

Aus dem Bereich Innere Medizin IV  
Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
**Direktor: Univ.-Prof. Dr. Danilo Fliser**

LDL-Carbamylierung als Mechanismus endothelialer  
Dysfunktion bei Patienten mit chronischer  
Nierenerkrankung

# **DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von:

Felix Thomas Lothar Frenzel  
geboren am 14.02.1990 in Neunkirchen

**Tag der Promotion:**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. M. Menger

**1. Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. D. Fliser

**2. Berichterstatter:**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
1.1 cLDL induziert endotheliale Dysfunktion in klinisch relevantem Ausmaß	7
1.2 cLDL induces endothelial dysfunction in a clinically relevant dimension	8
<b>2. Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen</b>	<b>10</b>
2.1.1 Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren	10
2.1.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD) als kardiovaskulärer Risikofaktor	10
<b>2.2 Atherogenetische Grundprinzipien</b>	<b>11</b>
2.2.1 Pathophysiologie der Atherosklerose	11
2.2.2 Endotheliale Dysfunktion initiiert Atherogenese	13
<b>2.3 Lipoproteine</b>	<b>14</b>
2.3.1 Lipoproteine als Regulatoren der Endothelfunktion	14
2.3.2 Carbamylierung von Lipoproteinen	16
<b>2.4 Voruntersuchungen der AG Dr. Dr. Speer: cLDL induziert endotheliale Dysfunktion in Aortenringen ex vivo</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<b>3. Material</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Antikörper</b>	<b>21</b>
3.1.1 Primärantikörper	21
3.1.2 Sekundärantikörper	21
<b>3.2 Kits und siRNA</b>	<b>22</b>
<b>3.3 Medien, Lösungen, Puffer</b>	<b>22</b>
<b>3.4 Geräte</b>	<b>24</b>
<b>3.5 Verbrauchsmaterialien</b>	<b>25</b>
<b>3.6 Chemikalien und sonstige Reagenzien</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Analyse- und Statistikprogramme</b>	<b>28</b>
<b>4. Methoden</b>	<b>29</b>
<b>4.1 LDL-Isolation, -Analyse und -Modifikation</b>	<b>29</b>
4.1.1 LDL-Isolation mittels Ultrazentrifugation	29
4.1.1.1 Langzeitprotokoll	29
4.1.1.2 Kurzzeitprotokoll	31
4.1.2 LDL-Konzentration und -Sterilfiltration	33
4.1.3 LDL-Konzentrationsbestimmung	33
4.1.4 LDL-Carbamylierung ex vivo	33
4.1.5 TBARS Assay	34
4.1.6 UHPLC-Aminosäureanalyse	34
<b>4.2 HAEC-Zellkultur</b>	<b>35</b>
<b>4.3 Small interfering RNA-Transfektion</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Tierversuche an C57BL/6J-Mäusen</b>	<b>37</b>
4.4.1 Verwendete Mausstämme	37
4.4.2 Überexpression von <i>Lox1</i>	38
4.4.3 nLDL-/cLDL-Stimulation <i>in vivo</i>	38
4.4.4 Blut- und Organentnahme	38
4.4.5 nLDL-/cLDL-Stimulation <i>ex vivo</i>	39

<b>4.5 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie</b>	<b>39</b>
4.5.1 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	39
4.5.1.1 ROS-Bestimmung in HAEC	40
4.5.1.2 ROS-Bestimmung in murinen Aortenringen	41
4.5.1.3 ROS-Bestimmung in murinem Vollblut	41
4.5.1.4 Messung	41
4.5.2 Detektion von Stickstoffmonoxid (NO)	42
4.5.2.1 NO-Bestimmung in HAEC	42
4.5.2.2 Messung und Normalisierung	43
<b>4.6 Western Blot</b>	<b>44</b>
4.6.1 Herstellung von Zelllysaten	44
4.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode	45
4.6.3 SDS-PAGE	45
4.6.4 Protein-Transfer (Blot)	46
4.6.5 Blocken	47
4.6.6 Antikörperinkubation	47
4.6.7 Auswertung	47
<b>4.7 Immunfluoreszenz-Färbung der eNOS S-Glutathionylierung</b>	<b>48</b>
<b>4.8 MALDI-ToF-Massenspektrometrie</b>	<b>49</b>
<b>4.9 Klinische Studie</b>	<b>49</b>
<b>4.10 Carbamyl-Lysin FLISA</b>	<b>50</b>
<b>4.11 Statistische Analyse</b>	<b>50</b>
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Ex vivo Carbamylierung von LDL</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Effekte von cLDL auf die endotheliale ROS Produktion</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Effekte von cLDL auf die endotheliale NO-Produktion</b>	<b>55</b>
<b>5.4 Effekte von cLDL auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS)</b>	<b>55</b>
5.4.1 eNOS-Phosphorylierung	55
5.4.2 eNOS-Entkopplung	56
<b>5.5 Rolle von LOX-1 als Rezeptor für cLDL</b>	<b>59</b>
<b>5.6 Zelluläre Mechanismen der cLDL-induzierten ROS-Produktion</b>	<b>61</b>
<b>5.7 Potentielle therapeutische Beeinflussbarkeit der LDL-Carbamylierung</b>	<b>63</b>
<b>5.8 Klinische Relevanz der Forschungsergebnisse bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung</b>	<b>64</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>70</b>
<b>6.1 Proteincarbamylierung und deren funktionelle Konsequenzen</b>	<b>70</b>
<b>6.2 Carbamylierung bei CKD</b>	<b>72</b>
<b>6.3 Endotheliale Effekte von cLDL</b>	<b>74</b>
<b>6.4 Rolle des Rezeptors LOX-1</b>	<b>79</b>
<b>6.6 Therapeutische Konsequenzen</b>	<b>82</b>
<b>6.7 Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>8. Publikation</b>	<b>93</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>94</b>

## **Vorbemerkung**

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten wurden in Form einer Originalarbeit publiziert (Speer *et al.* Eur Heart J 2014). Bei der Durchführung der Arbeit und bei der Auswertung der Daten wurde ich von Herrn Dr. med. Dr. sc. nat. Timo Speer betreut. Der Text und die Abbildungen dieser Dissertationsschrift sind daher in weiten Teilen eine deutsche Reproduktion der Originalarbeiten.

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

APS	Ammonium-Persulfat
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
AU	arbitrary unit (willkürliche Einheit)
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BCNU	1,3-Bis(2-Chlorethyl)-1-Nitrosourea
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CKD	Chronic kidney disease (chronische Nierenerkrankung)
cLDL	carbamyliertes LDL
CMH	1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine
CRP	C-reaktives Protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DETC	Diethyldithiocarbaminsäure
DFO	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenylen-Iodonium
ECL	Enhanced chemoluminescence (erweiterte Chemolumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFR	estimated GFR (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate)
ESR	Elektronenspinresonanz
FLISA	Fluorescence-linked Immunosorbent Assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAEC	Human aortic endothelial cells (humane aortale Endothelzellen)
HbA <sub>1c</sub>	Glykosyliertes Hämoglobin
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
hsCRP	high sensitivity CRP
IF	Immunfluoreszenz
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KHB	Krebs-HEPES-Puffer
KHK	koronare Herzkrankheit
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX-1	Lectin-like oxLDL Rezeptor-1
MALDI-ToF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator
MDRD	Modifikation of Diet in Renal Disease
milk	Magermilchpulver
mind.	mindestens

MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MW $\pm$ SE	Mittelwert $\pm$ Standardfehler
NFS	Nanoparticle Formation Solution
nLDL	natives LDL
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG-SOD	Polyethylenglykol-Superoxid Dismutase
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ROS	Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPM	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
sog.	sogenannt
TBS	Tris buffered saline (Trisgepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
ToF	time of flight (Flugzeitberechnung)
ü.N.	über Nacht
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 cLDL induziert endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD)

Erhöhte LDL-Cholesterinspiegel sind insbesondere auch bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung wesentlich mit Atherosklerose und dem Auftreten von Gefäßkomplikationen vergesellschaftet. Vermehrt werden bei diesen Patienten Serumproteine posttranslational carbamylisiert. Die Carbamylierung von Lipoproteinen kann die Schaumzellenbildung und endotheliale Dysfunktion begünstigen, eine mechanistische Bestätigung dieser Hypothese wurde bislang nicht erbracht.

In dieser Studie wurden die endothelialen Effekte carbamylierten LDLs untersucht. Zunächst wurde LDL aus dem Serum gesunder Probanden isoliert und anschließend *ex vivo* carbamylisiert. ESR-spektroskopisch zeigte sich eine gesteigerte ROS- und verminderte NO-Produktion nach Inkubation von murinen Aortenringen sowie in humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) nach Inkubation mit carbamylisiertem LDL (cLDL). Western Blot-Analysen ergaben einen durch cLDL hervorgerufenen aktivitätsmindernden Phosphorylierungszustand der endothelialen NO-Synthase (eNOS). Der als Entkopplung bezeichnete Zerfall der dimeren eNOS in Monomere, welche folglich ROS statt NO bilden, wurde ergänzend immunfluoreszenzmikroskopisch durch cLDL-abhängige S-Glutathionylierung aufgezeigt. Zudem konnte LOX-1 als Rezeptor identifiziert werden, der diese Effekte von cLDL auf HAEC vermittelt. C57BL/6J-Wildtypmäuse wiesen nach Injektion mit cLDL erhöhte ROS-Spiegel in Vollblut und explantierten Aortenringen auf, wobei sich in *Lox1* transgenen C57BL/6J- Mäusen mit endothelialer Überexpression von LOX-1 eine weitere deutliche Zunahme der Effektstärke objektivieren lies. Durch Inkubation mit spezifischen Inhibitoren wurden die Beteiligung der NADPH-Oxidase (Inhibition durch Captopril/ DPI) sowie p38 MAPK (Inhibition durch SB202190) an der LOX-1 Rezeptoraktivierung nachgeschalteten zellulären Signalkaskade bewiesen.

Die klinische Relevanz der LDL-Carbamylierung verdeutlichte der Vergleich *in vivo* carbamylierter Lysin-Reste im LDL gesunder Probanden (kein Nachweis) und chronisch Nierenkranker ( $54 \pm 4$ ) mittels MALDI-ToF-Massenspektroskopie. Analog der ESR-spektroskopischen Studien mit *ex vivo* carbamylisiertem LDL führte das aus dem Plasma von CKD-Patienten isolierte LDL zu einer signifikanten Reduktion der NO-Produktion in Zellkulturversuchen an HAEC.



In einer klinischen Studie an Patienten mit CKD zeigte sich, dass hohe LDL-Carbamyl-Lysinkonzentrationen mit höherer Mortalität und Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert sind.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass cLDL bei chronisch Nierenkranken in klinisch relevantem Ausmaß endotheliale Dysfunktion über eine gesteigerte ROS-Produktion und eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit induziert. Auf molekularer Ebene werden hier nach LOX-1 Rezeptorbindung p38 MAPK und NADPH-Oxidase aktiviert sowie eNOS gehemmt und via S-Glutathionylierung entkoppelt. Diese Ergebnisse weisen auf einen wichtigen neuen Pathomechanismus für die Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit Niereninsuffizienz hin. Zudem konnte cLDL als neuer Biomarker sowie therapeutischer Angriffspunkt identifiziert werden.

## **1.2 cLDL induces endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease (CKD)**

Elevated levels of LDL-cholesterol are crucially involved in the pathogenesis of atherosclerosis and subsequent cardiovascular complications. This also applies to CKD-patients, whose serum proteins are increasingly subject to posttranslational carbamylation. Lipoprotein carbamylation is thought to promote foam cell formation and endothelial dysfunction but the underlying molecular mechanisms remained unclear.

Here, we investigated the endothelial effects of carbamylated LDL. LDL was isolated from healthy donors' serum and carbamylated *ex vivo*. ESR-spectroscopy showed an increased production of ROS and diminished release of NO in murine aortic rings and human aortic endothelial cells (HAEC) after incubation with cLDL. Western blot analyses revealed a cLDL-induced, activity-diminished phosphorylation state of eNOS, a key regulator of cellular redox state. In addition, uncoupling called disaggregation of dimeric eNOS into monomer units, which promotes the production of ROS instead of NO, was shown to be due to S-glutathionylation of eNOS. Moreover, LOX-1 was identified as the receptor mediating these adverse endothelial effects of cLDL. While C57BL/6J- wild type mice already featured increased levels of ROS in whole blood and explanted aortic rings after injection with cLDL, an even greater increase was observed in *Lox1* transgenic C57BL/6J- mice exhibiting endothelial overexpression of LOX-1. Using specific inhibitors, further experiments demonstrated an involvement of NAPH-oxidase (inhibition by captopril/ DPI) and p38

MAPK (inhibition by SB202190) in the cellular downstream effects of LOX-1 receptor stimulation by cLDL.

The clinical relevance of LDL carbamylation was proven by comparison of carbamylated lysine residues in LDL of healthy donors (none detectable) and CKD patients ( $54 \pm 4$ ) using MALDI-ToF mass spectrometry. Similar to LDL carbamylated *ex vivo*, incubation with LDL isolated from CKD patients' plasma led to a significant reduction of basal NO-production in HAEC culture experiments.

Notably, in a prospective clinical study of CKD patients, we could prove the clinical relevance of these experimental findings. Carbamyl-lysine levels in LDL were associated with increased all-cause mortality and cardiovascular event rate.

In summary, cLDL induces endothelial dysfunction through increased production of ROS and diminished bioavailability of NO, in a clinically relevant dimension in CKD patients. LOX-1 receptor binding leads to activation of p38 MAPK and NADPH-oxidase such as inhibition and uncoupling of eNOS by S-glutathionylation. These findings highlight on carbamylation of LDL as an important pathomechanism for CKD-associated accelerated cardiovascular disease. Moreover, cLDL was identified as a novel biomarker and potential therapeutic target.

## **2. Einleitung**

### **2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache in westlichen Ländern dar. So waren kardiovaskuläre Ereignisse wie der akute Myokardinfarkt oder Schlaganfall entsprechend der Global Burden of Disease-Studie in 2013 für 247,9 Todesfälle/100.000 Personen verantwortlich. Demnach waren 28,2 % aller Todesfälle weltweit kardiovaskulären Erkrankungen geschuldet [1]. Ähnliche Zahlen publiziert die Todesursachenstatistik für Deutschland. Laut Daten des statistischen Bundesamts sind 38,9% der gesamten Todesursachen im Jahr 2014 Erkrankungen des Kreislaufsystems zuzuschreiben [2].

#### **2.1.1 Klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Seit Start der Framingham-Herz-Studie im Jahr 1948 sind mehrere unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren identifiziert worden [3], die das globale Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bestimmen und seitdem in zahlreichen Folgestudien validiert wurden. So stratifizierte die deutsche „Prospektive Cardiovasculäre Münster (PROCAM)“ Studie hinsichtlich des Risikos für einen Myokardinfarkt neben dem Geschlecht als bedeutsamste Risikofaktoren das Lebensalter, dicht gefolgt von LDL-Cholesterin, Nikotinkonsum, HDL-Cholesterin, systolischem Blutdruck, positiver Familienanamnese mit frühzeitigen Myokardinfarkten, Diabetes mellitus und Triglyzeriden [4].

#### **2.1.2 Chronische Nierenerkrankung (CKD) als kardiovaskulärer Risikofaktor**

Interessanterweise sind Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie nicht nur direkte Auslöser von Gefäßerkrankungen [5,6], sondern stellen auch die beiden häufigsten Ursachen der Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung dar [7,8].

Eine chronische Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) liegt nach Definition der KDIGO dann vor, wenn eine Störung der Nierenstruktur oder -funktion über einen Zeitraum von länger als drei Monaten negative Auswirkungen auf den Gesundheitszustand ausübt [9]. Ihre Klassifikation beruht neben der Ursache der Nierenschädigung (z.B. Glomerulonephritiden, diabetische Nephropathie, hyperten-

sive Nephrosklerose) auf der verbleibenden glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Albuminurie. Gemeinsamer Endpunkt jeder über mehrere Jahre hinweg bestehender chronischen Nierenschädigung ist dabei das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz (GFR < 15 ml/h) mit progressiver Glomerulosklerose und der Entwicklung von Schrumpfnieren [10]. Neben einer Beeinträchtigung der ex- und inkretorischen Nierenfunktion sind eine Salz- und Wasserretention durch Störungen im Wasser-/Elektrolyt- und Säuren-Basen-Haushalt sowie Endorganschäden durch retinierte harnpflichtige Substanzen die Folge [10].

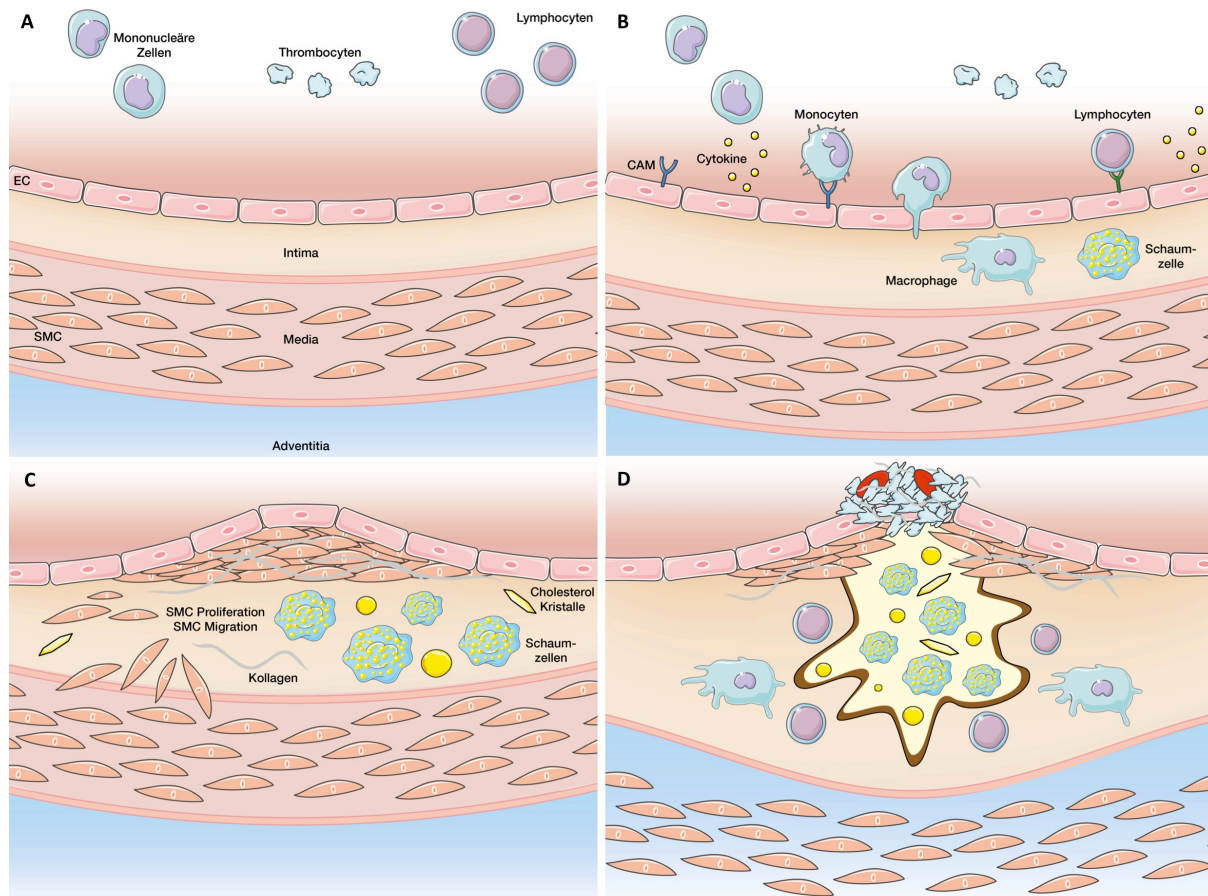
So wird ersichtlich, weshalb die CKD mittlerweile als eine der stärksten unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktoren angesehen wird und ihrerseits selbst im Sinne eines *circulus vitiosus* beispielsweise die Entstehung einer arteriellen Hypertonie begünstigt [11]. CKD kann daher *per se* und nicht nur im Zusammenspiel mit den Komorbiditäten Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie als hauptverantwortlich für die Pathogenese atherosklerotischer Gefäßerkrankungen betrachtet werden. Dies gilt insbesondere für eine alternde Gesellschaft, da die Prävalenz einer chronischen Nierenerkrankung mit zunehmendem Alter steigt [12]. Dennoch scheint die mit einer chronischen Nierenerkrankung assoziierte hohe kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität nicht alleine durch klassische Risikofaktoren erklärt werden zu können [13].

## **2.2 Grundprinzipien der Atherogenese**

### **2.2.1 Pathophysiologie der Atherosklerose**

Die Entstehung atherosklerotischer vaskulärer Läsionen stellt ein Grundprinzip kardiovaskulärer Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheit, ischämischem Schlaganfall oder peripher-arterieller Verschlusskrankheit dar.

Der in Abbildung 1 illustrierte Prozess der Atherogenese zeigt ein komplexes Geschehen in einem durch multiple Risikofaktoren bestimmten Milieu, welches durch die Ausbildung atheromatöser Plaques in Gefäßwänden geprägt ist. Infolge von Plaqueruptur und Thrombusbildung kommt es zu flusslimitierenden Stenosen und Gewebsischämie, welche sich klinisch als Myokardinfarkt oder Schlaganfall präsentieren können [14].



**Abbildung 1: Pathophysiologie der Atherogenese.** EC= endothelial cells (Endothelzellen), SMC= smooth muscle cells (glatte Muskelzellen), CAM= cell adhesion molecule (Zelladhäsionsmoleküle). Abbildung von Dr. Dr. T. Speer zur Verfügung gestellt.

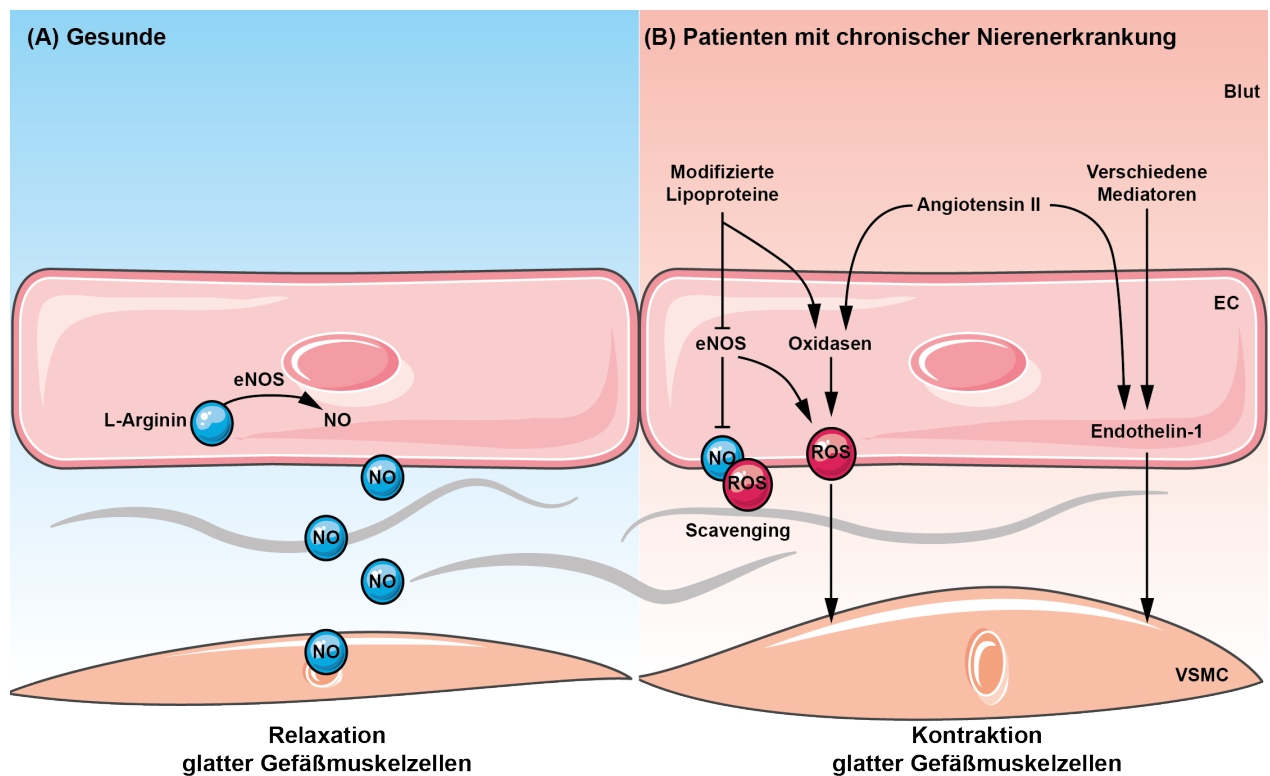
Im gesunden Zustand (Abb. 1A) verhindert eine intakte Endothelzellschicht (EC) als Barriere zwischen Blutstrom und Gefäßwand die Adhäsion und Aktivierung korpuskulärer Blutbestandteile. Insbesondere modifizierte Lipoproteine wie Low-density lipoprotein (LDL) können die endotheliale Barriere überwinden und gelangen über verschiedene Prozesse in den subendothelialen Raum [15]. Diese subendotheliale Retention von LDL und Lipidpartikeln wird heute als Kernprozess zur Initiierung der Atherogenese diskutiert [16]. Im Subendothelraum aggregieren die LDL-Partikel, werden zusätzlich durch Oxidation zu einem pro-atherogenen Partikel und können so eine inflammatorische Reaktionskaskade anstoßen. Modifizierte LDL-Partikel aktivieren Endothelzellen (analog der Wirkung von Zytokinen wie  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ ) und induzieren damit die endotheliale Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle (CAM) (Abb. 1B) [17]. Dies ermöglicht zirkulierenden Monozyten die Adhäsion an das Endothel. Die gleichzeitige Freisetzung von chemotaktischen Botenstoffen, Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen aktiviert die Monozyten und fördert damit deren Adhäsion und

Transmigration in den subendothelialen Raum, wodurch ein *circulus vitiosus* entsteht [18]. Im subendothelialen Raum differenzieren Monozyten zu Makrophagen und werden durch Einlagerung von Cholesterinestern und freien Fettsäuren in Schaumzellen umgewandelt. Wachstumsfaktoren stimulieren zudem die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMC), die aus der Media in die Intima einsprossen (Abb. 1C). Gleichzeitig setzen sie extrazelluläre Matrixbestandteile wie Proteoglykane, Elastin und Kollagen frei. Die dadurch gebildete fibröse Kappe dient der schützenden Abkapselung des Konglomerats aus Schaumzellen, extrazellulären Lipidablagerungen, Cholesterinkristallen und apoptotischen Zelltrümmern, sodass diese Plaques zunächst asymptomatisch bleiben. Vermutlich durch eine Störung der apoptotischen Beseitigung toter Makrophagen („Efferozytose“) kann es innerhalb der Plaque zur Fortdauer und Intensivierung der Inflammation kommen [19]. Als erste Anhalte für das Fortschreiten einer Läsion zur so genannten vulnerablen Plaque konnten eine pathologische Intimaverdickung (PIT) [20] und Akkumulation unveresterter Cholesterine beobachtet werden. Durch Umwandlung des Lipidkerns in ein nekrotisches Zentrum [21] und Ausdünnung der fibrösen Kappe zeigen sich solche vulnerablen Plaques (Abb. 1D) anfällig gegenüber Scherkräften, was zur Plaquefissur oder -ruptur, mit der Konsequenz tödlicher thrombotischer Gefäßverschlüsse, führen kann [22].

### **2.2.2 Endotheliale Dysfunktion initiiert Atherogenese**

Neben der rein physikalischen Barrierefunktion stellen Endothelzellen ein komplexes Kontrollorgan der vaskulären Homöostase dar. Durch parakrine Faktoren regulieren sie u.a. den Gefäßtonus, inhibieren die Thrombozytenaggregation, verhindern die Adhäsion von Leukozyten und limitieren die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [23]. Das Schlüsselmolekül dieser Aufgaben stellt dabei das endothelstammige freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) dar, welches die Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen anregt, die Expression vaskulärer Zelladhäsionsmoleküle inhibiert, anti-inflammatorisch und anti-koagulatorisch wirkt [24,25] sowie die Oxidation von LDL unterdrückt [26]. Endotheliale Dysfunktion, welche als erster Schritt der Atherogenese angesehen wird [27], entsteht vorwiegend durch ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von NO und konkurrierender reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [28]. Der resultierende oxidative Stress stimuliert zudem die oben beschriebene pro-inflammatorische Zellaktivierung und wirkt so pro-atherogen.

Tatsächlich sind alle kardiovaskulären Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Raucherstatus sowie manifeste kardiovaskuläre Erkrankungen selbst mit einer erhöhten ROS-Produktion in der Gefäßwand assoziiert, wodurch die Bioverfügbarkeit von NO am Endothel zumindest teilweise reduziert wird [23,29]. Es überrascht daher nicht, dass insbesondere das urämische Milieu einer chronischen Nierenerkrankung oxidativen Stress generiert. Dieser entsteht erstens durch ROS-Produktion infolge Aktivierung pro-oxidativer endothelialer Enzyme (NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase, Enzyme der mitochondrialen Atmungskette), zweitens durch Inhibition anti-oxidativer Enzyme wie der endothelialen NO-Synthase durch sog. Entkopplung [23]. Letztlich führt diese Dysfunktion des Endothels zu Vasospasmen, Thromboseneigung, vaskulärer Inflammation sowie Intimaproliferation und induziert somit die Atherogenese.



**Abbildung 2: Auswirkungen des Milieus chronischer Nierenerkrankungen auf die Endothelfunktion.** VSMC = vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskulaturzellen). Abbildung modifiziert nach Speer *et al.* (Oxford Textbook of Clinical Nephrology 2015).

## 2.3 Lipoproteine

### 2.3.1 Lipoproteine als Regulatoren der Endothelfunktion

Die Vertreter der heterogenen Lipoprotein-Familie nehmen eine bedeutsame Rolle als Modulatoren der Endothelfunktion ein.

So werden dem High Density Lipoprotein (HDL) als Vehikel des reversen Cholesterintransports aus der Körperperipherie zur Leber hauptsächlich anti-atherogene Eigenschaften zugeschrieben. Darüber hinaus übt HDL vasoprotektive Effekte durch gesteigerte NO-Produktion via Hochregulation und Stimulation der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus, schützt Endothelzellen vor Apoptose und fördert deren Wachstum sowie Migration. Zuletzt weist HDL durch Stimulation der endothelialen Prostazyklin-Synthase und Herabregulation von Selectinen anti-thrombotische Eigenschaften auf [30,31].

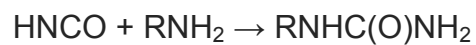
Demgegenüber gilt eine Erhöhung des Low Density Lipoproteins (LDL) seit vielen Jahren als kardiovaskulärer Risikofaktor. Da jedoch annäherungsweise die Hälfte aller Patienten mit klinischer Manifestation der Atherosklerose normale bis lediglich geringfügig erhöhte LDL-Cholesterinspiegel aufweisen [27], müssen abseits der LDL-C-Konzentration auch qualitative oder strukturelle Merkmale der Partikel oder Umweltfaktoren von Bedeutung sein. Ebenso erscheint es auf mechanistischer Ebene im Rahmen der Schaumzellen-Hypothese zunächst paradox, dass erhöhte LDL-Spiegel zur Bildung atherogener Schaumzellen führen, da Makrophagen durch einen negativen Feedbackmechanismus des LDL-Rezeptors vor einer Cholesterinüberladung geschützt werden. Um diese Downregulation zu umgehen und pro-atherogen zu wirken, müssen native LDL-Partikel somit zusätzlich strukturell modifiziert werden [17].

Gegenwärtig sind mehrere solcher posttranslationalen Proteinmodifikationen bekannt, welche LDL in ein pro-atherogenes Lipoprotein umwandeln und für dessen Effekte auf das Gefäßsystem verantwortlich sind. Bislang am besten charakterisiert ist die ROS-vermittelte Oxidation von LDL, die zur Bildung von oxidiertem LDL (oxLDL) führt. Dieses wird von Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren konzentrationsunabhängig aufgenommen [32] und vermittelt somit frühe Auswirkungen in der Entwicklung endothelialer Dysfunktion. Auch oxLDL induziert einen Teufelskreis, indem es u.a. durch Aktivierung der NADPH-Oxidase und eNOS-Uncoupling selbst als Stimulus zur Bildung weiterer freier Sauerstoffradikale fungiert. Durch Sensibilisierung des kontraktiven Gefäßapparates werden der Gefäßtonus gesteigert, Vasospamen begünstigt und Remodelling-Vorgänge angestoßen [33].



### 2.3.2 Carbamylierung von Lipoproteinen

Neben der Oxidation wurde kürzlich die Carbamylierung von Lipoproteinen als weitere, deren Funktion beeinflussende Modifikation identifiziert [34]. Unter Carbamylierung versteht man eine nicht-enzymatische Proteinmodifikation durch langanhaltende Exposition zu im Rahmen nachlassender Nierenfunktion zunehmend aus Harnstoff spontan freigesetzten Cyanaten. Deren aktive Form, Isocyan Säure (HNCO), reagiert irreversibel mit freien Aminosäuren (RNH<sub>2</sub>) bzw. Aminosäureseitenketten von Proteinen und anderen Molekülen zu Carbamyl-Aminosäuren(seitenketten) (RNHC(O)NH<sub>2</sub>).



Die resultierende Carbamid-Verbindung verändert nicht nur die Struktur carbamylierter Substanzen, sondern zugleich auch deren Ladung und Funktion. *In vivo* kann so die molekulare Aktivität von Enzymen, Co-Faktoren, Hormonen, Antikörpern, Rezeptoren und Transportproteinen beeinflusst werden [34].

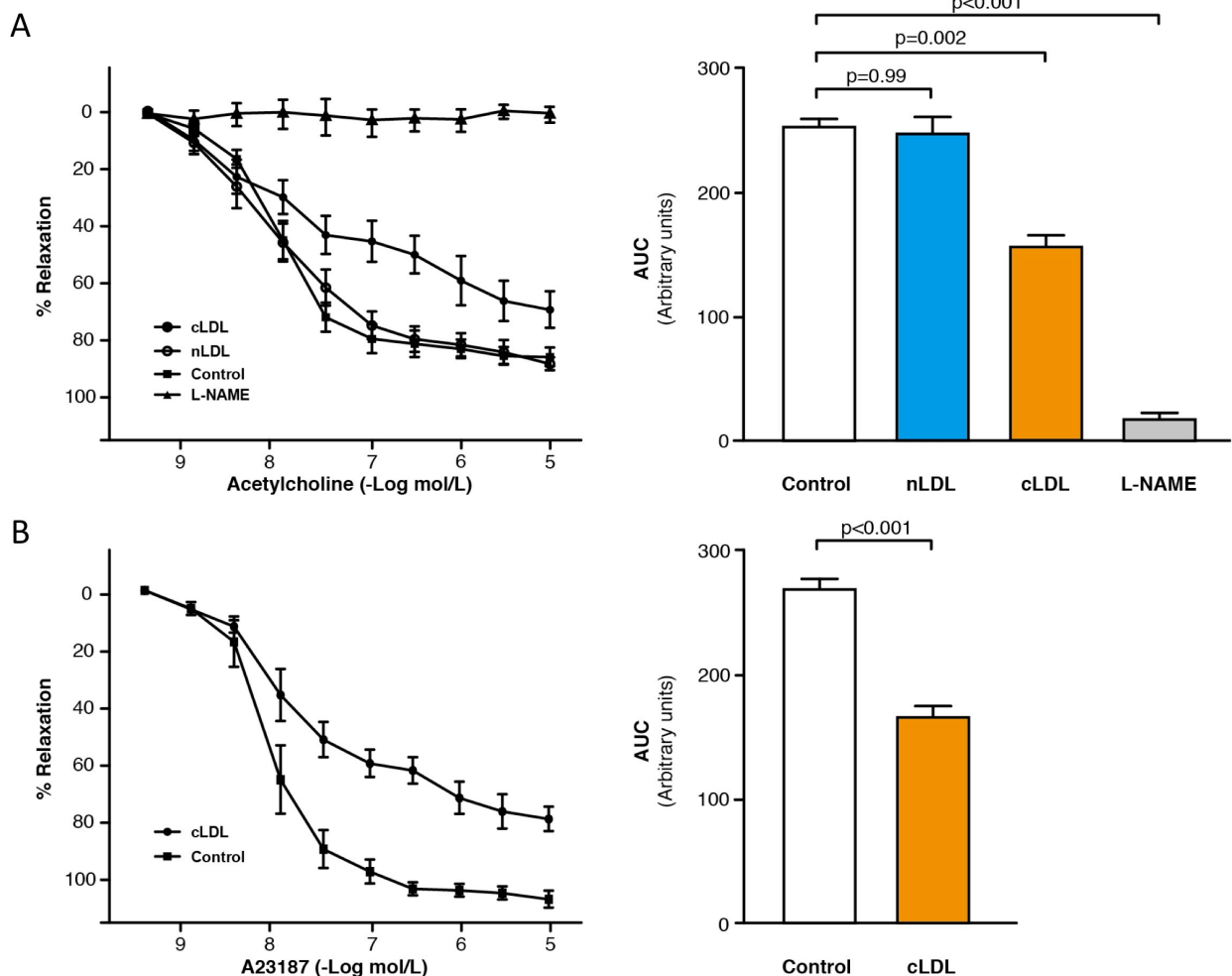
Bereits vor vielen Jahren wurde der Mechanismus der Carbamylierung am Hämoglobin von Patienten mit terminaler Nierenerkrankung beschrieben [35] und mit der Toxizität der Urämie in Verbindung gebracht [34]. Jedoch scheint der Vorgang der Carbamylierung nicht unbedingt Harnstoff-spezifisch zu sein, da Cyanate auch bei Nierengesunden durch die Myeloperoxidase und Peroxid-katalysierte Oxidation von Thiocyanaten (beispielsweise aus Tabakrauch) in Entzündungsherden anfallen können [36,37]. In der jüngeren Vergangenheit ist nun insbesondere die Harnstoff- bzw. Myeloperoxid-abhängige Carbamylierung von Lysin-Resten an Lipoproteinen chronisch nierenkranker Patienten in den Fokus der Forschung gerückt, da sowohl bei dieser Population, als auch Patienten mit koronarer Herzkrankheit, erhöhte Serumspiegel carbamylierter Proteine (insbesondere Lipoproteine) detektiert wurden [38-40]. Durch Nachweis der Beeinträchtigung funktionaler Integrität von HDL- und LDL-Partikeln konnte hierbei ein erster Zusammenhang zur Atherosklerose-Entwicklung bei chronischer Nierenerkrankung nachgewiesen werden [39-41]. Carbamyliertes cLDL-Cholesterin scheint damit eine dem oxLDL ähnliche Rolle wahrzunehmen, wobei Studien zeigten, dass einzelne LDL-Partikel auch simultan carbamyliert und oxidiert werden können und beide Modifikationen im Rahmen der Atherogenese in vielen Partikeln voraussichtlich koexistieren [42]. Die Vermutung, cLDL führe im Rahmen chronischer Nierenerkrankung in Analogie zu oxLDL zu

endothelialer Dysfunktion, galt daher bislang als plausibler Erklärungsversuch für das hohe kardiovaskuläre Risikoprofil dieser Patientengruppe. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus konnte aber nie schlüssig bewiesen werden [36].

## 2.4 Voruntersuchungen der AG Dr. Dr. Speer: cLDL induziert endotheliale Dysfunktion in Aortenringen *ex vivo*

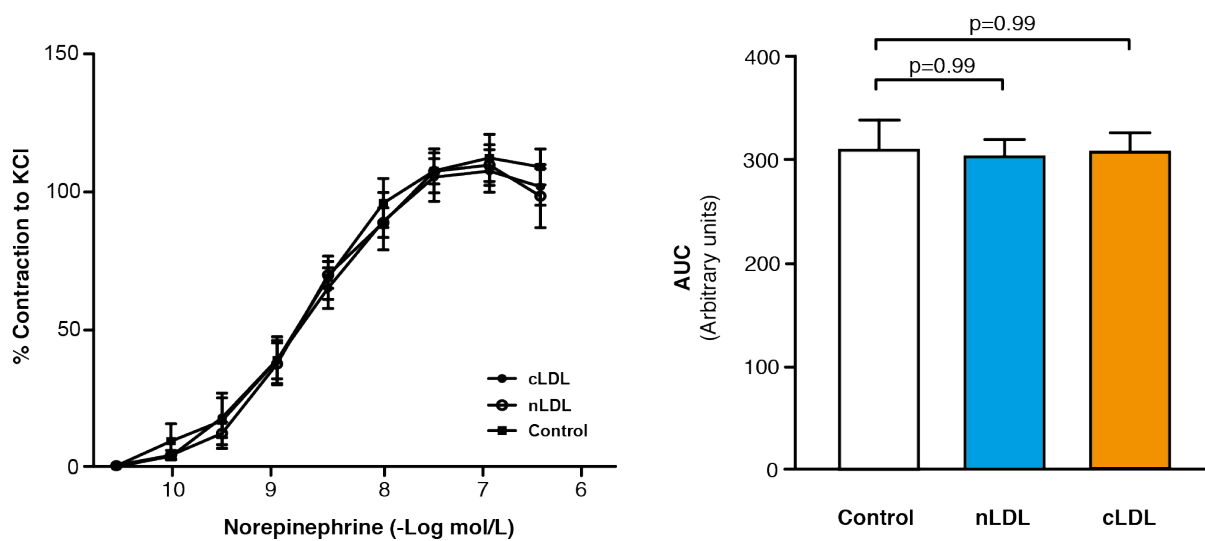
Welche exakten Effekte cLDL auf die Endothelzellfunktion ausübt, blieb unklar, bis es unserer Arbeitsgruppe in Organkammerexperimenten kürzlich gelang, zu zeigen, dass cLDL die endotheliale Funktion in isolierten Aortenringen beeinträchtigt [43]. Die folgenden Abbildungen sind der entsprechenden Publikation der Arbeitsgruppe von Dr. Dr. T. Speer [43] entnommen.

In Voruntersuchungen an Aortenringen von Wildtyp C57Bl/6J-Mäusen konnte durch Messung der isometrischen Wandspannung beobachtet werden, dass *in vitro* carbamyliertes LDL (siehe Kapitel 4.3) im Gegensatz zu nativem LDL gesunder Probanden spezifisch die durch Acetylcholin und dem Kalzium-Ionophor A23187 vermittelte vaskuläre Relaxationsfähigkeit beeinträchtigen kann (Abb. 3). Die Wirkung auf Rezeptor-abhängige und -unabhängige Signalwege gleichermaßen zeigt, dass der Mechanismus nicht vom muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor abhängig sein kann.



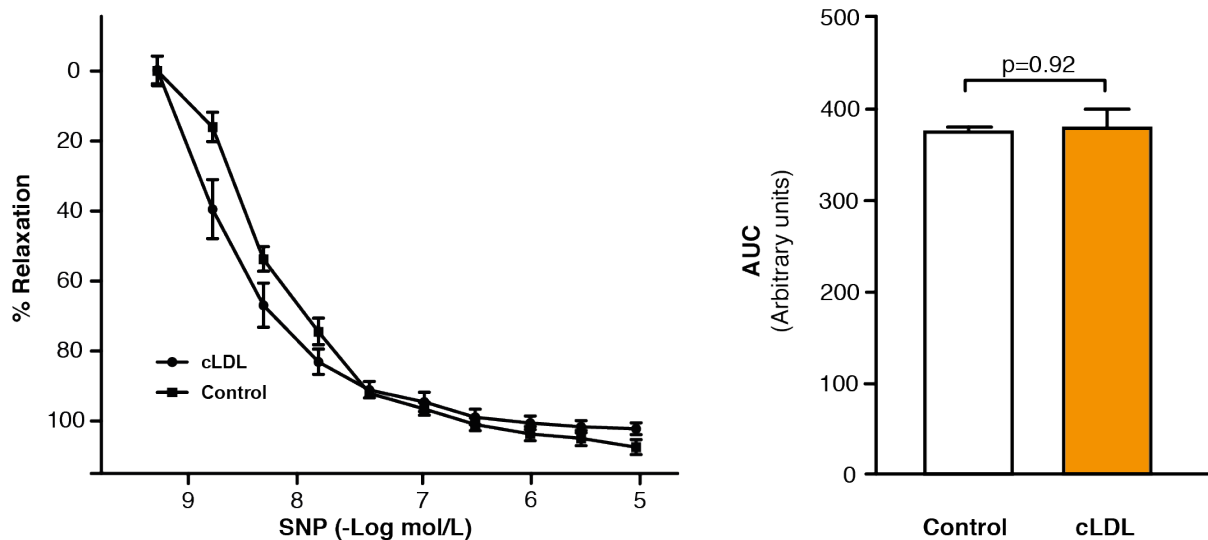
**Abbildung 3: Behandlung mit cLDL hemmt gegenüber nLDL sowohl rezeptorvermittelte (Acetylcholin) als auch rezeptorunabhängige Vasodilatation (A23187) in Aortenringen ex vivo.** (A) Messung der isometrischen Wandspannung an Aortenringen von C57Bl/6J-Mäusen mit Acetylcholin in aufsteigenden Konzentrationen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l während submaximaler Kontraktion durch Noradrenalin ( $10^{-6}$  mol/l)  $\pm$  nLDL/cLDL (je 100  $\mu$ g/ml) (B) Analoger Versuchsaufbau unter dem Kalzium-Ionophor A23187 ( $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l). Relaxation je prozentual zur Vorkontraktion angegeben. AUC als  $-\log(\text{ED}_{50})$ . Abbildung entnommen aus Speer *et al.* Eur Heart J 2014.

Eine Versuchsserie mit dem Vasokonstriktor KCl zeigte keine Änderung der Gefäßkontraktilität in Anwesenheit von nLDL und cLDL gegenüber der Kontrolle (Abb. 4), sodass die ausbleibende Relaxation der ersten Versuchsreihe nicht im Rahmen einer Zunahme der Vasokonstriktion durch cLDL erklärt werden kann.



**Abbildung 4: Kein signifikanter Unterschied in der Gefäßkontraktion durch KCl in Gegenwart von nLDL und cLDL.** Messung der Zunahme isometrischer Wandspannung von Aortenringen unter dem Vasokonstriktor KCl (80 mmol/l) während submaximaler Kontraktion durch Noradrenalin ( $10^{-6}$  mol/l)  $\pm$  nLDL/cLDL (je 100  $\mu$ g/ml). AUC als  $-\log(\text{ED}_{50})$ . Abbildung entnommen aus Speer *et al.* Eur Heart J 2014.

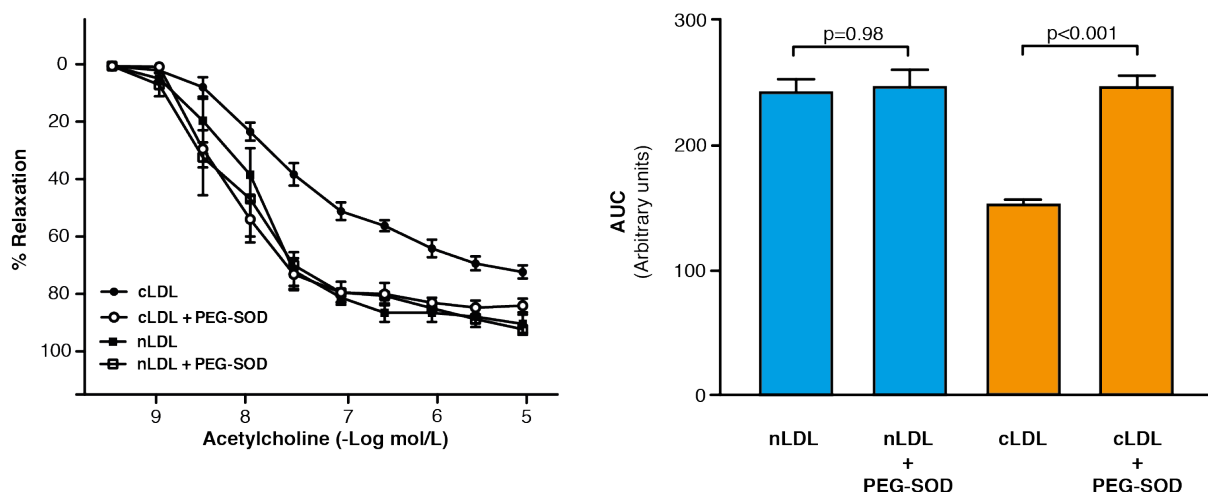
Der Frage, ob die Einschränkung der vaskulären Relaxationsfähigkeit durch cLDL via Endothel oder glatte Gefäßmuskelzellen vermittelt wird, ging unsere Arbeitsgruppe durch isometrische Spannungsmessungen unter dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (Sodium nitroprusside, SNP) nach (Abb. 5). Da sich nach Zugabe von cLDL gegenüber Nitroprussid alleine kein signifikanter Unterschied in der gemessenen Wandspannung zeigte, kann der von cLDL ausgeübte Effekt nicht in einer Störung der vasodilatativen Eigenschaften glatter Gefäßmuskelzellen als Rezeptororgane von NO liegen, sondern muss spezifisch durch Beeinträchtigung der Endothelfunktion durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO begründet sein.



**Abbildung 5: Kein signifikanter Unterschied in der Gefäßrelaxation durch Nitroprussid nach Zugabe von cLDL.** Messung der isometrischen Wandspannung von Aortenringen unter Nitroprussid ( $10^{-10}$  bis  $10^{-5}$  mol/l), während submaximaler Kontraktion durch Noradrenalin ( $10^{-6}$  mol/l)  $\pm$  cLDL (100  $\mu$ g/ml). Relaxation prozentual zur Vorkontraktion angegeben. AUC als  $-\log(\text{ED}_{50})$ . Abbildung entnommen aus Speer *et al.* Eur Heart J 2014.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass cLDL spezifisch endothelabhängige, nicht jedoch endothelunabhängige Gefäßrelaxationen durch sowohl rezeptorvermittelte, als auch rezeptorunabhängige Agonisten inhibiert (Abb. 3-5).

Durch Zugabe des ROS-Scavengers Polyethylenglykol-Superoxid-Dismutase (PEG-SOD) konnte die endothelvermittelte Relaxation gegenüber Acetylcholin in mit cLDL-behandelten Aortenringen wiederhergestellt werden (Abb. 6), was auf eine potentielle Schlüsselrolle von ROS in der Induktion endothelialer Dysfunktion durch cLDL hinweist.



**Abbildung 6: Wiederherstellung der endothelvermittelten Relaxation gegenüber Acetylcholin  $\pm$  nLDL/cLDL nach Zugabe von PEG-SOD.** Messung der isometrischen Wandspannung an Aortenringen mit Acetylcholin in aufsteigenden Konzentrationen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-5}$  mol/l während submaximaler Kontraktion durch Noradrenalin ( $10^{-6}$  mol/l)  $\pm$  nLDL/cLDL (je 100  $\mu$ g/ml)  $\pm$  PEG-SOD (150 U/ml). Relaxation prozentual zur Vorkontraktion angegeben. AUC als  $-\log(\text{ED}_{50})$ . Abbildung entnommen aus Speer *et al.* Eur Heart J 2014.

Der Effekt von cLDL auf die Gefäßdilatation erschien unserer Arbeitsgruppe somit vergleichbar mit derer von oxLDL, was auf die Möglichkeit verschiedenartiger Modifikationen von LDL hinweist, welche über ähnliche Signalwege gleichartige Auswirkungen auf die vaskuläre Homöostase ausüben [32]. Die Tatsache, dass natives LDL gesunder Probanden in diesen Pioniersuchen jedoch keine vergleichbaren Auswirkungen zeigte, legt nahe, dass nicht der LDL-Partikel selbst, sondern dessen Modifikationen für die Endothelfunktion maßgeblich verantwortlich sein müssen [44,45].

## **2.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

Die gezeigten deskriptiven Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen deutliche Effekte von carbamylisiertem LDL auf die Endothelfunktion in isolierten Aortenringen *ex vivo*. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen wurden bislang allerdings nicht charakterisiert.

Das Ziel dieser Arbeit soll daher die Bearbeitung der folgenden Fragestellungen sein:

1. Wie beeinflusst cLDL die endotheliale Homöostase *in vitro* und *in vivo*?
2. Welche molekularen Mechanismen liegen den Effekten von cLDL auf das Endothel zugrunde?
3. Welche klinische Relevanz haben diese Ergebnisse? Stellt carbamylisiertes LDL einen Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Nierenkranken dar?

### 3. Material

#### 3.1 Antikörper

##### 3.1.1 Primärantikörper

Name	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Diluent	Inkubation	Einsatz
Anti-Carbamyl Lysine (CBL)	goat	Academy Bio-Medical (CBL 30S-G1a)	1:200	Diluent (FLISA)	1h RT	FLISA
anti-eNOS (pS1177), Phospho-Specific	mouse	BD Transduction Lab (#612393)	1:2.000	5% BSA	ü.N.	WB
anti-eNOS (pT495), Phospho-Specific	mouse	BD Transduction Lab (#612706)	1:2.000	5% BSA	ü.N.	WB
anti-eNOS III	mouse	BD Transduction Lab (#610297)	1:1.000	5% BSA	1h RT	IF
anti-GPX	rabbit	Millipore (AB 5010)	1:1.000	5% BSA	1h RT	IF
GAPDH (6C5)	mouse	Millipore (MAB374)	1:20.000	5% milk	1h RT	WB
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	rabbit	Cell Signaling (#9211)	1:1.000	5% BSA	ü.N.	WB
total-p38 MAPK	rabbit	Cell Signaling (#9212)	1:1.000	5% BSA	ü.N.	WB

##### 3.1.2 Sekundärantikörper

Name	Spezies	Hersteller	Verdünnung	Diluent	Inkubation	Einsatz
Alexa Fluor 488 Anti-mouse IgG <sub>1</sub>	donkey	Invitrogen (A21202)	1:1.000	1% BSA	1h RT	IF
Alexa Fluor 594 Anti-rabbit IgG (H+L)	donkey	Invitrogen (A21207)	1:1.000	1% BSA	1h RT	IF
Anti-Goat IgG IRDye 800CW	donkey	LI-COR Biosciences	1:500	Diluent (FLISA)	1h RT	FLISA
Anti-Goat IgG, HRP	donkey	Santa cruz (sc-2020)	1:4.000	5% milk	1h RT	WB
ECL Anti-Rabbit IgG, HRP	donkey	GE Healthcare (NA934)	1:10.000	5% milk	1h RT	WB
ECL Anti-Mouse IgG, HRP	sheep	GE Healthcare (NA931)	1:20.000	5% milk	1h RT	WB

### 3.2 Kits und siRNA

Produkt	Hersteller
N-TER Nanoparticle siRNA Transfection System	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
scrambled small interfering GAPDH (5'-GGUUUACAUGUCCAAUUAU[dT][dT]-3')	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
siRNA against LOX-1 (5'-GAAUUUGAAGGCUCUGGAA[dT][dT]-3')	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

### 3.3 Medien, Lösungen, Puffer

Medien, Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
Block-Puffer (FLISA)	PBS 1% (w/v) BSA
Block-Puffer (WB)	Waschpuffer (WB) 5% (w/v) BSA oder Magermilchpulver
Diluent (FLISA)	TBS 0,05% (v/v) Tween-20 0,1% BSA pH 7,4
EBM-Starvationmedium	EBM (Lonza, # CC-3121) 0,5% (v/v) FBS
EGM2-Gefriermedium	EGM2-Vollmedium 10% (v/v) DMSO
EGM2-Transfektionsmedium	EBM-2 (Lonza, # CC-3156) EGM-2 Single Quots (Lonza, # CC-4176) 10% (v/v) FBS kein Gentamicin
EGM2-Vollmedium	EBM-2 (Lonza, # CC-3156) EGM-2 Single Quots (Lonza, # CC-4176) 10% (v/v) FBS
Elektrophoresepuffer	Aqua dest. 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS pH 8,3
Fibronectin Gebrauchslösung	DMEM + Glucose 1 g/l; + L-Glutamin; - L-Pyruvat 1% (w/v) Fibronectin

KBr-Dichtelösung 1,063 g/cm <sup>3</sup>	Aqua dest. 94,26 g/l KBr
KBr-Dichtelösung 1,210 g/cm <sup>3</sup>	Aqua dest. 337,36 g/l KBr
KHB-Chelatorenlösung	Krebs HEPES Puffer 5 µmol/l DETC 25 µmol/l DFO
Lämmli-Puffer (10x)	Aqua dest. 50% (v/v) 1 M Tris (pH 6,8) 20% (v/v) Glycerol 2 g/l Bromphenolblau 200 g/l SDS 10% (v/v) β-Mercapto-Ethanol
LDL-Puffer	Aqua dest. 0,9% (w/v) NaCl 0,05 mM Natrium-EDTA
Lysepuffer (WB)	Aqua. dest 50 mmol/l Tris (pH 7,5) 150 mmol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 0,5% (v/v) IGEPAL CA-630 0,1% (w/v) 1 M DTT 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 0,1 mmol/l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mmol/l NaF 1 mmol/l PMSF
Lysepuffer (eNOS-Entkopplung)	Aqua dest. 50 mmol/l Tris (pH 7,5) 150 mmol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 0,5% (v/v) IGEPAL CA-630 10 µg/ml Aprotinin 10 µg/ml Leupeptin 0,1 mmol/l Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mmol/l NaF 1 mmol/l PMSF
TBS (10x)	Aqua dest. 24 g/l Tris 80 g/l NaCl
Transferpuffer (10x)	Aqua dest. 390 mM Glycin 480 mM Tris 0,037% (w/v) SDS



Transferpuffer (1x)	Aqua dest. 10% (v/v) Transferpuffer (10x) 20% (v/v) Methanol
Waschpuffer (FLISA)	PBS 0,05% (v/v) Tween-20
Waschpuffer (WB)	Aqua dest. 10% (v/v) TBS (10x) 0,1% (v/v) Tween-20

### 3.4 Geräte

Produkt	Hersteller
Anästhesie-System Fluovac - mit IMS Fluosorber	Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA
CO <sub>2</sub> -Inkubator - Serie CB	Binder, Tuttlingen
CCD-Kamera Fusion Fx7	peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Dichtemessgerät Density Meter DMA 500	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
ESR-Spektrometer e-scan	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8100 mit Objektiv PlanApo 40x	Keyence, Ōsaka, Japan Nikon, Tokyo, Japan
mit Objektiv PlanFluor ELWD DM 20xC	Nikon, Tokyo, Japan
Metallblockthermostat BIO-1V	VLM GmbH, Bielefeld
Microplate Reader sunrise-basic	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrozentrifuge PicoFuge II	Stratagene, CA, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell Elektrophorese- System mit PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Odyssey Sa Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Pipettierhilfe Pipetman	Gilson International, Limburg an der Lahn
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettierhilfe Swift PET	Abimed Analysen-Technik, Langenfeld
Quick-Seal Cordless Tube Topper 7700	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Semi-Dry Blotter TE 77 XP	Hoefer, San Francisco, USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Tube Slicer	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Vakuumpumpe EcoVac	schuett-biotech, Göttingen
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach

#### Waagen:

Präzisionswaage PCB 100-3 (0,001g) Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern  
Semi-Mikrowaage R 160P-D1 (0,00001g) Sartorius AG, Göttingen

Wipptisch Rocker PMR-30 Grant Instruments, Cambridgeshire, UK

Wipptisch ST5 Cat Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau

#### Zentrifugen:

Heraeus Fresco 17 Centrifuge Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Heraeus Megafuge 1.0R Heraeus instruments, Osterode

Optima XPN 90 Ultracentrifuge Beckman Coulter, Brea, CA, USA

mit Ultrazentrifugenrotor Type 70.1 Ti

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Aspirationspipette (2 ml)	Sarstedt, Newton, NC, USA
BD Falcon Culture Slides (8 Kammer)	BD Biosciences, Heidelberg
Deckgläser (50x24 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Newton, NC, USA
Falcon-Zentrifugationsröhrchen (50 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Gel saver Tip II (200 µl)	Starlab, Hamburg
Hämatokrit-Versiegelungskitt	VWR International GmbH, Darmstadt
Immobilon-P Transfer-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Microplatte (96-well) Microlon 200 (Med. Bindung, U-Boden)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Microvette CB 300	Sarstedt, Newton, NC, USA
Mikro-Kapillaren	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Mikrotiterplatte Nunc F Maxisorb (96 well, flat bottom)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer "improved" Zählkammer	Biochrom AG, Berlin
Quick Seal Centrifuge Tubes (16x76 mm)	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
serologische Pipette Cellstar (10/ 20 ml)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Spitzen für Multipipette (50/ 100 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
TipOne Filterspitzen (10/ 20/ 100/ 200/ 1000 µl)	Starlab, Hamburg
Ultrafree-Mc Centrifugal Filter Units (0,22 µm) GV durapore	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Whatman-Papier	Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel
Zellkulturflasche (175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Newton, NC, USA

Zellkulturflasche Cellstar (25,75 cm <sup>2</sup> )	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturplatte (12-well)	Greiner-bio.one, Frickenhausen
Zellkulturplatte (6-well)	TPP Switzerland, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	SPL Life sciences, Korea

### 3.6 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Chemikalien, sonstige Reagenzien	Hersteller
2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Acrylamid (30%, Rotiphorese Gel A 30)	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Aprotinin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Aqua dest.	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
BCNU	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Bio-Rad Protein Assay Farbstoff-Konz.	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
BSA	VWR International GmbH, Darmstadt
Captopril	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
CMH	Noxygen, Elzach
DETC	Noxygen, Elzach
DFO	Noxygen, Elzach
DMEM Low Glucose (+ L-Glutamin; - L-Pyruvat)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
DPI	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Eisensulfat (FeSO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Essigsäure	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Ethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
FBS	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Fibronectin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HBSS (- CaCl <sub>2</sub> ; - MgCl <sub>2</sub> )	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
IGEPAL CA-630	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Isofluran	Baxter International, Deerfield, IL, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
KBr	AppliChem, Darmstadt
KHB	Noxygen, Elzach

Kaliumcyanat (KOCN)	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-Arginin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-Cystein	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-Histidin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-Lysin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-NAME	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-Serin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
L-Threonin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Leupeptin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Luminata Forte Western HRP Substrat	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
NaF	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Natrium-EDTA	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Natriumphosphat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ )	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Pageruler Plus Prestained Protein ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS (- $\text{CaCl}_2$ , - $\text{MgCl}_2$ )	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PFA	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
PMSF	Carl Roth, Karlsruhe
RNAse freies $\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
SB202190	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Taurin	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
TEMED	AppliChem, Darmstadt
Trichloressigsäure	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Tris Base	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Trypanblau (0,4%)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trypsin-EDTA (0,05%)	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA
Tween-20	AppliChem, Darmstadt
Vectashield Mounting-Medium mit DAPI	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
$\beta$ -Mercapto-Ethanol	Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA

### 3.7 Analyse- und Statistikprogramme

Alle Auswertungs- und Statistikprogramme wurden unter den Betriebssystemen Microsoft Windows XP respektive Mac OSX 10.6.8 ausgeführt. Dabei dienten *MS Office 2007*, *MS Office mac2011*, *SPSS 20.0* und *Graph Pad Prism 6.0* der statistischen Erhebung und Diagrammerstellung. Zusätzlich wurde zur Bedienung einiger Geräte spezielle Software verwendet, wie beispielsweise das Programm *Fusion* zur Belichtung und Aufnahme von Western Blot-Membranen mit der CCD-Kamera Fusion Fx7, während die integrierte Analysesoftware der anschließenden Densitometrie diente. Die Auswertung des Carbamyl-Lysin-FLISA mit dem Odyssey Sa Infrared Imaging System (Fa. LI-COR Biosciences) erfolgte mit der zugehörigen Software *Image Studio*, während ESR-Spektren mittels Software *Bruker e-scan Research* aufgezeichnet wurden. Weiterhin wurde die *BioZero Observation Application* zur Anfertigung von Bildern mittels Fluoreszenzmikroskop Biozero BZ-8100 (Fa. Keyence) benutzt und die Daten-Analyse-Software *Magellan 6.0* zur Konzentrationsbestimmung mit dem Microplate Reader sunrise-basic (Fa. Tecan).

## 4. Methoden

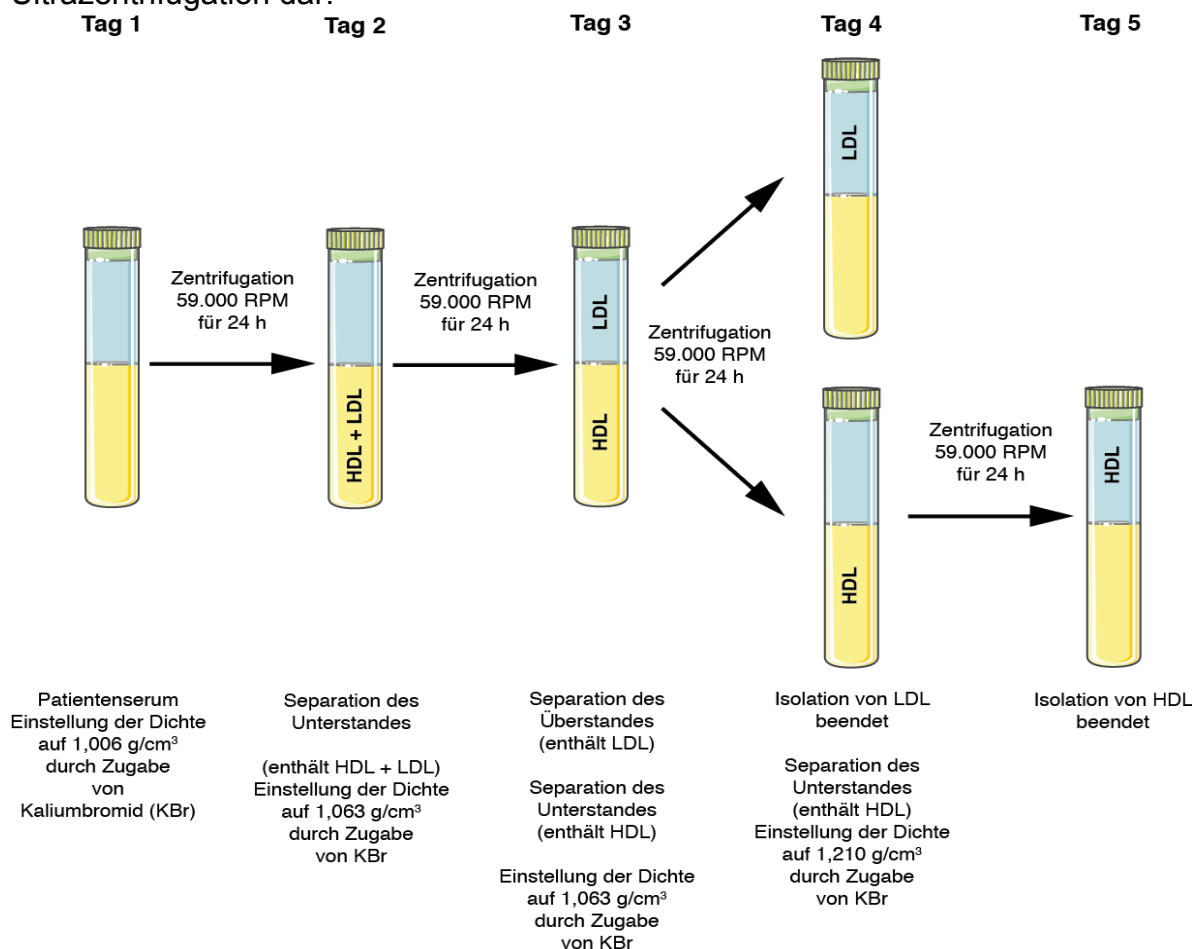
### 4.1 LDL-Isolation, -Analyse und -Modifikation

#### 4.1.1 LDL-Isolation mittels Ultrazentrifugation

Die Isolation von LDL aus dem Serum von Patienten und gesunden Probanden erfolgte mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation, wie zuvor durch Havel RJ *et al.* beschrieben [46]. Bei dieser Technik macht man sich zu Nutze, dass die LDL-Fraktion der Lipoproteine eine Dichte zwischen  $1,019 \text{ g/cm}^3$  und  $1,062 \text{ g/cm}^3$  aufweist, während die Dichte der HDL-Fraktion zwischen  $1,063 \text{ g/cm}^3$  und  $1,210 \text{ g/cm}^3$  liegt.

##### 4.1.1.1 Langzeitprotokoll

Jegliches, zur weiteren *ex vivo*-Carbamylierung benötigte LDL gesunder Probanden wurde mittels eines viertägigen Langzeitprotokolls isoliert, welches ebenso die Möglichkeit bietet, in einem zusätzlichen Arbeitstag HDL zu isolieren. Folgende Abbildung stellt den Prozess der LDL-/ HDL-Isolation aus Serum mittels Ultrazentrifugation dar:



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der LDL- / HDL-Isolation mittels Ultrazentrifugation.

## Tag 1

Zunächst wurde zu 5 ml des verwendeten Patienten-Serums 8,5 ml einer KBr Lösung mit einer Dichte von  $1,006 \text{ g/cm}^3$  gegeben. Das Serum mit der Dichtelösung wurde dann mittels Spritze und Kanüle in die Zentrifugationsröhrchen (Quick Seal Centrifuge Tube) verfüllt. Anschließend wurden die Zentrifugationsröhrchen abgewogen und zum Austarieren der Ultrazentrifuge gewichtsgleiche Paare mit maximaler Differenz von 0,02 g gebildet. Zuletzt wurden die Röhrchen mit dem Quick-Seal Cordless Tube Topper 7700 (Fa. Beckman Coulter) verschweißt und nach Dichtigkeitsprüfung mind. 20 h bei 59.000 RPM und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  ultrazentrifugiert.

## Tag 2

Nach Zentrifugation befanden sich nun im Unterstand die Lipoproteine HDL und LDL, während sich die Chylomikronen und VLDL (Dichte  $< 1,006 \text{ g/cm}^3$ ) im Überstand befanden. Nach Schneiden der Röhrchen mit dem Tube Slicer (Fa. Beckman Coulter) wurde der Überstand verworfen und der Unterstand (HDL + LDL) weiterverwendet. Dazu erfolgte zunächst die Messung der Dichte im Unterstand mittels eines Dichtemessgerätes (Fa. Anton Paar). Nach Messung der Dichte wurde mit folgender Formel berechnet, wie viel KBr zugegeben werden musste, um eine Zieldichte von  $1,063 \text{ g/cm}^3$  zu erzielen.

$$\text{Berechnung der benötigten KBr-Menge [g]: } \frac{\text{Volumen} * (\text{Zieldichte} - \text{Messdichte})}{1 - (0,312 * \text{Zieldichte})}$$

Nach Zugabe der berechneten Menge KBr zu dem Unterstand erfolgte dessen Suspension mittels Magnetrührer. Nach Lösung des KBr wurde die entstandene Suspension zusammen mit Dichtelösung (Dichte  $1,063 \text{ g/cm}^3$ ) in die Zentrifugationsröhrchen überführt, diese gewogen und verschlossen. Es schloss sich danach ein weiterer Zentrifugationsschritt für mind. 20 h bei 59.000 RPM und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  an.

## Tag 3

Nach Zentrifugation befanden sich nun im Überstand die LDL-Fraktion (Dichte:  $1,019$  bis  $1,062 \text{ g/cm}^3$ ) und im Unterstand die HDL-Fraktion. Während die HDL-Fraktion verworfen wurde, wurde im Überstand – wie bereits beschrieben – mittels KBr und einer entsprechenden Dichtelösung erneut eine Zieldichte von  $1,063 \text{ g/cm}^3$  eingestellt, um Kontaminationen mit HDL zu entfernen. Die Berechnung der benötigten KBr-Menge erfolgte nach Dichtemessung unter Verwendung der obigen

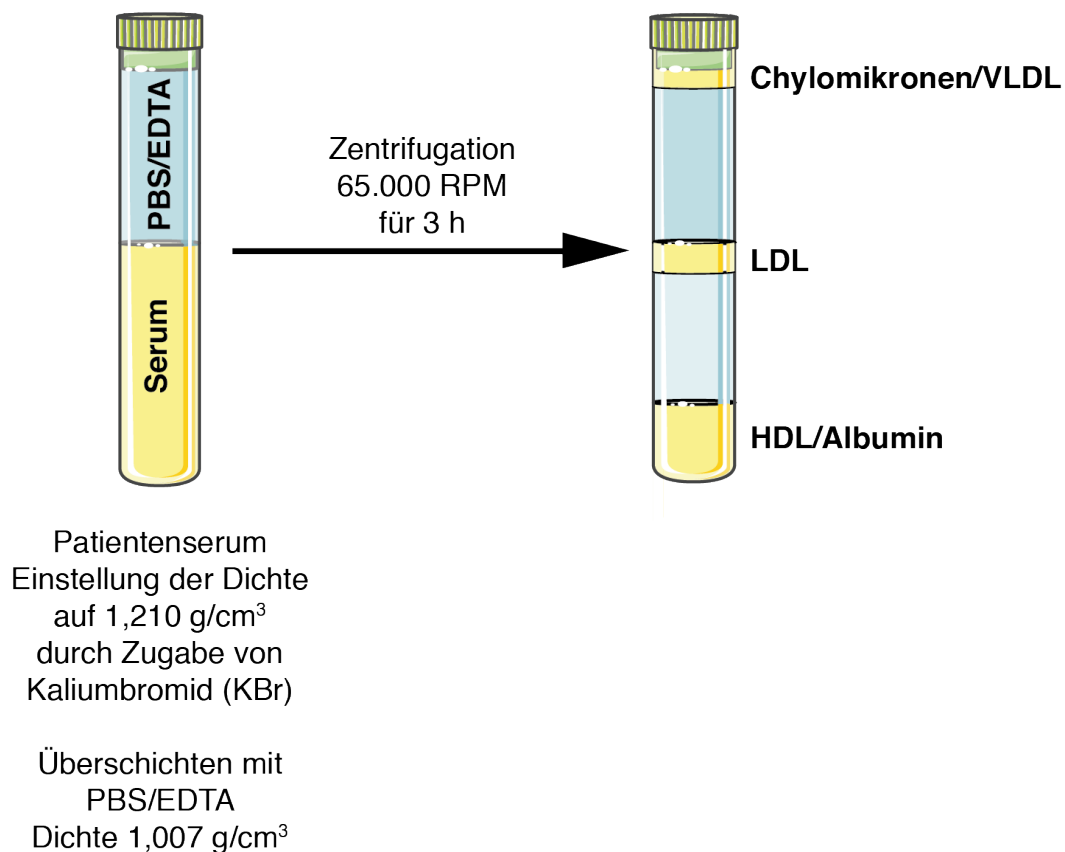
Formel. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt für 24 h bei 59.000 RPM und 4 °C an.

#### Tag 4

Nach erfolgter Zentrifugation befand sich die LDL-Fraktion erneut im Überstand. Dieser wurde separiert und nach Verwerfen des restlichen Röhrcheninhalts konzentriert und sterilfiltriert (siehe 4.1.2).

#### 4.1.1.2 Kurzzeitprotokoll

Die Isolation von LDL zur Datenerhebung für die klinische Studie an Prä-Dialyse-Patienten konnte aufgrund der größeren Probandenzahl nur mittels eines Kurzzeitprotokolls zügig verwirklicht werden, da hier im Gegensatz zum Langzeitprotokoll LDL innerhalb eines einzigen Tages isoliert werden konnte. Neben Analogien im allgemeinen Ablauf, waren die weiteren Konzentrations- und Sterilfiltrationsverfahren in beiden Protokollen identisch (siehe 4.1.2).



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung des Kurzzeitprotokolls zur LDL-Isolation mittels Ultrazentrifugation.

Zur Probenvorbereitung und -auftrennung wurden zunächst zu 500 µl des zu verwendenden Serums nüchternen Probanden 3,3 ml einer KBr-Lösung mit einer

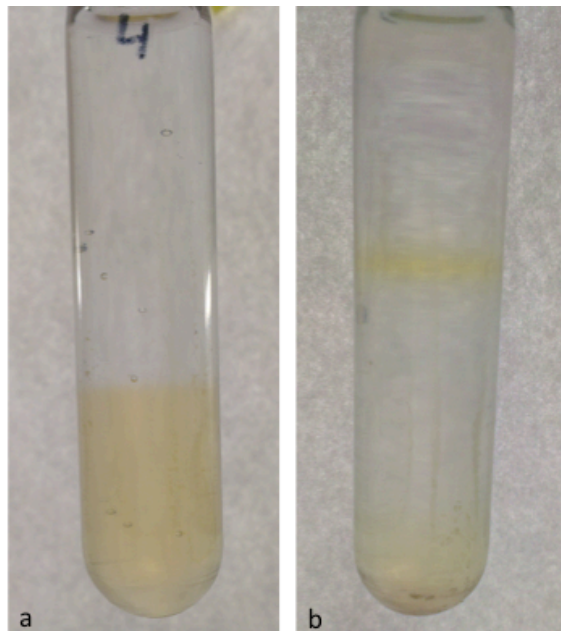


Dichte von  $1,21 \text{ g/cm}^3$  gegeben. Serum und Dichtelösung wurden resuspendiert und die Dichte der Suspension gemessen. Anschließend wurde mit folgender Formel berechnet, wie viel KBr zugegeben werden musste, um eine Zieldichte von  $1,21 \text{ g/cm}^3$  zu erzielen.

$$\text{Berechnung der benötigten KBr-Menge [g]: } \frac{\text{Volumen} * (\text{Zieldichte} - \text{Messdichte})}{1 - (0,312 * \text{Zieldichte})}$$

Die Serum-KBr Suspension wurde dann mittels Spritze und Kanüle in die Zentrifugationsröhrchen (Quick Seal Centrifuge Tube) verfüllt und vorsichtig mit 1 mM EDTA in PBS (Dichte  $1,007 \text{ g/cm}^3$ ) luftblasenfrei überschichtet, sodass eine Trennschicht sichtbar wurde (Abbildung 9a). Anschließend wurden die Zentrifugationsröhrchen abgewogen und zum Austarieren der Ultrazentrifuge gewichtsgleiche Paare mit maximaler Differenz von 0,02 g gebildet. Zuletzt wurden die Röhrchen mit dem Quick-Seal Cordless Tube Topper 7700 verschweißt und nach Dichtigkeitsprüfung mind. 3 h bei 65.000 RPM und  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  ultrazentrifugiert.

Nach Zentrifugation befanden sich die Chylomikronen und VLDL (Dichte  $< 1,006 \text{ g/cm}^3$ ) als weiße Schicht am oberen Ende des Röhrchen, während sich HDL zusammen mit KBr am Boden des Röhrchens abgesetzt hatten und die LDL-Fraktion als gelbe Schicht einem Nimbus gleich in der oberen Hälfte sichtbar war (Abbildung 9b). Nach Öffnen der Röhrchen mittels Rasierklinge wurde die gelbe LDL-Schicht mit Hilfe einer Kanüle sorgfältig aufgenommen der restliche Röhrchen-Inhalt verworfen.



**Abbildung 9:** **a** Quick-Seal Zentrifugationsröhrchen mit Blutplasma-KBr-Suspension (untere Hälfte) und scharfer Trennschicht nach Überschichtung mit 1 mM EDTA in PBS (Dichte  $1,007 \text{ g/cm}^3$ ) **b** nach Zentrifugation klare Trennung der Lipoprotein-Fractionen, LDL mittig als gelblicher Ring sichtbar

#### **4.1.2 LDL-Konzentration und -Sterilfiltration**

Unabhängig von der Art des verwendeten Protokolls zur Isolation wurde die entnommene LDL-Fraktion abschließend in Filter-Zentrifugationsröhrchen (Amicon Ultra 4 ml Centrifuge Filter Units, 30K, Fa. Millipore) zum Entfernen des verbliebenen KBr überführt. Die Filtergefäße wurden mit LDL-Puffer (Rezept siehe 3.3) aufgefüllt und 10 min bei 4.000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Im nächsten Schritt wurde das im Filter verbleibende LDL resuspendiert und in Mikroreaktionsgefäße mit einem integrierten 0,22 µm großen Filter (Ultrafree-Mc Centrifugal Filter Units (0,22 µm), Fa. Millipore) pipettiert und zur Sterilisation 10 min bei 3.000 RPM und 4 °C zentrifugiert. Der Filter wurde verworfen und das Zentrifugat als Endprodukt behalten.

#### **4.1.3 LDL-Konzentrationsbestimmung**

Zuletzt wurden die Proteinkonzentrationen der fertigen Proben nach dem Bradford-Assay bestimmt (siehe 4.6.2), wobei eine Standardreihe von 0-20 µg/µl BSA eingesetzt wurde. Danach wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die im Weiteren beschriebenen Assays wurde die LDL-Präparation binnen 14 Tagen nach Isolation verwendet, um eine Degradierung zu vermeiden.

#### **4.1.4 LDL-Carbamylierung *ex vivo***

Das zuvor aus dem Serum gesunder Spender isolierte LDL (siehe 4.1.1) wurde im nächsten Schritt *ex vivo* carbamylt, gemäß eines Protokolls von Wang *et al.* [40].

Hierzu wurde das LDL in einem Puffer aus 50 µmol/l Natriumphosphat bei pH 7,0 auf eine Konzentration von 3 mg/ml LDL-Protein verdünnt und anschließend mit 20 mg Kaliumcyanat pro mg LDL für 4 h bei 37 °C inkubiert. In mind. fünf Waschschritten unter Verwendung der Filter-Zentrifugationsröhrchen (Amicon Ultra 4 ml Centrifuge Filter Units, 30K, Fa. Millipore) wurde das Kaliumcyanat danach wieder aus den LDL-Proben entfernt und die Proteinkonzentration erneut gemäß Bradford-Methode bestimmt (siehe 4.6.2). Das als Kontrolle zu verwendende nLDL wurde ebenso behandelt, nur wurde hierbei auf die Zugabe von Kaliumcyanat verzichtet.

Für ein weiteres Experiment wurden LDL-Proben in Gegenwart von je 10 mM des L-Enantiomers der Aminosäuren Arginin, Cystein, Histidin, Lysin, Serin, Threonin oder Taurin (Fa. Sigma Aldrich) carbamylt [47].

#### **4.1.5 TBARS-Assay**

Zur Bestimmung des Grades an LDL-Lipidperoxidation nach *ex vivo*-Carbamylierung (siehe 4.1.4) wurde ein TBARS-Assay durchgeführt, wie zuvor durch Esterbauer *et al.* beschrieben [48]. Der Assay erlaubt dabei eine Aussage über das Ausmaß der unter Stimulation der Proben mit Thiobarbitursäure infolge oxidativen Stresses gebildeten reaktiven Substanzen (TBARS) und kann daher insbesondere zum Ausschluss von LDL-Lipidperoxidation eingesetzt werden.

Zunächst wurden je 50 µl der Proben mit 200 µl eiskalter 10% (w/v) Trichloressigsäure zur Proteinpräzipitation für 15 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (2.200 g, 4 °C, 15 min) wurden 200 µl des Überstands in einem neuen Mikroreaktionsgefäß mit 200 µl 0,67% (w/v) Thiobarbitursäure (in 10% (v/v) DMSO ad Aqua dest.) versetzt. Ebenso wurden je 200 µl der seriell verdünnten, achtstufigen Standardreihe aus 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (0-100 µM, in 2% (v/v) Ethanol ad Aqua dest.) mit 200 µl Thiobarbitursäure versetzt und Proben und Standard im Heizblock bis zum Farbumschlag für ca. 20 min bei 70 °C gekocht. Anschließend wurden je 150 µl von Probe bzw. Standard in Kavitäten einer nicht-absorbierenden 96-Well Mikrotiterplatte in Duplikaten pipettiert und die Absorptionsmessung mittels photometrischem Plattenreader bei einer Wellenlänge von 532 nm durchgeführt. Die Konzentration von TBARS wurde anhand der Standardkurve bestimmt und auf die Proteinkonzentration der Proben (siehe 4.1.3) normalisiert.

#### **4.1.6 UHPLC-Aminosäureanalyse**

Um das Ausmaß der LDL-Carbamylierung zu bestimmen, wurde eine Aminosäureanalyse mittels Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) durchgeführt, einem analytischen Trennverfahren, mit dessen Hilfe die einzelnen Bestandteile eines flüssigen Stoffgemischs durch Vergleiche mit Standards identifiziert und auch quantifiziert werden können.

Diese Analysen wurden als Auftragsleistung durch das *Functional Genomics Center* der Universität Zürich/Schweiz unter Verwendung des „AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit“ (Fa. Waters Corporation) und eines Accquity UPLC Systems (Fa. Waters Corporation) durchgeführt und mit der Software *Empower* (Fa. Waters Corporation) ausgewertet. N6-Carbamoyl-DL-Lysin (Fa. Sigma Aldrich) diente dabei als interner Standard.

## 4.2 HAEC-Zellkultur

Für zellkulturbasierte *in vitro*-Versuche wurden humane aortale Endothelzellen (Human Aortic Endothelial Cells (HAEC)) der Firma PromoCell verwendet.

### Auftauen und Kultivieren

Die bei -80 °C in Aliquots à 1,5 Millionen Zellen (Passage 3) in 1 ml EGM2-Gefriermedium gelagerten Zellsuspensionen wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und im Anschluss in eine mit Fibronectin beschichtete T75-Zellkulturflasche gegeben. Die Kultur der Zellen erfolgte in Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil der Luft bei 37 °C in EGM2-Vollmedium. Um DMSO-Reste des EGM2-Gefriermediums zu entfernen, wurde nach spätestens 24 Stunden das Medium gewechselt. Weitere Medienwechsel erfolgten alle zwei Tage unter sterilen Kautelen.

### Passagieren

Die Zellen wuchsen bis zur Ausbildung eines subkonfluenten Zellrasens (ca. 80% Konfluenz). Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x HBSS gewaschen und nach Zugabe von 4 ml (T75) respektive 8 ml (T175) 0,05% Trypsin-EDTA für 5 min bei 37 °C inkubiert. Zur Neutralisation des Trypsins wurden die so abgelösten Zellen anschließend mit einem äquivalenten Volumen an EGM2-Vollmedium versetzt und die Zellsuspension bei 1.200 RPM und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in vorgewärmtem EGM2-Vollmedium resuspendiert und die Zellen in entsprechenden Zellkulturgefäßen neu ausgesät. Um eine adäquate Adhäsion endothelialer Zellen zu gewährleisten, wurden alle verwendeten Zellkulturgefäße vor der Zellaussaat für mind. 15 min im Inkubator bei 37 °C mit DMEM-Fibronectin beschichtet. Für alle Experimente wurden Zellen der Passagen P4-P6 benutzt.

### Zellzählung

Um bei den nachfolgenden Experimenten eine gleiche Zellzahl zu erreichen, erfolgte während des Passagierens eine Zellzählung. Hierzu wurden direkt vor dem Zentrifugationsschritt 10 µl der Zellsuspension entnommen, mit 10 µl Trypanblau versetzt und in eine Zählkammer (Neubauer improved) pipettiert. Nun wurden vier große Eckquadrate mit je 0,1 µl Volumen ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl ergab sich als Produkt aus Mittelwert, Verdünnungs-faktor (2), Kammerfaktor (10<sup>4</sup>) und Volumen der Zellsuspension.

## Starvation

Um für die nachfolgenden Versuche alle Zellen in derselben Zellzyklusphase zu synchronisieren und damit ein gleichmäßiges Ansprechen auf spezifische Stimulation zu gewährleisten, wurde das Medium der bereits auf Zellkulturplatten ausgesäten Zellen am Vortag der entsprechenden Versuche auf ein nährstoffarmes EBM-Starvationmedium umgestellt und die Zellkulturplatten anschließend für 24 h bei 37 °C weiter inkubiert.

### 4.3 Small interfering RNA-Transfektion

Um die Rolle des endothelialen Rezeptors LOX-1 für die zellulären Effekte von cLDL zu verifizieren, wurden Experimente an HAEC durchgeführt, bei welchen die LOX-1 Expression durch RNA-Interferenz herunterreguliert wurde [49]. Hierzu erfolgte eine Transfektion der HAEC mit an Nanopartikel gebundener small interfering RNA (siRNA).

Wie bereits von Shi *et al.* beschrieben [50], wurde gegen den LOX-1-Rezeptor gerichtete siRNA und Scrambled siRNA gegen GAPDH (Fa. Sigma Aldrich, siehe 3.2) mit Hilfe des Peptid-basierten „N-TER Nanoparticle siRNA Transfection System“ (Fa. Sigma Aldrich) in HAEC transfiziert. Dazu wurde die siRNA (10 nmol) zunächst unter ständiger Kühlung auf Eis durch Zugabe von 2 ml eiskaltem RNase freiem H<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 5 µM verdünnt, 10 s gevortext und anschließend impulszentrifugiert (14.000 RPM, 4 °C). In dieser Form bleibt die siRNA bei -20 °C gekühlt ausreichend stabil zur Lagerung. Anschließend mussten die zur Transfektion notwendigen Nanopartikel generiert werden. Diese bilden sich durch nicht-kovalente Bindung der siRNA an die N-TER Peptide des Transfektions-Systems in einer wässrigen Lösung, der sog. Nanoparticle Formation Solution (NFS), welche nach Berechnung der benötigten Gesamtmenge ( $NFS_{total}$ ) äquivalent aus siRNA-Lösung (A) und N-TER Peptid-Lösung (B), in einer Zusammensetzung gemäß Tabelle 1, hergestellt wurde:

	siRNA-Lösung (A)	N-TER Peptid-Lösung (B)	NFS-Negativkontrolle (C)
5 µM siRNA	0,13 x NFS <sub>total</sub>	–	–
N-TER Peptid	–	0,08 x NFS <sub>total</sub>	–
siRNA Diluent	0,37 x NFS <sub>total</sub>	–	0,5 x NFS <sub>Neg</sub>
H <sub>2</sub> O	–	0,42 x NFS <sub>total</sub>	0,5 x NFS <sub>Neg</sub>
Gesamtvolumenanteil	0,5 x NFS <sub>total</sub>	0,5 x NFS <sub>total</sub>	1,00 x NFS <sub>Neg</sub>

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der 650 nM Nanoparticle Formation Solution (A+B) und NFS-Negativkontrolle (C)

Nach dem getrennten Pipettieren beider Lösungen wurden diese anschließend zum Reaktionsstart zusammengegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die daraus resultierende NFS-Gebrauchslösung wies eine Endkonzentration von 650 nM auf.

Ohne vorherige Starvation erfolgte schließlich die Transfektion von bereits am Vortag auf mit Fibronectin beschichteten 6-Well Platten ausgesäten HAEC (n=75.000/well, siehe 4.2). Hierbei wurde jede Kavität nach Absaugen des Mediums gemäß der angestrebten Endkonzentration von 10 nM mit je 15 µl der 650 nM NFS-Gebrauchslösung ad 1 ml serum- und antibiotikafreiem EGM2-Transfektionsmedium für 4 h transfiziert. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde neben der Scrambled siRNA gegen GAPDH bei einigen Kavitäten anstelle der NFS-Gebrauchslösung eine Lösung ohne siRNA und N-TER Peptide (Lösung C, siehe Tabelle 1) ad 1 ml EGM2-Transfektionsmedium pipettiert. Danach wurde das Medium für weitere 24 h auf EGM2-Vollmedium gewechselt, bevor weitere Versuche an den HAEC erfolgten.

## 4.4 Tierversuche an C57BL/6J-Mäusen

### 4.4.1 Verwendete Mausstämme

Für Tierversuche wurden C57BL/6J-Wildtypmäuse (WT) von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) sowie korrespondierende transgene C57BL/6J-Mäuse mit *Lox1*-Überexpression in Endothelzellen (*Lox1/Tg*) im Rahmen einer Kollaboration mit Dr. Alexander Akhmedov (Institut für Physiologie, Universität Zürich, Schweiz) bezogen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen und Berücksichtigung entsprechender Richtlinien gehalten und im Alter von 10-12 Wochen für die Experimente euthanasiert. Eine entsprechende Genehmigung zur Durchführung der Tierexperimente lag vor.

#### **4.4.2 Überexpression von *Lox1***

In den *Lox1/Tg*-Mäusen war zur endothelialen *Lox1*-Überexpression der murine Tyrosinkinase-Rezeptor Tie2-Promotor benutzt worden. Die *Lox1*-Genexpression in Endothelzellen wurde durch das Einbringen der Kodiersequenz für das murine *Lox1*-Gen in den Expressionsvektor pSP14/15 erzielt, welcher den murinen 2 kb Tie2-Promotor zusammen mit dem 10 kb Tie2-Enhancer enthält, der wiederum aus dem Intron 1 des endogenen, murinen Tie2-Gen stammt. Der verwendete Mausstamm wurde im Detail durch Akhmedov *et al.* beschrieben [51].

#### **4.4.3 nLDL-/cLDL-Stimulation *in vivo***

Einem Teil der C57BL/6J-Mäuse wurde 24 Stunden vor der Organentnahme für ROS-Messungen mittels ESR-Spektroskopie (siehe 4.5.1) nLDL oder cLDL (je 15 mg/kg Körpergewicht) in einem Volumen von 150 µl PBS in die Schwanzvene injiziert. Um einen spontanen Tod des Tieres durch Fettembolie zu vermeiden, wurde auf eine sehr langsame und gleichmäßige Injektion geachtet. Das Tier war während der gesamten Prozedur unter konstanter volatiler Allgemeinnarkose mittels Isofluran (Fa. Baxter) und in einem Restraîner immobilisiert.

#### **4.4.4 Blut- und Organentnahme**

Zur Entnahme der Aorta abdominalis wurden die Mäuse erneut durch Isofluran-Inhalation anästhesiert und dann durch zervikale Dislokation euthanasiert. Zusätzlich wurde Blut für die ROS-Messungen aus dem Herzen entnommen. Dazu wurde nach Fixierung der Mäuse, auf dem Rücken liegend, zunächst der Bauch der Tiere mit 70% Ethanol desinfiziert. Durch Eröffnen des Epigastriums und Durchtrennung des Diaphragmas von kaudal konnte ein Zugang zum Herzen geschaffen werden, aus welchem mittels einer 23G Nadel ca. 100 µl Blut aspiriert wurde. Dieses wurde direkt in eine mit Lithium-Heparin beschichtete Microvette (CB 300, Fa. Sarstedt) auf Eis transferiert und umgehend nach Organextraktion zur ROS-Messung mittels ESR verwendet (siehe 4.5.1.3).

Anschließend wurde der epigastrische Schnitt zur kompletten medialen Eröffnung des Abdomens erweitert, die Aorta abdominalis unter Mobilisation des Darmkonvoluts aufgesucht und unter stumpfer Präparation freigelegt. Ein ca. 10 mm langes Segment der murinen Aorta abdominalis wurde entnommen und in einer mit eiskaltem PBS gefüllten Petrischale auf einer elektronischen Kühlplatte bei 2 °C und

unter dem Lichtmikroskop vom anhaftenden Binde- und Fettgewebe stumpf freipräpariert. Nach erfolgter Präparation wurde das blanke Aortensegment umgehend zur ESR-Spektroskopie eingesetzt (siehe 4.5.1.2).

Im Gegensatz dazu wurden die Aortenringe der bereits am Vortag *in vivo* mit nLDL respektive cLDL injizierten Mäuse (siehe 4.4.3) in einem Mikroreaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und darin bis zur ROS-Messung mittels ESR-Spektroskopie (siehe 4.5.1.2) kurzfristig gelagert.

#### **4.4.5 nLDL-/cLDL-Stimulation *ex vivo***

Zudem erfolgte die Entnahme von Aortenringen zur *ex vivo* Inkubation mit je 100 µg/ml nLDL respektive cLDL für 1 h bei 37 °C in KHB-Chelatorenlösung (Rezept siehe 3.3) und nachfolgender ESR-Spektroskopie.

### **4.5 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie**

Die Elektronenspinresonanz-(ESR-)Spektroskopie bezeichnet eine Technik zur Erfassung ungepaarter Elektronen in einer Probe aufgrund deren charakteristischem Absorptionsverhalten bei Anregung mit Mikrowellenstrahlung in einem äußeren Magnetfeld, in Analogie zur Wirkungsweise der Kernspintomographie. Möglich ist dies dank des Eigendrehimpulses (Spin) ungepaarter Elektronen, welcher diesen ein magnetisches Moment verleiht. Die ESR-Spektroskopie bietet somit eine Möglichkeit, prinzipiell alle chemischen Verbindungen mit ungepaarten Elektronen anhand charakteristischer Absorptionsspektren zu erfassen und zu unterscheiden. Ungepaarte Elektronen sind als freie Radikale aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit jedoch nicht direkt erfassbar und müssen durch Reaktion mit oder Kopplung an sog. „spin traps“ oder „spin probes“ und konsekutiver Bildung stabilerer Addukte mit längerer Halbwertszeit detektierbar gemacht werden. Die Addukte selbst weisen dabei je nach gebundenem Radikal spezifische Signalmuster auf, welche eine eindeutige Identifikation erlauben [52,53].

#### **4.5.1 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)**

Als Vertreter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und demnach Maß für zellulären oxidativen Stress wurde mittels Elektronenspinresonanz- (ESR-) Spektroskopie die Produktion von Hyperoxid-Anionen ( $O_2^{\cdot-}$ ; alte Bezeichnung „Superoxid-Anionen“) in murinen Aortenringen, murinem Vollblut und humanen aortalen Endothelzellen



(HAEC) nach Stimulation mit nLDL und cLDL quantifiziert. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Aminosäuren, des p38-MAPK-Inhibitors SB202190 sowie von DPI und Captopril als Hemmstoffe der NADPH-Oxidase auf die Produktion von ROS untersucht.

Alle ESR-spektroskopischen Messungen erfolgten in Krebs-HEPES-Puffer (KHB, Fa. Noxygen). Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde unmittelbar vor jedem Versuch durch Zugabe von 5 µM Diethyldithiocarbaminsäure (DETC, Fa. Noxygen) und 25 µM Deferoxamin (DFO, Fa. Noxygen) die KHB-Chelatorenlösung hergestellt.

#### **4.5.1.1 ROS-Bestimmung in HAEC**

Humane aortale Endothelzellen (HAEC) wurden auf mit Fibronectin beschichtete 6-Well Platten ausgesät (n=100.000/well) und in EGM2-Vollmedium kultiviert. Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen für 24 h auf EBM-Starvationmedium umgestellt und am Folgetag für Versuche genutzt.

Eine Stunde vor der Messung wurden die HAEC mit nLDL oder cLDL (je 100 µg/ml) stimuliert. Wenn angegeben, erfolgte eine Vor-Inkubation für je 30 min mit Captopril (10 µM), DPI (5 µM) oder SB202190 (5 µM) bzw. eine Stimulation in Anwesenheit von L-Arginin, L-Cystein, L-Histidin, L-Lysin, L-Serin, L-Threonin oder Taurin (je 100 µg/ml). Nach Stimulation wurden die Zellen bei 5% CO<sub>2</sub> und 37 °C für 1 h inkubiert.

Zur Probenvorbereitung wurden alle Zellen einer 6-Well Platte nach Absaugen des Mediums mit 1x HBSS gewaschen und mit 700 µl 0,05% Trypsin-EDTA pro Kavität für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abstoppen der enzymatischen Reaktion mit je 700 µl EGM2-Vollmedium auf Eis wurden die Zellsuspensionen aller Kavitäten in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei 1.400 RPM und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 48,5 µl der KHB-Chelatorenlösung (5 µM DETC + 25 µM DFO in KHB, pH 7,4) resuspendiert. Unmittelbar vor der Messung (siehe 4.5.1.4) erfolgte die Zugabe von 1,5 µl 1-Hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine (CMH, 500 µM in KHB-Chelatorenlösung, Fa. Noxygen) als sog. „spin probe“.

#### **4.5.1.2 ROS-Bestimmung in murinen Aortenringen**

Sowohl die gefrorenen, als auch die frisch explantierten Aorten wurden nach stumpfer Freipräparation zunächst zu ca. 2 mm kleinen Ringen zugeschnitten und in je 400 µl der KHB-Chelatorenlösung (Rezept siehe 3.3) auf Kavitäten einer 6-Well Platte auf Eis verteilt. Um Eisen-Kontaminationen des Gewebes durch das Präparationsbesteck zu entfernen, wurde das Medium anschließend zweimal abgesaugt und erneuert. Sofern noch nicht *in vivo* erfolgt, wurden die Aortensegmente nun *ex vivo* mit nLDL respektive cLDL für 1 h bei 37 °C stimuliert (siehe 4.4.5). Danach wurde allen Proben je 12 µl CMH (500 µM in KBH-Chelatorenlösung) als „spin probe“ zugegeben und diese der Messung zugeführt (siehe 4.5.1.4).

#### **4.5.1.3 ROS-Bestimmung in murinem Vollblut**

Neben der ROS-Bestimmung in HAEC und Aortenringen wurden reaktive Sauerstoffspezies in murinem Vollblut ESR-spektroskopisch quantifiziert. Dazu wurden 48,5 µl des direkt aus dem Herzen in eine mit Lithium-Heparin beschichtete Microvette aspirierten Vollblutes (siehe 4.4.4) unmittelbar nach dessen Gewinnung auf Eis mit 1,5 µl der „spin probe“ CMH (500 µM in KBH-Chelatorenlösung) versetzt und ohne weitere Verzögerung mittels ESR-Spektroskopie gemessen.

#### **4.5.1.4 Messung**

Direkt nach Zugabe der „spin probe“ wurde die gesamte Flüssigkeit in einer Mikro-Kapillare blasenfrei aspiriert, die Kapillare am unteren Ende mit Hämatokrit-Versiegelungskitt verschlossen und zur Messung in das ESR-Spektrometer e-scan (Fa. Bruker BioSpin) überführt. Die ESR-Spektren wurden anschließend mit der Software *Bruker e-scan Research* bei Anregung mit einer Mikrowellenleistung von 18,11 mW und einer Modulationsamplitude von 2,3 G aufgezeichnet, mit folgender Feineinstellung des Magnetfelds: center field 3484,5 G, sweep time 5,24 s, field sweep 16 G. Jede Probe wurde in fünf Durchläufen gemessen, nachdem zuvor bereits mit 48,5 µl KHB-Chelatorenlösung + 1,5 µl CMH (500 µM in KHB-Chelatorenlösung) eine Messung zur Hintergrundberechnung durchgeführt worden war. Die Ergebnisse wurden abschließend auf die Zellzahl bzw. das Trockengewicht der Aortenringe normalisiert.

## **4.5.2 Detektion von Stickstoffmonoxid (NO)**

Neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde auch die endotheliale Produktion von NO mittels ESR-Spektroskopie in HAEC nach Stimulation mit nLDL und cLDL gemessen. Als Negativkontrolle wurden HAEC mit dem eNOS-Inhibitor-Vorläufer L-NAME (0,3 mM) inkubiert.

### **4.5.2.1 NO-Bestimmung in HAEC**

Humane aortale Endothelzellen (HAEC) wurden auf mit Fibronectin beschichteten 6-Well Platten ausgesät ( $n=100.000/\text{well}$ ) und in EGM2-Vollmedium kultiviert. Bei Erreichen von 80% Konfluenz wurden die Zellen für 24 h auf EBM-Starvationmedium umgestellt und am Folgetag für Versuche genutzt. Eine Stunde vor der Messung wurden HAEC wahlweise mit nLDL oder cLDL (je 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) stimuliert und für 1 h in einer feuchten Atmosphäre mit 5%  $\text{CO}_2$ -Anteil der Luft bei 37 °C inkubiert.

### **Vorbereitung der Pufferlösung und Spin-Trap**

Ebenso wie die ROS-Messungen erfolgten die NO-Messungen mittels ESR-Spektroskopie in Krebs-HEPES-Puffer (KHB) bei pH 7,4. Parallel wurden eine  $\text{FeSO}_4$ - (4,5 mg/10 ml) sowie eine DETC-Lösung (7,2 mg/10 ml) in 0,9 % NaCl hergestellt. Um Sauerstoff zu entfernen, mussten sowohl die  $\text{FeSO}_4$ - als auch DETC-Lösung für mindestens 20 min auf Eis mit Stickstoff entgast werden, bevor man diese zur Bildung von kolloidalem  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  als Spin-Trap zusammen pipettieren konnte [54-57].

### **Probenvorbereitung**

Alle Kavitäten der 6-Well Platten wurden zunächst, nach Absaugen des Mediums, zweimalig mit je 2 ml auf 37 °C vorgewärmten KHB gewaschen. Dann wurden je 1000  $\mu\text{l}$  der entgasten  $\text{FeSO}_4$ - und DETC-Lösung in einem Mikroreaktionsgefäß zusammengegeben, um kolloidales  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  zu bilden. Nach Vorlage von je 900  $\mu\text{l}$  KHB pro Kavität der Zellkulturplatte, wurde je 300  $\mu\text{l}$   $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  vorsichtig zugegeben und durch behutsames Schwenken der Platte vermischt. Nach Inkubation für eine Stunde im Inkubator bei 37 °C wurden die Zellen auf Eis platziert und mittels Zellschaber mechanisch von der 6-Well Platte abgelöst.

Da die Messung der ESR-Spektren in flüssigem Stickstoff erfolgte, wurde zunächst ein die zu messenden Proben enthaltender Gefrierzylinder hergestellt. Hierzu wurden

je 250 µl KHB in einer 1 ml Spritze luftblasenfrei aufgezogen und die gesamte Spritze in Flüssigstickstoff gefroren. Nach leichtem, erneutem Aufwärmen der schockgefrorenen Spritze in der Hand wurde der noch gefrorene KHB-Zylinder mit dem Kolben zurückgezogen und 100 µl der zuvor abgelösten, mit Fe(DETC)<sub>2</sub> inkubierten Zellen darüber geschichtet. Nach einem zweiten Schockfrost-Vorgang in Flüssigstickstoff erfolgte eine weitere Zugabe von 250 µl KHB. Nach drittmaligem Gefrieren in flüssigem Stickstoff wurde der Zylinder aus der Spritze gedrückt und in einem Kryotube bis zur Messung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### **4.5.2.2 Messung und Normalisierung**

Zur Messung wurden die Gefrierzylinder in einen mit Flüssigstickstoff gefluteten Probenhalter transferiert und dieser in das ESR-Spektrometer e-scan eingeführt. Innerhalb des Probenhalters wurde der Zylinder dabei mittels eines Wattestabes fixiert. Die ESR-Spektren wurden anschließend mit der Software *Bruker e-scan Research* bei Anregung mit einer Mikrowellenleistung von 36,14 dBmW und einer Modulationsamplitude von 8,18 G aufgezeichnet, mit nachfolgender Feineinstellung des Magnetfelds: center field 3434 G, sweep time 5,24 s, field sweep 80 G. Jede Probe wurde dabei in 50 Durchläufen gemessen.

Die Resultate der ESR-Spektroskopie wurden abschließend auf den Proteingehalt der Zellverbände im jeweiligen Gefrierzylinder normalisiert. Hierzu wurden die Gefrierzylinder nach der Messung in Mikroreaktionsgefäße überführt und nach erfolgtem Auftauen für 5 min zentrifugiert (5.000 RPM, 4 °C). Der Überstand wurde sodann abgesaugt und das Zellpellet in 70 µl Lysepuffer (Rezept siehe 3.3) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut für 10 min zum Entfernen von Zelldebris zentrifugiert (14.000 RPM, 4 °C). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte abschließend im Überstand nach der Bradford-Methode (siehe 4.6.2).

## 4.6 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, um Proteine anhand spezifischer Antikörper nachzuweisen. Gegen die jeweiligen Proteine gerichtete, spezifische Primärantikörper werden dabei von Horseradish-Peroxidase(HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern gebunden. Der Proteinnachweis erfolgt dann nach Zugabe eines entsprechenden Substrates für die HRP mittels eines Chemilumineszenz-Detektionssystems.

### 4.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Proteinextraktion der Zellen aus der Zellkultur wurden Zelllysate angefertigt. Die hierzu auf einer 6-Well Platte ausgesäten Zellen ( $n=150.000/\text{well}$ ) wurden nach zweifachem Waschen mit je 2 ml eiskaltem PBS mit 80  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (Rezept siehe 3.3) pro Kavität versetzt und für 10 min unter regelmäßigem Schwenken der Platte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der 6-Well Platte abgelöst und die Suspension in bereitgestellte Mikroreaktionsgefäße überführt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min (14.000 RPM, 4 °C) zum Entfernen von Zelldebris. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, diese direkt auf Eis platziert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 4.6.2).

Zur Untersuchung der eNOS-Entkopplung erfolgte die Aufnahme der Zellen in einen nicht-reduzierenden Lysepuffer (Rezept siehe 3.3), um wie von Lobysheva *et al.* beschrieben, das Verhältnis von Monomer- gegenüber Monomer- plus Dimerform der eNOS (total eNOS) darzustellen [58]. Der Protein-Transfer aller Lysate zu dieser Versuchsreihe erfolgte im Gegensatz zu den übrigen Western Blot-Versuchen anschließend im Wet Blot-Verfahren bei 4°C (siehe 4.6.4).

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden alle Zelllysate mit 10x Lämmli-Puffer (Rezept siehe 3.3) im Verhältnis 10:1 versetzt, für 10 min zur Denaturierung der Proteine bei 95 °C gekocht (außer zur Untersuchung der eNOS-Entkopplung), anschließend auf Eis abgekühlt und bis zur Durchführung der Elektrophorese bei -80 °C gelagert. Nach dem späteren Auftauen wurden die Proben zum nochmaligen Denaturieren 5 min bei 95 °C gekocht und für mind. 5 min auf Eis gestellt.

#### 4.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode

Eine quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte durch Absorptionsmessung gemäß Bradford-Test. Zunächst wurde aus BSA (1 µg/µl) und Bradford-Reagenz (Bradford-Stock und Aqua dest. im Verhältnis 1:5) eine BSA-Standardreihe von 0-10 µg/µl in Schritten von 2 µg/ml pipettiert und diese nach Vortexen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden 4 µl des zu untersuchenden Zelllysats (siehe 4.6.1) zu 996 µl des Bradford-Reagenz pipettiert, gevortext und ebenso 5 min inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl von Probe bzw. Standard in Kavitäten einer nicht-absorbierenden 96-Well Platte in Duplikaten pipettiert und die Absorptionsmessung mittels photometrischem Plattenreader bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde dann anhand der Standardkurve berechnet.

#### 4.6.3 SDS-PAGE

Die größenspezifische Auftrennung der Proteine der vorbereiteten Proben (siehe 4.6.1) erfolgte mittels Gelelektrophorese unter Verwendung denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gele, bestehend aus einem 10% Trenn- und 4% Sammelgel (Tabelle 2), in einer Dicke von 1,5 mm.

Substanz	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Aqua dest.	7,9 ml	6,8 ml
30% Acrylamid	6,7 ml	1,7 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	1,25 ml
10% SDS	0,2 ml	0,1 ml
10% APS	0,2 ml	0,1 ml
TEMED	0,008 ml	0,01 ml

**Tabelle 2:** Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

Zuerst wurde das Trenngel in die vorbereiteten Gelkammern eingegossen und mit 200 µl 2-Propanol überschichtet, um entstandene Luftblasen zu entfernen und eine scharfe Gelfront zu erhalten. Nach erfolgter Auspolymerisierung wurde 2-Propanol wieder entfernt und mit Aqua dest. nachgespült. Dann wurde das Sammelgel auf die Gelfront des Trenngels aufgegossen und nach Einsetzen von 1,5 mm dicken

Gelkämme dessen Auspolymerisierung abgewartet. Nach Entfernung der Gelkämme und Auffüllen der Elektrophoresekammer mit Elektrophorese-Puffer (Rezept siehe 3.3) erfolgte die Beladung der einzelnen Geltaschen mit je exakt 30 µg Protein der hergestellten Zelllysate (siehe 4.6.1) sowie 8 µl des Größenstandards (Pageruler Prestained Protein ladder). Leere Geltaschen wurden mit 8 µl 1x Lämmli-Puffer (Rezept siehe 3.3) beladen, um eine parallele Laufrichtung der Banden zu gewährleisten. Die Elektrophorese lief bei einer konstanten Spannung von 100 V bis zum Erreichen der Gelkammeruntergrenze durch die Lauffront.

#### **4.6.4 Protein-Transfer (Blot)**

##### **4.6.4.1 Semi Dry Blot**

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden von der Gel-Trägermatrix auf eine PVDF-Membran erfolgte mit Ausnahme der Western Blots zur eNOS-Entkopplung im sog. Semi-Dry-Verfahren. Hierzu wurde die PVDF-Membran zunächst für 5 min in Methanol aktiviert und dann zusammen mit dem kongruent zugeschnittenen Filterpapier in eine Transferpufferlösung (Rezept siehe 3.3) gegeben. Nach Anfeuchten der Blotting-Kammer mit Transferpuffer wurden nach „Sandwich“-Technik erst drei Lagen dünnen Filterpapiers, dann Membran, Gel und schließlich erneut drei Lagen dünnen Filterpapiers eingelegt, wobei auf eine ausreichende Befeuchtung mit Transferpuffer und ein Ausstreichen von Luftblasen geachtet wurde. Nach dem Schließen der Kammer erfolgte der Transfer bei einer konstanten Stromstärke von 240 mA pro Gel und einer Dauer von 75 min.

##### **4.6.4.2 Wet Blot**

Der Protein-Transfer der Western Blots zum Nachweis der eNOS-Entkopplung wurde im sog. Wet Blot-Verfahren bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden Filterpapiere, Gel und PVDF-Membran (nach Aktivierung in Methanol) in Transferpuffer überführt und als „Sandwich“ geschichtet. Dieses wurde, unter sanfter Kompression durch die Gitter einer Gelhaltebox, in die mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer eingebracht. Nach dem Schließen der Kammer wurde das komplette System in den Kühlschrank verbracht und der Transfer bei 4 °C unter einer konstanten Stromstärke von 320 mA pro Gel und einer Dauer von 75 min durchgeführt.

#### **4.6.5 Blocken**

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper wurde die PVDF-Membran nach dem Protein-Transfer für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Schüttel- und Mischgerät in Blocking-Puffer, bestehend aus Waschpuffer und 5% Magermilchpulver, inkubiert (Rezepte siehe 3.3). Beim Nachweis von Phospho-Proteinen wurde statt Magermilchpulver BSA verwendet, um Interferenzen mit dem Milchprotein Casein zu vermeiden.

#### **4.6.6 Antikörperinkubation**

Die Inkubation der PVDF-Membran mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte in Blocking-Puffer auf einem Schüttel- und Mischgerät gemäß antikörperspezifischer Inkubationszeiten, wie unter 3.1.1 und 3.1.2 angegeben. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper wurde die PVDF-Membran 3x für je 5 min in Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurde die PVDF-Membran mit 1 ml ECL-Peroxidase-Substrat für 2 Minuten inkubiert. Überschüssiges Substrat wurde entfernt, die Membran in eine Klarsichtfolie gepackt und Flüssigkeitsreste sowie Luftblasen ausgestrichen.

#### **4.6.7 Auswertung**

Die Lichtemission (erweiterte Chemilumineszenz) bei Umsetzung des ECL-Peroxidase-Substrats, katalysiert durch das am Sekundärantikörper konjugierte Enzym HRP, wurde mittels CCD-Kamera Fusion Fx7 (Fa. PeqLab) und Computersoftware *Fusion* gemessen. Dadurch wurden die an die Proteinbanden spezifisch gebundenen Antikörper sichtbar gemacht. Zuletzt erfolgte eine densitometrische Quantifikation des Proteingehalts mittels Software *ImageJ*. Für die weitere Auswertung wurde die Expression der nachgewiesenen Proteine auf die Expression von GAPDH als Ladekontrolle normalisiert. Die Beurteilung der eNOS-Entkopplung erfolgte durch densitometrische Quantifikation des Verhältnisses von eNOS-Monomer zu Gesamt-eNOS (Monomer- plus Dimerform).



## 4.7 Immunfluoreszenz-Färbung der eNOS S-Glutathionylierung

Um eine eNOS-Entkopplung durch S-Glutathionylierung von Thiol-Seitenketten zu untersuchen [59,60], wurde eine entsprechende Immunfluoreszenz-Färbung in HAEC, modifiziert nach Chen *et al.* durchgeführt.

Die hierzu auf zuvor mit Fibronectin beschichteten 8 Kammer Culture-Slides ausgesäten HAEC (n=10.000/Kammer) wurden nach Erreichen von 60% Konfluenz für 24 h mit EBM-Starvationmedium versetzt und am Folgetag mit 100 µg/ml cLDL respektive nLDL für 4 h in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil bei 37 °C stimuliert. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte HAEC verwendet, während mit 25 µM BCNU stimulierte HAEC als Positivkontrollen dienten. BCNU verstärkt hierbei als Inhibitor der Glutathion-Reduktase die S-Glutathionylierung verschiedener Proteine durch Veränderung des zellulären Redoxmilieus und einer relativen Zunahme des Anteils an oxidiertem Glutathion.

Nach Waschen der Zellen mit je 400 µl PBS und Fixierung für 10 min bei Raumtemperatur mit je 400 µl 4% (v/v) PFA wurden die Zellen anschließend für 5 min mit je 400 µl 0,25% (v/v) Triton X-100 in TBS-T (TBS mit 0,01% (v/v) Tween-20) permeabilisiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit je 400 µl 1% (w/v) BSA in TBS-T geblockt. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit PBS und die Inkubation mit je 200 µl des Primärantikörpermixes aus anti-GPX (rabbit, AB 5010, Fa. Millipore) und anti-eNOS III (mouse, #610297, Fa. BD Transduction Lab.) in Verdünnung 1:1.000 pro Antikörper in 1% (w/v) BSA in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschrritten mit PBS erfolgte die lichtgeschützte Zugabe von je 200 µl des sekundären Fluoreszenzantikörpermixes (Alexa Fluor 488 Donkey anti-Mouse IgG<sub>1</sub> und Alexa Fluor 594 Donkey anti-Rabbit IgG, Fa. Invitrogen) in Verdünnung 1:1.000 pro Antikörper in 1% (w/v) BSA in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschrritten wurden die Kammerbegrenzungen aufgebrochen, sodass nur der Boden als Objektträger erhalten blieb. Hierauf erfolgte eine Kernfärbung mit je einem Tropfen „Vectashield Mounting-Medium mit DAPI“ (Fa. Vector Labs). Anschließend wurde der Objektträger eingedeckt und Bilder mit einem digitalen Fluoreszenzmikroskop (Fa Keyence) im blauen (Zellkerne), grünen (eNOS) und roten (Glutathion) Fluoreszenzkanal bei 40x Vergrößerung aufgenommen. Ein Overlay wurde dann mit Hilfe von Photoshop CS erstellt.

## 4.8 MALDI-ToF-Massenspektrometrie

Im Rahmen einer Kooperation mit Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski (Institut für Molekulare Herz-Kreislaufforschung, Universitätsklinikum der RWTH Aachen) wurde die Anzahl carbamylierter Lysin-Residuen im LDL gesunder Probanden und von CKD-Patienten mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (MALDI-ToF-MS) analysiert [61], wobei Proben *ex vivo* carbamylierten LDLs als Positivkontrolle dienten (siehe 4.1.4).

## 4.9 Klinische Studie

Um die Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten und Tiermodellversuchen zu validieren, wurde zudem die *in vivo*-Carbamylierung von LDL in einer klinischen Studie von n=96 stabilen Prä-Dialyse-Patienten mit chronischer Nierenerkrankung quantifiziert. Die Probanden wurden im Jahr 2001 aus Patienten rekrutiert, die die nephrologische Ambulanz der Klinik für Innere Medizin IV Homburg/Saar aufsuchten und nach erfolgter Aufklärung hierzu ihre schriftliche Zustimmung gaben.

Die Isolation von LDL erfolgte aus Plasmaproben der Probanden (siehe 4.1.1), die durch Zentrifugation von Blutentnahmen (10 min, 14.000 RPM, 4 °C) am Rekrutierungstag gewonnen wurden. Der Gehalt an Carbamyl-Lysin wurde anschließend mittels FLISA nachgewiesen (siehe 4.10)

Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war das Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung ohne Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie. Die Probanden wurden bis zum 31. Juli 2009 nachbeobachtet, was einer medianen Nachbeobachtungszeit von 4,7 Jahren (IQR 2,5 Jahre) entsprach. Die kombinierten klinischen Endpunkte waren definiert als Auftreten des ersten kardiovaskulären Ereignisses (z.B. Myokardinfarkt, Koronarangioplastie/-Stent/-Bypass, Schlaganfall mit Dauer der Symptome länger als 24 h, Karotis-Endarteriektomie/-Stent, nicht-traumatischer Amputation der unteren Extremität, Angioplastie/Stent/Bypass einer Unterschenkelarterie, Tod infolge eines kardiovaskulären Ereignisses) oder Tod jedweder Ursache. Als sekundärer Endpunkt wurde die Gesamtmortalität beurteilt.

Eine detaillierte Beschreibung der Studienkohorte ist folgenden Publikationen zu entnehmen [43,62,63].

#### **4.10 Carbamyl-Lysin FLISA**

Zur Quantifizierung von Carbamyl-Lysin im isolierten LDL wurde ein Fluoreszenzgekoppelter Immunabsorptionstest (FLISA) durchgeführt, wobei alle Inkubationsschritte lichtgeschützt auf einem Schüttel- und Mischgerät erfolgten. Zu Beginn wurde eine Standardreihe aus *ex vivo* carbamyliertem LDL (siehe 4.1.4) mittels serieller Verdünnung in 16 Stufen von 500 µg/ml auf 0 ng/ml (cLDL in PBS) in Mikroreaktionsgefäße pipettiert. Danach wurde eine 96 Well Mikrotiterplatte (Maxisorp) mit jeweils 100 µl Standard oder Probe (10 µg/ml in PBS) pro Kavität beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Platte zunächst zweimalig mit 200 µl PBS pro Kavität gewaschen. Anschließend wurde mit je 200 µl Block-Puffer für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach drei erneuten Waschschritten mit Waschpuffer wurde die Platte mit jeweils 100 µl Primärantikörper (Goat Anti-Carbamyl Lysine, 1:200 in Diluent) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl sekundärem Fluoreszenzantikörper (Anti-Goat IRDye 800CW, 1:500 in Diluent) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer und einem abschließenden Waschschrift mit PBS erfolgte die Fluoreszenzmessung in allen Kavitäten mithilfe des Odyssey Sa Infrared Imaging System (Fa. LI-COR Biosciences) bei einer Wellenlänge von 800 nm. Unter Verwendung der Software *Image Studio* (LI-COR Biosciences) wurde der Anteil carbamylierten LDLs anhand der Standardkurve bestimmt und auf die Proteinkonzentration der Proben (siehe 4.1.3) normalisiert.

#### **4.11 Statistische Analyse**

Aus den gewonnenen Rohdaten aller Versuche wurden statistische Kennzahlen (Mittelwert, Median, Standardabweichung/Varianz, Standardfehler) berechnet und zur Signifikanzbeurteilung statistische Vergleiche angestellt. Zur Darstellung der Resultate und als Grundlage der Diagrammerstellung wurden Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler ( $MW \pm SE$ ) gewählt, um die Standardabweichung für die Anzahl pro Gruppe zu korrigieren und die Mittelwert-Abweichung in der Grundgesamtheit abzubilden. Die Signifikanz von Mittelwertunterschieden wurde bei einfachen Vergleichen zwischen zwei Gruppen anhand des Zweistichproben-t-Tests überprüft. Bei multiplen Vergleichen zwischen mehreren Gruppen wurde zunächst eine Gruppen-Signifikanzprüfung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA)

durchgeführt und nach signifikantem Omnibustest im Anschluss durch den Post-Hoc-Test nach Turkey einzelne signifikante Unterschiede in Paarvergleichen identifiziert. Die Nullhypothese wurde dabei auf einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5% verworfen, d.h. ein  $P$ -Wert  $< 0,05$  wurde bei Einzelvergleichen als statistisch signifikant angesehen. Um eine Alphafehler-Kumulierung zu vermeiden, wurde das Signifikanzniveau bei multiplen Paarvergleichen nach der Bonferroni-Methode adjustiert.

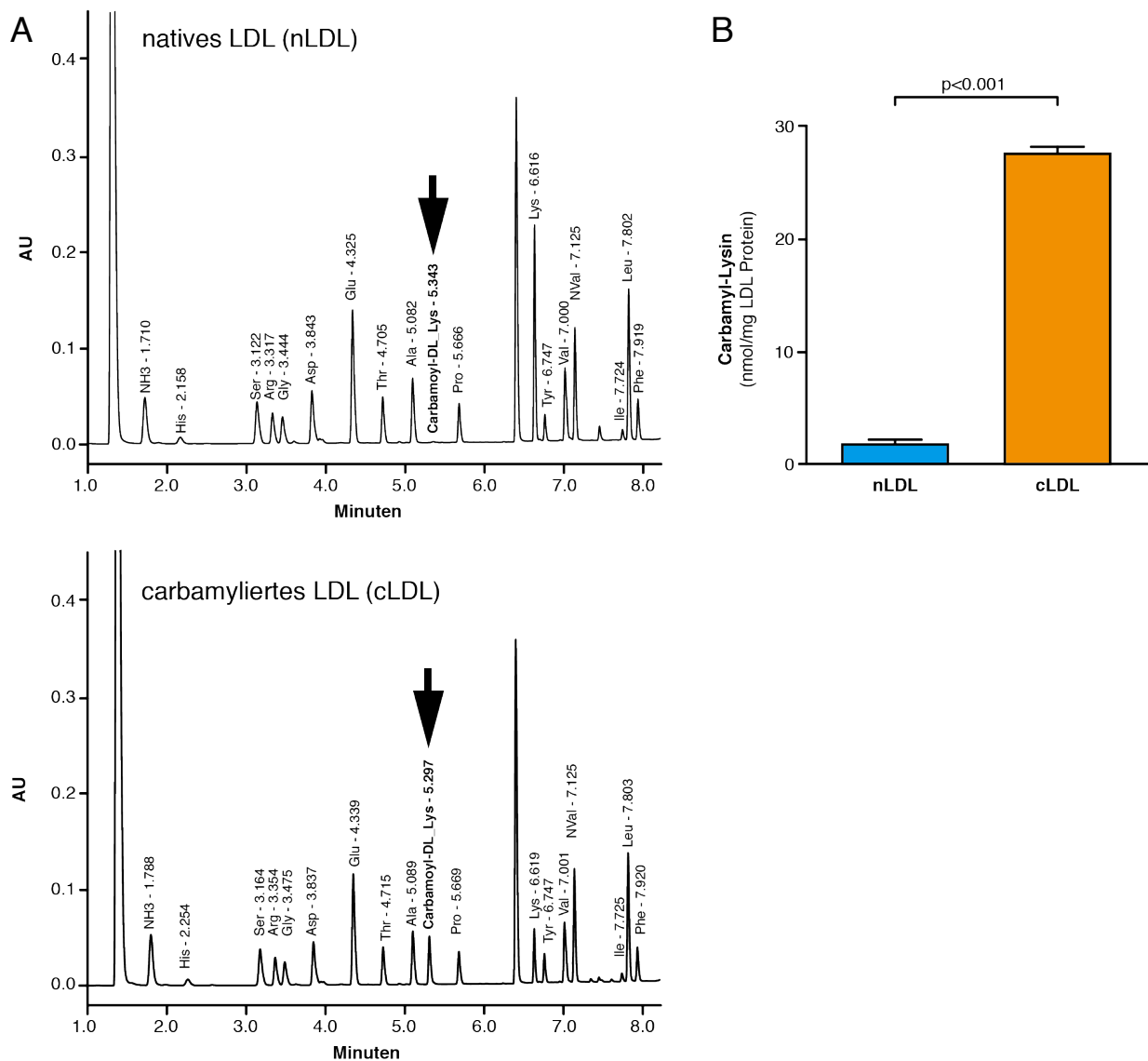
In der klinischen Studie wurden die Patienten zur Risikostratifizierung anhand des Medians gemessenen Carbamyl-Lysins im LDL von  $28,1 \mu\text{g cLDL/mg LDL}$ -Proteingehalt in zwei Gruppen aufgeteilt und deren klinische Charakteristika als Variablen gegenübergestellt. Normalverteilte, quantitative Variablen wurden dabei als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $MW \pm SD$ ) dargestellt, während bei quantitativen Variablen mit Verteilungsschiefe Median  $\pm$  Interquartilsabstand abgebildet wurden. Die Merkmalsausprägung dichotomer, nominalskaliertes Variablen wurde in jeder Gruppe prozentual angegeben. Die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen beiden Gruppen wurde bei quantitativer Merkmalsausprägung mittels einfaktorierter Varianzanalyse (Normalverteilung) oder Kruskal-Wallis-Test (keine Normalverteilung), bei nominalskalierten Variablen mittels Chi-Quadrat-Test beurteilt.

Um einen Zusammenhang zwischen der Höhe der LDL-Carbamyl-Lysin-Spiegel und der Gesamtmortalität sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse in der Patientenkohorte zu untersuchen, wurden entsprechend der Gruppeneinteilung anhand des medianen Carbamyl-Lysins im LDL, deskriptive Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Die unterschiedlichen Überlebenszeiten beider Gruppen wurden dann mittels Log-rank-Test auf deren Signifikanz hin geprüft. Abschließend wurden mehrere Cox-Regressionsmodelle erstellt, um neben der Analyse der LDL-Carbamyl-Lysin-Spiegel auch eine Adjustierung hinsichtlich Alter, Geschlecht, hs-CRP, Diabetes mellitus und prävalenter KHK als potentiellen Störfaktoren zu erzielen.

## 5. Ergebnisse

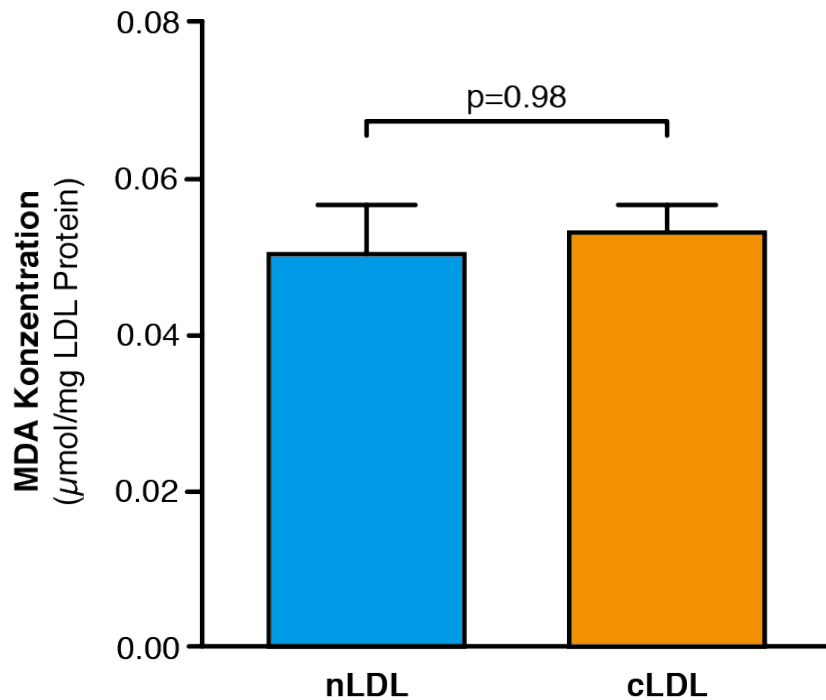
### 5.1 Ex vivo Carbamylierung von LDL

Für die folgenden Versuche wurde LDL aus frischem Nüchternplasma gesunder Spender durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isoliert und *ex vivo* carbamyliert. Die direkt nach Carbamylierung mittels UHPLC durchgeführte Aminosäurenanalyse ergab einen relevanten Carbamyl-DL-Lysin-Anteil von  $27,4 \pm 0,9$  nmol/mg LDL Protein, während in nativem LDL kein Carbamyl-DL-Lysin nachzuweisen war (Abb. 10). Diese Analysen wurden als Auftragsleistung durch das Functional Genomics Center der Universität Zürich/Schweiz durchgeführt.



**Abbildung 10: LDL-Carbamylierung.** (A) Repräsentative UHPLC-Aminosäurenanalyse von nativem LDL sowie LDL nach Carbamylierung *ex vivo*. Der Pfeil zeigt den Carbamyl-DL-Lysin-Peak. (B) Vergleich des Carbamyl-DL-Lysin-Gehalts von LDL vor und nach *ex vivo* Carbamylierung ( $N = 10$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

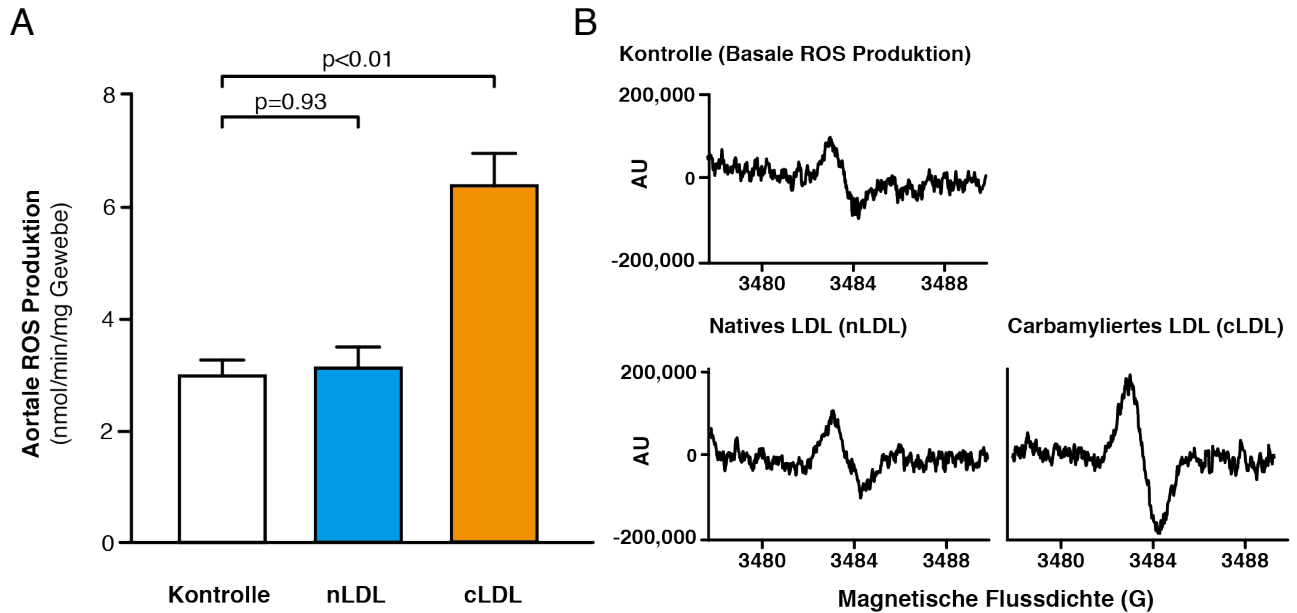
Um eine relevante Lipidperoxidation während des Carbamylierungsprozesses auszuschließen, wurde der Gehalt an Malondialdehyd (MDA) mittels TBARS-Assay bestimmt (Abb. 11). Hier ließ sich kein signifikanter Unterschied der MDA-Konzentration in carbamyliertem ( $0,054 \pm 0,005 \mu\text{mol}/\text{mg}$ ) und nicht-carbamyliertem LDL ( $0,05 \pm 0,006 \mu\text{mol}/\text{mg}$ ) detektieren.



**Abbildung 11: Ausschluss von LDL-Lipidperoxidation.** TBARS-Assay zur Bestimmung des Malondialdehyd (MDA)-Gehalts von nLDL/cLDL ( $N = 10$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

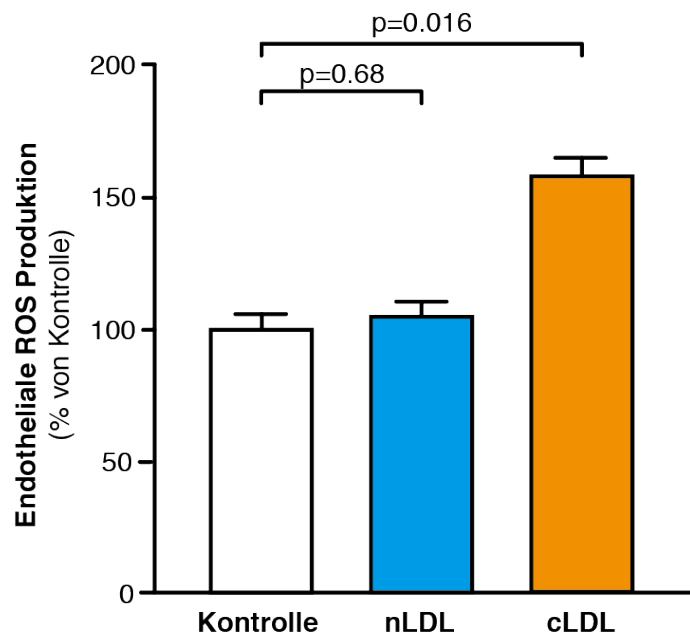
## 5.2 Effekte von cLDL auf die endotheliale ROS Produktion

In den in der Einleitung gezeigten Voruntersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der ROS-Scavenger PEG-SOD die cLDL-induzierte Vasokonstriktion in Aortenringen vermindert. Dies legt nahe, dass reaktive Sauerstoffspezies mechanistisch eine Rolle im Rahmen der Effekte von cLDL auf das Gefäßsystem spielen. Daher wurden im Folgenden die Auswirkungen von cLDL auf die Freisetzung von ROS in murinen Aortenringen unter Verwendung von ESR-Spektroskopie untersucht (Abb. 12). Hierbei zeigte cLDL eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion ( $196,8 \pm 14,75\%$  gegenüber Kontrolle;  $P < 0,01$ ), während nLDL keinerlei Effekt ausübte ( $P = 0,93$ ).



**Abbildung 12: Effekt von cLDL auf die ROS-Produktion in murinen Aortenringen.** (A) ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der Superoxid-Produktion in Aortenringen nach Inkubation mit nLDL/cLDL (100 µg/ml, 1 h,  $N = 10$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). (B) Repräsentative ESR-Spektren. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

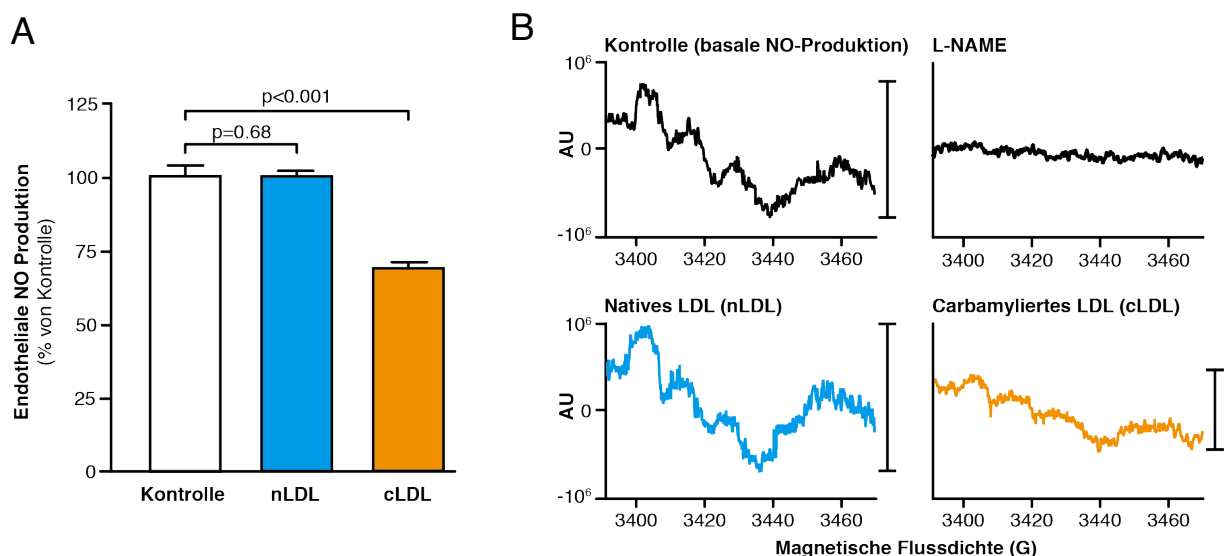
Da eine Steigerung der ROS-Produktion durch cLDL in murinen Aortenringen nachgewiesen werden konnte, wurden weitere ESR-spektroskopische Analysen an HAEC durchgeführt, um das Endothel als Ursprungsort reaktiver Sauerstoffspezies zu identifizieren. Wie zuvor zeigte sich eine signifikant gesteigerte ROS-Produktion nach Inkubation von HAEC mit cLDL ( $146,4 \pm 14,4\%$  gegenüber unbehandelten HAEC;  $P=0,016$ ), während nLDL erneut keinen Effekt ausübte ( $P=0,68$ ).



**Abbildung 13: Effekte von cLDL auf die ROS-Produktion in HAEC.** ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der Superoxid-Produktion in HAEC nach Inkubation mit nLDL/cLDL (je 100 µg/ml, 1 h,  $N = 4$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

### 5.3 Effekte von cLDL auf die endotheliale NO-Produktion

Da eine endotheliale Dysfunktion neben der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies auf einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO beruht, wurde die endotheliale NO-Produktion in HAEC nach Inkubation mit nLDL und cLDL quantifiziert. Die funktionalen Daten der in der Einleitung genannten Ergebnisse aus Organkammer-Experimenten bestätigend, erbrachte die ESR-Spektroskopie eine signifikante Reduktion der endothelialen NO-Produktion auf  $72,7 \pm 2,3\%$  nach Inkubation mit cLDL ( $P < 0,001$ ), während nLDL gegenüber Kontrollen keine Auswirkungen zeigte ( $P = 0,68$ ).



**Abbildung 14: Effekte von cLDL auf die endotheliale NO-Produktion.** (A) ESR-Spektroskopie zur Quantifizierung der NO-Produktion in HAEC, inkubiert mit nLDL oder cLDL (je  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 h,  $N = 4$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ) (B) Repräsentative ESR-Spektren der NO-Produktion in HAEC  $\pm$  cLDL/nLDL und L-NAME ( $0,3 \text{ mM}$ ) als Kontrolle. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

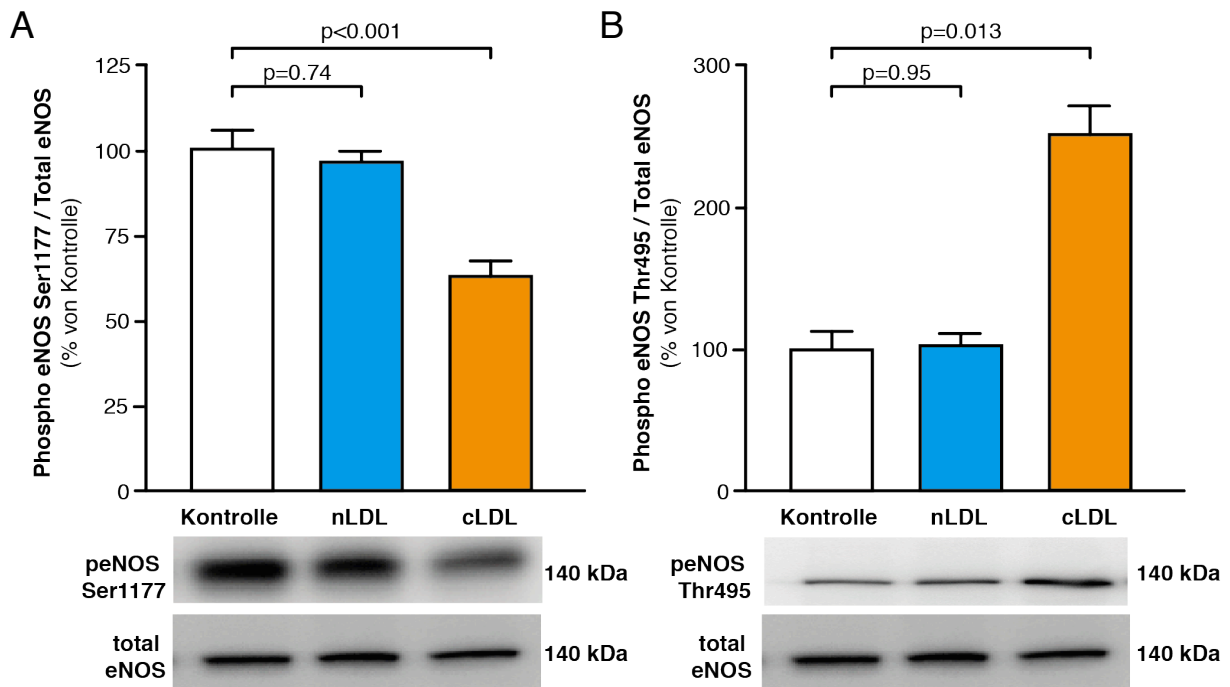
### 5.4 Effekte von cLDL auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

#### 5.4.1 eNOS-Phosphorylierung

Um den Mechanismus der durch cLDL verringerten basalen NO-Produktion in HAEC zu eruieren, wurde die enzymatische Aktivität der verantwortlichen endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) untersucht, welche durch Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren reguliert wird [64]. Anhand von Western Blots ließen sich in HAEC nach Inkubation mit cLDL eine gegenüber Kontrollen auf  $65,8 \pm 5,0\%$  verringerte Phosphorylierung der eNOS-aktivierenden Seitenkette Ser1177 ( $P < 0,001$ ) und eine gleichzeitige Steigerung der eNOS-inhibierenden Phosphorylierung am Thr495 auf  $258,3 \pm 35,4\%$  ( $P = 0,013$ ) nachweisen, während die



Expression von eNOS (total-eNOS) unverändert blieb. Die Inkubation mit nLDL bewirkte keine veränderte Phosphorylierung regulatorischer eNOS-Reste ( $P=0,74$  bzw.  $P=0,95$ ). Diese Versuche zeigen, dass die durch cLDL verursachte Einschränkung der endothelvermittelten Relaxationsfähigkeit zumindest teilweise durch eine Aktivitätsminderung der eNOS bedingt ist.

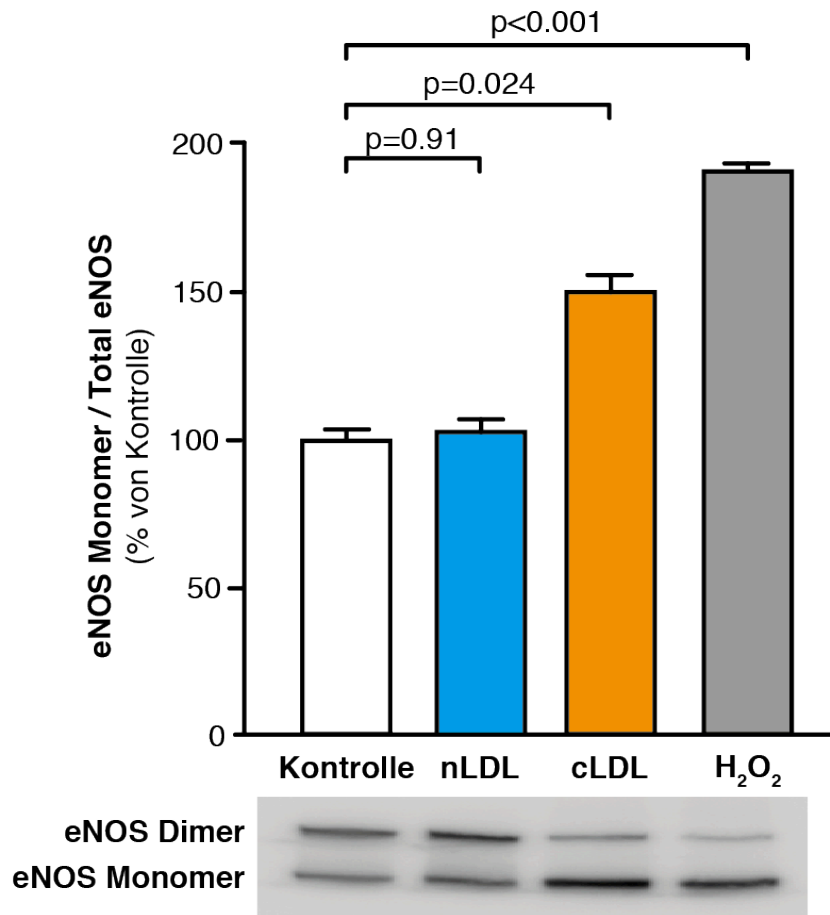


**Abbildung 15: Effekte von cLDL auf eNOS-Phosphorylierung (A)** Western Blots zur Darstellung der eNOS-aktivierenden Phosphorylierung an Ser1177 und total eNOS in HAEC nach Inkubation mit nLDL/cLDL (je 100 µg/ml, 10 min,  $N = 5$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). **(B)** eNOS-inhibierende Phosphorylierung an Thr495 in HAEC nach Inkubation mit nLDL/cLDL (je 100 µg/ml, 10 min,  $N = 5$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

### 5.4.2 eNOS-Entkopplung

Neben Phosphorylierungen, welche die enzymatische Aktivität der eNOS quantitativ beeinträchtigen, sind weitere Mechanismen bekannt, die deren Enzymaktivität auch qualitativ zu ändern vermögen. Der Zerfall der üblicherweise als Dimer vorliegenden eNOS in Monomere, deren sog. Entkopplung, führt zur Katalyse der Bildung von ROS anstatt NO als Reaktionsprodukt [60]. Um diese eNOS-Entkopplung als mögliche Ursache der gesteigerten ROS-Produktion in Aortenringen und HAEC nach Inkubation mit cLDL zu untersuchen, wurden Monomer- und Dimerform der eNOS in stimulierten HAEC mittels Western Blots quantifiziert. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen konnte bereits 10 min nach Stimulation mit cLDL ein signifikanter Anstieg des Monomer-Anteils an der Gesamtheit aller eNOS-Formen (total eNOS) verzeichnet

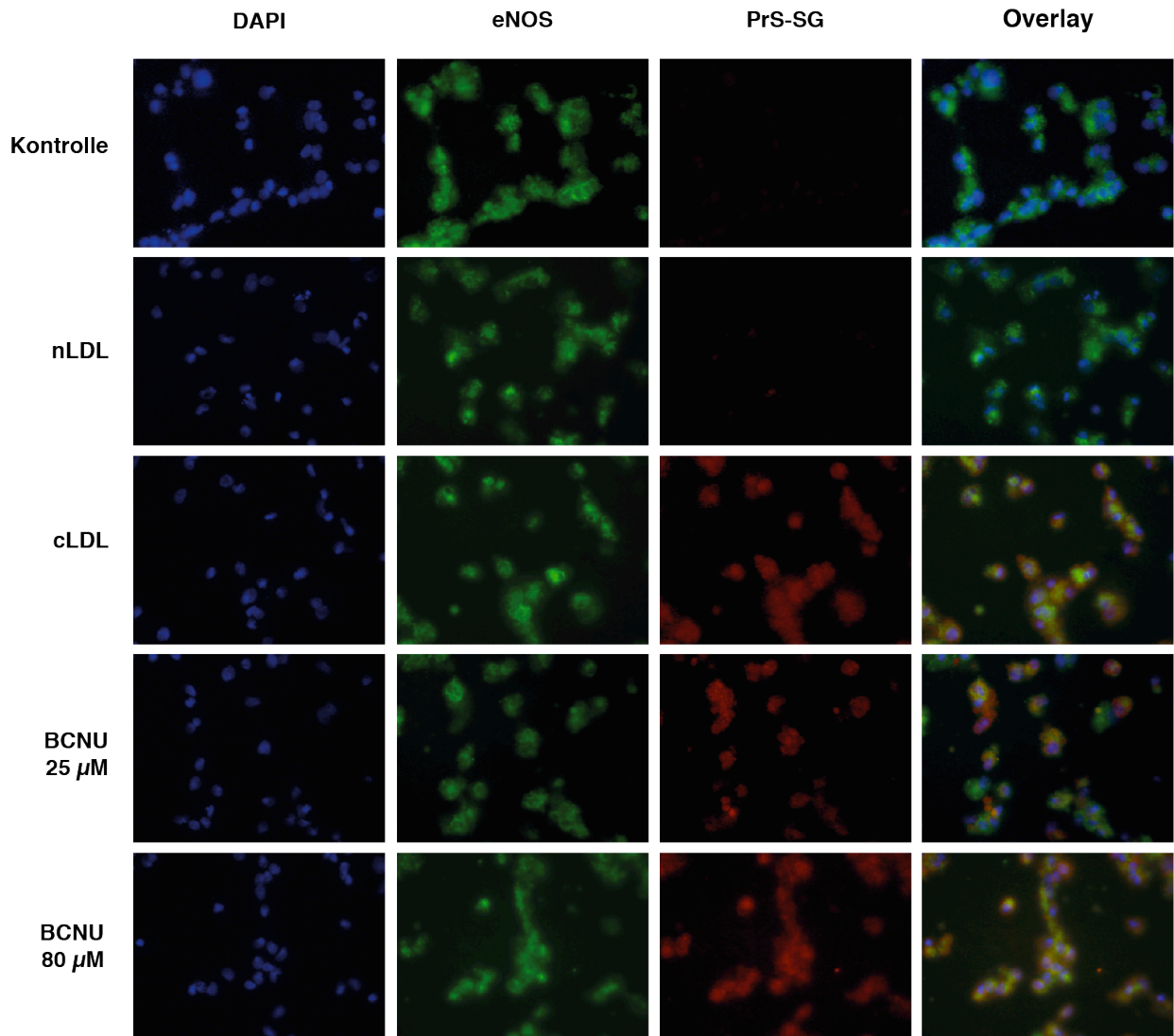
werden ( $P=0,024$ ). Unter Stimulation mit nLDL blieb das Monomer-/Dimerverhältnis unverändert ( $P=0,91$ ). Die Ergebnisse zeigten, dass cLDL in Endothelzellen eine Entkopplung der eNOS bewirkt, wodurch die zuvor beobachtete Produktion von ROS erklärt werden könnte.



**Abbildung 16: Effekte von cLDL auf die Entkopplung von eNOS.** Western Blot zur Darstellung der eNOS-Entkopplung in HAEC nach Inkubation mit nLDL/cLDL (je 100 µg/ml, 10 min,  $N = 6$  pro Gruppe) durch Quantifikation der eNOS-Monomer- und -Dimerform, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mmol/l) als Positivkontrolle.  $MW \pm SE$ . Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

Da kürzlich von Chen *et al.* gezeigt werden konnte, dass eine S-Glutathionierung der eNOS zu deren Entkopplung führt [59], untersuchten wir mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Effekte von cLDL auf diese posttranslationale Proteinmodifikation der eNOS in HAEC. Die Zellen wurden hierzu mit nLDL, cLDL (je 100 µg/ml) oder 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU, 25 und 80 µM), einem Inhibitor der Glutathiondisulfid-Reduktase als Positivkontrolle, stimuliert. Es zeigte sich, dass cLDL im Gegensatz zu nLDL eine mit BCNU vergleichbare Stimulation der Protein S-Glutathionierung (PrS-SG) in HAEC bewirkte, während eine gleichzeitige Färbung von eNOS und Anfertigung entsprechender Overlays nahelegte, dass die S-Glutathionierung mit eNOS co-lokalisiert. Die S-

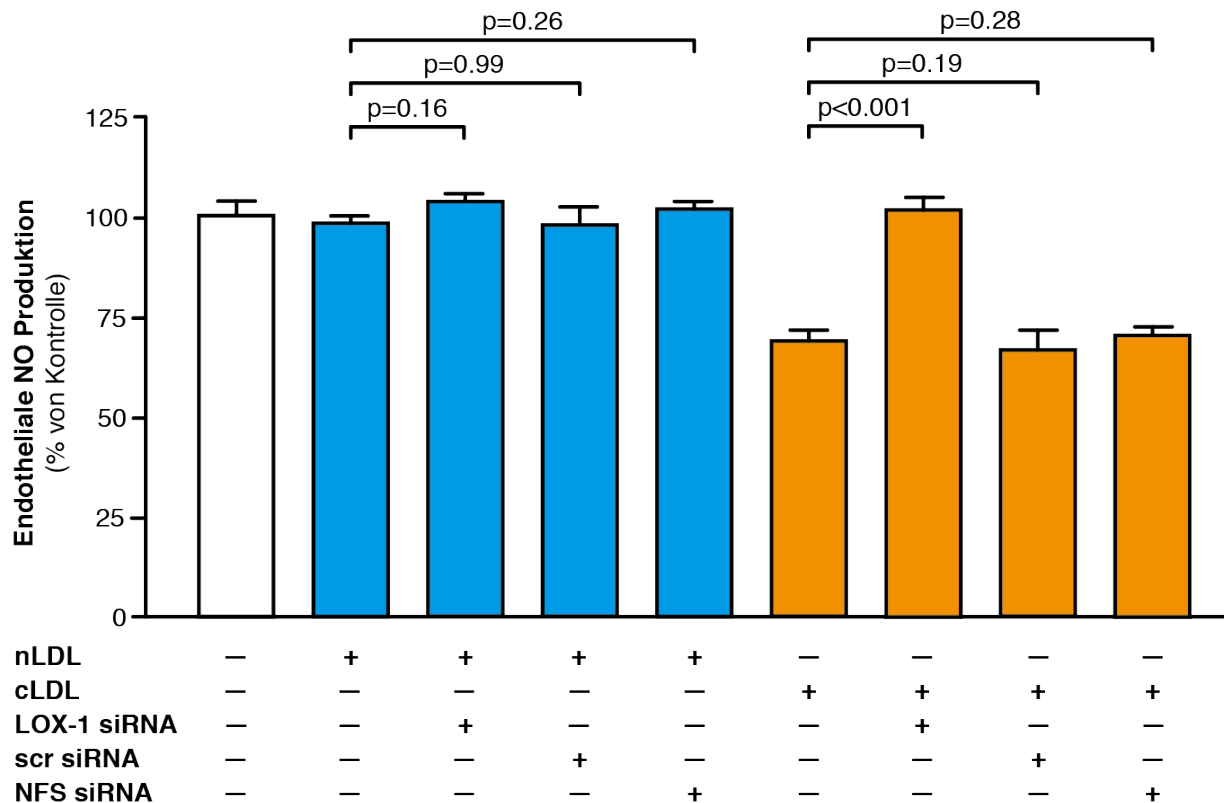
Glutathionylierung der eNOS kann daher zumindest teilweise für die durch cLDL induzierte eNOS-Entkopplung und konsekutive ROS-Produktion verantwortlich gemacht werden.



**Abbildung 17: S-Glutathionylierung von eNOS in HAEC nach Stimulation mit cLDL.** Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der eNOS (grün, Alexa Fluor 488) und Protein S-Glutathionylierung (PrS-SG, rot, Alexa Fluor 594). Nuclei angefärbt mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau). Overlay der Färbungen in HAEC nach Inkubation mit nLDL/cLDL (je 100  $\mu$ g/ml) bzw. 1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff (BCNU, 25 und 80  $\mu$ M) als Positivkontrolle für 4 h. Bilder stehen repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

## 5.5 Rolle von LOX-1 als Rezeptor für cLDL

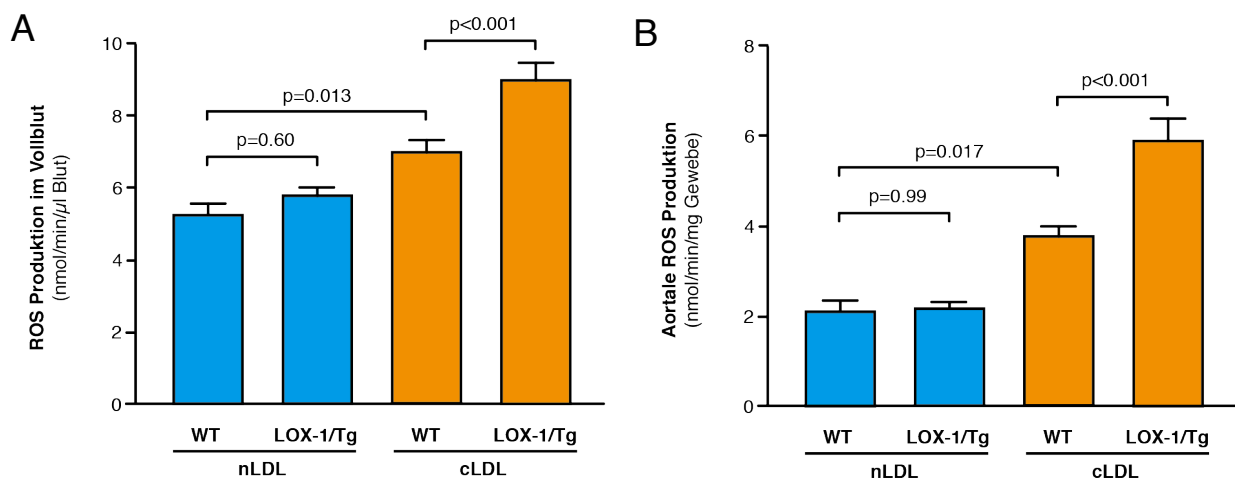
Da der endotheliale Rezeptor Lectin-like-oxidized LDL-Rezeptor-1 (LOX-1) als Vermittler der endothelschädigenden Effekte von oxLDL infolge der Produktion oxidativen Stresses bekannt ist [65], sollte die in der Literatur beschriebene Möglichkeit von Interaktionen mit anderweitig modifizierten Lipoproteinen [66] und damit die Bedeutsamkeit für den endothelialen cLDL-Wirkmechanismus untersucht werden. Hierzu wurden die ESR-Experimente zur Messung der endothelialen NO-Produktion in HAEC unter Stimulation mit nLDL oder cLDL nach Transfektion der HAEC mit einer gegen LOX-1-gerichteten small interfering RNA (siRNA) wiederholt (Abb. 18).



**Abbildung 18: Effekte einer Reduktion der Expression von LOX-1 mittels siRNA auf die cLDL-induzierte endotheliale NO-Produktion.** ESR-Spektroskopie zur Quantifizierung der NO-Produktion in HAEC  $\pm$  nLDL/cLDL (je 100  $\mu$ g/ml, 1 h) nach Silencing von LOX-1 durch siRNA-Transfektion ( $N = 6$  pro Gruppe). Scr siRNA (scrambled small interfering RNA) und NFS (Nanoparticle Formation Solution) als Negativkontrolle.  $MW \pm SE$ . Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

Die inhibitorische Wirkung von cLDL auf die endotheliale Freisetzung von NO konnte hierdurch vollständig aufgehoben werden ( $P < 0,001$ ), während siRNA in der Gegenwart von nLDL keinen Einfluss auf die endotheliale NO-Produktion nahm ( $P = 0,16$ ; Abb. 18). Die alleinige Inkubation mit scrambled siRNA bzw. der Nanoparticle Forming Solution (NFS) übten als Negativkontrollen keinen Effekt aus.

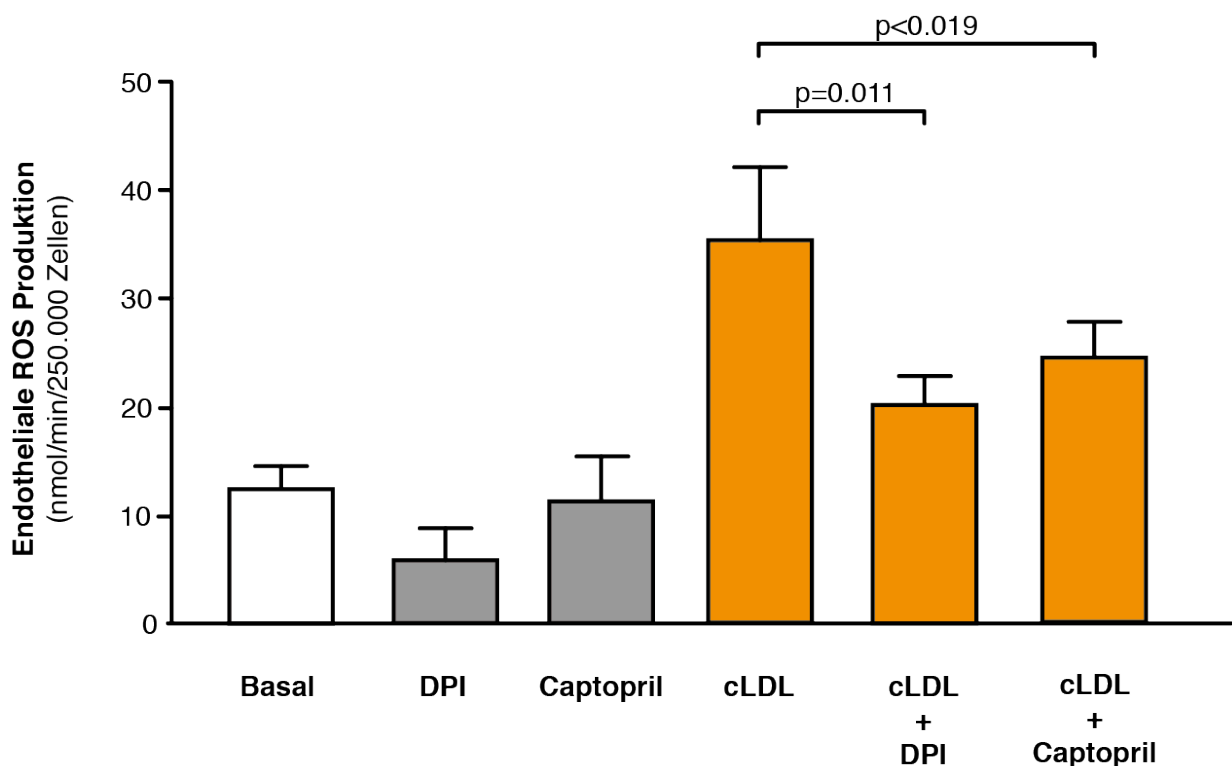
Zur Bestätigung dieser *in vitro*-Experimente *in vivo* wurde der Effekt von cLDL auf die ROS-Produktion in C57BL/6J-Wildtypmäusen (WT) und transgenen C57BL/6J-Mäusen mit Überexpression des Rezeptors LOX-1 in Endothelzellen (*Lox1/Tg*) untersucht. 24 h nach i.v.-Injektion von nLDL bzw. cLDL wurden Vollblut sowie die Aorten zur ESR-spektroskopischen Bestimmung der ROS-Produktion entnommen. So konnte erstens nachgewiesen werden, dass cLDL in WT-Mäusen auch *in vivo* zu gesteigerter ROS-Produktion in Vollblut (Abb. 19A;  $P = 0,013$ ) und Aortenringen (Abb. 19B;  $P = 0,017$ ) führt. Zweitens zeigten die transgenen Tiere gegenüber WT-Mäusen nach Stimulation mit cLDL eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion, sowohl im Vollblut von  $7,0 \pm 0,4$  auf  $9,1 \pm 0,40$  nmol/min/ $\mu$ l Blut (Abb. 19A;  $P < 0,001$ ), als auch den Aortenringen von  $3,9 \pm 0,1$  auf  $5,9 \pm 0,5$  nmol/min/mg Gewebe (Abb. 19B;  $P < 0,001$ ). Unter Stimulation mit nLDL zeigte sich kein Unterschied zwischen *Lox1/Tg*- und WT-Mäusen ( $P = 0,60$  bzw.  $P = 0,99$ ).



**Abbildung 19: Effekte einer Überexpression von LOX-1 in Endothelzellen auf die cLDL-induzierte ROS-Produktion *in vivo*.** ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der ROS-Produktion in Vollblut (A) und Aortenringen (B) von WT- und *Lox1/Tg*-Mäusen 24 h nach i.v.-Injektion von nLDL/cLDL (15 mg/kg,  $N = 4$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

## 5.6 Zelluläre Mechanismen der cLDL-induzierten ROS-Produktion

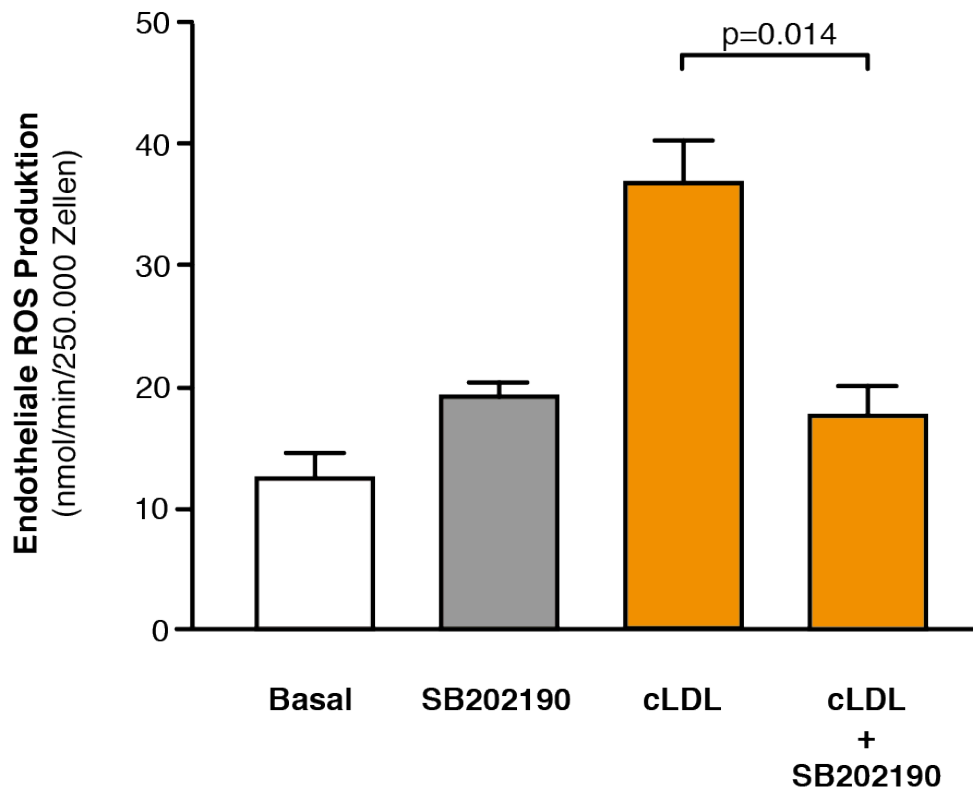
Im nächsten Schritt sollten die zellulären Mechanismen, welche die cLDL-induzierte ROS-Produktion vermitteln, untersucht werden. Da sich in der Literatur Hinweise auf eine Verstärkung der endothelialen NADPH-Oxidase-Aktivität infolge LOX-1-Aktivierung finden [67], wurden die ESR-spektroskopischen ROS-Messungen in Gegenwart des NADPH-Oxidase-Inhibitors Diphenylen-Iodonium (DPI) sowie Captopril wiederholt (Abb 20). Denn auch für Captopril sind direkte inhibitorische Effekte auf die NADPH-Oxidase-Aktivität beschrieben worden [68,69]. Tatsächlich ließ sich durch beide Substanzen eine signifikante Reduktion der cLDL-induzierten ROS-Produktion in HAEC erzielen (DPI  $P=0,011$ ; Captopril  $P<0,019$ ), was die Beteiligung des Enzyms NADPH-Oxidase am endothelialen Wirkungsmechanismus von cLDL via LOX-1 nahelegt.



**Abbildung 20: Effekte einer Inhibition der NADPH-Oxidase auf die cLDL-induzierte ROS-Produktion.** ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der ROS-Produktion durch cLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 1 h) in HAEC nach Präinkubation mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Diphenylen-Iodonium (DPI) (5  $\mu\text{M}$ , 30 min) oder Captopril (10  $\mu\text{M}$ ;  $N = 3-5$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

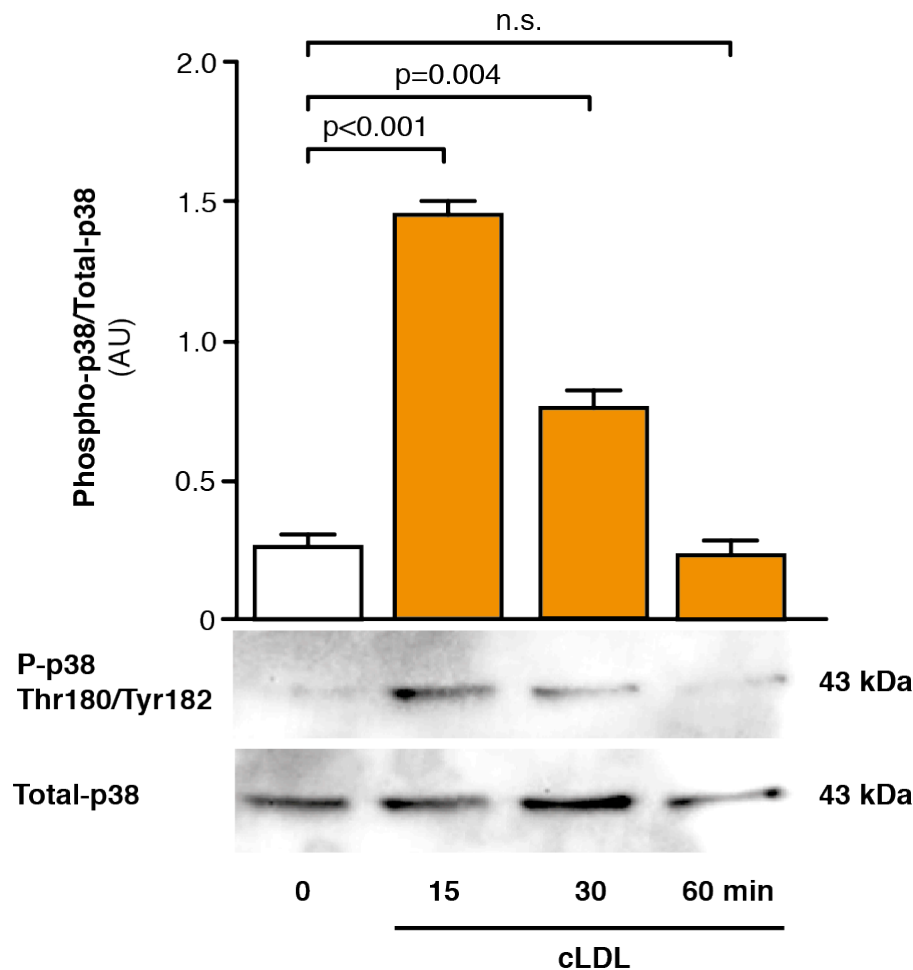
Während verschiedene mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) als weitere Effektorproteine des Rezeptors LOX-1 beschrieben worden sind [67], zeigten Veröffentlichungen von Rosenkranz *et al.*, dass insbesondere die MAPK p38 eine

wichtige Rolle bei der Modulation der LOX-1 abhängigen Aktivierung der NADPH-Oxidase spielt [70]. Daher sollte nun deren Rolle bei der Vermittlung endothelialer Eigenschaften von cLDL untersucht werden, wobei sich zeigte, dass der spezifische p38-MAPK-Inhibitor SB202190 die durch cLDL gesteigerte ROS-Produktion in HAEC signifikant abschwächen und beinahe normalisieren konnte (Abb. 21;  $P=0,014$ ).



**Abbildung 21: Effekte einer Inhibition der p38-MAPK auf die cLDL-induzierte ROS-Produktion.** ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der ROS-Produktion durch cLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 1 h) in HAEC nach Präinkubation mit dem spezifischen p38-MAPK-Inhibitor SB202190 (5  $\mu\text{M}$ , 30 min;  $N = 3-5$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

Weiterhin konnte mittels Western Blots an HAEC nach Inkubation mit cLDL eine zeitabhängige Steigerung der Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38-MAPK nachgewiesen werden (Abb. 22). Der maximale Effekt (gemessen am Anteil der phosphorylierten Proteinfraction phospho-p38) trat hier nach 15 min ( $P<0,001$ ) auf, wobei die zur Normalisierung verwendete Gesamtproteinexpression von p38 (total-p38) unverändert blieb.



**Abbildung 22: Phosphorylierung der p38-MAPK.** Western Blot zum Zeitverlauf der Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase an Thr180/Tyr182 in HAEC nach Inkubation mit cLDL (100 µg/ml,  $N = 4$ ,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

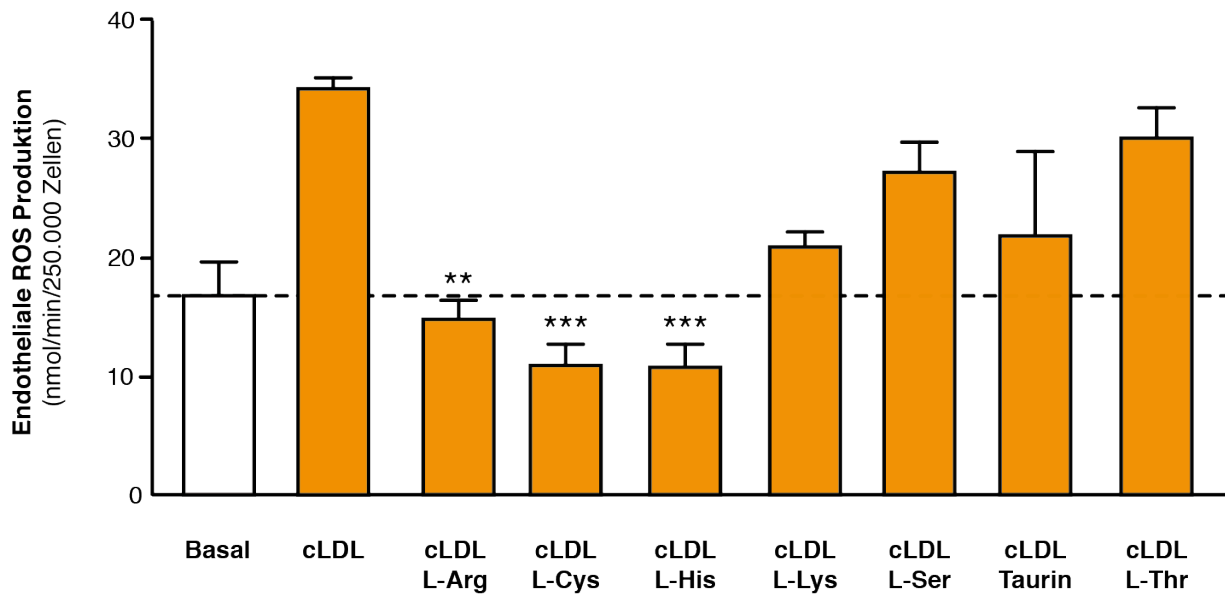
In der Zusammenschau scheint die Aktivierung von p38-MAPK durch Phosphorylierung somit zumindest einen Teilschritt der cLDL-induzierten ROS-Produktion über den LOX-1-Signalweg darzustellen.

## 5.7 Potentielle therapeutische Beeinflussbarkeit der LDL-Carbamylierung

Kürzlich konnte von Berg *et al.* gezeigt werden, dass durch Anwesenheit bestimmter Aminosäuren während der *ex vivo* Carbamylierung der Carbamylierungsgrad von Albumin reduziert wird [47]. Um dies auch für den Prozess der Carbamylierung von LDL zu überprüfen, wurde LDL gesunder Probanden in Gegenwart von L-Arginin (L-Arg), L-Cystein (L-Cys), L-Histidin (L-His), L-Lysin (L-Lys), L-Serin (L-Ser), L-Threonin (L-Thr) und dem Aminosäureabbauprodukt Taurin mit Kaliumcyanat inkubiert und damit carbamiliert. Die resultierenden LDL-Präparationen wurden anschließend mit HAEC inkubiert und die endotheliale ROS-Produktion ESR-



spektroskopisch quantifiziert (Abb. 23). Es zeigte sich, dass LDL, welches in der Anwesenheit von L-Arginin ( $P<0,01$ ), L-Cystein ( $P<0,001$ ) und L-Histidin ( $P<0,001$ ) carbamyliert wurde, keinen stimulierenden Effekt auf die endotheliale ROS-Produktion mehr ausübte. Alle anderen untersuchten Aminosäuren blieben ohne statistisch signifikanten Effekt.

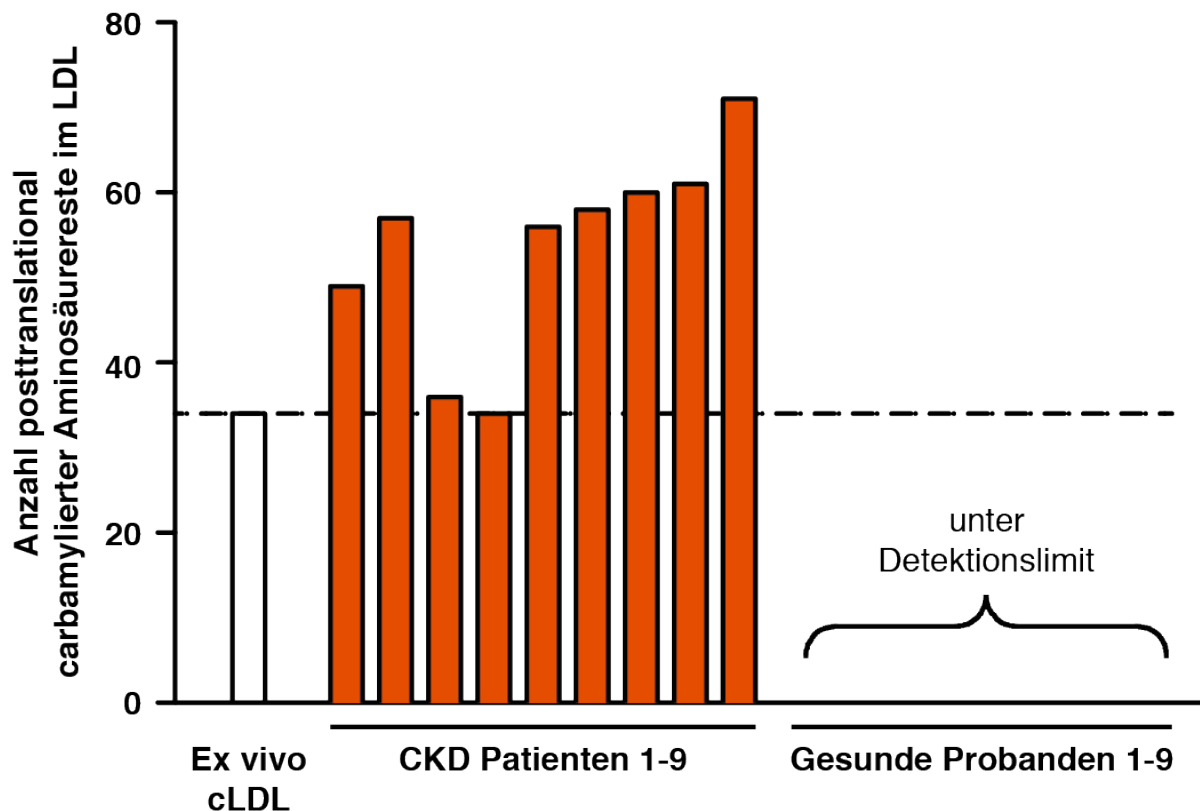


**Abbildung 23: Effekte verschiedener Aminosäuren auf die durch cLDL-vermittelte endotheliale ROS-Produktion.** ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der ROS-Produktion in HAEC nach Inkubation mit cLDL (100 µg/ml, 1 h), welches in Gegenwart spezifischer Aminosäuren carbamyliert wurde (je 10 mM,  $N = 4$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). \*\* $P<0,01$  und \*\*\* $P<0,001$  im Vergleich zu cLDL alleine. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

## 5.8 Klinische Relevanz der Forschungsergebnisse bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

Ziel der folgenden Untersuchungen war es zu untersuchen, ob es sich bei den zuvor beschriebenen Forschungsergebnissen der durch carbamyliertem LDL induzierten endothelialen Dysfunktion um pathophysiologisch bedeutsame Vorgänge handelt. Hierzu untersuchten wir aus dem Blut von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) und gesunden Probanden isoliertes LDL. Im Rahmen einer Kooperation (Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski, Institut für Molekulare Herz-Kreislaufforschung, Universität Aachen) wurde die Anzahl carbamylierter Lysin-Reste im LDL der genannten Patientengruppen mittels MALDI-ToF-MS analysiert (Abb. 24). Als Kontrolle diente das in den zuvor beschriebenen Experimenten verwendete, *ex vivo* carbamylierte LDL. Während sich im nativen LDL der gesunden Probanden keine Carbamylierung von Lysinresten nachweisen ließ, fanden sich im

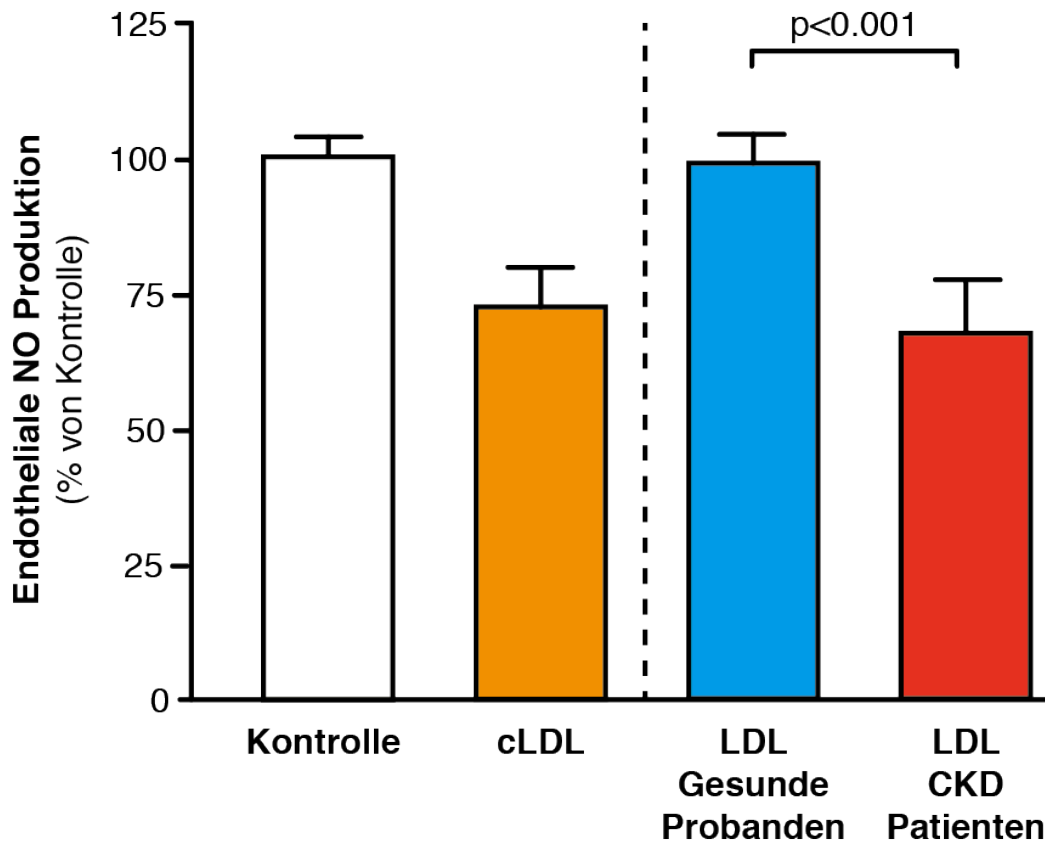
daraus *ex vivo* generierten cLDL, auf welches sich alle vorherigen Versuche stützten, 34 posttranslational carbamylierte Lysin-Residuen. Interessanterweise zeigte die Untersuchung des aus CKD-Patienten isolierten LDL mit einem mittleren Carbamyl-Lysin-Gehalt von  $54 \pm 4$  modifizierten Seitenketten sogar eine wesentlich stärker ausgeprägte Carbamylierung, als das verwendete *ex vivo* modifizierte cLDL. Dieses Untersuchungsergebnis indiziert, dass die Carbamylierung von Lysinresten eine bedeutende Modifikation des LDL bei Patienten mit CKD darstellt.



**Abbildung 24: Quantifikation carbamylierter Lysinreste im LDL.** Quantifikation der carbamylierten Lysinreste in LDL-Isolaten von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) und gesunden Probanden ( $N = 9$  pro Gruppe). Der linke Balken repräsentiert die Anzahl an carbamylierten Lysinresten im cLDL, das nach *ex vivo* Carbamylierung für oben dargestellte Experimente verwendet wurde. Jeder übrige Balken repräsentiert einen individuellen Probanden. Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

Neben dem quantitativen Nachweis von *in vivo* carbamylierten Lysinresten im LDL Nierenkranker wurden nun auch dessen endotheliale Effekte untersucht. Dazu wurden HAEC mit aus dem Plasma von CKD-Patienten sowie gesunden Kontrollen isoliertem LDL inkubiert und die endotheliale NO-Produktion ESR-spektroskopisch quantifiziert (Abb. 25). Es handelte sich hierbei um die gleichen LDL-Präparationen, welche auch für die in Abbildung 24 gezeigten Analysen verwendet wurden. Ähnlich wie zuvor bereits für *ex vivo* modifiziertes cLDL gezeigt, führte auch das aus dem

Plasma von CKD-Patienten isolierte LDL gegenüber Kontrollen zu einer signifikanten Reduktion der endothelialen NO-Produktion auf  $66,9 \pm 3,6\%$  ( $P < 0,001$ ), während LDL gesunder Probanden keinen Effekt auf die endotheliale NO-Produktion ausübte. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Carbamylierung von LDL für die Entstehung einer CKD-assoziierten endothelialen Dysfunktion.



**Abbildung 25: Effekte von LDL chronisch Nierenkranker und gesunder Probanden auf die endotheliale NO-Produktion.** ESR-Spektroskopie zur Bestimmung der endothelialen NO-Produktion in HAEC nach Inkubation mit LDL-Isolaten aus dem Plasma von CKD-Patienten und gesunden Probanden sowie *ex vivo* modifiziertem cLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 1 h,  $N = 9$  pro Gruppe,  $MW \pm SE$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

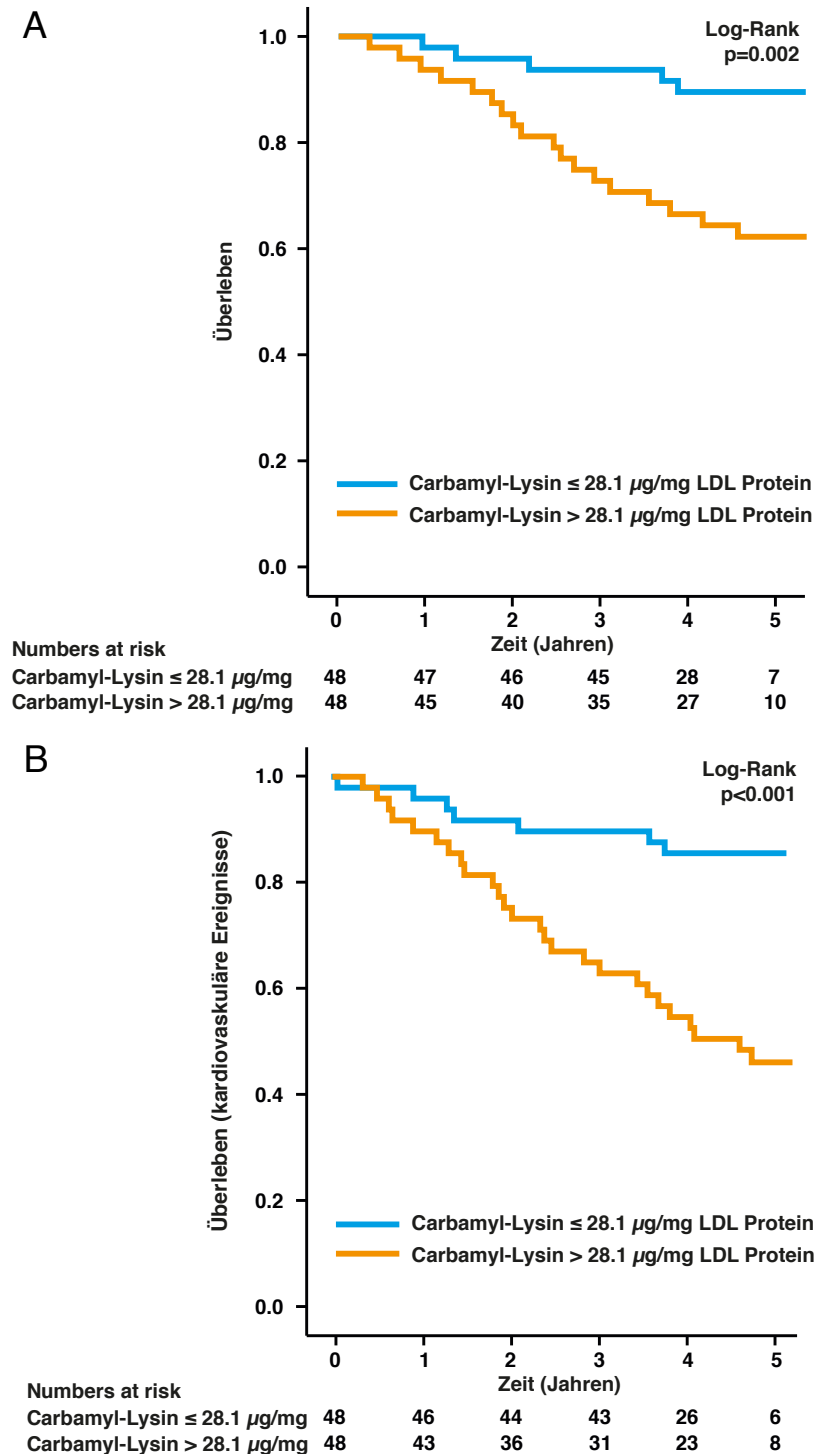
Um letztlich die klinische Relevanz der Forschungsergebnisse für Patienten mit chronischer Nierenerkrankung zu belegen, wurde in einer prospektiven Kohorte von CKD-Patienten untersucht, ob ein erhöhter Carbamyl-Lysingehalt im LDL dieser Patienten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist. Tabelle 3 zeigt die klinischen Charakteristika der Kohorte zu Studienbeginn, deren Probanden entsprechend des Medians des gemessenen cLDL / mg LDL-Protein (28,1  $\mu\text{g}$  cLDL/mg LDL-Protein) in zwei Gruppen unterteilt wurden.

	<b>Gesamt</b>	<b>cLDL ≤ 28,1 µg/mg LDL-Protein</b>	<b>cLDL &gt; 28,1 µg/mg LDL-Protein</b>	<b>P-Wert *</b>
	<b>(n=96)</b>	<b>(n=48)</b>	<b>(n=48)</b>	
<b>Alter [Jahre]</b>	60,2 ± 14,4	57,1 ± 15,6	63,3 ± 12,6	0,055
<b>Geschlecht (% männlich)</b>	46 (47,9)	28 (58,3)	18 (37,5)	0,065
<b>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</b>	29,5 ± 6,0	28,9 ± 5,8	30,2 ± 6,3	0,231
<b>Diabetes mellitus (%)</b>	29 (30,2)	11 (22,9)	18 (37,5)	0,182
<b>Raucher (%)</b>	7 (7,3)	4 (8,3)	3 (6,2)	0,999
<b>KHK (%)</b>	16 (16,7)	7 (14,6)	9 (18,8)	0,785
<b>Therapie mit Lipidsenkern (%)</b>	33 (34,4)	15 (31,2)	18 (37,5)	0,668
<b>Systolischer Blutdruck [mmHg]</b>	167 ± 28	160 ± 21	175 ± 32	0,021
<b>Diastolischer Blutdruck [mmHg]</b>	98 ± 20	97 ± 14	99 ± 25	0,521
<b>Kreatinin [mg/dl]</b>	2,80 ± 2,16	2,26 ± 2,12	3,33 ± 2,09	0,008
<b>Harnstoff [mg/dl]</b>	88,7 ± 50,2	70,0 ± 41,7	107,4 ± 51,4	<0,001
<b>eGFR [ml/min/1,73 m<sup>2</sup>]</b>	35,0 ± 23,0	42,3 ± 24,2	27,5 ± 19,2	<0,001
<b>hsCRP [mg/l]</b>	3,2 (6,3)	2,9 (3,3)	4,5 (11,2)	0,058
<b>cLDL [µg/mg LDL-Protein]</b>	30,4 (20,8)	18,3 (20,7)	38,9 (11,5)	<0,001
<b>Gesamt-Cholesterin [mg/dl]</b>	210,4 ± 52,5	207,9 ± 43,6	213,0 ± 60,5	0,563
<b>Triglyzeride [mg/dl]</b>	199,3 ± 122,8	209,4 ± 118,7	189,3 ± 127,3	0,573
<b>HDL-Cholesterin [mg/dl]</b>	55,2 ± 17,4	56,1 ± 19,1	54,2 ± 15,8	0,651
<b>LDL-Cholesterin [mg/dl]</b>	123,5 ± 43,1	118,9 ± 36,0	128,1 ± 49,1	0,298
<b>Hämoglobin [g/dl]</b>	12,5 ± 1,7	12,9 ± 1,7	12,1 ± 1,7	0,049
<b>HbA1c [%]</b>	6,2 ± 0,9	6,1 ± 0,8	6,4 ± 1,0	0,120
<b>Tod (%)</b>	23 (24,0)	5 (10,4)	18 (37,5)	0,004
<b>kardiovaskuläres Ereignis (%)</b>	33 (34,4)	7 (14,6)	26 (54,2)	<0,001

\* Vergleich zwischen beiden Untergruppen, unterteilt anhand des Medians von 28,1 µg cLDL/mg LDL-Protein.

**Tabelle 3: Klinische Charakteristika der Patientenkohorte.** Reproduktion aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

In Mortalitätsanalysen („Survival analyses“) zeigte sich schließlich, dass CKD-Patienten mit LDL-Carbamyl-Lysinspiegeln über dem Median von 28,1  $\mu\text{g}$  cLDL/mg LDL-Proteingehalt eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen (Abb. 26A;  $P=0,002$ ). Zusätzlich waren die LDL-Carbamyl-Lysinspiegel ein signifikanter Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (Abb. 26B;  $P<0,001$ ).



**Abbildung 26: Überlebensanalysen für Gesamt-Mortalität und kardiovaskuläre Ereignisse (Kaplan-Meier) entsprechend der LDL-Carbamyl-Lysinspiegel. (A) Gesamtsterblichkeit und (B) kardiovaskuläre Ereignisse von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung ( $N = 96$ ). Abbildung reproduziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).**

Um den Einfluss weiterer Variablen auf die Assoziation zwischen Carbamyl-Lysinspiegeln und Gesamtmortalität sowie kardiovaskulären Ereignissen ausschließen zu können, wurden mehrere Cox-Regressionsmodelle erstellt. Auch nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, hs-CRP, Diabetes mellitus und prävalenter KHK erwiesen sich die LDL-Carbamyl-Lysinspiegel als signifikanter Prädiktor für Gesamtmortalität und kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (Tabelle 4).

	Gesamtmortalität		Kardiovaskuläre Ereignisse	
	HR (95% KI)	<i>p</i>	HR (95% KI)	<i>p</i>
<b>Modell 1</b>				
cLDL ≤ 28,1 µg/mg LDL	1	...	1	...
cLDL > 28,1 µg/mg LDL	4,26 (1,58 - 11,49)	0,004	4,66 (2,02 - 10,76)	<0,001
<b>Modell 2 *</b>				
cLDL ≤ 28,1 µg/mg LDL	1	...	1	...
cLDL > 28,1 µg/mg LDL	3,34 (1,23 - 9,05)	0,018	4,04 (1,74 - 9,42)	0,001
<b>Modell 3 #</b>				
cLDL ≤ 28,1 µg/mg LDL	1	...	1	...
cLDL > 28,1 µg/mg LDL	2,91 (1,02 - 8,29)	0,046	3,96 (1,67 - 9,39)	0,002

\* adjustiert nach Alter und Geschlecht

# adjustiert nach Alter, Geschlecht, hs-CRP, Diabetes mellitus und KHK

**Tabelle 4: Cox-Regression für Gesamtmortalität und kardiovaskuläre Ereignisse in Abhängigkeit vom cLDL-Basisspiegel.** Reproduktion aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, wie carbamyliertes LDL über eine gesteigerte Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale und eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit endotheliale Dysfunktion induziert. Ebenso wurden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dieser Effekte via LOX-1 Rezeptorbindung und konsekutiver p38-MAPK- und NADPH-Oxidase-Aktivierung identifiziert, welche die ROS-Produktion stimulieren. Während cLDL die Aktivität der eNOS durch veränderte Phosphorylierung direkt inhibiert, erfolgt gleichzeitig perpetuiert durch die gesteigerte ROS-Produktion eine Entkopplung der eNOS infolge S-Glutathionylierung. Die Bedeutsamkeit dieser neuen pathophysiologischen Erkenntnisse für Patientengruppen mit hohem kardiovaskulärem Risiko, wie chronisch Nierenkranken, wurde in einer prospektiven klinischen Studie untersucht. Hier zeigte sich, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und erhöhten LDL-Carbamyl-Lysinpiegeln eine signifikant erhöhte Mortalität aufweisen.

### 6.1 Proteincarbamylierung und deren funktionelle Konsequenzen

Carbamylierung beschreibt eine posttranslationale Proteinmodifikation durch kovalente Bindung von elektrophilem Isocyanat an nukleophile funktionelle Gruppen, wie dem N-Terminus eines Proteins bzw. einer Aminosäure ( $\text{NH}_2$ ) oder der stark basischen  $\epsilon$ -Aminogruppe ( $\text{NH}_3^+$ ) eines Lysinrestes [71]. Letzteres führt zur irreversiblen Bildung von Carbamyllysin (Homocitrullin) und wurde 1960 von Stark *et al.* als unerwünschter Nebeneffekt während reversibler Denaturierungs-Renaturierungsversuche von Proteinen mit Harnstoff beobachtet [40]. In geringerem Ausmaß können auch die basischen Guanidinogruppen von Argininresten und reduzierten Thiolresten von Cystein carbamylt werden [72].

Der Großteil an reaktivem Isocyanat für relevante Carbamylierungsvorgänge *in vivo* stammt entweder aus dem spontanen Zerfall von Harnstoff aus dem Proteinkatabolismus oder wird enzymatisch über die Myeloperoxidase- (MPO-) katalysierte Oxidation von Thiocyanaten gebildet, deren stark erhöhte Serumspiegel insbesondere bei Rauchern nachgewiesen werden konnten [40,73]. Eine Akkumulation und verstärkte katalytische Aktivität des Leukozytenenzym MPO wurde wiederum in Entzündungsherden und atherosklerotischen Plaques nachgewiesen und eine Assoziation zu deren Vulnerabilität postuliert [40,74-77].

Proteincarbamylierung wurde somit als intrinsischer Stoffwechselweg bei Inflammationsprozessen und der Atherogenese identifiziert, wobei mittlerweile in zahlreichen weiteren Geweben und Organsystemen Carbamylierungsprozesse beschrieben wurden. Durch Beeinflussung von Struktur und Funktion extrazellulärer Matrixproteine wie Typ I Kollagen und Elastin wurde beispielsweise zuletzt eine Rolle der Carbamylierung bei molekularen Degenerations- und Alterungsprozessen postuliert [78]. Darüber hinaus gelten durch spontane Carbamylierung modifizierte Proteine mittlerweile als Schlüsselmediatoren zerebraler Proteinopathien in der Demenzforschung [79]. So konnte gezeigt werden, dass Carbamylierung von Tau-Proteinen *in vitro* zu gesteigerter Selbstassoziation zu für die Alzheimer-Demenz typischen, gepaarten helikalen Tau-Filamenten führt [80].

Ferner ist bekannt, dass durch posttranslationale Proteinmodifikationen potentielle Neoepitope auf körpereigenen Proteinen entstehen, welche aufgrund von Autoantikörperbildung für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Diabetes mellitus, systemischem Lupus erythematodes oder rheumatoider Arthritis verantwortlich sind [81]. Mydel *et al.* gelang so im Mausmodell durch Injektion von Homocitrullin-haltigen Peptiden die Induktion von Chemotaxis, T-Zell-Aktivierung, Antikörperproduktion und Ausbildung des Phänotyps einer erosiven Arthritis [82,83]. Dies suggeriert, dass die Bildung von Homocitrullin durch Carbamylierung von Lysinresten als Schlüsselschritt in der Auslösung von entzündlichen Reaktionen fungiert. Ziel aktueller Untersuchungen ist es zu überprüfen, ob Autoantikörper gegen carbamylierte Proteine als Biomarker der Erkrankungsaktivität bei rheumatoider Arthritis eingesetzt werden können [84].

Weitere charakteristische Effekte der Carbamylierung beinhalten die Änderungen des Molekulargewichts und isoelektrischen Punkts der betroffenen Proteine sowie deren Aggregationstendenzen, was oftmals einen Verlust der enzymatischen Aktivität bedingt. So konnte *in vitro* ein Verlust der Chaperon-Funktion des für die Transparenz der Augenlinse verantwortlichen Hauptstrukturproteins  $\alpha$ -Crystallin unter der Ausbildung von Disulfidbrücken mit Proteinaggregation infolge Carbamylierung nachgewiesen und hierdurch eine Bedeutsamkeit für die Katarakt-Genese aufgezeigt werden [85]. Auch Erythropoetin verliert nach Carbamylierung seine Wirkung auf Hämatopoese, Blutdruck und Gefäßtonus, sodass dessen gewebs- und neuroprotektiven Effekte in Tiermodellen überwiegen [86,87]. Weiterhin führt die Carbamylierung von Insulin zur Reduktion dessen biologischer



(Verringerung des Glukosemetabolismus in Fettzellen) und immunologischer Aktivität [88] und bei Coeruloplasmin zur Beeinträchtigung der Ferroxidase und deren antioxidativer Aktivität [89].

Selbstverständlich stellt Carbamylierung jedoch nicht die einzige relevante Proteinmodifikation *in vivo* dar. Im Rahmen der Atherogenese gut belegt sind die Effekte oxidierten LDLs (oxLDL), wobei einzelne LDL-Partikel simultan carbamylt und oxidiert werden können und im Rahmen der Atherogenese beide Modifikationen koexistent auftreten können [42]. Um valide Untersuchungsbedingungen zu schaffen, mussten während *ex vivo*-Carbamylierung von LDL aus dem Serum gesunder Probanden mit Kalium-Cyanat daher simultane oxidative Veränderungen ausgeschlossen werden. Da sich mittels TBARS-Assay weder vor, noch nach Carbamylierung eine Lipidperoxidation im LDL fand, können oxidative Verunreinigungen als Grundlage aller demonstrierten Effekte zunächst ausgeschlossen werden, welche damit alleine auf cLDL und zurückzuführen sind.

## 6.2 Carbamylierung bei CKD

Während gesunde Personen niedrige systemische Isocyanat-Spiegel aufweisen, sind diese aufgrund des chemischen Gleichgewichts mit Harnstoff bei chronisch Nierenkranken bis auf das Dreifache erhöht [34,90]. In Analogie dazu erreichten die bei Rauchern gemessenen Thiocyanat-Spiegel gegenüber gesunden Kontrollgruppen ebenfalls das Dreifache [40].

Weil das extrem hohe kardiovaskuläre Risiko bei Nierenkranken nicht alleine durch die Prävalenz traditioneller Risikofaktoren erklärt werden kann, wurde 2013 unter anderem von Koeth *et al.* anhand der Plasmaspiegel proteingebundenen Homocitrullins ein Zusammenhang zwischen Carbamylierung im urämischen Milieu einer chronischen Nierenerkrankung und der erhöhten Inzidenz schwerer kardialer Komplikationen postuliert [41]. Mittlerweile sind Carbamylierungsprozesse an einer Vielzahl von Enzymen, Antikörpern, Hormonen, Rezeptoren und Matrixproteinen beschrieben [91], wobei zuletzt v.a. die Rolle carbamylten LDLs als Vermittler endothelialer Dysfunktion untersucht wurde. cLDL begünstigt unter anderem die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und induziert deren Apoptose [39,66,92], stimuliert gleichzeitig Wachstum und Migration glatter Gefäßmuskelzellen [93] sowie die Freisetzung von Matrix-Metallproteinase gegenüber dem weitaus kollagenaseempfindlicheren carbamylten Typ I Kollagen [76,94]. Die Folge sind

atherosklerotische Remodelling-Vorgänge des Endothels und der extrazellulären Matrix. Währenddessen akkumuliert zirkulierendes cLDL aufgrund einer verminderten Bindungsaffinität für die apoB/E-Bindungsdomänen der hepatischen LDL-Rezeptoren mit konsekutiv reduzierter Plasma-Clearance im menschlichen Kreislauf [95,96]. Die erhöhte Affinität für Scavenger-Rezeptoren SR-A1 auf Makrophagen führt dann zur gesteigerten Cholesterineinlagerung und Entwicklung zu „Schaumzellen“, was atherosklerotische und inflammatorische Umbauvorgänge weiter perpetuiert [40].

Auch HDL-assoziierte Proteine sind im urämischen Milieu modifiziert, wobei sich dieser „dysfunktionale“ HDL-Phänotyp durch Verlust der anti-inflammatorischen Eigenschaften, mit verringerter Aufnahmekapazität für Cholesterin und damit einem beeinträchtigten Cholesterintransport aus Makrophagen und der Körperperipherie auszeichnet [31,97]. Hierbei stellt die Carbamylierung eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen dar. Holzer *et al.* fanden in carbamyliertem HDL (cHDL) fünf- bis achtfach erhöhte Spiegel an Carbamyllysin gegenüber cLDL aus denselben atherosklerotischen Läsionen und brachten dies in gute Korrelation mit dem klinischen Ausprägungsgrad der Atherosklerose. Durch Bindung an den Makrophagen-Scavenger-Rezeptor SR-B1 trägt cHDL auch zur Schaumzellbildung im Rahmen der Atherogenese bei [98].

Tierexperimentelle Daten legen zudem nahe, dass carbamyliertes Albumin (C-Alb) zu einem nephrotoxischen Partikel wird und eine progressive peritubuläre Fibrose induzieren kann [99]. C-Alb hemmt ferner die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in neutrophilen Granulozyten, wobei diese Störung des oxidativen Bursts zur erhöhten Inzidenz infektiöser und entzündlicher Komplikationen bei chronischer Nierenerkrankung beitragen kann [100].

Während obige Erkenntnisse jüngeren Publikationen entstammen, wurde Carbamylierung am Hämoglobin bereits in den 70er Jahren beschrieben, als Harnstoff zur Behandlung der Sichelzellanämie eingesetzt wurde [101]. Diese Therapie wurde jedoch aufgrund der erhöhten Kataraktrate, deren Entstehung durch Chaperon-Carbamylierung mittlerweile belegt ist (siehe Kapitel 6.1), wieder verlassen. 1981 wurde dann von Flückiger *et al.* eine spontane Carbamylierung in einer Hämoglobin A-Subfraktion bei chronisch Nierenkranken entdeckt, welche mit der Höhe des Harnstoffspiegels im Blut korrelierte [102]. Seitdem wird diskutiert, ob der prozentuale Anteil carbamylierten Hämoglobins (cHb) bei chronisch Nierenkranken,

analog dem HbA<sub>1c</sub> bei Diabetikern, als Parameter der Dialyseeffizienz benutzt werden kann [37,103]. Gleichzeitig sind Interferenzen bei der HbA<sub>1c</sub>-Bestimmung von Diabetikern mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz durch anteilige Hämoglobin-Carbamylierung in Abhängigkeit der verwendeten Assays beschrieben worden [104].

### 6.3 Endotheliale Effekte von cLDL

Allgemein gefasst umschreibt der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ eine Beeinträchtigung der endothelvermittelten Vasodilatation infolge eines Mangels an bioaktivem Stickstoffmonoxid (NO) in der Gefäßwand [105]. Dass endotheliale Dysfunktion als Schlüsselprozess der Atherogenese im urämischen Milieu mit der Carbamylierung von (Lipo-)Proteinen in Verbindung zu bringen ist, konnte bereits im Vorfeld von verschiedenen Autoren festgestellt werden [38-40], allerdings blieben die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unklar. Eine Verifizierung der generellen Arbeitshypothese endothelialer Dysfunktion infolge spezifischer Carbamylierung von LDL wurde in den grundlegenden Versuchen dieser Arbeit erzielt. In HAEC führte cLDL im Gegensatz zu nLDL zu einer signifikanten Reduktion der basalen NO-Freisetzung, wobei auch eine Inkubation von Aortenringen mit cLDL gleiche Ergebnisse brachte. Oxidative Verunreinigungen des *ex vivo* carbamylierten LDL wurden hierbei schon im Vorfeld mittels TBARS-Assay ausgeschlossen.

Die Bildung von NO erfolgt dabei durch drei verschiedene Isoformen der sog. NO-Synthase (neuronale nNOS/NOS I, induzierbare iNOS/NOS II und endotheliale eNOS/NOS III) und entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über Stimulation löslicher Guanylylcyclasen zur Bildung cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) und der Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasewege [106]. Die physiologischen Funktionen von NO im menschlichen Organismus sind vielschichtig und reichen über die Wirkung als Neurotransmitter [107] und Regulator des Gefäßonus [106] bis auf Gentranskriptionsebene [108]. Alle als Homodimer aufgebauten NO-Synthasen nutzen molekularen Sauerstoff und L-Arginin als Substrate und benötigen neben reduziertem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als weitere Kofaktoren. eNOS wird hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert, stimuliert die Vasodilatation und senkt dadurch den Blutdruck, hemmt ferner das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen, vermindert Thrombozytenaggregation, Leukozytenadhäsion und inflammatorische Prozesse in der Gefäßwand unter Förderung der

kapillären Neo-Angiogenese [60,109]. Es stellt damit einen wichtigen anti-atherogenen Mediator dar.

Während die basale NO-Freisetzung pulsatil in Abhängigkeit vom intrazellulären Kalziumgehalt der Endothelzellen über die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II erfolgt [110], kann die Aktivität der eNOS zusätzlich via Phosphorylierung regulatorischer Aminosäurenreste oder durch den Blutfluss verursachten Scherstress moduliert werden [105]. In der aktuellen Arbeit konnte in HAEC gezeigt werden, dass cLDL über die Dephosphorylierung des aktivierenden Ser1177- und Phosphorylierung des inhibierenden Thr495-Restes die enzymatische Aktivität der eNOS zur Produktion von NO signifikant reduziert [64].

Neben veränderter Enzymaktivität der eNOS, verminderter zellulärer Expression oder einem funktionellen Mangel an Substraten oder Kofaktoren kann eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO durch vermehrtes Aufkommen an ROS verursacht sein [28]. Hierbei kann eine gesteigerte ROS-Produktion sowohl Ursache, als auch Folge einer dysfunktionalen eNOS sein. Denn neben ihrer Rolle als NO-produzierendem Enzym kann eNOS nach Entkopplung auch selbst als Quelle oxidativen Stresses dienen. Im Gegensatz zur Dimerform, welche in einer Kurzschlussreaktion des Harnstoffzyklus die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin unter Freisetzung von NO katalysiert [60], verliert die entkoppelte eNOS diese Fähigkeit NO zu produzieren und generiert stattdessen ROS. Nachgewiesen ist eine eNOS-Entkopplung im Rahmen von Hypercholesterinämie [111], Diabetes mellitus [112] und chronischem Nikotinabusus [113]. Neben Oxidation des essentiellen Kofaktors  $BH_4$  sind L-Arginin-Depletion und Bildung endogener Methylarginine bekannte Hauptursachen der eNOS-Entkopplung [60,109,114]. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot-Analysen gezeigt, dass auch cLDL eine eNOS-Entkopplung induzieren kann. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde die S-Glutathionylierung der eNOS identifiziert, die kürzlich als zu besagter Entkopplung führende posttranslationale Proteinmodifikation beschrieben worden war. Die eNOS weist hierzu zwei für deren Funktionalität bedeutsame, hochkonservierte Cysteinreste auf, deren Thiolseitenketten durch eine Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion reversibel glutathionyliert werden können [59]. Den Nachweis erbrachten wir mittels immunfluoreszenzmikroskopischen Färbungen in HAEC-Kulturen, in welchen nach Stimulation mit cLDL eine Darstellung der Hochregulation endothelialer Protein S-Glutathionylierung in Co-Lokalisierung mit eNOS gelang. Indirekt beweist dies, dass cLDL nicht nur zur Reduktion der

endothelialen NO-Produktion führt, sondern via eNOS-Entkopplung auch gegenläufig zu gesteigerter ROS-Produktion und damit zu einer Störung des endothelialen Redoxgleichgewichts von beiden Seiten. Folgeexperimente sind notwendig, um den präzisen Prozess der Glutathionylierung in Anwesenheit von cLDL zu untersuchen. Wie bereits diskutiert, besteht eine inverse Relation zwischen der endothelialen Bioverfügbarkeit von NO und dem Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [114], welche in der Gefäßwand hauptsächlich durch die vier Enzymsysteme der NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase, der mitochondrialen Atmungskette sowie dysfunktionaler eNOS (nach Entkopplung) gebildet werden [33,105]. In niedrigen Konzentrationen dienen diese unter physiologischen Bedingungen als Signalmoleküle und nehmen eine wichtige Rolle für die Regulation von Gefäßtonus, zellulärer Sauerstoffwahrnehmung, Zellproliferation, Apoptose und Entzündungsantworten ein [115]. Gleichzeitig wird das Gefäßsystem durch Superoxid-Dismutasen, Katalasen und Glutathion-Peroxidase als antioxidativ wirksame Enzymsysteme vor oxidativem Stress geschützt. Da kardiovaskuläre Risikofaktoren und Herz-Kreislauferkrankungen jedoch mit einer chronisch gesteigerten oder akuten Überproduktion von ROS assoziiert sind, mündet dies nach Überwindung des körpereigenen anti-oxidativen Abwehrsystems in oxidativen Stress [105], welcher einen Hauptmechanismus der Atherogenese darstellt [116]. Hierdurch wird die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit weiter vermindert und eine endotheliale Dysfunktion induziert. Die vorliegenden ESR-spektroskopischen Untersuchungen beweisen, dass cLDL sowohl *in vitro*, als auch in murinen Aortenringen *ex vivo* die ROS-Produktion signifikant stimuliert. Diese Resultate stützen die Beobachtungen von Carracedo *et al.* an endothelialen Progenitorzellen, welche nach Inkubation mit cLDL eine verringerte Proliferations- und Angiogeneserate bei beschleunigter zellulärer Seneszenz zeigten [117].

Im Gefäßsystem und Myokard entfällt der Großteil der produzierten ROS auf die Familie der NADPH-Oxidasen [118]. Ihre Vertreter kommen als membrangebundene Multienzymkomplexe in verschiedenen Isoformen in allen Gefäßwandschichten vor, werden vorwiegend in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen sowie der Adventitia exprimiert und generieren unter dem Einsatz von NADPH als Elektronendonator Superoxide aus molekularem Sauerstoff [105]. Eine Hochregulation katalytischer Untereinheiten fand sich in menschlichen Koronararterien im Rahmen der Atherogenese [119] und es sind Verbindungen mit

verschiedenen weiteren Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems beschrieben worden, darunter Bluthochdruck, kardialer Hypertrophie, Herzinsuffizienz und ischämischem Schlaganfall sowie im Rahmen von Kollateralisierungs- und Remodellingvorgängen [120]. Eine Schlüsselrolle der NADPH-Oxidasen für das zelluläre Redoxmilieu belegen auch Untersuchungen, die zeigen, dass über nachgeschaltete Signalwege sowohl eine Entkopplung der eNOS, als auch eine Aktivierung der Xanthin-Oxidase und von MAPK-Signalwegen erfolgen [121]. In der vorliegenden Arbeit führte eine Prä-Inkubation mit den direkten NADPH-Oxidase-Inhibitoren DPI und Captopril [69] zu einer signifikanten Verminderung der cLDL-induzierten endothelialen ROS-Produktion in HAEC. Die Beteiligung der NADPH-Oxidase an der Generierung von oxidativem Stress war somit auch für cLDL indirekt belegt.

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) stellen eine Familie von Proteinkinasen dar, welche über Phosphorylierungskaskaden in mehrstufigen Signaltransduktionswegen zelluläre Wachstums-, Differenzierungs- und Anpassungsvorgänge steuern [122]. Sie vermitteln die zellulären Antworten diverser Stimuli wie Mitogenen, proinflammatorischen Zytokinen, Hitzeschockproteinen oder osmotischem Stress [123]. Die Expression von MAPK ist im Mausmodell in atherosklerotischen Läsionen gesteigert [124]. Unter den MAPK stellt p38 ein wichtiges Enzym dar, welches zelluläre Inflammation, Differenzierung und Apoptose in Reaktion auf Tumornekrosefaktoren oder Interleukine steuert [125] und zu Adaptationsprozessen im hypertonen Milieu beiträgt [126]. In Analogie zu NADPH-Oxidase und eNOS-Entkopplung stellt die gesteigerte Produktion von ROS so nicht nur eine mögliche Folge der p38 MAPK-Aktivierung dar [127], sondern ROS wirken ebenfalls als direkte Stimuli der p38 MAPK [128]. Die Wirksamkeit der Unterbrechung dieser Kaskade für das zelluläre Überleben zeigten Borodkina *et al.*. Ihnen gelang es, die durch subletalen oxidativen Stress induzierte, vorzeitige Zellseneszenz in menschlichen endometrialen Stammzellen durch den p38 MAPK-Inhibitor SB203580 aufzuhalten und erhöhte ROS-Spiegel zu senken [127]. Direkte Verknüpfungen mit der NADPH-Oxidase zeigen Rosenkranz *et al.* auf, welche durch spezifische p38 MAPK-Inhibition eine Aufhebung der NO-schonenden Effekte von Dihydropyridinen im Rahmen NADPH-Oxidase gesteuerter Superoxid-Produktion beobachteten [70]. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, spielt p38 MAPK eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der zellulären Wirkungen von cLDL. Nach p38-spezifischer Inhibition mittels SB202190 wurde die

zuvor nach Inkubation von HAEC mit cLDL gesteigerte ROS-Produktion nahezu normalisiert. Dies legt nahe, dass cLDL einen Großteil des zellulären oxidativen Stresses nicht ohne p38-MAPK-Signaltransduktionswege vermitteln kann.

Die Aktivierung von MAPK erfolgt dabei entweder durch spezifische phosphorylierende MAPK-Kinasen oder Autophosphorylierung nach Interaktion mit Liganden-aktivierten Bindeproteinen, wie dem TGF-beta aktivierten Kinase 1 (MAP3K7) Bindeprotein 1 [129]. In Ergänzung zur Aufhebung der cLDL-induzierten ROS-Produktion durch p38 MAPK-Inhibition konnte cLDL in Western Blots auch eine Phosphorylierung von p38 MAPK induzieren.

Wie die exakte intrazelluläre Signaltransduktionskaskade der cLDL-induzierten endothelialen Dysfunktion verläuft, lässt sich aufgrund der Vielzahl gegenseitiger Verknüpfungspunkte nicht vollständig beschreiben. Allerdings können eNOS, NADPH-Oxidase und p38 MAPK als kritisch beteiligte Enzymkomplexe aufgezeigt werden. Dabei scheinen die beschriebenen schädigenden Effekte von cLDL gegenüber der Gefäßwand nicht nur auf eine direkte Wirkung an Endothelzellen beschränkt zu sein. So konnten jüngste Erkenntnisse von Holy *et al.* 2016 im Mausmodell ein erhöhtes Thromboserisiko nach Stimulation mit cLDL nachweisen [130]. Die verstärkte Thrombozytenaggregation war hierbei auch auf eine Beteiligung desselben p38-MAPK-Signaltransduktionsweges zurückzuführen und untermauert den Stellenwert gestörter Thrombolyse als unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor chronisch Nierenkranker [131]. Weitere Anhaltspunkte für eine dem cLDL analoge Transformation von HDL in ein proatherogenes Partikel nach Carbamylierung zeigten Sun *et al.* 2016 auf, wobei HDL-Isolate chronisch Nierenkranker gegenüber gesunden Probanden auch einen entsprechend erhöhten Carbamylierungsgrad aufwiesen. *In vitro* hemmte cHDL die Migration, Angiogenese und Proliferation von Endothelzellen und war mit einer Störung des reversen Cholesterintransports verbunden [132].

Diese Erkenntnisse untermauern die These, dass Carbamylierung bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine bedeutsame posttranslationale Proteinmodifikation darstellt, die eine systemische Wirkung auf verschiedene Serumproteine ausübt, damit alle Gefäßwandschichten und verschiedene Organsysteme betrifft. Drechsler *et al.* folgern so beispielsweise aufgrund der Daten von Mortalitätsanalysen anhand der Plasmaspiegel carbamylierten Albumins eine Assoziation zwischen Carbamylierung und urämischer Kardiomyopathie bei diabetischer Nephropathie [133].

Im Gegensatz dazu wird von anderen Autoren die endotheliale Dysfunktion im urämischen Milieu weniger auf die Carbamylierung von Lipoproteinen, als auf direkte Effekte von Harnstoff bzw. Cyanat zurückgeführt [134].

#### **6.4 Rolle des Rezeptors LOX-1**

Im Gegensatz zur Carbamylierung sind andere Lipoproteinmodifikationen bereits besser untersucht worden. Insbesondere oxidiertes LDL (oxLDL) wurde schon vor einigen Jahren im Initialstadium der Atherogenese in betroffenen Gefäßwänden nachgewiesen und erhöhte oxLDL-Serumspiegel als Prognosefaktoren bei Patienten mit KHK identifiziert [33]. Direkte Interaktion von oxLDL mit dem Endothel führt zu zellulären Umbauprozessen mit der Folge von Zellproliferation oder apoptotischem Zelltod, wobei die Toxizität von oxLDL neben der direkten Produktion von Superoxiden durch Lipidperoxidation auf eine eNOS-Entkopplung und Aktivierung der NADPH-Oxidase zurückgeführt wurde [33,51]. Auch wurde eine verminderte vaskuläre Relaxationsfähigkeit von Aortenringen nach Inkubation mit LDL-Isolaten von Patienten mit Diabetes mellitus Typ II [45] durch spezifische Beeinträchtigung der NO-vermittelten Reaktion durch oxLDL begründet [32,44]. Diese oxLDL-vermittelten Remodellingvorgänge werden insbesondere durch p38 und p44/42 MAPK-abhängige Signalwege vermittelt [67].

Die oben genannten molekularen Signalwege von oxLDL weisen starke Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit zuvor untersuchten Transduktionswegen von cLDL auf. Auch ist bekannt, dass modifizierte Lipoproteine (z.B. glykiertes oder oxidiertes LDL) stärker an Scavengerrezeptoren binden als an „normale“ LDL-Rezeptoren. In Endothelzellen wurde dabei LOX-1 (Scavenger-Rezeptor Klasse E) als der für Bindung, Internalisierung und Degradation von oxLDL verantwortliche Rezeptor identifiziert [135]. Die Beobachtung, dass bei Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie oder Dyslipidämie, als auch in atherosklerotischen Plaques eine erhöhte Expression von LOX-1 vorliegt [136,137], legt eine bedeutsame Involvierung von LOX-1 in der Atherogenese nahe. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von LOX-1 durch oxLDL in Endothelzellen die direkte Freisetzung von ROS sowie eine pro-inflammatorische Endothelaktivierung bedingt [65]. Dabei stimulieren ROS sowie mittlere Konzentrationen von oxLDL nach Rezeptorbindung im hyperlipidämischen Milieu die weitere Expression von LOX-1 auf Endothelzellen



und Makrophagen und schaffen so einen positiven Rückkopplungsmechanismus, während hohe Konzentrationen direkt zytotoxisch wirken [33,138,139].

In der Folge wurden verschiedene Scavenger-Rezeptoren auch als Vermittler der proatherogenen Eigenschaften von cLDL auf Endothelzellen identifiziert [66]. Während Scavenger-Rezeptoren wie CD36, SREC-1 und SR-A1 an der Internalisierung und Transzytose von cLDL beteiligt sind, konnte nachweislich nur durch Inhibition von LOX-1 die cLDL-vermittelte Zytotoxizität und Monozytenadhäsion aufgehoben werden. Auch zeigte sich nur für LOX-1 eine positive Rückkopplung mit endothelialer Rezeptor-Hochregulation analog der Wirkung von oxLDL [66].

Dass LOX-1 somit auch den Rezeptor darstellt, welcher die zellulären Effekte von cLDL in Endothelzellen vermittelt, bestätigte in der vorliegenden Arbeit die Normalisierung der durch cLDL reduzierten endothelialen NO-Produktion nach Gen-Silencing von *LOX1* durch siRNA-Transfektion in HAEC. Indirekt wird hierdurch auch die Bedeutsamkeit der NADPH-Oxidase und MAPK für die Wirkung von cLDL validiert, welche als nachgeschaltete Transduktoren von LOX-1 dokumentiert worden sind [67] und in den Vorversuchen eine Störung des zellulären Redoxgleichgewichts zuungunsten der NO-Bioverfügbarkeit bewirken konnten. In Übereinstimmung damit ließ sich ergänzend durch eine Endothel-spezifische Überexpression von LOX-1 in *Lox1/Tg*-Mäusen *in vivo* eine weitere Steigerung der cLDL-induzierten ROS-Produktion im Vollblut und Aortenringen dieser Tiere erzielen.

Dass sich die Bedeutung von LOX-1 nicht nur auf das Endothel beschränkt, verdeutlicht die bereits genannte Studie von Holy *et al.* Hier wurde gezeigt, dass auch pro-thrombogene Eigenschaften von cLDL über eine gesteigerte Expression von LOX-1 auf Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen vermittelt werden [131].

## **6.5 Klinische Bedeutung der Proteincarbamylierung**

Bereits 2007 postulierten Wang *et al.* Homocitrullin (=Carbamyllsin) als unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor [40]. In einer Fall-Kontroll-Studie untersuchten die Autoren retrospektiv die Plasmaspiegel proteingebundenen Homocitrullins (PBHCit) zweier Gruppen der Genebank-Population, die sich darin unterschieden, ob binnen drei Jahren nach Aufnahme in die Datenbank schwere kardiovaskuläre Komplikationen dokumentiert wurden. Auch nach Adjustierung für traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren, Nierenfunktion, MPO und CRP konnten erhöhte Homocitrullin-Spiegel dosisabhängig mit dem Risiko einer Revaskulari-

sierungsbedürftigkeit bei KHK, zukünftigen Myokardinfarkten, ischämischen Schlaganfällen oder Tod assoziiert werden [40].

2013 spezifizierten Koeth *et al.* diese Beobachtungen für Patienten mit chronischer Nierenerkrankung. In einer Kohortenstudie wurden 347 Patienten ab dem Beginn ihrer Langzeitdialysebehandlung für fünf Jahre nachbeobachtet und gesteigerte Proteincarbamylierung (gemessen anhand der PBHCit-Spiegel) dosisabhängig mit erhöhter Mortalität assoziiert [41]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass bei Dialysepatienten ein geringeres Ausmaß an Proteincarbamylierung mit einem geringeren Mortalitätsrisiko assoziiert ist. Veränderungen der Carbamylierung konnten das Mortalitätsrisiko der Studienteilnehmer unabhängig von traditionellen Faktoren wie Dialyseeffektivität und Proteinhaushalt vorhersagen [140].

Im Gegensatz zur globalen Bestimmung des proteingebundenen Homocitrullins wurde in der vorliegenden Arbeit spezifisch im LDL die Anzahl carbamylierter Lysin-Reste quantifiziert. Während Nierengesunde keine detektierbare Carbamylierung im LDL aufwiesen, konnte in LDL-Isolaten von stabilen Prä-Dialysepatienten ein mittlerer Carbamyl-Lysin-Gehalt von  $54 \pm 4$  modifizierten Lysinresten dokumentiert werden. Auch konnte nach Inkubation von HAEC mit den LDL-Isolaten chronisch Nierenkranker eine gegenüber *ex vivo* carbamyliertem LDL vergleichbare, signifikante Reduktion der basalen NO-Produktion nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass das von Nierenkranken isolierte LDL stärker carbamyliert war, als das in den Experimenten verwendete *ex vivo* modifizierte LDL. Dies unterstreicht die klinische Relevanz der Untersuchungen dieser Arbeit. Der höhere Grad an Carbamyl-Lysin im LDL chronisch Nierenkranker könnte hierbei auf zusätzliche Cyanat-unabhängige Carbamylierungsprozesse (wie der MPO) oder weitere, bislang nicht identifizierte Mechanismen zurückzuführen sein.

In einer prospektiven Studie wurde an nicht-dialysepflichtigen chronisch Nierenkranken zudem untersucht, ob sich ein höherer Grad an LDL-Carbamylierung auch mit einer erhöhten Mortalität assoziieren lässt. Selbst nach Adjustierung für zusätzliche Kovariaten wie Alter, Geschlecht, CRP, Diabetes mellitus und prävalenter KHK konnte eine durchschnittlich drei- bis vierfach höhere Gesamtmortalität sowie vierfach höhere Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse in der Patientengruppe mit LDL-Carbamyl-Lysinspiegeln über dem Median von  $28,1 \mu\text{g cLDL/mg LDL-Proteingehalt}$  objektiviert werden. Diese Untersuchungen etablieren cLDL als spezifischen Prädiktor einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität bei chronisch

Nierenkranken. Der Nachweis erhöhter Serumspiegel bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung oder KHK [39], deren unabhängige prognostische Aussagekraft, als auch die direkten endothelschädigenden Effekte unterstreichen den Stellenwert von cLDL als wichtigen kardiovaskulären Risikofaktor in diesem Patientenkollektiv.

Zudem impliziert eine Publikation aus der Deutschen Diabetes Dialyse (4D) Studie eine potentielle Überlegenheit von cLDL gegenüber carbamyltem Albumin (C-Alb) als Mortalitätsprädiktor bei chronisch Nierenkranken [133]. Die C-Alb-Konzentrationen korrelierten signifikant mit denen der kardialen Stressmarker Troponin-T und NT-proBNP und waren assoziiert mit dem Vorliegen von Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz. Das Risiko thrombogener Ereignisse im arteriellen Stromgebiet (Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall) wurde (im Gegensatz zu cLDL) durch C-Alb jedoch nicht adäquat abgebildet.

## **6.6 Therapeutische Konsequenzen**

Es existiert eine große Evidenz aus einer Vielzahl randomisierter Studien, dass eine medikamentöse Hemmung der Cholesterinsynthese und damit konsekutiv niedrigeren LDL-C Spiegel sowohl in der Primär- als auch in der Sekundärprophylaxe mit einem verbesserten kardiovaskulären Outcome assoziiert ist [141]. Die bekannteste Medikamentenklasse stellen hierbei die  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) dar, deren pleiotrope Effekte auch zum Teil auf einer Aktivitäts- und Expressionssteigerung der eNOS sowie Inhibition der NADPH-Oxidase beruhen [109].

Die medikamentöse Kombination mit Ezetimib, einem selektiven Hemmstoff der intestinalen Cholesterinresorption ermöglicht gegenüber der Monotherapie mit Statinen eine stärkere Senkung der LDL-Cholesterinspiegel und damit der kardiovaskulären Mortalität [142]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese Wirkung unter anderem auf einer Hemmung der Schaumzellenbindung durch verminderte Expression der Scavenger-Rezeptoren CD36 und SR-B1 bei gleichzeitiger Hochregulation von apoE und Caveolin-1 auf Makrophagen beruht [143]. Spezifisch wird so auch die Interaktion mit carbamylten Lipoproteinen behindert, was die beobachtete Mortalitätsreduktion im atherosklerotischen Milieu gut erklären würde.

Zuletzt stehen mit Hemmstoffen der Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK-9-Inhibitoren) mittlerweile monoklonale Antikörper zur Verfügung, welche bei nicht ausreichender LDL-Cholesterin-Senkung unter Statin-/Ezetimib-Maximaldosis

oder bei unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Myopathien oder Myalgien als Alternative eingesetzt werden können. Während in der 4D-Studie eine Statin-Therapie nur bei Patienten mit niedrigen C-Alb-Spiegeln mit einer verminderten Mortalität assoziiert war [133], sollte untersucht werden, ob auch die Effektivität der PCSK-9-Inhibitoren von der „Carbamylierungslast“ des Organismus abhängig ist und inwieweit PCSK-9-Inhibitoren die Plasmakonzentrationen von cLDL beeinflussen.

Spezifische Therapiestrategien, die die Carbamylierung negativ beeinflussen, existieren bislang nicht. Zukünftige Beachtung gilt hier dem körpereigenen Aminosäurehaushalt, denn urämische Carbamylierungsvorgänge ereignen sich nicht nur an Proteinen, sondern auch an freien Aminosäuren. Außerdem reagieren  $\alpha$ -Aminogruppen freier Aminosäuren aufgrund ihrer geringeren Säurekonstante ( $pK_S$ -Wert) bei physiologischem pH-Wert mehr als hundertfach schneller als die  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten komplexer Proteine [72,144]. Der körpereigene Aminosäurepool könnte daher die Funktion eines natürlichen „Cyanatfängers“ wahrnehmen. So konnten Berg *et al.* kürzlich zeigen, dass alle untersuchten freien Aminosäuren die Carbamylierung von Albumin *in vitro* in unterschiedlichem Ausmaß beeinträchtigen [135]. Analog konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Anwesenheit von L-Arginin, L-Cystein und L-Histidin während *ex vivo* Carbamylierung von LDL tatsächlich den Grad der Carbamylierung reduziert und diese modifizierten LDL-Partikel nicht mehr zur Induktion einer endothelialen ROS-Produktion führen. Unterstützung der These, durch parenterale Aminosäuresubstitution eine Carbamylierung *in vivo* zu reduzieren, bot eine vielversprechende Pilot-Studie von Kalim *et al.* an 23 Dialysepatienten. Die Behandlung mit 14 g einer Mixtur essentieller Aminosäuren nach jeder Hämodialyse führte hier zu einer deutlichen Reduktion der C-Alb-Spiegel [145]. Ob dies allerdings tatsächlich zu einer verminderten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei Nierenkranken führt, bleibt unklar.

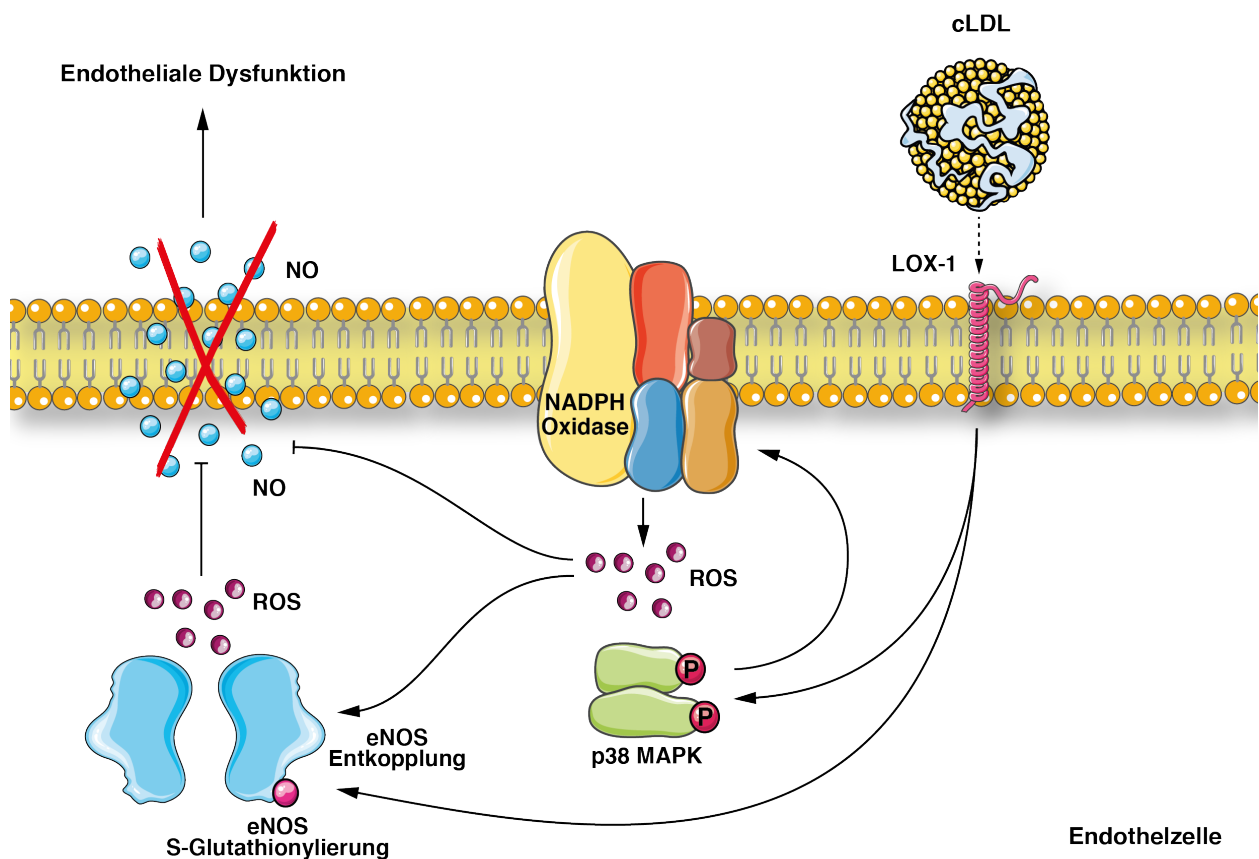
## **6.7 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Dissertation konnten die spezifischen endothelialen Wirkmechanismen von carbamylisiertem LDL aufgezeigt (siehe Abbildung 27), das relevante Auftreten von LDL-Carbamylierung bei chronisch Nierenkranken bewiesen und die Bedeutung des Ausmaßes an LDL-Carbamylierung als Prädiktor von

Mortalität und schweren kardiovaskulären Komplikationen bei chronisch Nierenkranken demonstriert werden.

Nach Interaktion von cLDL mit dem endothelialen Rezeptor LOX-1 fungieren NADPH-Oxidase sowie p38-MAPK-Signalweg zunächst selbst als Quellen einer sich perpetuierenden Produktion von ROS und führen darüberhinaus zur Entkopplung der eNOS durch S-Glutathionylierung. Neben Steigerung der ROS-Produktion senkt cLDL die endotheliale Bioverfügbarkeit von NO weiterhin direkt durch Aktivitätsminderung der eNOS infolge veränderter Enzymrestphosphorylierung.

Die Untersuchungen unterstreichen die zentrale Bedeutung von cLDL bei der Entstehung vaskulärer Komplikationen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Darüberhinaus sind die Ergebnisse bei allen Konditionen von Relevanz, die mit erhöhten cLDL-Konzentrationen einhergehen wie Rauchen oder Diabetes mellitus. Die Modulation der Carbamylierung von LDL stellt hierbei perspektivisch einen interessanten therapeutischen Ansatz dar.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung molekularer Mechanismen der cLDL-induzierten endothelialen Dysfunktion.** Abbildung modifiziert aus Originalpublikation zu dieser Arbeit (Speer *et al.* Eur Heart J 2014).

## 7. Literaturverzeichnis

1. Global Burden of Disease Study, C., *Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. **386**(9995): p. 743-800.
2. Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland – Fachserie 12 Reihe 4 – 2014, A.
3. Kannel, W.B., et al., *Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study*. Ann Intern Med, 1961. **55**: p. 33-50.
4. Assmann, G. and H. Schulte, *The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease*. Am Heart J, 1988. **116**(6 Pt 2): p. 1713-24.
5. Klag, M.J., et al., *Blood pressure and end-stage renal disease in men*. N Engl J Med, 1996. **334**(1): p. 13-8.
6. Tozawa, M., et al., *Blood pressure predicts risk of developing end-stage renal disease in men and women*. Hypertension, 2003. **41**(6): p. 1341-5.
7. Foley, R.N. and A.J. Collins, *End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(10): p. 2644-8.
8. Collins, A.J., et al., *'United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2012. **59**(1 Suppl 1): p. A7, e1-420.
9. Stevens, P.E., A. Levin, and M. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group, *Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline*. Ann Intern Med, 2013. **158**(11): p. 825-30.
10. Herold G: *Innere Medizin*. Herold, G. Köln, 2013 S. 636-645.
11. Vanholder, R., et al., *Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(6): p. 1048-56.
12. Sarnak, M.J., et al., *Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2154-69.
13. Apostolov, E.O., et al., *Carbamylated low-density lipoprotein: nontraditional risk factor for cardiovascular events in patients with chronic kidney disease*. J Ren Nutr, 2012. **22**(1): p. 134-8.
14. Barquera, S., et al., *Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 328-38.
15. Martin, S.S., et al., *Dyslipidemia, coronary artery calcium, and incident atherosclerotic cardiovascular disease: implications for statin therapy from the multi-ethnic study of atherosclerosis*. Circulation, 2014. **129**(1): p. 77-86.
16. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Boren, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-44.

17. Steinberg, D., *Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1211-7.
18. Faxon, D.P., et al., *Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2617-25.
19. Tabas, I., *Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 36-46.
20. Kolodgie, F.D., et al., *Is pathologic intimal thickening the key to understanding early plaque progression in human atherosclerotic disease?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 986-9.
21. Kolodgie, F.D., et al., *Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma*. N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2316-25.
22. Aikawa, M. and P. Libby, *The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach*. Cardiovasc Pathol, 2004. **13**(3): p. 125-38.
23. Forstermann, U., *Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008. **5**(6): p. 338-49.
24. Feletou, M., R. Kohler, and P.M. Vanhoutte, *Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses*. Ann Med, 2012. **44**(7): p. 694-716.
25. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
26. Naseem, K.M., *The role of nitric oxide in cardiovascular diseases*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(1-2): p. 33-65.
27. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
28. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
29. Li, H. and U. Forstermann, *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(2): p. 161-7.
30. Mineo, C., et al., *Endothelial and antithrombotic actions of HDL*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1352-64.
31. Speer, T., S. Zewinger, and D. Fliser, *Uraemic dyslipidaemia revisited: role of high-density lipoprotein*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(10): p. 2456-63.
32. Tanner, F.C., et al., *Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 2012-20.
33. Galle, J., et al., *Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells*. Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 219-26.
34. Kraus, L.M. and A.P. Kraus, Jr., *Carbamoylation of amino acids and proteins in uremia*. Kidney Int Suppl, 2001. **78**: p. S102-7.
35. Oimomi, M., et al., *Carbamoylation of hemoglobin in renal failure and clinical aspects*. Metabolism, 1984. **33**(11): p. 999-1002.
36. Basnakian, A.G., et al., *Carbamylated LDL*. Adv Clin Chem, 2010. **51**: p. 25-52.
37. Kalim, S., et al., *Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications*. Am J Kidney Dis, 2014. **64**(5): p. 793-803.
38. Apostolov, E.O., et al., *Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(11): p. 1852-7.
39. Ok, E., et al., *Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease*. Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 173-8.
40. Wang, Z., et al., *Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1176-84.

41. Koeth, R.A., et al., *Protein carbamylation predicts mortality in ESRD*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(5): p. 853-61.
42. Apostolov, E.O., et al., *Carbamylated-oxidized LDL: proatherosclerotic effects on endothelial cells and macrophages*. J Atheroscler Thromb, 2013. **20**(12): p. 878-92.
43. Speer, T., et al., *Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction*. Eur Heart J, 2014.
44. Hein, T.W., J.C. Liao, and L. Kuo, *oxLDL specifically impairs endothelium-dependent, NO-mediated dilation of coronary arterioles*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1): p. H175-83.
45. McNeill, K.L., et al., *Inhibitory effects of low-density lipoproteins from men with type II diabetes on endothelium-dependent relaxation*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(6): p. 1622-7.
46. Havel, R.J., H.A. Eder, and J.H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. J Clin Invest, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
47. Berg, A.H., et al., *Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure*. Sci Transl Med, 2013. **5**(175): p. 175ra29.
48. Esterbauer, H., et al., *Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein*. Free Radic Res Commun, 1989. **6**(1): p. 67-75.
49. Timmons, L., et al., *Inducible systemic RNA silencing in Caenorhabditis elegans*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(7): p. 2972-83.
50. Shi, Y., et al., *Oxidized low-density lipoprotein activates p66Shc via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, protein kinase C-beta, and c-Jun N-terminal kinase kinase in human endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(9): p. 2090-7.
51. Akhmedov, A., et al., *Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo*. Eur Heart J, 2014. **35**(40): p. 2839-48.
52. Müller, J., D. Rösch, and L.W. Kroh, *Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR). Schnellmethoden zur Beurteilung von Lebensmitteln und ihren Rohstoffen*. Eds W. Baltes, L.W. Kroh, Behr's Verlag GmbH Co KG, Hamburg, 3. Auflage, 2004: p. 251-271.
53. Rohn, S. and L.W. Kroh, *Electron spin resonance--a spectroscopic method for determining the antioxidative activity*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(10): p. 898-907.
54. Dikalov, S. and B. Fink, *ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues*. Methods Enzymol, 2005. **396**: p. 597-610.
55. James, P.E., M. Miyake, and H.M. Swartz, *Simultaneous measurement of NO(\*) and PO(2) from tissue by in vivo EPR*. Nitric Oxide, 1999. **3**(4): p. 292-301.
56. Vanin, A.F., *Iron diethyldithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection*. Methods Enzymol, 1999. **301**: p. 269-79.
57. Vedernikov, Y.P., et al., *Effect of diethyldithiocarbamate on the activity of nitric oxide-releasing vasodilators*. Eur J Pharmacol, 1992. **212**(1): p. 125-8.
58. Lobysheva, I., et al., *Moderate caveolin-1 downregulation prevents NADPH oxidase-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling by angiotensin II in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(9): p. 2098-105.
59. Chen, C.A., et al., *S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1115-8.
60. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.



61. Jankowski, V., et al., *Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(2): p. 297-302.
62. Rogacev, K.S., et al., *CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease*. *Eur Heart J*, 2011. **32**(1): p. 84-92.
63. Seiler, S., et al., *FGF-23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment*. *Nephrol Dial Transplant*, 2010. **25**(12): p. 3983-9.
64. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
65. Cominacini, L., et al., *Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(17): p. 12633-8.
66. Apostolov, E.O., et al., *Scavenger receptors of endothelial cells mediate the uptake and cellular proatherogenic effects of carbamylated LDL*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(10): p. 1622-30.
67. Dandapat, A., et al., *Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2435-42.
68. Egan, T.M., et al., *Captopril--a potential free radical scavenger: inhibition of PMN NADPH oxidase*. *Clin Invest Med*, 1988. **11**(5): p. 351-6.
69. van der Giet, M., et al., *Captopril and quinapril reduce reactive oxygen species*. *Eur J Clin Invest*, 2002. **32**(10): p. 732-7.
70. Rosenkranz, A.C., et al., *Endothelial antioxidant actions of dihydropyridines and angiotensin converting enzyme inhibitors*. *Eur J Pharmacol*, 2006. **529**(1-3): p. 55-62.
71. Stark GR, S.W., Moore S, *Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins*. *J Biol Chem*, 1960. **40**:3177-3181.
72. Jaisson, S., C. Pietrement, and P. Gillery, *Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis*. *Clinical chemistry*, 2011. **57**(11): p. 1499-505.
73. Husgafvel-Pursiainen, K., et al., *Passive smoking at work: biochemical and biological measures of exposure to environmental tobacco smoke*. *International archives of occupational and environmental health*, 1987. **59**(4): p. 337-45.
74. Daugherty, A., et al., *Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions*. *The Journal of clinical investigation*, 1994. **94**(1): p. 437-44.
75. Hazen, S.L. and J.W. Heinecke, *3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima*. *The Journal of clinical investigation*, 1997. **99**(9): p. 2075-81.
76. Jaisson, S., et al., *Impact of carbamylation on type I collagen conformational structure and its ability to activate human polymorphonuclear neutrophils*. *Chemistry & biology*, 2006. **13**(2): p. 149-59.
77. Podrez, E.A., et al., *Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro*. *The Journal of clinical investigation*, 1999. **103**(11): p. 1547-60.
78. Gorisse, L., et al., *Protein carbamylation is a hallmark of aging*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016. **113**(5): p. 1191-6.

79. Adav, S.S. and S.K. Sze, *Insight of brain degenerative protein modifications in the pathology of neurodegeneration and dementia by proteomic profiling*. Molecular brain, 2016. **9**(1): p. 92.
80. Farias, G., C. Gonzalez-Billault, and R.B. Maccioni, *Immunological characterization of epitopes on tau of Alzheimer's type and chemically modified tau*. Molecular and cellular biochemistry, 1997. **168**(1-2): p. 59-66.
81. Pruijn, G.J., *Citrullination and carbamylation in the pathophysiology of rheumatoid arthritis*. Frontiers in immunology, 2015. **6**: p. 192.
82. Doyle, H.A. and M.J. Mamula, *Posttranslational modifications of self-antigens*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2005. **1050**: p. 1-9.
83. Mydel, P., et al., *Carbamylation-dependent activation of T cells: a novel mechanism in the pathogenesis of autoimmune arthritis*. Journal of immunology, 2010. **184**(12): p. 6882-90.
84. Gavrilu, B.I., C. Ciofu, and V. Stoica, *Biomarkers in Rheumatoid Arthritis, what is new?* Journal of medicine and life, 2016. **9**(2): p. 144-8.
85. Yan, H., L. Yao, and Y. Hui, *Decreased chaperone activity of alpha-crystallin by carbamylation in vitro*. Yan ke xue bao = Eye science, 2004. **20**(4): p. 264-7.
86. Lapchak, P.A., *Carbamylated erythropoietin to treat neuronal injury: new development strategies*. Expert opinion on investigational drugs, 2008. **17**(8): p. 1175-86.
87. Park, K.D., et al., *Inhibition of erythropoietin activity by cyanate*. Scandinavian journal of urology and nephrology, 2004. **38**(1): p. 69-72.
88. Oimomi, M., et al., *Carbamylation of insulin and its biological activity*. Nephron, 1987. **46**(1): p. 63-6.
89. Roxborough, H.E., et al., *Carbamylation inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin*. Biochemical and biophysical research communications, 1995. **214**(3): p. 1073-8.
90. Nilsson, L., et al., *Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure*. Clinical chemistry, 1996. **42**(3): p. 482-3.
91. Kraus, L.M. and A.P. Kraus, Jr., *The search for the uremic toxin: the case for carbamoylation of amino acids and proteins*. Wiener klinische Wochenschrift, 1998. **110**(15): p. 521-30.
92. Apostolov, E.O., et al., *Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2007. **292**(4): p. H1836-46.
93. Asci, G., et al., *Carbamylated low-density lipoprotein induces proliferation and increases adhesion molecule expression of human coronary artery smooth muscle cells*. Nephrology, 2008. **13**(6): p. 480-6.
94. Garnotel, R., et al., *Enhanced activation of and increased production of matrix metalloproteinase-9 by human blood monocytes upon adhering to carbamylated collagen*. FEBS letters, 2004. **563**(1-3): p. 13-6.
95. Horkko, S., et al., *Decreased clearance of uraemic and mildly carbamylated low-density lipoprotein*. European journal of clinical investigation, 1994. **24**(2): p. 105-13.
96. Horkko, S., et al., *Carbamylation-induced alterations in low-density lipoprotein metabolism*. Kidney international, 1992. **41**(5): p. 1175-81.
97. Holzer, M., et al., *Uremia alters HDL composition and function*. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 2011. **22**(9): p. 1631-41.
98. Holzer, M., et al., *Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional*. Antioxidants & redox signaling, 2011. **14**(12): p. 2337-46.

99. Gross, M.L., et al., *Glycated and carbamylated albumin are more "nephrotoxic" than unmodified albumin in the amphibian kidney*. American journal of physiology. Renal physiology, 2011. **301**(3): p. F476-85.
100. Jaisson, S., et al., *Carbamylated albumin is a potent inhibitor of polymorphonuclear neutrophil respiratory burst*. FEBS letters, 2007. **581**(7): p. 1509-13.
101. Nalbandian, R.M., et al., *Urea, urease, cyanate, and the sickling of hemoglobin S*. Clinical chemistry, 1972. **18**(9): p. 961-4.
102. Fluckiger, R., et al., *Hemoglobin carbamylation in uremia*. The New England journal of medicine, 1981. **304**(14): p. 823-7.
103. Tarif, N., et al., *Carbamylated hemoglobin in hemodialysis patients*. American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation, 1997. **30**(3): p. 361-5.
104. Chachou, A., et al., *Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA1c measurements by various methods*. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2000. **38**(4): p. 321-6.
105. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014. **237**(1): p. 208-19.
106. Forstermann, U., et al., *Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries*. Circulation research, 1986. **58**(4): p. 531-8.
107. Shibuki, K. and D. Okada, *Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum*. Nature, 1991. **349**(6307): p. 326-8.
108. Khan, B.V., et al., *Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(17): p. 9114-9.
109. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. European heart journal, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
110. Hemmens, B. and B. Mayer, *Enzymology of nitric oxide synthases*. Methods in molecular biology, 1998. **100**: p. 1-32.
111. Stroes, E., et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia*. The Journal of clinical investigation, 1997. **99**(1): p. 41-6.
112. Heitzer, T., et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus*. Diabetologia, 2000. **43**(11): p. 1435-8.
113. Ueda, S., et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(1): p. 71-5.
114. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
115. Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2023-31.
116. Stocker, R. and J.F. Keaney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
117. Carracedo, J., et al., *Carbamylated low-density lipoprotein induces oxidative stress and accelerated senescence in human endothelial progenitor cells*. FASEB J, 2011. **25**(4): p. 1314-22.
118. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circulation research, 2000. **86**(5): p. 494-501.

119. Guzik, T.J., et al., *Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(2): p. 333-9.
120. Lassegue, B., A. San Martin, and K.K. Griendling, *Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system*. *Circulation research*, 2012. **110**(10): p. 1364-90.
121. Landmesser, U., et al., *Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 943-8.
122. Alberts B. *Ras Activates a Downstream Serine/Threonine Phosphorylation Cascade That Includes a MAP-Kinase*. In: *Molecular Biology of the Cell, 4. Auflage, Garland 2002*.
123. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 153-83.
124. Park, J.G., et al., *Peroxiredoxin 2 deficiency exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circ Res*, 2011. **109**(7): p. 739-49.
125. Kyriakis J. M., Avruch J.: *Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update*. In: *Physiological reviews. Band 92, Nummer 2, 2012. S. 689-737*.
126. Sheikh-Hamad, D. and M.C. Gustin, *MAP kinases and the adaptive response to hypertonicity: functional preservation from yeast to mammals*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(6): p. F1102-10.
127. Borodkina, A., et al., *Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells*. *Aging (Albany NY)*, 2014. **6**(6): p. 481-95.
128. Wang, H., et al., *Subanesthetic isoflurane reduces zymosan-induced inflammation in murine Kupffer cells by inhibiting ROS-activated p38 MAPK/NF-kappaB signaling*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 851692.
129. Sakurai, H., et al., *TAK1-TAB1 fusion protein: a novel constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase kinase that stimulates AP-1 and NF-kappaB signaling pathways*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. **297**(5): p. 1277-81.
130. Holy, E.W., et al., *Carbamylated Low-Density Lipoproteins Induce a Prothrombotic State Via LOX-1: Impact on Arterial Thrombus Formation In Vivo*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2016. **68**(15): p. 1664-1676.
131. Sharma, S., et al., *Impaired thrombolysis: a novel cardiovascular risk factor in end-stage renal disease*. *European heart journal*, 2013. **34**(5): p. 354-63.
132. Sun, J.T., et al., *Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function*. *American journal of physiology. Renal physiology*, 2016. **310**(6): p. F511-7.
133. Drechsler, C., et al., *Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease*. *Kidney international*, 2015. **87**(6): p. 1201-8.
134. El-Gamal, D., et al., *The urea decomposition product cyanate promotes endothelial dysfunction*. *Kidney international*, 2014. **86**(5): p. 923-31.
135. Sawamura, T., et al., *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein*. *Nature*, 1997. **386**(6620): p. 73-7.
136. Kataoka, H., et al., *Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions*. *Circulation*, 1999. **99**(24): p. 3110-7.

137. Mehta, J.L., et al., *Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(1): p. 36-45.
138. Mehta, J.L., et al., *Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(2): p. 243-9.
139. Mehta, J.L. and D.Y. Li, *Identification and autoregulation of receptor for OX-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **248**(3): p. 511-4.
140. Kalim, S., et al., *Longitudinal Changes in Protein Carbamylation and Mortality Risk after Initiation of Hemodialysis*. Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN, 2016.
141. Jarcho, J.A. and J.F. Keaney, Jr., *Proof That Lower Is Better--LDL Cholesterol and IMPROVE-IT*. The New England journal of medicine, 2015. **372**(25): p. 2448-50.
142. Murphy, S.A., et al., *Reduction in Total Cardiovascular Events With Ezetimibe/Simvastatin Post-Acute Coronary Syndrome: The IMPROVE-IT Trial*. Journal of the American College of Cardiology, 2016. **67**(4): p. 353-61.
143. Qin, L., et al., *Inhibition of macrophage-derived foam cell formation by ezetimibe via the caveolin-1/MAPK pathway*. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 2016. **43**(2): p. 182-92.
144. Stark, G.R., *Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups*. Biochemistry, 1965. **4**(6): p. 1030-6.
145. Kalim, S., et al., *The Effects of Parenteral Amino Acid Therapy on Protein Carbamylation in Maintenance Hemodialysis Patients*. Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation, 2015. **25**(4): p. 388-92.

## 8. Publikation

Speer T, Owala FO, Holy EW, Zewinger S, Frenzel FTL, Stahli BE, Razavi M, Triem S, Cvija H, Rohrer L, Seiler S, Heine GH, Jankowski V, Jankowski J, Camici GG, Akhmedov A, Fliser D, Luscher TF, Tanner FC. Carbamylated low-density lipoprotein induces endothelial dysfunction. *Eur Heart J* 2014 Nov 14;35(43):3021-32

## 9. Danksagung

Zum Abschluss möchte ich die Gelegenheit nicht ungenutzt lassen, all jenen meinen Dank auszusprechen, die mich auf meinem Weg zur vorliegenden Dissertationsschrift unterstützt haben. Zu allererst gebührt mein Dank meinem Doktorvater Professor Dr. med. Danilo Fliser für die freundliche Überlassung dieses spannenden Themas und der Ermöglichung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank verdient mein Betreuer Dr. med. Dr. sc. nat. Timo Speer, auf dessen Voruntersuchungen diese Doktorarbeit aufbaut und der mich stets motiviert und unterstützt hat. Ich danke Dr. Dr. Speer für sein unermüdliches Engagement, seine Geduld, die allzeit konstruktive Kritik, die Hilfe bei der statistischen Datenauswertung und die insgesamt exzellente Betreuung.

Mein aufrichtiger Dank gilt ebenso allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des nephrologischen Forschungslabors, insbesondere der medizinisch-technischen Assistentin Claudia Noll sowie allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „*Vascular Biology and Lipoprotein Metabolism*“.

Ebenso danken möchte Dr. med. Stephen Zewinger und den Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin IV für die Rekrutierung der Probanden für die klinische Studie. Ich danke weiterhin Prof. Dr. rer. nat. Joachim Jankowski aus dem Institut für Molekulare Herz-Kreislaufforschung der RWTH Aachen, dessen Team in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe die MALDI-ToF-Analysen durchgeführt hat und Dr. Alexander Akhmedov aus dem Institut für Physiologie der Universität Zürich für die Überlassung der *Lox1/Tg*-Mäuse.

Zu guter Letzt ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, ohne deren Unterstützung weder mein Medizinstudium, noch diese Dissertation möglich gewesen wären. Mir ist bewusst, dass ich mich ob des unerschütterlichen Rückhalts meiner gesamten Familie glücklich schätzen darf und bin ebenso in tiefem Dank für den ungetrübten Beistand meiner engen Freunde sowie meiner Lebensgefährtin Lina.