

Aus der Klinik für Nephrologie, Endokrinologie und Transplantationsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Versuche zur Identifizierung von strukturellen und funktionellen  
Veränderungen in high density lipoprotein

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tao Huang

aus GuangDong, VR China

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
2. Prof. Dr. med. K. Kisters  
3. Prof. Dr. med. B. Sanner

Datum der Promotion: 22.03.2013

# Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis .....	III
1. Zusammenfassung .....	1
1.1 Abstract .....	1
1.2 Einleitung und Zielsetzung .....	3
1.3 Methodik .....	5
1.3.1 Zellkultur .....	5
1.3.2 MCP-1 Expression und Sekretion in VSMCs .....	5
1.3.3 Präparative Trennung von Lipoproteinen aus Serum .....	5
1.3.4 Isolationsqualität und Identifizierung von Lipoproteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot .....	5
1.3.5 Kommerzielle Assays und Kits .....	6
1.3.6 Trennung von Protein- und Lipid-Fractionen des HDLs .....	6
1.3.7 Analytische und präparative <i>reverse phase – high pressure liquid chromatography</i> (RP-HPLC) Analyse .....	6
1.3.8 Proteinidentifikation durch Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation in Verbindung mit der tandem Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF-MS) .....	6
1.4 Ergebnisse .....	8
1.4.1 Pro-inflammatorische Eigenschaft von Up <sub>4</sub> A .....	8
1.4.2 Funktionelle und strukturelle Veränderungen des HDLs bei terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden .....	8
1.4.3 S1P-Induktionseigenschaften der Proteinkomponenten des HDLs .....	9
1.5 Diskussion .....	10
1.6 Literatur .....	14
2. Erklärung über den Anteil an den ausgewählten Publikationen .....	18
3. Ausgewählte Publikationen .....	19
3.1 The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. ....	19
3.2 High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A .....	32
3.3 Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. ....	46
4. Lebenslauf .....	59
5. Publikationsliste .....	61

5.1 Originalarbeit.....	61
5.2 Abstracts.....	61
5.3 Vorträge.....	65
6. Danksagung .....	66
7. Selbstständigkeitserklärung .....	67

## I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
ACN	Acetonitril
Apo	Apolipoprotein
APR	Akut-Phase-Reaktion
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CETP	<i>cholesteryl ester transfer protein</i>
CKD	chronischen Nierenerkrankungen
EC	Endothelzellen
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDCFs	<i>endothelium-derived contracting factors</i>
EDRFs	<i>endothelium-derived relaxing factors</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESRD	terminale Niereninsuffizienz, <i>engl. end stage renal disease</i>
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HDL-C	HDL-Cholesterin
HPLC	high pressure liquid chromatography
IMT	Intima-Media-Gefäßwanddicke, <i>engl. Intima-media thickness</i>
IU	Internationale Einheit, <i>engl. International unit</i>
KBr	Kaliumbromid
l	Liter
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LSF	Lysosulfatide
MALDI-TOF/TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation in Verbindung mit der tandem Flugzeitmassenspektrometrie
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAF-AH	<i>platelet activating factor acetylhydrolase</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PON 1	Paraoxonase 1
RCT	reverser Cholesterintransport
ROS	reaktive Sauerstoffspezies, <i>engl. reactive oxygen species</i>
RP-HPLC	<i>reverse phase – high pressure liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>engl. revolutions per minute</i>
s.	sieht

S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAA	Serum Amyloid A
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPC	Sphingosylphosphorylcholine
sPLA2	<i>secretory phospholipase A2</i>
SR-BI	<i>scavenger receptor B1</i>
TFA	Trifluorsäure
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
Up <sub>4</sub> A	<i>uridine adenosine tetraphosphate</i>
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
vers.	Version
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
VSMCs	glatte Gefäßmuskelzellen, <i>engl. vascular smooth muscle cells</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight in volume</i>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Abstract

Oxidativer Stress, systemische Inflammation und Lipidstoffwechselstörungen bei terminaler Niereninsuffizienz begünstigen die beschleunigte Atheroskleroseentwicklung. Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische Funktionsstörung, in der verschiedene atherogene und atheroprotektive Komponenten involviert sind. Das Zytokin *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), das bei der Monozyten-Infiltration in den subendothelialen Raum eine wesentliche Rolle spielt, stellt einen pro-inflammatorischen Indikator in früher Phase der Atherogenese dar. Die frühe Phase der Atherogenese ist durch eine Endothelfunktionsstörung charakterisiert. Es kommt zu einer Imbalance von gefäßprotektiven und -schädlichen Substanzen. Der vasoaktive Purinrezeptoragonist *uridine adenosine tetraphosphate* (Up<sub>4</sub>A) wirkt bei der kardiovaskulären Inflammation möglicherweise atherogen. In der vorliegenden Arbeit kann Up<sub>4</sub>A die Produktion des pro-inflammatorischen MCP-1 Dosis-abhängig stimulieren. Dies deutet darauf hin, dass eine mögliche Fehlregulation von Up<sub>4</sub>A unter pathologischen Bedingungen die pro-inflammatorische Reaktion in der Blutgefäßwand verstärken kann.

Das *high density lipoprotein* (HDL) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein Lysophospholipid und Bestandteil des HDLs, sind in der Lage, die endotheliale Stickstoffmonoxid-Produktion durch die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase zu stimulieren. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass HDL und eine seiner Proteinunterfraktionen sehr aktiv sind, S1P aus den Erythrozyten herauszuholen. In Bezug auf die Fähigkeiten von S1P, einige anti-atherogene Funktionen des HDLs zu vermitteln, stellt die Eigenschaft vom HDL, S1P aus Erythrozyten hinaus zu steuern, eine mögliche anti-atherogene Funktion des HDLs dar. Darüber hinaus spielt HDL beim reversen Cholesterintransport eine wesentliche Rolle und besitzt anti-inflammatorische, anti-oxidative und anti-thrombotische Eigenschaften. Bei terminaler Niereninsuffizienz ist die inflammatorische Kapazität des HDLs eher mit den Folgeerkrankungen der Patienten assoziiert als mit der HDL-Quantität. Die Dysfunktionalität vom HDL ist möglicherweise auf Veränderungen der Zusammensetzung des HDLs unter pathologischen Bedingungen zurückzuführen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten HDL-Isolationen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz haben einen schlechteren Hemmungseffekt bei der Thrombin-induzierten MCP-1 Produktion als HDL-Proben von gesunden Probanden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HDL von Patienten zum Teil pro-inflammatorisch agiert. Der Funktionsverlust des HDLs lässt sich mindestens zu einem wichtigen Teil auf die Anreicherung des Serum Amyloid A (SAA) im HDL zurückführen. SAA ist ein hoch effektives pro-inflammatorisches Molekül im HDL und der SAA-Spiegel im HDL ist signifikant mit dem Verlust der anti-inflammatorischen Kapazität des HDLs korreliert.

Zusammengefasst liefert die vorliegende Arbeit zusätzliche Hinweise darauf, dass HDL unter terminaler Niereninsuffizienz von einem funktionalen in einen dysfunktionalen Zustand wechselt. Unter systemisch inflammatorischen und oxidativen Bedingungen werden die atheroprotektiv wirkenden Komponenten des HDLs zum Teil durch die aufgenommenen atherogenen Moleküle aus dem Partikel verdrängt. Somit hat HDL verringerte anti-atherogene Funktionen und erhöhte pro-atherogene Kapazitäten. Zusammen mit der Dysfunktionalität des HDLs, können weitere Fehlregulationen von Komponenten, wie das in dieser Arbeit untersuchte Up<sub>4</sub>A, zur exzessiven

kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und jeder anderen pro-inflammatorischen vaskulären Krankheit beitragen.



## 1.2 Einleitung und Zielsetzung

Atherosklerose ist eine inflammatorische Gefäßerkrankung, die durch die Akkumulation von Lipiden in großen Arterien charakterisiert ist<sup>1-4</sup>. Die endotheliale Dysfunktion wurde als ein frühes Merkmal der Atherogenese identifiziert und führt zur unausgeglichene endothelialen Freisetzung von verschiedenen Arten der *endothelium-derived contracting factors* (EDCFs) und *endothelium-derived relaxing factors* (EDRFs)<sup>1</sup>. Zu den wohl bekanntesten EDRFs zählt das Stickstoffmonoxid (NO)<sup>5</sup> und zu EDCFs gehören das Endothelin und das Angiotensin II<sup>1</sup>. Ein Purinrezeptoragonist *uridine adenosine tetraphosphate* (Up<sub>4</sub>A) wurde als ein hoch potenter EDCF identifiziert<sup>6</sup>. Diese Substanz gehört zu den Dinukleosidpolyphosphaten, die als wichtiger Regulator im kardiovaskulären System gelten<sup>7</sup>. Junge Patienten mit Bluthochdruck weisen eine erhöhte Plasmakonzentration von Up<sub>4</sub>A auf, die wiederum signifikant mit der linksventrikulären Masse und der Intima-Media-Gefäßwanddicke (IMT, *intima-media thickness*) korreliert<sup>8</sup>. Weiterhin kann Up<sub>4</sub>A die Proliferation von humanen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs, *vascular smooth muscle cells*) stimulieren<sup>8</sup>. Diese Ergebnisse weisen auf eine potenzielle atherogene Funktion von Up<sub>4</sub>A hin<sup>8</sup>.

Außer den oben genannten endothelial gebildeten vasoaktiven Substanzen spielen weitere Substanzen oder Molekülgruppen wie zum Beispiel das *high density lipoprotein* (HDL) bei der Regulation des Vasotonus eine wichtige Rolle. HDL stimuliert die endotheliale NO-Produktion durch die Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und wirkt somit vasodilatativ und Endothel-schützend<sup>9, 10</sup>. Durch zahlreiche klinische Studien wurde die negative Korrelation zwischen dem Spiegel vom HDL-Cholesterin (HDL-C) und dem atherosklerotischen Risiko bereits gut gezeigt<sup>11, 12</sup>. Die atheroprotektiven Mechanismen des HDLs und seine Funktionalitätsveränderungen unter Krankheitsbedingungen bilden seit den vergangenen Jahren einen wissenschaftlichen Fokus. Die anti-atherosklerotische Wirkung des HDLs wurde unter anderem auf dessen Funktion im reversen Cholesterintransport (RCT) zurückgeführt. Hierbei fördern die HDL-Partikel den Cholesterinefflux aus peripheren Zellen und das Cholesterin wird vom HDL anschließend zur Leber zurücktransportiert. Weiterhin hat man pleiotrope anti-atherogene Eigenschaften des HDLs entdeckt. Dazu gehören die anti-oxidativen, anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und anti-thrombotischen Effekte<sup>13</sup>. Diese Eigenschaften sind auf eine Reihe funktioneller Moleküle, die mit dem HDL assoziiert sind, zurückzuführen. Sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* können HDL und drei seiner Lysophospholipid-Bestandteile – Sphingosylphosphorylcholine (SPC), Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Lysosulfatide (LSF) - über die Akt-Kinase-abhängige eNOS-Aktivierung ihre vasodilatative Wirkung vermitteln<sup>14</sup>. Die Arbeitsgruppe von Professor van der Giet konnte zeigen, dass HDL und S1P in der Lage sind, die Produktion des pro-inflammatorischen Moleküls, *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), Dosis-abhängig in VSMCs zu hemmen<sup>15</sup>. MCP-1 ist eines von vielen Zytokinen, das von vaskulären Zellen wie Endothelzellen (EC), VSMCs und Monozyten in der Initiation und Progression der atherosklerotischen Plaques freigesetzt wird<sup>16</sup>. Es spielt bei der Monozyten-Infiltration in den subendothelialen Raum eine entscheidende Rolle<sup>16-18</sup>. MCP-1 lockt und kumuliert weitere Monozyten aus dem Blut in die entzündete Region, fördert ihre Differenzierung zu Makrophagen und verstärkt dadurch die Entzündungsreaktion.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die anti-inflammatorische Kapazität vom HDL bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten vermindert ist und HDL somit dysfunktional wird<sup>19, 20</sup>. Chemische Modifikationen und strukturelle Veränderungen von Protein- und Lipid-Komponenten im Molekül können das ursprünglich anti-inflammatorische HDL zu einem pro-inflammatorischen Molekül modulieren<sup>13</sup>. Während einer Akut-Phase-Reaktion (APR) erhöht sich die Konzentration von Serum Amyloid A (SAA) und *secretory phospholipase A2* (sPLA2) im HDL. Dagegen wird eine Abnahme der

Konzentration von HDL-Komponenten wie etwa Apolipoprotein (Apo) A-I, Paraoxonase 1 (PON 1), und *cholesterol ester transfer protein* (CETP) beobachtet. Der Anteil an Phospholipiden und Cholesterinestern nimmt zu, wobei der Gehalt an Triglyceriden, freien Fettsäuren und Cholesterin im HDL abnimmt. Wie sich die Komponente- bzw. Struktur-Veränderungen im HDL-Molekül und seine Funktionalitätsänderungen gegenseitig auswirken, bestehen weiterhin große Wissenslücken und daher stellt dies eine interessante Fragestellung dar.

Der Verlauf der Atherosklerose ist durch ein dynamisches Zusammenspiel verschiedener lokaler und systemischer Komponenten zu bestimmen. Um den biomolekularen Hintergrund der Atherogenese besser zu verstehen, stellen die Komponenten  $Up_4A$  und HDL die Hauptuntersuchungsobjekte in der vorliegenden Arbeit dar.

Im Einzelnen werden folgende Ziele verfolgt:

1. Ziel des ersten Teils der Arbeit ist zu untersuchen, welchen Einfluss  $Up_4A$  auf die pro-inflammatorische Reaktion in der vaskulären Wand hat. Dafür ist die Induktionskapazität von  $Up_4A$  auf die Produktion des pro-inflammatorischen Signals MCP-1 *in vitro* zu charakterisieren. Zu diesem Zweck erfolgt ein auf VSMCs basierendes Funktionalitätsassay.
2. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Kompositionen und die Funktionen des komplex aufgebauten Makromoleküls HDL unter systemischem Inflammationszustand im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht werden. Hier werden Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (ESRD, *end stage renal disease*) gewählt, da sich in diesem Patientenkollektiv Veränderungen, bedingt durch die Dialyse, anhäufen und verstärkt auftreten. Eine exzessive kardiovaskuläre Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist seit langem bekannt<sup>21</sup>. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind weitgehend ungeklärt. Es liegt daher nahe, den Zusammenhang von Lipidstoffwechselstörungen und dem erhöhten Atheroskleroserisiko bei Patienten mit ESRD zu untersuchen. Es stellt sich die Frage, wie die krankheitsbedingten funktionellen und strukturellen Veränderungen des HDLs mit der akzellerierten Atherosklerose bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Verbindung stehen.
3. In Bezug auf seine Fähigkeiten, sowohl atheroprotektive Eigenschaften vom HDL zu imitieren als auch einige anti-atherogene Funktionen des HDLs zu vermitteln, hat S1P in letzten Jahren viel Aufmerksamkeit gewonnen. HDL ist ein Hauptträger und ein endogener Empfänger von S1P. Daher lässt sich vermuten, dass die Fähigkeit des HDLs, die S1P-Verteilung zwischen ihm und anderen Hauptträgern im Blut wie etwa Erythrozyten zu modulieren, zu den anti-atherogenen Eigenschaften vom HDL zählt. Im dritten Teil der Arbeit werden die S1P-induzierenden Kapazitäten vom HDL und seiner Komponenten untersucht.

## 1.3 Methodik

### 1.3.1 Zellkultur

VSMCs wurden mit Hilfe der Explanttechnik nach Ross<sup>22</sup> aus Aorten von Wistar-Ratten gewonnen. Die VSMCs wurden in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Die Experimente wurden an Zellen der Passage 3 bis 7 durchgeführt. Vor den Stimulationsexperimenten wurden die konfluenten Zellen für 24 h in Abwesenheit von FCS kultiviert.

### 1.3.2 MCP-1 Expression und Sekretion in VSMCs

Um die anti-inflammatorischen Kapazität der Testsubstanzen zu ermitteln, wurden die VSMCs mit den unterschiedlichen Testsubstanzen, wie zum Beispiel HDL oder SAA, in Anwesenheit von Thrombin (2 IU/ml für MCP-1 Expression und 8 IU/ml für Sekretion) stimuliert. Die pro-inflammatorischen Kapazität der Testsubstanzen erfolgte ohne Co-Inkubation von Thrombin in VSMCs. Die Bestimmung der MCP-1 Sekretion in VSMCs erfolgte nach 24 h Stimulation aus dem Überstand mittels Luminex<sup>TM</sup>-Technologie (Millipore, Deutschland), normiert auf den Gesamtzellproteingehalt. Die Stimulationszeit für die MCP-1 Expressionsversuche betrug 4 h und anschließend erfolgte die RNA-Isolation säulenbasiert mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit von Qiagen (USA). 1 µg RNA wurde mit Hilfe vom iScript<sup>TM</sup> cDNA Sythesis Kit (Biorad, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Die MCP-1 Expression wurde dann mittels Real-time PCR sondenbasiert im CFX96/384 System (Biorad, Deutschland) bestimmt. Die verwendeten Primer und Sonden wurden von TibMolBiol (Deutschland) synthetisiert. Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode mit  $\beta$ -Aktin als Referenzgen.

### 1.3.3 Präparative Trennung von Lipoproteinen aus Serum

Die präparative Isolation von Lipoproteinen erfolgte durch die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation (UZ) mit Modifikation<sup>23</sup>. Der Dichtegradient besteht aus 2,7 ml Wasser, 4 ml 1,1 g/ml Kaliumbromid (KBr)-Natriumchlorid (NaCl)-Lösung ( $11,42 \times 10^{-3}$  g NaCl und  $133,48 \times 10^{-3}$  g KBr/ml), 2 ml 1,225 g/ml KBr-NaCl-Lösung ( $11,42 \times 10^{-3}$  g NaCl und  $315,54 \times 10^{-3}$  g KBr/ml) und 3 ml mit KBr gesättigter Serumprobe. Für die UZ wurde das Modell 17-65 (Beckmann, Deutschland) mit dem Rotor SW40 Ti (Beckmann, Deutschland) bei 4°C unter Vakuum (40.000 rpm, 18 h) verwendet. Nach der UZ waren *very low density lipoprotein* (VLDL), *low density lipoprotein* (LDL) und HDL als gelbe Banden und eine Albuminschicht am Boden des Zentrifugationsröhrchens zu beobachten. Für die Zellversuche wurde das HDL gegen phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) dialysiert und steril filtriert (0,22 µm Porengröße).

### 1.3.4 Isolationsqualität und Identifizierung von Lipoproteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die präparativ isolierten HDL- und LDL-Proben wurden mit zweifachem Lämmli Puffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben auf ein 12%iges Gel (Pierce, USA) aufgetragen, 1 h elektrophoretisch bei 120 V getrennt und nachfolgend mittels Coomassie-Färbung identifiziert. Der Nachweis von Apo A-I erfolgte antikörperbasiert mit Hilfe der Western Blot-Technik.

### 1.3.5 Kommerzielle Assays und Kits

Die Gehaltsbestimmungen von Protein, Gesamtcholesterin, Triglyceriden, Phospholipiden, SAA und Apolipoproteinen (Apo A-I, A-II, C-II, C-III, B) im HDL bzw. Serum erfolgten unter Nutzung der in Tabelle 1 angegebenen Assays.

**Tabelle 1** Verwendete Assay-Systeme für die Bestimmung von HDL- und Serum-Parametern

Protein	BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, USA
Gesamtcholesterin	CHOL-H L-Type Kit	Wako Chemicals GmbH, Deutschland
Triglyceride	Triglyceride L-Type Assay	Wako Chemicals GmbH, Deutschland
Phospholipide	Phospholipids B Assay	Wako Chemicals GmbH, Deutschland
Apolipoproteine (Apo A-I, A-II, C-II, C-III, B)	Human Apolipoprotein Multiplex Immunoassay (Luminex™-Technologie)	Millipore, Deutschland
SAA	Human SAA ELISA Kit	IBL International, Deutschland

### 1.3.6 Trennung von Protein- und Lipid-Fraktionen des HDLs

Für die Trennung der Protein- und Lipid-Bestandteile im HDL wurde die Hexan-Isopropanol-Methode<sup>24</sup> verwendet. Die dialysierte HDL-Probe (ca. 1 mg/ml) wurde mit dem fünffachen Volumen Hexan-Isopropanol-Lösung (3:2 v/v) und anschließend mit dem vierfachen Volumen Hexan vermischt und darauf die wässrige Protein-haltige Schicht und die organische Lipidschicht getrennt. Beide Fraktionen wurden dann in einer Speedvac (Thermo Scientific, USA) getrocknet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### 1.3.7 Analytische und präparative *reverse phase – high pressure liquid chromatography* (RP-HPLC) Analyse

Die RP-HPLC-Analysen erfolgten mit einem Hitachi Elite LaChrom System (VWR International, Deutschland). Die getrocknete HDL-Proteinprobe wurde in 3 Mol/l Guanidinium-Hydrochlorid gelöst. Die RP-HPLC-Analyse wurde bei einer Flussrate von 1,2 ml/min bei 37°C durchgeführt. Für die analytische Trennung wurden 60 µg Protein mittels 4,6 x 250 mm 5 µm C18-Säule und folgendem Gradienten getrennt: Acetonitril (ACN) in Wasser (+ 0,1% Trifluorsäure (TFA)) von 30% bis 60% bei 1% pro min. Für die präparative Trennung wurden 400 µg Protein auf eine 10 x 250 mm 5 µm C18 semipräparative HPLC-Säule gegeben und mit folgendem Gradienten getrennt: ACN in Wasser (+ 0,1% TFA) von 30% bis 60% bei 0,5% pro min. Die Auswertung des Chromatogramms bei 214 nm erfolgte mittels EZChrom Elite Software (Version 3.3.2, VWR International, Deutschland). Die präparativ getrennten Protein-Unterfraktionen wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers gesammelt und anschließend getrocknet oder eingeeengt je nach Folgeversuchen.

### 1.3.8 Proteinidentifikation durch Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation in Verbindung mit der tandem Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF-MS)

Um das unbekannte Protein in der HPLC-Unterfraktion des HDL-Proteins zu identifizieren, wurde MALDI-TOF/TOF-MS durchgeführt<sup>8</sup>. Die tryptisch verdaute Probe (0,5% w/v bei 37°C für 24 h) wird mittels MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Ultraflex III, Bruker-Daltonic, Deutschland) analysiert. Darauf folgte eine SwissProt-Datenbankabfrage des gemessenen *peptide mass fingerprint* (PMF)-Spektrum mit Hilfe der Bruker-Daltonic Bio-tools (vers. 3.1). Das Mascot (vers. 2.2) wurde für den

Vergleich von experimentellen MALDI-MS-Datensätzen mit berechneter Peptidmasse für jeden Eintrag in die Sequenz-Datenbank ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) verwendet.

## 1.4 Ergebnisse

### 1.4.1 Pro-inflammatorische Eigenschaft von Up<sub>4</sub>A

Um die pro-inflammatorischen Eigenschaft des vasokonstriktiven Faktors Up<sub>4</sub>A zu untersuchen, wurde ein auf VSMCs basierendes Funktionalitätsassay verwendet. Thrombin ist ein bekannter Stimulus für die MCP-1 Produktion in VSMCs<sup>15</sup> und wurde daher als Positivkontrolle jeweils in den MCP-1 Expressions- (2 IU/ml) und Sekretions-Experimenten (8 IU/ml) eingesetzt. Zwei Stimulationszeitpunkte wurden für die Expression und Sekretion ausgewählt. Nach 4 h Inkubation der Zellen mit Up<sub>4</sub>A ist die intensive MCP-1 Expression nachzuweisen, während die von Up<sub>4</sub>A stimulierte MCP-1 Proteinsekretion erst nach 24 h Inkubationszeit das Maximum erreicht (siehe ausgewählte Publikation 1, Abb. 1C und 1D). Weiterhin ist Up<sub>4</sub>A in der Lage, die Expression und Sekretion von MCP-1 Dosis-abhängig und signifikant zu stimulieren (s. ausgewählte Publikation 1, Abb. 1A und 1B). Die zugrunde liegenden Signaltransduktionswege wurden in der Folgearbeit der ausgewählten Publikation weiter untersucht<sup>25</sup>.

### 1.4.2 Funktionelle und strukturelle Veränderungen des HDLs bei terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden

HDL-Proben wurden mittels Dichtegradienten-UZ aus Serumproben von gesunden Probanden und Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz isoliert. Die Isolationsqualität wurde mittels SDS-PAGE-Analyse und anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Die Hauptproteinkomponente Apo A-I konnte im HDL mit Hilfe der Western Blot-Technik identifiziert werden. Der Protein-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalt wurde photometrisch bestimmt. Die HDL-Proben sowohl von gesunden Probanden als auch von ESRD-Patienten hemmen die Thrombin-induzierte Expression und Sekretion von MCP-1 Dosis-abhängig. Bei ESRD-Patienten ist eine Verschiebung der mittleren effektiven Konzentration (EC<sub>50</sub>) vom HDL zu sehen, was auf einen Verlust der anti-inflammatorischen Funktion des HDLs von ESRD-Patienten hinweist (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 1A und 1B). Um die pro-inflammatorische Kapazität des HDLs von ESRD-Patienten zu untersuchen, wurden VSMCs mit HDL stimuliert und die Expression und Sekretion von MCP-1 anschließend bestimmt. Der Funktionalitätstest zeigte, dass die HDL-Proben von ESRD-Patienten die MCP-1 Bildung in VSMCs signifikant stärker stimulierten als die von gesunden Probanden (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 2A und 2B). Um zu klären, welche Komponenten im HDL für die inflammatorische Eigenschaft verantwortlich sind, wurde die HDL-Probe mittels Delipidierungsverfahren in ihre Protein- und Lipidfraktion zerlegt. Die pro-inflammatorischen Wirkungen der Protein- und Lipid-Fraktionen vom HDL wurden ebenfalls mit dem Zell-basierten Funktionalitätsassay überprüft. Während die Lipidfraktion des HDLs von ESRD-Patienten keine signifikante MCP-1 Stimulationswirkung zeigte, hatte die HDL-Proteinfraktion von Patienten einen starken induzierenden Effekt von MCP-1 (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 2C und 2D). Für die Identifizierung der ausschlaggebenden Komponente wurde die HDL-Proteinfraktion von ESRD-Patienten chromatographisch mittels HPLC in weitere sechs Unterfraktionen zerlegt. In Abbildung 2E (s. ausgewählte Publikation 2) ist exemplarisch eines der Chromatogramme der HDL-Proteinfraktion abgebildet. Die zweite Protein-Unterfraktion zeigte die stärkste MCP-1 Induktionsaktivität unter allen Unterfraktionen (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 2F).

Um die Proteinkomponente in der Unterfraktion 2, die möglicherweise für die pro-inflammatorische Kapazität des HDL-Proteins verantwortlich ist, zu identifizieren, wurde eine MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse durchgeführt. Abbildung 3B (s. ausgewählte Publikation 2) stellt exemplarisch ein

Massenspektrum der durch tryptischen Verdau entstandenen Peptide der Protein-Unterfraktion 2 dar. Durch den Vergleich des PMFs in der Massenspektrum-Datenbank ergab sich, dass die Unterfraktion 2 hauptsächlich aus SAA bestand (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 3C). Dieses deutet darauf hin, dass SAA für die pro-inflammatorische Funktion des HDLs von ESRD-Patienten verantwortlich ist.

Die mögliche Wirkung von SAA auf die MCP-1 Produktion wurde weiter überprüft. Rekombinantes SAA konnte die Expression und Sekretion von MCP-1 Dosis-abhängig stimulieren (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 4A und 4B). Bei weiteren Untersuchungen lässt sich eine MCP-1 Induktionswirkung durch eine mögliche Probenkontamination des rekombinanten SAA mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) ausschließen (s. ausgewählte Publikation 2, Anhang Abb. 1A und 1B). Daraufhin stellte sich die Frage, ob SAA das Funktionsdefizit des HDLs von Patienten mit ESRD direkt verursachen kann. Dazu wurde Serum von gesunden Probanden mit rekombinantem SAA versetzt, daraus HDL isoliert und funktionell getestet. Die SAA-Konzentration in der mit SAA künstlich versetzten HDL-Probe war signifikant höher als die im nicht mit SAA versetzten HDL (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 5A). Vergleicht man die anti-inflammatorische Kapazität des HDLs von gesunden Kontrollprobanden mit dem SAA-angereicherten HDL, war das nicht mit SAA beladene HDL in der Lage, die Thrombin-induzierte MCP-1 Expression zu hemmen, während in Anwesenheit von SAA ein deutlicher Inhibierungsfunktionsverlust auftrat (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 5B). Vergleicht man die Hemmwirkung vom HDL, welches mit SAA versetzt wurde, mit der in Abbildung 1A (s. ausgewählte Publikation 2) gezeigten Hemmwirkung des HDLs von Patienten mit ESRD, so zeigt sich ein relativ übereinstimmender Kurvenverlauf. Um die Korrelation zwischen der anti-inflammatorischen Kapazität des HDLs und dem SAA-Spiegel im HDL zu untersuchen, wurden HDL-Proben von gesunden Probanden und ESRD-Patienten isoliert und die SAA-Gehalte sowohl im Serum als auch im HDL bestimmt. Die Serum- und HDL-Proben der Patienten wiesen einen signifikant höheren SAA-Spiegel auf, als die von gesunden Probanden (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 6A und 6B). Stellt man den hemmenden Effekt des HDLs auf die Thrombin-induzierte MCP-1 Expression in Korrelation mit dem SAA-Spiegel im HDL, ist ein signifikanter Zusammenhang zu beobachten (s. ausgewählte Publikation 2, Abb. 6C).

#### **1.4.3 S1P-Induktionseigenschaften der Proteinkomponenten des HDLs**

In Erythrozyten ist S1P in einer phosphorylierten Form gelagert. Bode und seine Mitarbeiter<sup>26</sup> haben gezeigt, dass besonders HDL in den verschiedenen Lipoprotein-Gruppen höchst aktiv ist, die S1P-Sezernierung aus Erythrozyten zu induzieren. Diese Aktivität des HDLs ist jedoch geringer, als die von Serumalbumin<sup>26</sup>. Die HDL-Proteine der gesunden Probanden wurden mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden gewonnen. Diese wurden durch das chromatographische Verfahren in vier große Fraktionen getrennt (s. ausgewählte Publikation 3, Abb. 1H). Die wesentliche Aktivität, S1P aus den Erythrozyten auszulagern, führte auf Fraktion 2 zurück (s. ausgewählte Publikation 3, Abb. 1F). Daraufhin wurde Fraktion 2 in zwei weitere Unterfraktionen zerlegt. Weitere Tests ergaben, dass Subfraktion 2.2 für die S1P-Sezernierung verantwortlich war (s. ausgewählte Publikation 3, Abb. 1G). Chromatographische Untersuchungen lassen vermuten, dass es sich bei Subfraktion 2.2 um Apo C-I und C-II handelt. Reine Apo C-I und C-II Proben konnten allerdings die von Subfraktion 2.2 induzierte S1P-Sezernierung aus Erythrozyten nicht auslösen. Daher ist zu vermuten, dass diese Subfraktion weitere Komponenten enthält, die für die S1P-Induktionsaktivität des HDL-Proteins verantwortlich sind.

## 1.5 Diskussion

Die terminale Niereninsuffizienz ist eine vorangeschrittene Form der chronischen Nierenerkrankungen (CKD). Charakteristische Merkmale sind oxidativer Stress, Inflammation und Lipidstoffwechselstörungen, welche das beschleunigte Atheroskleroserisiko begünstigen<sup>27</sup>. Obwohl es in der Literatur verschiedene experimentelle Hinweise gibt, besteht immer noch enormer Erklärungsbedarf. Die Wirkungen der verschiedenen athero-relevanten Faktoren auf die Atherogenese bieten hierfür gute Forschungsansätze. Atherosklerose ist eine chronisch inflammatorische Funktionsstörung in den Arterien<sup>1, 4</sup>. Wenn die ursprünglich schützenden Inflammationsreaktionen nicht in der Lage sind, den endogenen und exogenen Risikofaktoren entgegen zu wirken, verändern sich diese Aktionen zu schädlichen Reaktionen<sup>2</sup>. In der atherogenen Initiationsphase stellt die Produktion von MCP-1 eine wichtige Indikation für die Inflammationsreaktion dar<sup>18</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der potenten vasokonstriktiven Substanz Up<sub>4</sub>A auf die MCP-1 Produktion in VSMCs untersucht. Die Dosis-abhängig stimulierende Wirkung von Up<sub>4</sub>A deutet darauf hin, dass eine mögliche Überproduktion von Up<sub>4</sub>A die pro-inflammatorischen Reaktionen in der Blutgefäßwand verstärken kann. Mögliche regulatorische Funktionen von Up<sub>4</sub>A in der renalen Hämodynamik und Blutdruckregulation wurden in einigen Pionierstudien untersucht<sup>28</sup>. Weiterhin ist Up<sub>4</sub>A ein starker Induktor für die Proliferation von VSMCs<sup>8, 29</sup> und kann die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in aktivierten Monozyten stimulieren<sup>8, 29, 30</sup>. Beides deutet darauf hin, dass Up<sub>4</sub>A einen Einfluss auf vaskuläre inflammatorische Krankheiten, wie zum Beispiel CKD, ausübt. Die Up<sub>4</sub>A-Konzentration im Plasma wurde bei jungen Patienten mit Bluthochdruck festgestellt. Es ist daher vorstellbar, dass eine Fehlregulation der Up<sub>4</sub>A-Produktion unter pathophysiologischen Bedingungen der terminalen Niereninsuffizienz vorhanden ist, und somit als eine mögliche Erklärung für das erhöhte Atheroskleroserisiko in dieser Patientengruppe dient.

Hypertriglyceridämie und ein abgesenktes HDL-Niveau im Plasma sind zwei wichtige Lipidstoffwechselstörungen bei CKD-Patienten<sup>31</sup>. Die inverse Relation zwischen der HDL-Quantität und der atherogenen Progression deutet auf die atheroprotektiven Wirkungen des HDLs hin<sup>32</sup>. Diese Relation geht bei ESRD-Patienten verloren, obwohl eine Abnahme des HDL-Gehalts in den Patienten nachgewiesen wurde<sup>33</sup>. Stattdessen ist die inflammatorische Kapazität des HDLs mit den Folgeerkrankungen der ESRD-Patienten assoziiert<sup>34</sup>. Einige Medikamentenbehandlungen, die das HDL-C bei Patienten mit koronaren Herzkrankheiten erhöhen, haben keine signifikante Wirkung bei der Reduzierung der koronaren Herzkrankheitsereignisse<sup>35</sup>. Es scheint, dass die Qualität vom HDL eine wesentlich größere Bedeutung als die HDL-Quantität hat<sup>36</sup>.

Mit den RCT-, anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und anti-thrombotischen Funktionen schützt HDL die Blutgefäßwand vor Atherosklerose<sup>13</sup>. Die atheroprotektiven Eigenschaften des HDLs sind auf die funktionellen Lipid- und Protein-Komponenten zurückzuführen, zu denen Apo A-I, PON 1, Glutathion-Peroxidase, Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), *platelet activating factor acetylhydrolase* (PAF-AH) und S1P zählen<sup>14, 37</sup>. Apo A-I ist das am häufigsten vorkommende Protein im HDL und ist durch seine Wechselwirkung mit dem *ATP-binding cassette transporter* (ABC) A1 für den Cholesterinefflux aus peripheren Zellen verantwortlich und somit für die RCT-Funktion vom HDL essenziell<sup>38</sup>. PON 1 und Glutathion-Peroxidase spielen bei der anti-oxidativen Funktion des HDLs eine wichtige Rolle<sup>37</sup>. Gemäß den früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Professor van der Giet hemmen HDL und S1P die Produktion von MCP-1, indem HDL über die Wechselwirkung zwischen S1P und Sphingolipidrezeptor Typ 3 die Aktivierung der NADPH-Oxidase blockiert<sup>15</sup>. In der vorliegenden



Arbeit konnte gezeigt werden, dass HDL und eine seiner Proteinunterfraktionen die Freisetzung des S1P aus Erythrozyten sehr aktiv induzieren. Mit Bezug auf die Beobachtung, dass ein erhöhter S1P-Spiegel im HDL auf eine Verbesserung der anti-atherogenen Funktion vom HDL hinweist<sup>15</sup>, stellt die Eigenschaft des HDLs, die Freisetzung des S1P aus Erythrozyten zu induzieren, eine mögliche anti-atherogene Funktion des HDLs dar. Weiterhin enthält HDL pro-atherogen wirkende Moleküle, zu denen SAA, sPLA2 und Apo C-III zählen. Apo C-III kann die Lipoproteinlipase und hepatische Lipase inhibieren und somit die hepatische Aufnahme von Triglycerid-reichen Partikeln verhindern<sup>39</sup>. Die durch sPLA2 freigesetzten oxidierten Phospholipide sind pro-inflammatorisch aktiv und spielen eine potente Rolle in der Atherogenese<sup>40</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen sind die atheroprotektiven Wirkungen der anti-atherogenen Komponenten im HDL gegenüber den Pro-atherogenen überlegen. Somit wirkt das HDL-Molekül insgesamt atheroprotektiv. Der systemische oxidative und inflammatorische Stress in chronisch niereninsuffizienten Patienten kann das Gleichgewicht zwischen atheroprotektiven und atherogenen Funktionen des HDLs beeinflussen. HDL kann so nicht nur einen Teil seiner athero-schützenden Kapazitäten verlieren, sondern sogar einen pro-oxidativen und pro-inflammatorischen Phänotyp annehmen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HDL von Patienten mit ESRD die MCP-1 Produktion in VSMCs schlechter hemmt als HDL von gesunden Probanden. Dies deutet darauf hin, dass das HDL von Patienten einen Teil seiner anti-inflammatorischen Kapazität verliert. Darüber hinaus stimuliert es die MCP-1 Produktion und zeigt somit seine pro-inflammatorische Wirkung. Der atheroprotektive Funktionsverlust und die Funktionsveränderungen werden meist auf Konformations- und Komponenten-Veränderungen im HDL zurückgeführt.

Zahlreiche klinische Studien zeigen, dass HDL von ESRD-Patienten eine Abnahme der Konzentrationen von HDL-C, Apo A-I, Glutathion-Peroxidase und LCAT, sowie eine sinkende PON 1 Aktivität aufweist<sup>41-43</sup>. Das bei CKD vorherrschende Urämiemilieu führt zur Produktionszunahme von stickstoffhaltigen Abfallprodukten und pro-inflammatorischen Zytokinen und somit zu einer sinkenden Apo A-I Produktion<sup>27, 44</sup>. Die Abnahme des Apo A-I Gehalts bei Patienten beeinträchtigt signifikant die RCT-Funktion des HDLs<sup>42</sup>. Allerdings liegen kontroverse Ergebnisse über die Veränderung des Apo A-I Gehalts im HDL von Patienten vor. Es wurde gezeigt, dass der Apo A-I Spiegel im HDL von ESRD-Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden nicht signifikant vermindert wurde<sup>43</sup>. Die Konzentrationsabnahme des im HDL vorkommenden LCAT bei Patienten führt zu einer Reduktion der Cholesterinester-Bildung im HDL und beeinträchtigt somit die Cholesterinaufnahme-Kapazität des HDLs<sup>44</sup>. Die sinkende Aktivität von PON 1 und Glutathion-Peroxidase führt zu einer sinkenden anti-oxidativen Funktion des HDLs auf die Peroxidation von Lipiden und anderen Lipoproteinen<sup>41</sup>. Morena und seine Mitarbeiter haben bei ESRD-Patienten festgestellt, dass HDL die Oxidation vom LDL schlecht hemmt<sup>45</sup>. Während es noch keine direkten klinischen Daten über die Veränderung des S1P-Gehalts im HDL bei ESRD-Patienten gibt, sind klinische Untersuchungen zur Konzentration von S1P im HDL und Plasma bei Patienten mit koronaren Arterienerkrankungen durchgeführt worden<sup>46</sup>. Im Gegensatz zur Abnahme vom S1P-Gehalt im HDL ist der S1P-Spiegel im Plasma von Patienten höher als das S1P-Niveau im Plasma der Kontrollgruppe<sup>46</sup>. Dies weist darauf hin, dass die S1P-Aufnahmekapazität des HDLs bei koronaren Arterienerkrankungen minimiert wird. Ein sinkendes S1P-Niveau im HDL verringert die anti-inflammatorischen Funktionen des HDLs. Gegenüber der Abnahme der zahlreichen atheroprotektiven Komponenten im HDL-Molekül ist die Anreicherung der atherogenen funktionellen Bestandteile im HDL (z.B. SAA, Apo C-III und sPLA2) unter systemischer Inflammation und oxidativem Stress festgestellt worden<sup>42</sup>. Im Einklang mit dem Ergebnis von Zimmermann und seinen Mitarbeitern<sup>47</sup>, sind die SAA-Spiegel in Serum und HDL der in der vorliegenden Arbeit

untersuchten ESRD-Patienten signifikant höher als die von gesunden Probanden. Die HDL-Proteinunterfraktion, die den höchsten SAA-Gehalt aufweist, zeigt die stärkste MCP-1 Induktionsaktivität unter allen Proteinunterfraktionen des HDLs von Patienten.

SAA ist ein amphipathisches,  $\alpha$ -helikales Protein und wird hauptsächlich in der Leber produziert. Dieses besitzt Apolipoprotein-Eigenschaften und ist im Wesentlichen in Assoziation mit HDL im Blutkreislauf zu finden<sup>48-50</sup>. In den vier human vorkommenden SAA-Proteinsubtypen sind SAA1 und SAA2 APR Proteine, SAA3 ist ein Pseudo-Gen<sup>49, 51</sup>. Unter physiologischen Bedingungen ist SAA4 die Hauptform des SAA im HDL<sup>49</sup>. Während einer akuten Inflammationsreaktion kann sich das SAA-Niveau (SAA1 und SAA2) im Blut rapide 1000-fach erhöhen<sup>52</sup>. Bei Patienten mit Niereninsuffizienz kann die SAA-Konzentration aufgrund der krankheitsbedingten mikro-Inflammation ebenfalls signifikant steigen<sup>47</sup>. Nachweise eines Zusammenhangs zwischen einem erhöhten SAA-Spiegel und dem Anstieg der kardiovaskulären Risiken sind vorhanden<sup>53, 54</sup>. Weiterhin deutet das erhöhte SAA-Niveau auf ein höheres Mortalitätsrisiko bei Patienten mit peripheren Arterienkrankheiten hin<sup>55</sup>. SAA allein kann als pro-inflammatorischer atherogener Mediator wirken<sup>56-60</sup>. SAA-angereichertes HDL verliert einen Teil seiner anti-oxidativen Kapazität gegen LDL-Oxidation<sup>59</sup>. SAA ist in der Lage, die MCP-1 Produktion in humanen Monozyten zu hemmen<sup>57</sup>. Dieses führt zur Migration und Gewebe-Infiltration der Monozyten in den atherosklerotischen Plaques<sup>60</sup>. Das SAA-angereicherte HDL kann Biglykane binden und die atheroprotektive Funktion des HDLs dadurch beeinträchtigen<sup>61</sup>. Frühere Studien deuteten darauf hin, dass nur das lipidfreie SAA eine biologische Funktion hat und die Verbindung mit HDL seine Aktivität beeinflusst<sup>50, 62-64</sup>. Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass die SAA-Akkumulierung im HDL unter Krankheitsbedingungen wie ESRD die schützende Wirkung des HDLs gegen die MCP-1 Produktion stark beeinträchtigt. Im Vergleich zu der bis zu 1000-fach erhöhten SAA-Konzentration in einer APR ist der SAA-Spiegel bei ESRD-Patienten relativ moderat. Dennoch scheint SAA allein viel effektiver bei der MCP-1 Induktion zu wirken, als die gleiche Menge von SAA im HDL. Dies spricht dafür, dass die biologischen Aktivitäten von SAA unter dem Einfluss der Lipid-Bindung stehen<sup>64</sup>. Die pro-inflammatorische Kapazität von SAA wird möglicherweise durch die Bindung mit HDL vermindert, die anti-inflammatorischen Eigenschaften des HDLs hingegen gehen durch die SAA-Ansammlung im Partikel teilweise verloren. Es gibt Hinweise, dass SAA das Apo A-I aus HDL-Molekül verdrängt<sup>13</sup>. In einer APR weist das SAA-angereicherte HDL<sub>3</sub>-Partikel (HDL<sub>3</sub>: Subpopulation des HDLs, Dichte zwischen 1,125 und 1,210 g/ml) auf eine Abnahme des Apo A-I Gehalts hin<sup>65</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde der Apo A-I Gehalt im HDL bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied des Apo A-I Spiegels im HDL zwischen gesunden Probanden und ESRD-Patienten festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese, sich auf den ersten Blick widersprechenden Ergebnisse, liegt darin, dass in dieser Arbeit der Apo A-I Gehalt der gesamten HDL-Gruppe, die sowohl HDL<sub>2</sub>- (Subpopulation des HDLs, Dichte zwischen 1,063 und 1,125 g/ml) und HDL<sub>3</sub>-Subtypen enthält, untersucht wurde. Außerdem kann die SAA-Konzentration in einer APR wesentlich höher sein als diese in ESRD-Patienten. Der Einfluss von SAA auf die RCT-Funktion des HDLs wurde untersucht. Freies SAA kann als ein zellulärer Cholesterin-Akzeptor über ABCA1, *scavenger receptor* B1 (SR-BI) und andere Wege agieren<sup>66</sup>. HDL von postoperativen Patienten behält zum größten Teil seine ABCA1- und G1-abhängigen Cholesterin-Akzeptoraktivitäten, trotz der Gehaltsverminderungen von HDL-C und Apo A-I<sup>67</sup>. Die Überexpression von SAA in Mäusen führt zu einer vermehrten Produktion von kleinen lipidarmen Apo A-I Partikeln, die im Körper beschleunigt abgebaut werden<sup>68</sup> und SAA beeinträchtigt *in vivo* die RCT-Aktivität des HDLs<sup>69</sup>. In der vorliegenden Arbeit führte die künstliche Akkumulierung des rekombinanten SAA im HDL von gesunden Probanden zu einem signifikanten anti-inflammatorischen Kapazitätsverlust und erhöhter pro-

inflammatorischen Kapazität des HDLs. Sämt einer positiven Korrelation zwischen dem SAA-Gehalt im HDL und der reduzierten anti-inflammatorischen Aktivität des HDLs, deuten diese experimentellen Ergebnisse darauf hin, dass die Häufung von SAA im HDL für die Dysfunktion des HDLs von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz einen wichtigen Beitrag leistet.

Weiterhin können die Apolipoproteine vom HDL durch systemischen oxidativen Stress und Inflammation unter pathologischen Bedingungen modifiziert werden. Experimentelle Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass die Hydrochlorsäure-produzierende Myeloperoxidase zur Formation von Chloro- und Nitrotyrosinen und Oxidation von Methionin in Apo A-I führt<sup>70-72</sup>. Durch die Apo A-I Modifikation wird die Cholesterinefflux-Funktion vom HDL minimiert, so dass es dysfunktional und pro-inflammatorisch wird<sup>70-72</sup>. Die Modifikationen von Apo A-I und weiteren Komponenten des HDLs von ESRD-Patienten spielen bei der Dysfunktionalität eine wichtige Rolle. Das zunehmende Wissen über die Entstehung des dysfunktionalen HDLs ist hilfreich für die Entwicklung der zahlreichen therapeutischen Behandlungsstrategien, die sich auf die Verbesserung der HDL-Qualität beziehen. Hierzu zählen kurze Apo A-I Peptidsequenzen, die eine ähnliche sekundäre Struktur wie Apo A-I aufweisen und den Cholesterinefflux aus Makrophagen im ApoE-Knockout-Mausmodell erhöhen<sup>13, 44</sup>.

Diese Arbeit liefert zusätzliche Hinweise darauf, dass HDL unter terminaler Niereninsuffizienz von einem funktionalen in einen dysfunktionalen Zustand wechselt. Unter systemisch inflammatorischen und oxidativen Bedingungen werden die atheroprotektiv wirkenden Komponenten des HDLs zum Teil durch die aufgenommenen atherogenen Moleküle aus dem Partikel verdrängt. Somit hat HDL verringerte anti-atherogene Funktionen und erhöhte pro-atherogene Kapazitäten. Der Funktionsverlust des HDLs lässt sich mindestens zu einem wichtigen Teil auf die Anreicherung des SAA im HDL zurückführen. Neben der Dysfunktionalität vom HDL können weitere Fehlregulationen von Komponenten, wie die in dieser Arbeit untersuchte vasoaktive Substanz Up<sub>4</sub>A, zu der exzessiven kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz beitragen. Weitere Untersuchungen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen vom HDL unter Krankheitsbedingungen sind als Folgearbeit des vorliegenden Manuskripts geplant. Eine weitere interessante Fragestellung ist, welcher Zusammenhang zwischen strukturellen und funktionellen Veränderungen in den HDL<sub>2</sub>- und HDL<sub>3</sub>-Subtypen besteht.

## 1.6 Literatur

1. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:791-804.
2. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138:S419-420.
3. Barter P. The inflammation: lipoprotein cycle. *Atheroscler Suppl.* 2005;6:15-20.
4. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
5. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113:1708-1714.
6. Jankowski V, Tolle M, Vanholder R, Schonfelder G, van der Giet M, Henning L, Schluter H, Paul M, Zidek W, Jankowski J. Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium-derived vasoconstrictive factor. *Nat Med.* 2005;11:223-227.
7. Jankowski V, van der Giet M, Mischak H, Morgan M, Zidek W, Jankowski J. Dinucleoside polyphosphates: strong endogenous agonists of the purinergic system. *Br J Pharmacol.* 2009;157:1142-1153.
8. Jankowski V, Meyer AA, Schlattmann P, Gui Y, Zheng XL, Stamcou I, Radtke K, Tran TN, van der Giet M, Tolle M, Zidek W, Jankowski J. Increased uridine adenosine tetraphosphate concentrations in plasma of juvenile hypertensives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1776-1781.
9. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2001;7:853-857.
10. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem.* 2003;278:9142-9149.
11. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989;321:1311-1316.
12. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study. *Am J Cardiol.* 1992;70:733-737.
13. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function recent advances. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1792-1798.
14. Nofer JR, van der Giet M, Tolle M, Wolinska I, von Wnuck Lipinski K, Baba HA, Tietge UJ, Godecke A, Ishii I, Kleuser B, Schafers M, Fobker M, Zidek W, Assmann G, Chun J, Levkau B. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004;113:569-581.
15. Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, Keul P, Assmann G, Chun J, Levkau B, van der Giet M, Nofer JR. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1542-1548.
16. Bursill CA, Channon KM, Greaves DR. The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol.* 2004;15:145-149.
17. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354:610-621.
18. Boisvert WA. Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:161-165.
19. Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation.* 2003;108:2751-2756.

20. Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Hama S, Hough G, Bachini E, Grijalva VR, Wagner AC, Shaposhnik Z, Fogelman AM. The double jeopardy of HDL. *Ann Med*. 2005;37:173-178.
21. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet*. 2000;356:147-152.
22. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*. 1971;50:172-186.
23. Terpstra AH, Woodward CJ, Sanchez-Muniz FJ. Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: visualization by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal Biochem*. 1981;111:149-157.
24. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*. 1978;90:420-426.
25. Schuchardt M, Prufer J, Prufer N, Wiedon A, Huang T, Chebli M, Jankowski V, Jankowski J, Schafer-Korting M, Zidek W, van der Giet M, Tolle M. The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89:799-810.
26. Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, Li Z, Bittman R, Huang T, Tolle M, van der Giet M, Graler MH. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem*. 2010;109:1232-1243.
27. Vaziri ND, Navab M, Fogelman AM. HDL metabolism and activity in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:287-296.
28. Matsumoto T, Tostes RC, Webb RC. The role of uridine adenosine tetraphosphate in the vascular system. *Adv Pharmacol Sci*. 2011;2011:435132.
29. Wiedon A, Tolle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun*;417:1035-1040.
30. Schepers E, Glorieux G, Jankowski V, Dhondt A, Jankowski J, Vanholder R. Dinucleoside polyphosphates: newly detected uraemic compounds with an impact on leucocyte oxidative burst. *Nephrol Dial Transplant*;25:2636-2644.
31. Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290:F262-272.
32. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95:764-772.
33. Kilpatrick RD, McAllister CJ, Kovesdy CP, Derose SF, Kopple JD, Kalantar-Zadeh K. Association between serum lipids and survival in hemodialysis patients and impact of race. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:293-303.
34. Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Kamranpour N, Fogelman AM, Navab M. HDL-inflammatory index correlates with poor outcome in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2007;72:1149-1156.
35. Wierzbicki AS, Hardman TC, Viljoen A. New lipid-lowering drugs: an update. *Int J Clin Pract*. 2012;66:270-280.
36. Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18:427-434.
37. Besler C, Luscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*. 2012;4:251-268.
38. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761:655-666.
39. von Eckardstein A, Holz H, Sandkamp M, Weng W, Funke H, Assmann G. Apolipoprotein C-III(Lys58----Glu). Identification of an apolipoprotein C-III variant in a family with hyperalphalipoproteinemia. *J Clin Invest*. 1991;87:1724-1731.

40. Wilensky RL, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2009;20:415-420.
41. Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl Res.* 2009;153:77-85.
42. Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:1631-1641.
43. Tolle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prufer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W, van der Giet M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res.* 2012;94:154-162.
44. Navab KD, Elboudwarej O, Gharif M, Yu J, Hama SY, Safarpour S, Hough GP, Vakili L, Reddy ST, Navab M, Vaziri ND. Chronic inflammatory disorders and accelerated atherosclerosis: chronic kidney disease. *Curr Pharm Des.* 2011;17:17-20.
45. Morena M, Cristol JP, Dantoine T, Carbonneau MA, Descomps B, Canaud B. Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:389-395.
46. Sattler KJ, Elbasan S, Keul P, Elter-Schulz M, Bode C, Graler MH, Brocker-Preuss M, Budde T, Erbel R, Heusch G, Levkau B. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:821-832.
47. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999;55:648-658.
48. Whitehead AS, de Beer MC, Steel DM, Rits M, Lelias JM, Lane WS, de Beer FC. Identification of novel members of the serum amyloid A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1992;267:3862-3867.
49. Malle E, De Beer FC. Human serum amyloid A (SAA) protein: a prominent acute-phase reactant for clinical practice. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:427-435.
50. Witting PK, Song C, Hsu K, Hua S, Parry SN, Aran R, Geczy C, Freedman SB. The acute-phase protein serum amyloid A induces endothelial dysfunction that is inhibited by high-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med;*51:1390-1398.
51. Kluve-Beckerman B, Drumm ML, Benson MD. Nonexpression of the human serum amyloid A three (SAA3) gene. *DNA Cell Biol.* 1991;10:651-661.
52. Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res.* 2005;46:389-403.
53. Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, Pepine CJ, Sharaf B, Bairey Merz CN, Sopko G, Olson MB, Reis SE. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). *Circulation.* 2004;109:726-732.
54. Jousilahti P, Salomaa V, Rasi V, Vahtera E, Palosuo T. The association of c-reactive protein, serum amyloid a and fibrinogen with prevalent coronary heart disease--baseline findings of the PAIS project. *Atherosclerosis.* 2001;156:451-456.
55. Vidula H, Tian L, Liu K, Criqui MH, Ferrucci L, Pearce WH, Greenland P, Green D, Tan J, Garside DB, Guralnik J, Ridker PM, Rifai N, McDermott MM. Biomarkers of inflammation and thrombosis as predictors of near-term mortality in patients with peripheral arterial disease: a cohort study. *Ann Intern Med.* 2008;148:85-93.
56. Cai H, Song C, Endoh I, Goyette J, Jessup W, Freedman SB, McNeil HP, Geczy CL. Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *J Immunol.* 2007;178:1852-1860.
57. Lee HY, Kim SD, Shim JW, Lee SY, Lee H, Cho KH, Yun J, Bae YS. Serum amyloid A induces CCL2 production via formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling in human monocytes. *J Immunol.* 2008;181:4332-4339.

58. Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol Rev.* 2009;61:119-161.
59. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995;96:2758-2767.
60. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1994;180:203-209.
61. Chiba T, Chang MY, Wang S, Wight TN, McMillen TS, Oram JF, Vaisar T, Heinecke JW, De Beer FC, De Beer MC, Chait A. Serum amyloid A facilitates the binding of high-density lipoprotein from mice injected with lipopolysaccharide to vascular proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;31:1326-1332.
62. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268:405-408.
63. Wilson PG, Thompson JC, Webb NR, de Beer FC, King VL, Tannock LR. Serum amyloid A, but not C-reactive protein, stimulates vascular proteoglycan synthesis in a pro-atherogenic manner. *Am J Pathol.* 2008;173:1902-1910.
64. King VL, Thompson J, Tannock LR. Serum amyloid A in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*;22:302-307.
65. Coetzee GA, Strachan AF, van der Westhuyzen DR, Hoppe HC, Jeenah MS, de Beer FC. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J Biol Chem.* 1986;261:9644-9651.
66. Bjork JM, Chen G, Smith AR, Hommer DW. Incentive-elicited mesolimbic activation and externalizing symptomatology in adolescents. *J Child Psychol Psychiatry*;51:827-837.
67. Jahangiri A, de Beer MC, Noffsinger V, Tannock LR, Ramaiah C, Webb NR, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:261-267.
68. de Beer MC, Webb NR, Whitaker NL, Wroblewski JM, Jahangiri A, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. SR-BI selective lipid uptake: subsequent metabolism of acute phase HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:1298-1303.
69. Annema W, Nijstad N, Tolle M, de Boer JF, Buijs RV, Heeringa P, van der Giet M, Tietge UJ. Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2). *J Lipid Res*;51:743-754.
70. Shao B, Cavigiolio G, Brot N, Oda MN, Heinecke JW. Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:12224-12229.
71. Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004;114:529-541.
72. Shao B, Oda MN, Bergt C, Fu X, Green PS, Brot N, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through methionine oxidation and site-specific tyrosine chlorination of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 2006;281:9001-9004.

## 2. Erklärung über den Anteil an den ausgewählten Publikationen

Tao Huang hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

1. Publikation 1: Schuchardt M, Prüfer J, Prüfer N, Wiedon A, Huang T, Chebli M, Jankowski V, Jankowski J, Schäfer-Korting M, Zidek W, van der Giet M, Tölle M. The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. J Mol Med (Berl). 89(8):799-810. (2011)  
20 Prozent  
 Beteiligung an der Durchführung und Auswertung von zell-basierenden Funktionalitätsassays, Mitarbeit bei der Anfertigung des Manuskriptes
  
2. Publikation 2: Tölle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prüfer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W, van der Giet M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. Cardiovasc Res. 94(1):154-162. (2012)  
50 Prozent  
 Etablierung der Isolationsmethode von Lipoproteinen aus Serumproben, Durchführung der präparativen Gewinnung von Lipoproteinen, Durchführung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen und Western Blots, Durchführung der Lipoproteinseparation in Protein- und Lipid-Fractionen, Mitwirkung an der Durchführung der zell-basierenden Funktionalitätsassays, Beteiligung an der Durchführung von vielfältigen Assays für die Bestimmung von zahlreichen Serum- und Probenparametern, Versuchsplanung, Vorbereitung und Durchführung von analytischen und präparativen *reverse phase – high pressure liquid chromatography* (RP-HPLC) Analysen, Mitwirkung an der Durchführung der Massenspektroskopie-Analyse, Mitarbeit bei der Anfertigung des Manuskriptes
  
3. Publikation 3: Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, Li Z, Bittman R, Huang T, Tölle M, van der Giet M, Gräler MH. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. J Cell Biochem. 15;109(6):1232-43. (2010)  
20 Prozent  
 Durchführung der präparativen Isolation von Lipoproteinen, Beteiligung an der Durchführung von analytischen und präparativen RP-HPLC Analysen, Mitarbeit bei der Anfertigung des Manuskriptes

---

Tao Huang



### 3. Ausgewählte Publikationen

#### **3.1 The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation.**

Schuchardt M, Prüfer J, Prüfer N, Wiedon A, Huang T, Chebli M, Jankowski V, Jankowski J, Schäfer-Korting M, Zidek W, van der Giet M, Tölle M.

J Mol Med (Berl). 2011 Aug;89(8):799-810.

### **3.2 High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A.**

Tölle M\*, [Huang T\\*](#), Schuchardt M, Jankowski V, Prüfer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W, van der Giet M.

Cardiovasc Res. 2012 Apr 1;94(1):154-62.

\* geteilte Erstautorenschaft

**Supplementary Figure Legends** (von der ausgewählten Publikation 2)

### **3.3 Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate.**

Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, Li Z, Bittman R, Huang T, Tölle M, van der Giet M, Gräler MH.

J Cell Biochem. 2010 Apr 15;109(6):1232-43.

## 4. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 5. Publikationsliste

### 5.1 Originalarbeit

1. Tölle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prüfer N, Jankowski J, Tietge UJ, Zidek W, van der Giet M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res*. 2012 Apr 1;94(1):154-62.  
[IF: 6.064]
2. Wiedon A, Tölle M, Bastine J, Schuchardt M, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate (Up4A) is a strong inducer of smooth muscle cell migration via activation of the P2Y2 receptor and cross-communication to the PDGF receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 20;417(3):1035-40.  
[IF: 2.484]
3. Schuchardt M, Tölle M, Prüfer J, Prüfer N, Huang T, Jankowski V, Jankowski J, Zidek W, van der Giet M. Uridine adenosine tetraphosphate activation of the purinergic receptor P2Y enhances in vitro vascular calcification. *Kidney Int*. 2012 Feb;81(3):256-65.  
[IF: 6.606]
4. Schuchardt M, Prüfer J, Prüfer N, Wiedon A, Huang T, Chebli M, Jankowski V, Jankowski J, Schäfer-Korting M, Zidek W, van der Giet M, Tölle M. The endothelium-derived contracting factor uridine adenosine tetraphosphate induces P2Y(2)-mediated pro-inflammatory signaling by monocyte chemoattractant protein-1 formation. *J Mol Med (Berl)*. 2011 Aug;89(8):799-810.  
[IF: 4.668]
5. Tölle M, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Klöckel L, Jankowski J, Jankowski V, Zidek W, van der Giet M. Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol*. 2010 Oct;161(3):530-40.  
[IF: 4.409]
6. Bode C, Sensken SC, Peest U, Beutel G, Thol F, Levkau B, Li Z, Bittman R, Huang T, Tölle M, van der Giet M, Gräler MH. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem*. 2010 Apr 15;109(6):1232-43.  
[IF: 2.868]
7. Tölle M, Jankowski V, Schuchardt M, Wiedon A, Huang T, Hub F, Kowalska J, Jemielity J, Guranowski A, Loddenkemper C, Zidek W, Jankowski J, van der Giet M. Adenosine 5'-tetraphosphate is a highly potent purinergic endothelium-derived vasoconstrictor. *Circ Res*. 2008 Nov 7;103(10):1100-8.  
[IF: 9.489]

### 5.2 Abstracts

1. Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle : Verminderte Aktivierung der eNOS durch HDL von Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz  
2007; Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Bochum

2. Tao Huang, Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: HDL from patients with end stage renal disease shows markedly reduced capability to induce cholesterol efflux in RAW264.7 cells  
2008; European Society on Hypertension; Berlin
3. Markus Tölle, Annette Wiedon, Tao Huang, Mirjam Schuchardt, Walter Zidek, Markus van der Giet: FTY720 attenuates the IL-1 $\beta$  induced iNOS expression and reactive oxygen species production in vascular smooth muscle cells  
2008; European Society on Hypertension; Berlin
4. Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: Adenosine tetraphosphat: Most potent nucleotidic vasoconstrictor known so far  
2008; European Society on Hypertension; Berlin
5. Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Christina Keller, Burkhard Kleuser, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet: Immunmodulator FTY720 induces myofibroblast differentiation via the lysophospholipid receptor S1P3 and smad3 signaling  
2008; European Society on Hypertension; Berlin
6. Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Annette Wiedon, Walter Zidek, Markus van der Giet: Sphingosine-1-phosphate inhibits production of reactive oxygen species in the vascular wall  
2008; European Society on Hypertension; Berlin
7. Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Tao Huang, Jerold Chun, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: High density lipoproteins derogate the thrombin induced monocyte chemoattractant protein-1 secretion in HMECs  
2008; European Society on Hypertension; Berlin
8. Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet: HDL blockiert die Interleukin-1 $\beta$  induzierte Expression und Sekretion von sPLA2  
2008; Kongress für Nephrologie, Tübingen
9. Markus Tölle, Tao Huang, Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Walter Zidek, Markus van der Giet: Sphingosin-1-Phosphat blockiert die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen in der Gefäßwand  
2008; Kongress für Nephrologie, Tübingen
10. Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: Verminderte Aktivierung der eNOS durch HDL von Patienten mit dialysepflichtiger Niereninsuffizienz  
2008; Kongress für Nephrologie, Tübingen
11. Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Annette Wiedon, Tao Huang, Nicole Prüfer, Jasmin Prüfer, Patricia Soban, Joschika Bastine, Joachim Jankowski, Vera Jankowski, Walter Zidek, Markus van der Giet : The influence of immunomodulation on chronic inflammatory signal transduction pathways in vascular disease  
2008 ; Berliner Immunologie Tag, Berlin
12. Markus Tölle, Tao Huang, Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Walter Zidek, Markus van der Giet: High-density lipoproteins reduces oxidative stress in the vessel wall by inhibition of NAD(P)H oxidase activity  
2008; American Society of Nephrology, Philadelphia
13. Annette Wiedon, Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Markus van der Giet: Inhibition of MMP-9 activity in VSMCs  
2009; Deutsche Forschungsgemeinschaft, Essen



14. Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: The novel S1P1 receptor agonist AUY954 is a very potent migration and proliferation stimulating sphingolipid  
2009; European Society on Hypertension; Mailand
15. Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Tao Huang, Jasmin Prüfer, Nicole Prüfer, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: The dinucleotide uridine adenosine tetraphosphate induce monocyte chemoattractant protein-1 expression and secretion in vascular smooth muscle cells  
2009; European Society on Hypertension; Mailand
16. Markus Tölle, Tao Huang, Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Walter Zidek, Markus van der Giet: HDL from patients with end-stage renal disease is dysfunctional – the missing link between HDL concentration and cardiovascular outcome in ESRD patients?  
2009; Kongress für Nephrologie, Göttingen
17. Mirjam Schuchardt, Jasmin Prüfer, Nicole Prüfer, Annette Wiedon, Tao Huang, Walter Zidek, Markus Tölle, Markus van der Giet: The dinucleotide uridine adenosine tetraphosphate stimulate the expression of the osteoblast transcripition factor cbfa1  
2009; Kongress für Nephrologie, Göttingen
18. Mirjam Schuchardt, Nicole Prüfer, Jasmin Prüfer, Annette Wiedon, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: Up4A verstärkt die *in vitro* Mineralisierung von glatten Gefäßmuskelzellen  
2009, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Lübeck
19. Annette Wiedon, Joschika Bastine, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Lars Klöckl, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: Uridin-Adenosin-Tetraphosphat ist ein potenter Stimulator der Migration und Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen  
2009, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Lübeck
20. Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Tao Huang, Jasmin Prüfer, Nicole Prüfer, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: Up4A induziert die Expression und Sekretion von MCP-1 in vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen  
2009, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Lübeck
21. Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: S1P1-Rezeptor medierte Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen  
2009, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Lübeck
22. Tao Huang, Lars Klöckl, Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Jacek Jemielity, Walter Zidek, Markus van der Giet, Markus Tölle: Adenosin-Tetraphosphat: Stärkster purinerger endothelial sezernierter Vasokonstriktor  
2009, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Lübeck
23. Mirjam Schuchardt, Nicole Prüfer, Jasmin Prüfer, Annette Wiedon, Tao Huang, Markus Tölle, Markus van der Giet: HDL as immune-modulating lipid particle and its influence of regulatory T cells  
2009, Berlin Immunologie Tag
24. Markus van der Giet, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Nicole Prüfer, Jasmin Prüfer, Markus Tölle: Dysfunctional HDL from patients with end-stage renal disease (ESRD) recover after successful renal transplantation  
2010 ; American Transplantation Congress, San Diego
25. Markus Tölle, Lars Klöckl, Annette Wiedon, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet: The S1P1 agonist AUY954 activates eNOS via Akt-mediated pathway  
2010, European Society on Hypertension, Oslo

26. Tao Huang, Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Annette Wiedon, Walter Zidek, Markus van der Giet : HDL from patients with end-stage renal disease is dysfunctional  
2010, European Society on Hypertension, Oslo
27. Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Nicole Prüfer, Jasmin Prüfer, Tao Huang, Annette Wiedon, Walter Zidek, Markus van der Giet : The dinucleotide Up4A induce the production of reactive oxygen species in VSMCs via NADPH oxidase  
2010, European Society on Hypertension, Oslo
28. Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Annette Wiedon, Lars Klöckl, Walter Zidek, Markus van der Giet : The dinucleotide Up4A activates P2Y receptors in the kidney to induce vasoactive response  
2010, European Society on Hypertension, Oslo
29. Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Tao Huang, Annette Wiedon, Markus van der Giet: HDL decreases MMP-9 activity in vascular smooth muscle cells via S1P3/TGF- $\beta$  cross activation  
2010, Frontiers in Cardiovascular Biology, Berlin
30. Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Tao Huang, Annette Wiedon, Markus van der Giet: HDL is dysfunctional in patients with end-stage renal disease  
2010, Frontiers in Cardiovascular Biology, Berlin
31. Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Nicole Prüfer, Sarah Schmid, Jasmin Prüfer, Cornelia Henkel, Simone Boes, Markus Tölle, Markus van der Giet: Potent anti-inflammatory capacity of HDL and its functional changes under disease condition  
2011, Berlin Immunologie Tag
32. Jasmin Prüfer, Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet: 6-Mercaptopurine increases mineralization of vascular smooth muscle cells *in vitro*  
2011, European Society on Hypertension, Mailand
33. Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Jasmin Prüfer, Stefan Huber, Tao Huang, Matthias Höhne, Walter Zidek, Markus van der Giet: Mycophenolic acid diminishes monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via ros inhibition  
2011, European Society on Hypertension, Mailand
34. Markus Tölle, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Jasmin Prüfer, Walter Zidek, Markus van der Giet: The anti-inflammatory capacity of HDL is lost by accumulation of the pro-inflammatory acute phase protein serum amyloid a in the HDL particle of patients with end-stage renal disease  
2011, European Society on Hypertension, Mailand
35. Jasmin Prüfer, Mirjam Schuchardt, Markus Tölle, Tao Huang, Walter Zidek, Markus van der Giet: Vascular calcification is vastly increased with 6-mercaptopurine in vascular smooth muscle cells *in vitro* and *ex vivo*  
2012, European Society on Hypertension, London
36. Nicole Prüfer, Mirjam Schuchardt, Sarah Schmid, Tao Huang, Markus Tölle, Walter Zidek, Markus van der Giet: Anti-inflammatorische Eigenschaften von HDL: Hemmung der Diapedese und Einfluss auf T-Zellen  
2012, Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Hamburg
37. Nicole Prüfer, Mirjam Schuchardt, Tao Huang, Jasmin Prüfer, Markus Tölle, Walter Zidek, Markus van der Giet: Identifizierung der Signalwege der SAA-induzierten MCP-1 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen  
2012, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Berlin

### 5.3 Vorträge

1. High density lipoprotein (HDL) from patients with end stage renal disease (ESRD) is dysfunctional  
2009; European Society on Hypertension; Mailand
2. High density lipoprotein (HDL) von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (ESRD) ist dysfunktional  
2010, Kongress der Deutschen Hochdruckliga, Berlin

## 6. Danksagung

Die Doktorarbeit wurde an der Charité am Campus Benjamin Franklin in der nephrologischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus van der Giet (und PD Dr. Markus Tölle) „Renal and Vascular Research Group“ durchgeführt. Ihnen danke ich für die Möglichkeit dieser wissenschaftlichen Arbeit. Darüber hinaus möchte ich Prof. van der Giet für die Betreuung der Doktorarbeit, die freundliche Hilfe und die Durchsicht meiner Arbeit danken.

Bei Herrn Dr. Markus Gräler (AG Dr. Gräler, Molekulares Krebsforschungszentrum, CVK, Charité Berlin), Herrn Prof. Dr. Uwe J.F. Tietge (AG Prof. Dr. Tietge, Center for Liver, Digestive and Metabolic Disease, University Hospital Groningen, Niederlande) und Herrn Prof. Dr. Joachim Jankowski (AG Prof. Dr. Jankowski, Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité Berlin) bedanke ich mich für die gute Kooperationsarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Kolleginnen und Kollegen, besonders an Frau Dr. Mirjam Schuchardt, Frau Annette Wiedon, Frau Patricia Wolter, Frau Nicole Prüfer, Frau Jasmin Prüfer, PD Dr. Markus Tölle, Frau Cornelia Henkel, für die freundliche Zusammenarbeit, die langjährige Unterstützung und die harmonische Arbeitsatmosphäre. Sie haben nicht nur fachlich, sondern auch bei sprachlicher Korrektur des Manuskriptes Hilfe geleistet.

Ich danke herzlich meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Mann und seiner Familie. Ohne sie wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.

## 7. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Tao Huang, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Versuche zur Identifizierung von strukturellen und funktionellen Veränderungen in *high density lipoprotein*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---

Datum

---

Tao Huang