoproteinen transferiert. Dies wird durch CETP gesteuert und diese Lipoproteine werden anschließend über den LDLR von der Leber aufgenommen. In den Hepatozyten kommt es zur Hydrolyse von CE zu freiem Cholesterin, welches dann in Form von Gallensäure ausgeschieden wird.
(unverändert übernommen aus: Rader, 2006)

1.2.5 BIOLOGISCHE UND FUNKTIONELLE DIVERSITÄT VON HDL

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Eigenschaften und Funktionen von HDL entdeckt, welche die anti-arteriosklerotischen Effekte von HDL widerspiegeln. Dazu zählen die Beteiligung am Makrophagen-Cholesterinefflux und am RCT, sowie an anti-oxidativen, anti-inflammatorischen, anti-infektiösen, vasodilatatorischen, anti-thrombotischen und endothelprotektiven Aktivitäten. Diese biologischen Funktionen von HDL werden direkt durch die Zusammensetzung und Struktur dieser Partikel reflektiert. Einerseits werden die HDL assoziierten Proteine als funktionelle Einheit der HDLs dargestellt, andererseits spielen aber auch die Lipide eine wichtige Rolle in der anti-atherogenen Funktionalität von HDL.^{19,20}

1.2.5.1 HDL-MEDIIERTE MAKROPHAGEN CHOLESTERIN EFFLUX

Das Potential von HDL anti-atherogen zu wirken, ist hauptsächlich auf dessen Funktion im Makrophagen RCT zurückzuführen. Dabei wird überschüssiges Cholesterin von lipid-beladenen Makrophagen, auch als Schaumzellen bezeichnet, in arteriosklerotischen Plaques entfernt und zur Leber transportiert, wo es dann in Form von Galle ausgeschieden wird. Makrophagen sind

¹⁹ {Besler 2012}

²⁰ {Kontush 2013}

Phagozyten, die absterbende bzw. tote Zellen und aggregierte, modifizierte Lipoproteine aufnehmen, da diese Cholesterin im Überschuss besitzen. Da zu viel Cholesterin toxisch wirken kann, haben diese Zellen mehrere Wege entwickelt, um das Cholesterin an das extrazelluläre Umfeld abzugeben. Beim ersten Schritt im Makrophagen RCT kommt es zu einer Hydrolyse von cytoplasmatischen CEs zu FC und anschließender Übertragung des FC auf reife HDL Partikeln oder auf extrazelluläres lipid-armes ApoA-I. Dieser Vorgang wird durch aktive Transportsysteme wie ABCAI und ABCGI gesteuert. ABCAI vermittelt den Cholesterinefflux auf das lipid-arme ApoA-I, wohingegen ABCGI den Efflux zwischen Makrophagen und reifen HDL steuert. Gefolgt vom Makrophagen Cholesterinefflux wird das HDL-assoziierte Cholesterin durch LCAT verestert, über die Leber aufgenommen (SR-BI oder CETP medierter Prozess), in FC umgewandelt und anschließend in Form von Galle ausgeschieden.

Bei der Untersuchung von Makrophagen von ABCAI-knockout Mäusen wurde festgestellt, dass diese eine Verminderung des Cholesterineffluxes auf lipid-armen ApoA-I als Rezeptor besitzen. Weiters konnte bei einer Überexpression von ABCAI in Zellen/Makrophagen von Mäusen beobachtet werden, dass diese mit einer verminderten Entwicklung von Arteriosklerose einhergeht. ABCGI defiziente Makrophagen besitzen einen verschlechterten Cholesterinefflux auf reife HDL Partikel und bei ABCGI-knockout Mäusen kommt es zu einer Akkumulation von Cholesterin und TGs in den Makrophagen. In Patienten mit Hypercholesterinämie wurde eine reduzierte Cholesterinefflux-Kapazität durch SR-BI und ABCGI für große HDL₂ Partikel beobachtet. Ebenfalls war bei diesen Patienten der HDL medierte Transport von CEs zur Leber beeinträchtigt.^{21,22}

1.2.5.2 CHOLESTERIN EFFLUX

HDL Levels korrelieren reziprok mit der Entwicklung und Häufigkeit von koronaren Arterienkrankheiten wie zum Beispiel Arteriosklerose. Eine Erklärung für die schützende Wirkung von HDL gegen Arteriosklerose ist der Prozess des RCT. Im RCT fördert HDL oder dessen Apolipoproteine die Entfernung von überschüssigen FC von peripheren Zellen oder Geweben. Nach einigen Reaktionen (siehe 1.2.4) wird das Cholesterin von HDL oder LDL zur Leber transportiert und als Galle ausgeschieden.²³

Die „wässrige Diffusion“ steuert den bidirektionalen Flux von Cholesterin zwischen den Plasmamembranen der Zellen und HDL im extrazellulären Medium. Die Richtung des Cholesterintransportes wird aufgrund des Gradienten der Cholesterinkonzentration und dem Verhältnis zwischen FC und PC in den Spender- und Akzeptorpartikeln bestimmt. Der geschwindigkeitsbestimmende

²¹ {Besler 2012}

²² {Rader 2006}

²³ {Yancey 2003}

Schritt des Effluxes ist hauptsächlich die Desorption von Cholesterinmolekülen von der Plasmamembran. Dieser Vorgang wird durch die Interaktion von freien Cholesterinmolekülen mit den benachbarten PL-Molekülen beeinflusst. Die verschiedenen HDL Subklassen sind alle gleich effektive Akzeptoren für diesen Mechanismus, da der Efflux nicht signifikant von der Änderung der HDL Partikelgröße beeinflusst wird. Die Cholesterintransferraten sind jedoch stark temperaturabhängig.

Die Diffusion von Cholesterinmolekülen zwischen den Plasmamembranen und HDL Partikeln kann weiters durch den SR-BI Rezeptor gesteuert werden. Die Bindung von HDL an SR-BI initiiert den Cholesterinefflux, wobei ein Komplex und ein hydrophober Kanal gebildet werden, durch welchen die Cholesterinmoleküle diffundieren können. Dieser Mechanismus ist stark von der Partikelgröße des HDLs abhängig. Größere HDL Partikel besitzen eine höhere Affinität als kleine, wodurch mehr Cholesterin und CEs transportiert werden. Die Aufnahmen von FC durch SR-BI sind ebenso von der Richtung des Cholesteringradienten abhängig. Der Efflux wird auch durch den PC Gehalt bestimmt. Studien haben gezeigt, dass eine Anreicherung des HDLs oder Serums mit PC zu einer Erhöhung des SR-BI-medierten Effluxes führt.^{24,25}

Die Kapazität von HDL den zellulären Cholesterinefflux zu steuern, wird ebenso von den Eigenschaften der HDL Oberflächenlipide bestimmt. Demnach ist der Cholesterinefflux, welcher durch SR-BI gesteuert wird, proportional zum PL-Gehalt des HDLs. Die Wirkung dieser PLs auf den Cholesterinefflux ist nicht nur auf deren Konzentration im HDL Partikel limitiert. Der physikalische Zustand der PLs repräsentiert eine wichtige Determinante in der Fähigkeit von HDL zelluläres Cholesterin aufzunehmen. Änderungen in der Komposition, welche zur Destabilisierung der HDL Partikeln führt, könnten dessen metabolischen Veränderungen beschleunigen, welche auch während des zellulären Lipideffluxes stattfinden.²⁶

ABCG1 kontrolliert die intrazelluläre Cholesterinhomeostase und die Expression dieses Transporters führt zu einer Steigerung des Cholesterineffluxes zu den HDL Partikeln. HDL₂ und HDL₃ sind gleich effektive Akzeptoren für ABCG1. Im Gegensatz dazu ist für den zellulären Cholesterinefflux durch ABCA1 das preß-HDL (lipid-armes ApoA-I) der geeignete Akzeptor. ABCA1 steuert einerseits den Efflux von FC und PL einiger Zellen, andererseits kommt es durch Beteiligung dieses Transporters zur Lipidierung von ApoA-I und Bildung des naszierenden HDLs. Die Anwesenheit von aktiven ABCA1 Transportern in den Plasmamembranen der Zellen bestimmt die Frequenz des Cholesterineffluxes und die Formierung von naszierenden HDL Partikeln. Der ABCA1 medierte Cholesterinefflux wird durch eine erhöhte Ungesättigtheit der PLs in der Plas-

²⁴ {Yancey 2003}

²⁵ {Rothblat 2010}

²⁶ {Kontush 2013}

membran inhibiert. Die Bindung von ApoA-I verhindert die intrazelluläre Degradierung des Transporters, wodurch deren Anwesenheit in der Plasmamembran erhöht wird. Ebenso wurde gezeigt, dass ABCA1 palmitoyliert ist. Diese post-translationale Modifikation führt zur Lokalisierung in der Plasmamembran und reguliert dessen Lipidefflux.²⁷ Studien haben gezeigt, dass durch eine „loss-of-function“ Mutation bzw. die komplette Abwesenheit des ABCA1 Gens die Krankheit namens Tangiers verursacht wird. Diese Krankheit ist durch einen extrem geringen HDL-C Spiegel, eine Akkumulation von Makrophagen im Gewebe und einen verminderten Efflux von Cholesterin und PLs gekennzeichnet, wodurch die Entwicklung von Arteriosklerose und koronaren Arterienkrankheiten prognostiziert wird.²⁸

1.2.5.3 STIMULATION DER ENDOTHELIALEN NO PRODUKTION

In den letzten Jahren konnte festgestellt werden, dass das HDL von gesunden Personen gefäßschützende Eigenschaften aufweist. HDL besitzt eine Vielzahl von Faktoren, welche die Funktionen von Endothelzellen beeinflussen. Diese positiven Effekte von HDL auf Endothelzellen inkludieren die Stimulation der Zellproliferation, Überlebensrate der Zellen, Migration und Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), wie auch die Inhibierung der Expression von Adhäsionsmolekülen.^{29,30} Eine Vielzahl von Mechanismen, denen die Effekte von HDL auf die endotheliale Reaktivität zu Grunde liegen, wurden entdeckt. Diese Prozesse inkludieren die Synthese des gefäßrelaxierenden Prostaglandins E₂ (PGE₂) und Prostaglandin I₂ (PGI₂), sowie die Aktivierung der endothelialen NO Synthase (eNOS) durch SR-BI.³¹ Endotheliale Dysfunktionen, welche durch eine verminderte Verfügbarkeit von NO (gefäßweiternde Eigenschaften) und eine verstärkte Affinität der Gefäßoberfläche für Leukozyten charakterisiert sind, werden häufig im Anfangsstadium von Arteriosklerose beobachtet.³²

Endotheliales NO spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Gefäßtonus und -Struktur. NO besitzt eine Vielzahl von gefäßschützenden Funktionen in den Blutgefäßen. Dazu zählen die anti-thrombotischen, anti-koagulativen, anti-inflammatorischen und pro-fibrinolytischen Effekte des NO. Die endotheliale NO-stimulierende Kapazität von HDL kann durch verschiedene Mechanismen erklärt werden.

Yuhanna et al zeigten, dass HDL an SR-BI am Endothel bindet, welches direkt die eNOS mediierte NO Produktion stimuliert. Die Bindung von HDL an SR-BI führt zu einer Tyrosinkinase Src

²⁷ {Rothblat 2010}

²⁸ {Besler 2012}

²⁹ {Rohrer 2004}

³⁰ {Mineo 2006}

³¹ {Nofer 2002}

³² {Assmann 2004}

gesteuerten Aktivierung von Phosphoinositid (PI) 3-Kinase, welche wiederum Akt und dadurch den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg aktiviert. Die Aktivierung von Akt stimuliert die Phosphorylierung von eNOS am Serinrest 1177, wodurch die Produktion von NO gefördert wird.

Die eNOS gesteuerte NO Produktion kann ebenfalls durch das Binden von HDL-assoziierten Lysophospholipiden an den S1P3 Rezeptor induziert werden. Dieser Rezeptor wird in den Endothelzellen exprimiert und verursacht eine HDL- und Lysophospholipid-induzierte Vasodilatation.

Terasaka et al^{33,34} entdeckten einen neuen Mechanismus, indem HDL die NO Produktion und Verfügbarkeit beeinflusst. Diese Forschungsgruppe zeigte, dass der ABCG1 mediiertes Efflux von Oxysterolen der Endothelzellen zu einer Akkumulation von 7-Ketosterolen in den Endothelzellen von ABCG1 defizienten Mäusen führte. Eine Inkubation von humanen Aortaendothelzellen mit HDL unterdrückte die 7-Ketosterol-induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffgruppen und Spaltung des aktiven eNOS Dimers. Weiters konnte festgestellt werden, dass der HDL gesteuerte Cholesterinefflux durch ABCG1 die inhibitorische Interaktion von eNOS mit Caveolin1 reduziert, wodurch die NO Produktion unterdrückt wird.

Besler et al fanden heraus, dass das HDL assoziierte Enzym Paraoxonase 1 (PON1) eine wichtige Determinante von HDL ist, um die NO Produktion zu stimulieren.³⁵

1.2.5.4 ANTI-OXIDATIVE AKTIVITÄT

Zu einem der wichtigsten anti-atherogenen Effekte von HDL zählt die Verhinderung der LDL Oxidation. Die Initiation und Progression von Arteriosklerose bzw. koronaren Arterienkrankheiten korrelieren mit der Akkumulation und Oxidation von LDL im subendothelialen Raum. Oxidiertes LDL (oxLDL) wird durch Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen aufgenommen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die oxidierte und modifizierte Form von LDL zu einer Aktivierung von endothelialen Entzündungsreaktionen führt. HDL inhibiert die Oxidation von LDL durch die Transition von Metallionen und verhindert die Bildung von Lipid-Hydroperoxiden. Diese inhibitorische Wirkung von HDL ist auf den hohen Gehalt von Antioxidantien in diesem Lipoprotein zurückzuführen. Dazu zählen die anti-oxidativen Eigenschaften von ApoA-I und die Anwesenheit von verschiedenen Enzymen wie zum Beispiel Paraoxonase (PON), plättchenaktivierender Faktor Acetyl-Hydrolase (PAF-AH), LCAT und Glutathion-Peroxidase (GPX), die sowohl die Formierung von oxLDL verhindern als auch zur Degradierung von bioaktiven Produkten des oxLDL führen.

³³ {Terasaka 2008}

³⁴ {Terasaka 2010}

³⁵ {Besler 2012}

ApoA-I, welches als Hauptapolipoprotein im HDL bezeichnet wird, hat die Fähigkeit die Lipid-Hydroperoxide von LDL zu binden und zu entfernen. Dadurch kommt es zu einer Reduktion von Peroxiden der PLs und CEs sowie zur Beseitigung von „hydroperoxyeicosatetraenoic acid (HPETE) und hydroperoxyoctadecadienoic acid (HPODE)“ vom nativen LDL. HPETE und HPODE induzieren die nicht enzymatische Oxidation von PLs in Lipoproteinen. Oxidierte PLs, welche in LDL vorkommen, können die Produktion von Zytokinen (zB MCP-1) stimulieren und leiten die Adhäsion von Monozyten an der endothelialen Oberfläche ein.

PON und PAF-AH katalysieren die Degradierung der oxidierten PLs im LDL. Mäuse mit PON1 Defizienz besitzen im Vergleich zu Wildtypmäusen eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Bildung von arteriosklerotischen Läsionen und dessen isoliertes HDL konnte die Oxidation von LDL nicht unterbinden. Eine Überexpression von humanen ApoA-I in ApoE knockout Mäusen führte zu einer Erhöhung der PAF-AH Aktivität mit gleichzeitiger Reduktion von oxidativem Stress im Plasma, Verminderung der ICAM1 und VCAM1 Expression und Verringerung der Monozytenrekretierung zur Arterienwand.^{36,37}

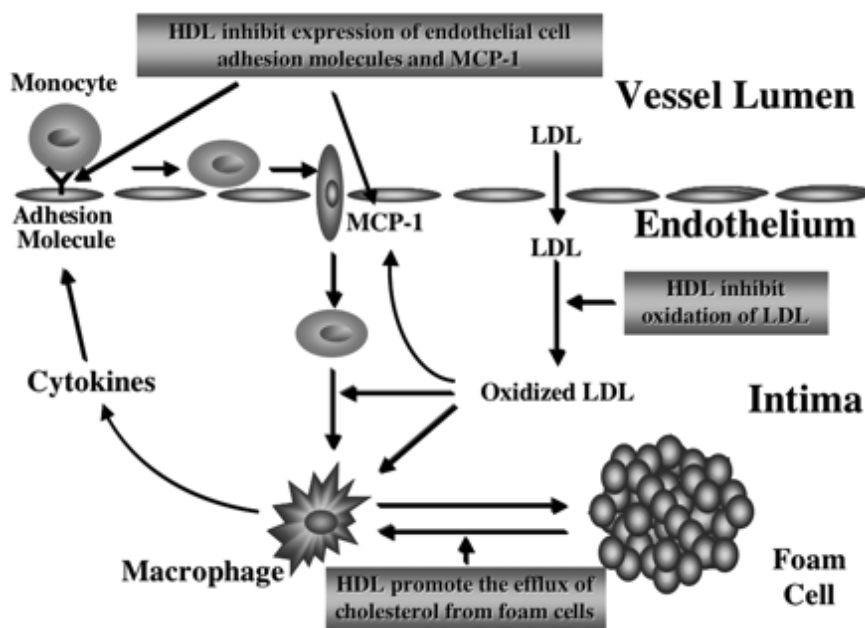


Abbildung 5: Anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften von HDL

Arteriosklerose ist eine entzündliche Krankheit, welche durch die Akkumulation und Oxidation von LDL in der Arterienintima initiiert wird. oxLDL stimuliert die Endothelzellen zur Expression von MCP-1, wodurch Monozyten in den sub-endothelialen Raum gelangen. oxLDL fördert ebenso die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen, die das oxLDL aufnehmen und dadurch zu Schaumzellen werden. Die HDL Partikel können in diesem Prozess an einigen Stellen die Bildung von Schaumzellen und in weiterer Folge die Entwicklung von Arteriosklerose verhindern. HDL verursacht den Efflux von Cholesterin aus den Schaumzellen und hat anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften. HDL inhibiert die oxidative Modifikation von LDL, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen und MCP-1. (unverändert übernommen aus Barter et al, 2004)

³⁶ {Besler 2012}

³⁷ {Assmann 2004}

1.2.5.5 ARTERIOSKLEROSE UND DIE ANTHINFLAMMATORISCHE AKTIVITÄT VON HDL

Arteriosklerose ist eine chronische entzündliche Erkrankung, welche durch eine Akkumulation von Makrophagen und T-Lymphozyten in der Arterienintima und durch eine erhöhte Plasmakonzentration von verschiedenen Entzündungsmarkern charakterisiert ist. Die Makrophagen, welche in den arteriosklerotischen Plaques akkumulieren, stammen von Monozyten aus dem Blut, die an Endothelzellen anhaften bevor sie in den subendothelialen Raum wandern. Innerhalb der Arterienwand differenzieren die Monozyten zu Makrophagen, welche eine Menge an Scavenger-Rezeptoren exprimieren, wodurch sie die Fähigkeit besitzen modifiziertes LDL zu binden und aufzunehmen. Dadurch kommt es zur Bildung der sogenannten Schaumzellen, durch welche die Arteriosklerose gekennzeichnet ist. Am Beginn dieses Prozesses kommt es zur Adhäsion von Monozyten an verletzten oder stimulierten Endothelzellen. Diese aktivierten Endothelzellen exprimieren Adhäsionsproteine wie zum Beispiel VCAM1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM1 (intercellular adhesion molecule-1) und E-Selektin. Nachdem diese Moleküle an der Oberfläche der Endothelzellen gebunden haben, kommt es zur Rekrutierung von Monozyten in den subendothelialen Raum durch Chemokine wie MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und oxLDL. E-Selektin wird als Antwort auf die Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Nuklearfaktor κ B in den Endothelzellen exprimiert. ICAM1 wird kontinuierlich an Endothelzellen und Leukozyten gebildet und interagiert mit Leukozyten-spezifischen Integrinen. VCAM1 wird ebenfalls als Antwort auf inflammatorische Zytokine von Endothelzellen produziert und hat eine Wechselwirkung mit Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten. ICAM1 und VCAM1 führen zu einer stabilen Adhäsion und anschließendem Arrest von Leukozyten auf der Oberfläche von Endothelzellen.³⁸

Die Interaktion von HDL oder ApoA-I mit den Zellen der Gefäßwand verhindert die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen initiieren. Die anti-inflammatorische Funktion von HDL wird durch verschiedene Mechanismen erklärt. HDL bindet über ApoA-I an Progranulin. Dieses wird von Makrophagen produziert. Die Bindung verhindert die Umwandlung von Progranulin in das entzündliche Granulin, welches die Expression des Tumornekrosefaktors α (TNF- α) und Interleukin 1β (IL 1β) in Makrophagen induziert. Es wurde gezeigt, dass HDL und rekonstituiertes HDL (rHDL) die zytokininduzierte Expression von VCAM1, ICAM1 und E-Selektin der Endothelzellen inhibiert. Die Unterdrückung dieser Expression ist mit einer Reduktion von mRNA Levels assoziiert. Weiters in-

³⁸ {Barter 2004}

hibiert HDL die Auswanderung von Monozyten, welche durch das oxLDL hervorgerufen wird. Diese Fähigkeit ist vorwiegend auf PON und PAF-AH zurückzuführen.³⁹

All diese Aktivitäten scheinen hauptsächlich durch ApoA-I mediiert zu sein. Aber auch PLs, wie S1P und Sphingolysophosphorylcholin, scheinen an diesen Mechanismen beteiligt zu sein.⁴⁰

1.2.5.6 WEITERE ANTI-ATHEROGENE EIGENSCHAFTEN

Sowohl isoliertes HDL von gesunden Personen als auch rHDL führen zu einer Stimulierung der endothelialen Reparaturmechanismen und inhibieren die endotheliale Zellapoptose, die Thrombozytenaggregation und die Expression von pro-thrombotischen Faktoren. Diese Vorgänge sind vermutlich auch in die anti-atherogenen Eigenschaften von HDL involviert.⁴¹

1.2.6 HDL DYSFUNKTION

Durch Entzündungsprozesse kommt es zu einer dramatischen Veränderung in der Zusammensetzung und Funktion von HDL, wodurch die anti-atherogenen Effekte zu pro-atherogenen umgewandelt werden können. HDL Partikel in der Akutphase von Entzündungen verlieren ihre Fähigkeit die Oxidation von LDL zu verhindern und die Zytokin-induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen zu inhibieren.⁴² Ebenso ist der Prozess des HDL-medierten Cholesterineffluxes deutlich reduziert.⁴³ Die Tatsache, dass HDL Partikel deren Funktionen verlieren, wurde ferner in Patienten mit koronaren Arterienkrankheiten (CAD – coronary artery disease) bewiesen. Die HDL Werte von diesen Patienten (CAD-HDL) besitzen zwar in etwa gleiche HDL Levels wie gesunde, jedoch weisen sie verminderte anti-inflammatorische Eigenschaften und reduzierte endothelschützende Effekte auf.⁴⁴ Diese HDL Partikel besitzen weiters eine Verminderung der Malondialdehyd- und PON1-Levels, wodurch das HDL pro-atherogen wird.⁴⁵ Eine Veränderung der Komposition und Funktion von HDL wurde ebenfalls im Endstadium von renalen Erkrankungen⁴⁶, Psoriasis⁴⁷ und Diabetes mellitus Typ 2⁴⁸ entdeckt.

Im Vergleich zu den proteomischen Untersuchungen des HDLs ist bis jetzt nur wenig über dessen Lipidzusammensetzung und dessen Korrelation mit entzündlichen Krankheiten bekannt.

³⁹ {Hasniza Zaman Huri 2012}

⁴⁰ {Kontush 2013}

⁴¹ {Besler 2012}

⁴² {van Lenten 2001}

⁴³ {van der Westhuyzen 2007}

⁴⁴ {Cowan 1995}

⁴⁵ {Besler 2011}

⁴⁶ {Holzer 2011}

⁴⁷ {Holzer 2012}

⁴⁸ {Sorrentino 2010}

Charakteristisch für das HDL, das aus Patienten mit CAD, chronischen Nierenerkrankungen und Psoriasis isoliert wurde, ist die Reduktion des PL- und Cholesteringehaltes. Interessanterweise zeigte Baker et al., dass die Komposition der Phosphatidylcholinspezies von HDL Einfluss auf dessen anti-inflammatorische Aktivität hat. Dies deutet darauf hin, dass auch die Lipidkomposition eine wichtige Determinante der HDL Funktionalität ist.^{49,50}

Obwohl HDL durch verschiedene Mechanismen die Entstehung von Arteriosklerose verhindern kann, kann es unter inflammatorischen Bedingungen die Bildung und das Voranschreiten von Arteriosklerose sogar fördern. Aufgrund dessen hat die Messung des HDL-Spiegels im Plasma durch die strukturelle und funktionelle Heterogenität von HDL eine geringe Aussagekraft über dessen protektive Wirksamkeit. Diese Hypothese wurde bestätigt, indem gezeigt wurde, dass eine Überexpression von ApoA-II in transgenen Mäusen zu einem hohen HDL-Spiegel führte, jedoch die Wahrscheinlichkeit für eine Entstehung von Arteriosklerose in diesen Mäusen höher ist. Ebenso wiesen PON1 knockout Mäuse auf, dass diese anfälliger für die Bildung von Arteriosklerose waren, obwohl sie keine Veränderungen in den HDL Levels zeigten.⁵¹ Deshalb ist neben der quantitativen Messung des HDLs im Plasma auch die Bestimmung der Qualität des HDLs sehr wichtig, um die anti-arteriosklerotische Kapazität von HDL abschätzen zu können.

1.3 ENDOTHELIALE LIPASE (EL)

Im Jahre 1999 wurde durch zwei unabhängige Forschungsgruppen die endotheliale Lipase (Gennomenklatur LIPG) entdeckt. Dieses Enzym ordnete man als neues Mitglied in die Triglyzerid-Lipase Familie ein, zu welcher ebenso die pankreatische Lipase, Lipoprotein-Lipase (LPL) und hepatische Lipase gehören. EL besitzt eine molekulare Homologie zu LPL (45%) und HL (40%). Das EL Protein besteht aus 482 Aminosäuren, hat ein molekulares Gewicht von circa 68 kDa und verfügt über eine konservierte katalytische Triade und Bindungsstellen für Heparin und Lipoproteinen. Die endotheliale Lipase wird hauptsächlich von Endothelzellen synthetisiert aber auch von der Leber, Lunge, Makrophagen, Schaumzellen von arteriosklerotischen Plaques, Hoden, Ovar und Plazenta. Das Enzym besitzt eine Triglyzerid-Aktivität, welche im Gegensatz zu LPL und HL von ApoCII unabhängig ist. Die wichtigste Eigenschaft ist die Aktivität der Phospholipase A1, wodurch es zu einer Abspaltung von Fettsäuren an der sn-1 von Phosphatidylcholinen kommt. Demnach besitzt EL eine hohe Phospholipase Aktivität und eine geringer Triglyzeridlipase Aktivität.^{52,53,54}

⁴⁹ {Marsche 2013}

⁵⁰ {Baker 2000}

⁵¹ {van Lenten 2001}

⁵² {Ma 2003}

EL zeigt eine hohe Präferenz für Lipoproteine und spielt eine große physiologische Rolle im HDL Metabolismus. EL hydrolysiert die PLs von HDL Partikel und produziert dadurch Lysophosphatidylcholin (LPC) und freie Fettsäuren. Die Expression von EL kann durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β hochreguliert werden. Hepatische Überexpression von EL in Mäusen durch adenoviralen Gentransfer verursachte reduzierte HDL-C und ApoA-I Levels. Ebenfalls zeigten EL knockout Mausmodelle signifikant erhöhte HDL-C Konzentrationen. Durch diese „loss-of-function“ Experimente wurde angenommen, dass EL ein wichtiger Regulator des HDL Metabolismus ist.^{55,56}

1.3.1 EL UND HDL METABOLISMUS

EL verfügt hauptsächlich über eine Phospholipase Aktivität und HDL Partikel werden bevorzugt von EL als Substrat verwendet.⁵⁷ Dadurch kommt es zur Spaltung von PLs in HDL, wodurch eine Reihe von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und ein Gemisch von LPCs produziert werden. Experimentelle Studien deuteten darauf hin, dass EL eine wichtige Determinante des HDL Plasmaspiegels ist. In C57BL/6 Mäusen wurde EL durch intravenöse Injektion eines EL Adenoviruses überexprimiert. Dieser Versuch spiegelte sich in einer 90%igen Reduktion des HDL Plasmaspiegels nach 30 Tagen der Injektion wieder.⁵⁸ Adenovirus-medierte Überexpression von EL resultierte in einer deutlichen Reduktion des HDL-C und ApoA-I im Plasma, bedingt durch eine dosisabhängige Erhöhung der katabolischen Rate von HDL assoziierten Apolipoproteinen und HDL-CEs. Diese metabolischen Effekte scheinen von der katalytischen Aktivität von EL abhängig zu sein. „Loss-of-function“ Studien in Mäusen mit spezifischen EL knockout Mäusen oder eine Antikörper-medierte Inhibierung von EL zeigten eine Steigerung der Plasma Levels von PLs, ApoA-I und HDL-C durch eine verminderte katabolische Rate.⁵⁹

Maugeais et al dokumentierten, dass durch eine Überexpression von EL eine Veränderung der HDL Struktur festgestellt werden konnte. EL-modifiziertes HDL war kleiner und hatte einen geringeren Gehalt an PLs, sowie freiem und veresterten Cholesterin. Die Menge an großen HDL Partikeln, welche im Kontrollplasma von humanen ApoA-I transgenen Mäusen gefunden wurde, war im Plasma von EL-exprimierenden Mäusen drastisch vermindert, wohingegen die kleinen HDL Subfraktionen durch die EL Expression erhöht waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Überexpression von EL in einer Reduktion von PLs und Cholesterin resultiert,

⁵³ {Huang 2010}

⁵⁴ {Annema 2011}

⁵⁵ {Broedl 2004}

⁵⁶ {Maugeais 2003}

⁵⁷ {Hirata 1999}

⁵⁸ {Jaye 1999}

⁵⁹ {Annema 2011}

wodurch kleinere HDL Partikel entstehen. Weiters wurde festgestellt, dass die Expression von EL durch eine Hydrolyse von PLs im naszierenden HDL gekennzeichnet ist. Dies hat eine verminderte Reifung des lipid-armen ApoA-I zum reifen HDL Partikel zur Folge. Durch die Überexpression von EL kam es außerdem zu einer erhöhten Aufnahme von HDL Apolipoproteinen durch die Leber.⁶⁰

Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass EL weitere Mechanismen bzw. Faktoren im HDL Metabolismus reguliert. EL defiziente Mäuse zeigten erhöhte hepatische LCAT mRNA und erhöhte LCAT Proteine im Plasma. Trotzdem hatten diese Mäuse eine um circa 50% verminderte Veresterungsrate von Cholesterin durch LCAT. Durch diese Erkenntnis kann angenommen werden, dass EL eine Rolle in der Veränderung der LCAT Aktivität spielt.⁶¹

Die HDL-C Konzentration ist vererblich und somit von Mensch zu Mensch verschieden. Diese Variabilität könnte auf einen genetischen Polymorphismus von EL zurückzuführen sein. Einige humane Genomstudien haben festgestellt, dass eine allgemeine Variation in der Nähe des EL Genlocus (LIPG) mit der HDL-C Konzentration in Menschen assoziiert ist. Es wurden unterschiedliche Aminosäuren Substitutionen im oder in der Promotorregion des LIPG Gens entdeckt, wodurch eine Erhöhung des HDL-C ersichtlich war. Zusammenfassend spielt EL eine große Rolle im HDL-C Metabolismus und in weitere Folge in der Entwicklung von Arteriosklerose.⁶²

1.3.2 AUSWIRKUNGEN VON EL AUF RCT

Es gibt nur wenige Studien, die den Effekt von EL auf den HDL-medierten Cholesterinefflux untersuchten und keiner konnte bis jetzt aussagekräftige Ergebnisse erzielen. Eine Reduktion der EL Expression *in vitro* in Makrophagen führte zu einer Abnahme des Effluxes auf ApoA-I (mediert durch ABCA1), wohingegen eine EL-Überexpression den gegenteiligen Effekt erzeugte. Dabei wurde festgestellt, dass die katalytischen und nicht katalytischen (Brücken-) Funktionen von EL für diesen Prozess verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu, fand eine Forschungsgruppe keine Korrelation zwischen EL und ABCA1 abhängigen Cholesterinefflux. Eine andere Studie wiederum zeigte einen um 63% gesteigerten Cholesterinefflux durch ABCA1 in EL überexprimierten Mäusen.

In Bezug auf den SR-BI medierten Cholesterinefflux wurde festgestellt, dass EL-modifiziertes HDL eine geringere Kapazität für diesen Mechanismus aufweist.⁶³ Während eine verminderte selektive Aufnahme von CE durch SR-BI unter der Verwendung des HDL₃ von EL knockout

⁶⁰ {Maugeais 2003}

⁶¹ {Ma 2003}

⁶² {Huang 2010}

⁶³ {Gauster 2004}

Mäusen beobachtet wurde⁶⁴, wurde die SR-BI medierte selektive Absorption mittels HDL von EL-überexprimierenden Mäusen *in vitro* und *in vivo* verbessert^{65,66}. Dies ist ebenso auf die katalytische Aktivität und die nicht katalytische Funktion von EL zurückzuführen.

Trotz dieser Erkenntnisse konnte keine Verbindung zwischen dem Hauptweg der Cholesterinausscheidung des Körpers, der biliären Sterolsekretion und EL in EL-überexprimierten Mäusen detektiert werden. EL Überexpression hatte keinen Effekt auf die Masse des fäkalen Outputs von neutralen Sterolen und Gallensäure.⁶⁷

1.3.3 BEEINFLUSSUNG VON EL AUF ENTZÜNDUNGEN

Es ist bekannt, dass der Prozess einer Entzündung eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Arteriosklerose spielt. Aufgrund dieser Erkenntnis haben verschiedenen Forschungsgruppen den Effekt von inflammatorischen Zytokinen auf die EL Expression in Endothelzellen *in vitro* untersucht.

Hirata et al⁶⁸ bewiesen, dass im Zusammenhang mit der Ätiologie von Gefäßerkrankungen die EL mRNA Levels durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β hochreguliert war. Jin et al⁶⁹ bestätigte diese Ergebnisse und erweiterte diese, indem er feststellte, dass die Sekretion und Aktivität des EL Proteins ebenso durch TNF- α und IL-1 β in Endothelzellen hochreguliert war. Dieser Effekt war sowohl dosis- als auch zeitabhängig.

In vitro Experimente haben darauf hingewiesen, dass durch die Wirkung von EL die Monozytenadhäsion am Gefäßendothel in Folge einer Interaktion mit Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) gefördert wird. Eine sehr starke Assoziation wurde zwischen der Plasmakonzentration von proinflammatorischen Zytokinen wie C-reaktives Protein (CRP) und IL-6 und der postheparinen EL Plasmakonzentration in übergewichtigen Männern mit bewegungsarmer Lebensweise berichtet.

Badellino et al⁷⁰ fanden einige inflammatorische Marker, wie zum Beispiel löslicher TNF Rezeptor II, lösliches ICAM1, Leptin, CRP und IL-6, welche mit der EL Plasmakonzentration korrelierten. Durch eine experimentell verursachte Endotoxämie stieg der EL Plasmaspiegel signifikant an. Dadurch konnte bewiesen werden, dass EL in entzündlichen Prozessen im Menschen hochreguliert ist.

⁶⁴ {Brown 2010}

⁶⁵ {Nijstad 2009}

⁶⁶ {Wiersma 2009}

⁶⁷ {Annema 2011}

⁶⁸ {Hirata 2000}

⁶⁹ {Jin 2003}

⁷⁰ {Badellino 2008}

Es ist bereits bekannt, dass eine systemische Entzündung im Anfangsstadium mit unterschiedlichen Krankheiten wie Fettleibigkeit, Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie, Hypertonie und koronaren Herzerkrankungen assoziiert ist. Erhöhte EL Plasmakonzentrationen wurden in Probanden bei metabolischem Syndrom und Fettleibigkeit registriert. Shiu et al⁷¹ konnte eine Verbindung zwischen einer erhöhten EL Konzentration im Serum und Diabetes mellitus Typ II bei Patienten feststellen. Durch Insulintherapie konnten diese erhöhten EL Konzentrationen im Serum wieder gesenkt werden.

Andererseits konnte ebenso eine Korrelation zwischen der Expression von Zytokinen und EL identifiziert werden. Qiu et al⁷² zeigten durch eine Inhibierung der EL Expression mit THP-1 Makrophagen eine reduzierte Induktion von pro-inflammatorischen Genen, Wachstumsfaktoren, anti-apoptotischen Genen und eine veränderte Lipidkomposition mit reduziertem Cholesterin, TGs und LPCs. Die Expression von EL mRNA steht im Zusammenhang mit der CD68 mRNA in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Läsionen, welche bei Differenzierung von Monozyten in Makrophagen deutlich steigt.

Die HDL-medierte Repression der Leukozytenadhäsion an Endothelzellen wird durch eine Inhibierung der Lipaseaktivität deutlich reduziert. Ahmed et al⁷³ zeigten, dass EL die Expression von VCAM1 limitiert. Eine Überexpression von EL führte zu einer verminderten TNF- α induzierten Expression und Promotoraktivität von VCAM-1. Dieses Ergebnis ist von der HDL Konzentration und der intakten EL Aktivität abhängig.

All diese Resultate weisen darauf hin, dass EL eine wichtige Komponente bei der Regulation von entzündlichen Prozessen darstellt und dessen Rolle in der Modellierung des Lipoprotein Metabolismus bei Entzündungen und in weiterer Folge bei der Entstehung von Arteriosklerose von Bedeutung ist.⁷⁴

1.3.4 EL UND ARTERIOSKLEROSE

Die Rolle von EL in der Entstehung und Entwicklung von Arteriosklerose ist umstritten. Einer Studie zu Folge führt eine gezielte genetische Inaktivierung von EL (EL-knockout) in ApoE knockout Mäusen zu einer Reduktion (70%) von arteriosklerotischen Läsionen.⁷⁵ Durch das Fehlen von EL kam es zu einer Erhöhung des anti-atherogenen HDLs, sowie des pro-atherogenen LDLs und LDL Cholesterins. Die Autoren erläuterten diese Erniedrigung in arteriosklerotischen Läsionen als ein Resultat von reduzierter Monozytenadhäsion an der Gefäßwand durch HSPG

⁷¹ {Shiu 2008}

⁷² {Qiu 2007}

⁷³ {Ahmed 2006}

⁷⁴ {Huang 2010}

⁷⁵ {Ishida 2004}

Moleküle. Im Gegensatz dazu detektierte eine andere Forschungsgruppe keinen Unterschied zwischen der Größe von arteriosklerotischen Läsionen und dem Gehalt an Makrophagen in den Plaques von EL-apoE-KO sowie EL-LDLR-KO Mäusen.

Arteriosklerose ist als eine entzündliche Erkrankung bekannt und ein Zusammenhang zwischen EL und Arteriosklerose wurde angedeutet. Die Expression von EL war als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine in der Zellkultur mit Endothelzellen signifikant hochreguliert. EL war ebenso bei Menschen während der Akutphase von Entzündungen erhöht. Es wurde gezeigt, dass EL die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Gefäßwand erhöht. Dahingegen stellte eine andere Studie fest, dass EL die TNF- α induzierte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen vermindert. Dies wurde durch die Entstehung von HDL PLs als Ligand für den PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) begründet. Aufgrund dieser Resultate kann die Schlussfolgerung formuliert werden, dass die EL Expression durch inflammatorische Stimulierungen hochreguliert wird, jedoch ist die Rolle von EL als pro- oder antiinflammatorisches Molekül umstritten.

Die Assoziation von EL Levels oder Varianten des EL Gens und der Entstehung von Arteriosklerose wurde ebenso bei Menschen untersucht. Eine positive Korrelation zwischen den Scores für die Klassifikation von koronaren Arterienerkrankungen und der Masse von EL in prä- und postheparinem Plasma wurde gefunden. In einer zweijährigen Studie mit Patienten im Endstadium von renalen Erkrankungen zeigten diejenigen Patienten, welche bereits im Vorfeld an kardiovaskulären Events erkrankten, höhere EL Levels im Serum gegenüber den Patienten ohne vorangegangene kardiovaskuläre Erkrankungen. Zwei unterschiedliche Publikationen stellten fest, dass die Thr111Ile Variation von EL mit einem verminderten Risiko von akuten Myokardinfarkten und koronaren Arterienerkrankungen in Verbindung steht. Jedoch konnte eine andere Studie den Einfluss der Thr111Ile Variation auf das kardiovaskuläre Risiko nicht bestätigen. Neuere Ergebnisse von zwei unabhängigen Forschungsgruppen zeigten, dass von fünf verschiedenen „single nucleotide“ Polymorphismen nur Thr111Ile mit einer Erhöhung des HDL-C, ApoA-I, der HDL Konzentration und einer Vergrößerung der HDL Partikel assoziiert war. Andererseits konnte nicht bewiesen werden, dass einer von diesen EL Polymorphismen ein Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose ist.⁷⁶ Durch diese widersprüchlichen Ergebnisse besteht Zweifel über den Zusammenhang zwischen den HDL Levels an sich und dem Schutz gegenüber der Entstehung von Arteriosklerose. Es ist ebenso noch nicht geklärt, welche Funktion EL in der Entwicklung von Arteriosklerose spielt und ob das Enzym pro- oder anti-arteriosklerotische Eigenschaften besitzt.

⁷⁶ {Annema 2011}

2 ZIELSETZUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der bedeutendsten Hauptursachen für Mortalität weltweit. In einer Vielzahl von Studien wurde festgestellt, dass HDL die Gefäßwand vor der Entstehung von Arteriosklerose schützt. Viele Mechanismen wurden für diese positiven Effekte von HDL entdeckt. Zu den anti-atherogenen Faktoren von HDL zählen die Entfernung von überschüssigem Cholesterin und dessen Transport von der Peripherie zurück zur Leber, die positive Regulation der NO Produktion, die Unterdrückung der LDL Oxidation (anti-oxidative Aktivität) und die Inhibierung der Expression von Adhäsionsmolekülen (anti-inflammatorische Aktivität). Eine Reduktion der HDL Plasmakonzentration ist einer der wichtigsten Faktoren für die Entstehung von koronaren Arterienerkrankungen (coronary artery disease – CAD).

Die endotheliale Lipase (EL) ist eine Phospholipase, welche zur Gruppe der Triglyzerid-Lipasen gehört. Sie wird hauptsächlich von Endothelzellen der Gefäße synthetisiert. Es ist bekannt, dass die EL im Lipoprotein-Metabolismus involviert ist, vor allem im HDL Metabolismus. Diese Lipase reguliert den HDL Plasmaspiegel negativ, verkleinert die HDL Partikel und moduliert die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von HDL. EL Plasmakonzentration sind unter entzündlichen Konditionen wie Diabetes mellitus Typ II, Fettleibigkeit oder Arteriosklerose erhöht.

Basierend auf diesen Erkenntnissen, soll in dieser Masterarbeit die Korrelation zwischen der EL Plasmakonzentration und der HDL Funktionalität und Struktur in Patienten mit stabilen koronaren Arterienerkrankungen (sCAD) untersucht werden. Dafür wurde die anti-inflammatorische und anti-oxidative Kapazität von HDL, sowie die Zusammensetzung des HDLs in den sCAD Patienten überprüft und mit der EL Plasmakonzentration korreliert. Weiters erfolgte eine Modifikation des HDL durch EL *in vitro*. Hierbei sollte die Lipid- und Proteinkomposition sowie die anti-inflammatorische Aktivität von EL-HDL analysiert werden.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 VERWENDETE ZELLELINIEN

Tabelle 2: Die für verschiedene Experimente verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
Ea.hy 926	„Human endothelial hybrid“ – Zellen
HepG2	„Human Liver Hepatocellular Carcinoma“ – Zellen

3.2 VERWENDETE VIREN

Tabelle 3: Die für die Modifizierung des HDLs verwendeten Adenoviren

Bezeichnung	Beschreibung
EL-Adenovirus	Adenovirus zur Expression der humanen endothelialen Lipase in kultivierten Zellen (HepG2). Hergestellt am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz nach der Methode von Strauss et al., 2002
LacZ-Adenovirus	Adenovirus zur Expression der beta-Galaktosidase in kultivierten Zellen (HepG2). Hergestellt am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz nach der Methode von Strauss et al., 2002

3.3 ZELLKULTUR

Die verwendeten Zelllinien wurden am Institut für Molekularbiologie und Biochemie an der Medizinischen Universität Graz in Kryotubes mit je circa einer Million Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Kultivierung der HepG2 Zellen erfolgte mit DMEM (Life Technologies, Wien, Österreich), 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Wien, Österreich) und Antibiotikum-Antimykotikum (Life Technologies, Wien, Österreich). Die Ea.hy 926 Zelllinie wurde mit DMEM (Life Technologies, Wien, Österreich), 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Life Technologies, Wien, Österreich), Antibiotikum-Antimykotikum (Life Technologies, Wien, Österreich), L-Glutamin (Life Technologies, Wien, Österreich), und Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) (Life Technologies, Wien, Österreich), kultiviert.

3.3.1 SPLITTEN DER ZELLEN

Je nach Art, Anzahl und Zustand der Zellen erreicht das Wachstum nach einiger Zeit eine Plateauphase, wodurch die Zellteilungsrate und –Vitalität reduziert wird. Um eine rasche Vervielfältigung sowie vitale Zellen zu erhalten, mussten diese regelmäßig unter dem Mikroskop auf deren Vitalität und Dichte überprüft werden und in regelmäßigen Abständen gesplittet werden.

Beim Splitten von adhärent wachsenden Zellen werden diese enzymatisch vom Boden der Zellkultivierungsflaschen abgelöst. Die Zellsuspension wird anschließend verdünnt und mit einer geringeren Anzahl von Zellen in eine neue Kultivierungsflasche übertragen.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit DPBS (Life Technologies, Wien, Österreich) gewaschen, um das DMEM mit 10% FCS vollständig zu entfernen. Anschließend wurde Trypsin-EDTA (0,05% für HepG2 Zellen und 0,025% für Ea.hy 926 Zellen) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) in DPBS auf den Zellrasen gegeben und die Kultivierungsflasche bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Kultivierungsflasche wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins durch Zugabe von DMEM gestoppt. Daraufhin wurde die Zellsuspension bei 1100g für drei Minuten zentrifugiert und das daraus entstandene Zellpellet in frischem vorgewärmten DMEM resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension konnte anschließend in eine neue Zellkultivierungsflasche überführt werden. Damit die Zellen sich gleichmäßig auf der Flaschenoberfläche verteilen, wurde diese mehrmals geschwenkt.

3.3.2 INFEKTION DER ZELLEN MIT REKOMBINANTEN ADENOVIREN

Bevor die HepG2 Zellen mit dem LacZ- und EL- Adenovirus infiziert wurden, wurden diese am Vortag (24 Stunden vorher) ausplattiert. Das Ausplattieren erfolgte in 60mm dishes und es wurden zwei Millionen Zellen pro dish verwendet. Vor der Infektion musste der Zellrasen mit Infektionsmedium (DMEM ohne FCS) vorsichtig gewaschen werden. Nach Entfernung dieses Mediums wurde frisches, vorgewärmtes (37°C) Infektionsmedium gemeinsam mit den Adenoviren in entsprechender Konzentration (MOI 200) auf die Zellen gegeben. Damit eine gleichmäßige und effiziente Aufnahme der Viren gewährleistet wird, wurden die 60mm dishes alle 20 Minuten leicht geschwenkt. Nach einer Infektionszeit von zwei Stunden bei 37°C wurde das Infektionsmedium, welches den Virus beinhaltet, abgesaugt und frisches DMEM mit 10% FCS und Antibiotikum-Antimykotikum zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.3.3 MODIFIKATION VON HDL AUF DEN ZELLEN

Das isolierte HDL wurde auf EL und LacZ- überexprimierenden HepG2 Zellen modifiziert. Dazu wurden pro 60mm dish zwei Millionen Zellen ausplattiert und nach 24 Stunden mit den jeweiligen Adenoviren infiziert. Am Tag nach der Infektion wurden die infizierten Zellen zunächst mit DMEM ohne FCS gewaschen. Anschließend wurden 2mg des isolierten HDLs gemeinsam mit DMEM + 10% FCS + Antibiotikum-Antimykotikum mit einem Gesamtvolumen von 1,8ml auf die Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem HDL erfolgte für 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank, wobei die Platten ca. alle 30 Minuten geschwenkt wurden, um eine gleichmäßige Verteilung des HDLs zu gewährleisten. Nach der 16-stündigen Modifikation wurde das Medium mit den modifizierten HDL Partikeln von den Platten gesammelt und kurz abzentrifugiert, um etwaige Zellbestandteile zu entfernen. Direkt im Anschluss wurde das modifizierte HDL mittels Ultrazentrifugation aus dem Inkubationsmedium reisoliert.

3.4 ISOLIERUNG VON HDL MITTELS ULTRAZENTRIFUGATION

Die Isolation des HDLs erfolgte aus dem Plasma, Medium sowie aus dem Serum von sCAD Patienten.

3.4.1 ISOLIERUNG AUS PLASMA UND MEDIUM

Für diese Methode wurde das Plasma bzw. Medium zunächst mit einer definierten Menge an Kaliumbromid (KBr) (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) vermischt. Durch die Beimengung von KBr zum Plasma oder Medium wird eine exakte Dichte von 1,24g/ml erreicht. Die zu verwendende Menge an KBr errechnet sich durch folgende Formel:

$$g(\text{KBr}) = \frac{\text{Volumen in ml (Plasma/Medium)} \times 0,2324}{0,61624}$$

Nach dem vollständigen Auflösen des KBr wurde die Korrektheit der Dichte von 1,24g/ml noch einmal überprüft. Anschließend konnten das bereits vorgelegte DPBS in den Zentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) mit jeweils 4ml dieses Plasmas/Mediums unterschichtet werden. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann verschweißt und bei 60.000rpm (330.000g) und 15°C für 5 Stunden in der Ultrazentrifuge (Beckman L-80 Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Danach konnte das HDL mit Hilfe einer Nadel aus den Röhrchen gewonnen werden.

Nach der Isolierung des HDLs erfolgte die Aufkonzentrierung mittels VivaSpin Turbo15 Tubes (Sartorius Stedim Austria GmbH) mit einem Cutoff von 10.000MW laut Arbeitsanleitung. Um das hinzugegebene KBr für die anschließenden Experimente zu entfernen, wurde das isolierte und aufkonzentrierte HDL entsalzt. Dieser Schritt erfolgte mit PD-10 Säulen (GE Healthcare GmbH, München, Deutschland) laut Arbeitsanleitung. Das isolierte HDL wurde dann direkt für weiterer Experimente verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.4.2 ISOLIERUNG VON HDL AUS SERUM VON sCAD PATIENTEN

Da die Menge an Serum von sCAD Patienten limitiert war, wurde die Isolierung des HDLs für jeden Patienten nicht mit 4ml Serum pro Zentrifugenröhrchen sondern mit 1ml durchgeführt. Somit wurden 1ml Serum mit der entsprechenden Menge an KBr vermischt, um die Dichte von 1,24g/ml zu erreichen. Nach der Unterschichtung des DPBS mit diesem Gemisch erfolgte die Ultrazentrifugation wie in Punkt 3.4.1 beschrieben. Da hier die HDL Bande nicht ersichtlich war, musste ein Kontroll-HDL bei der Zentrifugation mitgeführt werden. Durch den Vergleich mit dem Kontrollröhrchen konnte nach der Ultrazentrifugation das HDL mit Hilfe einer Nadel aspiriert werden.

Aufgrund dessen, dass die Menge des isolierten HDLs bei der Isolierung von HDL von Patientenproben gering war, erfolgte zuerst die Entsalzung und dann das Aufkonzentrieren. Um das KBr zu entfernen, wurde bei der Entsalzung mit den PD-10 Säulen zuerst das isolierte HDL aufgetragen und dann mit der entsprechenden Menge an DPBS auf 2,5ml aufgefüllt. Danach erfolgte die Eluierung mit 3,5ml DPBS. Nach der Entsalzung wurde das isolierte HDL mittels VivaSpin4 Tubes (Sartorius Stedim Austria GmbH) laut Arbeitsanleitung auf circa 400µl aufkonzentriert und direkt für anschließende Experimente verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.5 PATIENTEN

Insgesamt wurden circa 80 Patientenproben mit stabiler koronarer Arterienerkrankung für die Analyse der anti-inflammatorischen, anti-oxidativen und der Lipid- und Proteinkomposition des isolierten HDLs aus diesen Proben herangezogen. All diese Patienten werden medikamentös behandelt. Im Krankenhaus der barmherzigen Schwestern der medizinischen Fakultät in Zagreb erfolgte die Gewinnung des Serums von diesen Patienten. Die Bestimmung der EL Plasmakonzentration wurde am Institut für Molekularbiologie und Biochemie an der Medizinischen Universität Graz mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Das Serum wurde dann für die Isolierung des HDLs am Institut für Molekularbiologie und Biochemie an der Medizinischen Universität Graz bei -20°C gelagert.

3.6 ANTI-INFLAMMATORISCHER ASSAY

Für die Bestimmung der anti-inflammatorischen Kapazität des HDLs von sCAD Patienten wurde ein Assay entwickelt und optimiert.

Zunächst wurden Ea.hy 926 Zellen in 12-well Platten mit einer Zellzahl von 120.000 Zellen pro well ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem isolierten HDL. Hierbei wurden die Zellen zuerst einmal mit vorgewärmten (37°C) DPBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit der entsprechenden Konzentration (100µg/ml) des HDLs zusammen mit DMEM ohne 10% FCS mit einem Gesamtvolumen von 500µl für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei der Kontrolle wurde in diesem Schritt nur das Medium (DMEM + 10% FCS + L-Glutamin) gewechselt. Nach der Inkubation erfolgte die Behandlung der Zellen mit der geeigneten Konzentration von TNF-α (0,12ng/ml) (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich), um die ICAM1 Expression zu induzieren. Zunächst wurden die Zellen auch hier einmal mit vorgewärmten (37°C) DPBS gewaschen und danach mit TNF-α gemeinsam mit DMEM ohne 10% FCS mit einem Gesamtvolumen von 500µl für fünf Stunden bei 37°C inkubiert. Auch die Kontrolle wurde mit demselben Medium behandelt. Nach der Inkubation von fünf Stunden mit TNF-α erfolgte die Lysierung der Zellen mittels RNA Lysispuffer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), um die RNA zu gewinnen. Nach der RNA Isolierung mittels RNA Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) laut Arbeitsanleitung erfolgte die Bestimmung der RNA Konzentration mit Hilfe des NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich). Danach wurde die RNA mit einem High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Applied Biosystems, USA) laut Arbeitsanleitung und mittels PCR in cDNA konvertiert. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet: 1) Temperatur: 25°C, 10 Minuten 2) Temperatur: 37°C, 2 Stunden 3) Temperatur 85°C 2 Minuten und 30 Sekunden 4) Hold bei 4°C. Für die Bestimmung der ICAM1 Expression wurde mit der zuvor gewonnenen cDNA eine real-time PCR durchgeführt. Hierfür wurde die cDNA zunächst 1:20 mit Ampuva Wasser verdünnt und ein Mastermix mit 5µl GoTaq® qPCR Mastermix (Promega, USA) plus 1µl Primer für HS_ICAM1 (QIAGEN, Niederlande), als zu bestimmendes Gen, oder HS_B2M (QIAGEN, Niederlande), als „housekeeping“ Gen bzw. Referenzgen, pro Probe hergestellt. Anschließend wurden 6µl Mastermix und 4µl verdünnte cDNA im Doppelansatz in eine 96-well Platte pipettiert, bei 1500g für zwei Minuten abzentrifugiert und die ICAM1 Expression mittels real-time PCR am Lightcycler (Cobas, LightCycler 480) bestimmt.

Die gemessenen ICAM1 mRNA Levels wurden nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode mit Hilfe einer Software kalkuliert. Die errechneten Werte wurden anschließend auf die Kontrolle normiert, wobei diese 100% der ICAM1 Expression widerspiegelt. Besitzt eine Probe eine ICAM1 Expression von

zum Beispiel 30%, so kann eine anti-inflammatorische Aktivität von 70% detektiert werden. Die Bestimmung der anti-inflammatorischen Kapazität wurde mit 57 Patientenproben durchgeführt.

3.7 ANTI-OXIDATIVER ASSAY

Für die Ermittlung der anti-oxidativen Aktivität wurden circa 80 Patientenproben eingesetzt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass eine durch 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH) induzierte Oxidation von Dihydrorhodamin (DHR) zu Rhodamin mittels Fluoreszenzmessung detektiert wird. Diese Oxidation kann jedoch von HDL gehemmt werden, wodurch die anti-oxidative Kapazität ermittelt werden kann.

Dafür wurde zuerst ein Iron-free HEPES Puffer hergestellt, wobei 20mM HEPES (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) und 150mM NaCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt wurde. Danach erfolgte eine Zugabe von 10g/L Chelex-100 (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) und eine einstündige Sterilfiltration. Für die Fertigstellung des Reaktionspuffers wurden noch 10µM DHR (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) aus einen 50mM Stock in DMSO und 1mM AAPH hinzugefügt.

Die Reaktion erfolgte in einer 96-well Platte, wobei zuerst 7,5µg Probe (Patienten-HDL) und 95µl des zuvor hergestellten Reaktionspuffer pipettiert wurden. Die Messung der Fluoreszenz fand bei 485/538nm Anregung/Emission alle fünf Minuten über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37°C statt.

3.8 ARYLESTERASE AKTIVITÄT ASSAY

Diese Methode beruht auf der photometrischen Messung der Aktivität von HDL, Phenylacetat in Phenol umzuwandeln. Auch diese Bestimmung wurde mit circa 80 Patientenproben durchgeführt.

Der dafür verwendete Reaktionspuffer besteht aus 100mM TRIS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 2mM CaCl₂ (Merck GesmbH, Wien, Österreich) und 1mM Phenylacetat (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich) bei einem pH-Wert von 8. Zunächst wurde 1µg HDL und 200µl des Reaktionspuffers in eine 96-well Platte pipettiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 270nm alle 15 Sekunden für fünf Minuten. Nach der photometrischen Messung folgte eine Kalkulierung der enzymatischen Aktivität nach dem Beer-Lambert Gesetz mit einem molekularen Extinktionskoeffizienten von 1310 L* mol^{-1} * cm^{-1} für Phenylacetat.

3.9 MESSUNG DER LIPID- UND PROTEINKOMPOSITION

Die Messung der Lipid- und Proteinkomposition wurde am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Dafür wurden circa 80 Patientenproben und eine HDL Konzentration von 150µg eingesetzt. Die Bestimmung der HDL Bestandteile beruhte auf dem Prinzip der Nephelometrie.

3.10 NICHT DENATURIERENDE POLYACRYLAMID-GRADIENTENGELELEKTROPHORESE

Für die Elektrophorese wurden sowohl einige Patientenproben als auch modifiziertes EL- und LacZ-HDL analysiert.

Diese wurde unter der Verwendung eines 4-20%igem Polyacrylamid-Gradientengels (NuSep, Wasserburg, Deutschland) und eines selbsthergestellten Laufpuffers (10,9g/L Tris, 4,95g/L Bor-säure, 1,12g/L EDTA) bei 4°C durchgeführt. Zu Beginn wurden 10µg des isolierten HDLs mit der entsprechenden Menge an Native Page 4x Samplepuffer (Life Technologies GmbH, Wien, Österreich) vermischt. Anschließend erfolgte nach einem 30-minütigem Vorlauf der Elektrophorese bei 125V, die Beladung des 4-20%igen Gels mit den HDL Proben und einem geeigneten Proteinstandard. Danach wurde die Elektrophorese bei 125V für 5,5 Stunden bei 4°C und unter der Verwendung eines Eiswasserbades durchgeführt. Nach 5,5 Stunden wurden die Gele in 5,5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat für 30 Minuten fixiert und anschließend mit Coomassie (200mg Coomassie + 90ml Methanol + 100ml Aqua dest + 20ml Eisessig) für mindestens eine Stunde gefärbt. Für die Entfärbung wurde eine Entfärbelösung aus 200ml Methanol, 100ml Eisessig und 700ml Aqua dest verwendet. Für die Bestimmung der Größe der HDL Partikel wurde ein Proteinstandard für Native Gele „Native Mark Unstained Protein Standard“ (Life Technologies GmbH, Wien, Österreich) verwendet.

3.11 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE – WESTERN BLOT

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit dem modifizierten EL- und LacZ-HDL zur Detektion der Proteine ApoA-I, ApoM und PON1 durchgeführt.

Die für diese Elektrophorese verwendeten Gele wurden selbstständig am Institut für Molekularbiologie und Biochemie hergestellt.

Tabelle 4: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamid-Trenngels

Herstellung eines 12%igen Polyacrylamid-Trenngels	
Acrylamid:Bis	3480µl
1,5M Tris	2170µl
Aqua dest	2950µl
10% SDS	86µl
Temed	4,36µl
10% Ammoniumpersulfat	76µl

Tabelle 5: Zusammensetzung eines 6,4%igen Polyacrylamid-Sammelgels

Herstellung eines 6,4%igen Polyacrylamid-Sammelgels	
Acrylamid:Bis	326µl
0,5M Tris	500µl
Glycerin	1650µl
10% SDS	21,5µl
Temed	1,25µl
10% Ammoniumpersulfat	19µl
Bromphenolblau	5µl

Nach der Herstellung der entsprechenden Gele wurden zunächst 10µg Protein des modifizierten HDLs mit der entsprechenden Menge an 6x SDS Samplepuffer (20% beta-Mercaptoethanol) vermischt und bei 95°C für 10 Minuten erhitzt. Währenddessen wurden die Gele in die Laufkammern (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien, Österreich) eingespannt und mit dem am Tag davor hergestellten Laufpuffer (30,3g/L Tris, 150,1g/L Glycerin, 10,1g/L SDS) befüllt. Nach dem Aufkochen der Proben wurden die Gele mit einem entsprechenden Proteinstandard (PegGOLD Protein Marker IV, 170kDa, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und den aufgekochten Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte zuerst bei 200V für 10-15 Minuten und dann bei 175V für circa 30-45 Minuten. Anschließend fand der Transfer der Proteine auf eine entsprechende Membran statt. Dafür wurden die Proteine aus dem Gel unter der Verwendung einer Blottingapparatur (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien, Österreich) und eines Blottingpuffers (12,11g/L Tris, 30g/L Glycin, 1g/L EDTA und 1g/L Azid) auf eine Roti® PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45µm (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) transferiert. Der Transfer wurde bei 120mA für ein Gel und für 90 Minuten in einem Eiswasserbad durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die Membranen in 10% Milch für eine Stunde bei

Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem primären Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 6) in 10% Milch über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Membranen alle 10 Minuten für eine Gesamtdauer von einer Stunde mit einem Waschpuffer (10g/L Tween 20, 180g/L NaCl, 200ml/L 1M TRIS HCl pH 7,4) gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 7) in 10% Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membranen mit dem Waschpuffer für eine Stunde erfolgte eine Inkubation mit einem geeigneten Substrat (entweder SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat, Thermo Scientific, Rockford, USA oder Chemiluminescent HRP Substrat, Millipore Corporation, Billerico, USA) und anschließender Detektion der Proteinbanden mit Hilfe des ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien Österreich). Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm „Image J“.

Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung

Protein	Firma	Verdünnung
ApoA-I	abcam – ab57471 Cambridge, UK	1:1000
PON1	abcam – ab24261 Cambridge, UK	1:1000
ApoM	Novus biologicals nb100-65491	1:1000

Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung

Beschreibung	Firma	Verdünnung
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark	1:5000
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark	1:2000

3.12 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION UND LIPIDKOMPOSITION

Um das modifizierte HDL in Bezug auf dessen Protein- und Lipidkomposition zu charakterisieren, wurde nach der Reisolierung des HDLs aus dem Medium die Proteinkonzentration mit dem NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) bei einer Absorption von 280nm bestimmt. Zusätzlich wurde der Triglyzerid-, Totalcholesterin- und Phospholipidgehalt durch pho-

tometrische Kits (Diasys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland) laut Arbeitsanleitung bestimmt.

3.13 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Der Pearson's Korrelationstest wurde sowohl für den Vergleich der anti-oxidativen und anti-inflammatorischen als auch für den Vergleich der Lipid- und Proteinkomposition mit der EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten verwendet. Die Auswertung der Austestung der ICAM1 Expressionen mit unterschiedlichen HDL und TNF- α Konzentrationen, der HDL Zusammensetzung, dem ApoA-I-, PON1 und ApoM-Gehalt und dem Vergleich der anti-inflammatorischen Kapazität zwischen unbehandeltem HDL und EL-HDL, LacZ-HDL und EL-HDL, unbehandeltem HDL und LacZ-HDL erfolgte mittels Student's *t* Test. Mittels One-way ANOVA wurde der Vergleich der anti-inflammatorischen Aktivität zwischen den unterschiedlichen Gruppen (unbehandeltes HDL, LacZ-HDL und EL-HDL) festgestellt. GraphPad Prism 5.0 Software wurde für alle statistischen Analysen verwendet. Ein *P* Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4 RESULTATE

4.1 sCAD PATIENTEN

4.1.1 ANTHINFLAMMATORISCHE KAPAZITÄT

4.1.1.1 OPTIMIERUNG DES ASSAYS

Für die Bestimmung der anti-inflammatorischen Aktivität des isolierten HDLs von sCAD Patienten wurde vorerst der Assay optimiert. Demnach wurden verschiedene Konzentrationen an HDL und TNF- α in der Zellkultur eingesetzt und die ICAM1 Expression untersucht. Dieses Experiment wurde durchgeführt, da die Menge an isolierten HDL von sCAD Patienten limitiert war. In Abbildung 6 ist ersichtlich, dass sowohl mit der höchsten als auch mit der niedrigsten eingesetzten Konzentration an HDL und TNF- α eine signifikante Reduktion der ICAM1 Expression im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden konnte. Für die Kontrolle wurden die Zellen ohne HDL inkubiert und ebenfalls dessen ICAM1 Expression analysiert. Die anschließenden Untersuchungen der anti-inflammatorischen Aktivität von Patientenproben wurden demnach mit 100 μ g/ml HDL und 0,12ng/ml TNF- α durchgeführt.

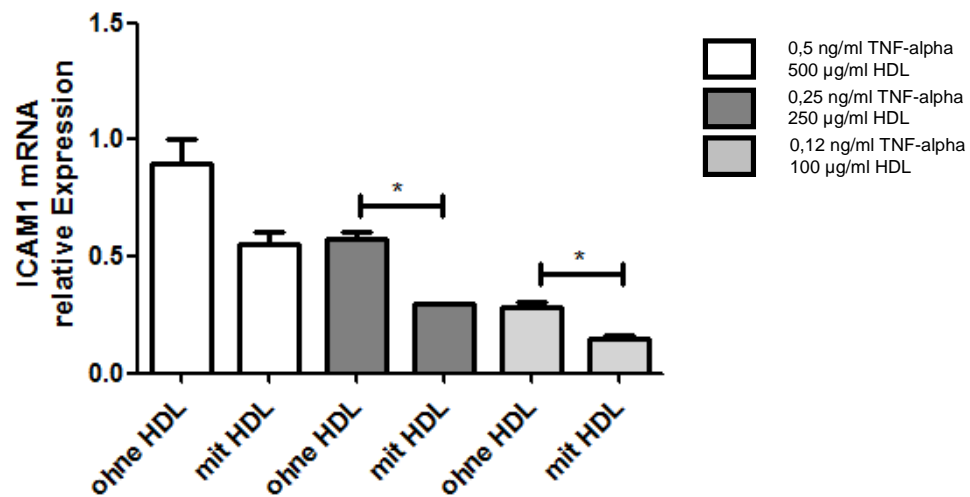


Abbildung 6: Optimierung des anti-inflammatorischen Assays

Ea.hy 926 Zellen wurden zunächst ausplattiert und am nächsten Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen an HDL (500 μ g/ml, 250 μ g/ml und 100 μ g/ml) für 16 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen mit TNF- α (0,5ng/ml, 0,25ng/ml und 0,12ng/ml) für fünf Stunden. Anschließend wurde die RNA isoliert und eine real-time PCR durchgeführt, um die ICAM1 mRNA Expression zu detektieren. Mittelwerte von zwei unterschiedlichen Experimenten.

4.1.1.2 ANTI-INFLAMMATORISCHE KAPAZITÄT VON sCAD PATIENTEN

Die Analyse der anti-inflammatorischen Kapazität von sCAD Patienten erfolgte mit 57 Patientenproben. Dafür wurden Ea.hy 926 Zellen ausplattiert und mit 100µg/ml isolierten HDL für 16 Stunden inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit 0,12ng/ml TNF-α für fünf Stunden, um eine ICAM1 Expression zu induzieren. Anschließend wurde die RNA isoliert und eine real-time PCR durchgeführt, wodurch die ICAM1 Expression detektiert werden konnte. Für die Kontrolle wurden die Zellen ohne HDL aber mit derselben Konzentration an TNF-α inkubiert. Alle Patientenproben wurden auf die Kontrolle normiert, wobei angenommen wurde, dass diese 100% ICAM1 Expression aufweist. Demnach besitzt eine Probe mit zum Beispiel 70% ICAM1 Expression eine anti-inflammatorische Kapazität von 30%.

Die detektierten anti-inflammatorischen Aktivitäten der unterschiedlichen Patientenproben wurden dann mit den jeweiligen EL Plasmakonzentrationen (pg/ml) korreliert. Wie in Abbildung 7 dargestellt wird, konnte keine Korrelation zwischen den HDL Aktivitäten und den EL Plasmakonzentrationen festgestellt werden.

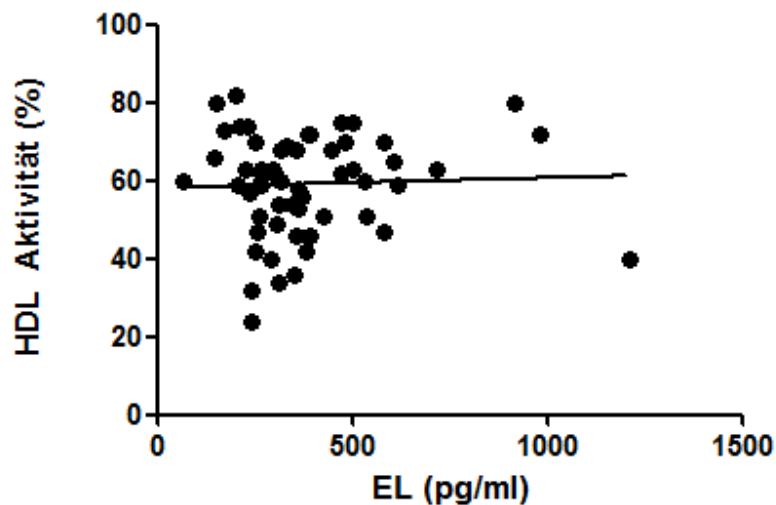


Abbildung 7: Korrelation der anti-inflammatorischen HDL Aktivität mit der EL Plasmakonzentration

Ea.hy 926 Zellen wurden ausplattiert und mit 100µg/ml HDL für 16 Stunden und mit 0,12ng/ml TNF-α für fünf Stunden inkubiert. Anschließend erfolgten eine Isolierung der RNA und eine real-time PCR, um die ICAM1 Expression detektieren zu können. Nach Berechnung der verschiedenen HDL Aktivitäten für 57 Patienten wurden diese den jeweiligen EL Plasmakonzentrationen gegenübergestellt und korreliert.

Da die EL Plasmalevels der sCAD Patienten eine hohe Streuung zwischen der geringsten und höchsten Konzentration aufwiesen, wurden diese in Quartilen eingeteilt. Jede HDL Aktivität wur-

de dann mit der dazugehörigen EL Plasmakonzentration in den einzelnen Quartilen korreliert (siehe Abbildung 8).

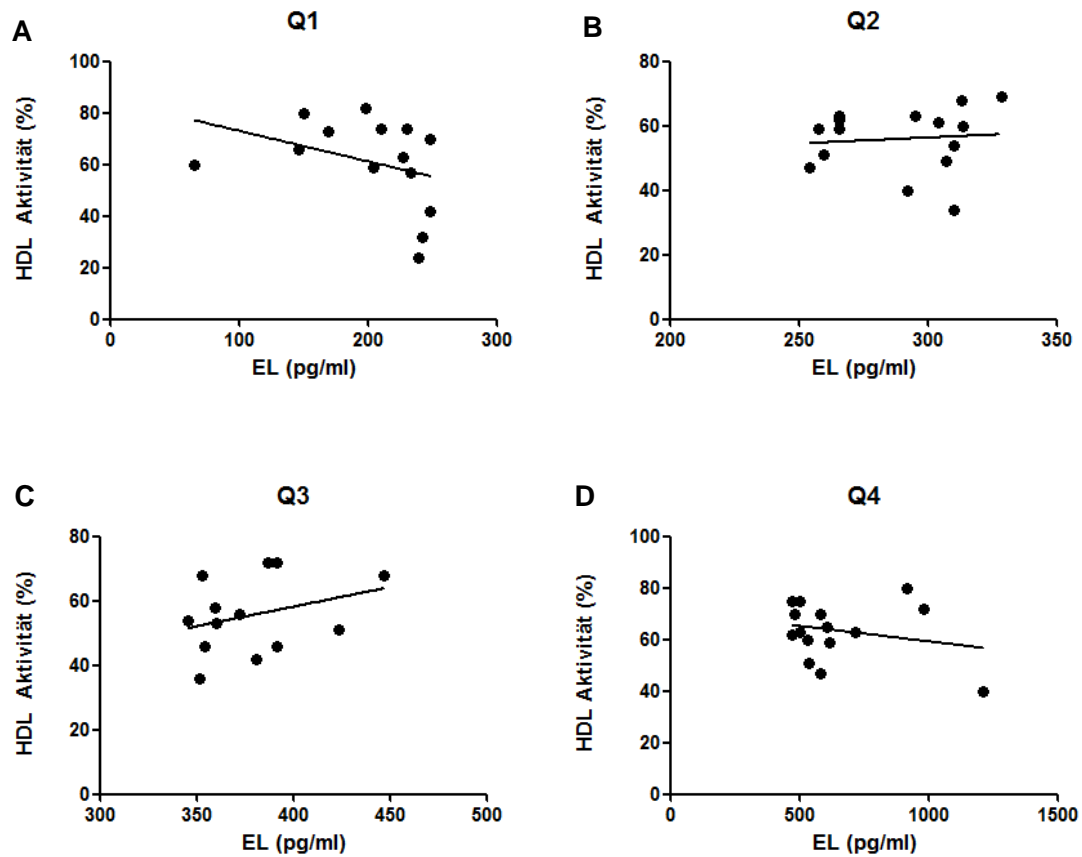


Abbildung 8: Einteilung der EL Plasmakonzentrationen in Quartilen und Korrelation mit den HDL Aktivitäten
 In Quartile 1 und Quartile 4 konnte ein negativer, statistisch nicht signifikanter Trend des Zusammenhangs zwischen der HDL Aktivität und der EL Plasmakonzentration festgestellt werden, wohingegen in Quartile 2 und Quartile 3 ein positiver, nicht signifikanter Trend zu sehen ist.

Nach der Einteilung der EL Plasmakonzentrationen in vier Gruppen konnten sowohl positive als auch negative Korrelationen mit den HDL Aktivitäten festgestellt werden. Jedoch ist keine dieser Korrelationen statistisch signifikant.

4.1.2 ARYLESTERASE AKTIVITÄT

Für die anti-oxidative Kapazität von HDL ist die Arylesterase bzw. Paraxonase Aktivität von PON1 eine wichtige Komponente. Aus diesem Grund wurde die Aktivität der Arylesterase von 76 sCAD HDLs bestimmt. Dafür wurden 1µg HDL und 200µl Reaktionspuffer (TRIS, CaCl₂ und Phenylacetat) in eine 96-well Platte pipettiert und die Fähigkeit des HDLs Phenylacetat in Phenol umzuwandeln bei einer Absorption von 270nm gemessen.

Die detektierten und kalkulierten Arylesterase Aktivitäten für jede Patientenprobe wurde danach mit den EL Plasmakonzentrationen korreliert. Wie in Abbildung 9 ersichtlich ist, besteht zwischen den beiden Komponenten eine positive Korrelation, jedoch ist diese nicht statistisch signifikant.

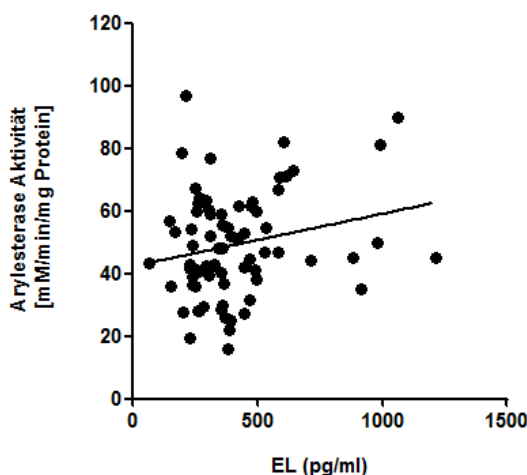


Abbildung 9: Korrelation zwischen Arylesterase Aktivität des HDLs und EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten

Für die Bestimmung der Arylesterase Aktivität wurden 1 μ g HDL und 200 μ l Reaktionspuffer (TRIS, CaCl_2 und Phenylacetat) verwendet und die Kapazität von HDL Phenylacetat in Phenol zu konvertieren bei einer Absorption von 270nm gemessen. Danach wurden die ermittelten Aktivitäten von 76 Patientenproben mit den EL Plasmakonzentrationen korreliert.

4.1.3 ANTI-OXIDATIVE KAPAZITÄT

Da die anti-oxidative Kapazität von HDL nicht nur von PON1 beeinflusst wird, wurde die allgemeine anti-oxidative Kapazität von 76 sCAD Patientenproben analysiert. Dafür wurden 7,5 μ g HDL und 96 μ l Reaktionspuffer (Iron-free HEPES, DHR und AAPH) eingesetzt und die Fähigkeit von HDL, die oxidative Konvertierung von Dihydrorhodamin in Rhodamin zu inhibieren, mittels Fluoreszenzmessung ermittelt. Anschließend wurde aus dem Prozentsatz des gebildeten Thodamins die anti- bzw. pro-oxidative Wirkung von HDL errechnet und dessen Zusammenhang mit der EL Plasmakonzentration analysiert. Aus Abbildung 10A geht hervor, dass zwischen der anti-oxidativen Kapazität des HDLs und der EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten ein positiver, statistisch signifikanter Trend besteht. Im Gegenteil dazu, wurde ein negativer, statisch nicht signifikanter Trend zwischen der pro-oxidativen Kapazität des HDLs und der EL Plasmakonzentration erzielt (siehe Abbildung 10B).

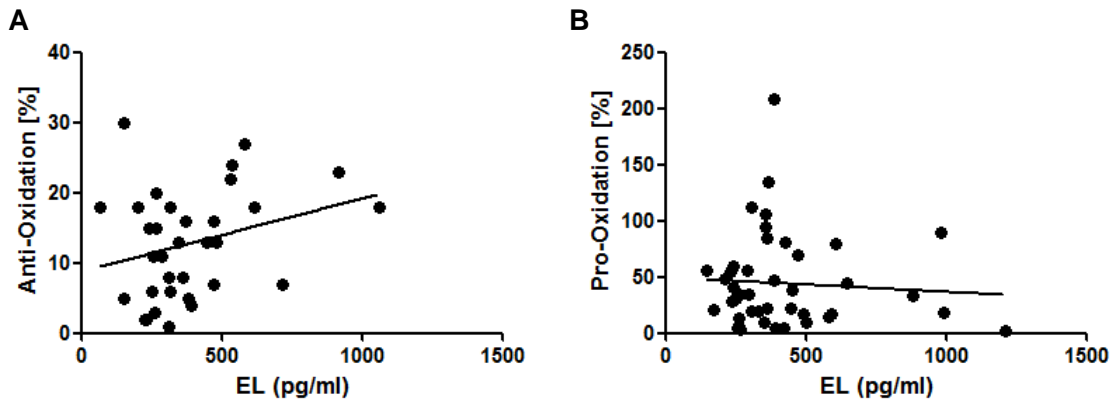


Abbildung 10: Korrelation zwischen der anti- bzw. pro-oxidativen Kapazität und der EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten

Für die Bestimmung der anti- bzw. pro-oxidativen Kapazität wurden 7,5µg HDL und 95µl Reaktionspuffer eingesetzt und die inhibitorische Fähigkeit von HDL Dihydrorhodamin in Rhodamin umzuwandeln mittels Fluoreszenzmessung detektiert. Danach wurde die oxidative Rhodamin-Bildung in % ermittelt und die Werte von A) 33 HDL-Proben, welche anti-oxidative Wirkung zeigten und B) 43 HDL-Proben, die pro-oxidative Wirkung zeigten, mit der EL Plasmakonzentration korreliert.

Da die Arylesterase (PON1) Aktivität bekanntlich ein Teil der gesamten anti-oxidativen Kapazität von HDL darstellt, wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden gemessenen Komponenten besteht. Dazu wurden 33 HDL-Proben, welche eine anti-oxidative Wirkung zeigen, herangezogen. Wie in Abbildung 11 ersichtlich ist, konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Arylesterase Aktivität und der anti-oxidativen Kapazität festgestellt werden, wodurch die Annahme bestätigt wurde, dass PON1 einen Einfluss auf die anti-oxidative Wirkung von HDL hat.

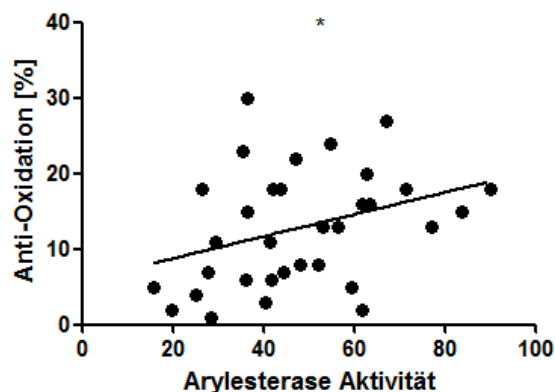
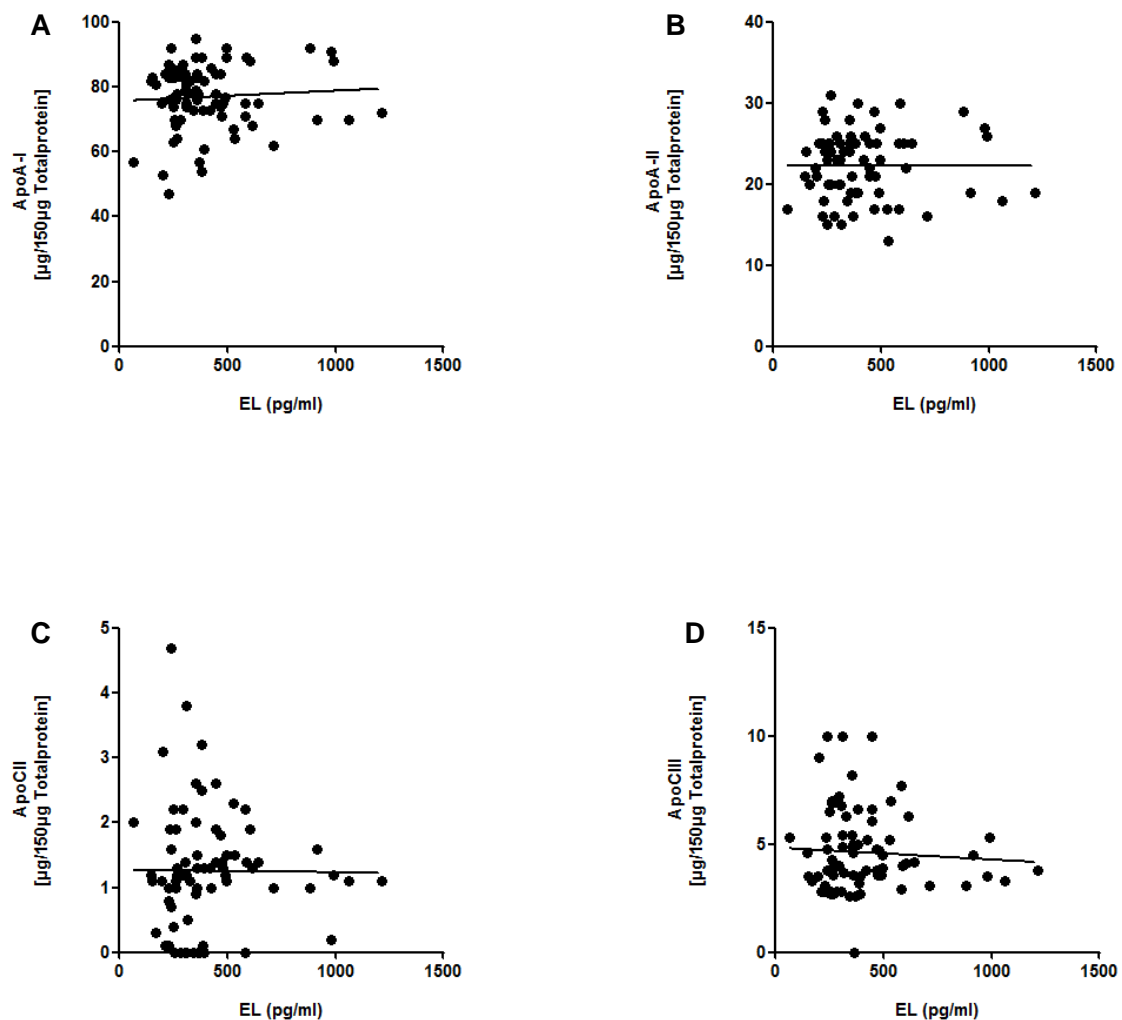


Abbildung 11: Korrelation zwischen Arylesterase Aktivität und anti-oxidativer Wirkung von HDL in sCAD Patienten

Die Ermittlung dieses Zusammenhanges wurde mit 33 Patientenproben durchgeführt.

4.1.4 PROTEIN- UND LIPIDZUSAMMENSETZUNG

Die Protein- und Lipidzusammensetzung wurde am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Diese Analyse beruht auf der Methode der Nephelometrie. Die Apolipoproteine ApoA-I, ApoA-II, ApoCII, ApoCIII und ApoE wurden mit der EL Plasmakonzentration von 76 sCAD Patienten korreliert. Wie in Abbildung 12 ersichtlich ist, konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den unterschiedlichen Apolipoproteinen und der EL Plasmakonzentration ermittelt werden, wohingegen für ApoE ein Trend einer positiven Korrelation ersichtlich ist.



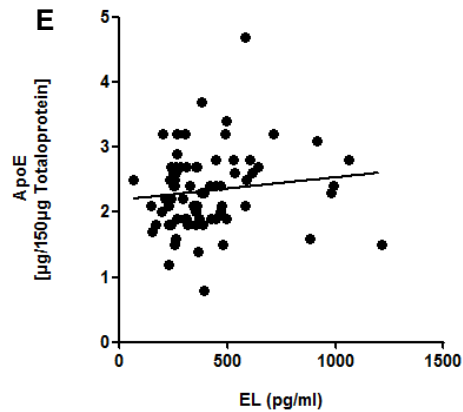
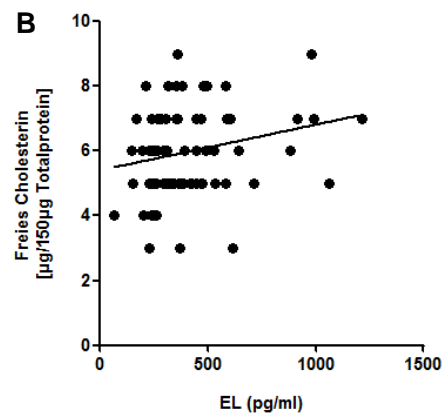
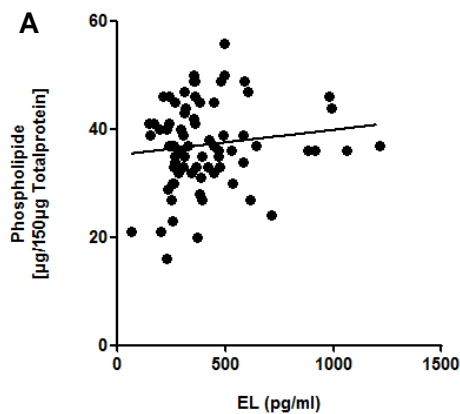


Abbildung 12: Korrelation zwischen EL Plasmakonzentration und Apolipoproteinen in sCAD Patienten
 Diese Korrelation wurde mit 76 Patientenproben durchgeführt.

Ebenfalls wurde der Zusammenhang zwischen dem EL Plasmaspiegel und Phospholipid-, Totalcholesterin- und freiem Cholesteringehalt in sCAD Patienten untersucht. Sowohl zwischen Phospholipiden und freiem Cholesterin und dem EL Plasmaspiegel als auch zwischen Totalcholesterin und der EL Plasmakonzentration konnte eine positive Korrelation festgestellt werden. Jedoch erwies sich, dass nur die Korrelation mit Totalcholesterin statistisch signifikant ist. (siehe Abbildung 13A, 13B und 13C)



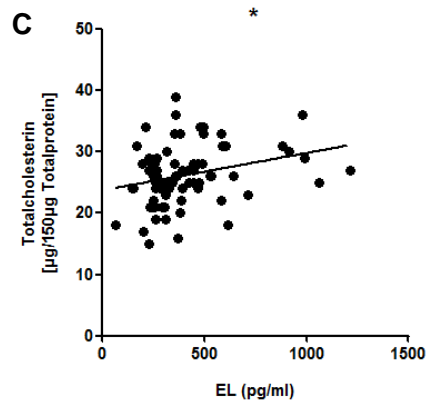


Abbildung 13: Korrelation zwischen EL Plasmakonzentration und Phospholipid-, freiem Cholesterin- und Totalcholesteringehalt in sCAD Patienten
Dies wurde mit 76 Patientenproben durchgeführt.

4.1.5 NACHWEIS DER HDL GRÖSSE

Mit Hilfe einer nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese wurde analysiert, ob es einen Unterschied in der Größe der HDL Partikel zwischen hohem und niedrigem EL Plasmaspiegel gibt.

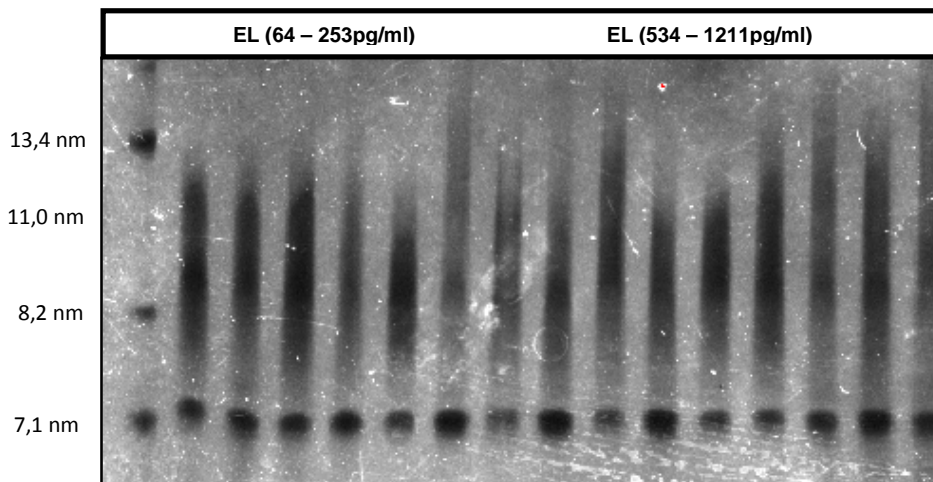


Abbildung 14: Unterschied der HDL Größe zwischen Patienten mit niedriger und hoher EL Plasmakonzentration

Für den Nachweis der HDL Größe wurden 10µg des isolierten HDLs auf ein 4-20%iges Gel aufgetragen und eine nicht denaturierende Polyacrylamid- Gradientengelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit 5,5-Sulfosalicylacid Dihydrat fixiert und mit Coomassie Blue gefärbt. Marker: NativeMark™ Unstained Protein Standard (Life Technologies, Wien, Österreich)

Laut Abbildung 14 konnte kein Unterschied in der HDL Größe zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden. Sowohl bei den Patienten mit niedriger EL Plasmakonzentration als auch bei denjenigen mit hoher EL Plasmakonzentration konnten die zwei HDL Fraktionen HDL₂ (11nm) und HDL₃ (9nm) mit derselben Größe nachgewiesen werden.

4.2 CHARAKTERISIERUNG DES IN VITRO EL-MODIFIZIERTEN HDL

4.2.1 PROTEIN- UND LIPIDKOMPOSITION DES DURCH EL MODIFIZIERTEN HDL

Um den Einfluss von EL auf die Zusammensetzung und die Funktionalität des HDLs, ohne den Einfluss von anderen Faktoren wie zum Beispiel Plasmaenzymen oder Medikationen (die in Patienten die EL Effekte auf HDL stark modulieren können), studieren zu können, wurde HDL *in vitro* mit EL überexprimierenden und LacZ-Kontrollzellen 16 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe von Kits der Triglycerid-, Totalcholesterin-, Phospholipid- und Proteingehalt in LacZ- und EL-HDL nach der Reisolation aus dem Inkubationsmedium mittels Ultrazentrifuge bestimmt. Wie in Abbildung 15 ersichtlich ist, konnte beim Vergleich zwischen LacZ-HDL und EL-HDL ein relativer Anstieg im Protein- und Totalcholesteringehalt festgestellt werden, wohingegen der Triglycerid- und Phospholipidgehalt sich verringert hat. Jedoch ist nur die Reduktion des Phospholipidgehalts signifikant.

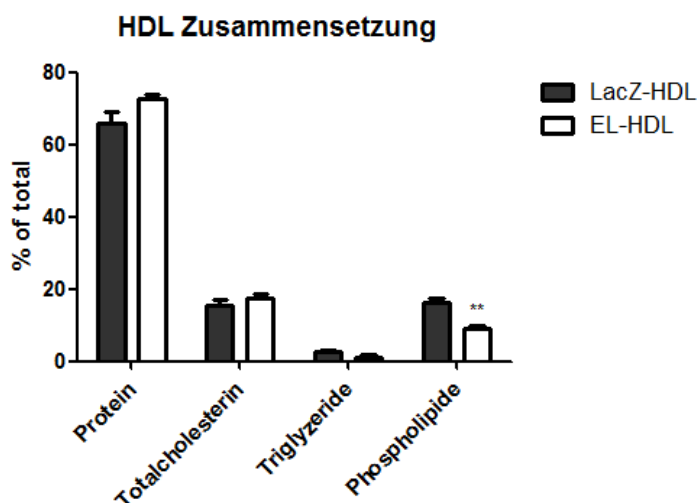


Abbildung 15: Die relative Zusammensetzung des LacZ- und EL- HDLs

Das Ergebnis zeigt die HDL Zusammensetzung, wobei das HDL und das modifizierte HDL mittels Ultrazentrifugation gewonnen wurde. Die Komposition des modifizierten HDLs wurde mit Hilfe von Kits bestimmt. Es erfolgte die Bestimmung der Mittelwerte von vier Experimenten.

4.2.2 APOM-, PON1- UND APOA-I-GEHALT DES MODIFIZIERTEN HDL

Da die HDL assoziierten Proteine ApoM und PON1 wichtig für die Wirkung des HDLs auf das Endothel sind und ApoA-I ein Hauptproteinbestandteil von HDL ist, wurden Western Blots mit dem modifizierten HDL für den Nachweis dieser Proteine durchgeführt, um die relative Veränderung der Menge festzustellen.

Die densitometrischen Auswertungen der Western Blots zeigten keine signifikanten Veränderungen des PON1, ApoM und ApoA-I-Gehalts zwischen LacZ-HDL und EL-HDL (Abbildungen 16 bis 21), obwohl in einigen vorherigen Experimenten eine Erniedrigung des PON1-Gehaltes und –Aktivität in EL-HDL detektiert werden konnte.

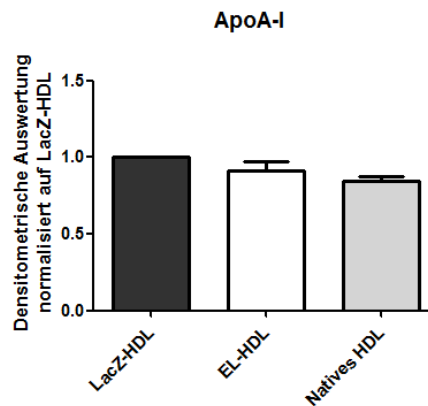


Abbildung 16: Densitometrische Auswertung des Western Blots von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoA-I

Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ. Die Ergebnisse wurden auf LacZ-HDL normiert, wobei LacZ-HDL als 1 angenommen wurde. Mittelwerte von vier unterschiedlichen HDL Modifikationen.

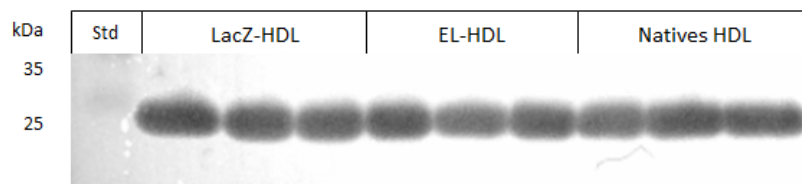


Abbildung 17: Repräsentativer Western Blot von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoA-I

LacZ- und EL-HDL zeigen im Western Blot den gleichen ApoA1-Gehalt. Gel: 12%, Membran: PVDF, Blocking: 10% Milch; 1. Antikörper: Rabbit-anti-humanApoA1-Antikörper (1:1000, in 10% Milch), Sekundärer Antikörper: Rabbit-anti-Goat-Antikörper (1:5000 in 10% Milch); Aufnahme der Bilder mit ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories); die zu erwartende Größe lag bei 25 kDa; Marker: Protein Marker IV (Peqlab)

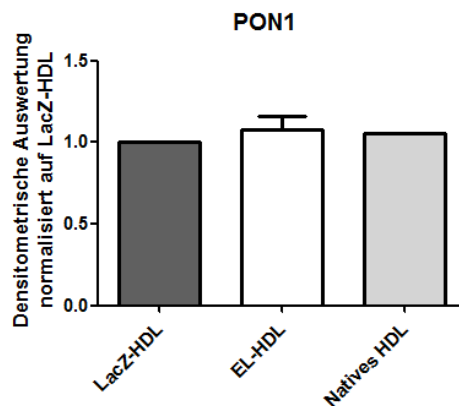


Abbildung 18: Densitometrische Auswertung des Western Blots von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von PON1

Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ. Die Ergebnisse wurden auf LacZ-HDL normiert, wobei LacZ-HDL als 1 angenommen wurde. Mittelwerte von vier unterschiedlichen HDL Modifikationen.

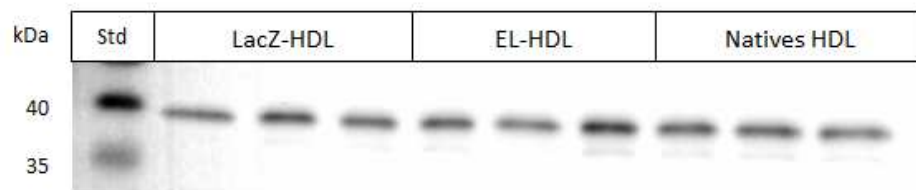


Abbildung 19: Repräsentativer Western Blot von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von PON1.

LacZ- und EL-HDL zeigen im Western Blot den gleichen PON1-Gehalt. Gel: 12%, Membran: PVDF, Blocking: 10% Milch; 1. Antikörper: Rabbit-anti-human ApoA1-Antikörper (1:1000, in 10% Milch), Sekundärer Antikörper: Rabbit-anti-Goat-Antikörper (1:5000 in 10% Milch); Aufnahme der Bilder mit ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories); die zu erwartende Größe lag bei 32-47 kDa; Marker: Protein Marker IV (Peqlab)

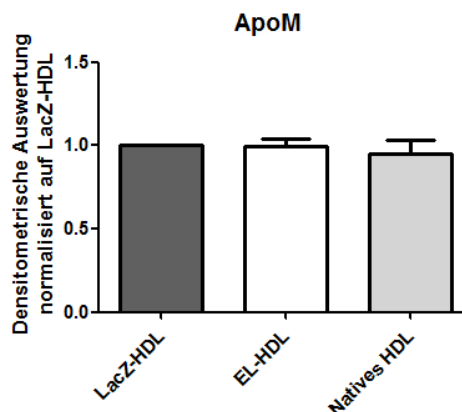


Abbildung 20: Densitometrische Auswertung des Western Blots von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoM

Die Auswertung erfolgte mit der Software ImageJ. Die Ergebnisse wurden auf LacZ-HDL normiert, wobei LacZ-HDL als 1 angenommen wurde. Mittelwerte von vier unterschiedlichen HDL Modifikationen.

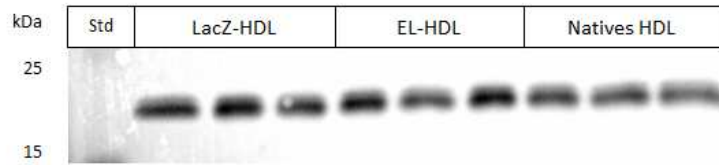


Abbildung 21: Repräsentativer Western Blot von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoM
 LacZ- und EL-HDL zeigen im Western Blot den gleichen ApoM-Gehalt. Gel: 12%, Membran: PVDF, Blocking: 10% Milch; 1. Antikörper: Rabbit-anti-humanApoA1-Antikörper (1:1000, in 10% Milch), Sekundärer Antikörper: Rabbit-anti-Goat-Antikörper (1:5000 in 10% Milch); Aufnahme der Bilder mit ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories); die zu erwartende Größe lag bei 20 kDa; Marker: Protein Marker IV (Peqlab)

4.2.3 GRÖSSE DES MODIFIZIERTEN HDL

Um festzustellen, ob die Reduktion des Phospholipidgehaltes in EL-HDL einen Einfluss auf die Größe des HDL hat, wurden LacZ-HDL und EL-HDL mittels nicht denaturierender Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese analysiert. Es zeigte sich eine Verkleinerung des EL-HDL im Vergleich zu LacZ-HDL. In Abbildung 22 sind vier Banden in LacZ-HDL mit einer Größe von etwa 12nm, 10nm, 8,5nm und 7,1nm ersichtlich. In EL-HDL sind Banden bei etwa 11nm, 9nm und etwa 8,2nm und 7,1nm zu sehen.

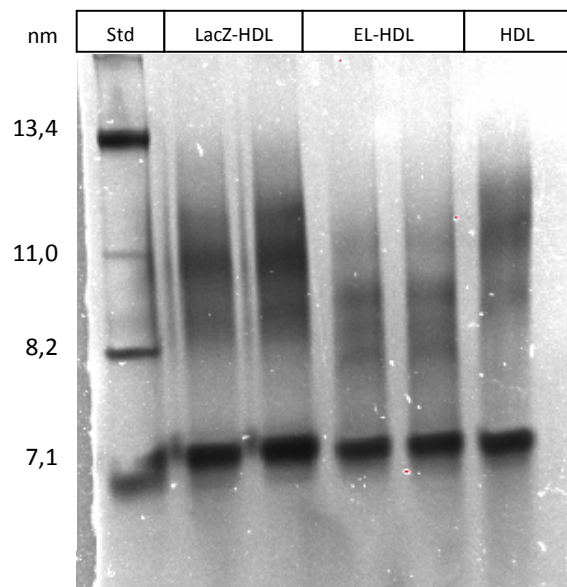


Abbildung 22: Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese des LacZ- und EL-HDL
 Dargestellt ist ein repräsentatives Gel von einer HDL-Modifikation, wobei je 10µg LacZ-, EL-HDL und unbehandeltes HDL, jeweils in Duplikaten aufgetragen wurden. Gel: Nusep Tris-Glycine NB 4-20%. Fixiert mit 5,5-Sulfosalicylacid Dihydrat, Gefärbt mit Coomassie Blue; Marker: NativeMark™ Unstained Protein Standard (Life Technologies, Wien, Österreich)

4.2.4 ANTIINFLAMMATORISCHE WIRKUNG VON EL MODIFIZIERTEN HDL

Da wir keine Korrelation zwischen der anti-inflammatorischen Wirkung von sCAD-HDL und der EL Plasmakonzentration festgestellt haben, wollten wir untersuchen, ob EL *in vitro* die anti-inflammatorische Wirkung von HDL beeinflusst.

Dafür wurden Ea.hy 962 Zellen ohne HDL, mit HDL, LacZ- und EL- HDL für 16 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für fünf Stunden bei 37°C mit TNF- α behandelt, um die ICAM1 Expression zu induzieren. Nach der Inkubation mit TNF- α wurde die RNA isoliert und eine real-time PCR durchgeführt.

In Abbildung 23 ist ersichtlich, dass im Vergleich zur Kontrolle ohne HDL eine statistisch signifikante Reduktion der ICAM1 Expression bei der Inkubation mit HDL, LacZ-HDL und EL-HDL detektiert wurde. Es konnte kein Unterschied zwischen LacZ-HDL und EL-HDL festgestellt werden. Jedoch wurde eine signifikante Verminderung der ICAM1 Expression des EL modifizierten HDLs gegenüber dem unbehandeltem HDL registriert.

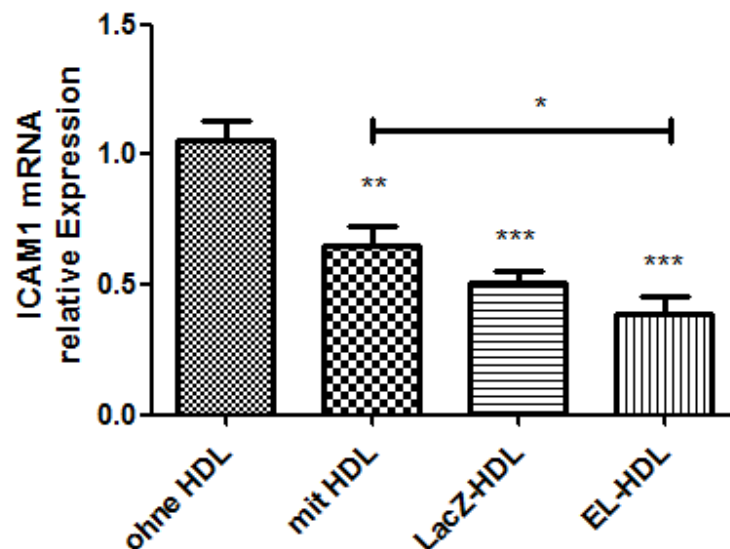


Abbildung 23: Anti-inflammatorische Kapazität von LacZ-HDL und EL-HDL

Ea.hy 926 Zellen wurden ohne HDL, mit HDL, mit LacZ- und EL-HDL für 16 Stunden inkubiert und anschließend mit TNF- α für fünf Stunden behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert und eine real-time PCR für die Messung der ICAM1 Expression durchgeführt. Bei der Auswertung wurden die Messwerte ohne HDL (Kontrolle) auf 1 gesetzt. Die anderen Ergebnisse wurden dann auf die Kontrolle normiert und verglichen. Dies erfolgte mit den Mittelwerten von acht Experimenten.

5 DISKUSSION

In der von uns durchgeführten Studie wurde sowohl der Zusammenhang zwischen den anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Fähigkeiten, als auch die Lipid- und Proteinkomposition des HDLs und der EL Plasmakonzentration bei Patienten mit stabiler koronarer Arterienerkrankung analysiert. Ebenfalls wurde isoliertes HDL aus Plasma *in vitro* durch LacZ- und EL-Adenoviren modifiziert und dessen Protein-, Phospholipid-, Triglyzerid- und Totalcholesteringehalt bestimmt. Weiters wurde die anti-inflammatorische Aktivität von EL-HDL im Vergleich zu LacZ-HDL und der ApoA-I, PON1 und ApoM Gehalt untersucht.

Bei der Bestimmung der anti-inflammatorischen Aktivität des HDLs durch Quantifizierung der Expression von ICAM1 in sCAD Patienten konnte keine Korrelation mit der EL Plasmakonzentration detektiert werden (siehe Abbildung 7). Unsere Resultate stimmen mit denen von Singaraja et al und Hara et al überein. Singaraja et al untersuchten die anti-inflammatorische Wirkung von HDL, welches aus Patienten mit inaktiver EL isoliert wurde. Trotz veränderter chemischer Zusammensetzung und Größe, zeigte das HDL von Probanden mit inaktiver EL eine vergleichbare anti-inflammatorische Wirkung wie das HDL von Probanden mit aktiver EL, welche als Inhibition der TNF- α induzierten VCAM1 Expression in humanen Endothelzellen gemessen wurde.⁷⁷ Hara et al analysierten die TNF- α induzierte Expression von VCAM1 in HUVEC Zellen, welche mit dem HDL von EL knockout Mäusen und Wildtyp Mäusen inkubiert wurden. In dieser Studie stellte sich heraus, dass es keinen Unterschied in der inhibitorischen Kapazität von HDL zwischen HDL-WT und HDL-EL^{-/-} gibt.⁷⁸ Diese Ergebnisse sind kompatibel mit jenen von Singaraja et al und zeigen, dass das Fehlen von EL in Menschen und Mäusen die anti-inflammatorische Wirkung von HDL nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten Ahmed et al, dass eine EL Überexpression in Endothelzellen, die TNF- α induzierte Expression von VCAM1 durch die Aktivierung von PPAR- α in Folge einer HDL Hydrolyse erniedrigt ist.⁷⁹ Die Unstimmigkeiten der Ergebnisse von Ahmed et al mit denen von Singaraja et al und Hara et al liegen höchst wahrscheinlich darin, dass Ahmed et al nicht die Effekte der HDL Modifikation durch EL untersuchten, sondern die Effekte einer EL Überexpression und Inkubation mit HDL, wobei die EL generierten Spaltprodukte wie Fettsäuren und Lysophosphatidylcholine und nicht HDL per se eine Rolle spielen.

⁷⁷ {Singaraja 2013}

⁷⁸ {Hara 2011}

⁷⁹ {Ahmed 2006}

Die Analyse der anti-oxidativen Wirkung und der Arylesterase Aktivität von HDL in Bezug auf die EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten zeigt einen Trend für eine positive Korrelation. (siehe Abbildungen 9 und 10A). Weiters wurde der Zusammenhang zwischen der anti-oxidativen Kapazität und der Arylesterase Aktivität untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die anti-oxidative Kapazität des sCAD HDLs eine signifikant positive Korrelation zur Arylesterase Aktivität von HDL-PON1 aufweist (siehe Abbildung 11). Hara et al untersuchten die Paraxonase und Arylesterase Aktivität im Plasma von EL knockout Mäusen und Wildtyp Mäusen. Beide Aktivitäten waren signifikant erhöht im Plasma von EL knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen.⁸⁰ Weiters zeigte die Arbeitsgruppe von Escolà-Gil, dass die HDL assoziierte PON1 Aktivität in EL defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen gleich ist. Ebenfalls wurde in dieser Studie die anti-oxidative Kapazität des isolierten HDLs von diesen Mäusen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass das HDL von EL defizienten Mäusen eine gesteigerte Fähigkeit zur Verzögerung der LDL Oxidation im Vergleich zu dem HDL aus Wildtyp Mäusen hat. Diese anti-oxidative Aktivität korreliert ebenso direkt mit dem HDL Phospholipid/Totalprotein und ApoA-I/Totalprotein Verhältnis.⁸¹ Diese Erkenntnisse stimmen jedoch nicht mit den gemessenen Ergebnissen in humanen Proben von sCAD Patienten in unserer Studie überein. Dies könnte man durch spezies-spezifische Unterschiede erklären. In Mausmodellen im Vergleich zum Menschen können andere Enzyme bzw. Mechanismen wirken, welche unabhängig oder gemeinsam mit EL die anti-oxidative Kapazität von HDL beeinflussen. Zusätzlich kann die Wechselwirkung von EL und HDL, sowie in weiterer Folge die Funktionalität von HDL in sCAD Patienten durch die im Plasma herrschenden pathologischen Bedingungen (chronische Entzündungen) oder durch Medikation stark beeinflusst werden. Tatsächlich haben wir herausgefunden, dass mehr als die Hälfte der von uns untersuchten sCAD HDLs eher eine pro-oxidative Wirkung zeigten. Dieser Effekt ist unter pathologischen Bedingungen charakteristisch. Aus diesem Grund wäre es wichtig, die Korrelation zwischen der EL Plasmakonzentration und der anti-oxidativen Kapazität des HDLs auch in einer gesunden Population zu untersuchen.

Bei der Bestimmung der Apolipoproteinkomposition (ApoA-I, ApoA-II, ApoC-II, ApoC-III und ApoE) des isolierten HDLs aus sCAD Patienten und dessen Korrelation mit der EL Plasmakonzentration zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (siehe Abbildungen 12A bis 12E). Wobei bei der Korrelation mit ApoE ein positiver und bei ApoC-III ein negativer Trend ersichtlich ist. Ma et al stellten fest, dass die HDL assoziierten Proteine ApoA-I und ApoE im

⁸⁰ {Hara 2011}

⁸¹ {Escolà-Gil 2013}

Plasma von EL knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erhöht sind. Diese Arbeitsgruppe beschrieb, dass dieser Effekt als Resultat auf einen posttranskriptionalen regulatorischen Mechanismus zurückzuführen ist.⁸² Escolà-Gil et al⁸³ und Ishida et al⁸⁴ erzielten dasselbe Ergebnis. Da wir keinen Zusammenhang zwischen der EL Plasmakonzentration und der Apolipoproteinkomposition festgestellt haben, kann man annehmen, dass sich die Wirkung von EL auf die Proteinzusammensetzung von HDL in Mausmodellen im Vergleich zum Menschen unterscheidet. Außerdem fehlt in einer knockout Maus die EL komplett, während dessen in den untersuchten Patienten, auch in denen mit niedrigster EL Konzentration, eine gewisse Menge an EL vorhanden ist, welche auf HDL wirkt.

In unserer Studie stellte sich bei der Untersuchung der Lipidzusammensetzung des HDLs von sCAD Patienten heraus, dass ein Zusammenhang zwischen dem Phospholipid-, dem freien Cholesterin- und dem Totalcholesteringehalt und der EL Plasmakonzentration besteht. Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Komponenten eine positive Korrelation mit der EL Plasmakonzentration aufweisen. Wohingegen nur die Korrelation mit dem Totalcholesteringehalt eine statistische Signifikanz zeigt. In der Literatur wird beschrieben und unsere früheren und laufenden Studien zeigen, dass EL eine Phospholipaseaktivität besitzt, wodurch die Phospholipide im HDL Partikel hydrolysiert werden und die Partikel infolge dessen verarmen und verkleinert werden. Dies konnte in der von uns durchgeführten Studie mit HDL von sCAD Patienten nicht bestätigt werden, denn auch bei der Bestimmung der HDL Größe von Patienten mit geringer EL Plasmakonzentration, im Vergleich zu Patienten mit hoher EL Plasmakonzentration, konnte kein Unterschied detektiert werden (siehe Abbildung 14). Ishida et al beschrieben, dass sowohl bei den männlichen als auch bei den weiblichen EL knockout Mäusen, im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, der Totalcholesterin- und Phospholipidgehalt im Plasma signifikant erhöht ist. Die Erhöhung des Totalcholesteringehaltes ist auf einen Anstieg des HDL-C Levels zurückzuführen. Ebenfalls wurden die mittels Ultrazentrifugation isolierten HDL Fraktionen der knockout, transgenen und wildtyp Mäusen auf dessen Protein-, Cholesterin- und Phospholipidgehalt analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass es keinen Unterschied in der Zusammensetzung der HDL Partikel in allen drei Mausmodellen gibt.⁸⁵ Eine weitere Studie von Escolà-Gil et al zeigte, dass die Plasmakonzentration von Totalcholesterin und Phospholipiden in EL defizienten Mäusen, im Vergleich zu Wildtyp Mäusen, erhöht ist. Dies basiert auf einer Erhöhung der HDL assoziierten Lipide. Die Abwesenheit von EL resultierte ebenfalls in einem Anstieg von Cholesterin

⁸² {Ma 2003}

⁸³ {Ishida 2003}

⁸⁴ {Escolà-Gil 2013}

⁸⁵ {Ishida 2003}

und Phospholipiden im HDL Partikel. Dies konnte durch eine Vergrößerung der HDL Partikel in EL knockout Mäusen bestätigt werden.⁸⁶ Diese Resultate wurden durch verschiedenen Studien bestätigt. (Ma et al ⁸⁷, Jin et al ⁸⁸, Singaraja et al ⁸⁹) Das Fehlen einer negativen Korrelation der HDL-PLs und der EL Plasmakonzentration in unserer Studie könnte man teilweise darauf zurückführen, dass die EL Masse im Plasma von sCAD Patienten bestimmt wurde. Da es bereits bekannt ist, dass es viele unterschiedliche Polymorphismen im *LIPG* Gen gibt, die die Aktivität von EL beeinflussen, könnte möglich sein, dass in einigen Patienten die EL Masse nicht mit der entsprechenden Aktivität einhergeht. Weiters stehen die für die Studie herangezogenen sCAD Patienten unter medikamentöser Behandlung (zB Statine), wodurch die HDL Komposition beeinflusst werden kann. Die beobachtete positive Korrelation zwischen der EL Plasmakonzentration und dem Totalcholesteringehalt des HDLs von sCAD Patienten könnte durch einen reduzierten Einfluss des CETP auf die HDL Partikel reguliert sein. Dies könnte daran liegen, dass HDL durch den Kontakt mit EL kein effizientes Substrat mehr für das CETP ist. Dies resultiert in weiterer Folge mit einem geringeren Transfer von HDL-CEs auf VLDL und einer Akkumulation von CEs in HDL. Im Gegensatz dazu könnte das HDL nach der Wirkung von EL ein besseres Substrat für LCAT werden, wodurch eine effizientere CE-Veresterung und eine Akkumulation von CEs in HDL entstehen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die selektive Aufnahme von HDL-CE durch SR-BI und die Verarmung von HDL an CEs vermindert ist. Denn Gauster et al beschrieben, dass durch EL die Zusammensetzung von HDL so verändert wird, dass infolgedessen die Bindungskapazität von HDL an SR-BI vermindert wird.⁹⁰ Demzufolge ist der Mechanismus für die Veränderung der HDL Zusammensetzung durch EL im Menschen noch nicht geklärt.

Basierend auf den Daten von Mausmodellen wurde jedoch trotzdem vermutet, dass EL einen Einfluss auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von HDL hat. Diese Annahme wurde durch eine Modifikation von HDL auf adenoviral LacZ und EL überexprimierenden HepG2 Zellen und anschließender Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von EL-HDL und LacZ-HDL überprüft.

Bei der Analyse der HDL Zusammensetzung stellte sich heraus, dass der Protein- und Totalcholesteringehalt in EL-HDL erhöht und der Triglyzerid- und Phospholipidgehalt in EL-HDL, im Ver-

⁸⁶ {Escolà-Gil 2013}

⁸⁷ {Ma 2003}

⁸⁸ {Jin 2003}

⁸⁹ {Singaraja 2013}

⁹⁰ {Gauster 2004}

gleich zu LacZ-HDL, vermindert ist. Dabei ist jedoch nur die Reduktion des Phospholipidgehaltes statistisch signifikant (siehe Abbildung 15). Dies kann durch die starke Phospholipase- und schwache Triglyzeridaktivität von EL erklärt werden. Durch den verminderten Phospholipidgehalt scheinen die HDL Partikel in EL-HDL zu schrumpfen, wie im Experiment der nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (siehe Abbildung 22) gezeigt werden konnte. Maugeais et al dokumentierten, dass durch eine Überexpression von EL eine Veränderung der HDL Struktur festgestellt werden konnte. EL-modifiziertes HDL war kleiner und hatte einen geringeren Gehalt an PLs, sowie freiem und veresterten Cholesterin.⁹¹

Die Analysen des PON1-, ApoA-I und ApoM-Proteingehaltes im Western Blot zeigten keine Veränderungen von EL-HDL im Vergleich zu LacZ-HDL. Unsere Arbeitsgruppe am Institut für Molekularbiologie und Biochemie an der Medizinischen Universität Graz konnte jedoch in vorangegangenen Untersuchungen eine Reduktion der PON1 Aktivität feststellen. Huang et al zeigten, dass eine Abhängigkeit zwischen der PON1 Aktivität und den Interaktionen mit der an HDL assoziierten Myeloperoxidase und ApoA-I besteht.⁹² Dadurch kann angenommen werden, dass es bei der Modifikation des HDLs durch EL *in vitro* zu einer Veränderung des Proteoms kommt, wobei PON1 zwar an HDL gebunden bleibt, jedoch seine Aktivität verliert. Demnach könnte bei einer gleichbleibenden Proteinmasse von PON1 die Aktivität reduziert werden.

Die Untersuchung der anti-inflammatorischen Kapazität des EL modifizierten HDLs zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit LacZ-HDL. Da bei der Bestimmung der anti-inflammatorischen Aktivität von HDL in sCAD Patienten keine Korrelation mit der EL Plasmakonzentration detektiert wurde, konnte dieses Resultat auch durch den *in vitro* Versuch bestätigt werden. Jedoch wurde eine signifikante Verminderung der ICAM1 Expression in EL-HDL, im Vergleich zum nicht modifizierten HDL, registriert.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass unsere Resultate daraufhin deuten, dass die *in vitro* Modifikation des HDLs durch EL den Phospholipidgehalt vermindert und die HDL Partikel dadurch kleiner werden. Durch die Analyse des Zusammenhanges zwischen der anti-inflammatorischen und der anti-oxidativen Kapazität als auch der Lipid- und Proteinkomposition des HDLs mit der EL Plasmakonzentration von Patienten mit stabiler koronarer Arterienerkrankung können wir die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien in Zellkultur oder in Mausmodellen nicht bestätigen. Dies könnte einerseits daran liegen, dass die EL Masse im Plasma bestimmt wurde und nicht dessen Aktivität, wodurch eine große Menge an EL Partikeln im Plasma vorhanden sein

⁹¹ {Maugeais 2003}

⁹² {Huang 2013}

können, die Aktivität jedoch durch Polymorphismen eingeschränkt wird. Andererseits ist es auch möglich, dass sich der HDL Metabolismus bzw. dessen Mechanismen im Menschen, im Vergleich zu *in vitro* und/oder *in vivo* Modellen, unterscheidet. Weiters ist es durchaus denkbar, dass die medikamentöse Behandlung (zB Statintherapie), unter der die Patienten stehen, sowie der pathologische Zustand der Patienten (chronische Entzündungen im Rahmen der Arteriosklerose), die Resultate beeinflussen. Die positive Korrelation zwischen der EL Plasmakonzentration und dem Totalcholesteringehalt des HDLs in sCAD Patienten könnte durch einen verminderten Einfluss von CETP oder einen erhöhten Einfluss von LCAT auf das HDL oder durch eine verminderte selektive Aufnahme von HDL-CE durch SR-BI erklärt werden. Demnach sind noch weitere Experimente notwendig, um diese Ergebnisse bzw. Hypothesen zu bestätigen.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die allgemeine Zusammensetzung _____	1
Abbildung 2: Die Transportfunktionen bzw. der Stoffwechsel der verschiedenen Lipoproteinklassen _____	5
Abbildung 3: HDL Synthese _____	7
Abbildung 4: HDL-medierter reverser Cholesterintransport _____	10
Abbildung 5: Anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften von HDL _____	15
Abbildung 6: Optimierung des anti-inflammatorischen Assays _____	35
Abbildung 7: Korrelation der anti-inflammatorischen HDL Aktivität mit der EL Plasmakonzentration _____	36
Abbildung 8: Einteilung der EL Plasmakonzentrationen in Quartilen und Korrelation mit den HDL Aktivitäten _____	37
Abbildung 9: Korrelation zwischen Arylesterase Aktivität des HDLs und EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten _____	38
Abbildung 10: Korrelation zwischen der anti- bzw. pro-oxidativen Kapazität und der EL Plasmakonzentration in sCAD Patienten _____	39
Abbildung 11: Korrelation zwischen Arylesterase Aktivität und anti-oxidativer Wirkung von HDL in sCAD Patienten _____	39
Abbildung 12: Korrelation zwischen EL Plasmakonzentration und Apolipoproteinen in sCAD Patienten _____	41
Abbildung 13: Korrelation zwischen EL Plasmakonzentration und Phospholipid-, freiem Cholesterin- und Totalcholesteringehalt in sCAD Patienten _____	42
Abbildung 14: Unterschied der HDL Größe zwischen Patienten mit niedriger und hoher EL Plasmakonzentration) _____	42
Abbildung 15: Die relative Zusammensetzung des LacZ- und EL- HDLs _____	43
Abbildung 16: Densitometrische Auswertung des Western Blots von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoA-I _____	44
Abbildung 17: Repräsentativer Western Blot von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoA-I _____	44
Abbildung 18: Densitometrische Auswertung des Western Blots von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von PON1 _____	45
Abbildung 19: Repräsentativer Western Blot von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von PON1 _____	45
Abbildung 20: Densitometrische Auswertung des Western Blots von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoM _____	45
Abbildung 21: Repräsentativer Western Blot von LacZ-/EL-HDL zum spezifischen Nachweis von ApoM _____	46
Abbildung 22: Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese des LacZ- und EL-HDL _____	46
Abbildung 23: Anti-inflammatorische Kapazität von LacZ-HDL und EL-HDL. _____	47

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Eigenschaften und Zusammensetzung der unterschiedlichen Lipoproteinklassen</i>	2
<i>Tabelle 2: Die für verschiedene Experimente verwendeten Zelllinien</i>	25
<i>Tabelle 3: Die für die Modifizierung des HDLs verwendeten Adenoviren</i>	25
<i>Tabelle 4: Zusammensetzung eines 12%igen Polyacrylamid-Trenngels</i>	32
<i>Tabelle 5: Zusammensetzung eines 6,4%igen Polyacrylamid-Sammelgels</i>	32
<i>Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung</i>	33
<i>Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung</i>	33

LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed**, Waleed; Orasanu, Gabriela; Nehra, Vedika; Asatryan, Liana; Rader, Daniel J.; Zouzenkova, Ouliana; Plutzky, Jorge (2006): High-density lipoprotein hydrolysis by endothelial lipase activates PPARalpha: a candidate mechanism for high-density lipoprotein-mediated repression of leukocyte adhesion. In: *Circ. Res.* 98 (4), S. 490–498.
- Annema**, Wijtske; Tietge, Uwe J. F. (2011): Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. In: *Curr Atheroscler Rep* 13 (3), S. 257–265.
- Assmann**, Gerd; Gotto, Antonio M. (2004): HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. In: *Circulation* 109 (23 Suppl 1), S. III8-14.
- Badellino**, Karen O.; Wolfe, Megan L.; Reilly, Muredach P.; Rader, Daniel J. (2008): Endothelial lipase is increased in vivo by inflammation in humans. In: *Circulation* 117 (5), S. 678–685.
- Baker**, P. W.; Rye, K. A.; Gamble, J. R.; Vadas, M. A.; Barter, P. J. (2000): Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. In: *J. Lipid Res.* 41 (8), S. 1261–1267.
- Barter**, Philip J.; Nicholls, Stephen; Rye, Kerry-Anne; Anantharamaiah, G. M.; Navab, Mohamad; Fogelman, Alan M. (2004): Antiinflammatory properties of HDL. In: *Circ. Res.* 95 (8), S. 764–772.
- Besler**, Christian; Heinrich, Kathrin; Rohrer, Lucia; Doerries, Carola; Riwanto, Meliana; Shih, Diana M. et al. (2011): Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. In: *J. Clin. Invest.* 121 (7), S. 2693–2708.
- Besler**, Christian; Lüscher, Thomas F.; Landmesser, Ulf (2012): Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. In: *EMBO Mol Med* 4 (4), S. 251–268.
- Biggerstaff**, Kyle D.; Wooten, Joshua S. (2004): Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. In: *Adv Physiol Educ* 28 (1-4), S. 105–106.
- Broedl**, Uli C.; Jin, Weijun; Rader, Daniel J. (2004): Endothelial lipase: a modulator of lipoprotein metabolism upregulated by inflammation. In: *Trends Cardiovasc. Med.* 14 (5), S. 202–206.
- Brown**, Robert J.; Lagor, William R.; Sankaranarayanan, Sandhya; Yasuda, Tomoyuki; Quertemous, Thomas; Rothblat, George H.; Rader, Daniel J. (2010): Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins. In: *Circ. Res.* 107 (3), S. 357–364.
- Cowan**, C. L.; Steffen, R. P. (1995): Lysophosphatidylcholine inhibits relaxation of rabbit abdominal aorta mediated by endothelium-derived nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor independent of protein kinase C activation. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (12), S. 2290–2297.
- Escolà-Gil**, Joan Carles; Chen, Xiangyu; Julve, Josep; Quesada, Helena; Santos, David; Metso, Jari et al. (2013): Hepatic lipase- and endothelial lipase-deficiency in mice promotes macrophage-to-feces RCT and HDL antioxidant properties. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1831 (4), S. 691–697.
- Fujimoto**, Victor Y.; Kane, John P.; Ishida, Brian Y.; Bloom, Michael S.; Browne, Richard W. (2010): High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. In: *Hum. Reprod. Update* 16 (1), S. 20–38.

Gauster, Martin; Oskolkova, Olga V.; Innerlohinger, Josef; Glatter, Otto; Knipping, Gabriele; Frank, Sasa (2004): 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.* 382 (Pt 1), S. 75–82.

Hara, Tetsuya; Ishida, Tatsuro; Kojima, Yoko; Tanaka, Hanayo; Yasuda, Tomoyuki; Shinohara, Masakazu et al. (2011): Targeted deletion of endothelial lipase increases HDL particles with anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo. In: *J. Lipid Res.* 52 (1), S. 57–67.

Hasniza Zaman Huri (2012): Dyslipidemia and Type 2 Diabetes Mellitus: Implications and Role of Antiplatelet Agents in Primary Prevention of Cardiovascular Disease: INTECH Open Access Publisher.

Hirata, K.; Dichek, H. L.; Cioffi, J. A.; Choi, S. Y.; Leeper, N. J.; Quintana, L. et al. (1999): Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. In: *J. Biol. Chem.* 274 (20), S. 14170–14175.

Hirata, K.; Ishida, T.; Matsushita, H.; Tsao, P. S.; Quertermous, T. (2000): Regulated expression of endothelial cell-derived lipase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (1), S. 90–93.

Holzer, Michael; Birner-Gruenberger, Ruth; Stojakovic, Tatjana; El-Gamal, Dalia; Binder, Veronika; Wadsack, Christian et al. (2011): Uremia alters HDL composition and function. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (9), S. 1631–1641.

Holzer, Michael; Wolf, Peter; Curcic, Sanja; Birner-Gruenberger, Ruth; Weger, Wolfgang; Inzinger, Martin et al. (2012): Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. In: *J. Lipid Res.* 53 (8), S. 1618–1624.

Huang, Ji; Qian, Hai-Yan; Li, Zhi-Zhong; Zhang, Jing-Mei; Wang, Su; Tao, Ying et al. (2010): Role of endothelial lipase in atherosclerosis. In: *Transl Res* 156 (1), S. 1–6.

Huang, Ying; Wu, Zhiping; Riwanto, Meliana; Gao, Shengqiang; Levison, Bruce S.; Gu, Xiaodong et al. (2013): Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. In: *J. Clin. Invest.* 123 (9), S. 3815–3828.

Ishida, Tatsuro; Choi, Sungshin; Kundu, Ramendra K.; Hirata, Ken-ichi; Rubin, Edward M.; Cooper, Allen D.; Quertermous, Thomas (2003): Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. In: *J. Clin. Invest.* 111 (3), S. 347–355.

Ishida, Tatsuro; Choi, Sungshin Y.; Kundu, Ramendra K.; Spin, Josh; Yamashita, Tomoya; Hirata, Ken-ichi et al. (2004): Endothelial lipase modulates susceptibility to atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. In: *J. Biol. Chem.* 279 (43), S. 45085–45092.

Jaye, M.; Lynch, K. J.; Krawiec, J.; Marchadier, D.; Maugeais, C.; Doan, K. et al. (1999): A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. In: *Nat. Genet.* 21 (4), S. 424–428.

Jin, Weijun; Millar, John S.; Broedl, Uli; Glick, Jane M.; Rader, Daniel J. (2003): Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. In: *J. Clin. Invest.* 111 (3), S. 357–362.

Jin, Weijun; Sun, Gwo-Shing; Marchadier, Dawn; Octaviani, Edelyn; Glick, Jane M.; Rader, Daniel J. (2003): Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase. In: *Circ. Res.* 92 (6), S. 644–650.

Karlson, Peter; Doenecke, Detlef (2005): Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. [Faltdafel mit Stoffwechselübersicht]. 15. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

Kontush, Anatol; Chapman, M. John (2012): High-density lipoproteins. Structure, metabolism, function, and therapeutics. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons Inc. Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com/detail.asp?ID=340110>.

- Kontush**, Anatol; Lhomme, Marie; Chapman, M. John (2013): Unraveling the complexities of the HDL lipidome. In: *J. Lipid Res.* 54 (11), S. 2950–2963.
- Koolman**, Jan; Röhm, Klaus-Heinrich (2009): Taschenatlas Biochemie des Menschen. In: *Taschenatlas Biochemie des Menschen*.
- Krebs**, Kristin (2005): Lipidsprechstunde. Praxisrelevante Fettstoffwechselstörungen und ihre Folgen. Stuttgart: Thieme.
- Ma**, Ke; Cilingiroglu, Mehmet; Otvos, James D.; Ballantyne, Christie M.; Marian, Ali J.; Chan, Lawrence (2003): Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (5), S. 2748–2753.
- Marsche**, Gunther; Saemann, Marcus D.; Heinemann, Akos; Holzer, Michael (2013): Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. In: *Pharmacol. Ther.* 137 (3), S. 341–351.
- Maugeais**, Cyrille; Tietge, Uwe J. F.; Broedl, Uli C.; Marchadier, Dawn; Cain, William; McCoy, Mary G. et al. (2003): Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. In: *Circulation* 108 (17), S. 2121–2126.
- Mineo**, Chieko; Deguchi, Hiroshi; Griffin, John H.; Shaul, Philip W. (2006): Endothelial and antithrombotic actions of HDL. In: *Circ. Res.* 98 (11), S. 1352–1364.
- Nijstad**, Niels; Wiersma, Harmen; Gautier, Thomas; van der Giet, Markus; Maugeais, Cyrille; Tietge, Uwe J. F. (2009): Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. In: *J. Biol. Chem.* 284 (10), S. 6093–6100.
- Nofer**, Jerzy-Roch; Kehrel, Beate; Fobker, Manfred; Levkau, Bodo; Assmann, Gerd; Eckardstein, Arnold von (2002): HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. In: *Atherosclerosis* 161 (1), S. 1–16.
- Petrides**, Petro E.; Löffler, Georg (1998): Biochemie und Pathobiochemie. Mit 233 Tabellen. 6. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Qiu**, Guosong; Ho, Alexander C.; Yu, Willie; Hill, John S. (2007): Suppression of endothelial or lipoprotein lipase in THP-1 macrophages attenuates proinflammatory cytokine secretion. In: *J. Lipid Res.* 48 (2), S. 385–394.
- Rader**, Daniel J. (2006): Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. In: *J. Clin. Invest.* 116 (12), S. 3090–3100.
- Rader**, Daniel J.; Daugherty, Alan (2008): Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. In: *Nature* 451 (7181), S. 904–913.
- Rohrer**, Lucia; Hersberger, Martin; Eckardstein, Arnold von (2004): High density lipoproteins in the intersection of diabetes mellitus, inflammation and cardiovascular disease. In: *Curr. Opin. Lipidol.* 15 (3), S. 269–278.
- Rothblat**, George H.; Phillips, Michael C. (2010): High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. In: *Curr. Opin. Lipidol.* 21 (3), S. 229–238.
- Shiu**, Sammy W. M.; Tan, Kathryn C. B.; Huang, Ying; Wong, Ying (2008): Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. In: *Atherosclerosis* 198 (2), S. 441–447.
- Singaraja**, Roshni R.; Sivapalaratnam, Suthesh; Hovingh, Kees; Dubé, Marie-Pierre; Castro-Perez, José; Collins, Heidi L. et al. (2013): The impact of partial and complete loss-of-function

mutations in endothelial lipase on high-density lipoprotein levels and functionality in humans. In: *Circ Cardiovasc Genet* 6 (1), S. 54–62.

Sorrentino, Sajoscha A.; Besler, Christian; Rohrer, Lucia; Meyer, Martin; Heinrich, Kathrin; Bahlmann, Ferdinand H. et al. (2010): Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. In: *Circulation* 121 (1), S. 110–122.

Temel, Ryan-E; Brown, J-Mark (2010): A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport. In: *World J. Gastroenterol.* 16 (47), S. 5946–5952.

Terasaka, Naoki; Westerterp, Marit; Koetsveld, Joris; Fernández-Hernando, Carlos; Yvan-Charvet, Laurent; Wang, Nan et al. (2010): ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (11), S. 2219–2225.

Terasaka, Naoki; Yu, Shuiqing; Yvan-Charvet, Laurent; Wang, Nan; Mzhavia, Nino; Langlois, Read et al. (2008): ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. In: *J. Clin. Invest.* 118 (11), S. 3701–3713.

van der Westhuyzen, Deneys R.; Beer, Frederick C. de; Webb, Nancy R. (2007): HDL cholesterol transport during inflammation. In: *Curr. Opin. Lipidol.* 18 (2), S. 147–151.

van Lenten, B. J.; Navab, M.; Shih, D.; Fogelman, A. M.; Lusis, A. J. (2001): The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. In: *Trends Cardiovasc. Med.* 11 (3-4), S. 155–161.

van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Nayak, D. P.; Hama, S.; Navab, M.; Fogelman, A. M. (2001): High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory properties during acute influenza a infection. In: *Circulation* 103 (18), S. 2283–2288.

Wiersma, Harmen; Gatti, Alberto; Nijstad, Niels; Kuipers, Folkert; Tietge, Uwe J. F. (2009): Hepatic SR-BI, not endothelial lipase, expression determines biliary cholesterol secretion in mice. In: *J. Lipid Res.* 50 (8), S. 1571–1580.

Yancey, Patricia G.; Bortnick, Anna E.; Kellner-Weibel, Ginny; La Llera-Moya, Margarita de; Phillips, Michael C.; Rothblat, George H. (2003): Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (5), S. 712–719.

Yasuda, Tomoyuki; Ishida, Tatsuro; Rader, Daniel J. (2010): Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. In: *Circ. J.* 74 (11), S. 2263–2270.