



Katharina Moosbrugger, BSc

EINFLUSS VON HDL-MODIFIKATIONEN DURCH
DIE ENDOTHELIALE LIPASE
AUF DIE FUNKTIONALITÄT UND KOMPOSITION VON HDL

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, Juni 2016

VORWORT

Zur Erlangung meines akademischen Grades an der Technischen Universität in Graz, konnte ich meine Masterarbeit am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, zugehörig zur Medizinischen Universität, verfassen.

Ich möchte diese Möglichkeit nutzen, um mich hiermit für die erhaltene Unterstützung bei verschiedenen Seiten zu bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat. Saša Frank, welcher mir im Laufe der Arbeit stets hilfreich und informierend zur Seite stand.

Für die Anweisung in den verschiedenen Methoden möchte ich mich sehr herzlich bei Irene Schilcher, MSc, bedanken, die mich zudem auch abseits der Laborarbeit mit Rat und Tat unterstützt hat. Eine Durchführung der vielen unterschiedlichen Analysen wäre alleine nicht möglich gewesen und deshalb möchte ich hiermit auch bei allen bedanken, die mit ihren Messungen zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben, ein besonderer Dank gilt dabei meinen Kolleginnen der Forschungsgruppe, Margarete und Andrijana.

Um überhaupt die Möglichkeit des Masterstudiums ergreifen zu können, möchte ich an dieser Stelle auch meinem ehemaligen Vorgesetzten, Herrn Ao. Prof. Dr. Rainer Kurmayer meinen Dank aussprechen, dass er mir die Voraussetzungen für die Inanspruchnahme einer Bildungskarenz gewährt hat.

An dieser Stelle sei außerdem all meinen Freunden gedankt, die mich immer wieder motiviert, und erheitert haben und somit meinen Studienalltag bereichert haben. Nicht zuletzt, gilt auch mein herzlicher Dank meiner Familie für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen und besonders während meines Studiums.

EIDESSTÄTTLICHE 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

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in zunehmend mehr Ländern und stehen dadurch im ungebrochenen Interesse der Forschung. Als chronische Vorstufe zu akut – eintretenden und oft folgenschweren Ereignissen spielt die Arteriosklerose eine wichtige Rolle, deren Entstehung und Verlauf negativ mit dem HDL – Cholesterin Spiegel in der Zirkulation assoziiert ist. Als wichtige Eigenschaft trägt der HDL – vermittelte reverse Cholesterintransport vom extrahepatischen Gewebe zur Leber in beachtlicher Weise zur anti-atherogenen Funktion bei. Überdies konnte mit der Paraoxonase 1 (PON1) aber auch ein mit HDL assoziiertes Enzym gefunden werden, das durch seine Fähigkeit zur Hydrolyse von Lipidperoxiden für die anti-oxidativen Effekte des HDL verantwortlich ist, wobei diese positiven Charakteristika auf funktionelles HDL beschränkt sind. Zu genannten Eigenschaften zählt auch die Fähigkeit von HDL, die *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) zu stimulieren und mit der damit verbundenen Produktion von NO indirekt weitere anti - inflammatorische und anti – thrombotische Effekte auszulösen. Die endotheliale Lipase (EL) spaltet bevorzugt Phospholipide in der Membran von HDL – Partikel und beeinflusst dadurch die Plasmakonzentration des HDL - Cholesterins.

Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte der Effekt der endothelialen Lipase auf die Komposition und Funktionalität von HDL *in vitro* bestimmt werden. Im Anschluss an durchgeführte Zellkulturexperimente, bei denen EL- und kontrollinfizierte HepG₂ – Zellen für 16 h in Medium mit zugesetztem HDL oder Plasma inkubiert wurden, erfolgte nach der Isolierung, unter Anwendung diverser Methoden die Charakterisierung des HDLs. Mit der Ausnahme der Myografie, zeigte sich bei allen Messungen ein ähnliches Ergebnis von HDL- und Plasmamodifikationen. Im Besonderen ließ sich eine Spaltung der Phospholipide im HDL durch eine offensichtlich erfolgreiche Infektion der HepG₂ – Zellen mithilfe unterschiedlicher Methoden bestätigen. Neben einem direkt sichtbaren Größenunterschied von EL- und Kontroll – HDL an Coomassie- und Sudan – gefärbten, nativen Gradientengelen, konnte mittels Kitmessungen auch eine signifikante Erniedrigung im Phospholipidgehalt der EL – Proben festgestellt werden. Überdies wurde dieser Unterschied in Größe und Lipidanteil durch die sehr präzise Messmethode der SAXS – Analyse bestätigt.

Der Gehalt und die Aktivität von PON1 zeigte ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der EL – Proben im Vergleich zur Kontrolle, was anhand PON1 – spezifischer Western Blots und der Messung der Arylesteraseaktivität unter Einsatz von Phenylacetat bestimmt wurde. Als weitere Analyse der Funktionalität des modifizierten HDLs sollte mithilfe eines weiteren Zellkulturexperiments mit der Endothelzelllinie EA.hy926 und angeschlossener HPLC – Messung aus dem Inkubationsmedium der eNOS – spezifische Nitritgehalt festgestellt werden. Dabei ergab sich ein deutlicher Trend eines geringeren Nitritgehalts der EL – Proben, welcher allerdings durch Wiederholung der Experimente auf seine statistische Relevanz überprüft werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass HDL durch die Modifikation der EL signifikant in der Partikelgröße verändert wird. Zudem scheint es eine Abschwächung von anti – atherogen geltenden Effekten des EL – HDLs im Vergleich zur Kontrolle zu geben.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases belong to the leading death causes worldwide and therefore are in the unabated focus of interest of many research groups. It has been shown that the development and progression of atherosclerosis is inversely correlated with plasma levels of HDL – cholesterol. Some important functions which contribute to this effect are the HDL - mediated transport of excess cholesterol from peripheral tissue to the liver (reverse cholesterol transport) for its further metabolism and excretion. Furthermore the attachment of the enzyme paraoxonase 1 (PON1) to HDL which facilitates hydrolysis of lipid peroxides and thereby prevents progression of atherosclerosis as well as the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by HDL with subsequent NO release in the vessels are also contributing to the anti – oxidative and anti – inflammatory effects of HDL. Most of these properties of HDL only for the lipoprotein in its native state and it can act in the opposite way when it becomes dysfunctional. Due to its ability to cleave preferentially phospholipids in the membrane of HDL – particles the endothelial lipase (EL) has been shown to be an important determinant of HDL-C plasma levels *in vivo*.

The aim of this study was to examine the effect of the endothelial lipase on the composition and functionality of HDL *in vitro* by the means of cell culture experiments using EL- and control infected HepG₂ cells with 16 h of incubation in medium with added HDL or plasma. Isolation of the modified HDL was followed by several methods to characterize the impact of EL and hence an observed cleavage of phospholipids by kit measurements of total phospholipid content but also using coomassie as well as sudan staining of native gradient gels and the precise methods of small angle x-ray scattering (SAXS) confirmed the successful infection of HepG₂ cells with the EL – carrying virus. All the mentioned analyses resulted in a significant decrease in particle size and phospholipid content of EL – modified HDL compared to the control. Additionally, PON1 specific western blots as well as measurements of arylesterase activity indicated a significant lowering of the presence as well as activity of PON1 in EL samples. The eNOS-specific measurements were done by means of another cell culture experiment using the endothelial cell line EA.hy926 and addition of modified HDL with following HPLC analysis of the medium. The same effects could have been in two single experiments and basically gave the hint that EL - modified HDL impairs the activity of eNOS. For statistical approval of these findings repetitions of the experiments have to be measured.

In conclusion, the results of this study show a remarkable impact of EL on the characteristics of HDL regarding particle size, PON1 availability and eNOS activation which all contributes to an impairment of the anti – atherogenic functions associated with functional HDL.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einführung.....	1
1.1 Lipoproteine im Allgemeinen.....	1
1.1.1 Aufgaben der unterschiedlichen Lipoproteinklassen.....	2
1.1.2 Exkurs: LDL-Rezeptor.....	3
1.2 HDL.....	4
1.2.1 Exkurs: Cholesterin.....	5
1.2.2 Regulation wichtiger Proteine im HDL – Stoffwechsel.....	8
1.2.3 Arteriosklerose und die Rolle des HDL.....	9
1.2.4 HDL vermittelter Cholesterin Efflux.....	12
1.2.5 Die Rolle von SR-B1 im HDL Metabolismus.....	15
1.2.6 Wichtige Funktionen weiterer HDL – assoziierter Moleküle und Proteine.....	17
1.3 Die endotheliale Lipase (EL).....	20
1.3.1 Versuche basierend auf EL.....	21
1.4 Paraoxonase.....	21
1.4.1 Allgemeine Eigenschaften und Funktion von PON1.....	22
1.4.2 PON im Zusammenhang mit Arteriosklerose.....	25
1.5 endotheliale Nitric oxide Synthetase (eNOS).....	26
1.5.1 Aufbau, Regulation und Funktion von eNOS.....	27
1.5.2 Einfluss von HDL auf die Aktivität von eNOS.....	29
2. Zielsetzung.....	30
3 Material und Methoden.....	31
3.1 HDL Isolierung.....	32
3.2 HDL- und Plasmamodifikation im Zellkultorexperiment.....	33
3.3 ApoB-Depletion.....	35
3.4 Myografie.....	35
3.5 Nitritbestimmung.....	36
3.6 Western Blot.....	37
3.7 Native Gele und Färbungen.....	39

3.7.1 nativer PON Blot.....	40
3.8 Saxs – Analyse	40
3.9 Arylesterasemessungen.....	40
3.10 Massenspektrometrie.....	41
3.11 Statistische Auswertung.....	42
4 Ergebnisse	43
4.1 Komposition des modifizierten HDL	43
4.1.1 Kitmessungen TC, TG, PL.....	44
4.1.2 Native Gele.....	45
4.1.3 Nativer PON – Blot	47
4.1.4 Western Blot: PON1 & ApoA-I	47
4.1.5 SAXS (Small-Angle X-ray Scattering)	49
4.1.6 Massenspektrometrie: Lipidprofil	52
4.2 Funktionalität von modifiziertem HDL.....	54
4.2.1 Myografie	54
4.2.2 Nitritbestimmung.....	56
4.2.3 Arylesterasemessung	57
5 Diskussion.....	58

1 EINFÜHRUNG

1.1 LIPOPROTEINE IM ALLGEMEINEN

Neben den Chylomikronen, Very Low Density – Lipoproteinen (VLDL) und Low – Density Lipoproteinen (LDL), gehören High- Density Lipoproteine (HDL) zur Gruppe der Lipoproteine, welche im Körper die wichtige Aufgabe des Transports von Lipiden übernehmen. Durch die hydrophoben Eigenschaften der Triacylglycerine, Phosphoglycerine, freien Fettsäuren, und des Cholesterins (frei und auch verestert) ergibt sich die Notwendigkeit von speziellen Transferproteinen, um genannte Moleküle im hydrophilen Transportmedium „Blut“ vom Aufnahme- bzw. Entstehungsort an den Wirkungs- oder Ausscheidungsort zu bringen. Die Bezeichnungen der jeweiligen Klassen der Lipoproteine erklären sich durch die Auftrennung entsprechend ihrer Dichte in der präparativen Ultrazentrifugation, wobei in obiger Reihenfolge Chylomikronen die geringste, und HDL die größte Dichte aufweisen. Weiters unterscheiden sie sich auch in ihrem Lipidgehalt und dem Verhältnis von Lipiden zu Proteinanteilen. Im Detail sind Lipoproteine aus unterschiedlichen Apolipoproteinen aufgebaut, welche entscheidend für ihre Aufnahme in Zellen durch Erkennung an verschiedenen Rezeptoren oder an ihnen auftretende Modifikationen, wie zum Beispiel Spaltung durch Enzyme durch allosterische Aktivierung sein können. Bisher sind mit den einzelnen Untergruppen zwölf verschiedene, im menschlichen Serum enthaltene Apolipoproteine beschrieben, welche spezifisch in den einzelnen Lipoproteinklassen auftreten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften der unterschiedlichen Apolipoproteinklassen. Unverändert übernommen und online verfügbar unter: <http://link.springer.com/search?query=Tab.+24.3&search-within=Book&facet-book-doi=10.1007%2F978-3->

Apolipoprotein	Lipoprotein	Molekülmasse (kDa)	Syntheseort	Funktion
A I	Chylomikronen, HDL	28,5	Leber, Darm	Strukturelement, Aktivator der LCAT
A II	HDL	17	Leber	Strukturelement, Aktivator der hepatischen Lipase
A IV	Chylomikronen, HDL	46	Darm	Strukturelement, Aktivator der LCAT
A V	VLDL, HDL	38	Leber	Aktivator der hepatischen Lipase
B ₁₀₀ *	VLDL, LDL	513	Leber	Ligand des ApoB ₁₀₀ -Rezeptors
B ₄₈ *	Chylomikronen	241	Darm	Strukturelement
CI	Chylomikronen, VLDL, HDL	7,6	Leber	Aktivator der LCAT
CII	Chylomikronen, VLDL, HDL	8,9	Leber	Aktivator der LPL
CIII	Chylomikronen, VLDL, HDL	8,7	Leber	Inhibitor der LPL
D	HDL	33	Leber	Aktivator der LCAT, Strukturelement
E	Chylomikronen, VLDL, HDL, (LDL)	34	Leber	Ligand des ApoE-Rezeptors
M	HDL, VLDL	13	Leber, Nieren	Unbekannt

* Nicht austauschbare Apolipoproteine.
LCAT: Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase; LPL: Lipoproteinlipase.

Bemerkenswert ist hierbei, dass ApoB₁₀₀, wie auch ApoB₄₈ die einzig nicht austauschbaren Proteine der Apolipoproteine sind, sondern immer, wie im Fall von ApoB₁₀₀ Teil der VLDL oder LDL sind bzw. ApoB₄₈ immer in Chylomikronen zu finden ist,. Dagegen sind die Proteine der Gruppe A, C, D und E wasserlöslich und zwischen den Lipoproteinen austauschbar.

Während Chylomikronen ein Lipid- Proteinverhältnis von 98:2 aufweisen, kann sich das bis zu den HDL hin zum Verhältnis 50:50 verschieben.

1.1.1 AUFGABEN DER UNTERSCHIEDLICHEN LIPOPROTEINKLASSEN

Zu ihrem Ort der Entstehung und ihren Aufgaben lässt sich über Lipoproteine zusammengefasst sagen, dass der Großteil in der Leber produziert wird und dass sie für den Transport von Lipiden vom Aufnahmeort zur Leber und von dort weiter zum extrahepatischen Gewebe und zurück verantwortlich sind. Ein Fehlen von diversen Komponenten (z.B. Rezeptoren, Enzyme, Regulatoren) dieses Kreislaufes kann zu schweren Einschränkungen der Vitalität im Organismus führen.

Chylomikronen sind sehr reich an den in den Mukosazellen der Darmschleimhaut resynthetisierten TAG, welche zuvor über die Nahrung aufgenommen und durch die Pankreaslipase gespalten wurden. Über die intestinalen Lymphgänge sammeln sie sich im Ductus thoracicus, bevor sie über die Pfortader weiter zur Leber transportiert werden. Vom Prinzip her ähnlich, aber noch nicht vollständig aufgeklärt funktioniert der Aufbau der VLDL, welche gegenüber den Chylomikronen einen leicht gesteigerten Gehalt an Phospholipiden und Cholesterin zeigen und in der Leber synthetisiert werden. Besondere Aufmerksamkeit gilt hierbei im Allgemeinen den cholesterinreichen VLDL, welche als Folge von hohem Cholesterinspiegel in der Leber entstehen und potentiell Arteriosklerose auslösen können. Auf den genaueren Entstehungsprozess dieser Erkrankung wird später noch näher darauf eingegangen. Chylomikronen sowie auch VLDL tauschen durch Wechselwirkung mit HDL-Partikeln ihre Apolipoproteinkomposition aus. Im Speziellen erfolgt ein Austausch der Klassen ApoE und ApoC, was zur Folge hat, dass die an der Plasmamembran von Kapillarendothelzellen und extrahepatischem Gewebe sitzende Lipoproteinlipase (LPL) aktiv wird, deren Cofaktor unter anderem die Subklasse ApoCII ist und welche die Spaltung von TAGs in Glycerin und Fettsäuren katalysiert. Diese freien Fettsäuren werden vom umliegenden Gewebe als Energiequelle genutzt und aus dem VLDL-Partikel entsteht durch die Spaltung zuerst ein Lipoprotein mittlerer Dichte (IDL = *intermediate-density lipoprotein*), bevor daraus durch weiteres Prozessieren das etwas dichtere LDL gebildet wird. Von den 4 Klassen der Lipoproteine, weisen LDL den höchsten Gehalt an Cholesterin bzw. Cholesterinester auf und transportieren diese Metabolite zur Leber und den extrahepatischen Geweben, wo deren Biosynthese reguliert wird. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei der an der Oberfläche von extrahepatischen Zellen sitzende LDL – Rezeptor, deren

Ligand das Apolipoprotein B₁₀₀ am LDL ist. Eine detaillierte Beschreibung der Funktion dieses Rezeptors findet sich im Anschluss an dieses Kapitel unter 1.1.2 Exkurs: LDL-Rezeptor.

Die noch ausstehende Klasse der HDL wird aufgrund ihrer zentralen Rolle in dieser Arbeit in einem eigenen Kapitel ausführlicher behandelt. Im Wesentlichen ist HDL aber für den reversen Cholesterintransport vom extrahepatischen Gewebe zur Leber und somit zum Ort der Ausscheidung verantwortlich und gilt zudem in der Zirkulation als entzündungshemmend, antioxidativ und antiatherogen wirksam [2–4].

1.1.2 EXKURS: LDL-REZEPTOR

Der Rezeptor, aufgebaut aus einer Transmembrandomäne, einem N-terminalen extrazellulären Anteil sowie einem intrazellulären C-Terminus, wird als Vorläuferprotein im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und weiter im Golgi-Apparat prozessiert, bevor er an der Zelloberfläche, bereit für die Interaktion mit sich an LDL - befindlichen ApoB₁₀₀, erscheint. Bei erfolgreicher Bindung eines Liganden kommt es zur Endozytose der Komplexe durch Wechselwirkung des Adapterproteins AP2 der Rezeptoren mit Clathrin und anschließender Bildung von *coated pits* und später *coated vesicles*. Nach Auflösung der Clathrinschicht bilden sich durch ATP-getriebenem Aufbau eines Protonengradienten frühe Endosomen mit saurem pH-Wert, welcher die Dissoziation von LDL und Rezeptoren bewirkt. Während letztere rezykliert und zurück an die Zelloberfläche transportiert werden, werden die Lipoproteine in Lysosomen abgebaut, wo zudem auch der in LDL enthaltene Cholesterinester durch eine saure Lipase in freies Cholesterin gespalten wird, welches weiter ins Cytosol übergeht und infolge einerseits am ER durch Aktivierung einer Signalkaskade die Cholesterinbiosynthese hemmt und andererseits über einen allosterischen Effekt die Acyl-CoA-Acyltransferase (ACAT) aktiviert. Diese führt wiederum zur Veresterung des freien Cholesterins in der Zelle und zur Speicherung der entstandenen Cholesterinester in Lipidtröpfchen. Somit spielt der LDL- Rezeptor eine bedeutende Rolle im Cholesterinstoffwechsel und assoziierten pathologischen Zuständen, was LDL-Rezeptor – Knock - Out Versuche in den Fokus vieler Studien brachte [3].

1.2 HDL

Diese Klasse der Lipoproteine umfasst eine sehr uneinheitliche Gruppe von Proteinen mit unterschiedlicher Form und Komposition. Je nach Protein- sowie Lipidgehalt können mindestens drei verschiedene Subgruppen unterschieden werden:

- Diskoidale HDL
- HDL₂ (8,8 – 12 nm Durchmesser)
- HDL₃ (7,2 – 8,8 nm Durchmesser) [5]

Das dominierende Apolipoprotein von HDL stellt das ApoA-I dar, welches von der Leber in einer lipidarmen Form sekretiert wird [4]. Diskoidale HDL entstehen durch Bindung von Cholesterin und Phospholipiden mit den für HDL-charakteristischen Apolipoproteinen ApoA-I und A-II, welche neben der Neusynthese in Leber- und intestinalen Mucosazellen auch durch Transfer von triacylglycerinreichen Chylomikronen und VLDL zur Verfügung stehen. Eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Lipide auf HDL spielen hierbei der ATP-abhängige Lipidtransporter ABCA1 (ABC=ATP *binding cassette*) und das Phospholipidtransferprotein (PLTP). Die initiale Lipidierung der ApoA-I-Partikel erfolgt überwiegend in Leber- und Darmzellen [6]. Das ebenfalls in der Leber produzierte Enzym, Lecithin- Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT), bindet an ApoA-I und katalysiert die Umsetzung von Cholesterin und Phosphatidylcholin (PC) in Cholesterinester und Lysophosphatidylcholin (LPC) mit der Folge, dass das HDL eine micelläre, kugelige Form annimmt, einerseits durch Akkumulation der hydrophoben Cholesterinester im Kern und andererseits durch Abdiffundieren des wasserlöslichere LPC aus der Oberfläche. Der dadurch frei werdende Platz wird mit Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe (reverser Cholesterintransport), ermöglicht durch die Lipidtransportproteine ABCA1 und ABCG1, die den Transfer durch die Plasmamembran vermitteln, aufgefüllt. Die dabei entstehende Fraktion des HDL₃ wird durch LCAT weiter modifiziert und nimmt Material aus den beim Abbau von VLDL entstehenden Resten auf. Durch diesen Übertrag von Phospholipiden und ApoC und E entsteht HDL₂. Als HDL₁ bezeichnet man jenen Anteil von HDL₂, welcher nur ApoE enthält [3]. Während es mit Methoden, wie zum Beispiel sequentieller Ultrazentrifugation, Massenspektrometrie, Gradientengel-elektrophorese, bereits viele Möglichkeiten zur Bestimmung der Partikelgröße und Zusammensetzung des HDL gibt, konnte bisher noch kein zufriedenstellendes Assay, welches auch im Hochdurchsatzverfahren anwendbar ist, zur Bestimmung der Funktionalität von HDL entwickelt werden [7].

Für die Aufnahme der in HDL transportierten Lipide aus dem extrahepatischen Gewebe, wie auch in die Leber, und somit dem Ort ihrer weiteren Metabolisierung und Ausscheidung, sind neben einer möglichen direkten Aufnahme des HDL₂ durch Rezeptoren für ApoE und ApoA-I folgende Wege beschrieben:

- * Aufnahme von Cholesterinester durch *scavenger receptor*-B1 (SR-B1-Rezeptor), wobei aus HDL₂ wieder diskoidales HDL oder HDL₃ entsteht.
- * Ein durch Cholesterinester-Transportprotein (CETP) vermittelter Austausch von TAGs der VLDL mit Cholesterinester der HDL₂, woraufhin VLDL durch die Anreicherung mit Cholesterinester eine Ähnlichkeit mit LDL entwickeln und am LDL-Rezeptor binden und aufgenommen werden können. Dieser CETP-vermittelte Austausch von Cholesterin des protektiven HDL hin zur Klasse des als atherogen geltenden VLDL bzw. LDL bringt möglicherweise proatherogene Effekte mit sich, was auch zur klinischen Untersuchung der medikamentös vermittelten Hemmung von CETP führte. Bisher konnte aber noch keine erfolgreiche Form dieses vielversprechenden Therapieansatzes etabliert werden.
- * Abbau der TAG-reichen HDL₂ durch die hepatische Triacylglycerinlipase (HL) lässt wiederum diskoidales HDL und HDL₃ entstehen [3, 4].

1.2.1 EXKURS: CHOLESTERIN

Einen wichtigen Metabolit für den menschlichen Organismus stellt das Cholesterin dar. Essentiell für die Bildung von Steroidhormonen und neben Phospholipiden und Sphingolipiden ein typisches Membranlipid tierischer Zellmembranen, wird es entweder über die Nahrung aufgenommen und kann zudem auch endogen synthetisiert werden. Bemerkenswert ist dabei, dass zwei Drittel des täglichen Cholesterinbedarfs über die Biosynthese gedeckt werden, während nur ein Drittel über die Nahrung aufgenommen wird, wobei es als typisches Produkt des tierischen Metabolismus in größeren Mengen nur in tierischen Produkten, wie beispielsweise Muskelfleisch und Eigelb vorkommt. Viele Zellen des Körpers haben die Möglichkeit, Cholesterin in Form von Cholesterinester intrazellulär zu speichern. Der Abbau des Cholesterins gestaltet sich hingegen aufgrund des Steranskeletts als nicht durchführbar und so kann dieses Ringsystem nur durch einer in der Leber stattfindenden Umwandlung zu Gallensäuren, welche wiederum für eine funktionierende Lipidverdauung unerlässlich sind, weiter verstoffwechselt und letztendlich ausgeschieden werden. Aufgrund seines Aufbaus zählt Cholesterin zu den Isoprenlipiden und wird in einer Kette von Reaktionen, ausgehend vom Acetyl-CoA aufgebaut. Die Bildung gliedert sich in folgende vier Phasen:

- * Bildung von Mevalonat aus Acetyl-CoA unter Beteiligung der HMG-CoA-Reduktase (β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-CoA)
- * Aus der Mevalonsäure entsteht „aktives Isopren“ (Isopentenylpyrophosphat)
- * Kondensation zum Squalen (30 C-Atome)
- * Über 22 Teilreaktionen zyklisiert Squalen zum Cholesterin

Der Zusammenhang zwischen aufgenommenem Cholesterin und der Geschwindigkeit der endogenen Biosynthese ist schon seit Längerem bekannt und lässt sich durch sogenannte Sterolregulationselemente 1 (SRE-1) in der Promotorregion wichtiger Synthesegene erklären. Versuche haben gezeigt, dass sich besonders die mRNA Menge kodierend für die HMG-CoA-Reduktase, die HmG-CoA-Synthase, die Prenyltransferase, aber auch den LDL-Rezeptor von der vorherrschenden Cholesterinkonzentration beeinflussen lässt. SRE1 gilt als *enhancer*, der bei erfolgter Bindung von Transkriptionsfaktoren (sogenannten *sterol regulatory element binding proteins* = SREBP) die Transkription obiger genannter Gene induziert. Im Detail bindet SREBP in der Membran des ER an ein aus 8 Transmembrandomänen bestehendes Protein, welches als SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*) bezeichnet wird. Fünf dieser Transmembrandomänen dienen als Cholesterinsensor, dessen Aktivierung bei ausreichender Cholesterinkonzentration dazu führt, dass der SREBP-SCAP Komplex an ein weiteres Protein, dem sogenannten Insig (*insulin induced gene*), bindet und somit in der ER-Membran fixiert wird. Kann kein Cholesterin am SCAP binden, löst sich der Komplex und wandert weiter zum Golgi-Apparat, wo SREBP von zwei Proteasen (S1P und S2P) geschnitten wird und der dadurch freigesetzte N-Terminus, bestehend aus einem Helix-turn-Helix Motiv, weiter in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor wirkt und zu einer verstärkten Transkription aller an der Cholesterinbiosynthese beteiligten Gene führt. Neben der beschriebenen Regulation auf Transkriptionsebene, spielt vor allem die HMG-CoA-Reduktase als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym bei der Synthese des Cholesterins eine entscheidende Rolle. Vergleichbar mit SCAP, ist die HMG-CoA-Reduktase in der Membran des ER lokalisiert und hat durch die Transmembrandomänen ebenfalls sensorische Eigenschaften, sensitiv für Cholesterin und Oxysterole. Bei Bindung solcher Moleküle werden eine Ubiquitinierung und der damit verbundene Abbau des Enzyms induziert. Überdies wird die HMG-CoA-Reduktase auch durch eine reversible Phosphorylierung inaktiviert, welche durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) vermittelt wird. Letztere ist wiederum bei gesteigerten AMP-Konzentrationen in der Zelle aktiv, ausgelöst unter anderem bei Zuständen des Energiemangels, wo es sinnvoll erscheint, auf energetisch aufwendige Syntheseprozesse zu verzichten.

Wie bereits erwähnt, kann das Sterangerüst des Cholesterins nur in Form von Gallensäuren schlussendlich ausgeschieden werden. Zudem hat sich auch herausgestellt, dass die Cholesterinbiosynthese über die Konzentration der Gallensäuren reguliert wird und deren Rückresorption auch im engen Zusammenhang stehen. Diese Wechselbeziehungen werden auch beispielsweise bei der Behandlung von Hypercholesterinämien klinisch genutzt. Neben den Gallensäuren, die über 7 α -Hydroxylcholesterin aus dem Cholesterin entstehen, sind hauptsächlich Wasser, aber in geringen Mengen auch Mucin und Gallenfarbstoffe, Cholesterin, Fettsäuren sowie anorganische Salze, Bestandteile der Galle im Menschen. Man konnte zeigen, dass über 90% der Gallensäuren, welche mit der Galle in den Duodenum zur Lipidverdauung

eingbracht werden, im Ileum über ein aktives Transportsystem resorbiert und in Folge über die Pfortader zurück zu deren Bildungsort, der Leber, transportiert werden. Dieser Vorgang wird auch als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet. Durch die hydrophobe Struktur des Cholesterins ist dieses im wässrigen Milieu unlöslich und erfordert einen durch die Gallensäuren vermittelten Transport als micelläre Lösung, die als weiteren Bestandteil unter anderem auch Phosphatidylcholin enthält. Wird ein bestimmter Grenzwert einer jeweiligen Komponente in der Zusammensetzung überschritten, kommt es zur Bildung von Kristallen, welche die Basis für die Entstehung von Gallensteinen legen können. Aufgrund der Tatsache, dass 80% der Gallensteine cholesterinreich sind und 50% reine Cholesterinkristalle sind, begann man Betroffene mit der Gabe von Gallensäuren zu therapieren, was neben einer Änderung des Verhältnisses von Cholesterin, Phosphoglyceriden und Gallensalzen auch eine Hemmung der Cholesterinbiosynthese und somit auch der Cholesterinausscheidung mit sich bringt und teilweise ein Weiterwachsen hemmte oder gar das Auflösen von Gallensteinen bewirkte [3].

Bedenkt man die bedeutende Rolle des Cholesterins, erscheint es als selbstverständlich, dass bei einem Ungleichgewicht in den Mengenverhältnissen verschiedene pathologische Zustände auftreten können. So ist beispielsweise die Hypo- α -Lipoproteinämie (Tangier-Erkrankung) verursacht durch eine Mutation im ABCA - 1 Transporterprotein mit deutlich erniedrigten HDL - und Cholesterinspiegel im Plasma verbunden. Die Beladung der HDL-Partikel im Rahmen des physiologisch ablaufenden reversen Cholesterintransportes ist dabei über den ABCA1 Weg nicht möglich, was zu einer Cholesterinablagerung in retikuloendothelialen Zellen führt und mitunter auch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen mit sich bringen kann [3].

Ein bedeutendes Regulatorprotein im Stoffwechsel der Lipoproteine im Menschen stellt das CETP dar. Wie bereits erwähnt, vermittelt es den Austausch von CE aus HDL und TAG von VLDL/LDL und stellt somit ein entscheidendes Bindeglied im reversen Cholesterintransport (RCT) vom extrahepatischen Gewebe hin zur Leber dar. Im Menschen erfolgen in etwa 70% der Cholesterin Clearance über den CETP - abhängigen, indirekten Pfad durch Austausch von CE mit TAG aus ApoB enthaltende Lipoproteine (VLDL und LDL). Pharmazeutisch eingesetzte Inhibitoren von CETP zur Einschränkung arteriosklerotischer Veränderungen konnten in durchgeführten, klinischen Studien noch nicht die erwartenden gewünschten Effekte zeigen. Jedenfalls konnte aber herausgefunden werden, dass es durch eingeführte Mutationen im Protein zu einer Verschiebung der Transportraten der unterschiedlichen Metabolite, CE und TAG kommt. Daraus ergeben sich neue Ansätze, die darauf abzielen, durch eine Präferenz des CETP für den Transport von Cholesterinester gegenüber von TAG einen gesteigerten Gesamtefflux der CE aus dem HDL erreichen zu können, wodurch theoretisch aus der Peripherie mehr Cholesterin aufgenommen und abtransportiert werden könnte [8].

1.2.2 REGULATION WICHTIGER PROTEINE IM HDL – STOFFWECHSEL

Die Tatsache, dass funktionelles HDL in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Verbesserung des Gesundheitszustandes assoziiert ist, lässt ein höheres Plasma - Level an HDL – Cholesterin immer wieder als Therapieansatz in den Fokus vieler Forschungsgruppen treten. Die Ansätze reichen dabei von der Stimulation einzelner wichtiger Gene für den Aufbau des Lipoproteins, bis hin zur Hemmung von Proteinen, die mit HDL interagieren und die Zusammensetzung des HDL verändern, wie zB. CETP.

Die Verfügbarkeit wichtiger Proteine im HDL Metabolismus kann auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden und betrifft im Fall von HDL aufgrund des besonderen Aufbaus und der Funktion dieses Lipoproteins eine Vielzahl von Genen. Im Grunde zählen dazu ApoA - I, ApoE, apoM, ABCA1, ABCG1, CETP, PLTP, die Gallensäuretransporter ABCG5/ABCG6, sowie der HDL – Rezeptor SR - BI. Eine entscheidende Möglichkeit zur Regulation passiert auf der Ebene der Transkription, wo durch Abschreiben der Information der DNA zur RNA der Grundstein für die Synthese von Proteinen gelegt wird. In Bezug auf HDL spielen dabei Steroidhormonrezeptoren eine Schlüsselrolle, welche zur Gruppe der nukleären Rezeptoren zählen. Prinzipiell werden diese Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von Steroidhormonen (Östrogen, Androgene, Glukokortikoide, etc.) aber auch von Produkten des Intermediärstoffwechsels, wie beispielsweise Gallensäuren, Fettsäuren, und Cholesterin-derivaten aktiviert und sind durch hoch konservierte Strukturmerkmale gekennzeichnet. Unter anderem zählen dazu eine Ligandenbindedomäne und eine DNA-Bindedomäne, charakterisiert durch zwei Zinkfinger – Motive, welche notwendig für die Bindung sogenannter *hormone response elements* (HRE) in der Promotorregion der jeweiligen Gene sind. Die Kernrezeptoren wirken dabei als Homo - bzw. Heterodimere und können vor Ligandenbindung entweder cytosolisch lokalisiert sein oder permanent bereits an der DNA gebunden sein und erst nach Aktivierung durch den entsprechenden Liganden unter Zusammenwirken mit weiteren Coaktivatoren eine Transkription des Zielgenes auslösen. Als Beispiel für die Komplexität der Genregulation ist in Abbildung 1 eine Auflistung der beteiligten Transkriptionsfaktoren für das ApoA - I Gen dargestellt. Außerdem ist durch (Block-) Pfeile der Einfluss verschiedener Substanzen (Hormone, Medikamente...) auf die jeweiligen Kernrezeptoren und regulatorischen Elemente angedeutet.

Einen Schritt weiter, kann die Expression von Proteinen auch durch die Wirkung von non-coding RNAs und microRNAs (miRNA) kontrolliert werden. Diese Sequenzen können an sogenannte *3'-untranslated regions* (UTRs) der Ziel – mRNA binden und deren Abbau auslösen oder eine Translation verhindern. Als weitere Möglichkeiten zur Regulation kann die Wirkung bzw. Bindung spezieller Proteine auch die posttranslationalen Modifikationen und abschließende Sekretion des fertigen Proteins vom ER über den Golgi – Apparat in das Cytosol bzw. den Transport an die Zellmembran verhindern. Als Beispiel dafür verhindert eine

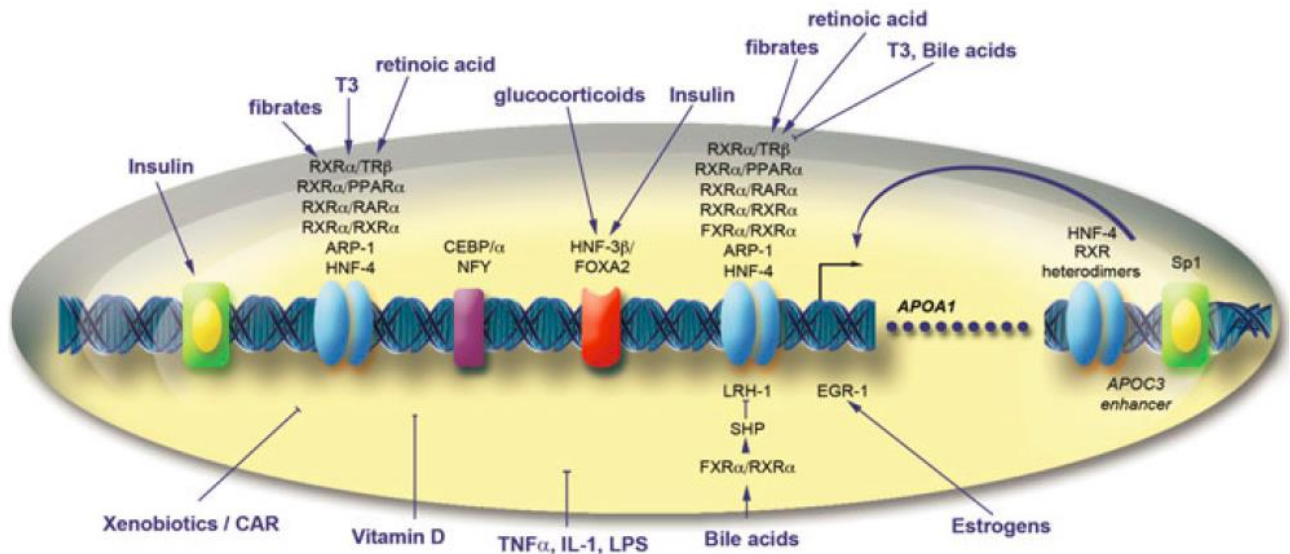


Abbildung 1: Regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktoren, die die Expression von ApoA-I kontrollieren.

Pfeile und Blockpfeile zeigen Aktivierung bzw. Inaktivierung an. Verwendete Abkürzungen: retinoic acid receptor (RAR); retinoid X receptor (RXR); thyroid receptor β (TR β); farnesoid X receptor (FXR); hepatocyte nuclear factor (HNF); apoA-I regulatory protein (ARP-1); forkhead box 2 (FOXA2); nuclear factor Y (NFY); CCAAT/enhancer – binding protein (CEBP); liver receptor homologue-1 (LRH-1); small heterodimer partner (SHP); specificity protein 1 (Sp1); tumor necrosis factor α (TNF α); interleukin-1 (IL-1); lipopolysaccharide (LPS). Eckardstein A von, Kardassis D, editors. High density lipoproteins: From biological understanding to clinical exploitation. Cham: Springer; 2015.

Interaktion des Enzyms Serinpalmitoyltransferase 1 (SPTLC1) mit ABCA1 einen Weitertransport des Proteins vom ER hin zum Golgi – Apparat. Nicht zuletzt, beeinflusst auch die Abbaurate die Verfügbarkeit der Proteine, die im Fall von ABCA1 neben anderen proteolytischen Wegen Calpain – vermittelt ablaufen kann. Im Detail handelt es sich bei Calpain um eine Protease, die im cytosolischen Loop von ABCA1 die Peptidsequenz PEST (Prolin, Glutaminsäure, Serin, Threonin) erkennt und schneidet. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion dieser Sequenz zu einem erhöhten Auftreten des ABCA1 Transporters in der Plasmamembran und einer damit verbundenen Verstärkung der ApoA-I - Bindung führt [5].

1.2.3 ARTERIOSKLEROSE UND DIE ROLLE DES HDL

Weltweit zählen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und im besonderen Arteriosklerose mit eintretenden akuten Folgeereignissen zur häufigsten Todesursache weltweit. So lag beispielsweise auch in den Jahren 1998 bis 2009 in Österreich in beinahe 50% aller Todesfälle eine Erkrankung des Herz – Kreislaufsystems als Ursache zugrunde [9]. Um diesen Trend umzukehren, ist allgemein anzustreben, die beeinflussbaren Risikofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose, wie Ernährung und Bewegung, im alltäglichen Leben in Bedacht zu nehmen und dementsprechend anzupassen. In jedem Fall betrifft diese Erkrankung einen Großteil der Bevölkerung und die Zahl der Betroffenen ist jährlich im Steigen begriffen. Neben den

durch den Lebenswandel bedingten Faktoren, gilt auch die genetische Prädisposition als Risiko, was in einigen Fällen zur Manifestation der Krankheit beitragen kann.

Als Grundlage zur Entstehung der Arteriosklerose ist vor allem ein Ungleichgewicht in der Funktion der Lipoproteine, wie in 1.1.1 Aufgaben der unterschiedlichen Lipoproteinklassen) beschrieben, ausschlaggebend. Es gilt als bewiesen, dass eine zu hohe Serumkonzentration an LDL Auslöser für Arteriosklerose ist, während ein hoher Spiegel an HDL-Cholesterin (HDL-C) mit vorbeugenden Effekten assoziiert ist. Einen wichtigen Grundstein für diese Erkenntnis legte bereits im Jahr 1976 die Framingham Studie, welche zeigte, dass eine niedrige Serumkonzentration an HDL - C signifikant und unabhängig mit einem erhöhten Risiko an Tod durch Herzinfarkt einhergeht. Diese Beobachtungen wurden durch viele weitere Studien bestätigt und so fand man heraus, dass niedrige HDL - C Konzentrationen auch bei insulinresistenten Zuständen, wie Diabetes Typ2 und dem Metabolischen Syndrom vorherrschend sind und wahrscheinlich für eine zusätzliche Belastung des Herz-Kreislaufsystems in diesen Patienten verantwortlich ist. Physiologisch, kommt es im genährten Zustand des Organismus zu einer Insulin - vermittelten Suppression der Lipolyse in Fettzellen. Durch Insulinresistenz findet diese Lipolyse trotz einer postprandialen Erhöhung der Insulinkonzentration in der Zirkulation weiterhin statt und führt zu einer verstärkten Freisetzung von freien Fettsäuren, welche teilweise nach ihrem Transport zur Leber eine gesteigerte Bildung von TAG - reichen VLDL und LDL induzieren. Durch Interaktion der einzelnen Lipoproteinklassen entstehen unter anderem TAG - reiche LDL, welche nach Spaltung durch die hepatische Lipase als kleine, dichtere Partikel besonders oxidationsanfällig sind und bevorzugt von in Gefäßen sitzenden Makrophagen aufgenommen werden können und dadurch das Fortschreiten der Bildung eines arteriosklerotischen Plaques induzieren [4].

Neben den unterschiedlichen anti-atherogenen Eigenschaften, die mit HDL assoziiert sind, wie z.B. anti-oxidativ und entzündungshemmend, wird die Fähigkeit zum Abtransportes von Cholesterin, auch als reverser Cholesterintransport (RCT) bezeichnet, aus nicht zu dessen Abbau befähigten Zellen immer wieder als wichtigste Eigenschaft des HDL genannt, um arteriosklerotischen Veränderungen in den Gefäßen vorzubeugen [10]. Eine nähere Beschreibung dazu findet sich im Kapitel 1.2.4 HDL vermittelter Cholesterin Efflux. Trotz dieser vermeintlich eindeutigen Hinweise auf die antiatherogenen Effekte von HDL, sind in der Literatur immer wieder kontroverse Erkenntnisse dazu zu finden, wie beispielsweise auch eine Analyse von aufgetretenen Myokardinfarkten, verglichen mit gesunden Kontrollen zeigte. Hier führte ein einzelner Nukleotidpolymorphismus (*single nucleotid polymorphism* SNP) im Bereich des EL – Gens zu einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration von HDL – Cholesterin, welches aber nicht mit einer protektiven Wirkung gegen das Eintreten eines Myokardinfarktes verbunden war. Zusammenhänge wie diese, lassen die Fragen auftauchen, inwiefern ein Zusammenhang zwischen Plasmakonzentrationen von HDL - C und Arteriosklerose bzw. EL und vaskulären

Effekten gegeben ist [11]. Generell stellte sich in letzter Zeit immer mehr heraus, dass nicht unbedingt ein hoher Plasmaspiegel an HDL – C vor Arteriosklerose schützt, sondern vielmehr die Fähigkeit des HDL, den Cholesterinefflux zu stimulieren. Diese Bewertung erweist sich aber aufgrund unzureichender in der Routine einsetzbaren Messmethoden noch als schwierig, weshalb man nach wie vor die viel einfacher zu bestimmenden Plasmakonzentrationen heranzieht [12].

KRANKHEITSVERLAUF DER ARTERIOSKLEROSE:

Arteriosklerose ist eine Krankheit, die mit chronisch - entzündlichen Veränderungen der Blutgefäße verbunden ist und welche durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden kann. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das LDL bzw. genauer gesagt, die Menge an LDL. Wird ein bestimmtes Maß an LDL in der Zirkulation überschritten, so wandern mehr LDL-Partikel in die Gefäßwände ein, als abtransportiert werden können und ziehen eine Akkumulation dieser Lipoproteine nach sich. Bei der Anhäufung kommt es zu Modifikationen des LDL und mitunter häufig auch zur Oxidation der Partikel, was in den Endothelzellen die Expression des *monocytic chemotactic proteins* (MCP) auslöst und somit den Stein zur Entzündungsreaktion ins Rollen bringt. Eingewanderte Monozyten differenzieren weiter zu Makrophagen und nehmen über *scavenger* Rezeptoren mehr LDL auf, was infolge zur Bildung der für Arteriosklerose charakteristischen, lipidgefüllten Schaumzellen führt. Diese aktivierten Makrophagen sekretieren ein weiteres Spektrum an Zytokinen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1, was die Entzündungsreaktion weiter anheizt [4]. Im Detail, sind die Adhesionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin entscheidende Faktoren für die Einwanderung der Leukozyten, wobei erstere Proteine aufgrund ihrer Struktur zur Immunglobulinfamilie zu zählen sind und mit leukozytenspezifischen Integrinen wechselwirken. Während ICAM-1 konstitutiv an den Endothelzellen vorhanden ist, werden E-Selektin und VCAM-1 nur in Antwort auf entzündungsfördernde Zytokine exprimiert. Es gilt als akzeptiert, dass HDL die Expression genannter Adhesionsmoleküle hemmen kann. Ein beschriebener Mechanismus ist dabei die HDL-vermittelte Hemmung der Sphingosinkinase in Endothelzellen. Dieses Enzym spielt eine Schlüsselrolle in der durch TNF- α ausgelösten Expression von Adhesionsmolekülen. Eine Hemmung führt dazu, dass in weiterer Folge der *nuclear factor kappa β* (NF- κ B) nicht mehr in den Kern translozieren kann und somit die Transkription der E-Selektingene ausbleibt [13]. Aufbau, Lage und Art der beteiligten Zellen der arteriosklerotischen Plaques entscheiden über den weiteren Krankheitsverlauf für Betroffene. Bei geringer Stabilität kann es zum Ablösen kommen, was infolge zu akuten Zuständen durch Verstopfen wichtiger Versorgungsgefäße führen kann. So ist beispielsweise die Arteriosklerose der Halsschlagadern eine der häufigsten Ursachen für eintretende Schlaganfälle, welche durch akute Unterversorgung des Gehirns mit Blut charakterisiert ist und oft auch zum Tod führen kann [14].

1.2.4 HDL VERMITTELTEN CHOLESTERIN EFFLUX

Die Tatsache, dass viele extrahepatischen Zelltypen das Cholesterin nicht weiter katabolisieren können und eine Anhäufung cytotoxisch wirkt, erfordert einen Lipoprotein-vermittelten Abtransport aus der Zelle. HDL ist durch seine Fähigkeit über Interaktion mit anderen Zellen Cholesterin aufnehmen zu können, für den reversen Cholesterintransport (RCT) vom extrahepatischen Gewebe hin zur Leber, wo es mit der Gallensäure weiter verstoffwechselt und anschließend unter anderem über den Faeces ausgeschieden werden kann, verantwortlich [15]. Wie in Abbildung 2 dargestellt, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, wie der Transport von Cholesterin aus der Zelle erfolgen kann:

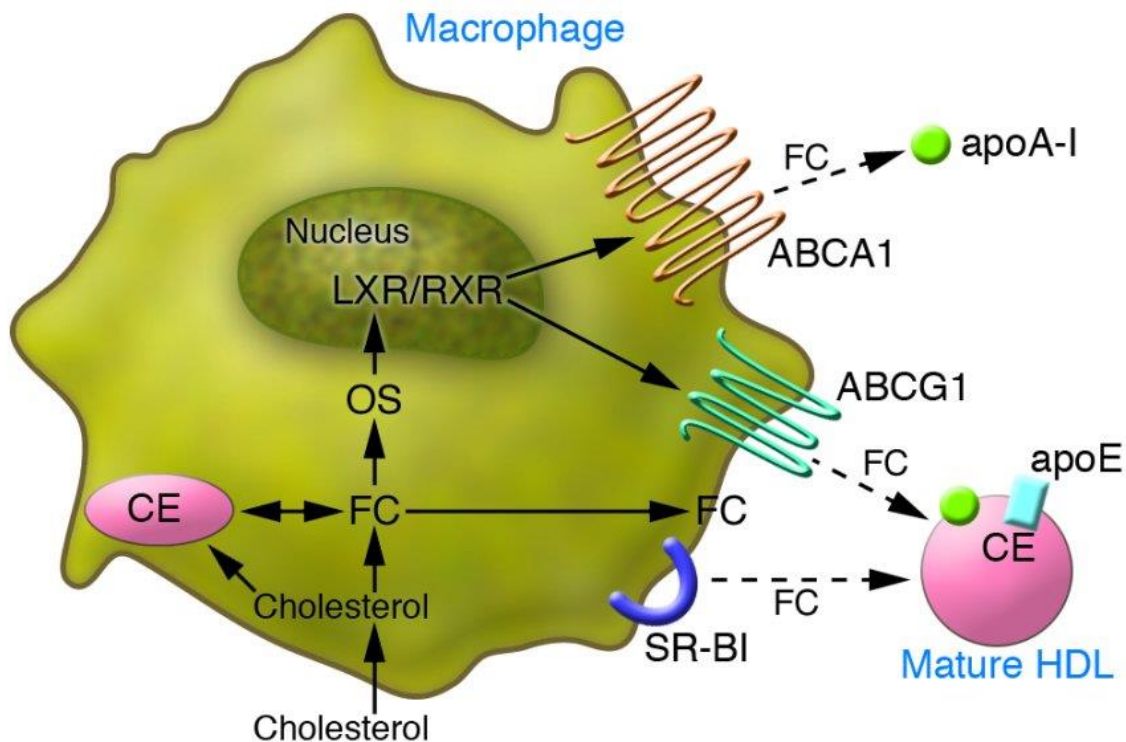


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten des Cholesterinabtransports aus der Zelle am Beispiel eines Makrophagen.

Neben der LXR/RXR regulierten Expression der beiden Transporterproteine ABCA1 und ABCG1 kann Cholesterin auch über SR-B1 oder Diffusion die Zelle verlassen. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: Implications for novel therapies. J. Clin. Invest. 2006;116:3090–100. doi:10.1172/JCI30163 [1]

Die unkomplizierteste Form ist wohl die nicht Protein-vermittelte, wässrige Diffusion, welche auf einfachen Diffusionsprozessen basiert und einen signifikanten Beitrag zum Efflux, beispielsweise in Makrophagen, leisten kann. Eine weitere Variante erfolgt über den *scavenger receptor type B1* (SR-B1), einem in der Leber stark exprimierten HDL Rezeptor, der bei Bindung auch wesentlich zum RCT durch Aufnahme transportierter Cholesterinester beiträgt. Im Gegensatz zu dieser selektiven Aufnahme von CE, kann er umgekehrt auch den Efflux von freiem Cholesterin vermitteln. Die Menge ist dabei von der Lipidkomposition der Plasmamembran und im Speziellen dem Verhältnis von Phospholipiden zu freiem Cholesterin abhängig [16].

Von den Möglichkeiten der passiven Diffusion des Cholesterins aus der Zelle, bis hin zum SR-B1 vermittelten Weg, ist der ABCA1-assoziierte Pfad, die am wahrscheinlich effektivste und auch am meisten erforschteste Variante. Hierbei erfolgt der Transfer von freiem Cholesterin auf überwiegend fettarme ApoA-I - Partikel. Zudem konnte aber auch gezeigt werden, dass mit ABCG1 ein weiteres Transporterprotein am Efflux von Cholesterin aus der Zelle, in diesem Fall hauptsächlich auf reifes, sphärisches HDL, beteiligt ist. Die Expression der beiden Transporter ABCA1 sowie ABCG1 wird hauptsächlich über die nuklearen *liver x receptors* α und β (LXR α und β) reguliert, welche in Bindung mit dem *retinoid X receptor* (RXR) als Heterodimere aktiv sind. Neben synthetischen LXR-Agonisten wird dieser Signalweg auch durch Oxysterole stimuliert, die aus intrazellulärem Cholesterin enzymatisch gebildet werden. Die Ergebnisse mehrerer Versuche unter Einsatz von LXR-Agonisten lassen die Modulation der Expression benannter Transporterproteine als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung der Arteriosklerose erscheinen. Die genaue Rolle von ABCG1 *in vivo* ist aber noch nicht vollständig geklärt. Im Experiment wurde beobachtet, dass Makrophagen ohne ABCG1 einen deutlich verminderten Transport von Cholesterin auf reifes HDL zeigten und Folge dessen eine Anhäufung Cholesterin und TAGs in Makrophagen stattfand. Paradoxerweise wurde unter diesen Umständen auch eine Reduktion der Arteriosklerose beobachtet, was sich möglicherweise durch die kompensatorische erhöhte Aktivität von ABCA1 und ApoE erklären lässt. Eine alternative Hypothese nennt die gesteigerte Anfälligkeit der ABCG1-defizienten Makrophagen für die Apoptose, induziert durch oxidiertes LDL, als mögliche Ursache für die beobachteten Effekte. Jedenfalls wird erwartet, dass zukünftig die gezielte Verstärkung einer oder mehrerer Cholesterineffluxmöglichkeiten von Makrophagen in der klinischen Behandlung der Arteriosklerose ihren Einsatz finden werden. Da der Transport aber zum Teil auch von der Verfügbarkeit entsprechender Akzeptormoleküle abhängt, stehen auch der Einsatz und die Entwicklung von effizienten ApoA-I- mimetischen Peptiden im Fokus der Wissenschaft. Während anfänglich noch an der Verwendung des synthetischen ApoA-I in gesamter Länge geforscht wurde, wechselte man allmählich immer mehr zu kürzeren Varianten, die vor allem durch ihre strukturelle Eigenschaften, insbesondere durch helikale, amphipathische Motive, in der Lage sind, die positiven Eigenschaften des HDL nachzuahmen [6].

ABCA1 TRANSPORTERPROTEIN:

Obwohl die genaue Struktur dieses Proteins noch nicht vollständig geklärt werden konnte, weiß man um die Wichtigkeit dieses Transporterproteins, dessen Expression in Abhängigkeit der Cholesterinkonzentration in der Zelle reguliert wird. Ein wichtiger Beitrag dazu wurde im Jahr 1999 bei der Entdeckung der Tangier-Krankheit geleistet, welche durch eine Mutation im ABCA1 gekennzeichnet ist. Im Versuch konnte dabei gezeigt werden, dass nach Inkubation von Schaumzellen mit ApoA-I eine gesteigerte Serumkonzentration an freiem Cholesterin zu finden ist, währenddessen bei Fibroblasten, isoliert aus Patienten mit Tangier Erkrankung, kein gesteigerter Cholesterinefflux festgestellt werden konnte. Aufgrund der bekannten Struktur eines verwandten Transporterproteins aus Bakterien, vermutet man einen Mechanismus der Transportfunktion, der aus zwei Schritten besteht. Durch ATP-Bindung und Hydrolyse der cytoplasmatischen Nukleotidbindedomänen, wird vermutlich der Konformationszustand der Transmembrandomäne kontrolliert. Je nach Konformationszustand, ergibt sich daraus eine Tasche in der Membran, die eine Translokation von Material von der cytosolischen Seite, hin zur äußeren Schicht des Phospholipidbilayers ermöglicht. Im Detail wird also angenommen, dass ABCA1 eine aktive Phospholipidtranslokaseaktivität zeigt, wobei neben Phosphatidylserin und Sphingomyelin bevorzugt Phosphatidylcholin transportiert wird. Durch diesen Vorgang findet gleichzeitig ein Abtransport von Phospholipiden und freiem Cholesterin auf lipidfreies ApoA-I statt. Die Herkunft dieses freien Cholesterins stellen dabei die Plasmamembran und endosomale Kompartimente dar und wird durch den Umstand ermöglicht, dass die Bestandteile der Plasmamembran einem ständigen Kreislauf von Internalisierung und Recycling mit endosomaler Beteiligung unterliegen. Durch intensive Forschungsarbeit konnte man feststellen, dass ABCA1 nach der Transkription sehr schnell abgebaut wird und dass die zelluläre Konzentration sensitiv auf die vorherrschende ApoA-I Verfügbarkeit reagiert. Dies erklärt sich durch den Umstand, dass beide Proteine eine Bindung eingehen, und der Transporter somit von Calpain (*calcium-dependent non-lysosomal cysteine protease*) vermittelter Proteolyse geschützt ist. Obwohl Studien zufolge keine besonderen strukturellen Anforderungen von ABCA1 bei Wahl der Akzeptormoleküle vorliegen und ein Transport auf verschiedene Apolipoproteinklassen möglich ist, scheint die Situation bei Interaktion mit ApoA-I aufgrund von beobachteten Unterschieden in der Effluxeffizienz als Antwort auf strukturelle Modifikationen, anders zu sein. Grund dafür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit das amphipathische Verhalten der C-terminalen α -Helix [16]. Die Wichtigkeit dieser Domäne bestätigte sich auch in Versuchen mit synthetisch hergestellten amphipathischen Molekülen, welche durch die ebenfalls helicale Struktur die tensideähnlichen Eigenschaften des ApoA-I nachahmen sollten. Tatsächlich konnte bei Einsatz sogenannter Polypro - II Helices, aufgebaut aus mehreren Einheiten von jeweils drei modifizierten Prolinresten, ein gesteigerter Cholesterinefflux *in vitro* nachgewiesen werden [17].

1.2.5 DIE ROLLE VON SR-B1 IM HDL METABOLISMUS

Der *scavenger receptor class B member 1*, oder kurz SR-B1 (Genname *SCARB1*), gehört zur Superfamilie CD36 der membrangebundenen Glykoproteine an Zelloberflächen, welche noch den *scavenger receptor CD36* und das lysosomale Membranprotein 2 (Genname *SCARB2*) beinhaltet. Diese Rezeptoren sind dazu in der Lage, modifizierte Formen von VLDL, LDL und HDL zu binden und durch die Zellmembran zu transportieren. Im Unterschied zu den anderen Mitgliedern dieser Familie, zeigt dabei SR-B1 eine besonders hohe Affinität für die selektive Aufnahme von Cholesterin aus HDL, ohne dabei die ApoA-I tragenden Partikel vollständig zu internalisieren und abzubauen. Das 82 kDa-große Membranprotein ist aus einer großen extrazellulären Domäne, sowie zwei Transmembrandomänen und zwei zytoplasmatischen amino- und carboxyterminalen Domänen aufgebaut und durch mehrere N-Glykosilierungsgebiete gekennzeichnet. Obwohl die erwartete Größe von murinem SR-B1 basierend auf der Aminosäurezusammensetzung nur 57 kDa beträgt, zeigte sich in Western-Blot Analysen von Geweben und kultivierten Zellen eine Größe von 80-84 kDa, bedingt durch die erhebliche Anzahl an posttranslationalen Modifikationen [5, 18].

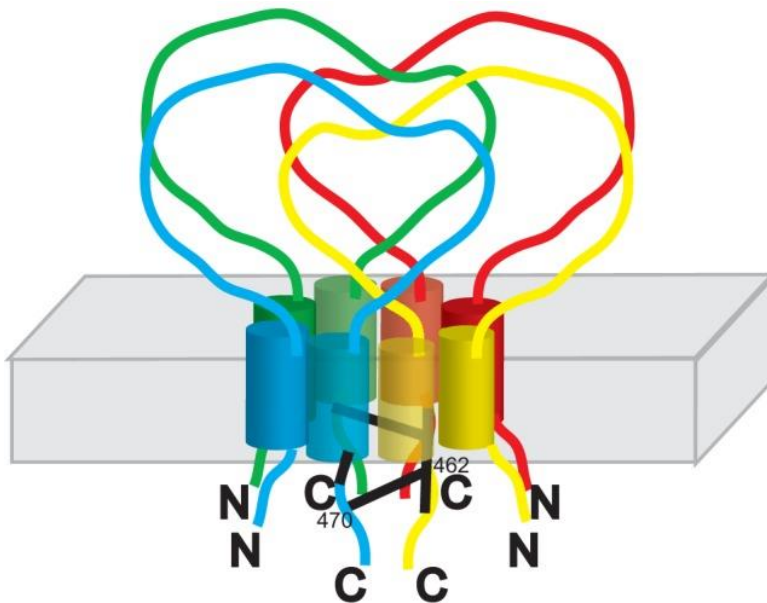


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines hypothetischen SR-B1 Tetramers

Mit Schwarz ist die möglicher Interaktion der Cysteinreste (Cys470 und Cys462) bei der Verbindung der C-Termini gekennzeichnet. Kent AP, Im Stylianou. Scavenger receptor class B member 1 protein: hepatic regulation and its effects on lipids, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Hepat Med* 2011;3:29–44. doi:10.2147/HMER.S7860

von Cholesterin aus der Zirkulation. Daneben findet man aber auch eine Expression von SR-B1 in steroidhormonproduzierenden Zellen, Makrophagen und auch Endothelzellen, welche Beobachtungen zufolge einer Feedback-Regulation unterliegt. Basierend auf diesen Erkenntnissen vermutet man, dass SR-B1 ein HDL-Rezeptor ist, der unter anderem Sterine für die Produktion von Steroidhormonen zur Verfügung stellt [19].

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, wird angenommen, dass mehrere SR-B1-Proteine durch Homooligomerisation Dimere oder Tetramere formen, wodurch ein hydrophober Tunnel in der Membran entsteht, durch den beispielsweise Cholesterinestermoleküle durchtreten können.

SR-B1 wird am stärksten in der Leber exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle in der bereits erwähnten, selektiven Aufnahme von HDL – Cholesterinester und dem damit verbundenen Entfernen

Es konnten bereits viele Wege identifiziert werden, die die Expression sowohl auf Proteinebene, als auch Transkriptionsebene regulieren. Ein wichtiger Regulationsfaktor von SR-B1 in der Leber ist beispielsweise das Adapterprotein *PDZ domain containing 1 (PDZK1)*, auch bekannt als *C-terminal linking and modulating protein (CLAMP)*, welches als einziges mit SR-B1 interagierendes Protein in Yeast-Two Hybrid Versuchen identifiziert werden konnte. Auf Transkriptionsebene wurden mehrere mitspielende Regulationswege erkannt, die auf komplexe Weise auch ineinander greifen. Beispiele für involvierte Transkriptionsfaktoren sind der *farnesoid X receptor (FXR)*, *liver X receptor (LXR)*, *retinoid X receptor (RXR)*, und auch *sterol regulatory element binding protein (SREBP)*. Weitere Faktoren, die Einfluss auf die Expression von SR-B1 nehmen, sind neben erhöhten Glukosespiegeln, Östrogen und der Ernährung die zur Behandlung von Hyperlipidämien eingesetzten Fibrate [18]. Letztere sind Medikamente, die über den *peroxisome proliferator-activator receptor (PPAR)* wirken und zu dessen Translokation als Heterodimer mit RXR zu den entsprechenden Response-Elementen im Zellkern führen und eine Stimulation des Lipidstoffwechsels nach sich ziehen [20]. Trotz vieler Zusammenhänge, die man im Laufe der Zeit bereits gewinnen konnte, ist die genaue *in vivo* Funktion dieses HDL-Rezeptors in der Leber noch nicht vollkommen geklärt und bleibt ein angestrebtes Ziel der Wissenschaft. Zur genaueren Lokalisation von SR-B1 im menschlichen Organismus hat man herausgefunden, dass sich der Rezeptor in der Leber sowohl auf Hepatozyten als auch auf den dort ansässigen Makrophagen, den Kupffer-Zellen und zusätzlich auch in den arteriosklerotisch - veränderten, großen Gefäßen und Koronararterien finden lässt. Dabei hat sich durch immunhistochemischen- und Western – Blot - basierten Methoden bestätigt, dass SR-B1 bei den Hepatozyten an der basolateralen, dem Lebersinus zugewandten, Membran und auch auf der apikalen Membran, wo die Sekretion der Galle stattfindet, exprimiert ist. Bei Stimulation mit Cholesterin wandert SR-B1 mittels Transzytose zu den Gallenkanälen. Abgesehen davon, basiert das Wissen über die Funktion dieses HDL-Rezeptors *in vivo* hauptsächlich auf Versuchen mit Mäusen oder anderen Modellorganismen. So hat man beispielsweise an Hamsterzellen (CHO) herausgefunden, dass SR-B1 mit Caveolae und hier bevorzugt mit dem Hauptprotein Caveolin – 1 (CAV-1), kolokalisieren. Diese 50 - 100 nm kleinen Einstülpungen der Plasmamembran weisen durch eine Anreicherung an Cholesterin und Phospholipiden eine spezifische Zusammensetzung auf und sind assoziiert mit wichtigen Abläufen im Organismus, wie zum Beispiel der Vermittlung wichtiger Signal - und Transportprozesse, welche auch Cholesterinefflux inkludieren. Allerdings hat sich diese Kolokalisation der Caveolae mit SR-B1 in späteren Versuchen mit Nebennierenzellen aus Ratten nicht bekräftigt, sondern zeigte vielmehr eine Kolokalisation mit kanalähnlichen Mikrovilli – Strukturen. Zusammenfassend hat man durch unzählige Mausexperimente herausgefunden, dass eine Hemmung von SR-B1 zu erhöhten HDL-Spiegeln führt, welche aber nicht mit Arteriosklerose-reduzierenden Eigenschaften assoziiert sind, vermutlich entweder durch eine Verminderung des RCT oder

einer Erhöhung der ApoB-beihaltenden Lipoproteine. Im Gegensatz dazu, wurden bei einer Überexpression von SR-B1 die umgekehrten Effekte beobachtet, die dadurch als optimale Therapiemöglichkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen erscheinen mag aber vor Einsatz im Menschen, eine Abklärung der Einflüsse vieler mitspielenden Komponenten, wie zum Beispiel endogenem CETP und dessen Effekte auf LDL und VLDL, erfordert. Zweifellos steht fest, dass im Menschen SR-B1 mit HDL-Cholesterin im Zusammenhang steht, die genauen Effekte in Bezug auf Arteriosklerose bedürfen aber weiteren Studien, die besser dazu in der Lage sind die Funktion von SR-B1 in der Leber und beim RCT zu bestimmen, als einfach nur HDL-Cholesterin zu messen [18].

Neben der Funktion von SR-B1 als HDL-Rezeptor im Lipidstoffwechsel, spielt das Protein außerdem eine Rolle bei kardiovaskulären Vorgängen, beim Eintritt von Pathogenen, der weiblichen Fertilität und der Immunantwort [21].

1.2.6 WICHTIGE FUNKTIONEN WEITERER HDL – ASSOZIIERTER MOLEKÜLE UND PROTEINE

Es wurden bereits einige zentrale Proteine und deren Funktion erklärt bzw. ist manchen aufgrund der zentralen Rolle in dieser Arbeit ein eigenes Kapitel gewidmet. Hier sollen weitere wichtige Proteine und Moleküle bzw. deren grundlegenden Funktionen kurz erläutert werden.

APOA-I

Das häufigste Apolipoprotein der HDL – Subklasse verfügt über eine hydrophobe C – terminale Sequenz, die nachweislich entscheidend für die Bindung von ApoA-I ans HDL ist. Weitere strukturelle Merkmale, die wesentlich zur Funktion beitragen, sind der Aufbau des Proteins aus insgesamt acht α – Helices, welche durch ihre Aminosäurezusetzung dem Protein ein amphipathisches Erscheinungsbild geben. Diese Gegebenheit ist entscheidend für die tensidenartige Eigenschaft von ApoA-I, welche unerlässlich für die Aufnahme von Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe ist, da sich die amphipathischen α – Helices in die Phospholipidschicht einbetten können und somit eine Interaktion ermöglichen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der ApoA-I – Varianten bei gleichmäßiger Verfügbarkeit von HDL₃ und HDL₂ bevorzugt am HDL₃ binden. Diese Präferenz in der Bindung lässt sich vermutlich durch die höhere räumliche Verfügbarkeit in der Oberfläche der HDL₃ – Partikel erklären, welche wahrscheinlich in einer lockereren Organisation der Phospholipidschicht begründet ist, welche allem Anschein nach wiederum durch eine erhöhte negative Gesamtladung der Oberfläche zustande kommt [22]. Etwa 70% der Proteinmasse des HDL macht das Lipoprotein ApoA-I aus. Dieses liegt in einem weitaus geringeren Anteil (ca. 5%) aber auch in lipidfreier bzw. lipidarmer Form im Blutplasma vor. Zudem liegt in an HDL gebundener Form ein Anteil an leicht dissoziierbarem ApoA-I vor, welcher als essentieller Vorläufer des prä – β_1 – HDL, unerlässlich für den funktionierenden reversen Cholesterintransport, gilt. Diesbezüglich hat

man auch herausgefunden, dass die Oxidation von ApoA-I durch die Myeloperoxidase oder andere reaktive Carbonylverbindungen den ABCA1 vermittelten Cholesterinefflux aus Zellen beträchtlich einschränken kann und damit potentiell den Fortschritt der Arteriosklerose durch Schaumzellbildung antreibt [22, 23].

Um diese antiatherogenen Effekte für den Organismus auch therapeutisch nutzbar zu machen, wird intensiv daran gearbeitet, ApoA-I mimetische Peptide künstlich zu synthetisieren. Dabei wurden bereits die verschiedensten Varianten entwickelt, welche entweder die volle Länge des Proteins nachahmen oder auch durch eine deutlich kürzere Peptidsequenz gekennzeichnet sind. Entscheidend scheint dabei die Wahrung des Strukturmerkmals der amphipatischen α – Helices zu sein. Als Beispiel dazu hat man vom mimetischen 4F - Peptid herausgefunden, dass es Arteriosklerose in Mäusen vor allem durch die Bindung oxidierter Lipide hemmen kann und nur in geringerem Ausmaß durch die Induktion des Cholesterinefflux wirkt [24]. Ein vergleichsweise innovativer Ansatz beruht auf dem Einsatz sogenannter Polypro – Helices, welche aus Wiederholungen von 3 hintereinander synthetisierten, modifizierten Prolinresten aufgebaut sind. Durch die charakteristische am Rückgrat gebundene Ringstruktur des Pyrrolidins im Prolin ergibt sich ohne Stabilisierung durch Wasserstoffbrückenbindungen eine helikale Struktur, welche in Versuchen die Fähigkeit zeigte, Cholesterinefflux zu stimulieren [17].

SPHINGOSIN – 1 –PHOSPHAT (S1P)

Ein wichtiges bioaktives Lipidmolekül stellt das Sphingosin – 1 – Phosphat (S1P) dar, welches im Plasma von aktivierten Thrombozyten sekretiert wird, jedoch hauptsächlich in gebundener Form am HDL vorliegt [5, 11]. Genauer gesagt, ist dieses Lysophospholipid über das Apolipoprotein ApoM im HDL verankert und ist Beobachtungen zufolge in kleineren, dichteren HDL – Partikel in doppelter Menge vorhanden verglichen mit großen HDL – Partikel. Tatsächlich hat man den genauen Zusammenhang von ApoM zur Menge von S1P am HDL – Partikel noch nicht vollständig geklärt. So zeigte sich, dass in humanem Plasma auf stöchiometrischer Basis einer von zehn HDL – Partikel Träger von S1P ist, aber nur einer von 20 ApoM aufweist. Hinzu kommt, dass die lipophile Bindetasche von ApoM sehr wahrscheinlich auch dazu in der Lage ist, mit anderen Molekülen, wie zum Beispiel Retinol und oxidierten Phospholipiden zu interagieren und welche somit mit S1P um den Bindeplatz konkurrieren. Kontrovers gestalten sich daher mittlerweile auch noch die Vermutungen, ob es neben ApoM nicht doch noch weitere Komponenten gibt, die die Assoziation von S1P am HDL vermitteln können [25]. S1P ist in involviert in antioxidative, entzündungshemmende und gefäßerweiternde Effekte, die dem Wirken von HDL zugeschrieben werden. Die genauen Wirkmechanismen gelten dabei als sehr komplex und laufen über unterschiedliche Signalwege bei verschiedenen Konzentrationen ab. [26].

Die Effekte von S1P basieren dabei auf Bindung an sogenannte S1P - Rezeptoren, von denen bisher mindestens fünf Subtypen identifiziert wurden, und schlagen sich in verschiedenen vaskulären Reaktionen nieder. Unter anderem wurde beispielsweise im Mausmodell herausgefunden, dass S1P direkt vor Ischämie des Herzens schützt, was vermutlich in einer Hemmung der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Apoptose von Kardiomyozyten im Infarktbereich begründet ist, mittels Mechanismen von NO - und S1P – vermittelter Signaltransduktion [5, 11].

Kürzlich hat man im Rahmen von Studien mit Endothelzellen auch herausgefunden, dass es mit großer Wahrscheinlichkeit Unterschiede in der Funktion von S1P gibt, je nachdem, ob es an HDL oder Albumin gebunden vorliegt. Vor dem Hintergrund existierender HDL – Rezeptoren und HDL – spezifischen Wirkungsweisen würde HDL - S1P – spezifisches Signalling auch plausibel erscheinen, wenn man das weitaus größere Vorhandensein von Albumin in der Zirkulation beachtet. Fest steht jedenfalls, dass bezüglich Herkunft, Funktion und Wirkungsweise dieses Lysophospholipids noch viele offene Fragen zu klären sind, es aber bereits durch seine

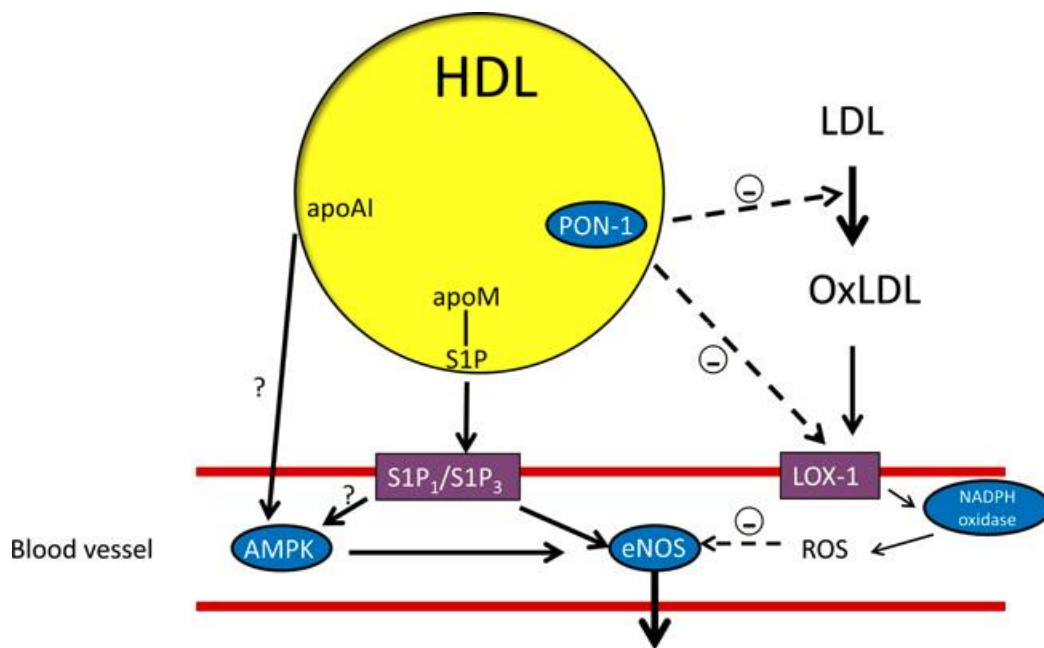


Abbildung 4: Protektive Effekte von HDL am Endothel

Mehre Komponenten des HDL – Partikels können mit Endothelzellen der Blutgefäße wechselwirken. ApoA-I führt vermutlich durch Aktivierung des AMPK (*AMP – activated protein kinase*) – Signalweges zur Produktion von NO mit damit verbundener Vasodilatation. Über ApoM im HDL verankertes S1P, kann eine Bindung mit S1P₁ und S1P₃ – Rezeptoren an Endothelzellen erfolgen und dadurch ebenfalls die Aktivität von eNOS verstärkt werden. PON1 ist hingegen für die antioxidativen Eigenschaften des HDL verantwortlich und verhindert neben der Bildung von oxidiertem LDL (oxLDL) auch die Aktivität von LOX – 1 (OxLDL Rezeptor), was eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die NADPH – Oxidase zur Folge hat und der hemmenden Wirkung der ROS auf eNOS vorbeugt. Sulaiman WN, Caslake MJ, Delles C, Karlsson H, Mulder MT, Graham D, Freeman DJ. Does high-density lipoprotein protect vascular function in healthy pregnancy? Clin Sci (Lond) 2016;130:491–7. doi:10.1042/CS20150475

bekanntesten Effekte in das Interesse der Forschung gerückt ist und als mögliches therapeutisches Mittel in naher Zukunft gehandelt wird [25].

In Abbildung 4 sind protektive Wirkungen des HDL am Endothel und ihre möglichen Signalwege angeführt, welche vor allem durch mit dem HDL – assoziierte Komponenten, wie ApoA-I, PON1 und S1P vermittelt werden [26].

1.3 DIE ENDOTHELIALE LIPASE (EL)

Einen wichtigen bestimmenden Faktor für die HDL-Konzentration in der Zirkulation stellt die endotheliale Lipase (EL) dar. Neben der hepatischen Lipase und der Lipoproteinlipase (LPL) zählt sie zur Genfamilie der vaskulären Lipasen, welche alle Triacylglyceride spalten können. Allerdings unterscheiden sie sich zum Teil sehr in ihrer hydrolytischen Aktivität. Während die LPL hauptsächlich TAG spaltet, zählen zu den Substraten der HL zusätzlich auch vermehrt Phospholipide. EL zeigt hingegen vorwiegend *sn*-1 Phospholipaseaktivität und spaltet TAGs nur im geringen Ausmaß. Durch diese Substratspezifität der EL, wie auch HL hinsichtlich der Phospholipide, sind beide Enzyme dazu in der Lage, die Plasmakonzentration von HDL signifikant zu regulieren [27, 28]. EL weist auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität zu HL von 41% auf und ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 68 kDa. Der Unterschied zu den anderen Mitgliedern der Lipasegenfamilie liegt auch darin, dass sie im Gegensatz zu diesen nicht hauptsächlich in der Leber synthetisiert sondern von Endothelzellen gebildet und sezerniert wird. Außerdem konnte die Expression von EL im Menschen unter anderem in der Plazenta, Schilddrüse, Leber, Lunge, Niere, sowie in den Eierstöcken und Hoden und auch in Schaumzellen in arteriosklerotischen Plaques detektiert werden. Ähnlich wie HL, ist auch EL dazu in der Lage, wichtige Brückenfunktionen zwischen Lipoproteinen und Heparinsulfatproteoglykanen an der Zelloberfläche zu vermitteln, welche wichtig für den Austausch von Metaboliten für die Zelle sein können [27]. Die Bedeutung von EL, im Besonderen im Zusammenhang mit Arteriosklerose, ist in der Literatur zum Teil kontrovers beschrieben und noch nicht vollständig geklärt [11]. Jedenfalls zeigte sich in Studien, dass die EL – vermittelte Hydrolyse von HDL den *peroxisome proliferator activated α receptor* (PPAR α) aktiviert und die Expression des vaskulären Zelladhensionsmolekül VCAM-1 unterdrückt, was in entzündungshemmenden Eigenschaften resultiert und somit einem Fortschreiten der Arteriosklerose nicht förderlich ist [11].

1.3.1 VERSUCHE BASIEREND AUF EL

EL ist als bekannter Modulator des wichtigen HDL immer wieder im Fokus zahlreicher Studien, die sich mit dem Lipoproteinmetabolismus und im weiteren Sinne mit dessen Auswirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen beschäftigen. So wurde unter anderem beobachtet, dass EL-Knock-Out Mäuse einen erhöhten Plasma-Spiegel an Cholesterin, Phospholipiden und assoziierten Apolipoproteinen zeigen, was im Allgemeinen in größeren HDL-Partikeln resultierte. Grund für diesen Anstieg ist die fehlende Prozessierung der Partikel durch die ausgeschaltete Lipase [28]. Des Weiteren konnte eine Reduktion der Arteriosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen beobachtet werden, wohingegen eine Überexpression von EL zu einer beträchtlichen Verminderung der Plasmakonzentration des HDL-Cholesterins sowie von ApoA-I führte und nur im geringen Ausmaß Effekte auf ApoB beinhaltende Lipoproteine zeigten. Hinzu kommt ein beobachteter 2,5 - 3facher Anstieg in der Aufnahme von HDL in Leber und Niere. Die Komposition der HDL-Partikel veränderte sich durch eine Überexpression von EL dahingehend, dass der Gehalt an Phospholipiden und Cholesterinestern zurückging, währenddessen der Anteil an TAG anstieg und freies Cholesterin unverändert blieb. Überdies führte eine durch SR-B1 vermittelte Aufnahme von hepatischen HDL-Cholesterinester und - Holopartikeln insgesamt zu einer verstärkten Aufnahme von HDL, jedoch nicht der Cholesterinester, in der Niere. Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass durch EL – prozessierte HDL- Partikel durch den Verlust an Phospholipiden destabilisiert werden und sich infolge delipidiertes ApoA-I von den Partikeln ablöst, welches weiter wiederum durch SR-B1 vermittelte selektive Aufnahme über die Nieren entfernt wird. Genetische Varianten der EL, beispielsweise durch *single nucleotide polymorphism* (SNP) in der Nähe des *LIPG* (EL) Gens, stehen im Zusammenhang mit der Plasmakonzentration von HDL-Cholesterin. Die genaue Beziehung dieser genetischen Variationen auf die Entstehung und Weiterentwicklung von Arteriosklerose, konnte jedoch noch nicht entschlüsselt werden [5].

1.4 PARAOXONASE

Das vor allem im Bereich der Arterioskleroseforschung bedeutende Enzym, Paraoxonase-1 (PON1), gehört zur Paraoxonase Genfamilie, von der mit PON1, PON2 und PON3 bisher drei verschiedene Formen beschrieben sind, die im Menschen am langen Arm des Chromosom 7 zwischen q21.3 und q22.1 kodiert sind. Aufgrund ihrer bemerkenswerten Ähnlichkeit auf Aminosäurebasis innerhalb einer Spezies, als auch zwischen verschiedenen Spezies, stammen sehr wahrscheinlich alle drei Formen von einem gemeinsamen Vorläufer ab. Vermutlich entstand der gesamte Gencluster durch hintereinander auftretende Genduplikation. Als potentieller Kandidat für den Ursprung dieser Enzyme gilt hierfür die Lactonase aus dem Pilz *Fusarium*

Oxysporium, welche eine beträchtliche Strukturhomologie und ein ähnliches Substratspektrum, verglichen mit humanen PON1 aufweist [29, 30]. In den letzten Jahren geriet vor allem PON1 aufgrund der assoziierten antioxidativen Eigenschaften in den Fokus der Forschung und ist somit besser verstanden, als die anderen Formen. Im Organismus tritt es hauptsächlich im Serum, assoziiert an HDL auf. Auch PON3 ist im Serum vorhanden, allerdings in einer 2fach geringeren Menge währenddessen PON2 intrazellulär lokalisiert ist [31].

1.4.1 ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN UND FUNKTION VON PON1

Vermutet wird, dass hauptsächlich die PON1 – Aktivität ausschlaggebend für die mit dem HDL assoziierten, antioxidativen Vorgänge ist. PON1 ist ein zur Hydrolyse von organophosphaten Substraten, wie Paraoxon, befähigtes Enzym mit einer Molekularmasse von 43 kDa, aufgebaut aus 355 Aminosäuren. Die dreidimensionale Struktur konnte von Harel *et al* durch Kristallisation und Analyse der rekombinanten Variante des *rabbit* PON1 bei einer Auflösung von 2,2 Å aufgedeckt werden und besteht im Wesentlichen aus einer sechsblättrigen Propellerstruktur mit einem zentralen Tunnel, wobei ein Propellerflügel aus vier β – Faltblättern aufgebaut ist. Zudem sind zwei Kalziumionen mit dem Protein assoziiert, von denen eines entscheidend für die katalytische Aktivität ist, währenddessen dem anderen eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des Proteins zugesprochen wird [30, 30]. Humanes PON1 ist klassifiziert als A-Esterase, welche im Gegensatz zu B-Esterasen in ihrer Aktivität nicht durch die Anwesenheit von Paraoxon (E600) inhibiert wird [30, 32]. Die Substratspezifität umfasst ein breites Spektrum unterschiedlicher Substanzen, angefangen von toxischen Sauerstoffmetaboliten in Insektiziden bis hin zu Diazoxone, Parathione, Phenylacetat und anderen aromatischen Estern, wobei die katalytische Aktivität vom jeweiligen Substrat abhängt. Von besonderer Bedeutung für den Menschen ist allerdings die sehr wahrscheinlich stattfindende Hydrolyse oxidierter Metaboliten von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren (PUFAs). In Abbildung 5 aus einer Übersicht von She *et al*, sind die Substrate der unterschiedlichen Formen von PON aufgelistet, wobei anzumerken ist, dass die angesprochenen physiologischen Substrate aus dem Lipidmetabolismus nicht in der Darstellung berücksichtigt sind [30, 33, 34].

Durch die strukturelle Ähnlichkeit dieser Moleküle zu den als PON1 - Substrat bekannten Lactonen wird angenommen, dass obig genannte Spaltung reaktiver Moleküle möglich ist [30]. Das in der Leber synthetisierte Protein tritt im Serum hauptsächlich lokalisiert am HDL auf, vermittelt wird diese Interaktion durch eine hydrophobe Sequenz am N-Terminus des fertigen PON1. Literatur zufolge, ist im Plasma PON auf einem von 8-10 HDL-Partikeln präsent. Kleine Mengen des Enzyms wurden aber auch in Chylomikronen und VLDL beobachtet, was die Vermutung entstehen ließ, dass diese beiden Lipoproteinklassen als Transportmittel für PON in die HDL dienen. Neben diesen gebundenen Varianten wurde aber auch freies PON beobach-

tet, welches im Gegenteil zu den bisher überwiegend positiven Eigenschaften für den Organismus in Verbindung mit Krankheiten, assoziiert mit oxidativem Stress, gebracht werden [7]. Die genauen Interaktionsstellen zwischen dem HDL und PON blieben für lange Zeit im Ungewissen und sind nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Eine neue Methode von Xiadong Gu *et al*, die sich der Interaktion von PON mit synthetisch hergestellten, photoreaktivem Phosphatidylcholin in rekonstituiertem HDL bedient, scheint aber neue Einblicke in die beteiligten Aminosäurereste bei der Interaktion genannter Moleküle zu bringen [35]. Während die genauen Mechanismen, wie das Enzym nach der Synthese in der Leber zum HDL kommt, noch größtenteils unbekannt sind, wurde bereits festgestellt, dass ApoA-I tragende HDL Moleküle mit hoher Affinität PON binden und dieses bis zu 100fach stabilisieren und zudem dessen Lipolactonase-Aktivität stimulieren kann [7]. Die hohe Affinität von PON zum HDL lässt auch dessen erhöhtes Vorkommen in arteriosklerotischen Plaques erklären. Außerdem findet sich beim Menschen neben einer hohen Expression des Enzyms in der Leber auch ein geringes Auftreten davon in den Nieren [33]. Studien zeigten, dass aufgereinigtes PON1 in leicht oxidiertem LDL die biologisch aktiven Lipide zerstören kann und zudem die Hydrolyse von 19% der Lipidperoxide und bis zu 90% der Cholesteryl-Linoleat Hydroperoxide in oxidiertem HDL vermitteln kann [29, 30].

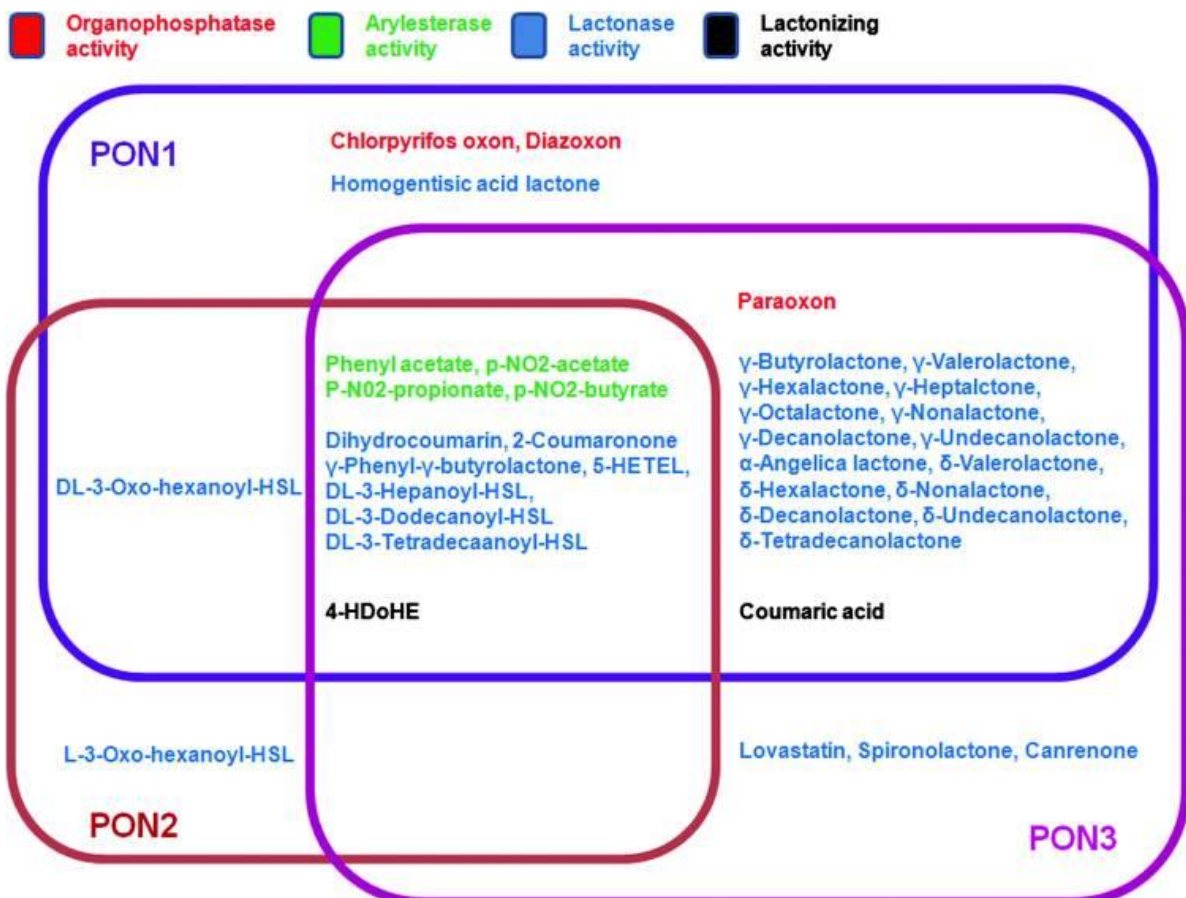


Abbildung 5: Auflistung und Einteilung der Substratspezifität der Varianten von PON.

Nicht inkludiert sind die vermuteten endogenen Substrate, die im menschlichen Körper hydrolysiert werden, wobei hier insbesondere Metabolite aus dem Lipidstoffwechsel vermutet werden. Abbildung übernommen aus She Z, Chen H, Yan Y, Li H, Liu D. The Human Paraoxonase Gene Cluster As a Target in the Treatment of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:597–632. doi:10.1089/ars.2010.3774

MESSUNG DER PON1-PRÄSENZ UND AKTIVITÄT

Das Interesse zur Bestimmung von PON entwickelte sich anfangs aufgrund toxikologischer Aspekte wegen der beobachteten Schutzfunktion vor Organophosphaten. Im Laufe der Zeit gewann das Enzym aber durch das Erkennen der Funktion in kardiovaskulären Erkrankungen und als Biomarker bei Oxidativem Stress, Entzündungen und Lebererkrankungen immer mehr an Bedeutung.

Die Bestimmung von PON1 erfolgt meist basierend auf Aktivitätsmessungen, kann aber auch immunologisch, durch Einsatz geeigneter spezifischer Antikörper oder direkt durch Analysen auf Nukleinsäurebasis mithilfe von Northern Blots und quantitativer RT-PCR stattfinden [36]. Oft wird die Fähigkeit zur Hydrolyse von definierten Substraten, wie zum Beispiel Arylester oder Paraoxone, spektrophotometrisch gemessen. Dabei wird PON1 mit unterschiedlichen Aktivitäten bewertet, abhängig vom eingesetzten Substrat (z.B. Arylesteraseaktivität). Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass in der Literatur eine starke Heterogenität beschrieben ist, was die Ergebnisse mit Einsatz unterschiedlicher Substrate und Assay-Bedingungen betrifft und somit die Vergleichbarkeit von Ergebnissen aus verschiedenen Laboratorien mit Vorsicht zu genießen ist. Wichtige Punkte, die bei der Wahl des geeigneten Substrates zu bedenken sind, stellen folgende dar:

- **Toxizität:** wichtig für den Umgang im Labor
- **Polymorphismen:** Die Kombination genetischer Variationen auf den beiden Allelen kann zu unterschiedlicher Aktivität des Enzyms führen
- **Hydrolyserate:** Diese setzt sich aus mehreren Faktoren zusammen, wie beispielsweise Substrat, Herkunft des Enzyms
- **Diagnostische Güte:** Bestimmte Erkrankungen und Zustände im Organismus können die Hydrolyserate beeinflussen [31]

Eine allgemein geringe Umsatzrate kann Folge einer unzureichenden Sensitivität des Assays sein und im Gegensatz dazu kann ein sehr hoher Umsatz an Substrat durch nicht spezifische Hydrolyse bedingt sein. Es wird ständig versucht, angewandte Assays weiterzuentwickeln um Probleme wie diese zu vermeiden und mehr Information über die Funktion des Enzyms von Interesse zu bekommen. So war es beispielsweise das Ziel einer Studie von *Ahmad et al*, ein Zell-basiertes Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln, um endogene PON1 Aktivität in Zellen zu messen und somit nach Aktivatoren der PON1 Genexpression, sowie katalytischen Aktivität und Stabilität zu screenen. Um diese Anforderungen erfüllen zu können, verwendeten sie mit 7-diethyl-phospho-6, 8-difluoro-4-methylumbelliferyl (DEPFMU) ein überaus sensitives Substrat für die Detektion von PON1 mit der besonderen Eigenschaft, dass die Hydrolyse jener chemischen Verbindung in der Emission von Fluoreszenz resultiert [36].

1.4.2 PON IM ZUSAMMENHANG MIT ARTERIOSKLEROSE

Erhöhte Werte der Lipoproteine der Klassen VLDL und LDL sind allgemein als Risikofaktoren zur Entwicklung von arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäße angesehen. Der Oxidation von LDL wird dabei eine besondere Schlüsselrolle zugesprochen. Dem gegenüber steht das als antiatherogen und antioxidativ geltende HDL. Diese Eigenschaften werden neben HDL-assoziierten Proteinen wie dem apoA-I und der Lecithin – Cholesterin – Acyltransferase (LCAT) vor allem dem PON1 zugesprochen, ermöglicht durch die obig in 1.4.1 Allgemeine Eigenschaften und Funktion von PON1, beschriebenen Fähigkeiten von PON, reaktive Metabolite aus dem Lipidstoffwechsel zu hydrolisieren [30]. Die Eigenschaft von PON, eng mit der Entwicklung von Arteriosklerose im Zusammenhang zu stehen, konnte auch in diversen Mausmodellen beobachtet werden. So zeigen beispielsweise PON-Knock-Out Mäuse einen beschleunigten Krankheitsverlauf, währenddessen umgekehrt PON transgene Mäuse, geschützt von anti-oxidativem Stress und Arteriosklerose zu sein scheinen. Einen interessanten Therapieeinsatz würde in Anbetracht der beschriebenen positiven Charakteristika die Erhöhung der Aktivität von PON im Organismus darstellen.

Diverse Versuche zeigten, dass sich PON sensitiv gegenüber seiner Umgebung und auch der Ernährung verhält. So verbesserte sich beispielsweise in Versuchen am Menschen und in Mäusen die PON Expression und Aktivität infolge von Zufuhr von Ölsäure und auch mediterraner Ernährung. Auch nach Gabe des zur Gruppe der Flavonoide zählenden und im Rotwein vorkommenden Quercetins, wie auch nach Verzehr von Granatapfelsaft und seinen Polyphenolen konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Neben den genannten, von außen zugeführten Stoffen haben mit diversen Phospholipidderivaten auch endogene Stoffe Potential gezeigt, die PON-Aktivität zu beeinflussen. Im Besonderen steigerte Phosphatidylcholin mit ungesättigten Fettsäuren die Arylesteraseaktivität in bemerkenswerter Weise, was auch zum Teil eine Erklärung für die Aktivierung von PON durch reifendes HDL mit seinen verschiedenen Phospholipidgruppen sein könnte. Die protektive Rolle von PON auf das Endothel konnte schon in mehreren Studien nachgewiesen werden und so scheint sich auch die anfangs durch Ultrazentrifugation aufgestellte Hypothese zu bestätigen, dass die PON-Aktivität zwischen den HDL-Varianten unterschiedlich ist und vor allem in den kleineren HDL₃ Partikel vergleichsweise hoch ist [7].

Ein weiteres wichtiges Enzym im Zusammenhang mit PON und der Entwicklung von Arteriosklerose stellt die Myeloperoxidase (MPO) dar, deren physiologische Funktion in Granulozyten die intrazelluläre Zerstörung von Krankheitserregern durch die Produktion von oxidierenden Metaboliten, wie hypochlorige Säure ist [7, 35]. Bei der Pathogenese von Arteriosklerose spielt freies MPO aber eine wichtige Rolle in der lokalen Zytotoxizität durch die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies *in situ* am betroffenen Endothel, das zudem auch für den nachgewiesenen Zusammenhang von Instabilität der arteriosklerotischen Plaques und Entzündung

verantwortlich gemacht werden könnte. Jedenfalls wurde höhere Level an gesamten MPO in chronisch arteriosklerotischen Patienten, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt [37]. In den Blutgefäßen ist MPO dazu imstande, das als eigentlich antiatherogen angesehene HDL durch Modulation mittels reaktiver Sauerstoffspezies in atherogene Formen umzuwandeln und so beispielsweise auch durch Oxidation des ApoA-I dessen protektiven Eigenschaften einzuschränken. Man hat herausgefunden, dass HDL, PON1 und MPO einen Ternärkomplex bilden, dessen Bestandteile sich gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen. So scheint es als bestätigt, dass sich PON1 und MPO jeweils gegenseitig inhibieren, während beide an das als Gerüst dienende HDL gebunden sind. Im Detail führt MPO mit der Oxidation von PON1 am Tyrosin 71 zu einer nachgewiesenen klinisch relevanten Veränderung, die eine bedeutende Rolle bei der Inaktivierung und Bindung am HDL spielt.

PON1 ist sehr anfällig für den Angriff freier Radikale und kann daher bei überdurchschnittlicher Menge solcher reaktiver Spezies, z.B. durch Umwelteinflüsse oder Produktion von NO oder H₂O₂ durch Makrophagen, in seiner eigentlich anti-oxidativen Wirkung inhibiert werden. Besagtes Milieu findet sich auch in einem entzündeten, arteriosklerotischen Plaque und führt durch modifiziertes PON zu dysfunktionellem HDL mit verbundener Akkumulation von Malondialdehyd – Addukten (MDA) im ApoA-I-HDL, was in weiterer Folge eine Serie von Reaktionen auslöst, die letztendlich zu einer Phosphorylierung negativer Regulatoren von eNOS in den Endothelzellen führen. Die dadurch reduzierte Produktion von NO führt wiederum zu gesteigerter Vasokonstriktion und Ischämie und damit zu einem Fortschreiten des Krankheitszustandes im Patienten [7, 7, 35]. In Anbetracht der durch PON betroffenen Reaktionen lässt sich vermuten, in welcher enger Verbindung die verschiedenen Enzyme und Komponenten, wie das in sich sehr variable HDL, zueinander stehen und wie sensibel sie auf pathologische Zustände aber auch exogene Faktoren reagieren können.

1.5 ENDOTHELIALE NITRIC OXIDE SYNTHETASE (ENOS)

Stickoxid (NO) ist das kleinste bekannte Signalmolekül und wirkt im Organismus an diversen Zielstrukturen. Gebildet kann es im Körper durch die drei Isoformen des Enzyms der NO – Synthetase (NOS) werden, welche als *neuronal* (n) (NOS I), *inducible* (i) (NOS II) und *endothelial* (e) (NOS III) NOS bezeichnet werden. Diese Bezeichnungen leiten sich von der charakteristischen Expression der homodimeren Isoformen ab und so ist nNOS hauptsächlich in spezifischen Neuronen des zentralen Nervensystems zu finden, wo das dort produzierte NO Einfluss auf die synaptische Plastizität und Regulierung des Blutdrucks nimmt und weiter im peripheren Nervensystem als atypischer Neurotransmitter wirkt und beispielsweise wichtig für Darmperistaltik und Erweiterung der Gefäße ist. Zudem ist nNOS auch im Herzmuskel und Skelettmuskeln lokalisiert [38, 39]. Wie der Name schon sagt, lässt sich die Expression von

iNOS bei Anwesenheit entsprechender Stimuli (zB. Zytokine) in bei nahezu allen Zellen auslösen, was erstmals in Makrophagen nachgewiesen werden konnte und einen Einfluss auf die Immunantwort hat. Außerdem spielt iNOS-produziertes NO in entzündlichen Prozessen eine Schlüsselrolle und gilt als vorherrschender Vermittler des Blutdruckabfalls im Zuge eines septischen Schocks. Im Gegensatz dazu wird eNOS konstitutiv von Endothelzellen in den Blutgefäßen exprimiert und leistet dort durch die Produktion von NO einen unerlässlichen Beitrag zur kardiovaskulären Homöostase. Durch die von NO - vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation am Endothel wird neben den daraus resultierenden, antithrombotischen Eigenschaften auch die Stimulation zum Wachstum von glatten Muskelzellen, ausgelöst durch *platelet - derived - growth factors* (PDGF), gehemmt. Hinzu kommen die mit NO assoziierten antiatherogenen Effekte, die unter anderem durch die Hemmung der Expression von MCP und einer damit verringerten Infiltration von Leukozyten verbunden ist [39, 40]. Bestätigt wurde diese Schlüsselfunktion auch in mehreren präklinischen Modellen, bei denen genetischer Knock-Out bzw. die medikamentöse Hemmung von eNOS in einer signifikanten Verstärkung der Arteriosklerose resultierte. Jedoch wurde aber auch bei einer Überexpression eine Begünstigung der Arteriosklerose beobachtet, welche vermutlich das Ergebnis von übermäßigem Vorhandensein des Enzyms im monomeren Zustand und einer damit verbundenen Bildung von Superoxiden ist [41].

1.5.1 AUFBAU, REGULATION UND FUNKTION VON ENOS

Alle Isoformen des Enzyms verbrauchen L-Arginin als Substrat und benötigen außerdem molekularen Sauerstoff und reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Co-Substrat, sowie Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotide (FMN) und Tetrahydro-L-Biopterin (BH4) als weitere Cofaktoren. Eine funktionelle NOS besteht aus zwei identen Monomeren, welche jeweils eine Reduktase-, wie auch Oxygenasedomäne aufweisen, verbunden durch eine Polypeptidsequenz, welche einen Calmodulin - bindenden Bereich aufweist. Eine wichtige Rolle für die Dimersierung von NOS wird dem sich an der Schnittstelle der Monomere befindlichen Zink und auch BH4 zugeschrieben. Das aktive Zentrum wird am N - Terminus durch ein an der Oxygenasedomäne lokalisiertes Häm gebildet, welches an eine Arginin - bindende Tasche gekoppelt ist [38]. Eine Aktivierung des Enzyms ermöglicht einen Transfer von Elektronen, beginnend durch die Reduktion von NADPH an der Reduktasedomäne bevor die Elektronen nach Zwischenschritten an der Oxygenasedomäne O₂ aktivieren und schließlich zur Oxidation von L - Arginin zu L - Citrullin und damit verbundener Bildung von NO führen.

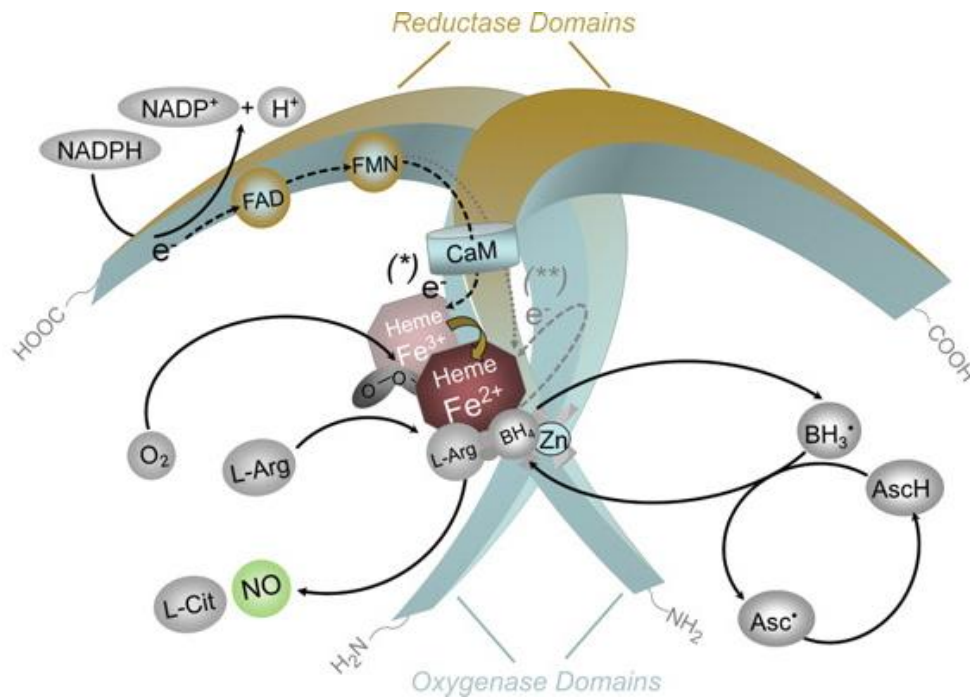


Abbildung 6 Schematische Darstellung eines NOS – Dimers

Für eine einfachere Darstellung ist nur der Ablauf des Reaktionswegs eines Monomers angeführt. In der Anwesenheit von Häm kommt es zur Bildung eines funktionellen Dimers, welches bei ausreichendem Vorhandensein aller benötigten Co – Faktoren NO als Nebenprodukt der Konversion von L – Arginin zu L – Citrullin bildet. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J 2012;33:829-37, 837a-837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304

Alle Isoformen können Calmodulin binden und so gilt vor allem die intrazelluläre Calciumkonzentration als entscheidender Faktor für die Aktivität des Enzyms. Mit steigender Ca^{2+} Konzentration wird vermehrt Calmodulin am Enzym gebunden und infolgedessen der Fluss der Elektronen von der Reduktase- zur Oxygenasedomäne ermöglicht.

Die Aktivität von eNOS wird zudem durch eine Vielzahl anderer Faktoren beeinflusst. Beispielsweise hat man herausgefunden, dass das Hitzeschockprotein 90 (hsp90) als allosterischer Aktivator wirkt und das in den Caveolae lokalisierte eNOS vom caveolae coat protein, Caveolin 1, inhibiert wird. Dies konnte auch durch Versuche mit Blutgefäßen von Caveolin – 1 defizienten Mäusen gezeigt werden, welche eine verstärkte Endothel – abhängige Relaxation aufwiesen. Überdies wurde beobachtet, dass durch die Interaktion von hsp90 und Calmodulin mit eNOS am Enzym gebundenes Caveolin – 1 verdrängt wird und somit eine Aktivierung des Enzyms erfolgt [39]. Dieser Zusammenhang wurde auch durch Versuche mit einer mit Caveolin – 1 interagierenden Substanz, dem sogenannten CavNOxin bekräftigt. In Anwesenheit dieses hochspezifischen Peptids wird die Bindung von Caveolin – 1 zu eNOS aufgehoben und es kommt zu einer Aktivierung und somit gesteigerter Produktion von NO [41]. Unabhängig von einer gesteigerten, intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration, stimuliert auch der Blutfluss in den

Gefäßen (engl. *fluid shear stress*) die Aktivität durch Phosphorylierung des Enzyms an mehreren Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Dabei kann eine Phosphorylierung in Abhängigkeit des primären Stimulus über unterschiedliche Signalwege ablaufen und je nach betroffenem Rest sowohl aktivierende, als auch hemmende Effekte auf eNOS mit sich bringen [39].

1.5.2 EINFLUSS VON HDL AUF DIE AKTIVITÄT VON ENOS

HDL gilt neben anderen beeinflussenden Faktoren als Regulator der Expression und Aktivität von eNOS, wobei im Besonderen die Produktion von NO gesteigert wird und ein damit verbundener vasodilatatorischer Effekt zu Tage tritt. Als wichtige Vermittler dieser Abläufe gelten im Speziellen SR-B1 und S1P – Rezeptoren (S1P₁ und S1P₃). Letztere wirken sehr wahrscheinlich über den Akt – Signalweg und der Phosphorylierung von eNOS.

In an kardiovaskulären Erkrankungen leidenden Patienten ist die durch NO – vermittelte gefäßerweiternde Wirkung nicht mehr zu beobachten, was vermutlich einerseits Folge der pathologischen Veränderungen des Endothels und andererseits durch verändertes, dysfunktionales HDL begründet sein kann.

2. ZIELSETZUNG

Die sehr hohe Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Arteriosklerose, sowie der ungebrochene Trend zu jährlichen Neuerkrankungen fordert neben einem Umdenken im Lebensstil des Einzelnen außerdem nach neuen Therapieansätzen und lässt somit unter anderem auch HDL mit seinen bereits bekannten entzündungshemmenden Wirkungen als mögliches Therapieziel in den Fokus der Wissenschaft treten. Ein Schlüsselenzym in der Vermittlung der mit dem HDL - assoziierten antioxidativen Eigenschaften stellt dabei die Paraoxonase (v.a. PON1) dar, die beispielsweise die Metabolisierung von Lipidperoxiden, wichtig im Krankheitsverlauf der Arteriosklerose, katalysieren kann. Die Rolle von EL im Zusammenhang mit Arteriosklerose konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden und ist kontrovers beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktionalität und Komposition von modifiziertem HDL, welches im Speziellen durch die endotheliale Lipase (EL) *in vitro* prozessiert wurde, im Vergleich zu einem Kontroll- HDL zu analysieren. Des Weiteren soll auch die Verfügbarkeit und Aktivität der Paraoxonase (PON) und ein möglicher Einfluss darauf durch EL-modifiziertes HDL bestimmt werden.

Im Besonderen soll dabei HDL im Zellkulturexperiment modifiziert und anschließend unterschiedlichen Analysen zur Bestimmung von Beschaffenheit (zB. PAGE, Phospholipidbestimmung etc.) und Funktion (zB. Arylesterasemessung) unterzogen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eigenschaften und die Funktionalität des durch die endotheliale Lipase (EL) modifizierten HDL's untersucht. Dazu wurde zum einen zuerst HDL mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Plasma isoliert und dieses im Anschluss im Zellkulturexperiment modifiziert. Zusätzlich wurden auch direkte Plasmamodifikationen ohne vorangehende Isolierung des HDL's durchgeführt. Nachfolgend wurde reisoliertes HDL bzw. zum Teil auch Plasma und apoB – depletiertes Plasma weiteren Messungen und Versuchen, wie zum Beispiel Western Blots, Kitmessungen, und anderen unterzogen, um durch die Modifikation entstandene Veränderungen in der Molekülzusammensetzung und Wirkung des HDL zu analysieren.

Das eingesetzte Plasma wurde vom LKH-Univ. Klinikum Graz bezogen und war den dort üblichen Richtlinien entsprechend auf jegliche Infektionen und Krankheitserreger getestet. In der Zellkultur kamen Zellen der Hepatocytzelllinie, HepG2 zum Einsatz, welche bis zur Passage 40 in den durchgeführten Experimenten verwendet wurden. Es sei hier angemerkt, dass sich die Höhe der Passage durch die Anzahl der durchgeführten Experimente ergeben hat und dass vermutlich auch eine höhere Passage noch akzeptabel gewesen wäre. Der Zustand der Zellen in Kultur, sowie auch in den Versuchen wurde laufend durch Kontrolle im inversen Durchlichtmikroskop beobachtet. Bei der Kultivierung wurde allen Flüssigkeiten (Medium etc.) ein Antibiotikamix bestehend aus Penicillin G Natriumsulfat (100 units/mL), Streptomycinsulfat (100 mg/mL), and Amphotericin B (2.5 mg/ml) in einer Endkonzentration von 5% zugesetzt um eine Infektion durch Bakterien zu verhindern. Zur Kultivierung und Durchführung der Modifikationen kam Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), wenn nötig mit einem Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem, fetalen Kälberserum (+FCS), sowie PBS (alle Gibco, Life Technologies) und 0,05% Trypsin zum Einsatz. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei feuchter Atmosphäre von 5% CO₂/95% Luft bei 37° C.

.Für die Transfektion der Zellen kamen folgende Adenoviren zum Einsatz:

Tabelle 2: Adenoviren, die im Zellkulturexperiment eingesetzt wurden und Angabe der Multiplicity of Infection

<i>VIRUS</i>	<i>BESCHREIBUNG</i>	<i>MOI</i>
LACZ 11/4/14	Adenovirus zur Expression der beta-Galaktosidase in kultivierten Zellen (HepG2). Hergestellt am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, Medizinische Universität Graz	5
EMPTY VIRUS 29/4/15	Adenovirus, eingesetzt als Leervektor für die Kontrolle in Experimenten mit Zellen in Kultur	5
EL 3/15	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	10

Für alle Experimente wurde für die Infektion mit EL eine *Multiplicity of Infection* (MOI) von 10 und für den Kontrollvirus LacZ bzw. empty Virus MOI 5 gewählt. Die Berechnung der einzusetzenden Virusmenge ergab sich aus der Zahl der zu infizierenden Zellen und der Titer der jeweiligen Viren. Die Proteinbestimmung des isolierten HDL's erfolgte mittels Nanodrop im Bewusstsein, das den Ergebnissen dieser Methode nicht blindlings vertraut werden sollte. Ein durchgeführter Lowry – Assay bei einigen Stichproben zeigte jedoch eine gute Korrelation beider Messmethoden, woraufhin die NanoDrop – Messung zur Methode der Wahl wurde. Zur Kontrolle wurde zudem auch immer der Totalcholesteringehalt basierend auf der Kitmessung bestimmt und mit dem Faktor 4 multipliziert, welcher näherungsweise mit der HDL – Konzentration übereinstimmen sollte. Dieser Faktor basiert auf klinisch gemessenen Daten und der erfahrungsgemäßen, angenommenen Zusammensetzung des HDL's aus Lipoproteinen, Cholesterin und Lipiden. Für den weiteren Einsatz in diversen Methoden und weiterführenden Experimenten wurden alle Werte jedoch ausschließlich auf Basis der am NanoDrop gemessenen Konzentration berechnet und aliquotiert.

Folgende Abbildung fasst den allgemeinen Aufbau des Experiments schematisch zusammen:

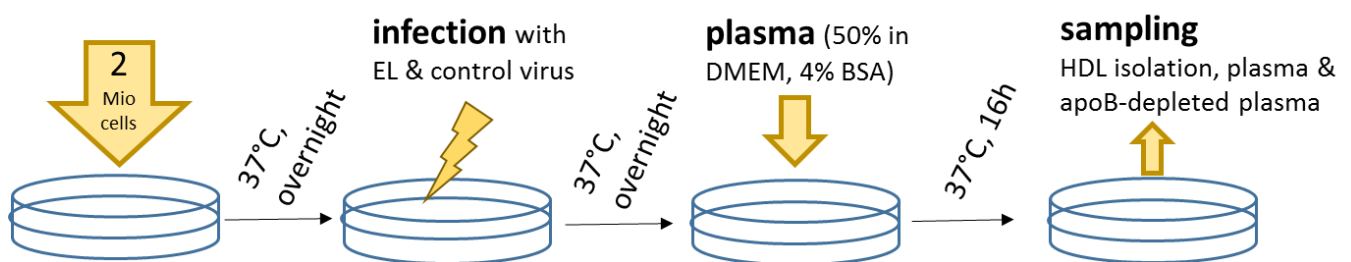


Abbildung 7: Übersicht des Prinzips des Versuchsaufbaus am Beispiel der Plasmamodifikationen

Nach dem Ausplattieren und Kultur der Zellen über Nacht erfolgte die Infektion mit dem jeweiligen Virus, bevor am dritten Tag entweder, wie hier mit Plasma oder auch isoliertem HDL in der Mischung mit Medium für 16 h inkubiert wurde. Reisoliertes HDL, bzw. direkt Plasma und ApoB – depletiertes Plasma wurden anschließend aliquotiert und verschiedenen Messungen unterzogen.

3.1 HDL ISOLIERUNG

Um HDL aus Plasma bzw. aus Medium mit 50% Plasma zu isolieren, wurde die Dichtegradientenzentrifugation mittels Kaliumbromid angewandt. Röhrchen, geeignet für Ultrazentrifugation von Beckmann Coulter®, wurden zuerst mit ca. 10mL PBS mit einer Dichte von 1,063 g/L, erreicht durch Zugabe von Kaliumbromid, luftblasenfrei befüllt. Pro Milliliter der zu isolierenden Flüssigkeit (Plasma oder Medium) wurden 0,378 g Kaliumbromid eingewogen und aufgelöst. Die Dichte sollte danach 1,23 bis 1,24 g/mL betragen und wurde durch Abwiegen kontrolliert. Bei abweichender Dichte wurde mittels entsprechender Addition von Kaliumbromid oder PBS nachjustiert um auf den gewünschten Wert zu kommen. Mit einer Spritze wurden vorsichtig 4 mL des Probenmaterials mit eingestellter Dichte in den Boden des Röhrchens pipettiert. In

Folge wurden die Röhren bis zur Markierung mit PBS + Kbr aufgefüllt, verschlossen und anschließend 6 Stunden bei 60 000 rpm und 15° Celsius zentrifugiert. Nach erfolgreicher Zentrifugation sollte sich das HDL in einer bestimmten Schicht entsprechend seiner Dichte, bekannt auch durch Erfahrungswerte, gesammelt haben. Die untere Grenze der HDL-beihaltenden Schicht wurde durch Vergleich mit einem Beispielröhrchen aus vorangegangenen Versuchen markiert. Im Detail, wurde bei der Entnahme zusätzlich zuerst ein Einstich mit einer separaten Nadel neben der ursprünglichen Öffnung des Röhrchens vollzogen, um die Entstehung von Unterdruck beim Absaugen zu verhindern. Des Weiteren wurde anschließend auch direkt an der Markierung vorerst mit einer extra Nadel die Röhrchenwand durchstoßen, bevor schließlich mit einer zum Absaugen bestimmten Nadel, durch Einführen in die markierte Einstichstelle, 4 mL pro Röhrchen abgenommen und in ein frisches Tube überführt wurden. Das so gesammelte HDL wurde anschließend durch Zentrifugation mittels Vivaspin® Turbo 4 oder 15 mL Tubes der Firma Sartorius aufkonzentriert. Zentrifugiert wurde bei 4° C und 3000 G und einer Zeit, abhängig von der jeweiligen Probe. Je nach Proteinmenge dauerte ein Zentrifugationslauf zwischen 5 und 20 Minuten. Nach erfolgter Aufkonzentrierung wurde das in den Taschen der Tubes verbleibende HDL in Eppis gesammelt und auf Eis bis zum nächsten Schritt aufbewahrt. Um das für die Isolierung erforderliche, zugesetzte Salz zu entfernen, wurden die Proben über eine Säule von G&C Healthcare eluiert, welche vorab durch 5maliges Waschen mit PBS – Buffer vorbereitet wurde. Wichtig dabei ist, die Menge der zu entsalzende Probe abzumessen, um nach dem Pipettieren dieser auf die Säule, die Differenz zum Totalvolumen von 2,7 mL mit PBS-Buffer auffüllen zu können. Eluiert wurde mit der ca. 1,5-2 fachen Menge der zu entsalzenden Probe. Abschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Nanodrop ermittelt und das Eluat auf verschiedene Aliquote aufgeteilt, diese mit Argon überschichtet und bei -80° Celsius bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2 HDL- UND PLASMA-MODIFIKATION IM ZELLKULTUREXPERIMENT

Nach Kultivierung einer ausreichenden Menge an Zellen wurden jeweils am ersten Tag des Zellkulturexperiments HepG2 Zellen in 60 mm Petrischalen ausplattiert. Dazu wurden die Flaschen nach einmaligem Waschen mit PBS für 3 Minuten bei 37° Celsius mit 2 mL 0,05%igem Trypsin inkubiert, bevor die Trypsinierung durch Zugabe von 4 mL Medium + FCS gestoppt wurde. Die Zellsuspension von 3 Flaschen wurde gesammelt, zentrifugiert und in einem Milliliter Medium + FCS sorgfältig durch 30-40maliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und danach durch Zugabe von 17 – 19 Milliliter Medium weiterverdünnt. Zur Zellzahlbestimmung wurden 60 µL der gut durchmischten Suspension in 6 mL Casyton Lösung gegeben und die Probe nach Mischen am CASY® vermessen. Bei beschriebener Vorbereitung war erfahrungs-

gemäß mit einer Zellzahl um die $2,3 \times 10^6$ Zellen/mL zu rechnen. Die gewünschte Ausgangsmenge für dieses Experiment betrug 2 Mio Zellen pro Petrischale. Dazu wurde ein entsprechender Anteil der Zellsuspension in Schalen, die vorgelegtes DMEM + FCS beinhalteten, gegeben, sodass sich ein Gesamtvolumen von ungefähr drei Milliliter ergab. Für den weiteren Verlauf wurde DMEM – FCS für Waschschriffe und Infektion der Zellen und DMEM + FCS für die Inkubation über Nacht aliquotiert.

Am darauffolgenden Tag wurde nach einmaligem Waschen mit 3 mL DMEM – FCS ein Teil der Zellen mit einem Kontrollvirus, in unserem Fall LacZ oder empty Virus, mit MOI 5 und der andere Teil mit dem Virus, kodierend für die endotheliale Lipase (EL) mit MOI 10 infiziert. Im Speziellen wurde hierbei mit einem adenoviralen Vektorsystem gearbeitet. Die eingesetzten Viren wurden entsprechend ihrem Titer in DMEM – FCS so verdünnt, dass die vorgegebene MOI bei einer Zugabe von einem Milliliter der Verdünnung pro Platte erreicht wurde. In der anschließenden 2 - stündigen Inkubation der Zellen bei 37° C im Infektionsmedium wurden die Platten alle 20 Minuten vorsichtig geschwenkt, um eine möglichst gleichmäßige Infektion zu erreichen. Danach wurde für die Inkubation der Zellen über Nacht in DMEM + FCS noch einmal das Medium gewechselt. Je nach Versuchsanleitung wurde für den weiteren Prozess DMEM – FCS mit oder ohne bovinem Serumalbumin (BSA) für die HDL- bzw. Plasmamodifikationen sowie auch Medium zum Waschen aliquotiert. Die Endkonzentration von 4% BSA im Medium wurde durch Zugabe der entsprechenden Menge einer 10%igen Stocklösung erhalten.

Am dritten Tag wurden die Zellen nach erneutem Waschen mit 1,8 mL Modifikationsmedium für 16 Stunden, also über Nacht bei Start um ca. 15:00 Uhr inkubiert, bevor abschließend am vierten Tag eine Reisolation des HDL nach obiger Beschreibung in 3.1 HDL Isolierung) durchgeführt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei folgende Versuche durchgeführt:

HDL – Modifikationen:

- LacZ - BSA
- LacZ + BSA
- EL - BSA
- EL + BSA

Plasma Modifikationen:

- LacZ bzw. emptyVirus + BSA
- EL + BSA

Bei beiden Modifikationen wurden dabei die Experimente mit 3 verschiedenen Plasmen (n=3) wiederholt, um mögliche personenabhängige Effekte zu erkennen bzw. vermeiden zu können. Außerdem ist anzumerken, dass Kontroll- und EL Infektion und bei HDL zusätzlich die Bedingungen mit und ohne BSA jeweils innerhalb eines Experimentes stattgefunden haben. Im Detail heißt das, dass die maximale Anzahl von 28 Platten auf entweder 4 Bedingungen bei HDL oder 2 Bedingungen bei Plasma aufgeteilt wurden. Die Begrenzung der Anzahl erklärt sich

durch die limitierten Plätze bei der Ultrazentrifugation, die für die anschließende Reisolation nötig gewesen ist. Um Einblick in die Lipid/Proteinzusammensetzung und Menge bzw. Änderung dieser zu gewinnen, wurde jeweils vom unmodifizierten Ausgangsplasma, sowie von reisolierendem HDL in allen Fällen neben der Konzentrationsmessung am NanoDrop, der Totalcholesterin- und Triglyceridgehalt bestimmt, als auch der Anteil an Phospholipiden. Letztere wurden jeweils mittels Kitmessung laut Anleitung (alle DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland) bestimmt und ausgewertet. Abschließend wurden von den reisolierenden HDL-Proben Aliquote für Myografie, Western Blots, native Gele, klinische Messungen, Nitritbestimmung, Arylesterasemessung, Massenspektrometrie, SAXS-Analyse, und NO-Bestimmung genommen, mit Argon überschichtet und bei -80°C eingefroren.

Neben reisolierendem HDL wurde bei den Plasmamodifikationen zusätzlich auch direkt ein Milliliter des Modifikationsmediums nach 16-stündiger Inkubation entnommen, wobei dabei von der Hälfte eine apoB-Depletion durchgeführt wurde. Durch den Vergleich von anschließend durchgeführten Western Blots und Färbungen von nativen Gelen dieser Proben mit dem entsprechenden isolierten HDL, sollten mögliche Veränderungen des HDL's, verursacht durch die im Rahmen der Isolierung stattfindenden Ultrazentrifugation, aufgedeckt werden.

3.3 APOB-DEPLETION

Dieses Verfahren wurde angewendet, um aus Serum bzw. Plasmaproben vor allem die Fraktion der LDL's und dem sich darin befindlichen apoB –Lipoprotein zu entfernen. Dazu wurde in einem 1+1 Verhältnis 400mM Glycinbuffer mit Polyethylenglykol (PEG) gemischt. Pro 100 mL der zu depletierenden Probe erfolgte anschließend eine Zugabe von 40 μL dieser Glycinbuffer/PEG -Mischung. Durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren und dem damit verbunden Mischen sollte sich eine Trübung der Lösung ergeben. Nach 20minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 30 min bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Bei erfolgreicher Depletion sollte ein deutliches Pellet erkennbar sein. Der Überstand, frei von apoB, wurde in ein neues Eppi überführt, bevor wiederum diverse Aliquote des depletierten sowie auch des Ausgangsmaterials bereiteten wurden.

3.4 MYOGRAFIE

Zur genaueren Untersuchung der Wirkungen des modifizierten HDL auf Endothelzellen von Blutgefäßen wurden die Effekte an der Mauseorta nach Inkubation mit HDL in der Myografie beobachtet. Die Versuche dazu wurden von Margarete Lechleitner durchgeführt und orientierten sich im Wesentlichen nach folgendem Ablauf: Zur Isolation einer murinen Aorta wurden 9-

12 Wochen alte männliche Mäuse geöffnet, perfundiert und die Aorta unter kühlen Bedingungen isoliert. Nach dem Waschen wurde der thorakale Teil der Aorta in 2 mm breite Ringe geschnitten. Zum Einstellen der Grundspannung von 10 mN wurden die Ringe in den Myograpfen eingespannt, auf 37° C erwärmt und unter ständigem Begasen mit Oxymix (Gemisch aus 95% CO₂ und 5% O₂) mit PSS – Buffer gespült. Nach Erreichen eines stabilen Wertes wurde laut Versuchsanordnung das sogenannte Wake-Up Protokoll gestartet, um die Ringe auf ihre Fähigkeit zur Kontraktion und Relaxation zu testen. Im Detail, wurde dazu anfangs durch wiederholte Zugabe von KPSS- Buffer mit dazwischenliegenden Waschschrritten die maximal erreichbare Kontraktion (100%) ermittelt, bevor eine dosisabhängige Kontraktionssteigerung durch steigenden Konzentrationen an Norepinephrin ermittelt wurde. Die darauffolgende Relaxation, stimuliert durch die Zugabe von steigenden Konzentrationen an Acetylcholin, sollte dabei vor Erreichen der Plateauphase bei bereits ca. 80% der maximalen Kontraktion gestartet werden. Nur jene Ringe, die erwartete, dosisabhängige Änderungen als Antwort auf die eingesetzten Stimuli zeigten, wurden für die eigentlichen Experimente weiterverwendet. Nach neuerlichem Waschen der Ringe wurde diese abermals durch Zugabe von Norepinephrin zur 80%igen Kontraktion angeregt. Je nach Versuchsplanung, wurde anschließend das modifizierte HDL in einer oder mehreren bestimmten Konzentration zugegeben und eventuell auftretende Effekte bezüglich Relaxation, aber auch Kontraktion, aufgezeichnet. Generell wurden jeweils pro Bedingung (LacZ und EL - HDL) vier Ringe analysiert. Auffällig war, dass im Allgemeinen die Ringe in Antwort auf Zugabe von EL- modifiziertem HDL in der dadurch induzierten Relaxation eine sehr hohe Streuung zeigten, währenddessen das Kontroll-HDL in einheitlicheren Ergebnissen resultierte.

3.5 NITRITBESTIMMUNG

Um den möglichen Einfluss des modifizierten HDLs auf eNOS zu untersuchen, wurde im Zelllexperiment entsprechend der jeweiligen Versuchsanleitung HDL in unterschiedlichen Konzentrationen mit Endothelzellen inkubiert. Anschließend wurde aus dem dabei gesammelten Medium, mittels HPLC der Gehalt an Nitrit bestimmt. Die Experimente dazu, angefangen vom Versuch in der Zellkultur bis hin zur HPLC, wurden von Andrijana Kirsch durchgeführt und sind im Folgenden exemplarisch für einen Versuchsablauf erklärt.

Besonderheiten für den Umgang mit der eingesetzten Endothelzelllinie EA.hy926 sind die Zugabe von 1% HAT – Mediumzusatz, einem Selektionsmittel für Hybridomzellen. Zudem erfolgte die Trypsinierung mit Verwendung einer 0,025% Trypsin/0,01% EDTA - Lösung in geringerer Konzentration und in einem kürzeren Zeitrahmen (2 min) verglichen mit den HepG₂ Zellen. Die Kultivierung fand in EBEM Medium unter Zusatz von Antibiotika und weiteren erforderlichen Agenzien statt.

Am ersten Tag wurden pro Bedingung 38000 Zellen pro Well in einem Volumen von ca. 500 μ l Medium ausplattiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen am darauffolgenden Tag in 300 μ l DMEM - Medium für 3h bei 37° C inkubiert. Je nach Aufbau des Experiments wurden von jeder Bedingung auch die Proben unter Zugabe von LNNA, einem Inhibitor der eNOS sowie mit Mitführen von Kontrollen ohne Zellen bzw. mit Zellen aber ohne HDL im weiters eingesetzten Testmedium, gemessen. Während der genannten Inkubation wurde das anschließend benötigte DMEM - Medium mit enthaltenem HDL (entweder EL- oder Kontroll-Virus – modifiziert) vorbereitet. Zur weiteren Behandlung wurden vorsichtig 200 μ l vom Medium abgenommen und 100 μ l des vorbereiteten Testmediums hinzugefügt. Nach einer weiteren 30-60 minütigen Inkubation wurden 100 μ l des Ansatzes in vorgekühlte Eppis überführt und eingefroren, bevor die Zellen nach Absaugen des verbleibenden Mediums und einmaligen Waschen mit PBS durch Zugabe von 50 μ l einer 1 molaren NaOH Stocklösung (0,42% SDS) lysiert wurden.

BCA – PROTEINBESTIMMUNG

Für eine spätere Normalisierung der HPLC – Daten wurde von den Zelllysaten eine Proteinbestimmung durchgeführt. Die Verdünnung der Proben, sowie des BSA – Standards (2mg/mL) in sechs verschiedenen Konzentrationen erfolgte mit demselben Buffer, der auch für die Lyse der Zellen verwendet wurde.

Die Reaktionslösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und setzt sich aus 200 μ l Reagenz A und 4 μ l Reagenz B pro Probe zusammen. Die Bestimmung erfolgte durch Vorlage von 10 μ l Blank, Standard und Proben in einzelne Wells einer 96-well Platte und Zugabe von 200 μ l der Reaktionslösung, bevor die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert wurde und anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen wurde.

3.6 WESTERN BLOT

Für die Analyse der Proben auf PON und ApoA-I wurden Western Blots von reisolierem HDL, wie auch direkt von modifiziertem Plasma bzw. dem depletierten Pendant dazu gemacht. Für die denaturierenden Gele wurden dabei 12%ige SDS - Gele laut Anleitung gegossen und jeweils 10 μ g Protein aufs Gel geladen. Vom Plasma-Medium Mix wurden bis zu 3 μ l und vom depletierten Material bis zu 4 μ l aufgetragen. Als Standard kam bei den denaturierenden Gelen der Proteinmarker IV der Firma VWR Life Sciences (vormals peqLab) zum Einsatz. Nach erfolgtem Lauf der Elektrophorese bei 10 min bei 200 Volt und anschließenden 50 min bei 175 Volt wurde das Gel im Sandwich auf eine PVDF-Membran (Amersham™ Hybond™ P0,45 PVDF, GE Healthcare Life Sciences) bei Kühlung im Eiswasser für 90 min bei 0,15 Ampere geblottet. Die Membran wurde gemeinsam mit dem darunterliegenden Filter zugeschnitten und

für die anschließende Inkubation mit 2 verschiedenen Primärantikörpern, entsprechend den zu erwartenden Größen der PON und ApoA-I Fraktionen, in 2 Hälften geteilt. Im Detail wurde hierfür die Membran auf Höhe der Markerbande bei 35 kDa durchtrennt. Beide Teile wurden mittels einer mindestens einstündigen, meist aber über Nacht bei 4° C andauernden Inkubation in 10%iger Milch geblockt, bevor die Membrane unter Schwenken für mindestens 1 h oder auch über Nacht bei 4° C mit den jeweiligen Erstantikörpern inkubiert wurden. Die eingesetzten Antikörper wurden laut Tabelle 33 in 10%iger Milch verdünnt und verwendet. Nach 6maligem Waschen durch jeweils 10-minütigem Schwenken im Waschbuffer folgte eine einstündige Inkubation mit 1:2000 verdünntem anti-Maus Antikörper, an welchem das Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Danach wurden nach weiteren 6 Waschschritten die Membrane mittels Immobilon™ Western chemilumineszenten HRP Substrat (Millipore®) laut Anleitung für ca. 4 min entwickelt und Aufnahmen der Membrane bei variierenden Belichtungszeiten am Gerät ChemiDoc mithilfe der Software ImageLab erstellt. Für die Zuordnung der Größe der Banden wurde außerdem noch eine normale Aufnahme mit Licht im sichtbaren Bereich unter der Einstellung „Colorimetric“ zur Markerdetektion gemacht. Auch die Auswertung der Intensität der einzelnen Banden erfolgte durch die ImageLab Software mithilfe der Funktionen im Menüpunkt „Image Tools“. Für die weitere statistische Analyse der Ergebnisse wurden die erhaltenen Werte mit der Software Prism5 ausgewertet.

Tabelle 3: Verwendete Antikörper, die in 10%iger Milch verdünnt zum Einsatz kamen

Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>Primärantikörper</i>		
Ms mAB to PON1	abcam – ab24261 Cambridge, UK	1:1000
mAB anti-Apolipoprotein A I	Novus Biologicals – NB100-65491 Littleton CO, USA	1:3000
<i>Sekundärantikörper</i>		
polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulin/HRP	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark	1:2000

3.7 NATIVE GELE UND FÄRBUNGEN

Für die Analyse, insbesondere der Größe, wurde von vorhandenem Probenmaterial (HDL, Medium und depletiertem Medium) einerseits ein natives Coomassie gefärbtes Gel zur Detektion der Proteine, als auch ein Sudan – gefärbtes Gel zur Detektion der Lipidanteile gemacht. Im Besonderen kamen hier von der Firma NuSep (Wasserburg, Deutschland) erworbene Gele mit einem Gradienten von 4-20% zum Einsatz. Die Auftrennung erfolgt dabei entsprechend der Partikelgröße der Moleküle, die soweit wandern können, wie es die Größe der Poren im Gel erlaubt. Als Proteinmarker diente gekaufter Protein-Standard Native Mark™ Protein Std der Firma invitrogen© (mittlerweile übernommen von Thermo Fisher Scientific). Alle Proben wurden mit 4x Buffer verdünnt, bevor der Lauf der Gele durch Beladen im vorgekühlten Buffer (siehe unten) für native Gele vorbereitet wurde. Die Gradientenelektrophorese erfolgte bei 125 Volt für 5 Stunden. Anschließend wurden die Gele für die Coomassie Färbung für 30 min in einer 5,5 – Sulfosalicylsäuredihydratlösung fixiert und über Nacht unter permanentem Schwenken in der Coomassie – Lösung gefärbt. Die Sudanlösung (siehe unten) wurde für jede Färbung frisch vorbereitet und vor Verwendung für 30 min bei 3000 G zentrifugiert. Eine vorangehende Fixierung der Gele war in diesem Fall nicht notwendig, stattdessen wurde direkt die Färbelösung nach erfolgter Elektrophorese in einer Schale auf das Gel gegeben, wiederum mit Parafilm verschlossen und über Nacht unter Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurden die verschieden gefärbten Gele jeweils nach dem Entfernen der Färbelösung durch Zugabe und mehrmaligen Wechseln der entsprechenden Destaining Solution entfärbt, bis sich die angefärbten Moleküle gut vom übrigen Gelhintergrund abgehoben hatten. In einer Klarsichtfolie wurden die Gele für die spätere Begutachtung und Analyse durch Einscannen am Kopiergerät digital festgehalten. Anzumerken ist, dass für die Sudanfärbung der mitgeführte Proteinstandard nach der Elektrophorese abgetrennt wurde und auch mittels Coomassie gefärbt wurde, um durch späteres Zusammensetzen eine ungefähre Zuordnung in der Größe der detektierten Lipide treffen zu können. Zum direkten Vergleich der modifizierten HDL wurde zum Teil auch 10µg unmodifiziertes, isoliertes HDL als Kontrolle mitgeführt. Im Anschluss finden sich eine Auflistung der hier verwendeten Buffer und ihre genaue Zusammensetzung:

Laufbuffer für native Gele:

90 mM Tris
80 mM Borsäure
3 mM EDTA
Auf 1 L dH₂O

Sudan – Staining Solution:

0,25 g Sudan
10 mL Aceton
7,5 mL Essigsäure
Ca. 39 mL dH₂O

3.7.1 NATIVER PON BLOT

Die Detektion von PON, wie auch ApoA1 unter nicht denaturierenden Bedingungen erfolgte bei gleicher Probenvorbereitung, bezogen auf Ladebuffer und verwendetem Standard, wie generell bei nativen Gelen (siehe 3.7 Native Gele und Färbungen) beschrieben. Die Gradientenelektrophorese wurde im Unterschied dazu allerdings unter Verwendung von 4-16%igen Gradientengelen (NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel) der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA, und einer Laufzeit von 210 min bei 125 Volt durchgeführt. Nach Blotting des gelaufenen Gels für 1 h bei 400 mA auf die PVDF - Membran wurde selbige mit Ponceau-red für eine Minute entfärbt und gleich wieder entfärbt, um den Standard sichtbar zu machen. Nach Erstellung einer Kopie der standardmarkierten Membran wurde diese weiter entfärbt und im Anschluss ab dem Blocken in 10%iger Milch der weiteren Prozedur laut 3.6 Western Blotting unterzogen.

3.8 SAXS – ANALYSE

Um tiefere Einblicke in die Struktur und Größe der EL - modifizierten HDL-Partikel im Vergleich zu Kontrollproben zu erhalten, wurden dankenswerter Weise von Tobias Madl sogenannte *small angle X-ray scattering* (SAXS) Analysen durchgeführt und die Ergebnisse mittels berechneten Modellen dargestellt.

Prinzipiell ist diese Anwendung eine Kontrastmethode, bei der das gestreute Signal durch Unterschiede in der durchschnittlichen Elektronendichte im Molekül vom Interesse, verglichen mit der Elektronendichte des umgebenden Mediums, entsteht. Bei der Messung werden praktisch Daten von der Streuung eines Blanks gesammelt, wie auch Daten der gewünschten Probe (zB Proteine oder DNA). Durch Subtraktion beider erhält man die spezifische Streuung für die eingesetzte Probe und kann anhand der erhaltenen Ergebnisse Aussagen über die potentielle Struktur und Größe des Moleküls treffen [42]. Eine nähere Beschreibung dazu findet sich im Ergebnisteil unter 4.1.5 SAXS (Small-Angle X-ray Scattering)

3.9 ARYLESTERASEMESSUNGEN

Wie bereits im Kapitel 1.4.1 Allgemeine Eigenschaften und Funktion von PON1, erklärt, ist eine Möglichkeit zur Bestimmung der PON1- Aktivität die Arylesterasemessung, die im Rahmen dieser Arbeit am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der Karl Franzens Universität Graz von Sabine Kern durchgeführt wurde.

Die Fähigkeit zur Hydrolyse des eingesetzten Substrates soll Einsicht in die Aktivität von PON1 geben. Speziell wurden dabei folgende Proben von den in der Zellkultur durchgeführten Plasmodifikationen analysiert:

- EL-modifiziertes HDL
- LacZ bzw. empty – modifiziertes HDL (=Kontrolle)
- Medium der beiden Modifikationsmöglichkeiten (EL und Kontrolle) und jeweils
- ApoB-depletiertes Medium

Das Prinzip der Messung basiert auf einer durch PON katalysierten Umsetzung des Substrats Phenylacetat zu Phenol, welche photometrisch bei einer Wellenlänge von 270 nm gemessen werden kann. Dazu wurde 1 µg des zu messenden HDL mit 200 µL eines Reaktionsbuffers (pH 8) bestehend aus 100mM TRIS (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 2mM CaCl₂ (Merck GesmbH, Wien, Österreich) und 1mM Phenylacetat (Sigma - Aldrich, Wien, Österreich), in eine 96-well Platte pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte alle 15 sec über einen Zeitraum von fünf Minuten, bevor die enzymatische Aktivität unter Anwendung des Beer – Lambert'schen Gesetzes und einem molekularen Extinktionskoeffizienten für Phenylacetat von 1310 L*mol⁻¹*cm⁻¹ berechnet wurde.

Die daraus erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich mit jenen der durchgeführten PON1 Western Blots kombiniert, um ein detailreicheres Bild über den Zusammenhang der Funktion und Präsenz von PON1 zu bekommen.

3.10 MASSENSPEKTROMETRIE

Um die genaue Lipidzusammensetzung zu bestimmen, die im HDL nach Modifikation durch die EL- sowie kontrollinfizierten HepG₂-Zellen vorherrscht, wurde entsprechendes Probenmaterial zur Messung an das Institut für Molekulare Biowissenschaften der Karl Franzens Universität an Thomas Eichmann weitergegeben. Dort wurde mittels LC-MS ein detailliertes Lipidprofil der Proben erstellt, bestehend aus der Bestimmung der Anteile des Gehaltes der Unterklassen an Phosphatidylcholin (PC), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Triglyzeriden (TAG), freiem Cholesterin (FC), und Cholesterinester (CE).

Dazu wurden 300 µg der HDL Proben zweimal mit Chloroform/Methanol/Wasser (2/1/0,6, v/v/v) extrahiert und weiter für 1 h am Schüttler bei Raumtemperatur in mit einer Extraktionslösung bestehend aus 500 nm Butylhydroxytoluol, 1% Essigsäure und 4 nmol internen Standardmix (C17 - LPC, C17 - PC, C17 – TAG; Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) geschwenkt. Anschließend wurde das organische Material durch Zentrifugation bei 1000 G für 15 min bei Raumtemperatur gesammelt und unter Stickstofffluss getrocknet. Für die weitere

UPLC - qTOF Analyse wurden die Proben in 1 mL Chloroform/Methanol/2-Propanol (2/1/12, v/v/v) rückgelöst und unter Verwendung einer HSS T3 Säule (2,1x100 mm, 1,8 µm; Waters Corporation) im AQUITY – UPLC System (Waters Corporation) zuerst chromatographisch aufgetrennt. Die Analyse der Proben erfolgte mithilfe einer ESI - Quelle und unter Einsatz des Detektors SYNAPT™ G1 qTOF HD MS (Waters Corporation, Milford, Massachusetts). Die weitere Verarbeitung der Daten fand unter Verwendung der MassLynx 4.1 Software (Waters Corporation) und Lipid Data Analyzer 1.6.2 Software statt.

3.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Sämtliche Daten der durchgeführten Experimente wurden mit der Software GraphPad Prism5.0 und teilweiser Datenaufbereitung mithilfe der Software, Microsoft Office Excel auf ihre statistische Relevanz überprüft. Für die Bewertung der Signifikanz der erhaltenen Ergebnisse wurde ein ungepaarter Students t-Test der Daten der jeweiligen Bestimmungen durchgeführt. Dabei wurde ein Signifikanzlevel von $p < 0,05$ angewandt. Zur grafischen Darstellung wurden auf Basis der gemessenen Daten der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) berechnet und eine festgestellte Signifikanz mit einem Stern (*) angezeigt, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ kennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

Die Resultate der durchgeführten Messungen und Analysen werden nachfolgend nach Methoden gegliedert dargestellt und sind außerdem entsprechend ihrer Information über HDL bezüglich Struktur oder Funktion untergeordnet. Bei bestimmten Anwendungen (zB Myografie) ist aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb der Triplikate keine Zusammenfassung sinnbringend – diese werden einzeln behandelt.

Insgesamt wurden vier Modifikationen nach gleichem Protokoll (siehe 3.2 HDL- und Plasmodifikation im Zellkulturexperiment) durchgeführt, bei denen isoliertes HDL im Medium für 16 Stunden mit EL- sowie LacZ-infizierten HepG₂ Zellen inkubiert wurde. Dabei wurden bei den jeweiligen Versuchen HDL verwendet, welches aus Plasma von drei verschiedenen Patienten isoliert wurde, um personenabhängige Effekte detektieren zu können. Zudem wurden 3 verschiedene Patientenplasmen im Zellkulturexperiment direkt modifiziert und reisoliertes HDL den verschiedenen Analysen unterzogen. Bei letzteren wurde zusätzlich nach der Modifikation, direkt Medium mit enthaltenem Plasma für spätere Analysen (zB. Arylesterasemessungen und Western Blots) aliquotiert. Dadurch sollten mögliche Effekte durch die stattfindende Ultrazentrifugation auf die Struktur bzw. Komposition des HDL im Rahmen der Reisolation vermieden bzw. aufgedeckt werden. Zur vereinfachten Präsentation der Ergebnisse, wird LacZ- und empty Virus-modifiziertes Material auch als Kontrolle bezeichnet.

Gleich vorweg sei angemerkt, dass bei allen durchgeführten Modifikationen, HDL wie auch Plasma direkt, die Ausbeute an gesamter Proteinmenge an HDL nach Reisolation bei EL – modifizierten Proben geringer war, als bei der entsprechenden Kontrolle. Für die weiteren Analysen wurde darauf geachtet, dass die beiden Bedingungen EL- und Kontroll-HDL in ihrer Konzentration ähnlich waren bzw. durch Verdünnen mit PBS vor dem Aliquotieren dementsprechend angepasst wurden.

4.1 KOMPOSITION DES MODIFIZIERTEN HDL

In folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der Analysen zusammengefasst, welche Auskunft über die Struktur, Größe und Lipidzusammensetzung des EL-modifizierten HDL verglichen mit dem Kontroll-modifiziertem HDL geben.

4.1.1 KITMESSUNGEN TC, TG, PL

Dargestellt sind die Ergebnisse der durchgeführten Kitmessungen zur Bestimmung des Gehalts an Totalcholesterin, TAG und Phospholipiden. Hierbei sei angemerkt, dass die jeweiligen Messungen unmittelbar nach Reisolation des HDL stattgefunden haben. Gezeigt werden Mittelwerte aus den HDL- und Plasmamodifikationen (HDL: n=4; Plasma n=5) mit berechneter Standardabweichung. Besonderes Augenmerk ist dabei auf die Änderung im Phospholipidgehalt von EL-modifizierten Proben verglichen mit Kontrollproben zu legen. Durch die Phospholipaseaktivität bei erfolgreicher Infektion der HepG2 Zellen mit dem EL – Virus ist anzunehmen, dass Phospholipidanteile im HDL vermehrt gespalten werden und somit eine Reduktion selbiger erkennbar ist.

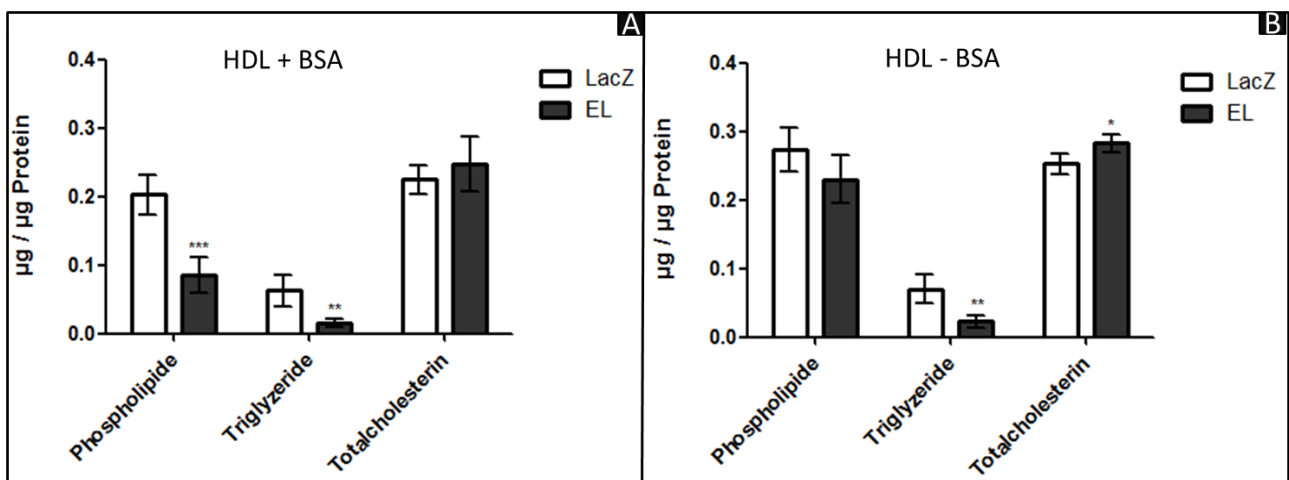


Abbildung 8: Auswertung der Kitmessungen zur Bestimmung der Zusammensetzung der EL-modifizierten HDL-Partikel im Vergleich zur Kontrolle

A: Zusammengefasst sind die Ergebnisse aus HDL-Modifikationen mit Zusatz von BSA (n=4) zur Bestimmung vom Totalcholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidanteil der modifizierten HDL-Partikel. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) von EL – HDL zu Kontroll – HDL ist mit * gekennzeichnet.

B: Die Modifikation erfolgte ohne Zusatz von BSA, was einen erheblichen Unterschied im Ergebnis der Phospholipidbestimmung ausmachte. Grund dafür sind die durch EL entstehenden Lysophosphat, die in Abwesenheit von BSA verstärkt am HDL verbleiben und die Messung verfälschen.

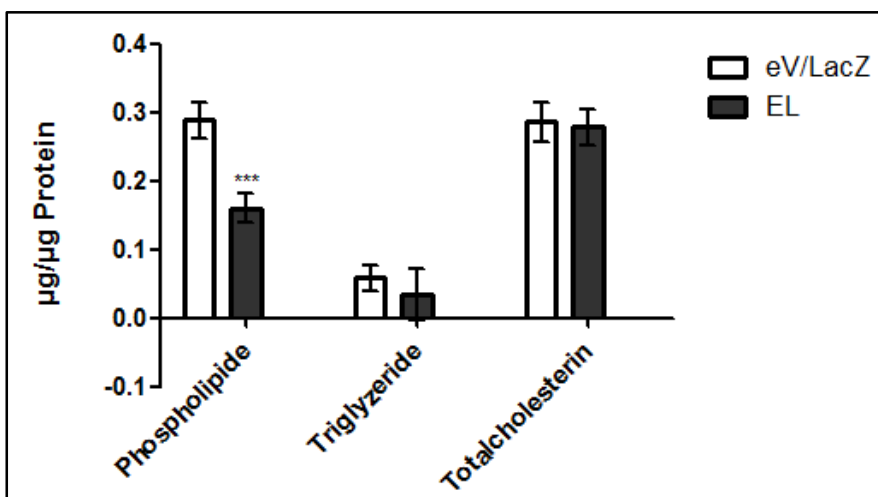


Abbildung 9: Beschaffenheit des HDL nach Plasmamodifikation

Ähnlich, wie bei der Modifikation von isoliertem HDL, war auch bei direkter Modifikation des Plasmas (50% in Medium) mit 4% BSA der Phospholipidanteil in den EL-modifizierten Proben deutlich geringer

4.1.2 NATIVE GELE

Für die Beurteilung der resolierten HDL – Proben wurde nach dem Lauf nativer Gradientengele (4-20%) die Größe der Protein- sowie Lipidanteile durch Anfärbung mittels Coomassie bzw. Sudan - Black visuell beurteilt. Passend zur beobachteten Verringerung des Phospholipidanteiles der EL-Proben bei den Kitmessungen, war bei allen HDL (Abbildung 10 A) - und Plasmamodifikationen (Abbildung 10 C-D) eine Verkleinerung der HDL-Partikel im Vergleich zur Kontrolle bei den Coomassie – Färbungen und auch Sudanfärbungen sichtbar, die durch eine Verschiebung der Bandengröße von ca. 11 nm auf eine deutlich kleinere (vermutlich zwischen 8,2 und 10 nm), charakterisiert ist. Bei den Proben, die unter Beisein von BSA modifiziert

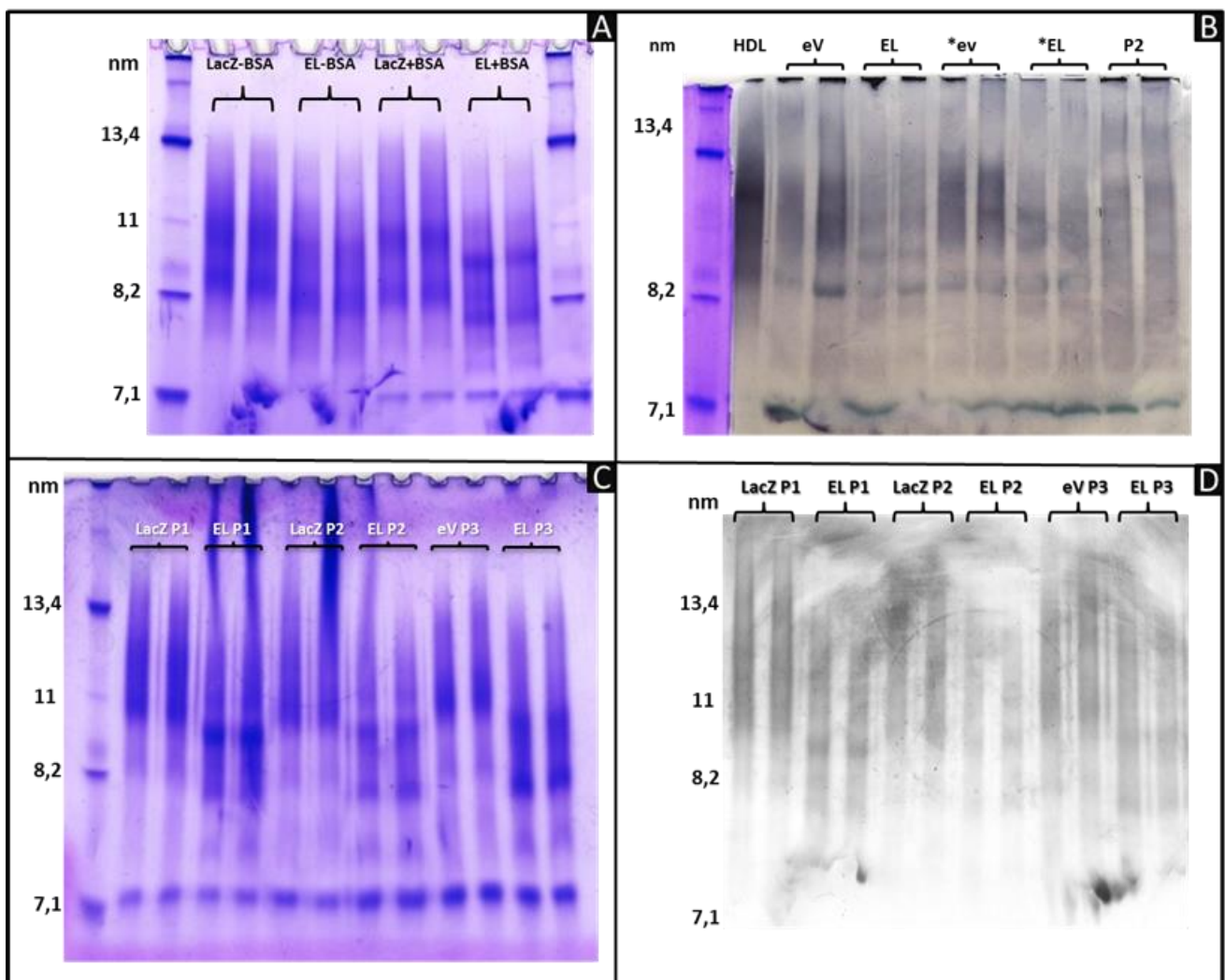


Abbildung 10: Coomassie und Sudangefärbte Gele nach 5 – stündigem Lauf der Proben auf 4-20% Gradientengele

A: Repräsentatives Bild einer Coomassie-Färbung der Proben einer HDL-Modifikation. Aufgetragen wurden 10µg resoliertes HDL **B:** Der mitgeführte Standard wurde nach Lauf des Gradientengels (4-20%) abgetrennt und Coomassie gefärbt, währenddessen die restlichen Proben mit Sudan gefärbt wurden. Aufgetragen wurden EL - und kontrollmodifiziertes Plasma (50% in Medium jeweils 3 µL) bzw. das *ApoB-depletierte Pendant (jeweils 4 µL) dazu, sowie unmodifiziertes isoliertes HDL (10 µg) und unmodifiziertes Plasma (1,5 µL) **C:** Coomassie-Färbung von den Proben der Plasmamodifikationen der 3 unterschiedlichen Plasmen (gekennzeichnet mit „P“ und der jeweiligen Zahl). **D:** Sudanfärbung von den Proben der Plasmamodifikationen der 3 unterschiedlichen Plasmen (gekennzeichnet mit „P“ und der jeweiligen Zahl). Aufgetragen wurden 10µg resoliertes HDL

wurden (siehe Abbildung 10 A LacZ- und EL-HDL + BSA sowie Abbildung 10 C), repräsentiert die Bande bei einer Größe von 7,1 nm die Anwesenheit von BSA, welches bei der Reisolation des HDL nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Neben den reisolierten HDL – Proben, wurde auch direkt Plasma (50% in Medium) und depletiertes Plasma der Modifikationen, sowie als Vergleich dazu einerseits isoliertes, unmodifiziertes HDL und auch unmodifiziertes Plasma am Gel aufgetrennt und in Folge der Lipidanteil mittels Sudanfärbung bestimmt. Dabei kann man in der repräsentativen Abbildung 10 B keinen wirklichen Unterschied in der Größe der lipidreichen Partikel des unmodifizierten HDLs und Plasmas verglichen mit dem kontrollmodifizierten Plasma bzw. depletierten Plasma beobachten, jedoch scheinen die Lipide bei ersteren gleichmäßiger über mehrere Partikelgrößen verteilt zu sein, erkennbar durch eine homogenere Anfärbung der jeweiligen Spur. Trotzdem lässt sich bei unmodifiziertem HDL auf Position 1 eine Konzentration der Lipide bei ca. 11 nm erkennen. Diese Größe ist vergleichbar mit dem hauptsächlich Lipidanteil in den Kontrollproben, besser ersichtlich bei depletiertem Plasma. Zusätzlich ist aber eine Bande mit einer Größe von ca. 8,2 nm bei allen Proben, die im Zellkulturerperiment (EL und auch KO) modifiziert wurden, erkennbar, welche sich vermutlich durch die Inkubation mit den HepG₂ – Zellen erklären lässt. Die Unterschiede zwischen EL und Kontrolle sind insgesamt bei den depletierten Proben (*eV vs *EL) besser ersichtlich, feststellbar durch eine insgesamt intensivere Färbung der jeweiligen Spuren und der erwarteten Verschiebung des EL – depletierten Plasmas (*EL) in der Größe von ca. 11 nm auf eine kleinere Partikelgröße.

4.1.3 NATIVER PON – BLOT

Die Analyse von PON1 unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte von reisolierendem HDL drei verschiedener Plasmamodifikationen. Trotz einer aufgetragenen Proteinmenge von 20 µg in allen Spuren, zeigte sich ein sehr inhomogenes Bild in der Intensität der Banden zwischen den Modifikationen (vgl. Abbildung 11, P1 – P3). An dieser Stelle sei angemerkt, dass aufgrund der allgemein schwachen Intensität der Banden bei ca. 8 – 11 nm der untere Teil der Membran (< 7,1 nm) aufgrund erreichter Maximalsättigung nach relativ kurzer Belichtungszeit, abgetrennt wurde und nochmal für längere Zeit belichtet wurde, wodurch eine leichte Verbesserung in der Sichtbarkeit der größeren Banden erzielt werden konnte.

Während bei den Proben von Plasma 3 kein PON detektierbar ist, bzw. bei Plasma 1 nur schwach, zeigen sich bei Plasma 2 (LacZ und EL P2) stärkere Banden und somit ein ähnliches Bild, wie bei den entsprechenden Coomassie – Färbungen, dass sich in einem Größenunterschied zwischen LacZ - und EL – HDL niederschlägt.

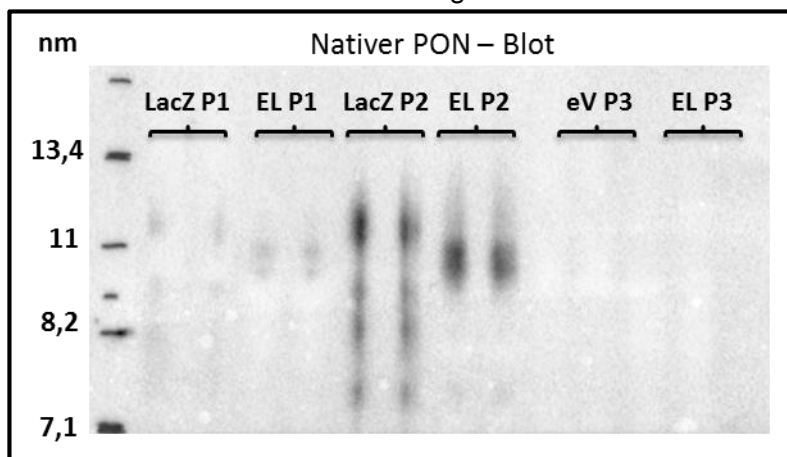


Abbildung 11: PON-Blot unter nicht denaturierenden Bedingungen

Lauf der HDL-Proben aus Plasmamodifikationen auf 4 - 16% Gradientengele. Bei Plasma 1 und 3 ist nur ein schwaches bis gar kein Signal sichtbar. Vergleichbar mit den Coomassie- und Sudanfärbungen zeigt sich bei Plasma 2 ein Größenunterschied zwischen Kontroll- und EL – HDL.

4.1.4 WESTERN BLOT: PON1 & APOA-I

PON1 ist unter anderem für die antioxidativen Eigenschaften des HDL verantwortlich und so wurde unter Einsatz von PON1 – spezifischer Antikörper getestet, ob eine Modifikation durch EL – infizierte Zellen einen Einfluss auf die Präsenz des Enzyms am HDL gegenüber der Kontrolle zeigt. Um Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge zu detektieren, wurde mit ApoA-I außerdem das am stärksten im HDL vorkommende Apolipoprotein mitbestimmt, welches von einer möglichen Aktivität der endothelialen Lipase unbeeinflusst bleiben sollte.

Die densitometrische Auswertung der Blots ergab sowohl bei den HDL- als auch Plasmamodifikationen einen signifikanten Unterschied der mit dem HDL assoziierten PON1-Mengen.

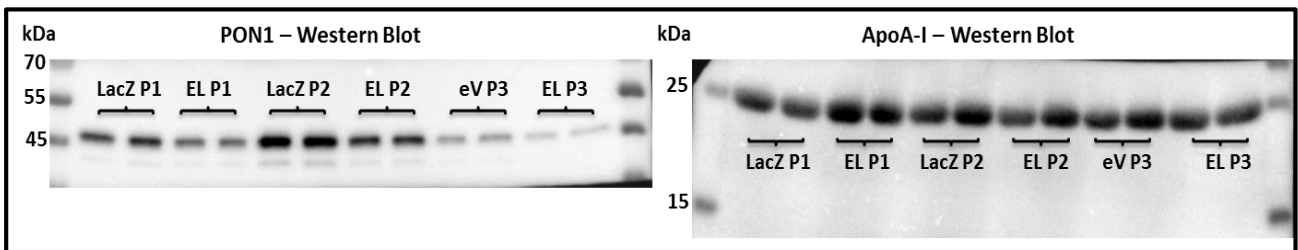


Abbildung 12: Repräsentativer Western Blot (SDS – PAGE) für PON1 und ApoA-I von reisolierem HDL aus Plasmamodifikationen

LacZ und eV beschreiben kontrollmodifiziertes HDL, welches jeweils neben dem simultan EL-modifiziertem HDL aufgetragen wurde. Die Art des verwendeten Plasma ist durch P1 - P3 angezeigt. Da bei ApoA-I zwischen EL-HDL und Kontrolle keine wirklichen Unterschiede in der Intensität der Banden erkennbar ist, kann man davon ausgehen, dass die Unterschiede bei PON1 nicht durch die aufgetragene Proteinmenge begründet sind.

Genauer gesagt, zeigte sich in allen Fällen, dass EL-modifiziertes HDL einen geringeren PON1 – Anteil als die entsprechenden Kontrollen aufweisen, während dem gegenüber im ApoA-I Blot dieses Muster nicht aufgefallen war (vgl. Abbildung 12).

Für eine annähernde Quantifizierung der Proben, wurde eine densitometrische Analyse der aufgenommenen Bilder durchgeführt, welche einen signifikanten Unterschied in der Menge von PON1 zwischen EL-HDL und Kontrolle in den durchgeführten HDL – Modifikationen (siehe Abbildung 13), sowie in den Modifikationen mit Plasma 1 und 2 ergab, ersichtlich in Abbildung 14. Bei Plasma 3 wurde die festgelegte Signifikanz ($p < 0.05$) mit einem Wert von 0.0532 knapp nicht erreicht. Eine densitometrische Auswertung der ApoA-I spezifischen Banden der EL- und Kontrollproben aus allen drei Plasmamodifikationen (vgl. Abbildung 14 B), ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden und lässt auf eine gleichmäßige Auftragsmenge von $10\mu\text{g}$ schließen.

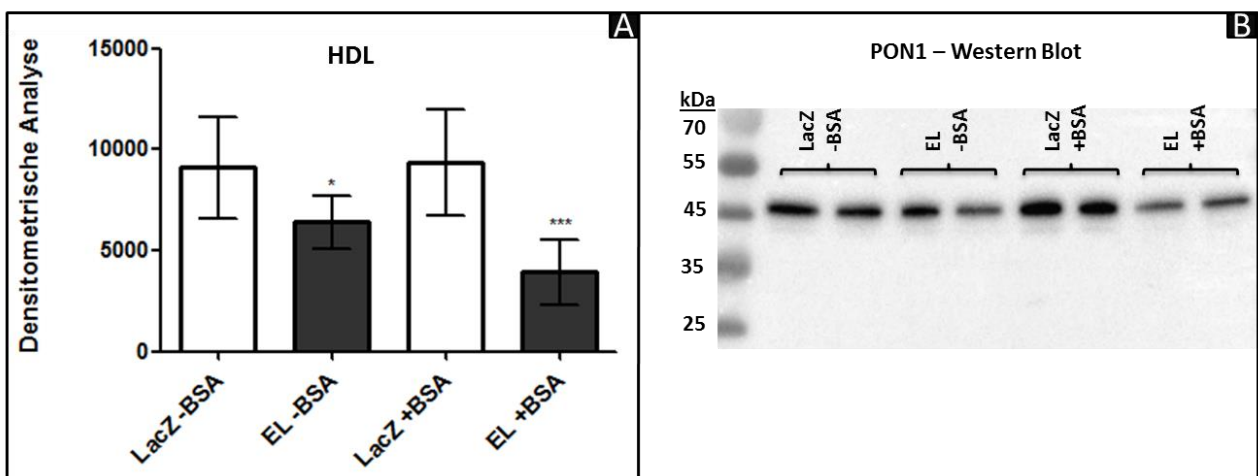


Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den PON1 - Western Blots mit den Proben aus den HDL – Modifikationen

A: Die densitometrische Analyse ($n=4$) der Banden des Pon1-spezifischen Western Blots ergibt eine signifikante Erniedrigung im PON1- Gehalt der EL- Proben verglichen mit den LacZ Proben, sowohl ohne als auch mit BSA.

B: Repräsentatives Bild eines PON1- Western Blots mit Proben aus einer HDL – Modifikation.

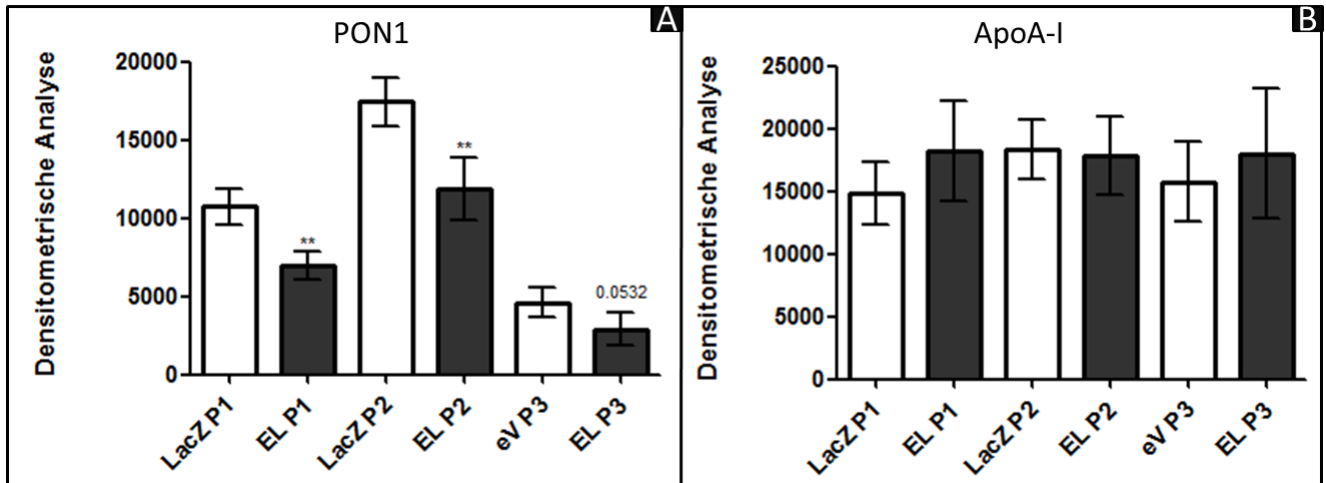


Abbildung 14: Zusammenfassung der densitometrischen Analyse der durchgeführten PON1- und ApoA-I Western Blots (SDS - PAGE) mit HDL aus drei Plasmamodifikationen (1-3)

PON1: ($n=4$) Bei EL-modifiziertem HDL ist in allen drei Plasmamodifikationen PON1 weniger präsent als in der jeweiligen Kontrolle. Der Faktor, der sich aus dem Vergleich von Kontrolle zu EL ergibt, scheint dabei in allen Experimenten ähnlich zu sein, währenddessen es sehr wohl Unterschiede in der Gesamtintensität zwischen den drei Probengruppen zu geben scheint.

ApoA-I: ($n=4$) Dargestellt sind jeweils die EL- modifizierten HDL-Proben sowie Kontrollen aus 3 verschiedenen Plasmamodifikationen als Mittelwert mit berechneter Standardabweichung. Dabei ist kein signifikanter Unterschied in der ApoA-I Menge feststellbar, was auf eine gleichmäßige Auftragsmenge von $10\mu\text{g}$ hindeutet.

4.1.5 SAXS (SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING)

Diese weitaus präzisere Messmethode zur Bestimmung von Größe und Oberflächenstruktur beruht im Prinzip auf der Messung von Röntgenkleinwinkelstreuung (*Small-Angle X-ray Scattering*). Die daraus ableitbare paarweise Abstandsverteilung (*pairwise distance distributions* $P(R)$) zwischen Elektronendichten im Molekül bestätigte den Trend, der sich schon aus den bisherigen Ergebnissen der durchgeführten Analysen ergab, nämlich dass die Modifikation des HDL durch EL-infizierte Zellen in einer Verkleinerung der Partikelgröße resultiert. Analysiert wurden neben reisolierten HDL-Proben aus einer Plasmamodifikation (Plasma 1) auch EL- und LacZ modifiziertes HDL (jeweils mit und ohne BSA) aus drei HDL-Modifikationen. Die Ergebnisse sind nachfolgend im Diagramm (siehe Abbildung 15) und auch als Modell (vgl. Abbildung 16) dargestellt.

Im Detail ergab dabei die Berechnung der Ergebnisse, dass die HDL Partikel in Gegenwart von BSA dichter sind und sich mehr Protein in der Mitte des Partikels befindet. Ohne BSA verschiebt sich der Proteinanteil in die äußeren Bereiche von HDL, wobei sich die maximale räumliche Ausdehnung (D_{max}) nicht detektierbar verändert. Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich durch den höheren Fettanteil der BSA-freien Proben erklären, da hier gespaltene Phospholipide (=Lysophospholipide) vermehrt in der Membran des Partikels stecken bleiben während sie in Anwesenheit von BSA mit diesem interagieren und leichter vom HDL-Partikel abgelöst werden. Im Vergleich der EL- mit den LacZ - Proben, ist eine, ebenso durch den Lipidgehalt verursachte, niedrigere radiale Dichteverteilung zwischen $20-40 \text{ \AA}$ deutlich erkennbar.

Grund dafür ist die weitaus geringere Elektronendichte in Lipiden, die sich in der SAXS Messung als negativer Beitrag (= geringere Elektronendichte als im Protein/Puffer) in der $P(R)$ niederschlägt. Die im Vergleich zu den EL-Proben deutlich niedrigere radiale Dichteverteilung weist auf einen erhöhten Lipidgehalt der LacZ - Proben hin.

Zudem ist die maximale räumliche Ausdehnung deutlich höher: die Dichteverteilung bei $R > 80 \text{ \AA}$ ist deutlich erhöht und der maximale Durchmesser D_{\max} liegt mit beinahe 160 \AA bei den LacZ - Proben deutlich über den EL-Proben (bis zu 140 \AA).

Einfacher sind die genannten Unterschiede in den Modellen auf der nächsten Seite ersichtlich, wobei es sich bei A um EL - Proben und B um LacZ - Proben einer HDL - Modifikation handelt, jeweils ohne (A/B - 1) und mit (A/B - 2) Zusatz von BSA. Die Anordnung der Kugeln sollte dabei die Verteilung der Proteinanteile im HDL - Partikel repräsentieren. Bemerkenswert ist dabei wie bereits erwähnt, dass in den Modellen A -1 und B - 1 aufgrund der Modifikation ohne BSA das Protein nicht so dicht gebündelt angeordnet zu sein scheint. Die Größe der Partikel ist jeweils durch einen schwarzen Pfeil angezeigt.

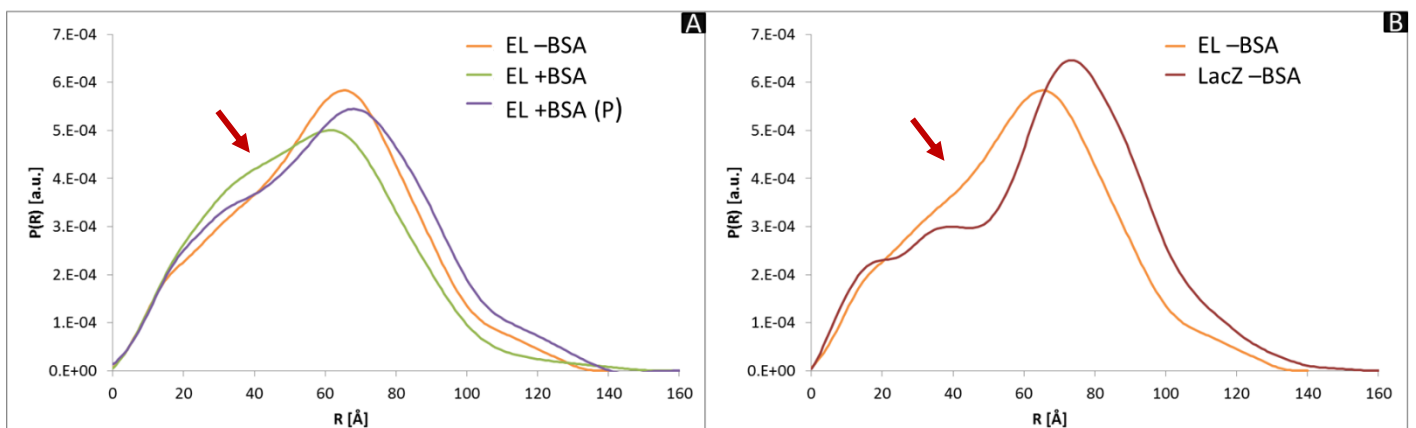


Abbildung 15: Ergebnisse der SAXS - Analysen dargestellt als Verteilungen $P(R)$

A: Zeigt EL-modifiziertes HDL, einmal aus einer Plasmamodifikation (P), mit und ohne BSA. Auffällig ist dabei der Unterschied (siehe roter Pfeil) im Verlauf der Verteilung von EL + BSA verglichen mit EL - BSA, der sich durch den höheren Lipidanteil in letzterem ergibt, was durch die geringere Elektronendichte in einem geringeren Signal niederschlägt. Die maximale räumliche Ausdehnung scheint dabei bei allen Proben gleich zu sein, ersichtlich aus demselben Endpunkt der verschiedenen Verteilungen auf der X - Achse.

B: Verglichen werden LacZ- und EL - modifiziertes HDL ohne Zusatz von BSA bei der Modifikation. Der rote Pfeil kennzeichnet die Unterschiede beider Verteilungen, die wie in A, Resultat des veränderten Lipidanteils der Proben sind. Zusätzlich ist durch die Aktivität von EL auch tatsächlich eine Verkleinerung der Partikel (vgl. EL - BSA) zu beobachten, ersichtlich anhand der gemessenen D_{\max} .

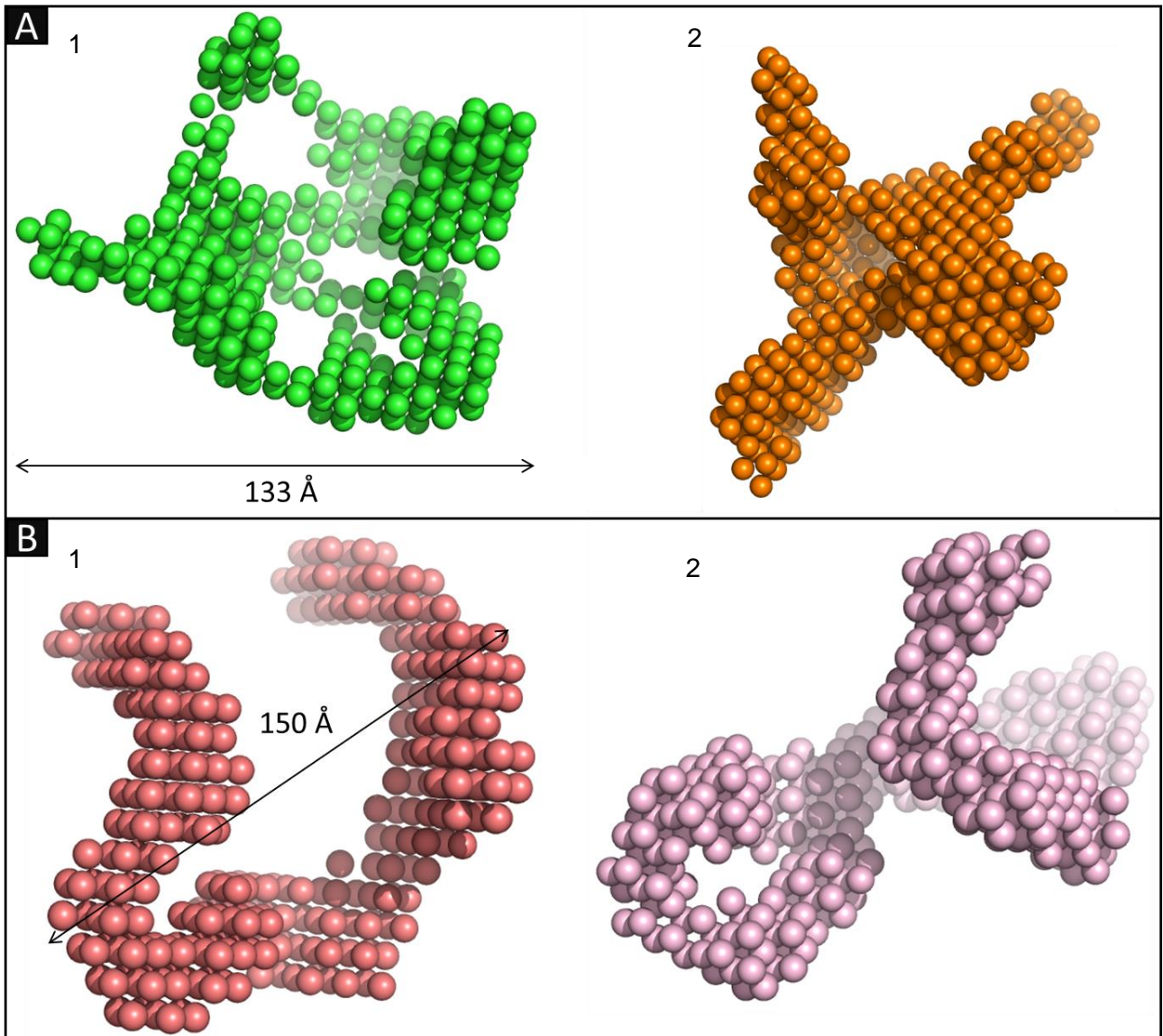


Abbildung 16: Modell der räumlichen Anordnung von Proteinanteilen im HDL auf Basis gemessener Daten aus der SAXS – Analyse

A: Modell wurde aus Daten von gemessenen HDL – Proben aus einer HDL – Modifikation durch EL – infizierte HepG₂ – Zellen erstellt. Dabei sind leichte Unterschiede in der Verteilung der Proteinanteile im HDL – Partikel erkennbar, wenn man die Proben ohne Zusatz von BSA (A-1) und mit zugesetztem BSA (A-2) während der Modifikation vergleicht. Genauer gesagt, scheinen die HDL – Proben ohne BSA ihr Protein lockerer am HDL – Partikel verteilt zu haben als die entsprechenden Proben, die unter Anwesenheit von BSA modifiziert wurden.

B: Dieselben Effekte zeigen sich in den LacZ – modifizierten HDL – Proben mit dem Unterschied, dass die HDL –Partikel hier generell größer zu sein scheinen, was auch den Erwartungen entspricht, da hier keine Spaltung der Phospholipide durch die Lipase stattfinden sollte. B - 1: LacZ ohne BSA; B – 2: LacZ mit BSA

4.1.6 MASSENSPEKTROMETRIE: LIPIDPROFIL

Die in der LC – MS beobachtete Zusammensetzung von den verschiedenen modifizierten HDL-Proben aus den Lipidklassen PI, PC, LPC, TAG, FC und CE bestätigt die angenommene Komposition aufgrund der Kitmessungen zur Bestimmung von Totalcholesterin, Triglyzeride und Phospholipide. Im Unterschied zu diesen chemischen Analysen, kann durch die viel genauere Messmethode der Massenspektrometrie auch LPC von PC unterschieden werden und somit auch der Effekt von EL unter Beisein von BSA besser beurteilt werden. Analysiert wurden im Speziellen nur HDL – Proben aus den Plasmamodifikationen von Plasma 1 und 2. In Abbildung 18 sind alle Ergebnisse der Messungen zusammengefasst und jeweils in die jeweiligen Lipidklassen unterteilt. Besonders bei PC, LPC und auch TAG zeigt sich im Vergleich von LacZ - bzw. empty Virus – HDL mit EL – HDL ein klarer Unterschied in der Zusammensetzung, was Indikator für eine erfolgreiche Infektion der HepG₂ – Zellen mit dem EL – Virus ist. Erwartungsgemäß kommt es durch die Spaltung von Phospholipiden zu einer signifikanten Reduktion im PI -, PC – und auch TAG - Gehalt der EL – Proben. Passend dazu, zeigt sich eine deutliche Erhöhung an LPC in diesen HDL – Proben. Im Gegensatz dazu, ist im Cholesteringehalt (FC und CE) kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Modifikationen feststellbar. Interessant, wäre für die genauere Beurteilung der Wirkung des zugesetzten BSA noch eine Vergleichsmessung mit Proben aus einer Plasmamodifikation ohne BSA gewesen. Grundsätzlich wird aber angenommen, dass BSA die durch die Aktivität von EL entstehenden Spaltprodukte bindet und dadurch in gewisser Weise aus dem HDL – Partikel zieht, währenddessen diese in Abwesenheit von BSA einfach im Partikel stecken bleiben. Abbildung 17 fasst die Verteilung der LPC aus den Proben der Plasmamodifikationen auf die verschiedenen Subklassen entsprechend der Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen zusammen. Dabei ist vor allem in 18:1, 18:2, 20:3, und 20:4 der Gehalt im EL – HDL deutlich höher als im jeweiligem Kontroll – HDL.

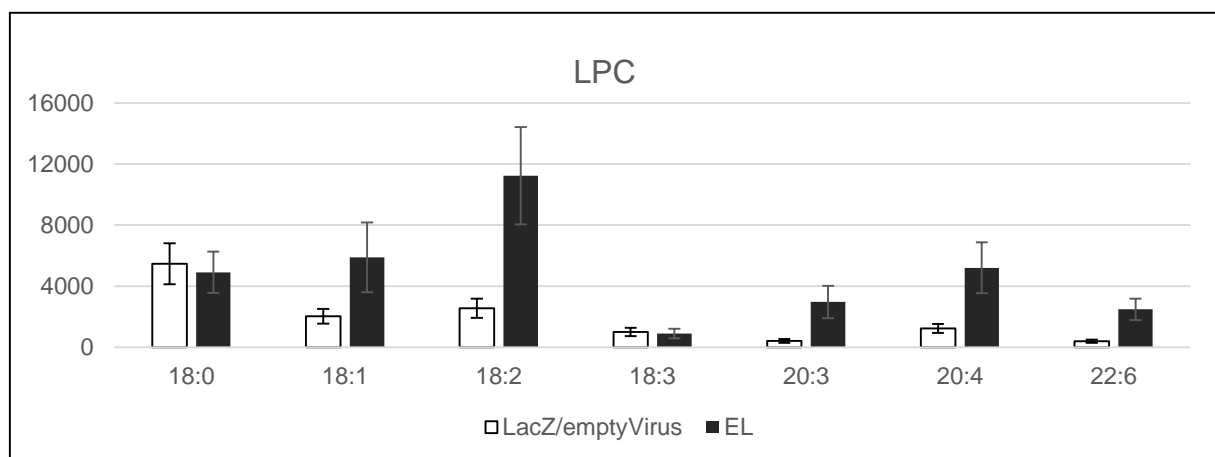


Abbildung 17: Übersicht über die einzelnen LPC – Klassen von EL – und Kontroll – HDL

Am häufigsten scheint im HDL, PC bzw. LPC mit 18 C – Atomen vorzukommen. Durch die Spaltung ist der LPC – Gehalt in den EL – Proben deutlich erhöht.

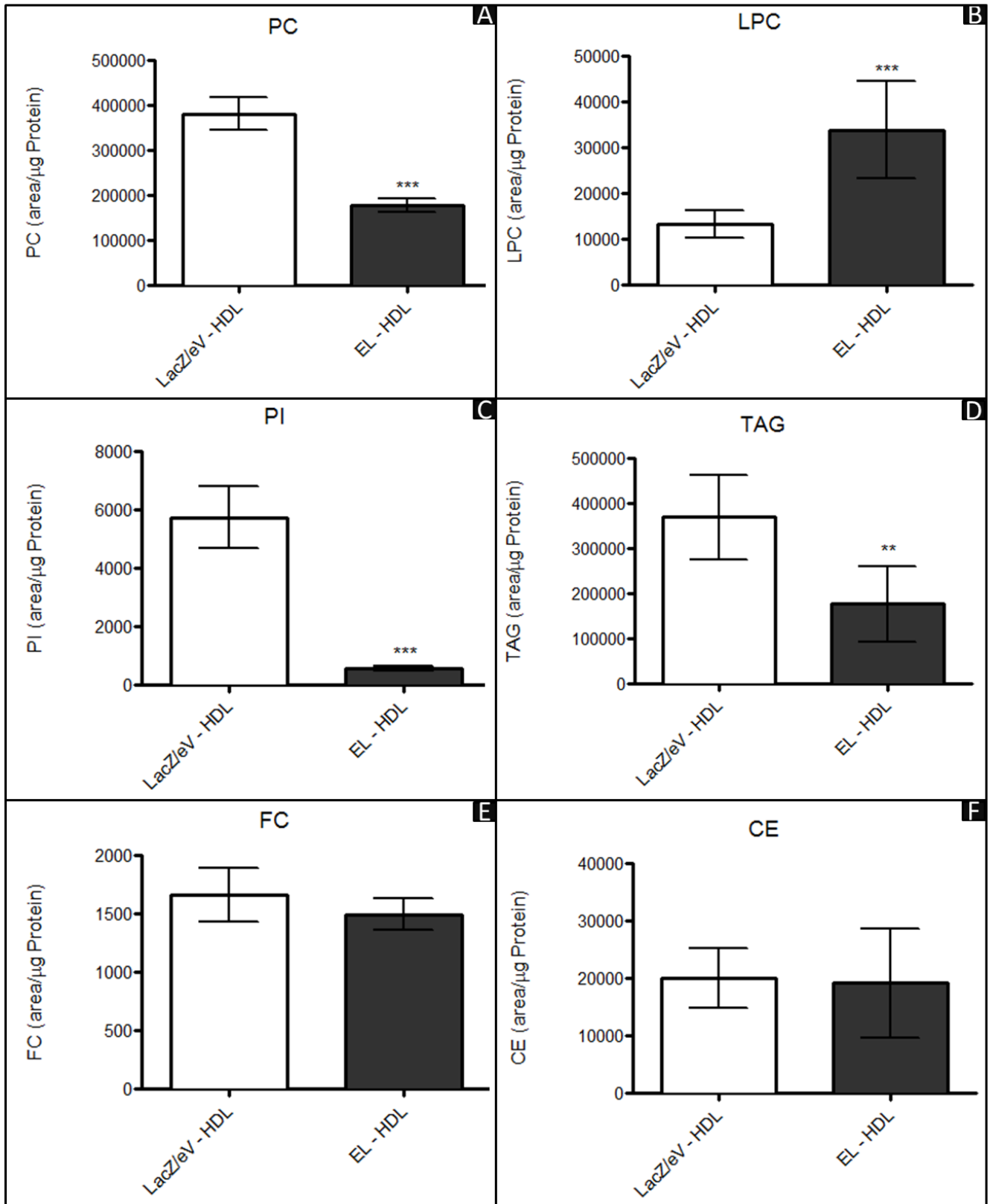


Abbildung 18: Mit LC – MS gemessenes Lipidprofil der HDL – Proben aus Plasmamodifikationen von Plasma 1 und 2 (n=6)

Verglichen werden immer LacZ – bzw. empty Virus – modifiziertes HDL mit EL – modifiziertem HDL.

A – Phosphatidylcholin (PC); B – Lysophosphatidylcholin (LPC); C – Phosphatidylinositol (PI); D – Triacylglyceride (TAG); E – Freies Cholesterin (FC); F – Cholesterinester (CE)

Bei den EL – modifizierten Proben ist ein signifikanter Rückgang der Phospholipide und auch Triglyceride beobachtbar, welcher den Erwartungen aufgrund der vorhandenen Phospholipaseaktivität der endothelialen Lipase in entsprechend modifizierten Proben entspricht

4.2 FUNKTIONALITÄT VON MODIFIZIERTEM HDL

Neben der Bestimmung von Struktur und Aufbau von *in vitro* modifiziertem HDL wurden auch Analysen durchgeführt, die eine mögliche Veränderung in der Funktionalität des HDL feststellen sollten. Besonders bei den Myografieversuchen, konnte sich aber vor allem bei den Plasmodifikationen kein eindeutiger Trend abzeichnen. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse dieser Methode im folgenden Kapitel auch einzeln dargestellt.

4.2.1 MYOGRAFIE

Die Menge und Funktion an HDL wird im Allgemeinen als wichtiger Faktor für die Entwicklung der Arteriosklerose gesehen, wobei unter anderem auch die direkte Wirkung am Endothel eine entscheidende Rolle spielt. Anhand der Methode der Myografie, bei der die Kontraktion bzw. Relaxation von Ringen einer Mauseorta in Antwort auf verschiedene Stimuli gemessen wird, sollte herausgefunden werden, ob die endotheliale Lipase das HDL in einer Weise modifiziert, dass dessen Effekt auf die Funktion der Endothelzellen ein anderer verglichen mit dem Kontroll-HDL (LacZ oder eV) ist.

In Abbildung 19 ist eine Zusammenfassung der Messung dargestellt, bei denen reisolierte HDL-Proben aus HDL-Modifikationen in vier unterschiedlichen Dosen (10, 30, 100, und 200 µg) zum Einsatz kamen. Die Analysen zeigten alle denselben Trend, nämlich dass EL-HDL

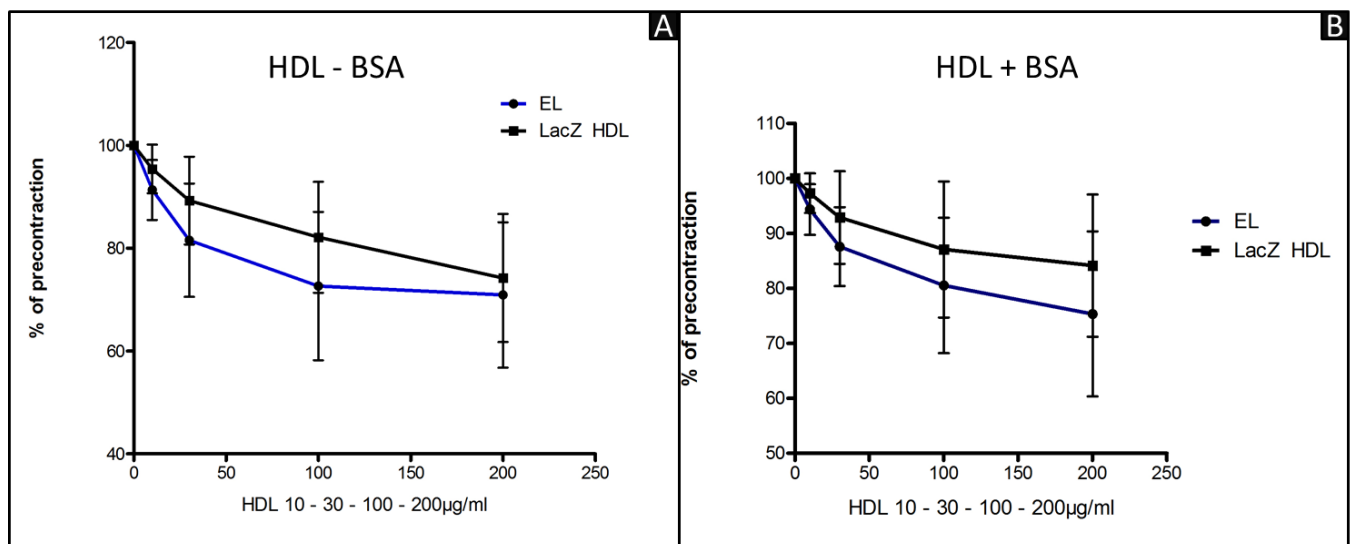


Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Myografien unter Einsatz von HDL aus HDL-Modifikationen

A: EL-HDL ($n=11$) ist in der Lage etwas besser zu relaxieren als eingesetztes LacZ-HDL ($n=14$) zur Kontrolle. Die Streuung ist bei allen Proben sehr hoch und so sind auch keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

B: Ähnlich verhält sich eingesetztes EL-HDL ($n=12$) zu LacZ-HDL ($n=15$), welches unter Zusatz von BSA modifiziert wurde. Wiederum sind eine hohe Standardabweichung und kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden HDL-Variationen zu beobachten, jedoch ist auch hier ein Trend erkennbar, dass EL-HDL besser zu relaxieren scheint.

dazu im Stande ist, die Aortaringe besser zu relaxieren als eingesetztes Kontroll – HDL. Jedoch wurde, auch aufgrund der mitunter sehr hohen Standardabweichung, keine Signifikanz dieser Unterschiede festgestellt. Vor allem bei den höheren Dosen (100 und 200 µg) scheint es aber, dass HDL, welches in Anwesenheit von BSA modifiziert wurde, einen eindeutigeren Trend hin zur besseren Relaxation vom EL – HDL zeigt.

Die Messungen mit HDL aus den Plasmamodifikationen ergaben teils widersprüchliche Ergebnisse und sind in Abbildung 20 dargestellt. Während sich bei HDL aus Plasma 1 der Trend aus den Experimenten mit Proben aus den HDL – Modifikationen bestätigte, dass EL – HDL besser relaxiert, zeigte sich mit den Proben aus Plasma 2 der genau gegenteilige Effekt in Form einer stärkeren Relaxation des LacZ – HDL (Kontrolle).

Die modifizierten HDL – Proben aus Plasma 3 sind nicht dargestellt und zeigten in der Myografie weder einen Trend hin zur besseren, noch zur schlechteren Relaxation von EL – HDL.

Generell wurden pro Bedingung immer vier Ringe im Rahmen einer Messung analysiert, welche oft trotz relativ homogener Reaktion auf die Vorstimulierung eine sehr unterschiedliche Reaktion auf den Zusatz von HDL zeigten und somit zu einer durchgehend hohen Standardabweichung der beobachteten Werte führten.

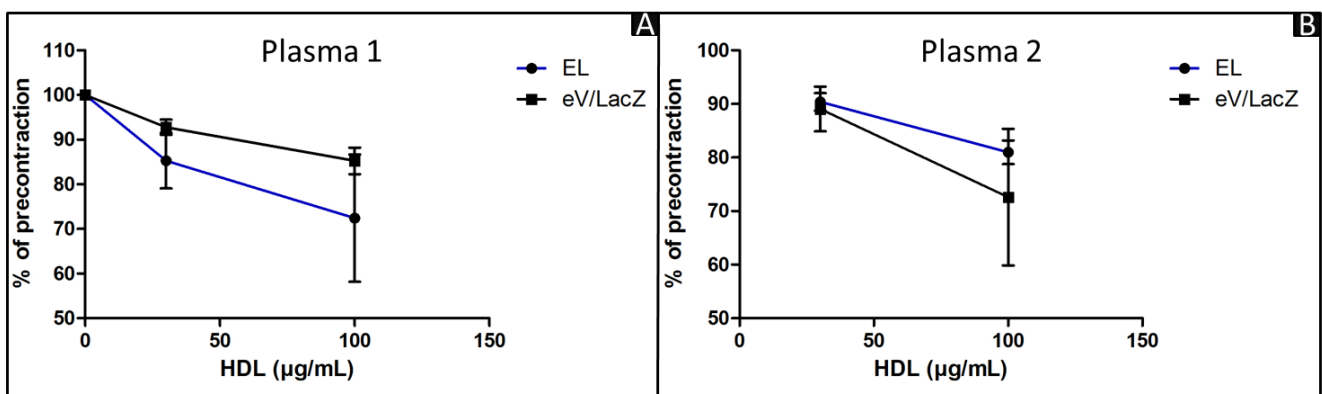


Abbildung 20: Ergebnisse der Myografie mit HDL aus Plasmamodifikationen

A: Getestet wurden zwei verschiedene Dosen (30 und 100 µg) an HDL (Plasma 1), wobei wieder eine hohe Standardabweichung sowie ein Trend zur besseren Relaxation von EL-HDL beobachtet wurden.

B: Unter denselben Bedingungen zeigte HDL der Plasmamodifikation mit Plasma 2 eine schlechtere Relaxation des EL – HDL bei wiederum sehr hoher Streuung der Einzelmessungen und somit der gegenteilige Effekt verglichen mit den bisherigen Experimenten.

4.2.2 NITRITBESTIMMUNG

In einem weiteren Zellkulturexperiment mit anschließender Bestimmung des Nitritgehaltes im Medium mittels HPLC sollte der Effekt von modifiziertem HDL auf die Aktivität von eNOS bestimmt werden. Dieses Enzym katalysiert die Bildung des wichtigen Signalmoleküls NO aus L-Arginin.

Um andere Quellen an Nitrit im Endergebnis auszuschließen und somit den eNOS – spezifischen Nitritgehalt zu bestimmen, wurde vom Totalnitritgehalt der Proben der jeweilige Wert der LNNA - inhibierten Proben abgezogen. Analysiert wurde dabei HDL aus Plasmamodifikationen (1-3) in jeweils zwei voneinander unabhängigen Experimenten, wobei im einzelnen Versuch Fünffachbestimmungen gemessen wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit berechneter Standardabweichung in Abbildung 21 dargestellt, normalisiert auf die jeweilige Proteinmenge.

Dabei zeigt sich in allen Experimenten, dass der Nitritgehalt bei den EL –Proben geringer ausfällt als bei den jeweiligen Kontrollen. Aufgrund der überaus hohen Streuung der Werte mit den Proben aus Plasma 1 wurden diese nicht in die zusammenfassende Berechnung genommen. Diese ergab für Plasma 2 und 3 eine eindeutige Erniedrigung an Nitrit in EL –Proben verglichen mit der Kontrolle, was eine hemmende Wirkung des EL – modifizierten HDL auf eNOS in Endothelzellen *in vitro* bedeuten würde. Zur statistischen Validation dieses Ergebnis sind aber noch weitere Versuche unter denselben Bedingungen notwendig.

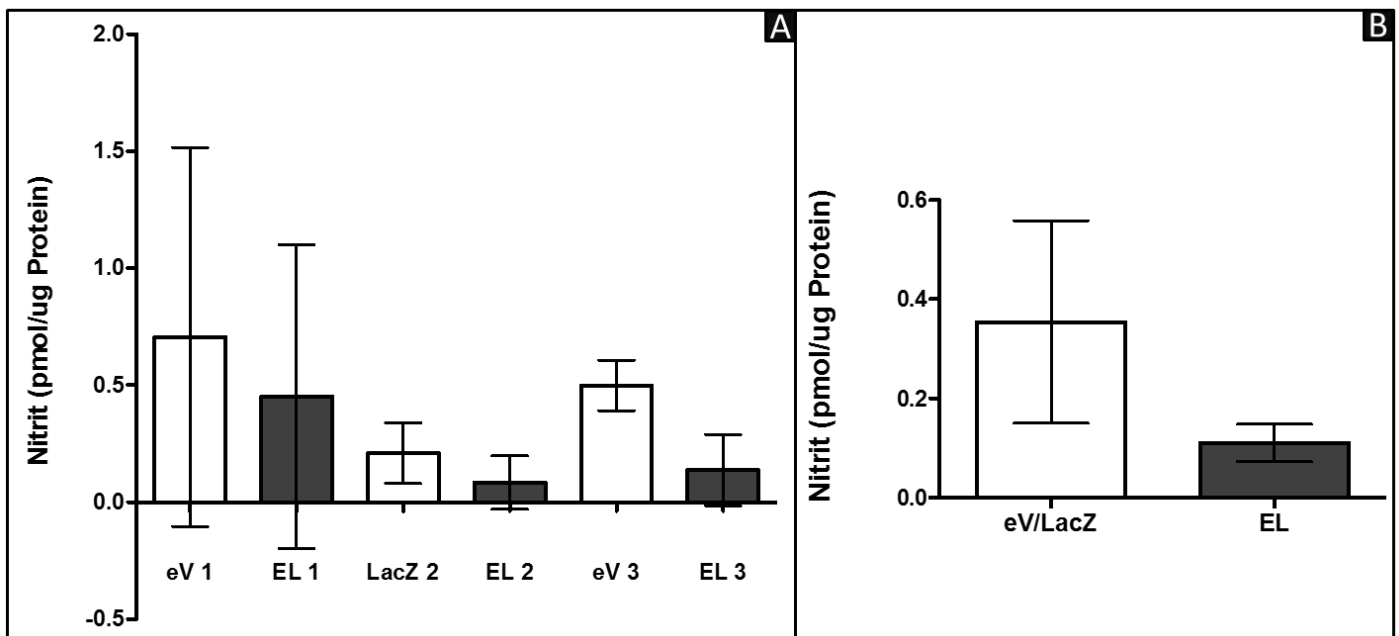


Abbildung 21: Ergebnis der eNOS – spezifischen Nitritbestimmung von Medium aus dem Zellkulturexperiment mit HDL aus den Plasmamodifikationen

A: Einzeldarstellung der durchgeführten Experimente – Vor allem bei Plasma 1 zeigt sich eine sehr hohe Standardabweichung. Generell ist ein verminderter Nitritgehalt in den EL – Proben feststellbar.

B: Zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Plasma 2 und 3, wobei sich eine recht deutliche Verminderung im Nitritgehalt der EL-Proben abzeichnet.

4.2.3 ARYLESTERASEMESSUNG

Als weitere Methode zur Abschätzung des Einflusses von EL auf die Funktionalität von HDL wurde die Arylesteraseaktivität in unterschiedlichem Probenmaterial bestimmt. Diese Messung sollte Rückschluss auf die Aktivität von PON1 erlauben.

Wie bei den anderen Analysen, waren auch in diesem Assay immer die zwei Bedingungen, EL- und kontrollmodifiziert, gegeben. Zusätzlich wurde neben (HDL-) Protein aus den HDL- und Plasmamodifikationen von letzteren auch direkt modifiziertes Plasma (50% in Medium + BSA) bzw. die jeweilige ApoB – depletierte Variante davon gemessen. Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse findet sich in Abbildung 22, wo die Unterteilung in A, B, C, und D entsprechend dem eingesetzten Material erfolgte. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl alle HDL - als auch Plasmaproben ein ähnliches Ergebnis lieferten, nämlich dass die EL – Proben im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere Aktivität zeigen.

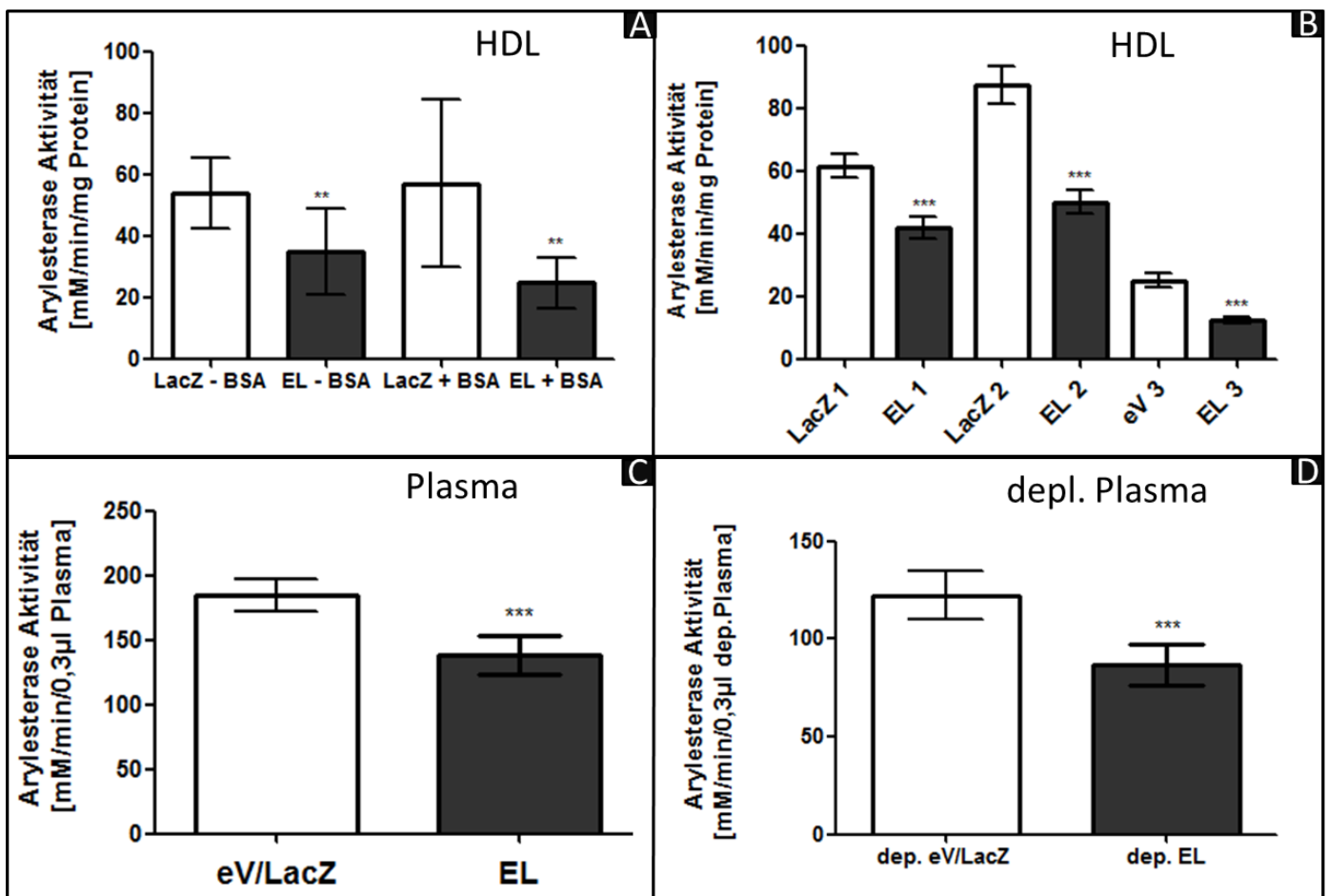


Abbildung 22: Arylesterasemessungen verschiedener Probenmaterialien

Diese resultiert im Gesamten in einer signifikant, geringeren PON - Aktivität der EL – Proben im Vergleich zur Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit berechneter Standardabweichung.

A: Untersucht wurde HDL ($n=9$) aus den HDL – Modifikationen. B: Zeigt die Analyse von HDL ($n=3$) aus den Plasmamodifikationen (1-3). C: Messung der Aktivität in Plasma (50% in Medium + BSA, $n=10$) aus den Plasmamodifikationen (1-3). Es kamen, wie bei ApoB - depletiertem Plasma (D) 3 µL des 1:10 verdünnten Probenmaterials zum Einsatz.

5 DISKUSSION

Im Zuge der durchgeführten Experimente der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt von EL auf die Eigenschaften von HDL beurteilt werden. Dazu wurde in vorangestellten Zellkulturexperimenten HDL oder direkt Plasma (50% in Medium) durch 16 - stündige Inkubation mit EL- bzw. kontrollinfizierten (LacZ bzw. empty Virus) HepG₂ – Zellen modifiziert und HDL mittels Dichtegradientenzentrifugation reisoliert. In weiterer Folge wurde das dadurch generierte, modifizierte HDL unterschiedlichen Untersuchungen zur Charakterisierung unterzogen. Im Besonderen wurden folgende Methoden zur Beurteilung von Komposition, Größe sowie Funktionalität angewandt: Kitmessungen zur Bestimmung von Totalcholesterin, TAG und Phospholipide, native Gradientengele und deren Färbung mit Sudan und Coomassie bzw. Detektion von PON1 mittels Immunoblotting, SAXS – Analyse, Messung des Lipidprofils durch LC – MS, ApoA-I und PON1 Western Blots, Bestimmung der Arylesteraseaktivität und des eNOS – spezifischen Nitritgehalts zur Bewertung der Funktionalität des modifizierten HDL, sowie nicht zuletzt Myografie. Letztere war auch die ursprüngliche Intention, die wesentlich die Zielsetzung dieser Arbeit beeinflusste. In unzähligen Myografiemessungen unter Verwendung von EL – modifiziertem HDL unserer Arbeitsgruppe hatte sich nämlich in früheren Versuchen gezeigt, dass jenes dazu in der Lage war, die Aortaringe der Mäuse schlechter zu relaxieren. Bei späterer Wiederholung der Versuche, zeigte sich aber durchgehend der gegenteilige Effekt, was sich in einer eindeutig besseren Relaxation der Aortaringe in Antwort auf EL – HDL im Vergleich zur Kontrolle niedergeschlagen hat. Um diesen kontroversen Ergebnissen auf den Grund zu gehen und die Unterschiede zwischen den modifizierten HDL – Varianten besser zu definieren, sollte durch diese Arbeit eine detailreiche Charakterisierung der unterschiedlichen modifizierten HDL – Varianten im Rahmen des Möglichen vollzogen werden.

Passend zur erwarteten Phospholipaseaktivität der endothelialen Lipase, zeigte sich durchgehend in allen EL – modifizierten HDL – Proben eine signifikante Reduktion im Phospholipidgehalt, währenddessen der Triglyceridgehalt zwar auch einen Trend zu einer Verminderung zeigte, allerdings nicht in diesem Ausmaß. Der Totalcholesteringehalt scheint auch von der Aktivität der endothelialen Lipase unberührt zu sein und weist nur einen äußerst schwachen Unterschied zwischen EL- und LacZ- bzw. empty Virus – HDL auf. Interessanterweise scheint dieser minimale Trend aber in die entgegengesetzte Richtung zu gehen, je nachdem ob direkt HDL oder Plasma modifiziert wurde. Während die EL – Proben aus ersteren einen leicht höheren Totalcholesteringehalt gegenüber der Kontrolle zu haben scheinen, zeigt sich bei EL – modifizierten Proben aus den Plasmamodifikationen eine schwache Reduktion des Totalcholesterins im Vergleich zur Kontrolle. Diese könnte das Ergebnis der Wirkung der weiteren, im Plasma präsenten Komponenten sein, welche im Rahmen der Modifikation neben der EL mit

dem HDL interagieren und es in seinem Aufbau verändern bzw. seiner Menge beeinflussen. Sieht man diese Veränderung im Zusammenhang mit den Resultaten aus der viel detaillierteren Messung der LC – MS, so scheint diese durch eine Erniedrigung im freien Cholesterin bestimmt zu sein, da dieses auch hier in den EL – Proben leicht reduziert ist, währenddessen sich bei der Bestimmung des Cholesterinesteranteiles keine Unterschiede zeigen. Zur Abklärung müssten aber noch weitere Wiederholungen der Modifikationen wie auch Messungen durchgeführt werden, um zufällige Abweichungen auszuschließen.

Bezüglich der strukturellen Veränderung, schlug sich diese Veränderung in der Komposition des HDL – Partikel in dessen Verkleinerung nieder, welche durch Gradientengelelektrophorese mit anschließender Färbung der Fett- und Proteinanteile erfasst wurde. Diese Veränderung bestätigte sich auch durch die hochauflösende Methode der SAXS – Analyse, welche neben dem erwarteten Größenunterschied zwischen EL- und Kontroll – HDL auch den Hinweis auf den Einfluss von BSA auf die Komposition des Partikels gab. Genauer gesagt, scheinen sich, wie bereits in den Resultaten erwähnt, die Proteinanteile in Abwesenheit von BSA lockerer und auch in den äußeren Bereichen des Partikels anzuordnen. Eventuell wäre es daher auch interessant, die Plasmamodifikationen, welche nur unter Zusatz von BSA von statten gingen auch nochmal ohne BSA zu wiederholen, da die Möglichkeit besteht, dass durch den veränderten Aufbau unterschiedliche Interaktionsstellen an der Oberfläche des HDL – Partikels exponiert sind und somit gewisse Vorgänge besser bzw. schlechter ablaufen können. Jedenfalls korrelieren die Resultate aus den durchgeführten Messungen zur Bestimmung von Komposition und Struktur der modifizierten HDL – Partikel auch mit den Ergebnissen aus Studien von Nijstad *et al* [43] und Maugeais *et al* [44], wo EL in Mäusen überexprimiert wurde und unter anderem der daraus resultierende Effekt auf die Plasmaphospholipaseaktivität, HDL – Partikelgröße und dem HDL – Umsatz beurteilt wurde. Dabei führte die Überexpression verschiedener EL - Dosen in Mäusen zu signifikanten Erniedrigungen der Plasmalevel von ApoA-I, HDL – Cholesterin und Phospholipiden. Eine Analyse des isolierten HDL aus EL – exprimierenden C57BL/6 Mäusen ergab neben unveränderten TAG – Gehalt und deutlich reduziertem PL – Gehalt, anders als bei den in Rahmen meiner Arbeit durchgeführten Messungen, wo nur ein minimale Veränderung im Totalcholesteringehalt feststellbar war, auch eine signifikante Verminderung des Gehalts an Cholesterinester und freiem Cholesterin. Die Ursache dafür könnte bei den unterschiedlichen Expressionssystemen liegen, die bei den Studien in den Versuchen eingesetzt wurden. Während in meiner Arbeit vereinfacht gesagt, lediglich HepG2 – Zellen kultiviert wurden und HDL darauf gegeben wurde, wurden bei Maugeais *et al* durch die Verwendung von Mäusen ein vollständiger, funktionierender Organismus behandelt und untersucht, bei dem weitaus komplexere Vorgänge in die Beschaffenheit der HDL – Partikel

eingreifen. So findet hier beispielsweise im Unterschied zum Zellkulturexperiment die Zirkulation des Blutes statt, wodurch die Partikel zu den verschiedenen interagierenden Organen, wie z.B. Leber und auch extrahepatisches Gewebe, gelangen. Nijstad *et al*/konnten zudem in seinen Experimenten beobachten, dass die SR – B1 vermittelte Aufnahme von EL – modifiziertem HDL in Wildtypmäusen im Vergleich zu Kontroll – HDL signifikant erhöht ist und konnten somit die Idee des funktionellen Zusammenspiels von EL und SR – B1 untermauern. Dieses basiert auf der Destabilisierung des HDL – Partikels durch Spaltung der Phospholipide und anschließendem Entfernen des lipidarmen ApoA-I über die Nieren bevor das HDL nach dem Entfernen von Cholesterinester durch SR – B1 wieder bereit für die Remodellierung und Beladung mit zu transportierenden Lipiden ist. Während in den aktuell von mir durchgeführten Versuchen die Komponente SR – B1 noch fehlt, wäre es in weiterführenden Versuchen angedacht, eine konsekutive oder Doppelinfection der HepG₂ – Zellen mit SR – B1 und EL Adenoviren zu testen um herauszufinden, ob bzw. in welchem Ausmaß sich dadurch die bereits bekannten Effekte der EL auf die Komposition und Funktionalität des HDL verändern.

Bezüglich des Nachweises von PON1 im reisolierten HDL, zeigte sich im Zuge der durchgeführten Experimente im Wesentlichen über alle Modifikationen hinweg ein ähnliches Bild. Die PON1 – spezifischen Western Blots lieferten nämlich bei den EL – HDL – Proben ein deutlich schwächeres Signal als das Kontroll – HDL. Diese Beobachtung lässt sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch durch die Spaltung der Phospholipide durch EL und der damit verbundenen Verkleinerung des Partikels erklären. Auch die Arylesterasemessungen zur Beurteilung der Aktivität von PON1 korrelierten mit den erhaltenen Signalunterschieden zwischen EL - und Kontrollproben in den Blots und resultierten in einer verringerten Arylesteraseaktivität der EL – Proben. Passend dazu, fielen auch die Erkenntnisse von Hara *et al* aus Experimenten mit EL^{-/-} Mäusen aus, die sich zum Ziel setzten die Unterschiede in der Qualität des HDL bezüglich entzündungshemmender und antioxidativer Kapazität zwischen Wildtyp - und EL – Knockout Maus zu definieren [45]. Im Detail konnte dabei beobachtet werden, dass die Plasmaaktivitäten HDL – assoziierter Enzyme, wie PON1, in EL^{-/-} - Plasma gegenüber dem Wildtyp – Plasma signifikant erhöht sind, was proportional zu den Plasmaspiegeln des HDL – Cholesterins in den verschiedenen Mäusen zu sein scheint. Allerdings wurden beim Einsatz von HDL – Protein dieselben Aktivitäten von PON1 in den beiden Varianten beobachtet, was möglicherweise die vergleichbaren und konkurrierenden, antioxidativen Eigenschaften der HDL – Partikel gegen die Kupfer – induzierte Oxidation von LDL widerspiegelt. Letztere war Teil der Experimentgestaltung, deren Durchführung und Auswertung Hinweise darauf gaben, dass die gezielte Inaktivierung von EL die Menge an HDL – Partikel mit intakten entzündungshemmenden und antiatherogenen Eigenschaften erhöht. Vor diesem Hintergrund bekräftigen unsere Ergebnisse die Theorie, dass EL die antioxidativen Eigenschaften von HDL reduziert. Die

Frage bleibt aber, ob dies nur aufgrund der mengenmäßigen Verminderung der HDL – Level passiert oder ob auch die Qualität der Partikel durch die Prozessierung der EL eine andere ist und beispielsweise nicht mehr so viele Interaktionsstellen für PON1 aufweisen kann. Jedenfalls stellt die Hemmung von EL auf Basis der bisherigen Erkenntnisse einen weiteren, vielversprechenden Therapieansatz dar, welcher vor allem für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zukünftig zum Einsatz kommen könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Nitritbestimmungen, basierend auf Zellkulturexperimenten unter der Verwendung von modifiziertem HDL und anschließender Messung des Nitritgehalts mithilfe der HPLC, geben Hinweis auf eine reduzierte Aktivität der eNOS nach der Zugabe von EL – modifiziertem HDL. Um diesen Trend zu untermauern, wäre es notwendig, weitere, voneinander unabhängige Wiederholungen zu messen und außerdem als zusätzliche Positivkontrolle unmodifiziertes HDL mitzuführen. Letzteres könnte Hinweis darauf geben, ob unter Verwendung dieses Versuchablaufs die allgemein anerkannte Meinung, dass HDL die Aktivität von eNOS stimuliert, bestätigt werden kann und somit das System an sich geeignet zur eNOS spezifischen NO - Messung ist. Glaubt man nichts desto trotz dem Trend aus den gemessenen Daten, so scheint sich dieser gegenteilig zu den Beobachtungen von Tatematsu *et al* zu verhalten [11]. In deren Studie sollte die Rolle von EL in der Kontrolle der endothelialen Signalübertragung und Biologie an sich, insbesondere aber das HDL und S1P betreffend, ermittelt werden. In Experimenten mit bovinen Aortaendothelzellen (BAEC), welche mittels siRNA in ihrer Expression der endothelialen Lipase gehemmt wurden, konnte dabei gezeigt werden, dass die HDL – vermittelte Aktivierung von eNOS durch das Ausschalten von EL abgeschwächt wurde. Als mögliche Ursache dafür, wird von Tatematsu *et al* basierend auf der beobachteten Wiederherstellung der eNOS – Aktivierung durch Stimulation mittels S1P, letzteres Molekül ins Spiel gebracht, von welchem angenommen wird, dass es physiologisch durch EL vom HDL – Partikel abgespalten wird und dadurch insbesondere über S1P₁ – Rezeptoren eine Aktivierung der eNOS, möglicherweise auch über den Akt – Signalweg auslösen kann. Basierend auf diesen Zusammenhängen, wäre es für zukünftige Messungen unter denselben Versuchsbedingungen daher auch von großem Interesse, den S1P – Gehalt der unterschiedlich modifizierten HDL – Proben mitzubestimmen. Zieht man aber nur die bisherigen Ergebnisse in Betracht, erscheint diese Hypothese, umgelegt auf unsere Beobachtungen widersprüchlich, da in diesem Fall unter Einwirkung der EL keine gesteigerte Aktivität von eNOS messbar war, obwohl rein theoretisch über die Spaltung durch die EL mehr eNOS - aktivierendes S1P freigesetzt werden müsste, sofern am Partikel vorhanden.

Es scheint hier eher eine Übereinstimmung der gemessenen Effekte mit früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe zu geben. Dabei hat Kozina *et al* in Zellkulturexperimenten mit

Ea.hy 926 – Zellen herausgefunden, dass eingesetztes LPC 18:1 nach kurzer Exposition mit den Zellen in einem verminderten Nitritgehalt resultierte, der interessanterweise aber nicht mit einem veränderten Phosphorylierungsgrad einherging, sondern vermutlich eher auf der durch die LPC induzierten, fehlenden Dimerisierung der eNOS – Monomere beruhte [40]. Es ist anzunehmen, dass diese Erhöhung der eNOS – Monomere auch speziell zu oxidativem Stress in den Zellen führten, ausgelöst durch die verstärkte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies diverser Oxidasen. Sieht man sich die Daten aus LC – MS genauer an (vgl. Abbildung 17), fällt eine deutliche Erhöhung (3x mehr) der LPC – Klassen 18:1, 18:2, 20:3, 20:4, und 22:6 auf, was wiederum zu den mit der LPC 18:1 assoziierten Hemmung der eNOS und den dadurch beobachtbaren, geringeren Nitritgehalten in EL – Proben passen würde.

Generell, waren nicht alle Messungen sehr eindeutig und einige resultierten in großen Abweichungen, was bei Wiederholungen eine Optimierung des Experimentprotokolls erforderlich machen würde. Auch wurde versucht, mit einer alternativen Messmethode die Bildung von NO bzw. die eNOS Aktivität zu erfassen. Leider brachte diese ebenfalls am Institut durchgeführte, innovative Anwendung der Detektion von NO mithilfe eingesetzter Fluoreszenzsensoren [46] keine Klarheit in diese Fragestellung, sondern zeigte nach Kontakt mit dem zu testenden HDL unerwartete Reaktionen.

Gemeinsam betrachtet, stellen sich unsere Ergebnisse des geringeren PON – Gehalts bzw. der verminderten PON1 – und auch eNOS Aktivität in EL – Proben schlüssig dar, wenn man sie mit den Erkenntnissen aus einer Studie von Besler *et al* vergleicht. Diese zielt im Wesentlichen darauf ab, die Effekte von HDL, aus an kardiovaskulär erkrankten (CAD) Patienten, auf eNOS – regulierende Mechanismen zu definieren [47]. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass HDL aus besagter Personengruppe (HDL_{CAD}) seine entzündungshemmenden Eigenschaften, ebenso wie die Fähigkeit, die Reperatur des Endothels zu stimulieren, verloren hat. Dieser Effekt ergibt sich vermutlich durch die HDL_{CAD} – vermittelte Stimulation des endothelialen *lectin – like oxidized LDL receptor 1* (LOX - 1), der wiederum die Aktivierung des PKC β II Signalweges in Endothelzellen auslöst. Dadurch werden letztendlich eNOS – aktivierende Vorgänge in der Zelle gehemmt und somit die eNOS – abhängige NO – Produktion vermindert. In weiterführenden Experimenten wurden von Besler *et al* eine geringere HDL – assoziierte PON1 – Aktivität, als einer der molekularen Mechanismen identifiziert, der zum Teil auch wegen des gesteigerten Malondialdehydgehalts zur Formation einer PKC β II aktivierenden Variante des HDL führt. Umgelegt auf unsere Versuche würde das damit folglich bedeuten, dass der durch die endotheliale Lipase bedingte verminderte PON1 – Gehalt des modifizierten HDL im Zellkulturexperiment dazu führte, dass in der dort verwendeten Endothelzelllinie über den PKC β II – Signalweg die eNOS – Aktivität eingeschränkt wurde und somit in der HPLC – Messung weniger Nitrit in den EL – Proben detektierbar war.

Abschließend lässt sich vermuten, dass sehr wahrscheinlich die beobachteten Effekte, vor allem in der Myografie, zum Teil sehr stark plasmaspezifisch zu sein scheinen. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, bzw. ist es sogar ziemlich sicher anzunehmen, dass im Zuge der Ultrazentrifugation bei der Isolation mit dem HDL – assoziierte Proteine abgetrennt werden. Dennoch würden nur die Ergebnisse aus Myografie und nativen PON – Blot in Kombination gesehen, den Zusammenhang zwischen PON1 und der gefäßerweiternden Wirkung bekräftigen, da bei Plasma 2 am meisten PON1 detektierbar war und in der Myografie das EL – HDL besser relaxierte. Allerdings müsste mit dem obig beschriebenen Hintergrund dennoch das unmodifizierte HDL besser relaxieren. Die Ergebnisse lassen daher keine eindeutige Schlußfolgerung zu und bedürfen einer Wiederholung bzw. eventuellen Beantwortung unter Anwendung eines anderen Messverfahrens.

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Eigenschaften der unterschiedlichen Apolipoproteinklassen. Unverändert übernommen und online verfügbar unter: <a href="http://link.springer.com/search?query=Tab.+24.3&search-within=Book&facet-book-
doi=10.1007%2F978-3-642-17972-3#page-1">http://link.springer.com/search?query=Tab.+24.3&search-within=Book&facet-book- doi=10.1007%2F978-3-642-17972-3#page-1 , zuletzt geprüft am 10.03.2016. [1]	1
Tabelle 2: Adenoviren, die im Zellkulturexperiment eingesetzt wurden und Angabe der Multiplicity of Infection	31
Tabelle 3: Verwendete Antikörper, die in 10%iger Milch verdünnt zum Einsatz kamen.....	38

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktoren, die die Expression von ApoA-I kontrollieren.....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten des Cholesterinabtransportes aus der Zelle am Beispiel eines Makrophagen.....	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines hypothetischen SR-B1 Tetramers.....	15
Abbildung 4: Protektive Effekte von HDL am Endothel	19
Abbildung 5: Auflistung und Einteilung der Substratspezifität der Varianten von PON.....	23
Abbildung 6 Schematische Darstellung eines NOS – Dimers	28
Abbildung 7: Übersicht des Prinzips des Versuchaufbaus am Beispiel der Plasmamodifikationen	32
Abbildung 8: Auswertung der Kitmessungen zur Bestimmung der Zusammensetzung der EL-modifizierten HDL-Partikel im Vergleich zur Kontrolle.....	44
Abbildung 9: Beschaffenheit des HDL nach Plasmamodifikation	44
Abbildung 10: Coomassie und Sudangefärbte Gele nach 5 – stündigem Lauf der Proben auf 4-20% Gradientengele.....	45
Abbildung 11: PON-Blot unter nicht denaturierenden Bedingungen.....	47
Abbildung 12: Repräsentativer Western Blot (SDS – PAGE) für PON1 und ApoA-I von reisolierem HDL aus Plasmamodifikationen	48
Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den PON1 - Western Blots mit den Proben aus den HDL – Modifikationen	48
Abbildung 14: Zusammenfassung der densitometrischen Analyse der durchgeführten PON1- und ApoA-I Western Blots (SDS - PAGE) mit HDL aus drei Plasmamodifikationen (1-3).....	49
Abbildung 15: Ergebnisse der SAXS – Analysen dargestellt als Verteilungen P(R).....	50
Abbildung 16: Modell der räumlichen Anordnung von Proteinanteilen im HDL auf Basis gemessener Daten aus der SAXS – Analyse	51
Abbildung 17: Übersicht über die einzelnen LPC – Klassen von EL – und Kontroll – HDL....	52
Abbildung 18: Mit LC – MS gemessenes Lipidprofil der HDL – Proben aus Plasmamodifikationen von Plasma 1 und 2 (n=6).....	53
Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Myografien unter Einsatz von HDL aus HDL – Modifikationen	54
Abbildung 20: Ergebnisse der Myografie mit HDL aus Plasmamodifikationen	55
Abbildung 21: Ergebnis der eNOS – spezifischen Nitritbestimmung von Medium aus dem Zellkulturexperiment mit HDL aus den Plasmamodifikationen	56
Abbildung 22: Arylesterasemessungen verschiedener Probenmaterialien	57

LITERATURVERZEICHNIS

1. Search Results - Springer. <http://link.springer.com/search?query=Tab.+24.3&search-within=Book&facet-book-doi=10.1007%2F978-3-642-17972-3#page-1>. Accessed 10 Mar 2016.
2. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol* 2015;6. doi:10.3389/fphar.2015.00222.
3. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G, Petrides PE, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. Berlin: Springer; 2014.
4. Barter P. The role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. *European Heart Journal Supplements* 2005;7:F4-F8. doi:10.1093/eurheartj/sui036.
5. Eckardstein A von, Kardassis D, editors. *High density lipoproteins: From biological understanding to clinical exploitation*. Cham: Springer; 2015.
6. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* 2006;116:3090–100. doi:10.1172/JCI30163.
7. Gugliucci A, Menini T. Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clin Chim Acta* 2015;439:5–13. doi:10.1016/j.cca.2014.09.016.
8. Morton RE, Izem L. Modification of CETP function by changing its substrate preference: a new paradigm for CETP drug design. *J Lipid Res* 2015;56:612–9. doi:10.1194/jlr.M056333.
9. Gesundheit Österreich GmbH/Geschäftsbereich ÖBIG. *Gesundheit und Krankheit in Österreich: Gesundheitsbericht Österreich 2009 (GBÖ 2009)*. Wien; November 2009.
10. Lee-Rueckert M, Escola-Gil JC, Kovanen PT. HDL functionality in reverse cholesterol transport - Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim Biophys Acta* 2016. doi:10.1016/j.bbali.2016.03.004.
11. Tatematsu S, Francis SA, Natarajan P, Rader DJ, Saghatelian A, Brown JD, et al. Endothelial lipase is a critical determinant of HDL-stimulated sphingosine 1-phosphate-dependent signaling in vascular endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1788–94. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301300.
12. Vickers KC, Remaley AT. HDL and cholesterol: life after the divorce?1. *J Lipid Res* 2014;55:4–12. doi:10.1194/jlr.R035964.
13. Barter PJ. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circulation Research* 2004;95:764–72. doi:10.1161/01.RES.0000146094.59640.13.
14. Chawhan SS, Mogarekar, Wagh RV, Das RR, Pramanik SS, Sonune SM, Chawhan SM. Relation of Paraoxonase1, Arylesterase and Lipid Profile in Ischemic Stroke Patients. *J Clin Diagn Res* 2015;9:BC01-3. doi:10.7860/JCDR/2015/15345.6707.
15. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: Implications for novel therapies. *J. Clin. Invest.* 2006;116:3090–100. doi:10.1172/JCI30163.
16. Phillips MC. Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux. *J. Biol. Chem.* 2014;289:24020–9. doi:10.1074/jbc.R114.583658.
17. Sviridov DO, Drake SK, Freeman LA, Remaley AT. Amphipathic polyproline peptides stimulate cholesterol efflux by the ABCA1 transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016;471:560–5. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.032.
18. Kent AP, Im Stylianou. Scavenger receptor class B member 1 protein: hepatic regulation and its effects on lipids, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Hepat Med* 2011;3:29–44. doi:10.2147/HMER.S7860.
19. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982–5.

20. Shipman KE, Strange RC, Ramachandran S. Use of fibrates in the metabolic syndrome: A review. *WJD* 2016;7:74. doi:10.4239/wjd.v7.i5.74.
21. Dockendorff C, Faloon PW, Germain A, Yu M, Youngsaye W, Nag PP, et al. Discovery of bisamide-heterocycles as inhibitors of scavenger receptor BI (SR-B1)-mediated lipid uptake. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2015;25:2594–8. doi:10.1016/j.bmcl.2015.03.074.
22. Nguyen D, Nickel M, Mizuguchi C, Saito H, Lund-Katz S, Phillips MC. Interactions of Apolipoprotein A-I with High-Density Lipoprotein Particles. *Biochemistry* 2013;52:1963–72. doi:10.1021/bi400032y.
23. Shao B. Site-specific Oxidation of Apolipoprotein A-I Impairs Cholesterol Export by ABCA1, a Key Cardioprotective Function of HDL. *Biochim Biophys Acta* 2012;1821:490–501. doi:10.1016/j.bbali.2011.11.011.
24. Bielicki JK, Zhang H, Cortez Y, Zheng Y, Narayanaswami V, Patel A, et al. A new HDL mimetic peptide that stimulates cellular cholesterol efflux with high efficiency greatly reduces atherosclerosis in mice. *J. Lipid Res.*;51:1496–503. doi:10.1194/jlr.M003665.
25. Levkau B. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Front Pharmacol* 2015;6. doi:10.3389/fphar.2015.00243.
26. Sulaiman WN, Caslake MJ, Delles C, Karlsson H, Mulder MT, Graham D, Freeman DJ. Does high-density lipoprotein protect vascular function in healthy pregnancy? *Clin Sci (Lond)* 2016;130:491–7. doi:10.1042/CS20150475.
27. Annema W, Tietge UJ. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* 2011;13:257–65. doi:10.1007/s11883-011-0175-2.
28. Ma K, Cilingiroglu M, Otvos JD, Ballantyne CM, Marian AJ, Chan L. Endothelial lipase is a major genetic determinant for high-density lipoprotein concentration, structure, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2748–53. doi:10.1073/pnas.0438039100.
29. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl* 2002;3:49–55.
30. She ZG, Chen HZ, Yan Y, Li H, Liu DP. The Human Paraoxonase Gene Cluster As a Target in the Treatment of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:597–632. doi:10.1089/ars.2010.3774.
31. Ceron JJ, Tecles F, Tvarijonaviciute A. Serum paraoxonase 1 (PON1) measurement: an update. *BMC Vet Res* 2014;10:74. doi:10.1186/1746-6148-10-74.
32. Aldridge WN. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 1953;53:110–7.
33. Di Draganov, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La BN. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005;46:1239–47. doi:10.1194/jlr.M400511-JLR200.
34. She Z, Chen H, Yan Y, Li H, Liu D. The Human Paraoxonase Gene Cluster As a Target in the Treatment of Atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:597–632. doi:10.1089/ars.2010.3774.
35. Gu X, Huang Y, Levison BS, Gerstenecker G, DiDonato AJ, Hazen LB, et al. Identification of Critical Paraoxonase 1 Residues Involved in High Density Lipoprotein Interaction. *J Biol Chem* 2016;291:1890–904. doi:10.1074/jbc.M115.678334.
36. Ahmad S, Carter JJ, Scott JE. A Homogeneous Cell-Based Assay for Measurement of Endogenous PON1 Activity. *Anal Biochem* 2010;400:1–9. doi:10.1016/j.ab.2010.01.023.

37. Gach O, Brogneaux C, Franck T, Sertheyn D, Legrand V, La Pierard, Magne J. Active and total myeloperoxidase in coronary artery disease and relation to clinical instability. *Acta Cardiol* 2015;70:522–7. doi:10.2143/AC.70.5.3110512.
38. Vítěček J, Lojek A, Valacchi G, Kubala L. Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges. *Mediators of Inflammation* 2012;2012:1–22. doi:10.1155/2012/318087.
39. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012;33:829–37, 837a–837d. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
40. Kozina A, Opresnik S, Wong MSK, Hallström S, Graier WF, Malli R, et al. Oleoyl-Lyso-phosphatidylcholine Limits Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Induction of Reactive Oxygen Species. *PLoS One* 2014;9:e113443. doi:10.1371/journal.pone.0113443.
41. Sharma A, Sellers S, Stefanovic N, Leung C, Tan SM, Huet O, et al. Direct Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation Provides Atheroprotection in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis. *Diabetes* 2015;64:3937–50. doi:10.2337/db15-0472.
42. Putnam CD, Hammel M, Hura GL, Tainer JA. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: Defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quart. Rev. Biophys.* 2007;40. doi:10.1017/S0033583507004635.
43. Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, van der Giet M, Maugeais C, Tietge UJ. Scavenger receptor BI-mediated selective uptake is required for the remodeling of high density lipoprotein by endothelial lipase. *J Biol Chem* 2009;284:6093–100. doi:10.1074/jbc.M807683200.
44. Maugeais C, Tietge UJ, Broedl UC, Marchadier D, Cain W, McCoy MG, et al. Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation* 2003;108:2121–6. doi:10.1161/01.CIR.0000092889.24713.DC.
45. Hara T, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Yasuda T, Shinohara M, et al. Targeted deletion of endothelial lipase increases HDL particles with anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo. *J. Lipid Res.*;52:57–67. doi:10.1194/jlr.M008417.
46. Eroglu E, Gottschalk B, Charoensin S, Blass S, Bischof H, Rost R, et al. Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. *Nat Comms* 2016;7:10623. doi:10.1038/ncomms10623.
47. Besler C, Heinrich K, Rohrer L, Doerries C, Riwanto M, Shih DM, et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* 2011;121:2693–708. doi:10.1172/JCI42946.