

Aus der Klinik für Innere Medizin IV/Nephrologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Professor. Dr. med. D. Fliser

Vaskuläre Effekte von HDL bei Kindern mit chronischer Nierenerkrankung und nach Nierentransplantation

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

2020

VORGELEGT VON
GABRIEL WERNICKE
GEBOREN AM 08.06.1986 IN SPEYER

Tag des Kolloquiums: 05. April 2022

Dekan : Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Fliser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hashim Abdul-Khaliq

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	4
1. Zusammenfassung	7
1.1. Vaskuläre Effekte von High-Density Lipoprotein bei Kindern mit chronischer Nierenerkrankung und nach Nierentransplantation.....	7
1.2. Vascular effects of high-density lipoprotein in children with chronic kidney disease and after kidney transplantation.....	8
2. Einleitung.....	10
2.1. chronische Nierenerkrankung.....	10
2.2. Chronische Nierenerkrankung und kardiovaskuläres Risiko.....	12
2.3. Dyslipidämie bei chronischer Nierenerkrankung	13
2.4. High-Density Lipoprotein (HDL).....	14
2.4.1. HDL-Metabolismus und reverser Cholesterintransport.....	15
2.4.2. Direkte vasoprotektive Eigenschaften von HDL.....	16
2.4.2.1. HDL vermittelte NO-Produktion	16
2.4.2.2. Weitere gefäßprotektive und antiatherogene Eigenschaften von HDL ...	18
2.5. Ziel dieser Doktorarbeit	19
3. Material und Methodik	20
3.1. Material	20
3.1.1. Substanzen	20
3.1.2. Materialien.....	21
3.1.3. Geräte.....	22
3.1.4. Medien, Lösungen, Puffer, Gele	23
3.2. Patientenseren und Patientencharakteristika	25
3.3. Gewinnung von HDL aus Patientenserum (HDL-Isolation).....	25
3.3.1. HDL-Isolation	25
3.3.2. Messung der Protein-Konzentration des HDLs	27
3.4. Kultivierung von Humanen Aortalen Endothelzellen (HAECs).....	28
3.4.1. Anlegen einer Zellkultur	28
3.4.1.1. Aussaat der HAECs	28
3.4.1.2. Splitten der HAECs	28
3.5. NO-Messung	29
3.5.1. Vorbereitung der „Spin Probes“	29
3.5.1.1. Herstellung einer Eisensulfat-Lösung.....	29

3.5.1.2. Herstellung einer DETC-Lösung	29
3.5.1.3 Begasung der Endproben	29
3.5.2. Vorbereitung der Zellen	29
3.5.3. ESR (Elektronenspinresonanz)-Messung	30
3.5.4. Normalisierung	30
3.6. Superoxid-Messung	30
3.6.1. Vorbereitung der Proben	30
3.6.2. ESR-Messung	30
3.7. Messung der endothelialen VCAM-1-Expression	31
3.7.1. Zelllyse als Vorbereitung für den Western Blot.....	31
3.7.2. Westen Blot (Semi-Dry).....	31
3.7.2.1. Elektrophorese	31
3.7.2.2. Blotten	31
3.7.2.3. Blocken.....	31
3.7.2.4. Antikörperinkubation.....	32
3.7.2.5. Detektion	32
3.7.2.6. Auswertung	32
3.8. Weitere Messungen	33
3.9. Statistische Auswertung.....	33
4. Ergebnisse.....	34
4.1. Effekte von HDL auf die endotheliale NO-Freisetzung.....	36
4.2. Effekte von HDL auf die endotheliale Superoxid (SO)-Freisetzung	37
4.3. Effekte von HDL auf die endotheliale Expression des vaskulären Zelladhensionsmolekül-1 (VCAM-1).....	38
4.4. Cholesterolefflux aus Makrophagen	39
4.5. Effekte von HDL dialysepflichtiger Kinder auf die endotheliale NO- Freisetzung in Abhängigkeit des Dialyseverfahrens.....	40
4.6. Effekte von HDL von Kindern an Hämodialyse auf die endotheliale NO- Freisetzung in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Probengewinnung.....	41
4.7. Effekte von HDL auf die endotheliale NO-Freisetzung in Abhängigkeit von der aortalen Pulswellengeschwindigkeit.....	42
4.8. Veränderungen der endothelialen Effekte von HDL von Kindern an Dialyse und 3 Monate nach Nierentransplantation.....	43
4.8.1. Effekte von HDL auf die endotheliale NO-Freisetzung.....	43
4.8.2. Effekte von HDL auf die endotheliale SO-Freisetzung.....	44
4.8.3. Effekte von HDL auf die endotheliale Expression des vaskulären Zelladhensionsmolekül-1 (VCAM-1).....	45

4.8.4. Cholesterolefflux aus Makrophagen.....	46
5. Diskussion.....	47
5.1. Beeinträchtigung der Funktion und Zusammensetzung von HDL unter inflammatorischen Bedingungen.....	47
5.2. Endotheliale Effekte von HDL chronisch Nierenkranker	50
5.3. CKD und Cholesterolefflux-Kapazität	52
5.4. Einfluss von HDL von CKD-Patienten auf klinisch messbare vaskuläre Funktionen	54
5.5. Veränderungen in der Zusammensetzung der HDL-Partikel bei CKD und deren Auswirkungen auf die Funktionalität von HDL	54
5.6. Strategien zur Verbesserung der HDL-Funktionalität	60
5.7. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis	64
7. Publikation	84
8. Danksagung	85
9. Lebenslauf.....	86

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

7-KC	7-Ketocholesterol
ABC	ATP Binding Cassette Transporter
ABCA1	ATP Binding Cassette Transporter A-1
ABCG1	ATP Binding Cassette Transporter G-1
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Apo A-I	Apolipoprotein A-I
Apo A-II	Apolipoprotein A-II
Apo A-IV	Apolipoprotein A-IV
Apo B	Apolipoprotein B
Apo C	Apolipoprotein C
Apo C-II	Apolipoprotein C-II
Apo C-III	Apolipoprotein C-III
Apo E	Apolipoprotein E
Apo M	Apolipoprotein M
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
aPWV	aortic Pulse Wave Velocity
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	Cell Adhesion Molecule
CE	Cholesterinester
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
cIMT	Carotid Intima Media Thickness
CKD	Chronic kidney disease
CMH	1-Hydroxy-3-Methoxycarbonyl -2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidine
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
cSrc	Thyrosinkinase cellular sarcoma
ddH ₂ O	double-distilled water
DETC	Diethyldithiocarbamic Acid Sodium Salt
DF	Deferoxamin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DTT	1,4-Dithiothreitol

EBM	Endothelial Basal Medium
ED	endotheliale Dysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK1/2	extrazellulär Signal-regulierende Kinasen 1/2
ESR	Elektronenspinresonanz
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	freies Cholesterol
FE	Eisen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GPX	Glutathionperoxidase
HAECs	Human Aortic Endothelial Cells
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HDL	High-Density Lipoprotein
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
KBr	Kaliumbromid
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KHK	koronare Herzkrankheit
KHP	Krebs-Hepes-Puffer
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LDLR	Low-Density Lipoprotein-Rezeptor
Lp-PLA2	Lipoprotein-associated Phospholipase A2
LSF	Lysosulfatid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAPRTCS	North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PAF-AH	Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase
PBS	Posphate Buffered Saline

PDZK1	PDZK1: multi PZD Domain-containing Adaptor Protein 1
PGI2	Prostaglandin I2
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKB	Proteinkinase B
PL	Phospholipid
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PON	Paraoxonase
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCT	reverser Cholesterintransport
rHDL	rekonstituiertes High-Density Lipoprotein
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P3	Sphingosin-1 Phosphatrezeptor 3
SAA	Serumamyloid A
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SAA-1	Serum Amyloid A-1
SDMA	symmetrisches Dimethylarginin
SO	Superoxid
SOD	Superoxid-Dismutase
SP-B	Surfactant Protein B
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
SR-BI	Scavenger-Rezeptor-BI
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Triglyceride
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UC	unverestertes Cholesterin
USRDS	U.S. Renal Data System
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

1. Zusammenfassung

1.1. Vaskuläre Effekte von High-Density Lipoprotein bei Kindern mit chronischer Nierenerkrankung und nach Nierentransplantation

Die chronische Nierenerkrankung geht einher mit einer überproportional hohen Inzidenz und Prävalenz kardiovaskulärer Ereignisse. Selbst in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung besteht bereits ein deutlich erhöhtes kardiovaskuläres Risiko verglichen mit Nierengesunden. Durch die hohe Koinzidenz traditioneller Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie und Diabetes Mellitus lässt sich das erhöhte kardiovaskuläre Risiko chronisch nierenkranker Patienten jedoch nur teilweise erklären.

High-Density Lipoprotein von Gesunden vermittelt neben seiner Rolle im reversen Cholesteroltransport zahlreiche weitere Effekte, die zur Wahrung der Integrität des Gefäßendothels beitragen und dadurch der Entstehung von Atherosklerose entgegenwirken. Bei Erwachsenen mit chronisch eingeschränkter Nierenfunktion konnte gezeigt werden, dass High-Density Lipoprotein seine antiatherogenen Eigenschaften verliert und sogar schädigende Effekte am Gefäßendothel vermittelt.

Ziel dieser Arbeit war es, die vaskulären Effekte des High-Density Lipoproteins von Kindern in unterschiedlichen Stadien der chronischen Nierenerkrankung sowie nach Nierentransplantation mit denen von nierengesunden Kindern zu vergleichen.

Im Gegensatz zu High-Density Lipoprotein nierengesunder Kinder führte die Inkubation humaner aortaler Endothelzellen mit High-Density Lipoprotein chronisch nierenkranker Kinder zu einer ausgeprägten Hemmung der Stickstoffmonoxid-Produktion, einer deutlich gesteigerten Superoxid-Produktion, einer vermehrten Expression des vaskulären Zelladhensionsmolekül-1 auf humanen aortalen Endothelzellen sowie zu einem verminderten Cholesterol-Efflux aus Makrophagen.

Diese Effekte lassen sich bereits bei Kindern mit leicht eingeschränkter Nierenfunktion nachweisen, nehmen mit fortschreitender Nierenfunktionseinschränkung zu und zeigen sich am stärksten bei Kindern mit terminaler, dialysepflichtiger Niereninsuffizienz. Ferner zeigte sich eine Assoziation zwischen der Abnahme der High-Density Lipoprotein-Funktion, gemessen an der Fähigkeit zur Induktion der Stickstoffmonoxid-Produktion, und einer erhöhten aortalen Pulswellengeschwindigkeit.

In einem dreimonatigen Follow-up von acht Kindern vor und nach Nierentransplantation zeigte sich eine signifikante Verbesserung von High-Density Lipoprotein-induzierter Stickstoffmonoxid-Produktion, eine Reduktion der Superoxid-Produktion sowie der Expression von vaskulärem Zelladhensionsmolekül-1.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es bei chronisch nierenkranken Kindern ohne zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktoren bereits in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung zu einer Einschränkung der antiatherogenen Effekte von High-Density Lipoprotein kommt. Diese Einschränkung nimmt unter Progression der Nierenerkrankung zu und zeigte sich durch eine Nierentransplantation nur teilweise reversibel.

1.2. Vascular effects of high-density lipoprotein in children with chronic kidney disease and after kidney transplantation

Chronic kidney disease is associated with a substantially elevated incidence and prevalence of cardiovascular disease. Even in incipient chronic kidney disease, there is already a markedly increased cardiovascular risk compared to healthy patients.

Chronic kidney disease patients are characterized by a high prevalence of traditional cardiovascular risk factors such as diabetes mellitus and arterial hypertension. However, the presence of these risk factors does only partially explain the high cardiovascular burden in these patients.

Besides its role in the reverse cholesterol transport, high-density lipoprotein from healthy subjects exerts several vasoprotective effects to maintain the integrity of the vascular endothelium and to prevent the development of atherosclerosis. In adults with impaired renal function it has been shown that high-density lipoprotein loses its antiatherogenic properties and even mediates proatherogenic effects on the vascular endothelium.

The aim of this thesis was to examine the vascular effects of high-density lipoprotein from children with different stages of chronic kidney disease, including children on dialysis, and after kidney transplantation. Compared with high-density lipoprotein from healthy children, the incubation of human aortal endothelial cells with high-density lipoprotein from children with chronic kidney disease resulted in marked inhibition of nitric oxide production, increased superoxide production, increased expression of vascular cell adhesion molecule-1 on human aortic endothelial cells, and reduced cholesterol efflux from macrophages. These effects were already present in children with mild renal impairment, and progress in a graded manner as renal function declines, with the most profound changes induced by high-density lipoprotein from children on dialysis. Furthermore, there was an association between an impaired high-density lipoprotein function, which was measured by the ability of high-density lipoprotein to induce nitric oxide production, and a higher aortal pulse wave velocity.

In a longitudinal follow-up of eight children undergoing kidney transplantation, high-density lipoprotein-induced production of endothelial nitric oxide, superoxide, and vascular cell adhesion molecule-1 improved significantly 3 months after kidney transplantation.

In summary, the results suggest that in children with chronic kidney disease without concomitant diseases affecting the properties of high-density lipoprotein, the antiatherogenic effects of high-density lipoprotein are already impaired in early chronic kidney disease with a further progress as renal function declines and a partial recovery after kidney transplantation.

2. Einleitung

2.1. chronische Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist nach KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) definiert als:

„ Anomalien der Nierenstruktur oder -funktion, die länger als 3 Monate anhalten und Auswirkungen auf die Gesundheit haben.“¹

Dabei gelten die in der folgenden Tabelle aufgeführten Diagnosekriterien¹:

Tabelle 1: Kriterien für die Diagnose einer chronischen Nierenerkrankung (gefordert ist das Vorhandensein mindestens eines der Kriterien für > 3 Monate)

Marker für Nierenschäden (einer oder mehrere)	<ul style="list-style-type: none">• Albuminurie (Albuminausscheidungsrate [AER] ≥ 30 mg / 24 Stunden; Albumin-zu-Kreatinin-Verhältnis [ACR] ≥ 30 mg / g [≥ 3 mg / mmol])• Anomalien im Urinsediment• Elektrolyt- und andere Anomalien aufgrund von tubulären Störungen• histologische Anomalien• Strukturelle Anomalien, die durch Bildgebung festgestellt werden• nach Nierentransplantation
Verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	<ul style="list-style-type: none">• GFR <60 ml / min / 1,73 m²

Die Klassifikation der CKD wird nach Ursache, glomerulärer Filtrationsrate (GFR) und Ausmaß der Albuminurie vorgenommen¹.

Anhand der GFR lässt sich die CKD in 6 Stadien unterteilen. Zudem werden 3 Stadien der Albuminurie unterschieden¹:

Chronische Nierenkrankheit Kategorien der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Albuminausscheidung				Albuminurie-Kategorien		
				A1	A2	A3
				Normal bis leicht erhöht	Moderat erhöht	Stark erhöht
				<3mg/mmol <30mg/g	3–30mg/mmol 30–300mg/g	>30mg/mmol >300mg/g
GFR-Kategorien (ml/min/1,73m ²)	G1	normal oder hoch	≥90			
	G2	leicht eingeschränkt	60–89			
	G3a	leicht bis mässig eingeschränkt	45–59			
	G3b	mässig bis stark eingeschränkt	30–44			
	G4	schwer eingeschränkt	15–29			
	G5	Nierenversagen	<15			
<p>Grün: niedriges Risiko; wenn keine zusätzlichen krankheitsrelevanten Auffälligkeiten in Struktur oder Funktion der Nieren vorliegen, besteht kein Anhalt für das Vorliegen einer chronischen Nierenkrankheit.</p> <p>Gelb: moderat erhöhtes Risiko; Orange: hohes Risiko; Rot: sehr hohes Risiko</p>						

Abb.1: Einteilung der CKD nach GFR und Albuminurie¹

Rückblickend lässt sich in den letzten Dekaden ein stetiger Anstieg der Prävalenz der CKD konstatieren².

In der Bevölkerung der USA zeigte sich ein Anstieg der kumulativen Prävalenz der CKD in den Stadien 1-4 in den Jahren von 1988-1994 zu 1999-2004 von 10% auf 13,1%². Die Zahl der dialysepflichtigen Patienten hat sich im gleichen Zeitraum mehr als verdoppelt³. In den Jahren 2005-2010 wird die Prävalenz der CKD mit ca. 14% beziffert³. Aktuelle Daten zeigen einen weiteren Anstieg der Prävalenz der CKD auf 14,8% in der Bevölkerung der USA⁴. Dabei ist CKD-Stadium 3 mit 6,6% am häufigsten vertreten⁴.

Die stetig steigende Prävalenz der CKD in der westlichen Bevölkerung ist zumindest teilweise auf eine steigende Prävalenz von Diabetes Mellitus und arterieller Hypertonie, den Hauptrisikofaktoren der CKD der erwachsenen Bevölkerung, zurückzuführen⁵⁻¹⁰. Auch zeigt sich mit steigendem Alter eine Zunahme der Prävalenz der CKD. Aktuelle Schätzungen zur Folge liegt die Prävalenz der CKD in der Bevölkerung der USA im Kollektiv der 18-44-jährigen bei 7%, bei den 45-64-jährigen bei 13% und im Alter von 65 Jahren oder älter bei 38%¹¹.

Die Kausalität der CKD bei Kindern ist eine andere. Daten des NAPRTCS (North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies), einem Register, das Daten von über 7000 Kindern im Alter bis 21 Jahren aus verschiedenen nephrologischen Zentren in den USA

enthält, zeigen, dass kongenitale Anomalien der Nieren sowie des ableitenden Harntrakts und hereditäre Nephropathien für zwei Drittel der CKD-Fälle im Kindesalter verantwortlich sind¹². Glomerulonephritiden sind in 14% der Fälle ursächlich und stellen bei Kinder ab einem Alter von über 12 Jahren die häufigste Ursache der CKD dar¹². Die verfügbaren europäischen Register spiegeln eine vergleichbare Datenlage wider^{13,14}.

2.2. Chronische Nierenerkrankung und kardiovaskuläres Risiko

Die chronische Nierenerkrankung ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert¹⁵⁻¹⁸. Hauptursache hierfür sind kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkte, plötzlicher Herztod, Herzinsuffizienz, Schlaganfälle bzw. Transiente Ischämische Attacken und periphere Arterielle Verschlusskrankheit¹⁹⁻²³. Bei Patienten im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz lassen sich in 40% eine koronare Herzkrankheit (KHK) und in etwa 75% eine linksventrikuläre Hypertrophie nachweisen²⁴. Ferner liegt die Prävalenz einer Herzinsuffizienz bei Hämodialyse- und Peritonealdialysepatienten bei annähernd 40%²⁴. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach Adjustierung für Alter, Geschlecht, Rasse und Diabetes Mellitus, Dialysepatienten verglichen mit der Normalbevölkerung eine 10 bis 20 fach höhere kardiovaskuläre Mortalität aufweisen²⁴.

Daten aus dem U.S. Renal Data System (USRDS) dokumentieren einen Abfall der adjustierten Mortalität (berechnet pro 1000 Patientenjahre in Risikokonstellation) bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz von 187 aus dem Jahre 2001 um 28% auf 138 im Jahr 2015²⁵. Dies ist u.a. durch eine verbesserte Erkennung der CKD und damit eine frühere Erkennung und Therapie kardiovaskulärer Komplikationen zu erklären. Die Mortalität von Dialysepatienten ist im Vergleich zur Normalbevölkerung jedoch weiterhin extrem hoch²⁵. So leben Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, die jünger als 80 Jahre alt sind, im Mittel noch weniger als ein Drittel so lange verglichen mit Gleichaltrigen aus der Allgemeinbevölkerung²⁵. Vergleichend bedeutet dies für Dialysepatienten im Alter von 20-44 Jahren eine durchschnittlich um etwa 35 Jahre verminderte Lebenserwartung²⁶. Ebenfalls Ausdruck der hohen kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung ist, dass die Mehrheit der Patienten noch vor Erreichen des Stadiums der terminalen Niereninsuffizienz verstirbt²⁷.

Retrospektiv erhobene Daten an der US Bevölkerung zeigen, dass bereits eine moderat verminderte GFR (GFR <60 ml/min/1.73 m²) als auch eine Albuminurie, als Ausdruck eines strukturellen Nierenschadens, unabhängige Prädiktoren sowohl einer erhöhten Gesamtmortalität als auch einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität darstellen²⁸.

Nicht nur erwachsene CKD-Patienten sondern bereits Kinder mit terminaler Niereninsuffizienz gehören einem kardiovaskulären Hochrisikokollektiv an. Auch bei Kindern mit terminaler Niereninsuffizienz stellen kardiovaskuläre Ereignisse die führende Todesursache dar²⁹⁻³². Daten zahlreicher internationaler Studien dokumentieren, dass 40%-50% der Todesfälle dieses Kollektivs auf kardiovaskuläre bzw. zerebrovaskuläre Ereignisse zurückzuführen sind^{29,30,33}. Beachtlich in diesem Zusammenhang ist auch, dass Kinder mit terminaler Niereninsuffizienz ein über 700-fach höheres Risiko aufweisen an einem Tod aus kardialer Ursache zu versterben als Nierengesunde in gleichem Alter³⁴. Insgesamt ist die altersspezifische Mortalitätsrate dieses Kollektivs etwa 30 mal höher im Vergleich zu Kindern ohne terminale Niereninsuffizienz³³.

Die Ursachen für die überproportional hohe Rate an kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung sind vielfältig und teilweise noch nicht vollständig geklärt.

Die bereits in der Framingham Studie³⁵ identifizierten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie, männliches Geschlecht und Alter finden sich zum Teil überproportional häufig bei CKD-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung³⁶. Einige davon stellen wiederum selbst Risikofaktoren für einen Progress der CKD dar³⁷. Jedoch lässt sich das deutlich erhöhte kardiovaskuläre Risiko bei CKD-Patienten, insbesondere bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz, nicht in ausreichendem Maße allein durch die hohe Prävalenz der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren erklären³⁸.

Es wurden weitere, meist durch das urämische Milieu bedingte, sogenannte nicht-traditionelle Risikofaktoren identifiziert, die mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion an Bedeutung gewinnen³⁷. Zu diesen zählen unter anderem Hyperhomocysteinämie, Proteinurie, Anämie, Malnutrition, Inflammation, oxidativer Stress oder ein anormaler Calcium-Phosphat-Metabolismus³⁷. Diesen Faktoren wird ebenfalls ein bedeutender Beitrag zum hohen kardiovaskulären Risikoprofil der CKD-Patienten zugeschrieben^{37,39-41}.

2.3. Dyslipidämie bei chronischer Nierenerkrankung

Die Dyslipidämie als klassischer kardiovaskulärer Risikofaktor, die sich bei Nierengesunden in Form eines hohen Low-Density Lipoprotein (LDL)-Plasmaspiegels und/oder eines verminderten High-Density Lipoproteins (HDL) abbildet, stellt sich bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sowohl in quantitativ als auch in qualitativ anderer Form dar.

Merkmale der „urämischen“ Dyslipidämie sind hohe Serum-Triglyceridspiegel und ein niedriges HDL. Gesamtcholesterin und LDL sind häufig normwertig beziehungsweise lediglich moderat erhöht⁴².

In zahlreichen prospektiven randomisierten Placebo-kontrollierten Studien konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Statinen in der Allgemeinbevölkerung (bei Patienten mit entsprechendem Risikoprofil) eine signifikante Reduktion der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse erzielt werden kann⁴³.

Der Benefit einer lipidsenkenden Therapie bei insbesondere CKD-Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien ist jedoch eingeschränkt und offensichtlich abhängig vom Schweregrad der Nierenfunktionseinschränkung⁴⁴⁻⁴⁷. Bei CKD-Patienten mit leicht bis moderat eingeschränkter Nierenfunktion (Stadien 1-3) lässt sich durch Statineinnahme eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität unabhängig der Ausgangslipidspiegel erzielen^{45,48-52}. In einer aktuellen Metaanalyse, die 327.037 Patienten aus 52 randomisiert kontrollierten Studien einschloss, konnte durch eine Senkung von LDL um 38,7% eine relative Risikoreduktion für kardiovaskuläre Ereignisse von 19 % erzielt werden⁵³. Im Gegensatz hierzu kann bei Hämodialysepatienten durch die Einnahme von Statinpräparaten trotz potenter Senkung des LDLs um über 40% keine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität erlangt werden^{44,54}.

2.4. High-Density Lipoprotein (HDL)

High-Density Lipoproteine stellen eine heterogene Gruppe an Lipoproteinen dar, die sich durch eine hohe Dichte (1.063 bis 1.21 g/mL) und einen geringen Durchmesser (5 bis 17 nm) auszeichnen⁵⁵. Reife HDL-Partikel bestehen aus einem Protein- und einem Lipidanteil. Ein einzelnes HDL-Molekül setzt sich dabei aus über 80 verschiedenen Proteinen und über 200 verschiedene Lipidspezies zusammen⁵⁶. Das quantitativ bedeutsamste Protein ist Apolipoprotein A-I (Apo A-I)⁵⁷. Weitere strukturell und funktionell bedeutsame Proteine sind u.a. Apolipoprotein A-II (Apo A-II), Apolipoprotein C (Apo C), Apolipoprotein E (Apo E), Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), Paraoxonase (PON) oder Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH)⁵⁵. Zusammen mit Phospholipiden und unverestertem Cholesterin bilden die amphiphilen Lipoproteine die wasserlösliche Hülle der HDL-Partikel. Im Kern befinden sich fettlösliche Cholesterinester und in geringeren Mengen auch Triglyceride^{55,58}. Durch Unterschiede in der Protein- und Lipidzusammensetzung lassen sich mehrere Subklassen an HDL-Partikeln charakterisieren, die sich in Dichte, Größe, Form und Oberflächenladung unterscheiden⁵⁹⁻⁶¹.

2.4.1. HDL-Metabolismus und reverser Cholesterintransport

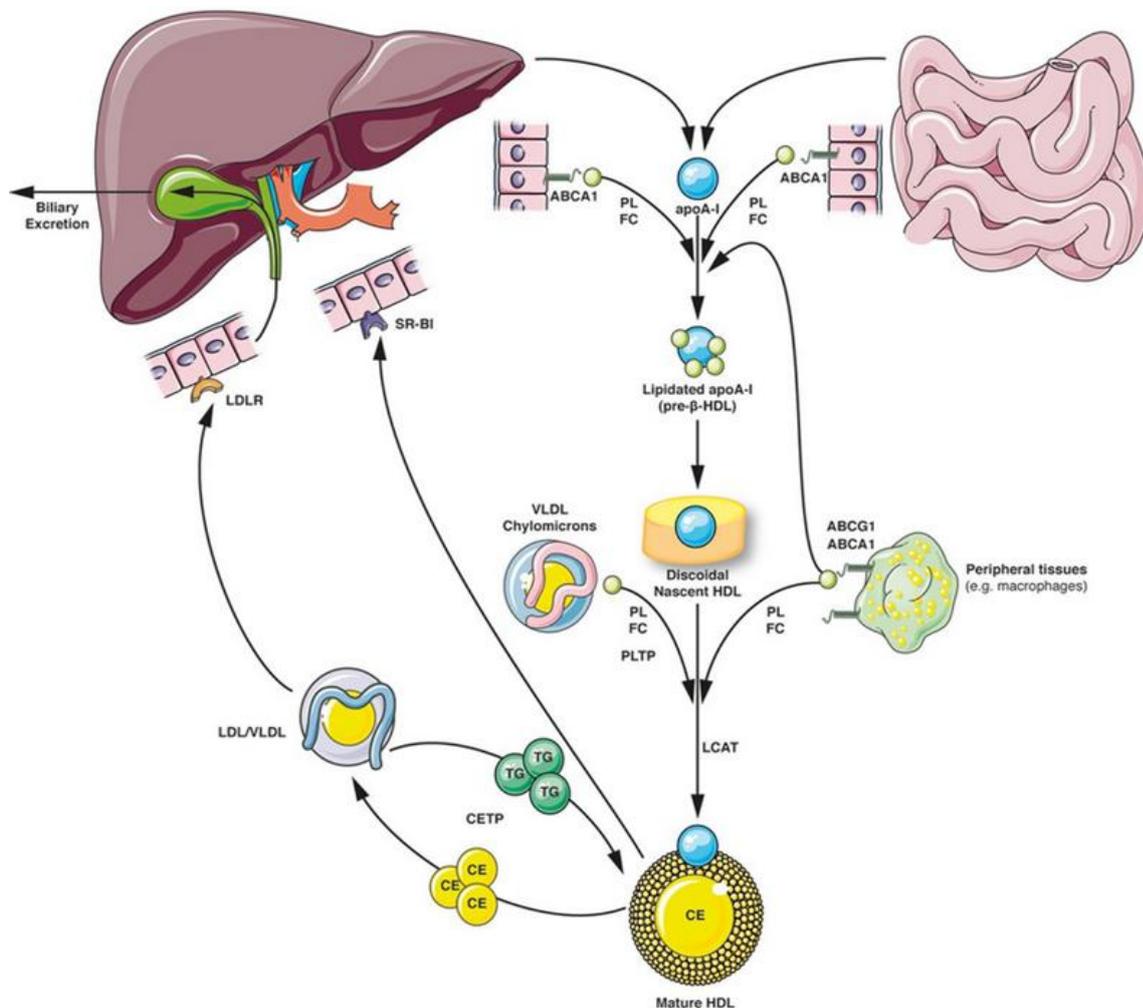


Abb. 2: HDL: Stadien der HDL-Reifung und dessen zentrale Rolle im reversen Cholesterintransport (Nephrol Dial Transplant. 2013 Oct; Speer et al.)

HDL spielt eine entscheidende Rolle beim reversen Cholesterintransport (RCT) aus den peripheren Geweben zur Leber⁶². Apolipoprotein A-I wird in Leber und Darm synthetisiert. Es erfolgt dann die Aufnahme von unverestertem Cholesterin (UC) und Phospholipiden (PLs) in die noch Lipid-armen Apo A-I-Partikel. Vermittelt wird dieser Lipidtransfer durch ein ubiquitär exprimiertes zelluläres ATP-abhängiges Transportprotein an der Außenseite der Zellmembran, den ATP-Binding-Cassette-Transporter-A1 (ABCA1)^{63,64}. Hierdurch entstehen die sogenannten prä-beta-HDL-Partikel⁶⁵, die vermittelt durch das Phospholipid-Transfer-Protein (PLTP) weitere UCs und PLs aus peripheren Geweben aufnehmen⁶⁴. Mit Hilfe der

Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase(LCAT)⁶⁶, einem Enzym, das die Veresterung eines Fettsäurerestes von Lecithin und Cholesterin katalysiert, entstehen aus den UCs lipophile Cholesterinester (CE)⁶⁷, die in den Kern der HDL-Partikel wandern und so aus den diskoiden prä-beta-HDLs die „reifen“, kugelförmigen HDL-Partikel entstehen lassen⁶⁸. Diese sorgen nun für den Rücktransport der Cholesterinester zur Leber, wo deren Aufnahme in Hepatozyten und schließlich die Ausscheidung über die Gallenflüssigkeit in den Darm erfolgen. Dies kann über zwei unterschiedliche Wege vermittelt werden: Zum einen gelingt dies durch direkte Interaktion der HDL-Partikel mit dem auf Hepatozyten exprimierten Scavenger Receptor Class B I (SR-BI)⁶⁴. Andererseits können die CEs durch das Cholesterinester Transferprotein (CETP) im Austausch für Triglyceride auf Apolipoprotein B (Apo B)-haltige Lipoproteine wie VLDL und LDL übertragen werden, die über LDL-Rezeptoren mit den Hepatozyten interagieren^{64,69}.

2.4.2. Direkte vasoprotektive Eigenschaften von HDL

Der reverse Cholesterintransport ist der am längsten und am besten bekannte atheroprotektive Mechanismus, bei dem HDL eine Schlüsselrolle einnimmt⁷⁰. Darüber hinaus weist HDL eine Reihe weiterer potentiell antiatherogener Eigenschaften auf⁷¹. Hierzu zählen unter anderem HDL-vermittelte vasodilatative⁷², anti-oxidative⁷³⁻⁷⁵, anti-inflammatorische^{76,77}, anti-thrombotische^{78,79} und anti-apoptische Effekte^{79,80}.

2.4.2.1. HDL vermittelte NO-Produktion

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiges Signalmolekül, das am Endothel als potenter Vasodilatator die Relaxation der glatten Muskelzellen und weitere atheroprotektive Effekte wie Verhinderung von Leukozytenadhärenz und Thrombozytenaktivierung vermittelt⁸¹. Endotheliale Dysfunktion (ED) aufgrund einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO führt zu beschleunigter Anreicherung von Makrophagen in der arteriellen Gefäßwand, fördert die Thrombusbildung und beeinträchtigt eine adäquate Vasodilatation als Reaktion auf diverse Stimuli^{82,83}. HDL von Nierengesunden induziert am Endothel die Produktion von NO^{79,84,85}. Bisher konnten mehrere Signalwege identifiziert werden, durch die HDL über Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) die Bioverfügbarkeit von NO erhöht:

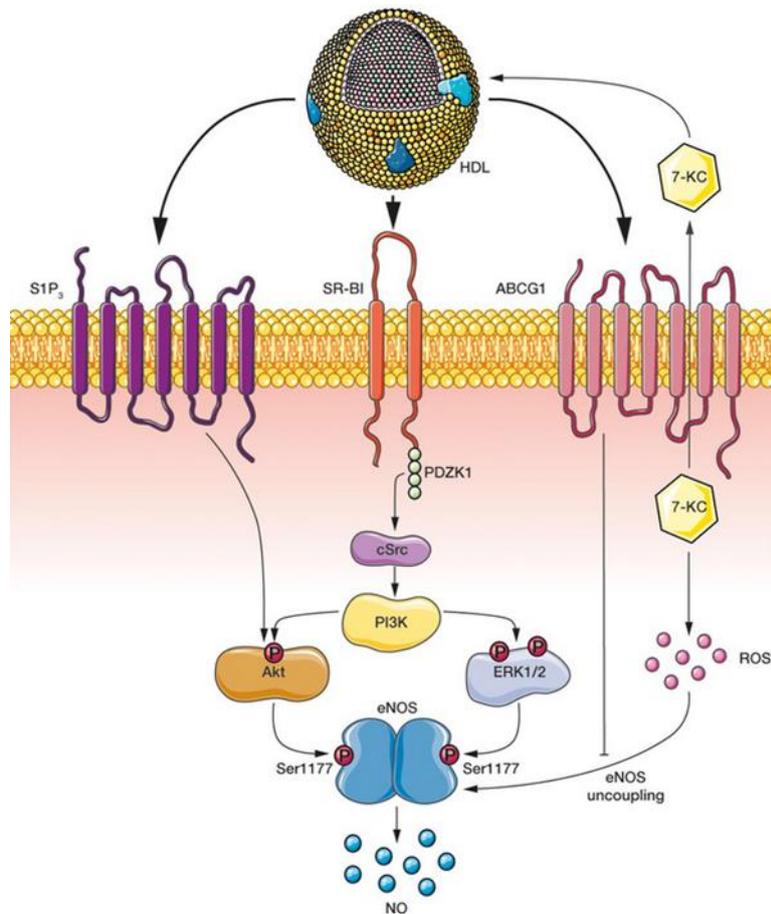


Abb. 3: Signalwege der HDL-vermittelten NO-Produktion in Endothelzellen (Nephrol Dial Transplant. 2013 Oct; Speer et al.)

Durch Interaktion von HDL über Apo A-I mit Scavenger-Rezeptor B1 (SR-BI), der in sackförmigen Ausbuchtungen der Plasmamembran, sogenannten Caveolae, kolokalisiert mit eNOS vorzufinden ist, bewirkt SR-BI die Aktivierung einer Thyrosinkinase (cSrc), die nachfolgend die Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) aktiviert⁶⁴. Diese wiederum induziert die voneinander unabhängige Aktivierung von einerseits Proteinkinase B (PKB, Akt) und andererseits einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK, ERK1/2). PKB und MAPK bewirken ihrerseits die Phosphorylierung von eNOS am Serinrest 1177, die, hierdurch aktiviert wird und NO produziert^{84–86}. Bei einem weiteren Signalweg, über den HDL die eNOS-vermittelte NO-Produktion induziert, interagiert Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein Lipidbestandteil des HDLs mit dem endothelialen Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 3 (S1P3). Dies führt einerseits indirekt zur Aktivierung von eNOS über die Aktivierung von PI3K und andererseits direkt durch Phosphorylierung von eNOS am Serinrest 1177 vermittelt durch die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC)⁷². Über einen ebenfalls SR-B1 unabhängigen Signalweg sorgt der ATP-Binding-Cassette-Transporter-G1

(ABCG-1) für die Ausfuhr von 7-Ketocholesterol (7-KC) aus den Endothelzellen und dessen Aufnahme in HDL-Partikel⁶⁴. Dies bedingt eine Reduktion der durch 7-KC bewirkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), was letztlich zu einer Stabilisierung der enzymatisch aktiven Dimerform von eNOS führt⁸⁷.

2.4.2.2. Weitere gefäßprotektive und antiatherogene Eigenschaften von HDL

Das Endothel spielt eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase durch Produktion einer Vielzahl verschiedener Substanzen, die für die Regulation von Gefäßtonus, Inflammation und endothelialer Integrität wichtig sind⁸⁸. Durch mechanische oder biochemische Stressoren, u.a. induziert durch die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren³⁵, entstehen Verletzungen am Endothel, die zu einer Störung der physiologischen Homöostase führen⁸⁹. Diese Veränderungen am Endothel werden auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und stellen den ersten Schritt für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen (Plaquebildung) dar^{90–92}. Das HDL Gesunder vermittelt protektive Effekte am Endothel, die zur Verhinderung der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beitragen^{93,94}. Neben dem Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit ist HDL assoziiert mit anti-oxidativen^{73–75,95} und anti-inflammatorischen Eigenschaften^{76,96}. Oxidiertes LDL (oxLDL) induziert ED⁹⁷. Durch den hohen Gehalt an Antioxidantien, die antioxidativen Eigenschaften von Apo A-I und mit Hilfe verschiedener Enzyme wie Paroxonase (PON), Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH) oder Glutathionperoxidase (GPX) verhindert HDL eine Oxidierung der LDL-Partikel⁹⁸. Ein inflammatorisches Milieu stimuliert Endothelzellen zur Expression von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs) wie Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) oder E-Selectin, die die Anhaftung von Leukozyten und insbesondere von Monozyten an die arterielle Gefäßwand und schließlich deren Migration in den subendothelialen Raum vermitteln⁹⁹. Dies stellt einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der atherosklerotischen Plaqueeinstellung dar¹⁰⁰. HDL Gesunder vermindert die Expression dieser Zelladhäsionsmoleküle und reduziert somit den Transfer der Monozyten in die Gefäßwand^{99,101}. Ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt der programmierte Zelltod der Endothelzellen, die Apoptose^{102–104}. Bisher konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, welche Apoptose induzieren. Dazu zählen beispielsweise oxLDL, Angiotensin II, Tumornekrosefaktor α (TNF α), Homocystein, Hyperglykämie oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS)^{105–109}. Sphingosylphosphorylcholine (SPC) und Lysosulfatide (LSF), beides Bestandteile von HDL, vermitteln antiapoptotische Effekte⁸⁰. Bei Verletzungen der Endothelschicht trägt HDL entscheidend zur Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen, sogenannter Progenitorzellen, in die Intima bei und beeinflusst

so deren Reendothelialisierung. Von Bedeutung ist hierbei die Interaktion von HDL mit SR-BI^{110,111}.

2.5. Ziel dieser Doktorarbeit

Unter bestimmten Bedingungen büßt HDL seine vasoprotektiven Eigenschaften ein. Dies konnte unter anderem gezeigt werden bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung und einem Diabetes Mellitus^{112,113}. Auch bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung verliert HDL seine gefäßschützenden Effekte und induziert darüberhinaus endotheliale Dysfunktion¹¹⁴. In diesem Patientenkollektiv ist jedoch eine hohe Prävalenz an klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren koexistent, die ebenfalls zur hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beiträgt³⁶ und Einfluss auf die Eigenschaften von HDL nimmt¹¹³.

Auch Kinder, die chronisch nierenkrank sind, versterben am häufigsten an kardiovaskulären Ereignissen^{33,115}. Sie weisen jedoch im Gegensatz zu erwachsenen Patienten mit CKD nahezu keine klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren auf. Dies ermöglicht es, den Einfluss der CKD auf die Eigenschaften von HDL am Endothel in Abwesenheit der interferierenden klassischen kardiovaskulären Riskofaktoren zu untersuchen.

In dieser Arbeit sollen deshalb die vaskulären Effekte von HDL bei Kindern in unterschiedlichen Stadien der CKD, an Dialyse und nach erfolgreicher Nierentransplantation untersucht und mit denen von nierengesunden Kindern verglichen werden.

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Substanzen

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Substanzen

Substanz	Hersteller
0,05% Trypsin-EDTA	Gibco, USA
0,4% Trypan Blue Solution	Sigma Aldrich, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Deutschland
30 % Acrylamid	Roth, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Deutschland
Anti-Goat-Antikörper	Millipore, USA
Anti-Mouse-Antikörper	Millipore, USA
Aqua dest.	Braun, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Deutschland
Bradford Reagenz (Protein Assay Dye Reagent)	Bio-RAD, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Deutschland
CMH (1-hydroxy-3-methoxycarbonyl -2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine)	Noxygen, Deutschland
Deferoxamine Methansulfonatsalz (DF)	Noxygen, Deutschland
Diethyldithiocarbamic Acid Sodium Salt (DETC)	Noxygen, Deutschland
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, USA
Dulbecco`s Posphate Buffered Saline 1x (PBS)	Gibco, USA
EBM (Endothelial Basal Medium)	Lonza, Schweiz
EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2)	Lonza, Schweiz
EBM-2 Single Quots	Lonza, Schweiz
Eisensulfat	Sigma Aldrich, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich, Deutschland
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Deutschland
Fibronektin	Sigma Aldrich, Deutschland
GAPDH-Antikörper	Millipore, USA
Glycerol	Serva, Deutschland
Glycin	Fisher Scientific, Deutschland
Halt 100x Protease/Phosphatase Inhibitor	Thermo Scientific, USA

Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, USA
Human Aortic Endothelial Cells (HAECs)	Lonza, Schweiz
IGEPAL CA-630	Sigma Aldrich, Deutschland
Isopropanol	Hedinger, Deutschland
Kaliumbromid (KBr)	AppliChem, Deutschland
Krebs-Hepes-Puffers (KHP)	Noxygen, Deutschland
Luminata Forte Western Chemiluminescent HRP Substrate	Merck Millipore, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Deutschland
Mercapto-Ethanol	Roth, Deutschland
Methanol	VWR, Deutschland
Natronlauge	Roth, Deutschland
Page Ruler Prestained	Thermo Scientific, USA
Salzsäure	Roth, Deutschland
SDS	Roth, Deutschland
TEMED	AppliChem, Deutschland
TNF α	Peprtech, USA
Tris Base	Fisher Scientific, Deutschland
Tween 20	AppliChem, Deutschland
VCAM-1-Antikörper	R&D systems, USA

3.1.2. Materialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Materialien

Material	Hersteller
C-Chip Disposable Hemocytometer	NanoEnTek, USA
Cryo Pure Gefäß 1,8 mL	Sarstedt AG & Co, Deutschland
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 mL	Greiner Bio-One, Deutschland
Falcon-Röhrchen 50 mL	Greiner Bio-One, Deutschland
Filterpapier	VWR, Deutschland
Gelgießapparatur	Bio-RAD, Deutschland
Glaskapillaren	Hirschmann, Deutschland
Lab Tek Chamber Slide (8-Well Zellkammer)	Thermo Scientific, USA
Mikroplatten (96-Well-Plates)	Greiner Bio-One, Deutschland
Pasteurpipetten 10 mL	Starlab, Deutschland

Pasteurpipetten 25 mL	Starlab, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Deutschland
PVDF-Membran	Millipore, USA
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Sarstedt AG & Co, Deutschland
Tube Topper	Beckman Coulter, USA
Zellkulturflasche (T 75 flask)	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellkulturplatten	Techno Plastics AG, Schweiz
Zellschaber S	Techno Plastics AG, Schweiz
Zentrifugationsfilter Amicon Ultra-4	Merck Millipore, Irland
Zentrifugationsfilter Ultrafree-MC	Merck Millipore, Irland
Zentrifugations-Tube 13 mL	Beckmann Coulter, USA

3.1.3. Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Autoclav 2540 EL	Biomedis, Deutschland
Capillary Holder	Noxygen, Deutschland
Dichtemessgerät DMA 500	Anton Paar, Österreich
e-scan Spektrometer	Bruker, Deutschland
Eismaschine AF80	Scotsman Ice Systems, USA
Feinwaage	neoLab, Deutschland
Heizblock Thermomix comfort	Eppendorf, Deutschland
Inkubator Mini Galaxy A	RS Biotech, UK
Low Temperature Finger Dewar (Sample holder)	Noxygen, Deutschland
Magnetrührer	VWR, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell System	Bio-RAD, Deutschland
pH-Messgerät S220 SevenCompact	Mettler Toledo, USA
Präzisionswaage PCB	Kern & Sohn, Deutschland
Schüttler	neoLab, Deutschland
Semi-dry Blottingkammer TEXP77	Hofer, USA
Tecan Sunrise (Magellan Plate Reader)	Tecan, Schweiz
Tischzentrifuge 5424 R	Eppendorf, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima XPN-90	Beckmann Coulter, USA
Vortex MS1 Minishaker	Eppendorf, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Deutschland

Westernblot Fluoreszenzscanner Odyssey SA	Licor, USA
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Deutschland

3.1.4. Medien, Lösungen, Puffer, Gele

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Medien, Lösungen, Puffer und Gele

Medium/Lösung/ Puffer/Gel	Herstellung/Zusammensetzung
Hungermedium	497,5 ml Endothelial Basal Medium (EBM) + 2,5 ml Fetale Bovine Serum (FBS)
Wachstumsmedium	450 ml Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2) versetzt mit EBM-2 Single Quots + 50 ml Fetale Bovine Serum (FBS)
10%-ige SDS-Lösung	5 g SDS in 50 ml ddH ₂ O gelöst
Fibronectinlösung	2 ml Dulbecco`s Pospate Buffered Saline (PBS) + 5 mg Fibronectin, Inkubation im Wasserbad (37°C) bis sich Fibronectin vollständig aufgelöst hat, dann 2 ml der Lösung in 500 ml Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) geben
KBr-Lösung (d=1,006 g/cm ³)	4,37 g Kaliumbromid in 500 ml ddH ₂ O gelöst
KBr-Lösung (d=1,063 g/cm ³)	47,13 g Kaliumbromid in 500 ml ddH ₂ O gelöst
KBr-Lösung (d=1,210 g/cm ³)	168,68 g Kaliumbromid in 500 ml ddH ₂ O gelöst
KHP-Chelatorenlösung	DETC (5 µM) und Deferoxamin (25 µM) werden in KHB gelöst (pH 7,4)
1 M Tris-Pufferlösung	12,114 g Tris in 100 ml ddH ₂ O gelöst (pH 6,8)

1,5 M Tris-Pufferlösung	18,171 g Tris in 100 ml ddH ₂ O gelöst (pH 8,8)
10x Lämmli-Sample Puffer	5 ml 1 M Tris (pH 6,8) + 2 g SDS + 20 mg Bromphenolblau + 2 ml Glycerol + 1 ml β-Mercapto-Ethanol vermischen, dann mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen
10x Transferpuffer	58,15 g Tris + 29,27 g Glycin + 3,7 g SDS in 1 L ddH ₂ O gelöst
Blocking-Puffer	7,5 g Magermilchpulver in 150 ml Waschpuffer gelöst
HDL-Puffer	8,766 g NaCl und 0,112 g EDTA mit ddH ₂ O auf 1 Liter aufgefüllt (pH 7,4)
Laufpuffer	3,028 g Tris + 14,41 g Glycin + 1 g SDS in 1 L ddH ₂ O gelöst
Lysepuffer	5 ml 1 M Tris (pH 8,0) + 3 ml 5 M NaCl + 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) + 100 µl 1 M DTT + 5 ml 10%-iges IGEPAL CA-630 in 83,5 ml destilliertem Wasser gelöst; unmittelbar vor Verwendung Hinzugabe von Halt 100x Protease/Phosphatase Inhibitor
Transferpuffer-Gebrauchslösung	100 ml 10x Transferpuffers + 200 ml Methanol + 700 ml ddH ₂ O
Waschpuffer	1000 ml 1x PBS + 500 µl Tween (0,05%)
Sammelgel	6,8 ml ddH ₂ O + 1,7 ml 30%-iges Acrylamid + 1,25 ml 1 M Tris-Pufferlösung (pH 6,8) + 0,1 ml 10%-ige SDS-Lösung; dann 0,1 ml 10%-ige APS-Lösung + 0,010 ml TEMED zugeben und vermischen; Gellösung in die Kammern über das auspolymerisierte Trenngel geben, Kämme einbringen und das Gel auspolymerisieren lassen (ca. 30 min); dann Kämme entfernen
Trenngel	7,9 ml ddH ₂ O + 6,7 ml 30%-iges Acrylamid + 1,5 ml 1,5 M Tris-

Pufferlösung (pH 8,8) + 0,2 ml 10%-ige SDS-Lösung; dann 0,2 ml 10%-ige APS-Lösung + 0,008 ml TEMED zugeben und vermischen; Kammern mit dieser Gellösung befüllen und mit 2-Propanolol überschichten; Gel auspolymerisieren lassen (ca. 30 min); 2-Propanolol entfernen

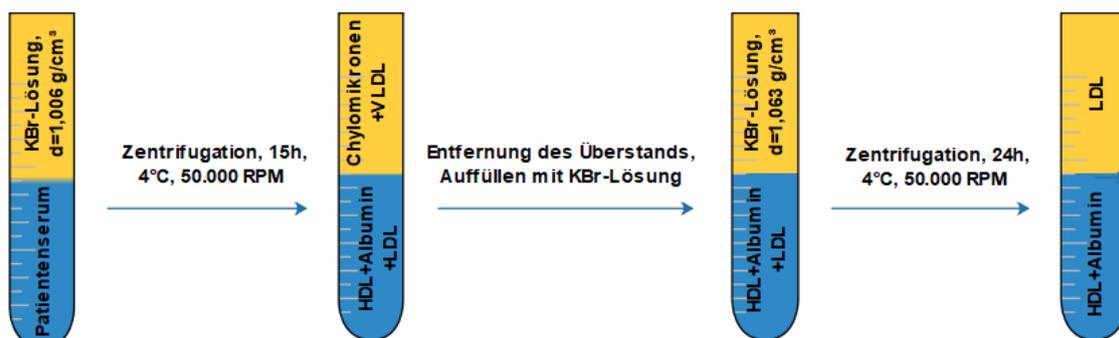
3.2. Patientenseren und Patientencharakteristika

Die Rekrutierung der Kinder für die Studie erfolgt im Rahmen einer Kooperation am University College London, UK, Institute of Child's Health durch Dr. Rukshana Shroff. Die Seren wurden im Zeitraum von Januar 2010 bis Dezember 2012 gewonnen. Sie entstammen von insgesamt 82 Kindern mit CKD im Alter zwischen 5 und 18 Jahren sowie von 12 nierengesunden Kindern. Von den chronisch nierenkranken Kindern lassen sich 10 dem CKD Stadium 2, 13 dem CKD-Stadium 3 und 16 den CKD-Stadien 4-5 zuordnen. 20 Kinder waren dialysepflichtig und 23 wurden nierentransplantiert. Kinder mit einer zugrundeliegenden entzündlichen Erkrankung wie beispielsweise einer Glomerulonephritis oder einer Vaskulitis wurden nicht berücksichtigt. Ferner mussten eine Infektion in den letzten 3 Monaten vor Probengewinnung, ein Diabetes Mellitus sowie ein Nikotinabusus ausgeschlossen sein.

3.3. Gewinnung von HDL aus Patientenserum (HDL-Isolation)

Die Isolation von HDL erfolgte mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Der Dichtegradient wurde mittels Kaliumbromid (KBr)-Lösungen erzeugt.

3.3.1. HDL-Isolation



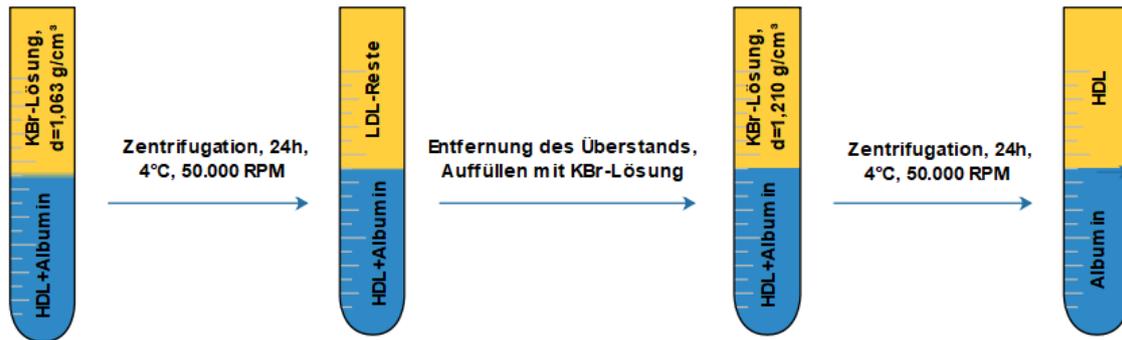


Abb. 4: Schematische Darstellung der HDL-Isolation mittels Ultrazentrifugation

Zunächst werden 5 ml Patientenserum in ein Zentrifugations-Tube überführt, das nun restlos mit der Kaliumbromid-Dichtelösung $1,063 \text{ g/cm}^3$ aufgefüllt und luftdicht verschlossen wird. Anschließend erfolgt die Ultrazentrifugation für 15 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 50.000 RPM. Nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge wird der Überstand (enthält Chylomikronen und VLDL) abpipettiert und kann nach weiterer Aufbereitung (Konzentration, Sterilisation) für weitere Untersuchungen verwendet werden. Der Unterstand (enthält LDL, HDL und Albumin) wird in ein 50 ml Falcon überführt und auf Eis gelagert. Nun erfolgt eine Dichtemessung des Unterstands. Zum Erreichen einer vorgegebenen Zieldichte von $1,063 \text{ g/cm}^3$ für den nachfolgenden Zentrifugationsschritt wird die hinzuzufügende Kaliumbromid-Menge nach folgender Formel berechnet:

$$\text{benötigte KBr - Menge [g]} = \frac{\text{Volumen [ml]} \times \left(\text{Zieldichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] - \text{Messdichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] \right)}{1 - (0,312 [\text{cm}^3/\text{g}] \times \text{Zieldichte} [\text{g/cm}^3])}$$

Nach Zugabe der errechneten Kaliumbromid-Menge wird die Lipoprotein-Suspension analog des initialen Procederes in ein Zentrifugations-Tube überführt, das nun vollständig mit der Kaliumbromid-Dichtelösung $1,063 \text{ g/cm}^3$ aufgefüllt und luftdicht verschlossen wird. Anschließend erfolgt die Ultrazentrifugation für 24 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 50.000 RPM. Nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge wird der Überstand (enthält LDL) abpipettiert und in ein Falcon zur Weiterverarbeitung überführt. Der Unterstand (enthält HDL und Albumin) wird in ein 50 ml Falcon überführt und auf Eis gelagert. Nun erfolgt eine Dichtemessung des Unterstands. Zum Erreichen einer Zieldichte von $1,063 \text{ g/cm}^3$ erfolgt die Berechnung der zu ergänzenden Menge an ddH₂O (double-distilled water) nach folgender Formel:

$$\text{benötigte Menge an ddH}_2\text{O [ml]} = \frac{\text{Volumen [ml]} \times \left(\text{Messdichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] - \text{Zieldichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] \right)}{\left(\text{Zieldichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] - 1 \right)}$$

Nach Zugabe der errechneten Menge an ddH₂O wird die Lipoprotein-Suspension analog des initialen Procederes in ein Zentrifugations-Tube überführt, das nun restlos mit der Kaliumbromid-Dichtelösung 1,063 g/cm³ aufgefüllt und luftdicht verschlossen wird. Anschließend erfolgt die Ultrazentrifugation für 24 Stunden bei 4 °C mit 50.000 RPM. Nach Entnahme aus der Ultrazentrifuge wird der Überstand (enthält residuelles LDL) abpipettiert und verworfen. Der Unterstand (enthält HDL und Albumin) wird in ein 50 ml Falcon überführt und auf Eis gelagert. Nun erfolgt eine Dichtemessung des Unterstands. Zum Erreichen der Zieldichte von 1,210 g/cm³ erfolgt die Berechnung der zu ergänzenden Kaliumbromid-Menge nach folgender Formel:

$$\text{benötigte KBr – Menge[g]} = \frac{\text{Volumen[ml]} \times \left(\text{Zieldichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] - \text{Messdichte} \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] \right)}{1 - (0,312[\text{cm}^3/\text{g}] \times \text{Zieldichte}[\text{g}/\text{cm}^3])}$$

Nach Zugabe der errechneten Kaliumbromid-Menge wird die Lipoprotein-Suspension analog des initialen Procederes in ein Zentrifugations-Tube überführt, das vollständig mit der Kaliumbromid-Dichtelösung 1,210 g/cm³ aufgefüllt und luftdicht verschlossen wird. Anschließend erfolgt die Ultrazentrifugation für 24 Stunden bei 4 °C mit 50.000 RPM. Nach Entnahme aus der Zentrifuge wird der Überstand (enthält HDL) zur Konzentrierung in ein Amicon-Röhrchen überführt. Nun wird das Amicon-Röhrchen mit HDL-Puffer bis zur weißen Markierung befüllt und für 10 min bei 4 °C mit 3000 RPM zentrifugiert. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal wiederholt. Ziel ist es, die Lipoproteine zu konzentrieren als auch residuelles Kaliumbromid zu entfernen. Anschließend erfolgt eine Sterilfiltration. Hierzu wird die Lipoprotein-Suspension in ein Filter-Röhrchen überführt und für 3 min bei 4°C mit 3000 RPM zentrifugiert. Bis zur Messung der HDL-Konzentration/Proteinbestimmung werden die Proben bei 4°C gelagert.

3.3.2. Messung der Protein-Konzentration des HDLs

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des HDLs erfolgt mittels Bradford-Reagenz (Protein Assay Dye Reagent). Zur Herstellung der Messlösung wird das Bradford Reagenz mit ddH₂O im Verhältnis 1:5 gemischt (z.B. 30 ml = 6 ml Bradford Reagenz + 24 ml ddH₂O). Nun erfolgt zunächst das Aufnehmen der Standardkurve. Hierfür benötigt man Bovines Serum Albumin (BSA, Stock 1 µg/µl). Das Pipettieren der Standardreihe erfolgt nach folgendem Schema (in Eppendorf-Röhrchen):

Tabelle 6: Standardreihe (BioRAD und BSA) zur Messung der HDL Konzentration

BioRAD [ml]	1,000	0,998	0,996	0,994	0,992	0,990
BSA [µl]	0	2	4	6	8	10

BioRAD [ml]	0,988	0,986	0,984	0,982	0,980	
BSA [μ l]	12	14	16	18	20	

Anschließend werden die Eppendorf-Röhrchen gevortext (\rightarrow Reaktion beginnt) und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung der Proben werden je 0,999 ml der BioRAD-Lösung zusammen mit 1 μ l der jeweiligen Probe in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Anschließend werden die Eppendorf-Röhrchen gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Proteinbestimmung werden nun je 200 μ l der Proben als auch der Standardreihe jeweils in Duplikaten in Wells einer 96-Well-Platte mittels pipettiert. Die Messung der Extinktion erfolgt nun im Magellan Plate Reader (Messwellenlänge: 595 nm).

3.4. Kultivierung von Humanen Aortalen Endothelzellen (HAECs)

3.4.1. Anlegen einer Zellkultur

3.4.1.1. Aussaat der HAECs

Zur Kultivierung der HAECs wird zunächst der Boden einer T-75-Zellkulturflasche (T 75 flask) mit Fibronectin-Lösung beschichtet, was eine Adhäsion der HAECs ermöglicht. Die T-75-Zellkulturflasche wird nachfolgend für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Fibronectin-Lösung abpipettiert und verworfen. Nun werden 20 ml des Wachstumsmediums hinzugegeben. Die Phiole mit den tiefgefrorenen HAECs wird im Wasserbad aufgetaut (bei 37°C). Sobald die Phiole aufgetaut ist, wird der Inhalt mittels steriler Pipette in die T-75-Zellkulturflasche überführt, die nun erneut bei 37°C inkubiert wird. Wenn 80% Konfluenz erreicht ist, können die Zellen weiter gesplittet werden.

3.4.1.2. Splitten der HAECs

Zunächst wird das Medium abgesaugt, das die HAECs in der T-75-Zellkulturflasche bedeckt. Anschließend werden die Zellen mit 6 ml einer EDTA-Lösung gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der T-75-Zellkulturflasche werden dann 4 ml der 0,05%-igen Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben. Die T-75-Zellkulturflasche wird anschließend für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Neutralisierung der 0,05%-igen Trypsin-EDTA-Lösung werden nun 4 ml des Wachstumsmediums hinzugegeben. Das Medium mit den darin enthaltenen Zellen (HAECs) wird nun mittels Pipette in ein 50 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei RT mit 300 G zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen. Das Zellpellet

resuspendiert man nun mit 2 ml des Wachstumsmediums. Zur Zellzählung werden zunächst 10 µl der Zellsuspension zusammen mit 10 µl der Trypan Blue Lösung in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Diese überführt man dann in eine Zählkammer (C-Chip Disposable Hemocytometer). Es werden nun nur die vitalen Zellen (avitale Zellen färben sich blau) in allen 4 Kammern ausgezählt und nach folgender Formel die Anzahl der Zellen/2 ml berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen/2 ml} = \frac{\text{Summe der vitalen Zellen in den 4 Kammern}}{4} \times 2 \times 2 \times 10000$$

Die Zellen werden nun in einer Dichte 150.000 Zellen/Well in einer Fibronectin-beschichteten 6-Well Platte ausgesät. Am Vortag der Experimente erfolgt ein Mediumwechsel vom Vollmedium zum Hungermedium. Am Tag des Experimentes erfolgt eine entsprechende Stimulation der Zellen mit HDL. Hierzu wird HDL in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt.

3.5. NO-Messung

3.5.1. Vorbereitung der „Spin Probes“

3.5.1.1. Herstellung einer Eisensulfat-Lösung

Zur Herstellung einer Fe-Sulfat-Lösung mit einer Fe-Sulfat-Menge von 4,5 mg/10 ml NaCl werden zunächst möglichst 4,5 mg Fe-Sulfat mittels Präzisionswaage abgewogen. Die Berechnung des benötigten NaCl-Volumens zur Resuspension des Fe-Sulfats erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{benötigtes NaCl-Volumen[ml]} = 10 \text{ ml} \times \frac{\text{abgewogenes Fe-Sulfat[mg]}}{4,5 \text{ mg}}$$

3.5.1.2. Herstellung einer DETC-Lösung

Die Herstellung der DETC (Diethyldithiocarbamic Acid Sodium Salt)-Lösung erfolgt analog der Herstellung der Fe-Sulfat-Lösung. Dabei beträgt die Ziel-DETC-Menge in der Endprobe 7,2 mg/10 ml NaCl.

3.5.1.3 Begasung der Endproben

Nun werden sowohl die Fe-Sulfat- als auch die DETC-Lösung mit Stickstoff für mindestens 20 Minuten begast, um Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen.

3.5.2. Vorbereitung der Zellen

Die Zellen (HAECs) werden zunächst zweimal mit kaltem Krebs-HEPES-Puffer (pH 7.4) gewaschen. Dann gibt man pro Well je 900 µl KHB hinzu. Nun werden je 600 µl der Fe-Sulfat-Lösung und der DETC-Lösung zusammen in ein Eppendorf-Röhrchen geben und

vorsichtig gemischt. Die Lösung verfärbt sich nun braun, was anzeigt, dass sich die Spinprobe, kolloidales Fe-(DETC)₂, bildet. Hiervon werden nun 300 µl auf die Zellen verteilt, leicht vermischt und die Zellen für 1 Stunde im Brutschrank (37°C) inkubiert. Nach der Inkubation wird ein gefrorener Zylinder aus KHB und den Zellen hergestellt, der für die nachfolgende Messung von NO verwendet wird. Bis zur Messung werden die Zylinder in flüssigem N₂ gelagert.

3.5.3. ESR (Elektronenspinresonanz)-Messung

Nun erfolgt die NO-Messung mittels ESR-Spektroskop. Hierzu wird der gefrorene Zylinder zunächst in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Messzylinder eingelegt, der in das Spektroskop eingebracht wird. Die Aufzeichnung der ESR-Spektren erfolgt mit der Software Bruker eScan Research nach Anregung mit einer Mikrowellenleistung von 36,14 mW und einer Modulationsamplitude von 8,18 G. Anschließend wird die Feineinstellung des Magnetfeldes vorgenommen: centre field 3434 G, sweep time 5,24 s, field sweep 80 G. An jeder Probe wurden insgesamt 50 Messungen durchgeführt.

3.5.4. Normalisierung

Zur Vergleichbarkeit werden die Ergebnisse der ESR-Messung auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe normalisiert. Hierzu wird der gefrorene Proben-Zylinder aufgetaut und für 5 min bei 4°C mit 5000 RPM zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wird das Zellpellet in 70 µl Lysepuffer resuspendiert und nach 10 min Lagerung auf Eis für 10 min bei 4°C mit 14000 RPM zentrifugiert. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt nun aus 4 µl des Überstands mittels Bradford-Reagenz wie oben beschrieben.

3.6. Superoxid-Messung

3.6.1. Vorbereitung der Proben

Die entsprechend stimulierten Zellen werden zunächst wie oben beschrieben mit Hilfe von Trypsin abgelöst und mittels Zentrifugation (5 min, 4°C, 1400 RPM) pelletiert. Das Zellpellet wird nun in jeweils 48,5 µl der KHP-Chelatorenlösung resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der Messung erfolgt die Zugabe von 1,5 µl der CMH-Lösung, so dass sich die Spinprobe bildet.

3.6.2. ESR-Messung

Anschließend werden die suspendierten Zellen mittels Kapillare aspiriert, die dann in den Capillary Holder eingelegt wird. Zur Messung wird dieser in das ESR-Spektroskop eingebracht. Analog zur NO Messung werden die ESR-Spektren mit der Software Bruker eScan Research aufgezeichnet. Hierbei erfolgt die Anregung mit einer Mikrowellenleistung

von 18,11 mW und einer Modulationsamplitude von 2,3 G mit anschließender Feineinstellung des Magnetfeldes: center field 3484,5 G, sweep time 5,24 s, field sweep 16 G. An jeder Probe werden insgesamt 5 Messungen durchgeführt. Zudem erfolgt eine „Background-Messung“ mit 48,5 µl der KHP-Chelatorenlösung und 1,5 µl CMH (ohne Zellpellet), die von den gemessenen Proben subtrahiert wird. Schließlich werden die Ergebnisse auf die Zellzahl normalisiert.

3.7. Messung der endothelialen VCAM-1-Expression

3.7.1. Zelllyse als Vorbereitung für den Western Blot

Die Zelllyse erfolgt durch Zugabe von 80 µl eiskaltem Lysepuffer pro Well. Nach Scrapen der Zellen wird das Lysat in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und zentrifugiert (10min, 4°C, 14000 RPM). Es erfolgt dann die Bestimmung der Proteinkonzentration wie bereits oben beschrieben unter Verwendung des Bradford-Reagenz. Nach Zugabe von 10X Lämmli-Sample Puffer werden die Lysate für 10 min bei 95°C gekocht, anschließend auf Eis gekühlt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.2. Westen Blot (Semi-Dry)

3.7.2.1. Elektrophorese

Zunächst werden die Proben (Zelllysate) aufgetaut, gevortext und auf Eis gelagert. Dann werden die Geltaschen mit 8 µl des Markers (Pageruler Prestained Protein ladder) bzw. mit den Proben befüllt. Hierbei werden 20 µg Protein/Well geladen. Die verbleibenden leeren Taschen werden mit 1x Lämmli-Sample Puffer gefüllt. Anschließend wird die Elektrophorese gestartet (54 mA, 90 min).

3.7.2.2. Blotten

Zunächst wird die Membran (PVDF-Membran) entsprechend der Filterpapiergröße zugeschnitten, für 5 min in Methanol aktiviert und schließlich in Transferpuffer überführt. Das Filterpapier wird ebenfalls in Transferpuffer angefeuchtet. Das Sammelgel wird nun entfernt und es wird ein Sandwich aus 2 Filterpapieren, Membran, Gel und zwei weiteren Filterpapieren gebildet. Dieses wird nun in der Blotting-Kammer platziert und der Blot gestartet (50 mA, 90 min).

3.7.2.3. Blocken

Nach Beendigung des Blottings wird die Blotting-Kammer geöffnet und die Membran in Blocking-Puffer gegeben und auf dem Schüttler für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

3.7.2.4. Antikörperinkubation

Nun erfolgt die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (Goat anti-human VCAM-1 Antikörper, Verdünnung 1:2000 in Blocking-Puffer) auf dem Schüttler für 1 h bei RT. Nach drei Waschrissen wird die Membran für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper (anti-Goat-Antikörper, Verdünnung 1:4000 in Blocking-Puffer) inkubiert. Als Referenzprotein wurde in den Versuchen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, das in den verwendeten Zellen eine hohe Expression aufweist. Es dient zur Normalisierung des Expressionslevels des untersuchten Proteins (VCAM-1) und stellt sicher, dass die Proteinmengen in den einzelnen Proben gleichmäßig verteilt sind. GAPDH weist ein Molekulargewicht von 37 kDa, VCAM-1 von 110 kDa auf. Somit liegen deren Proteinbanden ausreichend weit voneinander entfernt, so dass die Membran zur Markierung und Detektion auseinandergeschnitten werden kann, ohne dass die Proteinbanden beschädigt werden. Die Markierung von GAPDH erfolgt analog und parallel zur Markierung von VCAM-1. Als Primärantikörper wird Mouse anti-human GAPDH-Antikörper (Verdünnung 1:20000) und als Sekundärantikörper anti-Mouse-Antikörper (Verdünnung 1:20000) verwendet.

3.7.2.5. Detektion

Die Detektion erfolgt mit der Chemilumineszenz-Methode. Nach drei Waschrissen erfolgt die Zugabe der ECL-Lösung (2 ml Luminata Forte Western Chemiluminescent HRP Substrate, Inkubation der Membran für 2 min). Der Sekundärantikörper ist mit HRP (horseradish peroxidase) markiert. HRP führt zur Oxidation von Luminol wodurch ein Lichtsignal frei wird, das nach Einbringen des Western Blots in das FUSION Kamera-System (CCD-Kamera Fusion Fx7) gemessen wird. Die Kamera erstellt digitale Bilder, die für die relative Quantifizierung der Proteinmengen gespeichert werden.

3.7.2.6. Auswertung

Die Auswertung des Western Blots erfolgt mit der Software ImageJ durch densitometrische Quantifizierung der von der Kamera aufgenommenen Proteinbanden anhand deren Grauabstufungen. Dabei wird auch der Hintergrund gemessen und von der Proteinbandenintensität abgezogen um genauere Messwerte zu erhalten. Die Quantifizierung erfolgt pro Blot jeweils für VCAM-1 und GAPDH, das als Ladekontrolle dient. Aus VCAM-1 und GAPDH wird eine Ratio gebildet, die als Grundlage der weiteren Auswertung dient.

3.8. Weitere Messungen

Die Bestimmung des Cholesterin-Effluxes sowie der aortalen Pulswellengeschwindigkeit (aPWV) erfolgten im Rahmen einer Kooperation durch Dr. Rukshana Shroff am University College, London, UK, Institute of Child's Health und wurden uns zur Verfügung gestellt.

3.9. Statistische Auswertung

Die klinischen Daten der Kohorte wurden als Mittelwert \pm SD (Standard Deviation) für normalverteilte oder Median und Interquartilbereich für nicht-normalverteilte Daten dargestellt. Zum Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen HDL-Funktionsassays wurde zunächst eine One-Way ANOVA durchgeführt. Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen erfolgten mittels Dunnett's Posthoc Test. Vergleiche von HDL-Funktionalitäts-Assays bei Kindern vor und nach Dialyse sowie vor und nach Nierentransplantation wurden unter Verwendung des gepaarten t-Tests durchgeführt. Die Korrelation zwischen den Ergebnissen der HDL-Funktionsassays, verschiedenen endothelialen Markern sowie vaskulären Messungen wurde mittels Pearson's oder Spearman's-Korrelationskoeffizienten quantifiziert. Für alle Analysen wurde ein zweiseitiger P-Werte von $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Alle Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 4.0; GraphPad Software Inc) bzw. IBM SPSS (Version 24) durchgeführt.

4. Ergebnisse

Zwischen den Kindern mit CKD und den nierengesunden Kindern bestanden keine Unterschiede in Bezug auf Alter, Geschlechterverteilung und ethnischer Herkunft. Die chronisch nierenkranken Kinder wiesen einen vergleichsweise höheren systolischen Blutdruck SD (Standardabweichung)-Score und höhere Phosphatspiegel im Serum auf. Nierentransplantierte Kinder hatten einen höheren Body Mass Index, einen höheren systolischen Blutdruck SD-Score sowie höhere Triglycerid-Spiegel als die dialysepflichtigen Kinder und die übrigen Kinder mit CKD. Interleukin-6-Spiegel waren lediglich bei den dialysepflichtigen Kindern erhöht. Interessanterweise zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gesamtcholesterin-, HDL- sowie LDL-Spiegel zwischen nierengesunden Kindern und Kindern mit CKD sowie zwischen Kindern in unterschiedlichen CKD-Stadien. Die vollständigen erhobenen Grundcharakteristika der Kinder sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 7: Charakteristika der Kinder

Charakteristikum	Kontrollen (N=12)	CKD 2 (N=10)	CKD 3 (N=13)	CKD 4/5 (N=16)	Dialyse (N=20)	Transplant (N=23)	p-Wert
Demografische Faktoren							
Alter (in Jahren)	13,3±3,7	12,7±2,1	11,3±3,3	12,4±0,9	14,2±3,9	14,4±4,0	0,72
Männlich	6(50%)	7(70%)	7(54%)	9(56%)	13(65%)	15(65%)	0,88
Ethnische Herkunft							
Kaukasisch	7	6	8	11	12	15	
Asiatisch	4	3	4	4	6	6	
Afroamerikanisch	1	0	1	0	1	1	
Andere	0	1	0	1	1	1	
Renale Erkrankung							0,82
Hypodysplasie		7	8	10	13	14	
Glomerulopathien		2	5	4	6	6	
Andere		1	0	2	1	3	
Klinische Faktoren							
eGFR (ml/min/1,73m ²)	103±4,8	68±6,1	41±10,7	14±8,7	-	47±14,2	<0,001
Dauer der CKD (in Jahren)	-	-	6,8±4,1	6,2±2,2	7,9±5,1	6,2±4,6	0,74
Art der Dialyse	-	-	-	-	PD: 11, HD: 9	-	-

BMI SD Score	1,2±0,3	0,9±0,2	1,1±0,1	0,9±0,4	0,23±0,6	1,3±0,6	0,06*
Systolischer BP SD Score	0,7±0,3	0,8±0,1	0,8±0,4	1,1±0,2	1,2±0,5	1,6±0,2	0,02*
Diastolischer BP SD Score	0,4±0,1	0,8±0,2	1,3±0,1	0,8±0,4	1,0±0,4	1,4±0,4	0,07
Antihypertensiva einnehmende Kinder	0	0	1	2	1	9	<0,001
Antihypertensiva	-	-					-
ACE-Hemmer			1	2	-	2	
Kalziumkanalblocker			-	-	1	7	
Diuretika			-	-	-	6	
Biochemische Faktoren							
Gesamtcholesterin (mg/dl)	187±13	182±21	188±22	202±42	190±29	211±34	0,51
HDL-Cholesterin (mg/dl)	44±7,1	45±5,9	41±9,2	43±8,2	41±11,2	44±9,5	0,29
LDL-Cholesterin (mg/dl)	131±13	127±18	145±24	151±39	151±50	144±23	0,12
Triglyceride (mg/dl)	91±11	93±17	90±19	127±32	119±40	140±65	0,08*
Phosphat (mmol/L)	1,5±0,1	1,6±0,4	1,4±0,6	1,6±0,3	1,4±0,7	1,1±0,3	0,04
High-sensitivity CRP (mg/L)	2,4±0,4	1,3±0,2	1,6±0,8	2,2±1,0	2,9±6,8	1,7±1,3	0,07
Interleukin-6 (pg/ml)	6,2±3,9	-	-	7,1±3,1	11,9±8,4	-	0,01**

Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert (MW) ± SD (Standardabweichung), N, N (%) oder Median (Interquartilbereich). Die p-Werte dienen dem Vergleich aller Gruppen miteinander; *p-Werte zwischen Transplantierten und CKD- + Dialyse-Gruppen: für BMI SD Score p=0,03, für systolischen BP SD Score p=0,002, für Triglyceridspiegel SD Score p=0,01; **p-Werte zwischen CKD 4 und CKD5 und der Dialyse-Gruppe.

4.1. Effekte von HDL auf die endotheliale NO-Freisetzung

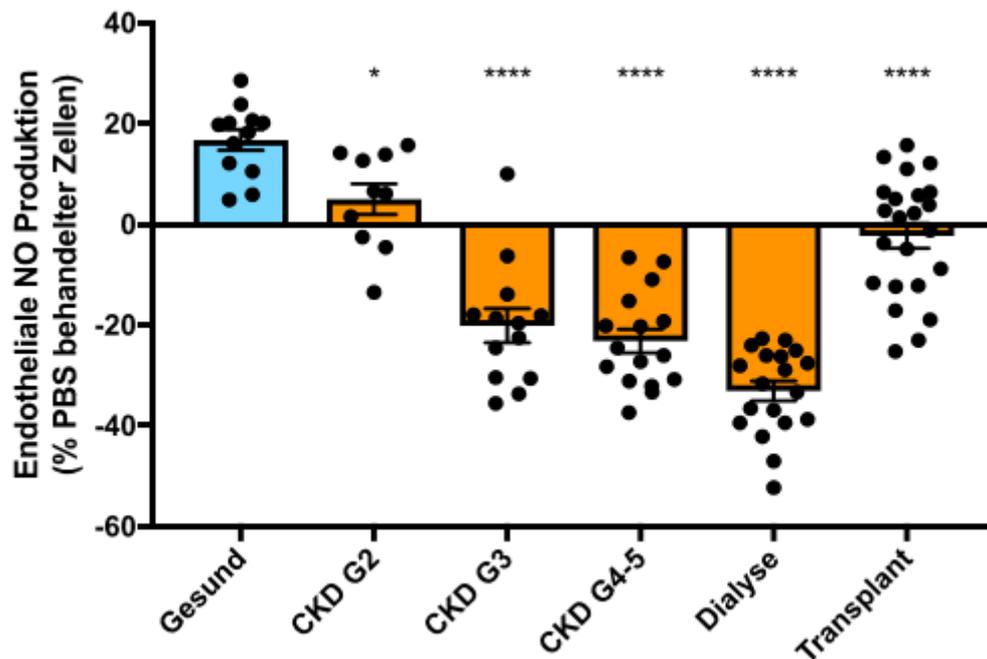


Abb. 5: Endotheliale NO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit dem HDL (50 µg/ml, 1 hr) nierengesunder Kinder und Kindern mit chronischer Nierenerkrankung. Die Messung erfolgte mittels ESR Spektroskopie. Jeder Punkt stellt einen einzelnen Probanden dar. N=10-23 pro Gruppe, MW±SD, *p<0,05 und ****p<0,0001 im Vergleich zu HDL der Gesunden.

Nach Inkubation der HAECs mit HDL gesunder Kinder zeigte sich ein Anstieg der endothelialen NO Produktion. Bereits bei Kindern mit nur leichtgradig eingeschränkter Nierenfunktion (CKD G2) war dieser Effekt geringer. Demgegenüber führte HDL von Kindern mit stärker eingeschränkter Nierenfunktion und dialysepflichtigen Kindern zu einer signifikanten Hemmung der endothelialen NO Produktion, welche sich bei Kindern nach erfolgreicher Nierentransplantation wieder verbesserte, aber nicht das Niveau der gesunden Kontrollgruppe erreichte.

4.2. Effekte von HDL auf die endotheliale Superoxid (SO)-Freisetzung

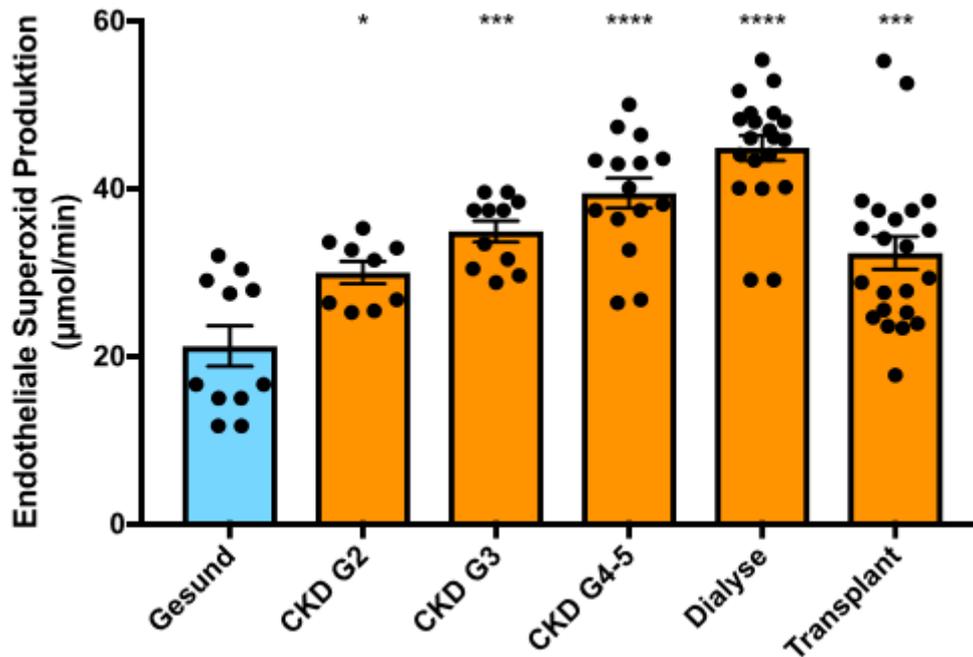


Abb. 6: Endotheliale SO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit dem HDL (50µg/ml, 1 hr) nierengesunder Kinder und Kindern mit chronischer Nierenerkrankung. Die Messung erfolgte mittels ESR-Spektroskopie. Jeder Punkt stellt einen einzelnen Probanden dar. N=9-22 pro Gruppe, MW±SD, *p<0,05, ***p<0,001 und ****p<0,0001 im Vergleich zu HDL der Gesunden.

Nach Inkubation der HAECs mit HDL gesunder Kinder zeigte sich ein Anstieg der endothelialen SO-Produktion. Bei Kindern mit geringgradig eingeschränkter Nierenfunktion (CKD G2) war dieser Anstieg bereits signifikant größer. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion zeigte sich ein weiterer stufenweiser Anstieg der endothelialen SO-Produktion mit einem Maximum bei Stimulation der HAECs mit dem HDL von Kindern an Dialyse. Nach erfolgreicher Nierentransplantation verringerte sich die SO-Produktion, ohne jedoch das Niveau der gesunden Kontrollgruppe zu erreichen.

4.3. Effekte von HDL auf die endotheliale Expression des vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1)

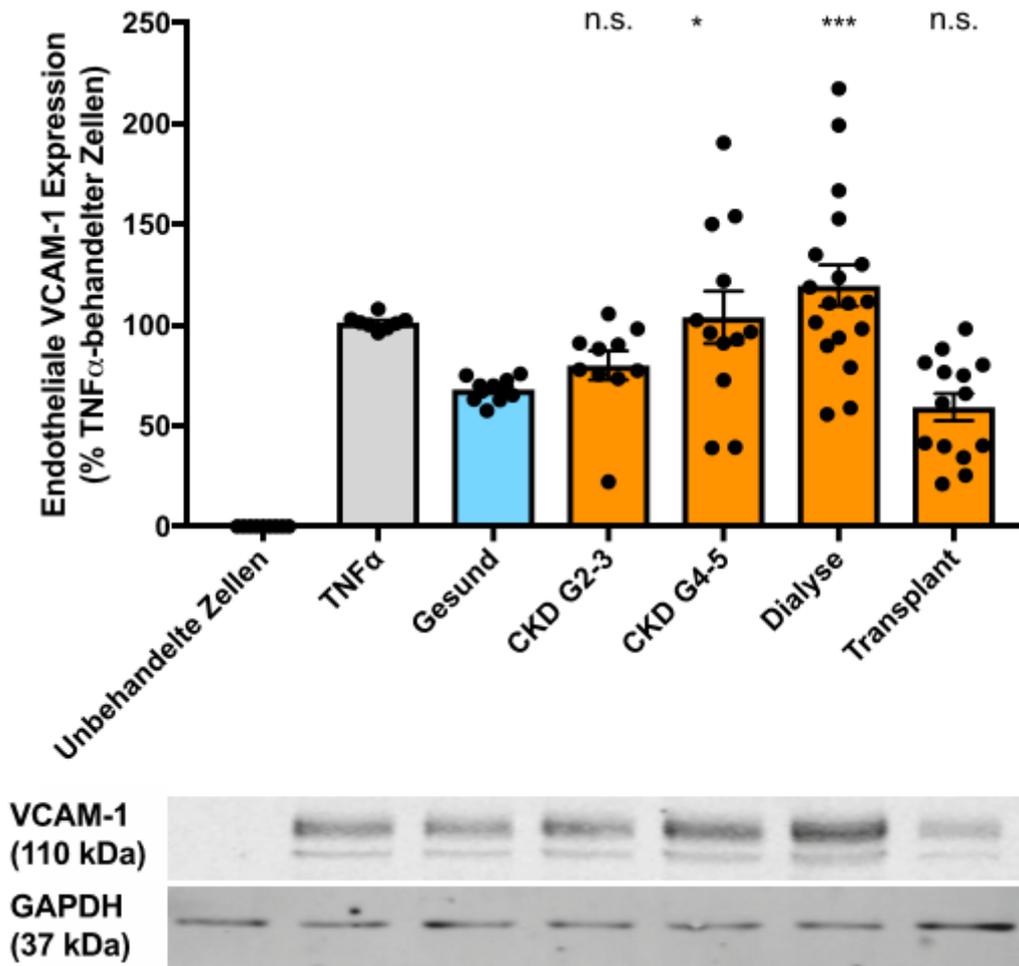


Abb. 7: Westernblot zur Darstellung der endothelialen VCAM-1-Expression auf HAECs, die mit HDL (50 μ g/ml, 1 hr) nierengesunder Kinder und Kindern mit chronischer Nierenerkerkrankung präinkubiert und anschließend mit TNF α (0,1 ng/ml, 4 hr) stimuliert wurden. Die Messung erfolgte mittels Western Blot und wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert. Jeder Punkt stellt einen einzelnen Probanden dar. N=10-18 pro Gruppe, MW \pm SD, *p<0,05 und ***p<0,001 im Vergleich zu HDL der Gesunden, n.s.=nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu HDL der Gesunden.

Die Stimulation der mit HDL gesunder Kinder präinkubierter HAECs mit TNF α führte zu einer Reduktion der VCAM-1-Expression. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Präinkubation mit HDL chronisch nierenkranker Kinder eine mit abnehmender Nierenfunktion stufenweise Zunahme der VCAM-1-Expression, welche sich bei Kindern nach erfolgreicher Nierentransplantation wieder reduzierte und nicht signifikant von der der gesunden Kontrollgruppe unterschied.

4.4. Cholesterolefflux aus Makrophagen

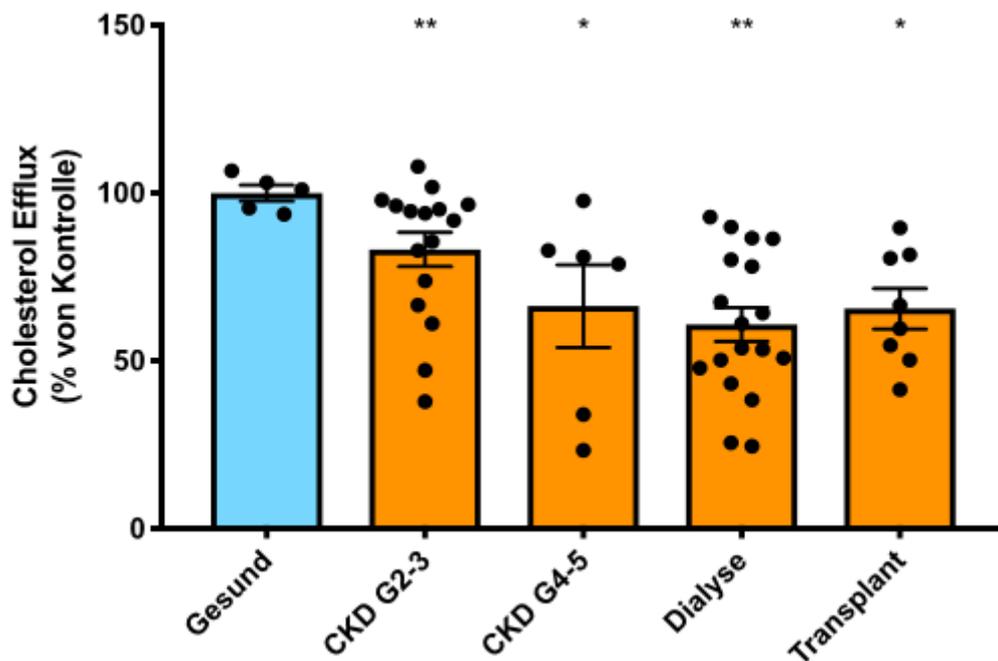


Abb. 8: Cholesterolefflux aus mit Cholesterole beladenen J774-Makrophagen in ein Apo B-freies Serum (Inkubation für 4 hr) nierengesunder Kinder und von Kindern mit chronischer Nierenerkrankung. Die Messung erfolgte mittels Spektrophotometer. Jeder Punkt stellt einen einzelnen Probanden dar. N=5-18 pro Gruppe, MW±SD, *p<0,05 und **p<0,01 im Vergleich zu HDL der Gesunden.

Der Cholesterolefflux aus Makrophagen in ein Apo B-freies Serum von Kindern mit geringgradig eingeschränkter Nierenfunktion zeigte sich bereits signifikant reduziert im Vergleich zu gesunden Kindern. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion kam es zu einer weiteren Verminderung der Cholesterolefflux-Kapazität, die sich auch nach erfolgreicher Nierentransplantation nicht signifikant verbesserte.

4.5. Effekte von HDL dialysepflichtiger Kinder auf die endotheliale NO-Freisetzung in Abhängigkeit des Dialyseverfahrens

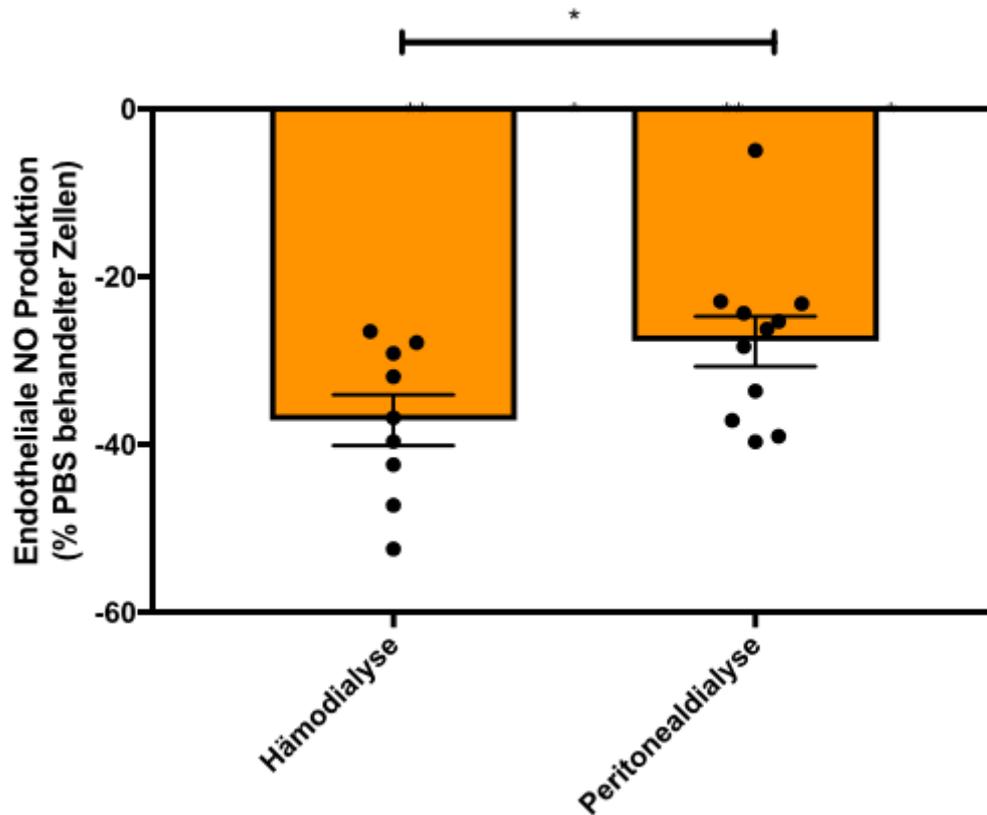


Abb. 9: Endotheliale NO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit HDL (50 µg/ml, 1hr) von Kindern an Hämodialyse und Peritonealdialyse. Die Messung erfolgte mittels ESR-Spektroskopie. Jeder Punkt stellt einen einzelnen Probanden dar. N=9-11 pro Gruppe, MW±SD, *p<0,05.

Nach Inkubation der HAECs mit HDL von Kindern an Hämodialyse zeigte sich eine signifikant stärkere Hemmung der endothelialen NO-Produktion im Vergleich zu Kindern an Peritonealdialyse.

4.6. Effekte von HDL von Kindern an Hämodialyse auf die endotheliale NO-Freisetzung in Abhängigkeit des Zeitpunktes der Probengewinnung

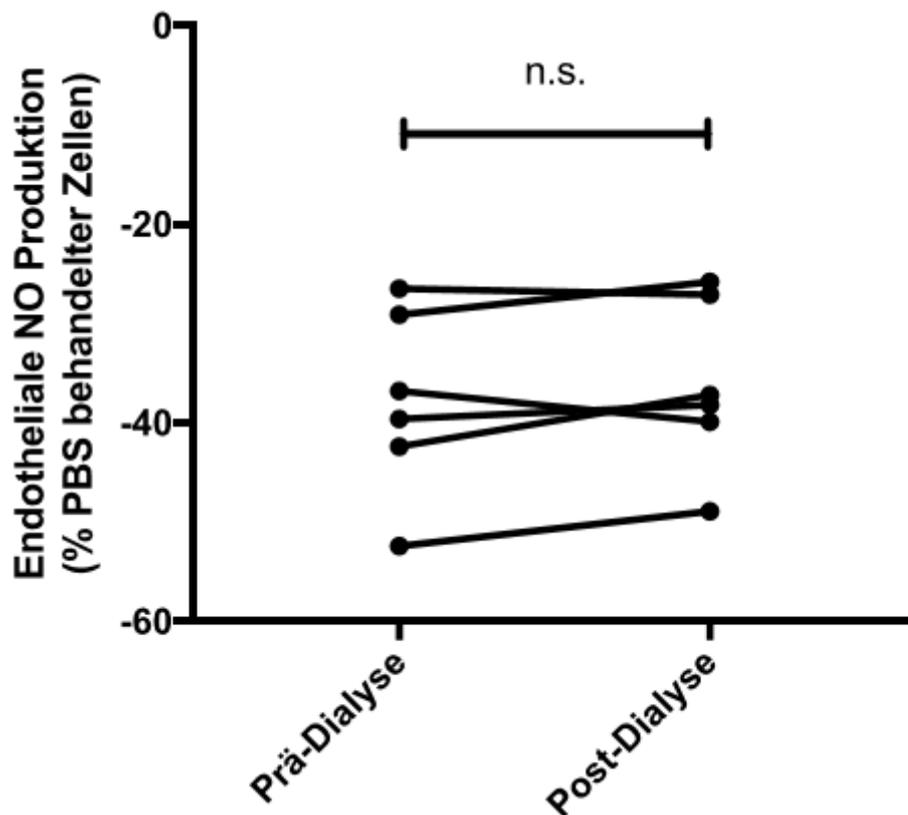


Abb. 10: Endotheliale NO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit HDL (50 µg/ml, 1hr) von Kindern, das aus Proben vor und unmittelbar nach Hämodialyse gewonnen wurde. Die Messung erfolgte mittels ESR-Spektroskopie. Miteinander verbundene Punkte repräsentieren jeweils Proben eines Probanden. N=6, n.s.=nicht signifikant.

Nach Inkubation von HAECs mit HDL von Kindern an Hämodialyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Stimulation der endothelialen NO Produktion, wenn man die Proben, die vor mit denen, die unmittelbar nach Hämodialyse gewonnen wurden miteinander vergleicht.

4.7. Effekte von HDL auf die endotheliale NO-Freisetzung in Abhängigkeit von der aortalen Pulswellengeschwindigkeit

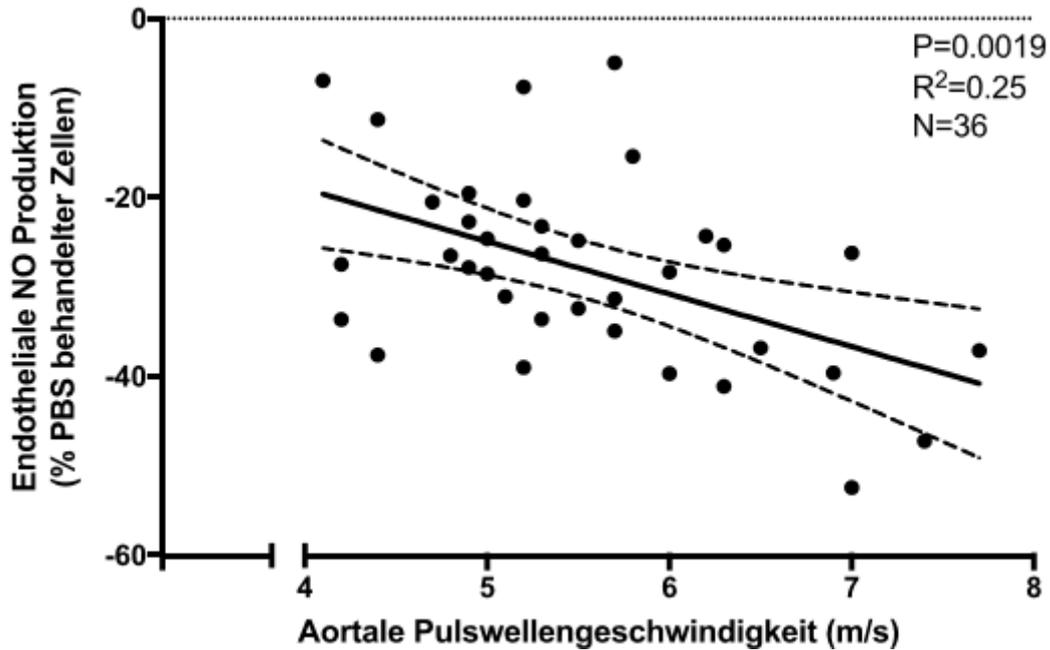


Abb. 11: Endotheliale NO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit HDL (50 µg/ml, 1 hr) von Kindern mit chronischer Nierenerkrankung in fortgeschrittenen Stadien (CKD G4-5) sowie an Dialyse in Abhängigkeit von der aortalen Pulswellengeschwindigkeit (aPWV). Die NO-Messung erfolgte mittels ESR-Spektrometrie. Die Messung der aPWV erfolgte mittels Applanationstonometrie. Jeder Punkt stellt einen einzelnen Probanden dar. N=36, p=0,0019, R²=0,25.

Die endotheliale NO Produktion in HAECs, die mit dem HDL chronisch nierenkranker Kinder inkubiert wurden, korrelierte signifikant mit der aortalen Pulswellengeschwindigkeit (aPWV). Eine höhere aortale Pulswellengeschwindigkeit war hierbei mit einer stärkeren Hemmung der endothelialen NO-Produktion assoziiert.

4.8. Veränderungen der endothelialen Effekte von HDL von Kindern an Dialyse und 3 Monate nach Nierentransplantation

4.8.1. Effekte von HDL auf die endotheliale NO-Freisetzung

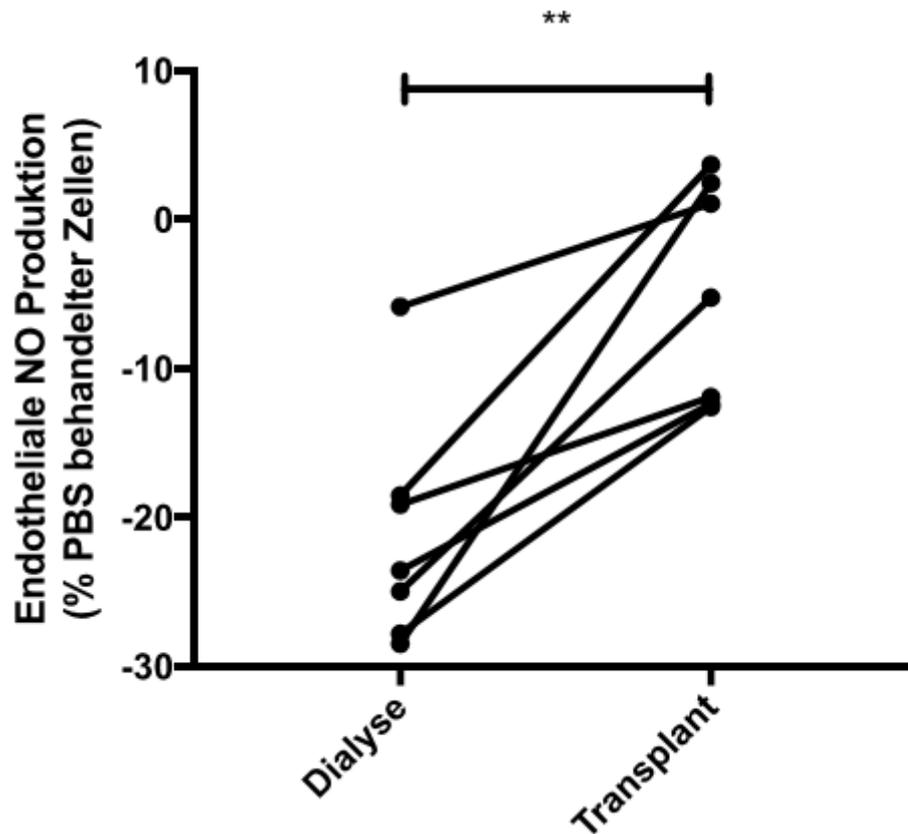


Abb. 12: Endotheliale NO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit HDL (50 µg/ml, 1 hr) von Kindern an Dialyse und 3 Monate nach Nierentransplantation. Die Messung erfolgte mittels ESR-Spektroskopie. Miteinander verbundene Punkte repräsentieren jeweils Proben desselben Probanden. N=7, **p<0,01, R²=0,80.

Die Inkubation der HAECs mit HDL dialysepflichtiger Kinder führte zu einer Hemmung der endothelialen NO-Produktion, die sich nach erfolgreicher Nierentransplantation signifikant verbesserte.

4.8.2. Effekte von HDL auf die endotheliale SO-Freisetzung

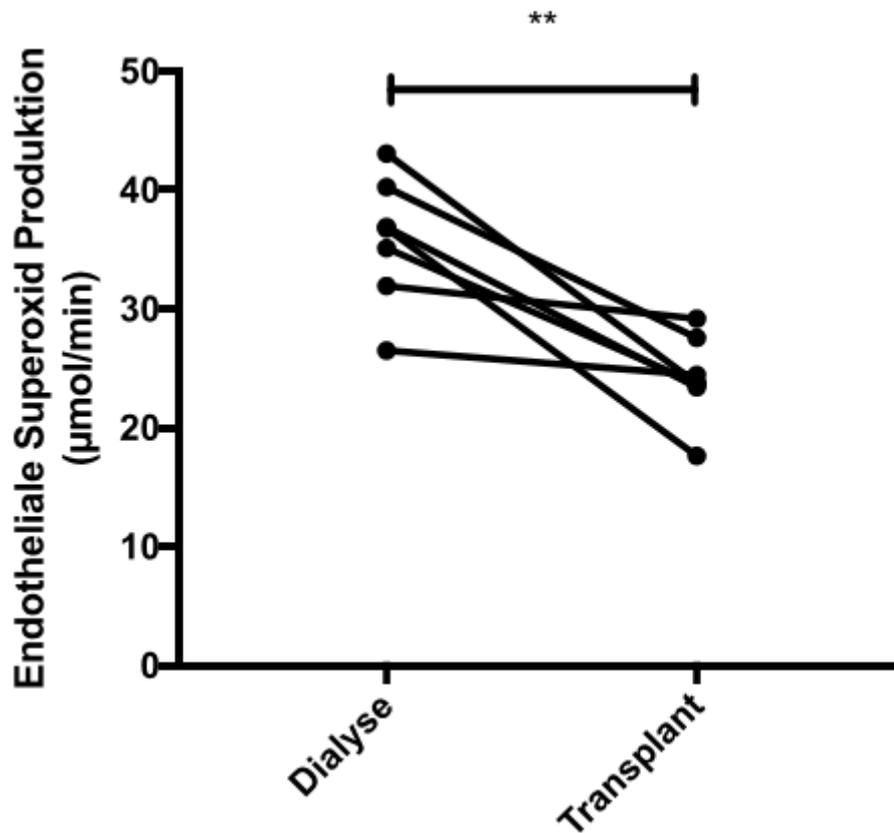


Abb. 13: Endotheliale SO-Produktion in HAECs nach Inkubation mit HDL (50 µg/ml, 1 hr) von Kindern an Dialyse und 3 Monate nach Nierentransplantation. Die Messung erfolgte mittels ESR-Spektroskopie. Miteinander verbundene Punkte repräsentieren Proben desselben Probanden. N=7, **p<0,01, R²=0,66.

Nach Inkubation der HAECs mit HDL dialysepflichtiger Kinder zeigte sich ein Anstieg der SO-Freisetzung, der sich nach erfolgreicher Nierentransplantation signifikant reduzierte.

4.8.3. Effekte von HDL auf die endotheliale Expression des vaskulären Zelladhensionsmolekül-1 (VCAM-1)

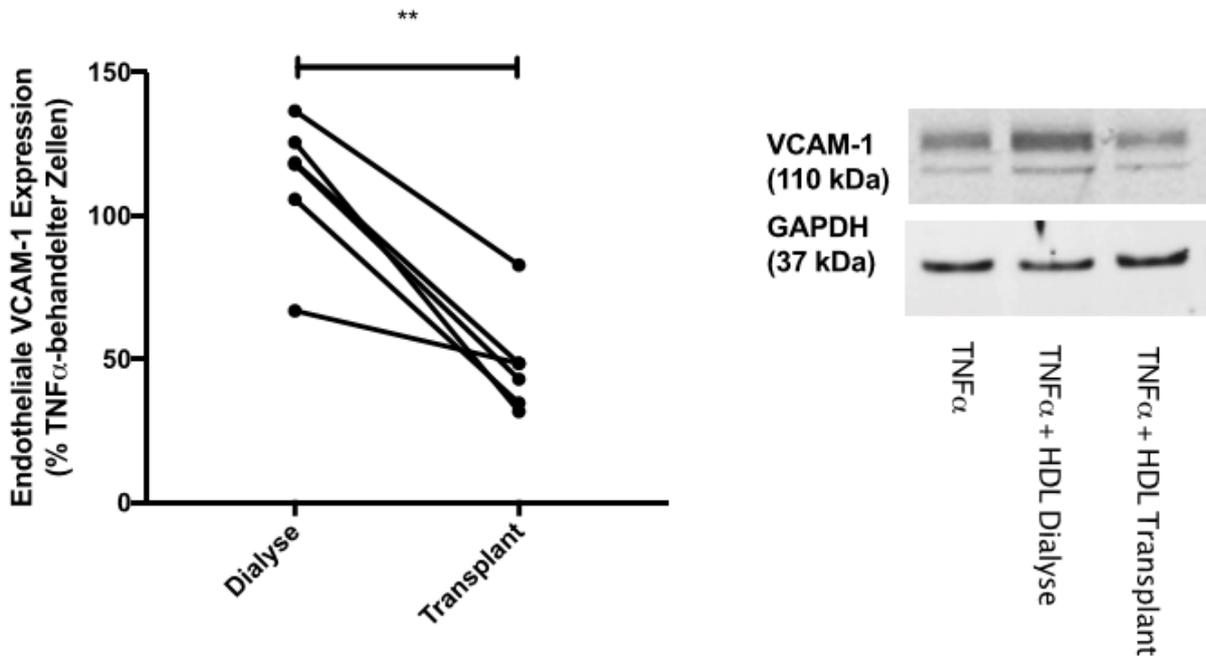


Abb.14: Westernblot zur Darstellung der endothelialen VCAM-1-Expression auf HAECs, die mit HDL (50µg/ml, 1 hr) von Kindern an Dialyse und 3 Monate nach Nierentransplantation präinkubiert und anschließend mit TNFα (0,1 ng/ml, 4 hr) stimuliert wurden. Die Messung erfolgte mittels Western Blot und wurde auf die Expression von GAPDH normalisiert. Miteinander verbundene Punkte repräsentieren Proben desselben Probanden. N=6, **p<0,01, R²=0,88.

Die Stimulation der mit HDL von dialysepflichtigen Kindern präinkubierten HAECs mit TNFα führt zu einer Zunahme der VCAM-1-Expression. Demgegenüber zeigte sich nach erfolgreicher Nierentransplantation wieder eine signifikante Reduktion der VCAM-1-Expression.

4.8.4. Cholesterolefflux aus Makrophagen

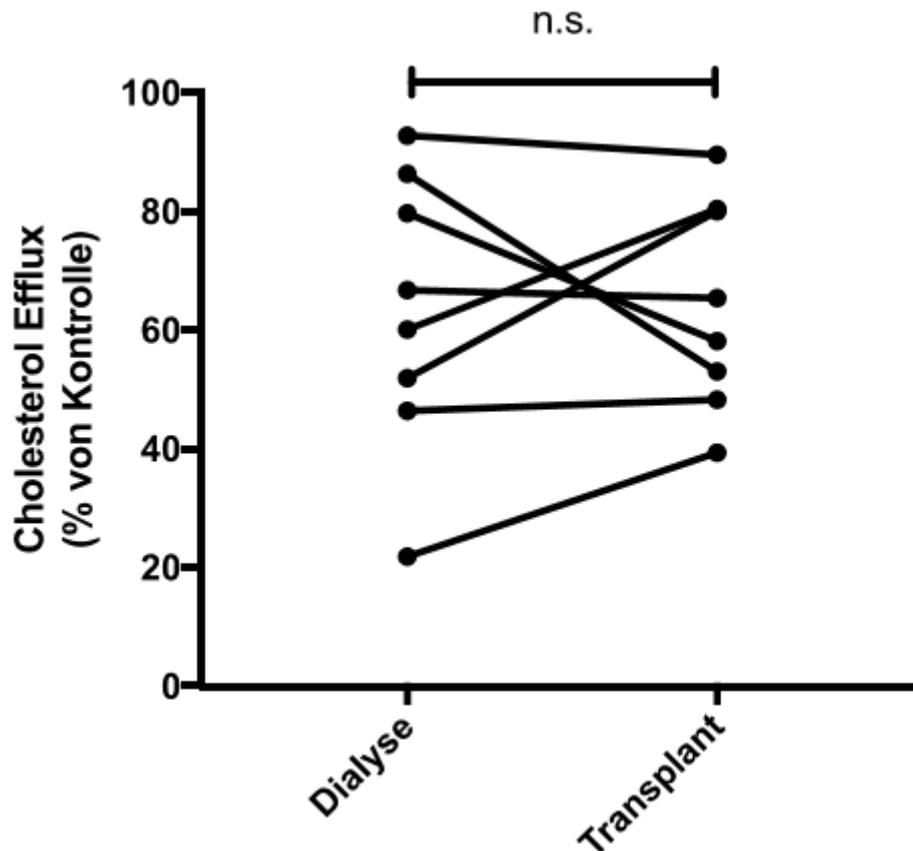


Abb. 15: Cholesterolefflux aus mit Cholesterole beladenen J774-Makrophagen in ein Apo B-freies Serum (Inkubation für 4 hr) von Kindern an Dialyse und 3 Monate nach Nierentransplantation. Die Messung erfolgte mittels Spektrophotometer. Miteinander verbundene Punkte repräsentieren Proben desselben Probanden. N=8, n.s.=nicht signifikant.

Der Cholesterolefflux aus Makrophagen in ein Apo B-freies Serum zeigte sich bei dialysepflichtigen Kindern vermindert und verbesserte sich nicht nach erfolgreicher Nierentransplantation.

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass das Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung bei Kindern, in Abwesenheit der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Effekte von HDL führt.

Bereits in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung zeigte sich eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit, eine erhöhte Superoxid-Freisetzung sowie eine erhöhte Expression von VCAM-1 auf HAECs. Zudem zeigte sich eine Einschränkung der Cholesterin-Efflux-Kapazität. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion nahmen diese HDL-vermittelten Effekte zu. Auch zeigte sich eine Assoziation zwischen HDL-Funktionalität und klinischen Messungen vaskulärer Dysfunktion. Die Zunahme der aortalen Pulswellengeschwindigkeit war mit einer progredienten Beeinträchtigung der HDL-induzierten NO-Freisetzung assoziiert. Durch eine Verbesserung der Nierenfunktion nach erfolgreicher Nierentransplantation konnte eine Verbesserung der endothelialen Effekte von HDL erzielt werden, die jedoch nicht das Level von Nierengesunden erreichte.

5.1. Beeinträchtigung der Funktion und Zusammensetzung von HDL unter inflammatorischen Bedingungen

In zahlreichen epidemiologischen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass HDL-Cholesterin (HDL-C) Plasmaspiegel invers mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse korrelieren und niedrige HDL-C Plasmaspiegel einen Risikofaktor für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit darstellen^{116,117}. Ein kausaler Zusammenhang wurde jedoch unlängst in Frage gestellt. Im Rahmen von zwei voneinander unabhängigen genetischen Studien, die sich der Methode der mendelschen Randomisierung, d.h. Randomisierung von Probanden anhand von genetischen Markern, bedienten, konnte keine Assoziation zwischen genetisch determiniertem HDL-Cholesterin und dem Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden festgestellt werden^{118,119}. So hatten beispielsweise Träger des LIPGSer-Allels ein um durchschnittlich 0,14 mmol/L höheres HDL-Cholesterin, bei ansonsten vergleichbaren Lipidkonzentrationen und gleichem kardiovaskulären Risikoprofil, verglichen mit Nicht-Allel-Trägern. Es fand sich bei LIPGSer-Allel-Trägern jedoch keine Risikoreduktion für einen Myokardinfarkt, gleichwohl die epidemiologischen Daten eine Risikoreduktion um 13% erwarten ließen¹¹⁹. In den letzten Jahrzehnten konnten diverse molekulare Mechanismen, welche die anti-atherogenen, gefäßprotektiven Effekte von HDL beschreiben, identifiziert werden¹²⁰. Wie u.a. in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, büßt HDL seine gefäßprotektiven Effekte bei chronischer Nierenerkrankung ein. Jedoch nicht nur bei chronischer

Nierenerkrankung, sondern auch im Rahmen anderer Erkrankungen, die mit oxidativem Stress und Inflammation einhergehen, sind die protektiven Effekte von HDL eingeschränkt.

Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte gezeigt werden, dass die anti-inflammatorischen und anti-atherogenen Effekte von HDL deutlich beeinträchtigt sind und die Fähigkeiten zur Vermittlung endothelialer Reperaturmechanismen sowie zur Induktion der NO-Synthese vermindert sind¹¹². In einer prospektiven Follow-up-Studie, die 111 Patienten mit Brustschmerzen einschloss, von denen 78 Patienten einen akuten Myokardinfarkt hatten (33 waren ohne Myokardinfarkt), zeigte sich bei den in vitro durchgeführten Untersuchungen mit dem isolierten HDL der STEMI-Patienten eine vergleichsweise verminderte Inhibition der endothelialen VCAM-1-Expression und eine reduzierte Cholesterolefflux-Kapazität unabhängig der HDL-Cholesterin-Spiegel im Plasma¹²¹. Vergleichbare Ergebnisse lieferte eine prospektive Studie von Dullaart et al., bei der 93 Patienten mit Brustschmerzen (65 davon hatten einen Myokardinfarkt) eingeschlossen wurden. Bei den Patienten mit Myokardinfarkt zeigte sich, auch nach Adjustierung der HDL-C Plasmaspiegel und des Apolipoprotein A1-Gehalts der HDL-Partikel, eine eingeschränkte Fähigkeit des HDLs zur Inhibition der endothelialen VCAM-1-Expression¹²². In zahlreichen weiteren Studien konnte eine Assoziation von koronarer Herzkrankheit bzw. akutem Myokardinfarkt und „dysfunktionalem“ HDL demonstriert werden, wobei als ursächlich u.a. Veränderungen im Lipidom und Proteom der HDL-Partikel postuliert werden¹²³. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein Lipidbestandteil von HDL, der u.a. an der HDL-vermittelten eNOS-Aktivierung beteiligt ist, bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung vermindert ist¹²⁴. Die S1P-armen HDL-Partikel sind in ihrer Fähigkeit zur Induktion einer Vasodilatation eingeschränkt. Dieser negative Effekt konnte durch Beladen der HDL-Partikel mit S1P aufgehoben werden¹²⁵. Des Weiteren konnten in einer Untersuchung von Bounafaa et al. bei 205 Patienten mit akutem Myokardinfarkt ein verminderter Gehalt der HDL-Partikel an der anti-oxidativ wirkenden Paraoxonase-1 (PON1) sowie eine verminderte Paraoxonase-1-Aktivität als potenzielle Ursachen einer beeinträchtigten HDL-Funktion identifiziert werden¹²⁶. Diese Beobachtungen ließen sich auch durch eine kleinere Studie von Gomaschi et al. bestätigen, in der bei 45 STEMI-Patienten die Fähigkeit von HDL zur Stimulation der endothelialen NO-Synthese zur NO-Produktion, die Cholesterolefflux-Kapazität sowie die HDL-Zusammensetzung in Abhängigkeit der delta CRP-Werte (CRP bei Aufnahme subtrahiert vom maximalen CRP während des stationären Aufenthaltes) untersucht wurden. Hierbei war ein hohes delta CRP der STEMI-Patienten mit einem reduzierten PON1- und S1P-Gehalt der HDL-Partikel sowie mit einer verminderten HDL-vermittelten Stimulation der NO-Produktion assoziiert. Interessanterweise wies HDL von STEMI-Patienten mit niedrigem delta CRP einen normalen PON1- und S1P-Gehalt auf. Die

Fähigkeit zur Stimulation der NO-Produktion blieb in diesem Kollektiv erhalten. Die Cholesterol-Efflux-Kapazität blieb unabhängig der inflammatorischen Antwort in beiden Gruppen unbeeinträchtigt¹²⁷. Dies unterstreicht den Einfluss von Inflammation auf Funktionalität und Zusammensetzung von HDL. Darüber hinaus konnten bei STEMI-Patienten Anreicherungen von weiteren Lipiden und Proteinen wie u.a. Lysophosphatidylcholin, Phosphatidsäure oder Serumamyloid A in den HDL-Partikeln nachgewiesen werden, bei denen ein negativer Einfluss auf die HDL-Funktionalität propagiert wird¹²³.

Auch für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 konnte in zahlreichen Studien gut belegt werden, dass HDL seine gefäßprotektiven Effekte einbüßt und dadurch einen bedeutenden Beitrag zum hohen kardiovaskulären Risiko von Diabetikern beisteuert¹²⁸⁻¹³⁰. Es wurden mehrere strukturelle Veränderungen der HDL-Partikel identifiziert, die für die „Dysfunktionalität“ bei Diabetikern verantwortlich gemacht werden. In einer Untersuchung von Denimal et al. wurde die Phospholipid- und Sphingolipid-Zusammensetzung des HDLs von 54 Typ-1-Diabetikern mit dem von 50 gesunden Kontrollen verglichen. HDL2 bzw. HDL3 der Typ-1-Diabetiker wies hierbei einen um 11,7% bzw. 14,4% geringeren S1P-Gehalt sowie einen um 23% bzw. 24% geringeren Gehalt an Ceramiden auf, bei vergleichbaren HDL-C Spiegeln beider Gruppen¹³¹. In einer Fall-Kontroll-Studie, die 41 Typ-2-Diabetiker und 41 gesunde Kontrollen mit vergleichbaren HDL-C-, LDL-C-, Gesamtcholesterin- und Triglyceridspiegeln einschloss, zeigten sich bei Typ-2-Diabetikern die HDL- vermittelte Stimulation der eNOS-Aktivität sowie die anti-inflammatorischen Eigenschaften des HDLs signifikant vermindert, verglichen mit der Kontrollgruppe. Von den Autoren wurde ein Zusammenhang mit verminderten S1P-Plasmaspiegeln der Typ-2-Diabetiker vermutet¹³². Demgegenüber konnte in 2 kleineren Studien, die jeweils 15 Typ-2-Diabetiker und 15 gesunde Kontrollen einschlossen, in der Gruppe der Diabetiker ein signifikant höherer S1P-Gehalt in den HDL-Partikeln nachgewiesen werden^{133,134}. Seitens der Autoren wurde dies als ein Versuch die dysfunktionalen Veränderungen von HDL zu kompensieren interpretiert. Hierbei führte die Inkubation von humanen Nabelvenenendothelzellen mit dem S1P-reicheren HDL der Diabetiker, im Vergleich zur Inkubation mit dem HDL der Nicht-Diabetiker, zur einer stärkeren Induktion der Cyclooxygenase 2(COX2)-Expression und der Freisetzung von Prostaglandin I₂ (PGI₂)¹³³, einem potenten Vasodilatator. Zudem konnte demonstriert werden, dass HDL, das nicht-enzymatisch glykiert wurde, eine deutlich eingeschränkte Fähigkeit zur Induktion der COX2-Expression und PGI₂- Freisetzung aufwies. Durch Rekonstitution des HDLs (glykiertes HDL wurde mit S1P inkubiert) konnten dessen protektive Effekte dosisabhängig wiederhergestellt werden¹³⁴. Im Rahmen von Proteomanalysen konnte bei Typ-2-Diabetikern eine nicht-enzymatische Glykierung von

Apolipoprotein A-I (Apo A-I), dem Hauptproteinbestandteil von HDL, das für zahlreiche protektive Effekte von HDL verantwortlich zeichnet, nachgewiesen werden. Diese führt im Vergleich zu nicht glykiertem Apo A-I zu einer 3-fach kürzeren Halbwertszeit von Apo A-I¹³⁵. Ferner konnte demonstriert werden, dass Myeloperoxidase, ein Enzym das mit oxidativem Stress und Inflammation assoziiert ist, bei Diabetikern die Oxidation von Apo A-I katalysiert und dadurch zu einer in vitro eingeschränkten Cholesterol-Efflux-Kapazität und verminderten anti-apoptotischen Effekten von HDL führt¹³⁶. Darüber hinaus waren in Studien u.a. ein erhöhter Serumamyloid A-Gehalt der HDL-Partikel¹³⁷ sowie eine verminderte PON1-Aktivität¹³⁸ mit einer Beeinträchtigung der HDL-Funktion bei Diabetikern assoziiert.

Auch bei einer Akute-Phase-Reaktion (APR), die Ausdruck einer systemischen Inflammation bei diversen Krankheitsbildern ist, sind die protektiven Effekte von HDL vermindert¹³⁹. In einer Untersuchung von Zimetti et al., bei der 59 Patienten mit einer APR aufgrund von Infektionen, Tumor- und Autoimmunerkrankungen mit einem CRP von >1,5 mg/dl und 39 gesunde Kontrollen eingeschlossen wurden, zeigte sich bei den Patienten mit APR eine verminderte Cholesterol-Efflux-Kapazität und die HDL-Partikel wiesen einen signifikant niedrigeren Apo A-I-Gehalt auf¹⁴⁰. Auch bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis, die mit einer chronischen Inflammation assoziiert sind, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, Spondylitis ankylosans oder systemischer Lupus erythematoses, konnte eine Beeinträchtigung der vasoprotektiven Effekte von HDL demonstriert werden, die mit dem erhöhten kardiovaskulären Risiko dieser Erkrankungsgruppe in Verbindung gebracht wird^{141,142}. In einer Untersuchung von O'Neill et al. zeigte sich, dass bereits eine geringgradige Inflammation zu strukturellen und funktionellen Veränderungen von HDL führt. Hierbei konnte bei 26 Patienten mit einer Paradontitis, verglichen mit 26 Gesunden, eine erhöhte HDL-vermittelte VCAM-1-Expression auf Endothelzellen sowie eine verminderte PON1-Aktivität nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise rehabilitierte sich die HDL-Funktion nach Auflösung des inflammatorischen Geschehens vollständig¹⁴³, was die dynamische Veränderbarkeit von HDL-Zusammensetzung und -funktionalität in Abhängigkeit des umgebenden Milieus unterstreicht. Dies geht konform mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, die eine teilweise Rehabilitation der HDL-Funktionalität nach erfolgreicher Nierentransplantation darlegen.

5.2. Endotheliale Effekte von HDL chronisch Nierenkranker

Sowohl Erwachsene als auch Kinder mit CKD haben ein überproportional hohes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse^{144,145}, das sich nicht in hinreichendem Maße durch die hohe Prävalenz an traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren erklären lässt¹⁴⁶. Die

Atherosklerose, als zugrunde liegende Ursache der Mehrzahl der Herz-Kreislauf-Erkrankungen, ist ein komplexer Prozess, der nur teilweise verstanden ist und einen fortwährenden Gegenstand der Forschung darstellt. In ihrer Pathogenese wird die endotheliale Dysfunktion (ED) als erster Schritt und frühester Indikator eines vaskulären Schadens angesehen¹⁴⁷. Dabei konnten v.a. oxidativer Stress und Inflammation, die beide hochprävalent bei CKD sind, als Auslöser von ED identifiziert werden¹⁴⁸. Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht zwischen übermäßiger Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und/oder deren vermindertem Abbau bzw. einem Mangel an Antioxidantien¹⁴⁹. Superoxide repräsentieren die bedeutendsten ROS im Zusammenhang mit oxidativem Stress. Sie werden hauptsächlich in Phagozyten und Endothelzellen durch Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH)-Oxidasen gebildet¹⁵⁰. Ihr Abbau erfolgt u.a. mit Hilfe von Superoxid-Dismutasen (SOD) zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid¹⁵⁷. CKD ist mit einer signifikanten Hochregulation von NADPH-Oxidasen bei gleichzeitiger Herabregulation von SOD assoziiert¹⁵². Darüber hinaus führen Superoxide durch Reaktion mit NO zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und der Entstehung von Peroxinitrit¹⁵³, das wiederum ein ROS verkörpert.

HDL von Gesunden vermittelt zahlreiche gefäßschützende und anti-atherogene Effekte^{79,154}, die u.a. der Entstehung von ROS und deren schädigendem Einfluss auf die Endothelfunktionen entgegenwirken. Demgegenüber konnte unsere Arbeitsgruppe demonstrieren, dass HDL von erwachsenen Patienten mit CKD im Gegensatz zu Gesunden seine gefäßschützenden Eigenschaften verliert und sogar pro-atherogene Effekte vermittelt, in dem es die endotheliale Superoxid-Produktion steigert, die NO-Bioverfügbarkeit reduziert und dadurch zu erhöhtem arteriellem Blutdruck führt¹¹⁴. Jurek et al. konnten zeigen, dass HDL von Dialysepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen in seinen Fähigkeiten zur Suppression der VCAM-1-Expression auf Endothelzellen sowie zur Verhinderung der Aufnahme von oxidiertem LDL in Makrophagen beeinträchtigt ist¹⁵⁵. Darüberhinaus ist HDL von Dialysepatienten deutlich eingeschränkt in der Verhinderung der oxidativen Transformation von LDL¹⁵⁶, die Ausdruck von oxidativem Stress ist und zur Entstehung der typischen Schaumzellen mit extrazellulärer Cholesterinablagerung in den atherosklerotischen Plaques führt. Während HDL Gesunder die Produktion inflammatorischer Zytokine durch periphere Monozyten und glatte Muskelzellen der Gefäßwand inhibiert, verliert HDL von Dialysepatienten diesen Effekt und führt teilweise sogar zu einer gesteigerten Zytokinproduktion^{157,158}.

Da erwachsene CKD-Patienten eine hohe Prävalenz an Begleiterkrankungen wie beispielsweise koronare Herzkrankheit und Diabetes mellitus aufweisen, die, wie bereits zuvor erwähnt, ebenfalls die Funktionalität von HDL beeinflussen, lässt sich die

Beeinträchtigung der vasoprotektiven Effekte von HDL nicht ausschließlich der eingeschränkten Nierenfunktion zuschreiben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung bei Kindern, in Abwesenheit relevanter Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, koronarer Herzerkrankung oder eines anderweitigen inflammatorischen Geschehens, zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Effekte von HDL führt. Bereits bei Kindern in frühen CKD-Stadien führte HDL im Vergleich zu Gesunden zu einer signifikant verminderten NO-Bioverfügbarkeit, einer erhöhten Superoxid-Freisetzung sowie zu einer erhöhten Expression von VCAM-1 in HAECs. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion nahmen diese schädlichen Effekte stufenweise zu und erreichten ein Maximum bei Kindern an Dialyse. Einhergehend mit diesen Beobachtungen konnten auch Kaseda et al. eine durch CKD bedingte Beeinträchtigung der HDL-Funktionalität bei Kindern demonstrieren¹⁵⁹. Sowohl das HDL von Kindern mit moderater CKD als auch von Kindern an Dialyse führte im Gegensatz zu Gesunden zu einer erhöhten Expression von inflammatorischen Zytokinen wie MCP-1, TNF- α und IL-1 β auf Macrophagen¹⁵⁹. Darüber hinaus zeigte sich das HDL der Kinder mit CKD und an Dialyse weniger effektiv in der Reduktion der Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin auf Endothelzellen. Nach künstlich erzeugter Verletzung des Endothels vermittelte HDL von Gesunden eine potente endotheliale Proliferation zur Reparatur des Schadens, während das HDL der Kinder mit CKD respektive der Kinder an Dialyse keine proliferativen Effekte induzieren konnte¹⁵⁹.

5.3. CKD und Cholesterol-Efflux-Kapazität

Durch eine Akkumulation von Cholesterolestern im Zytoplasma transformieren Makrophagen im subendothelialen Raum zu sogenannten Schaumzellen, die eine herausragende Rolle bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen spielen¹⁶⁰. HDL dient als wichtiger Akzeptor für freies Cholesterol aus Makrophagen der arteriellen Gefäßwand. Dieser HDL-vermittelte Cholesterol-Ausstrom aus den Makrophagen, der auch als Cholesterol-Efflux bezeichnet wird, repräsentiert den initialen Schritt des reversen Cholesteroltransportes und wirkt über Reduktion der Schaumzellbildung der Entstehung atherosklerotischer Läsionen entgegen¹⁶¹.

In mehreren Fall-Kontroll-Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit, verglichen mit Herzgesunden, die Cholesterol-Efflux-Kapazität eingeschränkt ist^{162,163}. Darüberhinaus war in Längsschnittstudien an unselektierten Populationen, die frei von kardiovaskulären Erkrankungen waren, die Cholesterol-Efflux-

Kapazität invers mit dem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen assoziiert¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Eine jüngst veröffentlichte Metaanalyse, die 15 Studien mit insgesamt 16.364 Patienten einschloss, bestätigte diese Ergebnisse: Eine verminderte HDL-vermittelte Cholesterol-Efflux-Kapazität war verbunden mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse¹⁶⁷.

Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz konnte in mehreren Studien eine signifikante Beeinträchtigung des HDL-vermittelten Cholesterol-Effluxes aus Makrophagen beschrieben werden^{168,169}. Dies ließ sich auch bei moderat verminderter Nierenfunktion nachweisen¹⁷⁰. In unseren Untersuchungen zeigte sich die Cholesterol-Efflux-Kapazität bereits bei Kindern mit nur geringgradig eingeschränkter Nierenfunktion signifikant vermindert im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion nahm dieser Effekt stufenweise zu und zeigte sich unverändert auch nach Verbesserung der Nierenfunktion durch eine erfolgreiche Nierentransplantation. Letzteres konnte auch in einer Untersuchung von Kopecky et al. bestätigt werden, wobei sich die Cholesterol-Efflux-Kapazität von Nierentransplantierten, unabhängig der Transplantatfunktion, nicht von derjenigen Patienten mit terminaler Nierenfunktion unterschied¹⁷¹. Einige Untersuchungen lassen vermuten, dass die verminderte Cholesterol-Efflux-Kapazität bei Patienten mit CKD nicht nur auf strukturelle und funktionelle Veränderungen von HDL zurückzuführen sind. So konnte sowohl bei einseitig nephrektomierten Mäusen als auch bei Patienten mit CKD eine verminderte Expression der Cholesteroltransporter ABCA1 und ABCG1 auf Monocyten bzw. Makrophagen beobachtet werden^{172,173}. Durch Inkubation der Makrophagen mit einem Leber-X-Rezeptor-Agonisten konnte eine Hochregulation der Cholesteroltransporter sowie eine verbesserte Cholesterol-Efflux-Kapazität erzielt werden¹⁷⁴. Im Gegensatz zu den bisherigen Studien und auch den Ergebnissen dieser Arbeit konnte in einer Untersuchung von Meier et al. bei Patienten mit CKD in den Stadien 3-5 verglichen mit Nierengesunden keine signifikant unterschiedliche Cholesterol-Efflux-Kapazität gemessen werden. Allerdings betrug die in den Versuchen verwendete HDL-Konzentration nur etwa 20 % der sonst verwendeten Menge¹⁷⁵. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Gipson et al. konnte sogar eine signifikant höhere Cholesterol-Efflux-Kapazität bei Patienten mit CKD in den Stadien 3-5 im Vergleich zu Gesunden und Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit gemessen werden¹⁷⁶. Interessanterweise war der Cholesteroltransfer in die Hepatozyten, der letzte Schritt des reversen Cholesteroltransports, in der Gruppe der CKD-Patienten signifikant vermindert. Um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, wurde eine humane Makrophagenzelllinie (THP1-Makrophagen) mit verestertem Cholesterol (anstatt freiem Cholesterol) sowie unverändertes Patientenserum (anstatt Apo B-depletiertes Serum) verwendet. Als einschränkend auf die Aussagekraft muss jedoch auf die geringe Zahl an eingeschlossenen Patienten und Kontrollen hingewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass,

im Gegensatz zur Allgemeinbevölkerung, bei nicht dialysepflichtigen Patienten mit CKD sowie bei Dialysepatienten die Cholesterolefflux-Kapazität keinen prognostischen Marker für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse und die Gesamtmortalität darstellt^{177,178}.

5.4. Einfluss von HDL von CKD-Patienten auf klinisch messbare vaskuläre Funktionen

Die aortale Pulswellengeschwindigkeit (aPWV) ist ein etabliertes, nicht-invasives Verfahren zur Detektion der vaskulären Funktion bzw. Dysfunktion und gilt als ein Surrogat-Parameter atherosklerotischer Läsionen¹⁷⁹. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die aPWV in der Allgemeinbevölkerung einen starken unabhängigen Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse darstellt^{180,181}, auch nach Adjustierung für traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren¹⁸². Bei bereits erhöhtem basalem kardiovaskulärem Risiko erhöht sich die Vorhersagekraft der aPWV für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, für kardiovaskuläre Mortalität und Gesamtmortalität¹⁸³. Im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist die aPWV bei Patienten mit CKD erhöht¹⁸⁴. Die aPWV ist sowohl bei nicht dialysepflichtigen CKD-Patienten als auch bei dialysepflichtigen Patienten ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, für kardiovaskuläre Mortalität und Gesamtmortalität^{185,186}. Darüber hinaus konnten Chen et al. zeigen, dass eine erhöhte aPWV bei CKD-Patienten in den Stadien 3-5 mit einer rascheren Progression der CKD assoziiert ist¹⁸⁷. In unseren Untersuchungen zeigte sich bei Kindern mit präterminaler Niereninsuffizienz und dialysepflichtigen Kindern eine Assoziation der HDL-vermittelten NO-Freisetzung mit klinischen Messungen vaskulärer Dysfunktion. Demnach korrelierte eine verminderte endotheliale NO-Freisetzung in vitro mit einer erhöhten aPWV. Dies bekräftigt den schädlichen Einfluss von HDL auf die vaskulären Funktionen bei Patienten mit CKD.

5.5. Veränderungen in der Zusammensetzung der HDL-Partikel bei CKD und deren Auswirkungen auf die Funktionalität von HDL

Reife HDL-Partikel setzen sich aus etwa 85-95 verschiedenen Proteinen, hunderten Lipiden und ca. einem Dutzend micro-RNAs zusammen^{188,189}. Je nach Größe, Dichte, Form, Lipid- und Proteinzusammensetzung können je nach angewandter Untersuchungstechnik mehrere HDL-Subklassen unterschieden werden. Durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation lassen sich die Hauptfraktionen, HDL2 und HDL3, separieren¹⁹⁰.

CKD führt zu einer veränderten HDL-Zusammensetzung, einhergehend mit einer Reduktion der größeren, weniger dichten lipidreichen HDL2-Partikel und einer Zunahme der kleineren, dichteren, lipidarmen HDL3-Partikel^{191,192}. Die reduzierte Aktivität sowie verminderte Plasmaspiegel der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) durch u.a. eine Herabregulation der LCAT-Expression in der Leber¹⁹³, führen zu einer verminderten Reifung der HDL-Partikel durch fehlende Veresterung freien Cholesterols¹⁹⁴. In der Mehrzahl der Studien war HDL2 im Vergleich zu HDL3 mit einem geringeren kardiovaskulären Risikoprofil verbunden¹⁹⁵. Allerdings ist die Studienlage uneinheitlich. So war in einer Untersuchung von Joshi et al. (The Framingham Offspring Study) HDL3 mit einer geringeren Rate an KHK-assoziierten Ereignissen wie Myokardinfarkt, Tod aufgrund von KHK und Revaskularisationen assoziiert¹⁹⁶.

Der Verlust der gefäßprotektiven Eigenschaften von HDL bei CKD, der u.a. in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, und die Transformation zu einem Molekül, das proatherogene Effekte am Endothel vermittelt, lässt sich zumindest teilweise Veränderungen im Lipidom und Proteom der HDL-Partikel zuschreiben¹⁹⁷. Dabei lassen sich Veränderungen von Art und Menge der HDL-gebundenen Lipide und Proteine sowie posttranslationale Modifikationen nachweisen.

Veränderungen der Proteinzusammensetzung von HDL

Holzer et al. konnten bei Patienten an Hämodialyse eine vermehrte Akkumulation von Serumamyloid A, Albumin, Lipoprotein-assoziiierter Phospholipase A2 und Apolipoprotein CIII in HDL nachweisen¹⁹⁸. Diese Veränderungen im Proteom von HDL korrelierten mit einer Beeinträchtigung der Cholesterin-Effluxkapazität. Darüber hinaus wies HDL einen reduzierten Gehalt an Phospholipiden, Lysophospholipiden sowie einen erhöhten Gehalt an Triglyceriden auf. Weitere Studien, die sich mit quantitativen Proteomanalysen von HDL von Dialysepatienten und gesunden Kontrollen befasst haben, zeigten ebenfalls Unterschiede in der Proteinkomposition von HDL, mit u.a. signifikanter Akkumulation von Proteinen im HDL der Dialysepatienten, die mit einem vermehrtem Auftreten von Atherosklerose¹⁹⁹ und einem Rückgang der exkretorischen Nierenfunktion einhergehen²⁰⁰. Vergleichbar zu HDL von Hämodialysepatienten, zeigten Kompositionsanalysen auch bei Peritonealdialysepatienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen, einen mehr proinflammatorischen Phänotyp von HDL, der mit Veränderungen in der Lipid- und Proteinzusammensetzung verbunden war¹⁹². Darüber hinaus konnten Wang et al. im HDL von Hämodialysepatienten im Vergleich zu Patienten mit fortgeschrittener CKD eine höhere Akkumulation von Serumamyloid A1, A2, A3, Hämoglobin β , Haptoglobin-verwandtes Protein, Cholesterinester-Transferprotein (CETP), Phospholipid-Transferprotein (PLTP) und Apolipoprotein E nachweisen²⁰¹. Dies

lässt einen Effekt des Hämodialyseverfahrens selbst auf Funktion und Zusammensetzung von HDL vermuten. Interessanterweise zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikant stärkere Hemmung der endothelialen NO-Produktion bei Kindern an Hämodialyse im Vergleich zu Kindern an Peritonealdialyse, was auch einen Effekt des gewählten Dialyseverfahrens selbst nahelegt.

Apolipoprotein A-I (Apo A-I), das Hauptstrukturprotein von HDL, spielt eine bedeutende Rolle in der Vermittlung vasoprotektiver Effekte²⁰². Proteomanalysen von HDL ergaben bei Dialysepatienten einen reduzierten Gehalt an Apo A-I¹⁵⁷. Auch bei nicht dialysepflichtigen CKD-Patienten sind die Apo A-I-Spiegel vermindert²⁰³. In Untersuchungen an Ratten mit CKD nach 5/6-Nephrektomie zeigte sich eine Herabregulation der hepatischen Apo A-I-Geneexpression als Ursache der verminderten Apo A-I-Plasmaspiegel²⁰⁴. Auch die Inkubation von HepG2-Zellen mit dem Plasma dialysepflichtiger Patienten führte in vitro zu einer reduzierten Apo A-I-mRNA-Expression und konsekutiv zu einer verminderten Apo A-I-Produktion²⁰⁵. Zudem trägt ein beschleunigter Katabolismus von Apo A-I bei Dialysepatienten zu reduzierten Apo A-I-Spiegeln und somit auch zu verminderten HDL-C-Siegeln bei²⁰⁶. Darüber hinaus wird ein verminderter Apo A-I-Gehalt in HDL im inflammatorischen Milieu durch einen vermehrten Austausch mit Serumamyloid A erzeugt²⁰⁷. Diese Umgestaltung des HDL-Proteoms im inflammatorischen Milieu korrelierte mit einer Beeinträchtigung der HDL-vermittelten Cholesterolefflux-Kapazität²⁰⁸.

Serumamyloid A (SAA) ist ein Akute-Phase-Protein, das unter inflammatorischen Bedingungen vermehrt von der Leber gebildet wird²⁰⁹, im Plasma mit HDL assoziiert²¹⁰ und hierbei Apo A-I aus den HDL-Partikeln verdrängt²¹¹. SAA-Plasmaspiegel sind bei Patienten mit CKD deutlich erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen¹⁵⁸. Schuchardt et al. konnten demonstrieren, dass mit SAA angereichertes HDL, durch Interaktion von SAA mit den Membranproteinen Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) und 4 (TLR4), zu einer Aktivierung von Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (MCP-1), einem Schlüsselchemokin in der Regulation von Migration und Infiltration von Makrophagen, in glatten Gefäßmuskelzellen führt²¹². Gleichwohl konnten Weichhart et al. zeigen, dass mit SAA angereichertes HDL analog zu HDL von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz die Produktion inflammatorischer Zytokine vermittelt¹⁵⁷. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Tölle et al., wobei der SAA-Gehalt in den HDL-Partikeln der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz invers mit den anti-inflammatorischen Eigenschaften von HDL korrelierte^{157,158}. Darüberhinaus trägt ein erhöhter SAA-Gehalt der HDL-Partikel zu einer Beeinträchtigung des Cholesteroleffluxes aus Makrophagen bei²¹³, insbesondere bei dialysepflichtigen Patienten¹⁹⁸. Ferner konnten Zewinger et al. demonstrieren, dass HDL durch Akkumulation von SAA seine Fähigkeiten zur Induktion der NO-Produktion, zur Suppression der Superoxid-Produktion sowie zur Reduktion

der Expression von VCAM-1 auf Endothelzellen einbüßte²¹⁴. Zudem korrelierten erhöhte SAA-Konzentrationen mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und einer erhöhten Gesamtmortalität. Interessanterweise waren bei Patienten mit niedrigen SAA-Konzentrationen hohe HDL-Plasmaspiegel mit einer geringeren kardiovaskulären Mortalität und Gesamtmortalität assoziiert und im Gegensatz dazu hohe HDL-Plasmaspiegel bei Patienten mit hohen SAA-Konzentrationen mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und Gesamtmortalität assoziiert²¹⁴. Kopecky et al. konnten zeigen, dass bei dialysepflichtigen Patienten höhere SAA-Konzentrationen mit einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergehen²¹⁵. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Akkumulation von SAA mit dazu beiträgt, dass das eigentlich gefäßprotektive HDL im urämischen Milieu in ein pro-inflammatorisches und pro-atherogenes Molekül transformiert.

Posttranslationale Modifikationen von HDL

Posttranslationale Modifikationen von HDL wie Oxidation und Carbamylierung von Proteinen führen zu einem Verlust der anti-inflammatorischen und anti-atherogenen Eigenschaften von HDL.

Paraoxonase-1 (PON1), ein Enzym, das mit HDL assoziiert ist, vermittelt über die Hydrolyse zahlreicher Substrate durch seine Arylesterase-Aktivität bedeutende anti-oxidative Effekte von HDL²¹⁶. Zum einen bewirkt PON eine Reduktion der Bildung und Akkumulation von Lipidperoxiden in LDL und verhindert somit dessen oxidative Transformation, die eine bedeutende Rolle in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen spielt. Zum anderen korreliert die PON-Aktivität invers mit der Anfälligkeit von HDL selbst oxidiert zu werden. PON verhindert die Peroxid- und Aldehydbildung in HDL, indem es Lipidperoxide und Cholesteryl-Linoleat-Hydroperoxide hydrolysiert²¹⁶. Bei Patienten mit KHK, Diabetes mellitus oder familiärer Hypercholesterinämie ist die PON-Aktivität im Vergleich zu Gesunden reduziert und wird mit einem Verlust der anti-inflammatorischen Effekte von HDL und einer Beschleunigung des Atherosklerose-Prozesses in Verbindung gebracht^{112,217–219}. Darüberhinaus konnte in einer Metaanalyse von Zhao et al. demonstriert werden, dass eine verminderte PON-Aktivität einen Risikofaktor für das Auftreten einer koronaren Herzerkrankung darstellt²²⁰. Sowohl bei dialysepflichtigen Patienten als auch bei Patienten mit nicht-dialysepflichtiger CKD lässt sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verminderte PON-Aktivität nachweisen^{221,222}, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert ist²²³. Demgegenüber zeigte sich in einer Untersuchung von Dantoine et al. die PON-Aktivität bei Nierentransplantierten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht vermindert²²². Dies deutet auf eine Rehabilitation der anti-oxidativen Effekte von HDL nach Nierentransplantation hin. Auch in unseren

Untersuchungen konnten wir demonstrieren, dass nach erfolgreicher Nierentransplantation eine zumindest partielle Restitution der vaskulären Effekte von HDL erzielt werden konnte. Neben PON, LCAT und Apo A-I trägt auch eine verminderte Glutathion-Peroxidase(GPX)-Aktivität zum Verlust der anti-oxidativen Eigenschaften von HDL bei Dialysepatienten bei²²⁴.

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten gebildet wird und eine bedeutende Rolle in anti-mikrobiellen, inflammatorischen und oxidativen Prozessen spielt. MPO erzeugt chlorierende Oxidantien, insbesondere Hypochlorsäure, und trägt zur Bildung zahlreicher intermediärer Sauerstoff- und Stickstoffspezies bei²²⁵. Hohe MPO-Plasmaspiegel sind mit dem Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung assoziiert und korrelieren mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse^{226,227}. Ein Ziel-Molekül von MPO ist HDL. So konnte bei hohen MPO-Plasmaspiegeln eine vermehrte Anreicherung von MPO-catalysierten Oxidationsprodukten in zirkulierendem HDL nachgewiesen werden²²⁵. Zudem konnte Apo A-I als ein Ziel MPO-vermittelter oxidativer Modifikationen ausgemacht werden²²⁸. MPO-bedingte Oxidationen von HDL bzw. Apo A-I sind assoziiert mit einer Inhibition des ABCA-1-abhängigen Cholesteroleffluxes aus Makrophagen²²⁹ sowie dem Verlust der anti-apoptischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von HDL²²⁸. Bei Patienten mit dialysepflichtiger CKD sind erhöhte Spiegel von oxidierten HDL mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse sowie kardiovaskulärer Mortalität assoziiert^{230,231}. Eine weitere posttranslationale Modifikation von HDL stellt die Carbamylierung von Proteinen dar. Hierbei bindet Isocyanat, die entweder als Abbauprodukt des Harnstoffs, insbesondere bei Harnstoff-Akkumulation bei chronischer Nierenerkrankung entsteht²³², oder durch die MPO-catalysierte Oxidation von Thiocyanat in Gegenwart von Wasserstoffperoxid gebildet wird²³³, an Aminogruppen von Lysin. Dies führt zu einer Änderung von Struktur und Funktion der carbamilierten Proteine. Der Carbamylierungsgrad von HDL zeigte sich bei CKD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht und korrelierte mit den Harnstoff-Plasmaspiegeln²³⁴. Carbamiliertes HDL führt zu einer nicht-produktiven Bindung von HDL an den SR-B1-Rezeptor, einem verminderten SR-B1-vermittelten Cholesterolefflux sowie verminderten anti-inflammatorischen²³⁵, anti-oxidativen²³³ und anti-apoptischen²³⁶ Fähigkeiten von HDL. Darüber hinaus trägt carbamiliertes HDL zur Schaumzellbildung in atherosklerotischen Läsionen bei²³⁷ und prognostiziert ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei Patienten mit ESRD²³⁸.

Akkumulation niedermolekularer Substanzen im HDL

Dimethylarginin (SDMA) sind nicht-proteinogene Aminosäuren, die durch posttranslationale Modifikation gebildet werden²³⁹. Sowohl ADMA als auch SDMA akkumulieren im Plasma von

CKD-Patienten²⁴⁰. ADMA konnte als starker endogener Inhibitor von NO-Synthasen (NOS) identifiziert werden²⁴¹, der mit endothelialer Dysfunktion, erhöhtem Blutdruck, kardiovaskulären Erkrankungen und einer erhöhten Mortalität assoziiert ist^{242,243}, insbesondere bei Patienten an Hämodialyse²⁴⁴. SDMA wurde lange Zeit als funktionell inaktives Enantiomer von ADMA betrachtet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass SDMA zwar nicht als direkter Inhibitor von NOS fungiert, jedoch mit dem L-Arginin-Transport zu NOS interferiert, hierdurch das Substratangebot zur NO-Produktion reduziert und über eine Entkopplung von NOS zu einer vermehrten Superoxid-Produktion führt^{245,246}. Sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern sind SDMA-Plasmaspiegel invers mit der Nierenfunktion assoziiert und erhöhte SDMA-Plasmaspiegel sind ein starker Prädiktor für eine Progression der CKD^{247,248}. Neben Induktion der Superoxid-Produktion durch NOS-Entkopplung, führte SDMA im Gegensatz zu ADMA bei Patienten mit CKD zu einer vermehrten Expression von Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)²⁴⁹. Dies unterstreicht die Bedeutung von SDMA als pro-oxidatives und pro-inflammatorisches Molekül insbesondere bei CKD. Darüberhinaus konnte in zahlreichen Studien demonstriert werden, dass erhöhte SDMA-Plasmaspiegel mit einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität und Gesamtmortalität sowie einer höheren Rate an kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind^{250,251}. Zudem konnten Pihlstrøm et al. zeigen, dass erhöhte SDMA-Plasmaspiegel bei Nierentransplantierten ein Prädiktor für den Verlust des Transplantates sind²⁵². Unsere Arbeitsgruppe konnte sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern mit CKD zeigen, dass erhöhte SDMA-Spiegel im Plasma im Gegensatz zu ADMA mit einer Akkumulation von SDMA in den HDL-Partikeln assoziiert sind^{114,253}. Sowohl HDL von Patienten mit CKD als auch HDL von Gesunden, das mit SDMA beladen wurde, führten durch Interaktion mit TLR2 zu einer verminderten endothelialen NO-Bioverfügbarkeit, beeinträchtigten endothelialen Reperaturmechanismen, gesteigerter inflammatorischer Aktivität und einem erhöhten arteriellen Blutdruck¹¹⁴. Diese Daten zeigen, dass die Akkumulation von SDMA zu einer Modifikation von HDLs hin zu inflammatorischen, pro-oxidativen Partikeln beiträgt, die nicht nur ihre vasoprotektiven Effekte einbüßen, sondern darüberhinaus endotheliale Dysfunktion induzieren. Analog zu den Beobachtungen bei SAA waren bei niedrigen SDMA-Konzentrationen höhere HDL-Spiegel mit einer geringeren Mortalität assoziiert und im Gegensatz dazu höhere HDL-Spiegel bei gleichzeitig erhöhter SDMA-Konzentration mit einer erhöhten Mortalität assoziiert²⁵⁴.

5.6. Strategien zur Verbesserung der HDL-Funktionalität

Wie bereits erwähnt, konnte in zahlreichen epidemiologischen Studien eine inverse Korrelation zwischen HDL-C Plasmaspiegeln und dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse beobachtet werden. Basierend auf diesen epidemiologischen Daten war zu erwarten, dass eine Erhöhung der HDL-C Konzentration zu einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse führt. Bei Menschen, die einen genetisch bedingten Mangel an Cholesterinester-Transferprotein (CETP) aufweisen, konnten vergleichsweise erhöhte HDL-C Spiegel und verminderte LDL-C Spiegel beobachtet werden²⁵⁵. Darüberhinaus konnte in Studien gezeigt werden, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen im CETP-Gen, die zu einem Mangel an CETP führen, mit einem reduzierten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert sind und mit einer verminderten Gesamtmortalität einhergehen^{256,257}. Diese Beobachtungen legten den Grundstein zur Entwicklung von CETP-Inhibitoren, die den Transfer von Cholesterinestern (CEs) und Triglyceriden von HDL auf LDL und VLDL unterbinden und dadurch die Konzentration von HDL-C im Plasma erhöhen und gleichzeitig die LDL-Konzentration senken^{258,259}. Trotz signifikanter HDL-C Erhöhung konnte durch den Einsatz von CETP-Inhibitoren in klinischen Studien, die Patienten mit hohem kardiovaskulären Risiko einschlossen, zunächst keine Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen erzielt werden^{260–262}. Die erste größere Studie, die ILLUMINATE-Studie, in der der CETP-Inhibitor Torcetrapib eingesetzt wurde, musste bei einem Exzess kardiovaskulärer Erkrankungen und einer erhöhten Gesamtmortalität im Interventionsarm vorzeitig abgebrochen werden²⁶⁰. Als unerwünschter Nebeneffekt des Torcetrapibs zeigte sich ein Hyperaldosteronismus, der zu einer signifikanten Blutdruckerhöhung führte, und als potenzielle Ursache der enttäuschenden Ergebnisse propagiert wurde. Trotz Abwesenheit solcher Nebeneffekte konnte auch durch den Einsatz der CETP-Inhibitoren Dalcetrapib (DAL-OUTCOMES-Studie)²⁶¹ und Evacetrapib (ACCELERATE-Studie)²⁶² keine Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse erzielt werden. Einzig in der REVEAL-Studie, mit der im Vergleich zu den vorgenannten Studien längsten Studiendauer und höchsten Zahl an eingeschlossenen Patienten, konnte durch Einsatz des CETP-Inhibitoren Anacetrapib neben einer potenten HDL-C Erhöhung von 104% und einer LDL-C Senkung von 17% eine signifikante, wenn auch geringe Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse erzielt werden²⁶³. Allerdings lässt sich dieser Effekt hinreichend durch die LDL-C Senkung erklären. Auch bei genetisch bedingtem Mangel an CETP korreliert das Ausmaß der positiven Auswirkungen auf die KHK mit dem Grad der LDL-C Senkung²⁵⁷. Mehrere potenzielle Ursachen des ausbleibenden positiven Effekts der HDL-C Erhöhung durch CETP-Inhibitoren wie beispielsweise interferierende Nebeneffekte der eingesetzten Therapeutika, eine zu geringe HDL-C Erhöhung sowie eine zu kurze Studiendauer sind möglich. Zudem erscheint die reine

HDL-C Erhöhung bei fehlender Verbesserung der Funktionalität von HDL eine plausible Erklärung. Bei Dialysepatienten sind weder niedrige HDL-C Spiegel noch eine hohe CETP-Aktivität mit kardiovaskulären Ereignissen korreliert²⁶⁴, so dass eine Erhöhung der HDL-C Plasmaspiegel in diesem Patientenkollektiv von höchst fraglichem Nutzen ist. Gestützt wird diese Hypothese durch die bisherigen Beobachtungen, dass eine moderate HDL-C Erhöhung durch Fibrate oder Niacin bei CKD-Patienten das kardiovaskuläre Outcome nicht verbessert hat und sogar mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert ist^{265,266}.

Erfolgsversprechende Therapieansätze zielen daher auf eine Verbesserung der Funktionalität von HDL ab. Wie bereits erwähnt spielt Apo A-I eine unverzichtbare Rolle bei zahlreichen protektiven Effekten, die durch HDL vermittelt werden, wie beispielsweise dem Cholesterol-Efflux aus Makrophagen. Darauf basierend wurden, als potenziellem Behandlungsansatz von Atherosklerose, Apo A-I-Mimetika entwickelt²⁶⁷. Diese aus einer Sequenz von 18 Aminosäuren zusammengesetzten synthetischen Peptide unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz deutlich von nativem Apo A-I, bilden jedoch eine Helixstruktur, die der des nativen Apo A-I gleicht und imitieren so dessen physiologische Funktionen^{268,269}. Die am besten untersuchten Apo A-I-Mimetika sind die 4F-Peptide (L-4F, D-4F, rev-D-4F). In Untersuchungen an Mäusen führte die Verabreichung von 4F zu einer Verbesserung des HDL-vermittelten Cholesterol-Effluxes und des reversen Cholesterintransports²⁷⁰ sowie zu einer verminderten LDL-Oxidation und einer verminderten Expression von VCAM-1 und MCP-1²⁷¹. Darüber hinaus war die Gabe von D-4F und reverse-D-4F mit einer Reduktion atherosklerotischer Läsionen bei Mäusen assoziiert^{271,272}. In vitro konnte durch die Gabe von 4F eine Stimulation der endothelialen Zellproliferation mit beschleunigter Reendothelialisierung einer Endothelverletzung sowie eine erhöhte eNOS-Aktivität nachgewiesen werden²⁷³. Zudem führte die Verabreichung von D-4F bei KHK-Patienten zu einer Verbesserung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von HDL²⁷⁴. In einer kleinen Studie konnten Vaziri et al. demonstrieren, dass 4F in vitro die anti-inflammatorische Aktivität von HDL bei Dialysepatienten verbessert²⁷⁵. Inwieweit 4F oder andere Apo A-I-Mimetika eine therapeutische Option zur Reduktion kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität bei CKD-Patienten darstellen, muss in größeren klinischen Studien untersucht werden. In mehreren Studien wurde untersucht, inwiefern die Infusion rekonstituierter HDL-Partikel (rHDLs), die als Kombination aus ApoA-I und Phospholipiden synthetisiert werden, zu einer Reduktion atherosklerotischer Plaques führt. Mit Apo A-I-Milano, einer natürlich vorkommenden Isoform von Apo A-I, die sich als besonders potent in der Vermittlung anti-atherogener Effekte herausgestellt hat²⁷⁶, wurde in Kombination mit Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC) mit ETC-216 erstmals ein entsprechender Rekombinant synthetisiert. In Untersuchungen an Mäusen führte die Infusion von ETC-216

zu einer signifikanten Plaque-Reduktion²⁷⁷. Darüber hinaus konnten Nissen et al. in einer kleineren klinischen Studie an Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine signifikante Reduktion der koronaren Atheromvolumina nach mehrmaliger Infusion von ETC-216 nachweisen²⁷⁸. Allerdings kam es dosisabhängig zu einem relevanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten sowie zu einem Abfall der Lymphozyten. MDCO-216, ebenfalls ein Rekombinant aus Apo A-I-Milano und POPC, dessen Infusion zu keiner unerwünschten Immunstimulation führte, bewirkte in Kombination mit Statinen keine Reduktion atherosklerotischer Läsionen der Koronargefäße bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom²⁷⁹. CER-001, ein Rekombinant aus Apo A-I, Sphingomyelin und Dipalmitoylphosphatidylglycerol bewirkte analog zu ETC-216 eine Reduktion der Volumina atherosklerotischer Plaques im Mausmodell²⁸⁰. Durch Infusion von CER-001 konnte jedoch keine Reduktion der koronaren Atherosklerose bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erzielt werden²⁸¹. Ein weiteres rHDL, CSL-112, erhöhte signifikant den ABCA1-abhängigen Cholesterolefflux aus Makrophagen in vitro sowie in vivo bei gesunden Probanden und Patienten mit stabiler atherosklerotischer Erkrankung^{282,283} und stellt somit einen weiteren vielversprechenden Therapieansatz dar. Der Nutzen von CSL-112 wird gegenwärtig in größeren randomisiert-kontrollierten Studien untersucht. Als Ursachen für den bislang ausbleibenden Erfolg der rHDLs werden eine zu kurze Studiendauer, eine zu geringe verabreichte Dosis von rHDL sowie eine durch Inflammation und oxidativen Stress bedingte strukturelle und funktionelle Modifikation von rHDL nach Infusion diskutiert.

Auch eine Verbesserung der Nierenfunktion durch eine erfolgreiche Nierentransplantation führt zumindest teilweise zu einer Verbesserung der HDL-Funktionalität. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Nierentransplantation zu einer signifikanten Verbesserung der HDL-vermittelten endothelialen Effekte hinsichtlich NO-Bioverfügbarkeit, Superoxid-Produktion und VCAM-1-Expression führt, die jedoch nicht das Niveau gesunder Kontrollen erreichten. Demgegenüber hatte eine erfolgreiche Nierentransplantation keine Verbesserung der Cholesterolefflux-Kapazität zur Folge. Auch in einer Untersuchung von Kopecky et al. waren Cholesterolefflux-Kapazität und anti-oxidative Aktivität von HDL bei Nierentransplantierten deutlich supprimiert, unabhängig von der Transplantatfunktion und vergleichbar mit dem Niveau von Dialysepatienten¹⁷¹. Nitriertes Apo A-I gilt als valider Marker für dysfunktionales HDL^{284,285}. Bakillah et al. konnten zeigen, dass sich 12 Monate nach erfolgreicher Nierentransplantation eine signifikante Reduktion von nitriertem Apo A-I nachweisen lässt. Hierbei korrelierten nitriertes Apo A-I und MPO-Aktivität miteinander²⁸⁶. Diese Daten zeigen, dass sich durch eine Verbesserung der Nierenfunktion, zumindest teilweise, die bei Dialysepatienten beobachteten schädlichen Modifikationen und Einschränkungen der Funktionalität von HDL verbessern lassen.

5.7. Zusammenfassung

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass es bei chronisch nierenkranken Kindern, in Abwesenheit der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, im Vergleich zu gesunden Probanden, zu einer Einschränkung der gefäßprotektiven Effekte von HDL kommt. Bereits in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung zeigten sich eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit, eine erhöhte Superoxid-Freisetzung, eine erhöhte Expression von VCAM-1 auf HAECs sowie eine eingeschränkte Cholesterolefflux-Kapazität. Diese pro-atherogenen, HDL-vermittelten Effekte nahmen mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion zu und konnten durch eine erfolgreiche Nierentransplantation teilweise reduziert werden, ohne jedoch das Niveau von Nierengesunden zu erreichen. Zudem war eine Zunahme der aortalen Pulswellengeschwindigkeit, als klinischer Parameter vaskulärer Dysfunktion, mit einer Beeinträchtigung der HDL-induzierten NO-Freisetzung assoziiert.

Diese Beobachtungen unterstreichen den Einfluss einer chronisch eingeschränkten Nierenfunktion auf die Transformation von HDLs hin zu pro-atherogenen Partikeln, die zumindest teilweise die mit chronischer Nierenerkrankung assoziierte hohe kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität erklären. Die Verhinderung bzw. Umkehr dieser Transformation sollte, als therapeutischer Aspekt, perspektivisch Beachtung finden.

6. Literaturverzeichnis

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1-150
2. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-2047.
3. U.S. Renal Data System, USRDS 2012 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2012
4. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2017;69(3):A7-A8.
5. Fields LE, Burt VL, Cutler JA, Hughes J, Roccella EJ, Sorlie P. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. *Hypertension*. 2004;44(4):398-404.
6. Gregg EW, Cheng YJ, Cadwell BL, et al. Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults. *JAMA*. 2005;293(15):1868-1874.
7. Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA*. 2003;290(2):199-206.
8. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*. 2003;289(1):76-79.
9. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-based Studies from 90 Countries. *Circulation*. 2016;134(6):441-450.
10. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(4):228-236.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Chronic Kidney Disease in the United States, 2019. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2019.
12. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(3):363-373.
13. Ardissino G, Daccò V, Testa S, et al. Epidemiology of chronic renal failure in children: data from the ItalKid project. *Pediatrics*. 2003;111(4 Pt 1):382-387.
14. Mong Hiep TT, Ismaili K, Collart F, et al. Clinical characteristics and outcomes of children with stage 3-5 chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 2010;25(5):935-940.

15. Tonelli M, Wiebe N, Culeton B, et al. Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2034-2047.
16. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2005;20(6):1048-1056.
17. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-1305.
18. Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med*. 2001;134(8):629-636.
19. Ahmed A, Campbell RC. Epidemiology of Chronic Kidney Disease in Heart Failure. *Heart Fail Clin*. 2008;4(4):387-399.
20. Garimella PS, Hirsch AT. Peripheral Artery Disease and Chronic Kidney Disease: Clinical Synergy to Improve Outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014;21(6):460-471.
21. Goicoechea M, de Vinuesa SG, Gómez-Campderá F, Luño J. Predictive cardiovascular risk factors in patients with chronic kidney disease (CKD). *Kidney Int Suppl*. 2005;(93):S35-38.
22. Shroff GR, Frederick PD, Herzog CA. Renal Failure and Acute Myocardial Infarction: Clinical Characteristics in Advanced Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Non-Chronic Kidney Disease Patients. A Collaborative Project of the United States Renal Data System/National Institutes of Health and the National Registry of Myocardial Infarction. *Am Heart J*. 2012;163(3):399-406.
23. Weiner DE, Dad T. Stroke and Chronic Kidney Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Management Across Kidney Disease Stages. *Semin Nephrol*. 2015;35(4):311-322.
24. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1998;9(12 Suppl):16-23.
25. Saran R, Robinson B, Abbott KC, et al. US Renal Data System 2017 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2018;71(3):A7.
26. Kramer A, Pippias M, Noordzij M, et al. The European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015: a summary. *Clin Kidney J*. 2018;11(1):108-122.
27. Subbiah AK, Chhabra YK, Mahajan S. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: a neglected subgroup. *Heart Asia*. 2016;8(2):56-61.
28. Astor BC, Hallan SI, Miller ER, Yeung E, Coresh J. Glomerular filtration rate, albuminuria, and risk of cardiovascular and all-cause mortality in the US population. *Am J Epidemiol*. 2008;167(10):1226-1234.
29. Groothoff JW, Gruppen MP, Offringa M, et al. Mortality and causes of death of end-stage renal disease in children: a Dutch cohort study. *Kidney Int*. 2002;61(2):621-629.

30. Oh J, Wunsch R, Turzer M, et al. Advanced Coronary and Carotid Arteriopathy in Young Adults With Childhood-Onset Chronic Renal Failure. *Circulation*. 2002;106(1):100-105.
31. Shroff R, Jr DJW, Mitsnefes MM. Cardiovascular complications in children with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(11):642-649.
32. Shroff R. Monitoring cardiovascular risk factors in children on dialysis. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial*. 2009;29 Suppl 2:173-175.
33. McDonald SP, Craig JC, Australian and New Zealand Paediatric Nephrology Association. Long-term survival of children with end-stage renal disease. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2654-2662.
34. Lilien MR, Groothoff JW. Cardiovascular disease in children with CKD or ESRD. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(4):229-235.
35. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.
36. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, et al. Traditional Cardiovascular Disease Risk Factors in Dialysis Patients Compared with the General Population: The CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(7):1918-1927.
37. Menon V, Gul A, Sarnak MJ. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005;68(4):1413-1418.
38. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2000;58(1):353-362.
39. Rucker D, Tonelli M. Cardiovascular risk and management in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(5):287-296.
40. Major RW, Cheng MRI, Grant RA, et al. Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2018;13(3):e0192895.
41. Jagadeswaran D, Indhumathi E, Hemamalini AJ, Sivakumar V, Soundararajan P, Jayakumar M. Inflammation and nutritional status assessment by malnutrition inflammation score and its outcome in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 2019 Feb;38(1):341-347.
42. Quaschnig T, Krane V, Metzger T, Wanner C. Abnormalities in uremic lipoprotein metabolism and its impact on cardiovascular disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2001;38(4 Suppl 1):14-19.
43. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet Lond Engl*. 2005;366(9493):1267-1278.
44. Fellström BC, Jardine AG, Schmieder RE, et al. Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1395-1407.

45. Shepherd J, Kastelein JJP, Bittner V, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with coronary heart disease and chronic kidney disease: the TNT (Treating to New Targets) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(15):1448-1454.
46. Baigent C, Landray MJ, Reith C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2011;377(9784):2181-2192.
47. Wanner C, Krane V, März W, et al. Atorvastatin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Undergoing Hemodialysis. *N Engl J Med*. 2005;353(3):238-248.
48. Lemos PA, Serruys PW, de Feyter P, et al. Long-term fluvastatin reduces the hazardous effect of renal impairment on four-year atherosclerotic outcomes (a LIPS substudy). *Am J Cardiol*. 2005;95(4):445-451.
49. Tonelli M, Isles C, Curhan GC, et al. Effect of pravastatin on cardiovascular events in people with chronic kidney disease. *Circulation*. 2004;110(12):1557-1563.
50. Tonelli M, Moyé L, Sacks FM, Kiberd B, Curhan G, Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Trial Investigators. Pravastatin for secondary prevention of cardiovascular events in persons with mild chronic renal insufficiency. *Ann Intern Med*. 2003;138(2):98-104.
51. Holdaas H, Wanner C, Abletshauer C, Gimpelewicz C, Isaacsohn J. The effect of fluvastatin on cardiac outcomes in patients with moderate to severe renal insufficiency: a pooled analysis of double-blind, randomized trials. *Int J Cardiol*. 2007;117(1):64-74.
52. Koren MJ, Davidson MH, Wilson DJ, et al. Focused atorvastatin therapy in managed-care patients with coronary heart disease and CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2009;53(5):741-750.
53. Wang N, Fulcher J, Abeysuriya N, et al. Intensive LDL cholesterol-lowering treatment beyond current recommendations for the prevention of major vascular events: a systematic review and meta-analysis of randomised trials including 327 037 participants. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2020;8(1):36-49.
54. Wanner C, Krane V, März W, et al. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med*. 2005;353(3):238-248.
55. Rysz-Górczyńska M, Banach M. Subfractions of high-density lipoprotein (HDL) and dysfunctional HDL in chronic kidney disease patients. *Arch Med Sci AMS*. 2016;12(4):844-849.
56. Annema W, von Eckardstein A. High-density lipoproteins. Multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2013;77(10):2432-2448.
57. Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125(15):1905-1919.
58. Asztalos BF, Schaefer EJ. High-density lipoprotein subpopulations in pathologic conditions. *Am J Cardiol*. 2003;91(7A):12E-17E.

59. Silverman DI, Ginsburg GS, Pasternak RC. High-density lipoprotein subfractions. *Am J Med.* 1993;94(6):636-645.
60. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-Density Lipoprotein Subfractions - What the Clinicians Need to Know. *Cardiology.* 2013;124(2):116-125.
61. Camont L, Chapman MJ, Kontush A. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends Mol Med.* 2011;17(10):594-603.
62. Rothblat GH, Bamberger M, Phillips MC. Reverse cholesterol transport. In: *Methods in Enzymology.* Vol 129. Plasma Lipoproteins Part B: Characterization, Cell Biology, and Metabolism. Academic Press; 1986:628-644.
63. Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22(4):347-351.
64. Speer T, Zewinger S, Fliser D. Uraemic dyslipidaemia revisited: role of high-density lipoprotein. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(10):2456-2463.
65. Kunitake ST, Chen GC, Kung S-F, Schilling JW, Hardman DA, Kane JP. Pre-Beta High Density Lipoprotein. 1990;10(1):6.
66. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 1968;9(2):155-167.
67. Kostner GM, Knipping G, Groener JE, Zechner R, Dieplinger H. The role of LCAT and cholesteryl ester transfer proteins for the HDL and LDL structure and metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 1987;210:79-86.
68. Shih AY, Sligar SG, Schulten K. Maturation of high-density lipoproteins. *J R Soc Interface.* 2009;6(39):863-871.
69. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage Reverse Cholesterol Transport Key to the Regression of Atherosclerosis? *Circulation.* 2006;113(21):2548-2555.
70. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res.* 2005;96(12):1221-1232.
71. Rye K-A, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009;50(Suppl):S195-S200.
72. Nofer J-R, van der Giet M, Tölle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004;113(4):569-581.
73. Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol.* 2015;6.
74. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000;41(9):1481-1494.
75. Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(7):1031-1040.

76. Murphy AJ, Chin-Dusting JPF, Sviridov D, Woollard KJ. The anti inflammatory effects of high density lipoproteins. *Curr Med Chem*. 2009;16(6):667-675.
77. Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res*. 2004;95(8):764-772.
78. Viswambharan H, Ming X-F, Zhu S, et al. Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2004;94(7):918-925.
79. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*. 2006;98(11):1352-1364.
80. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34480-34485.
81. Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM. Nitric oxide: orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med*. 2012;44(7):694-716.
82. Cohen RA. The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 1995;38(2):105-128.
83. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res*. 2001;88(8):756-762.
84. Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(6):226-231.
85. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med*. 2001;7(7):853-857.
86. Mineo C, Yuhanna IS, Quon MJ, Shaul PW. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9142-9149.
87. Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, et al. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3701-3713.
88. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 4:1-14.
89. García-Palmieri MR. The endothelium in health and in cardiovascular disease. *P R Health Sci J*. 1997;16(2):136-141.
90. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-809.
91. Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995;75(6):71B-74B.
92. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*. 1997;80(9A):11I-16I.

93. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, et al. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol.* 2013;169(3):493-511.
94. Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial Protection by High-Density Lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1724–1731
95. Brites F, Martin M, Guillas I, Kontush A. Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit. *BBA Clin.* 2017;8:66-77.
96. Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory Properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95:764–772
97. Valente AJ, Irimpen AM, Siebenlist U, Chandrasekar B. OxLDL induces endothelial dysfunction and death via TRAF3IP2: inhibition by HDL3 and AMPK activators. *Free Radic Biol Med.* 2014;70:117-128.
98. Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23 Suppl 1):III8-14.
99. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):1987-1994.
100. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2292-2301.
101. Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, et al. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238(1):61-65.
102. Bennett MR, Boyle JJ. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998;138(1):3-9.
103. Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14(5):469-475.
104. Stoneman VEA, Bennett MR. Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci Lond Engl 1979.* 2004;107(4):343-354.
105. Kinscherf R, Claus R, Wagner M, et al. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1998;12(6):461-467.
106. Napoli C, Quehenberger O, De Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W. Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2000;14(13):1996-2007.
107. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 1997;81(6):970-976.
108. Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhäusl W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes.* 1995;44(11):1323-1327.

109. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res.* 2000;87(3):179-183.
110. Mineo C, Shaul PW. Role of high-density lipoprotein and scavenger receptor B type I in the promotion of endothelial repair. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(5):156-161.
111. Seetharam D, Mineo C, Gormley AK, et al. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res.* 2006;98(1):63-72.
112. Besler C, Heinrich K, Rohrer L, et al. Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2693-2708.
113. Sorrentino SA, Besler C, Rohrer L, et al. Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy. *Circulation.* 2010;121(1):110-122.
114. Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction via activation of Toll-like receptor-2. *Immunity.* 2013;38(4):754-768.
115. Mitsnefes MM. Cardiovascular Disease in Children with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2012;23(4):578-585.
116. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79(1):8-15.
117. deGoma EM, Leeper NJ, Heidenreich PA. Clinical significance of high-density lipoprotein cholesterol in patients with low low-density lipoprotein cholesterol. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(1):49-55.
118. Haase CL, Tybjærg-Hansen A, Qayyum AA, Schou J, Nordestgaard BG, Frikke-Schmidt R. LCAT, HDL cholesterol and ischemic cardiovascular disease: a Mendelian randomization study of HDL cholesterol in 54,500 individuals. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):E248-256.
119. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012;380(9841):572-580.
120. Besler C, Lüscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med.* 2012;4(4):251-268.
121. Annema W, Willemsen HM, de Boer JF, et al. HDL function is impaired in acute myocardial infarction independent of plasma HDL cholesterol levels. *J Clin Lipidol.* 2016;10(6):1318-1328.
122. Dullaart RPF, Annema W, Tio RA, Tietge UJF. The HDL anti-inflammatory function is impaired in myocardial infarction and may predict new cardiac events independent of HDL cholesterol. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2014;433:34-38.

123. Rached F, Lhomme M, Camont L, et al. Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(9):1254-1261.
124. Sattler KJE, Elbasan S, Keul P, et al. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(6):821-832.
125. Sattler K, Gräler M, Keul P, et al. Defects of High-Density Lipoproteins in Coronary Artery Disease Caused by Low Sphingosine-1-Phosphate Content: Correction by Sphingosine-1-Phosphate-Loading. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(13):1470-1485.
126. Bounafaa A, Berrougui H, Ikhlef S, et al. Alteration of HDL functionality and PON1 activities in acute coronary syndrome patients. *Clin Biochem*. 2014;47(18):318-325.
127. Gomaraschi M, Ossoli A, Favari E, et al. Inflammation impairs eNOS activation by HDL in patients with acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2013;100(1):36-43.
128. Ebtehaj S, Gruppen EG, Parvizi M, Tietge UJF, Dullaart RPF. The anti-inflammatory function of HDL is impaired in type 2 diabetes: role of hyperglycemia, paraoxonase-1 and low grade inflammation. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1):132.
129. Ganjali S, Dallinga-Thie GM, Simental-Mendía LE, Banach M, Pirro M, Sahebkar A. HDL functionality in type 1 diabetes. *Atherosclerosis*. 2017;267:99-109.
130. Srivastava RAK. Dysfunctional HDL in diabetes mellitus and its role in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem*. 2018;440(1-2):167-187.
131. Denimal D, Pais de Barros J-P, Petit J-M, Bouillet B, Vergès B, Duvillard L. Significant abnormalities of the HDL phosphosphingolipidome in type 1 diabetes despite normal HDL cholesterol concentration. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):752-760.
132. Vaisar T, Couzens E, Hwang A, et al. Type 2 diabetes is associated with loss of HDL endothelium protective functions. *PLoS One*. 2018;13(3):e0192616.
133. Tong X, Peng H, Liu D, et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin 1-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:27.
134. Tong X, Lv P, Mathew AV, et al. The compensatory enrichment of sphingosine -1-phosphate harbored on glycated high-density lipoprotein restores endothelial protective function in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:82.
135. Kashyap SR, Osme A, Ilchenko S, et al. Glycation Reduces the Stability of ApoAI and Increases HDL Dysfunction in Diet-Controlled Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):388-396.
136. Lu N, Xie S, Li J, Tian R, Peng Y-Y. Myeloperoxidase-mediated oxidation targets serum apolipoprotein A-I in diabetic patients and represents a potential mechanism leading to impaired anti-apoptotic activity of high density lipoprotein. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2015;441:163-170.
137. McEneny J, Daniels J-A, McGowan A, et al. A Cross-Sectional Study Demonstrating Increased Serum Amyloid A Related Inflammation in High-Density Lipoproteins from

- Subjects with Type 1 Diabetes Mellitus and How this Association Was Augmented by Poor Glycaemic Control. *J Diabetes Res.* 2015;2015:351601.
138. Jamuna Rani A, Mythili SV, Nagarajan S. Study on paraoxonase 1 in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2014;58(1):13-16.
 139. Jahangiri A. High-density lipoprotein and the acute phase response. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(2):156-160.
 140. Zimetti F, De Vuono S, Gomaschi M, et al. Plasma cholesterol homeostasis, HDL remodeling and function during the acute phase reaction. *J Lipid Res.* 2017;58(10):2051-2060.
 141. Ronda N, Favari E, Borghi MO, et al. Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(3):609-615.
 142. Gkolfinopoulou C, Stratikos E, Theofilatos D, et al. Impaired Antiatherogenic Functions of High-density Lipoprotein in Patients with Ankylosing Spondylitis. *J Rheumatol.* 2015;42(9):1652-1660.
 143. O'Neill F, Riwanto M, Charakida M, et al. Structural and functional changes in HDL with low grade and chronic inflammation. *Int J Cardiol.* 2015;188:111-116.
 144. Ballew SH, Matsushita K. Cardiovascular Risk Prediction in CKD. *Semin Nephrol.* 2018;38(3):208-216.
 145. Weaver DJ, Mitsnefes M. Cardiovascular Disease in Children and Adolescents With Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol.* 2018;38(6):559-569.
 146. Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective. *Kidney Int.* 2006;70(1):26-33.
 147. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-636.
 148. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:1-19.
 149. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017.
 150. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
 151. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-1928.
 152. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(3):119-146.
 153. Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R. Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular

- endothelium: studies in cultured cells and smokers. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 2009;296(6):H1781-H1792.
154. Mineo C, Shaul PW. Novel Biological Functions of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *Circ Res*. 2012;111(8):1079-1090.
 155. Jurek A, Turyna B, Kubit P, Klein A. The ability of HDL to inhibit VCAM-1 expression and oxidized LDL uptake is impaired in renal patients. *Clin Biochem*. 2008;41(12):1015-1018.
 156. Morena M, Cristol JP, Dantoine T, Carbonneau MA, Descomps B, Canaud B. Protective effects of high-density lipoprotein against oxidative stress are impaired in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2000;15(3):389-395.
 157. Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, et al. Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2012;23(5):934-947.
 158. Tölle M, Huang T, Schuchardt M, et al. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res*. 2012;94(1):154-162.
 159. Kaseda R, Jabs K, Hunley TE, et al. Dysfunctional high-density lipoproteins in children with chronic kidney disease. *Metabolism*. 2015;64(2):263-273.
 160. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med Berl Ger*. 2017;95(11):1153-1165.
 161. Anastasius M, Kockx M, Jessup W, Sullivan D, Rye K-A, Kritharides L. Cholesterol efflux capacity: An introduction for clinicians. *Am Heart J*. 2016;180:54-63.
 162. Linsel-Nitschke P, Jansen H, Aherrahou Z, et al. Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Lipids Health Dis*. 2009;8:14.
 163. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364(2):127-135.
 164. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014;371(25):2383-2393.
 165. Saleheen Danish, Scott Robert, Javad Sunda, et al. Abstract 19753: Hdl Cholesterol Efflux Capacity is Inversely Associated With Incident Chd Events Independent of Hdl-c and Apo-a-i Concentrations. *Circulation*. 2014;130(suppl_2):A19753-A19753.
 166. Ebtehaj S, Gruppen EG, Bakker SJL, Dullaart RPF, Tietge UJF. HDL (High-Density Lipoprotein) Cholesterol Efflux Capacity Is Associated With Incident Cardiovascular Disease in the General Population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1874-1883.
 167. Qiu C, Zhao X, Zhou Q, Zhang Z. High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity is inversely associated with cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis*. 2017;16.

168. Yamamoto S, Yancey PG, Ikizler TA, et al. Dysfunctional high-density lipoprotein in patients on chronic hemodialysis. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(23):2372-2379.
169. Anderson JLC, Gautier T, Nijstad N, et al. High density lipoprotein (HDL) particles from end-stage renal disease patients are defective in promoting reverse cholesterol transport. *Sci Rep.* 2017;7.
170. Kaseda R, Tsuchida Y, Yang H-C, et al. Chronic kidney disease alters lipid trafficking and inflammatory responses in macrophages: effects of liver X receptor agonism. *BMC Nephrol.* 2018;19.
171. Kopecky C, Haidinger M, Birner-Grünberger R, et al. Restoration of Renal Function Does Not Correct Impairment of Uremic HDL Properties. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(3):565-575.
172. Zuo Y, Yancey P, Castro I, et al. Renal Dysfunction Potentiates Foam Cell Formation by Repressing ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(9):1277-1282.
173. Ganda A, Yvan-Charvet L, Zhang Y, et al. Plasma Metabolite Profiles, Cellular Cholesterol Efflux, and Non-Traditional Cardiovascular Risk in Patients with CKD. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;112:114-122.
174. Matsuo K, Yamamoto S, Wakamatsu T, et al. Increased Proinflammatory Cytokine Production and Decreased Cholesterol Efflux Due to Downregulation of ABCG1 in Macrophages Exposed to Indoxyl Sulfate. *Toxins.* 2015;7(8):3155-3166.
175. Meier SM, Wultsch A, Hollaus M, et al. Effect of chronic kidney disease on macrophage cholesterol efflux. *Life Sci.* 2015;136:1-6.
176. Gipson GT, Carbone S, Wang J, et al. Impaired Delivery of Cholesterol Effluxed From Macrophages to Hepatocytes by Serum From CKD Patients May Underlie Increased Cardiovascular Disease Risk. *Kidney Int Rep.* 2019;5(2):199-210.
177. Kopecky C, Ebtehaj S, Genser B, et al. HDL Cholesterol Efflux Does Not Predict Cardiovascular Risk in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2017;28(3):769-775.
178. Bauer L, Kern S, Rogacev KS, et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Cardiovascular Events in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(2):246-247.
179. Tomiyama H, Yamashina A. [Pulse wave velocity]. *Rinsho Byori.* 2004;52(8):669-675.
180. Mattace-Raso FUS, van der Cammen TJM, Hofman A, et al. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation.* 2006;113(5):657-663.
181. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation.* 2006;113(5):664-670.
182. Ohkuma T, Ninomiya T, Tomiyama H, et al. Brachial-Ankle Pulse Wave Velocity and the Risk Prediction of Cardiovascular Disease: An Individual Participant Data Meta-Analysis. *Hypertens Dallas Tex 1979.* 2017;69(6):1045-1052.

183. Zhong Q, Hu M-J, Cui Y-J, et al. Carotid-Femoral Pulse Wave Velocity in the Prediction of Cardiovascular Events and Mortality: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Angiology*. 2018;69(7):617-629.
184. Tholen S, Klofat K, Pan CR, et al. Progression of aortic pulse wave velocity in patients with chronic kidney disease. *J Clin Hypertens Greenwich Conn*. 2013;15(11):833-838.
185. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME, London GM. Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*. 1999;99(18):2434-2439.
186. Zoungas S, Cameron JD, Kerr PG, et al. Association of carotid intima-medial thickness and indices of arterial stiffness with cardiovascular disease outcomes in CKD. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2007;50(4):622-630.
187. Chen S-C, Chang J-M, Tsai Y-C, Su H-M, Chen H-C. Brachial-ankle pulse wave velocity and brachial pre-ejection period to ejection time ratio with renal outcomes in chronic kidney disease. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. 2012;35(12):1159-1163.
188. Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res*. 2013;54(10):2575-2585.
189. Annema W, von Eckardstein A. Dysfunctional high-density lipoproteins in coronary heart disease: implications for diagnostics and therapy. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2016;173:30-57.
190. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res*. 1981;22(2):339-358.
191. Alabakovska SB, Todorova BB, Labudovic DD, Toseska KN. LDL and HDL subclass distribution in patients with end-stage renal diseases. *Clin Biochem*. 2002;35(3):211-216.
192. Holzer M, Schilcher G, Curcic S, et al. Dialysis Modalities and HDL Composition and Function. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015;26(9):2267-2276.
193. Vaziri ND, Liang K, Parks JS. Down-regulation of hepatic lecithin:cholesterol acyltransferase gene expression in chronic renal failure. *Kidney Int*. 2001;59(6):2192-2196.
194. Serban M-C, Muntean D, Mikhailids D, Toth P, Banach M. Dysfunctional HDL: The journey from savior to slayer. *Clin Lipidol*. 2014;9:49-59.
195. Maeda S, Nakanishi S, Yoneda M, et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(5):444-452.
196. Joshi PH, Toth PP, Lirette ST, et al. Association of high-density lipoprotein subclasses and incident coronary heart disease: The Jackson Heart and Framingham Offspring Cohort Studies. *Eur J Prev Cardiol*. 2016;23(1):41-49.

197. Rysz J, Gluba-Brzózka A, Rysz-Górzyńska M, Franczyk B. The Role and Function of HDL in Patients with Chronic Kidney Disease and the Risk of Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2).
198. Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, et al. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2011;22(9):1631-1641.
199. Shao B, de Boer I, Tang C, et al. A Cluster of Proteins Implicated in Kidney Disease Is Increased in High-Density Lipoprotein Isolated from Hemodialysis Subjects. *J Proteome Res.* 2015;14(7):2792-2806.
200. Rubinow KB, Henderson CM, Robinson-Cohen C, et al. Kidney function is associated with an altered protein composition of high-density lipoprotein. *Kidney Int.* 2017;92(6):1526-1535.
201. Wang K, Zelnick LR, Hoofnagle AN, et al. Alteration of HDL Protein Composition with Hemodialysis Initiation. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN.* 2018;13(8):1225-1233.
202. Mangaraj M, Nanda R, Panda S. Apolipoprotein A-I: A Molecule of Diverse Function. *Indian J Clin Biochem.* 2016;31(3):253-259.
203. Attman PO, Alaupovic P. Lipid and apolipoprotein profiles of uremic dyslipoproteinemia--relation to renal function and dialysis. *Nephron.* 1991;57(4):401-410.
204. Vaziri ND, Deng G, Liang K. Hepatic HDL receptor, SR-B1 and Apo A-I expression in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc.* 1999;14(6):1462-1466.
205. Moradi H, Said HM, Vaziri ND. Post-transcriptional nature of uremia-induced downregulation of hepatic apolipoprotein A-I production. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2013;161(6):477-485.
206. Ikewaki K. In vivo kinetic studies to further understand pathogenesis of abnormal lipoprotein metabolism in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2014;18(2):261-264.
207. Sato M, Ohkawa R, Yoshimoto A, et al. Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein. *Biosci Rep.* 2016;36(4).
208. Vaisar T, Tang C, Babenko I, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res.* 2015;56(8):1519-1530.
209. Eklund KK, Niemi K, Kovanen PT. Immune functions of serum amyloid A. *Crit Rev Immunol.* 2012;32(4):335-348.
210. Benditt EP, Eriksen N. Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(9):4025-4028.
211. Banka CL, Yuan T, de Beer MC, Kindy M, Curtiss LK, de Beer FC. Serum amyloid A (SAA): influence on HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 1995;36(5):1058-1065.

212. Schuchardt M, Prüfer N, Tu Y, et al. Dysfunctional high-density lipoprotein activates toll-like receptors via serum amyloid A in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):3421.
213. Annema W, Nijstad N, Tölle M, et al. Myeloperoxidase and serum amyloid A contribute to impaired in vivo reverse cholesterol transport during the acute phase response but not group IIA secretory phospholipase A(2). *J Lipid Res*. 2010;51(4):743-754.
214. Zewinger S, Drechsler C, Kleber ME, et al. Serum amyloid A: high-density lipoproteins interaction and cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2015;36(43):3007-3016.
215. Kopecky C, Genser B, Drechsler C, et al. Quantification of HDL proteins, cardiac events, and mortality in patients with type 2 diabetes on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2015;10(2):224-231.
216. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paromo SL, La Du BN. Paraonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraonase. *J Clin Invest*. 1998;101(8):1581-1590.
217. McElveen J, Mackness MI, Colley CM, Peard T, Warner S, Walker CH. Distribution of paraon hydrolytic activity in the serum of patients after myocardial infarction. *Clin Chem*. 1986;32(4):671-673.
218. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, et al. Serum paraonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1991;86(2-3):193-199.
219. Mackness B, Mackness M. Anti-inflammatory properties of paraonase-1 in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*. 2010;660:143-151.
220. Zhao Y, Ma Y, Fang Y, et al. Association between PON1 activity and coronary heart disease risk: a meta-analysis based on 43 studies. *Mol Genet Metab*. 2012;105(1):141-148.
221. Dirican M, Akca R, Sarandol E, Dilek K. Serum paraonase activity in uremic predialysis and hemodialysis patients. *J Nephrol*. 2004;17(6):813-818.
222. Dantoine TF, Debord J, Charmes JP, et al. Decrease of serum paraonase activity in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1998;9(11):2082-2088.
223. Kennedy DJ, Tang WHW, Fan Y, et al. Diminished antioxidant activity of high-density lipoprotein-associated proteins in chronic kidney disease. *J Am Heart Assoc*. 2013;2(2):e000104.
224. Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2009;153(2):77-85.
225. Malle E, Marsche G, Panzenboeck U, Sattler W. Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins. *Arch Biochem Biophys*. 2006;445(2):245-255.
226. Zhang R, Brennan ML, Fu X, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*. 2001;286(17):2136-2142.

227. Brennan M-L, Penn MS, Van Lente F, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1595-1604.
228. Undurti A, Huang Y, Lupica JA, Smith JD, DiDonato JA, Hazen SL. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. *J Biol Chem*. 2009;284(45):30825-30835.
229. Shao B, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase: an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21(4):322-328.
230. Honda H, Ueda M, Kojima S, et al. Oxidized high-density lipoprotein as a risk factor for cardiovascular events in prevalent hemodialysis patients. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):493-501.
231. Honda H, Hirano T, Ueda M, et al. High-Density Lipoprotein Subfractions and Their Oxidized Subfraction Particles in Patients with Chronic Kidney Disease. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23(1):81-94.
232. Kalim S, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found*. 2014;64(5):793-803.
233. Holzer M, Zangger K, El-Gamal D, et al. Myeloperoxidase-derived chlorinating species induce protein carbamylation through decomposition of thiocyanate and urea: novel pathways generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17(8):1043-1052.
234. Sun JT, Yang K, Lu L, et al. Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(6):F511-517.
235. Holzer M, Gauster M, Birner-Grünberger R, Marsche G. The effect of carbamylation on the functionality of high-density lipoprotein. *BMC Pharmacol*. 2009;9(Suppl 2):A6.
236. Verbrugge FH, Tang WHW, Hazen SL. Protein Carbamylation and Cardiovascular Disease. *Kidney Int*. 2015;88(3):474-478.
237. Holzer M, Gauster M, Pfeifer T, et al. Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(12):2337-2346.
238. Koeth RA, Kalantar-Zadeh K, Wang Z, Fu X, Tang WHW, Hazen SL. Protein Carbamylation Predicts Mortality in ESRD. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2013;24(5):853-861.
239. Tain Y-L, Hsu C-N. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). *Toxins*. 2017;9(3).
240. Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(5):275-285.
241. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet Lond Engl*. 1992;339(8793):572-575.

242. Schlesinger S, Sonntag SR, Lieb W, Maas R. Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165811.
243. Zhou S, Zhu Q, Li X, et al. Asymmetric dimethylarginine and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2017(7):44692.
244. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, et al. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet Lond Engl*. 2001;358(9299):2113-2117.
245. Bode-Böger SM, Scalera F, Kielstein JT, et al. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2006;17(4):1128-1134.
246. Feliers D, Lee D-Y, Gorin Y, Kasinath BS. Symmetric dimethylarginine alters endothelial nitric oxide activity in glomerular endothelial cells. *Cell Signal*. 2015;27(1):1-5.
247. El-Sadek AE, Behery EG, Azab AA, et al. Arginine dimethylation products in pediatric patients with chronic kidney disease. *Ann Med Surg* 2012. 2016;9:22-27.
248. Emrich IE, Zawada AM, Martens-Lobenhoffer J, et al. Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc*. 2018;107(3):201-213.
249. Schepers E, Barreto DV, Liabeuf S, et al. Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2011;6(10):2374-2383.
250. Oliva-Damaso E, Oliva-Damaso N, Rodriguez-Esparragon F, et al. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. *Int J Mol Sci*. 2019;20(15).
251. Schwedhelm E, Wallaschofski H, Atzler D, et al. Incidence of all-cause and cardiovascular mortality predicted by symmetric dimethylarginine in the population-based study of health in pomerania. *PLoS One*. 2014;9(5):e96875.
252. Pihlstrøm H, Mjøen G, Dahle DO, et al. Symmetric dimethylarginine as predictor of graft loss and all-cause mortality in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2014;98(11):1219-1225.
253. Shroff R, Speer T, Colin S, et al. HDL in children with CKD promotes endothelial dysfunction and an abnormal vascular phenotype. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2014;25(11):2658-2668.
254. Zewinger S, Kleber ME, Rohrer L, et al. Symmetric dimethylarginine, high-density lipoproteins and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2017;38(20):1597-1607.
255. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1234-1238.

256. Johannsen TH, Frikke-Schmidt R, Schou J, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Genetic inhibition of CETP, ischemic vascular disease and mortality, and possible adverse effects. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(20):2041-2048.
257. Nomura A, Won H-H, Khera AV, et al. Protein-Truncating Variants at the Cholesteryl Ester Transfer Protein Gene and Risk for Coronary Heart Disease. *Circ Res*. 2017;121(1):81-88.
258. Doggrell SA. Raising high-density lipoprotein cholesterol with inhibitors of cholesteryl ester transfer protein - a new approach to coronary artery disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13(10):1365-1368.
259. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med*. 2004;350(15):1505-1515.
260. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007;357(21):2109-2122.
261. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2089-2099.
262. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, et al. Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(20):1933-1942.
263. HPS3/TIMI55-REVEAL Collaborative Group, Bowman L, Hopewell JC, et al. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(13):1217-1227.
264. Seiler S, Schlitt A, Jiang X-C, et al. Cholesteryl ester transfer protein activity and cardiovascular events in patients with chronic kidney disease stage V. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2008;23(11):3599-3604.
265. Papademetriou V, Lovato L, Tsioufis C, et al. Effects of High Density Lipoprotein Raising Therapies on Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus, with or without Renal Impairment: The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study. *Am J Nephrol*. 2017;45(2):136-145.
266. Kalil RS, Wang JH, de Boer IH, et al. Effect of extended-release niacin on cardiovascular events and kidney function in chronic kidney disease: a post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. *Kidney Int*. 2015;87(6):1250-1257.
267. Getz GS, Reardon CA. Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis. *J Inflamm Res*. 2011;4:83-92.
268. deGoma EM, Rader DJ. Novel HDL-directed pharmacotherapeutic strategies. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(5):266-277.
269. Anantharamaiah GM, Mishra VK, Garber DW, et al. Structural requirements for antioxidative and anti-inflammatory properties of apolipoprotein A-I mimetic peptides. *J Lipid Res*. 2007;48(9):1915-1923.
270. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2004;109(25):3215-3220.

271. Qin S, Kamanna VS, Lai JH, et al. Reverse D4F, an apolipoprotein-AI mimetic peptide, inhibits atherosclerosis in ApoE-null mice. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2012;17(3):334-343.
272. Li X, Chyu K-Y, Faria Neto JR, et al. Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 2004;110(12):1701-1705.
273. He D, Zhao M, Wu C, et al. Apolipoprotein A-1 mimetic peptide 4F promotes endothelial repairing and compromises reendothelialization impaired by oxidized HDL through SR-B1. *Redox Biol.* 2018;15:228-242.
274. Dunbar RL, Movva R, Bloedon LT, et al. Oral Apolipoprotein A-I Mimetic D-4F Lowers HDL-Inflammatory Index in High-Risk Patients: A First-in-Human Multiple-Dose, Randomized Controlled Trial. *Clin Transl Sci.* 2017;10(6):455-469.
275. Vaziri ND, Moradi H, Pahl MV, Fogelman AM, Navab M. In vitro stimulation of HDL anti-inflammatory activity and inhibition of LDL pro-inflammatory activity in the plasma of patients with end-stage renal disease by an apoA-1 mimetic peptide. *Kidney Int.* 2009;76(4):437-444.
276. Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A-I-Milano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest.* 1980;66(5):892-900.
277. Shah PK, Yano J, Reyes O, et al. High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103(25):3047-3050.
278. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290(17):2292-2300.
279. Nicholls SJ, Puri R, Ballantyne CM, et al. Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* 2018;3(9):806-814.
280. Tardy C, Goffinet M, Boubekour N, et al. CER-001, a HDL-mimetic, stimulates the reverse lipid transport and atherosclerosis regression in high cholesterol diet-fed LDL-receptor deficient mice. *Atherosclerosis.* 2014;232(1):110-118.
281. Nicholls SJ, Andrews J, Kastelein JJP, et al. Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre- β High-Density Lipoprotein Mimetic, on Coronary Atherosclerosis in Patients Following Acute Coronary Syndromes in the CER-001 Atherosclerosis Regression Acute Coronary Syndrome Trial: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* 2018;3(9):815-822.
282. Diditchenko S, Gille A, Pragst I, et al. Novel formulation of a reconstituted high-density lipoprotein (CSL112) dramatically enhances ABCA1-dependent cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(9):2202-2211.

283. Gille A, D'Andrea D, Tortorici MA, Hartel G, Wright SD. CSL112 (Apolipoprotein A-I [Human]) Enhances Cholesterol Efflux Similarly in Healthy Individuals and Stable Atherosclerotic Disease Patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(4):953-963.
284. Zheng L, Nukuna B, Brennan M-L, et al. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004;114(4):529-541.
285. Bakillah A. Nitrated apolipoprotein A-I, a potential new cardiovascular marker, is markedly increased in low high-density lipoprotein cholesterol subjects. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(1):60-69.
286. Bakillah A, Tedla F, Ayoub I, et al. Plasma Nitration of High-Density and Low-Density Lipoproteins in Chronic Kidney Disease Patients Receiving Kidney Transplants. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:352356.

7. Publikation

Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, Shroff R, Kuschnerus K, Krankel N, Kania G, Zewinger S, Akhmedov A, Shi Y, Martin T, Perisa D, Winnik S, Muller MF, Sester U, **Wernicke G**, Jung A, Gutteck U, Eriksson U, Geisel J, Deanfield J, von Eckardstein A, Luscher TF, Fliser D, Bahlmann FH, Landmesser U (2013): Abnormal High-Density Lipoprotein Induces Endothelial Dysfunction via Activation of Toll-Like Receptor-2. *Immunity* 2013 Apr 18;38(4):754-68

8. Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der vorliegenden Dissertationsschrift begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. med. Danilo Fliser, Klinikdirektor der Inneren Medizin IV/Nephrologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Themenvergabe und die damit einhergehende Ermöglichung meiner wissenschaftlichen Arbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Dr. Timo Speer für die allzeit großartige Unterstützung, beginnend von der Einarbeitung im Labor bis hin zum Korrekturlesen, die Geduld sowie die konstruktive Kritik. Vielen Dank für die exzellente Betreuung.

Darüber hinaus möchte ich Frau Dr. Rukshana Shroff vom University College in London, Institute of Child`s Health, für die Zurverfügungstellung der Patientenseren sowie der im Rahmen einer Kooperation erfolgten Bestimmungen von Cholesterol-Efflux und aortaler Pulswellengeschwindigkeit danken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des nephrologischen Forschungslabors, insbesondere bei Frau Noll, Frau Triem und Frau Wagner, für die Unterstützung beim Erlernen der Messmethoden und den ständigen Rat bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Freunden sowie meiner Ehefrau Miriam für die vor allem emotionale Unterstützung.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

