

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Prof. Dr. med. Carl Neuerburg

Der Einfluss des SNP rs11057830 im Gen des Scavenger-Rezeptors
B1 in Endothelzellen auf die Proteinexpression und Aktivität der
endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Erminia Johanna Magnon

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: PD Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Zusammenfassung

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) und der HDL-Rezeptor Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) spielen eine zentrale Rolle in der Regulation vaskulärer Funktionen, u. a. des Cholesterintransports und damit des kardiovaskulären Risikos. Es ist bereits bekannt, dass Mutationen im SR-B1-Gen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bedingen. Die aktuelle Studie sollte untersuchen, ob genetische Modifikationen im SR-B1-Gen Unterschiede in der Expression von eNOS und SR-B1 bedingen und mögliche pathophysiologische Relevanzen für kardiovaskuläre Erkrankungen besitzen könnten. Darüber hinaus sollte die NO-Produktion pro Menge eNOS in den Zelllinien gemessen werden, um die Effizienz des Enzyms unter den Zelllinien vergleichen zu können. Dazu haben wir die Expressionsmuster von eNOS und SR-B1 und zusätzlich die eNOS-Aktivität in einer humanen endothelialen Hybridzelllinie EA.hy 926 sowie in zwei weiteren EA.hy 926 Zelllinien, in denen mittels der CRISPR-Cas 9-Methode eine Mutation (SNP rs11057830) im SR-B1-Gen eingebaut wurde, charakterisiert. Wir haben diese Parameter in unbehandelten Zellen evaluiert, aber auch in Zelllinien, die mit Acetylsalicylsäure, Vitamin E, HDL oder einem NO-Donor (DETA-NO) versetzt wurden.

Die Proteinexpression von eNOS und SR-B1 wurde mittels Western Blot analysiert. Insgesamt wurden 20 Western Blots zur Untersuchung von eNOS und 12 Western Blots zur Analyse von SR-B1 unter gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt. Die NO-Produktion der eNOS wurde durch mittels Chemilumineszenzdetektion bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass unter allen Bedingungen und Behandlungen mit den oben genannten Substanzen die eNOS- und SR-B1-Expression in allen Zelllinien (Wildtyp und Zelllinien mit SR-B1-Mutationen) sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu keinen statistisch signifikanten Unterschieden führte. Die NO-Produktion pro eNOS-Menge zeigte ebenfalls keine signifikante Variabilität zwischen den Zelllinien.

Die Daten deuten darauf hin, dass die genetischen Modifikationen in den Zelllinien keinen Einfluss auf die basale Expression von eNOS und SR-B1 ausüben. Auch die Effizienz der eNOS scheint nicht durch die SR-B1-Mutation beeinflusst zu werden. Dies lässt vermuten, dass die genetischen Variationen im SR-B1-Gen möglicherweise andere molekulare Mechanismen betreffen, die in dieser Untersuchung nicht erfasst wurden. Um die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen auf vaskuläre Funktionen besser zu begreifen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

Abstract

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the HDL receptor scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) play a central role in the regulation of vascular functions, including cholesterol transport and thus cardiovascular risk. It is already known that mutations in the SR-B1 gene cause an increased cardiovascular risk. The current study was designed to investigate whether genetic modifications in the SR-B1 gene could cause differences in the expression of eNOS and SR-B1 and have possible pathophysiological relevance for cardiovascular diseases. In addition, the NO production per amount of eNOS in the cell lines should be measured in order to compare the efficiency of the enzyme among the cell lines. To this end, we characterized the expression patterns of eNOS and SR-B1 and additionally the eNOS activity in a human endothelial hybrid cell line EA.hy 926 and in two other EA.hy 926 cell lines in which a mutation (SNP rs11057830) in the SR-B1 gene was inserted using the CRISPR-Cas 9 method. We evaluated these parameters in untreated cells, but also in cell lines treated with acetylsalicylic acid, vitamin E, HDL or a NO donor (DETA-NO).

The protein expression of eNOS and SR-B1 was analyzed by Western blot. A total of 20 Western blots were performed for the analysis of eNOS and 12 Western blots for the analysis of SR-B1 under the same experimental conditions. NO production of eNOS was determined by chemiluminescence detection.

The results showed that under all conditions and treatments with the substances, eNOS and SR-B1 expression in all cell lines (wild type and cell lines with SR-B1 mutations) did not result in statistically significant differences at both 24 and 48 hours. NO production per amount of eNOS also showed no significant variability between the cell lines.

The data suggest that the genetic modifications in the cell lines have no effect on the basal expression of eNOS and SR-B1. The SR-B1 mutation also does not seem to influence eNOS efficiency. This suggests that the genetic variations in the SR-B1 gene may involve other molecular mechanisms that were not assessed in this work. To better understand the impact of these genetic alterations on vascular functions, further investigations are required.

Abkürzungsverzeichnis

ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1	MAP	Mitogen-Activated Protein
ApoA-1	Apolipoprotein A-1	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
ASS	Acetylsalicylsäure	MUT	Mutante
BCA	Bicinchoninsäure	MUT_K	Mutante-Kontrolle
BSA	Rinderserumalbumin	NEAA	Nicht-essenzielle Aminosäuren
COX 1/2	Cyclooxygenase 1/2	NO	Stickstoffmonoxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
DETA/NO	Diethylenetriamine/nitric oxide adduct	PS	Penicillin-Streptomycin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	RCT	Reverser Cholesterintransport
DMSO	Dimethylsulfoxid	RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	SDS PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamidgelelektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
FBS	Fötale Kälberserum	SR-B1	Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1
HDL	High-density-Lipoprotein	TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
HUVECs	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen	U/min	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobase	VLDL	Very-low-density-lipoprotein
kDa	Kilodalton	WT	Wildtyp
KHK	Koronare Herzkrankheit		
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyl Transferase		
LDL	Low-density-lipoprotein		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Atherosklerose	1
1.2 Cholesterin und Apolipoproteine	1
1.3 Reverser Cholesterintransport.....	2
1.4 Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1	4
1.5 SR-B1 und seine protektive Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose	4
1.6 SR-B1 in Endothelzellen.....	6
1.7 eNOS in Caveolen.....	6
1.8 SCARB-1 Varianten und KHK- Risiko	7
1.9 Acetylsalicylsäure und KHK-Risiko	7
1.10 Vitamin E und KHK-Risiko	8
1.11 Ziele der Arbeit	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.2 Chemikalien	11
2.3 Geräte	13
2.4 Methoden	14
2.4.1 Zellkultur.....	14
2.4.2 Zellsplitting	14
2.4.3 Kryokonservierung.....	15
2.4.4 Zellzahlbestimmung.....	15
2.4.5 Bestimmen der Wachstumskurven	16
2.4.6 Zellbehandlung mit ASS, HDL, DETA/NO und Trolox.....	16

Inhaltsverzeichnis

2.4.7	Proteinisolation.....	17
2.4.8	Proteinbestimmung.....	17
2.4.9	SDS-Page	18
2.5	Western-Blot.....	19
2.6	Immunmarkierung der Proteine	20
2.7	Immunhistochemiefärbung von eNOS und Caveolin.....	20
2.8	Chemilumineszenzdetektion zur Bestimmung von NO	21
2.9	Statistik.....	22
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Wachstumskurven WT, MUT und MUT_K.....	24
3.2	eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K.....	25
3.3	SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K.....	26
3.4	ASS-Behandlung.....	27
3.4.1	eNOS-Expression nach ASS-Behandlung	27
3.4.2	SR-B1-Expression nach ASS-Behandlung.....	28
3.5	Trolox-Behandlung	30
3.5.1	eNOS-Expression nach Trolox-Behandlung.....	30
3.5.2	SR-B1-Expression nach Trolox-Behandlung.....	32
3.6	HDL-Behandlung.....	34
3.6.1	eNOS-Expression nach HDL-Behandlung	34
3.6.2	SR-B1-Expression nach HDL-Behandlung	36
3.7	DETA/NO-Behandlung	38
3.7.1	eNOS-Expression nach DETA/NO-Behandlung.....	38
3.7.2	SR-B1-Expression nach DETA/NO-Behandlung.....	39
3.8	Bestimmung der NO-Produktion.....	40
3.8.1	NO-Produktion der unbehandelten Zelllinien	40
3.8.2	NO-Produktion nach ASS-Behandlung	41
3.8.3	NO-Produktion nach Trolox-Behandlung	43
3.8.4	NO-Produktion nach HDL-Behandlung.....	45

Inhaltsverzeichnis

3.9	Immunhistochemische Färbung.....	47
4	Diskussion	51
4.1	Der WT weist ein schnelleres Zellwachstum auf als die übrigen Zelllinien	51
4.2	Die eNOS-Expression unterscheidet sich nicht in den Zelllinien	51
4.3	Die SR-B1-Expression unterscheidet sich nicht in den Zelltypen	52
4.4	ASS hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1	52
4.5	Trolox hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1	53
4.6	HDL hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1	53
4.7	DETA/NO hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1	54
4.8	Die eNOS-Effizienz unterscheidet sich nicht in unbehandelten und behandelten WT, MUT und MUT_K.....	54
4.9	Immunhistochemische Färbung von eNOS und Caveolin in den Zelllinien	55
4.10	Kritische Beleuchtung der eigenen Ergebnisse.....	56
4.11	Schlussfolgerung.....	57
5	Literaturverzeichnis.....	58
6	Anhang	68
6.1	Standard Operating Procedures	68

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Herz-Kreislauf-Erkrankung, welche durch Lipidablagerungen in Teilen der Arterie, Proliferation der glatten Muskelzellen und der anschließenden Bildung einer atherosklerotischen Plaque gekennzeichnet ist (Tsao et al., 2023). Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache; 2019 starben daran ca.17,9 Millionen Menschen (World Health Organization, 2021). Während der Entstehung von Atherosklerose lagern sich cholesterinreiche Lipoproteine in der Intima der Gefäße ein, wobei sie am Proteoglycan der Intima-Schicht haften bleiben und diese anfälliger für chemische Reaktionen wie Oxidationen machen (Zipes et al., 2015). Sehr früh nach der Akkumulation von cholesterinreichen Lipoproteinen wandern Leukozyten in die Intima ein und verursachen dort eine Entzündungsreaktion. Dabei exprimieren Makrophagen Cholesterin-Rezeptoren, die dafür sorgen, dass diese Cholesterin binden und aufnehmen können. Durch diesen Vorgang werden die Makrophagen zu Schaumzellen, die proteolytische Enzyme freisetzen, welche das entstandene Plaque destabilisieren, sodass dieser leichter reißt. Zusätzlich schütten sie Gerinnungsfaktoren aus, die Thrombenbildung auslösen können, was tödliche Myokardinfarkte zur Folge haben kann (Libby et al., 2002).

1.2 Cholesterin und Apolipoproteine

Alle Säugetierzellen benötigen Cholesterin. Die höchste Konzentration ist dabei in der Plasmamembran zu finden, die niedrigste im endoplasmatischen Retikulum (Ouimet et al., 2019). In der Plasmamembran beeinflusst das Cholesterin die biophysikalischen Eigenschaften, indem es die Biegesteifigkeit und somit die spontane Krümmung beeinflusst und damit der Membran die Fähigkeit verleiht, mechanischen Belastungen standzuhalten (Doole et al., 2022). Der zelluläre Cholesterinspiegel wird durch das Zusammenspiel von De-novo-Synthese, Aufnahme über die Nahrung, Export und Speicherung bestimmt (Abe et al., 2022, Luo et al., 2020).

Um den Transport von Cholesterin durch den Körper zu gewährleisten, werden Lipoproteine benötigt, welche hydrophobe Träger darstellen und aus Proteinen und Lipiden bestehen. Die wichtigsten zirkulierenden Apolipoproteine, welche am Cholesterintransport beteiligt sind, sind Very-low-density-Lipoprotein (VLDL), Low-density-Lipoprotein (LDL), High-density-Lipoprotein (HDL) und Chylomikronen. Diese Apolipoproteine variieren je nach

Einleitung

Dichte der Apo-Protein-Untereinheit, Bindungspartnern und Art der transportierten Cholesterinfracht (Sucharski and Koenig, 2022).

Wird Cholesterin über die Nahrung aufgenommen, wird dieses über die Enterozyten des Darms absorbiert und in Form von Chylomikronen freigesetzt, aus denen das Cholesterin von der Leber aufgenommen wird. Die Leber, welche den Hauptort für die Cholesterinbiosynthese darstellt, liefert Cholesterin als VLDL in den Blutkreislauf. Dort werden sie nach der Verarbeitung zu LDL, die über Rezeptor-vermittelte Endozytose in periphere Zellen aufgenommen werden können (Abe et al., 2022, Luo et al., 2020). Das HDL stellt einen Cholesterinakzeptor und -träger dar und erleichtert den Cholesterinausfluss aus peripheren Geweben, einschließlich cholesteringeladener Monozyten-abgeleiteter Makrophagen und Schaumzellen, zurück in die Leber. Dort wird freies Cholesterin entweder als Gallencholesterin ausgeschieden, in Gallensäuren umgewandelt oder recycelt. Somit spielt HDL eine Schlüsselrolle im reversen Cholesterintransport (RCT) (Abe et al., 2022).

1.3 Reverser Cholesterintransport

Als RCT (Abb. 1) wird der Prozess bezeichnet, bei dem überflüssiges Cholesterin aus peripheren Geweben, einschließlich der Gefäßwände und Makrophagen, mittels HDL zurück zur Leber transportiert wird, um ausgeschieden zu werden (Brufau et al., 2011, Getz and Reardon, 2018, Rader et al., 2009). Der erste Schritt beim RCT stellt der Ausfluss von Cholesterin aus lipidbeladenen peripheren Zellen dar. Hierbei wird das freie Cholesterin zur Plasmamembran transportiert, wo es für den Efflux verfügbar wird (Getz and Reardon, 2018). Es wurde bereits eine Vielzahl an Wegen für den Cholesterinausfluss aus den Zellen definiert. Unter anderem der Ausfluss über *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) zu lipidfreien Apolipoproteinen, dabei insbesondere Apolipoprotein A-1 (ApoA-1), der Ausfluss über *ATP-binding cassette transporter G1* (ABCG1) zu reifen HDL-Partikeln, der Ausfluss zu reifen HDL-Partikeln über den Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1), sowie passive Diffusion (Getz and Reardon, 2018, Rader et al., 2009).

ApoA-1 wird zunächst von der Leber produziert und in das Plasma ausgeschüttet. Dieses interagiert dann mit Serumphospholipiden und bildet Prä- β -HDL, welches dann den Cholesterinausfluss aus z.B. Makrophagen und Fibroblasten auslöst. Wurde das Cholesterin externalisiert, wird es mit Lecithin durch die Lecithin-Cholesterin-Acyl Transferase (LCAT) verestert, wodurch Cholesterinester entstehen (Getz and Reardon, 2018, Ohashi et al., 2005). Diese bilden den Kern des HDLs, wodurch reife, kugelförmige HDL-Partikel entstehen. Das reife HDL wird dann von Hepatozyten über den SR-B1 oder

Einleitung

Rezeptoren der LDL-Familie aufgenommen (Getz and Reardon, 2018), in Gallensalze umgewandelt und über den Magen-Darm-Trakt ausgeschieden (Ohashi et al., 2005).

Es gibt Studien, die darauf hindeuten, dass erhöhte Plasma-HDL-Spiegel das Fortschreiten der Plauegröße trotz stark erhöhter Plasmacholesterinspiegel verzögern können (Choudhury et al., 2004) und dass erhöhte HDL-Spiegel mit einer stabileren Plaue-Morphologie korrelieren (Tardif et al., 2007). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass HDL-Cholesterin eine umgekehrte Beziehung zu den jährlichen Veränderungen der Plauegröße zeigt (Von Birgelen et al., 2003). Neuere Daten aus Metastudien implizieren jedoch, dass hohe HDL-Spiegel keine signifikanten Schutzeffekte gegen kardiovaskuläre Ereignisse haben. Die Ergebnisse stützen sich auf das Konzept, dass die Qualität des HDL und nicht die Quantität einen protektiven Einfluss auf die Atherogenese darstellt (Abedi et al., 2023, Lee et al., 2021).

Reverser Cholesterintransport

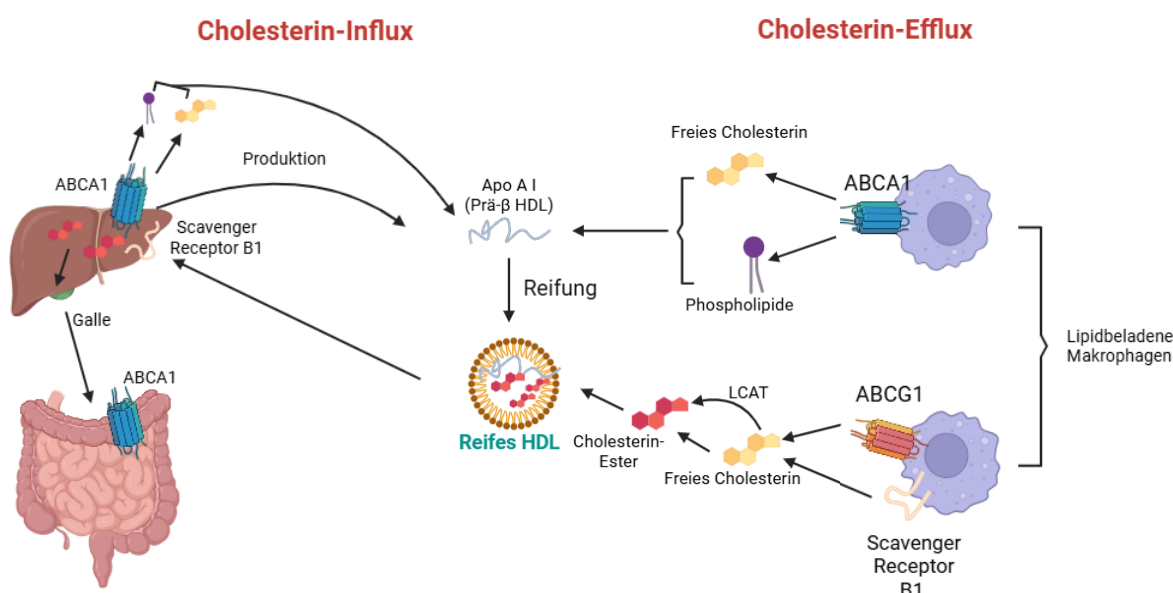


Abb. 1: **Reverser Cholesterintransport.** Lipidbeladene Makrophagen geben freies Cholesterin und Phospholipide über ABCA1, ABCG1 und SR-B1 ab. Ausgelöst wird dies an ABCA1 durch die Interaktion mit Apo A-1, welches die Leber zuvor über ABCA1 ins Plasma abgegeben hat (Cholesterin-Efflux). Nach der Interaktion von Apo A-1 mit Serumphospholipiden bildet sich Prä-β HDL. LCAT verestert anschließend das freie Cholesterin zu Cholesterin-Ester, welche von HDL-Partikeln aufgenommen werden können. Dadurch entwickelt sich Prä-β HDL zu reifen HDL-Partikeln, welche die Cholesterin-Ester an die Leber über SR-B1 abgeben (Cholesterin-Influx). Die Leber scheidet anschließend die Cholesterin-Ester über die Galle aus (Abe et al., 2022). Grafik erstellt mit BioRender.com.

1.4 Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ 1

Der SR-B1 ist ein HDL-Rezeptor, welcher HDL mit hoher Affinität bindet (Acton et al., 1996). Er hat ein Molekulargewicht von ungefähr 82 kDa (Kilodalton) (Shen et al., 2018) und zeichnet sich aus durch eine extrazelluläre Schleife, welche durch zwei Transmembrandomänen flankiert wird (PrabhuDas et al., 2017). Das Gen für SR-B1 liegt auf dem SCARB-1 Gen des langen Arms von Chromosom 12, ist ca. 75 kb (Kilobasen) lang und enthält 13 Exons und 12 Introns (Cao et al., 1997). Hauptsächlich wird SR-B1 von Hepatozyten und steroidogenen Zellen der Nebennieren und Gonaden exprimiert (Acton et al., 1996, Connelly and Williams, 2004, PrabhuDas et al., 2017, Shen et al., 2018), jedoch kommt er auch auf Endothelzellen (Huang et al., 2019, Shen et al., 2018, Yu et al., 2021), Makrophagen (Ashraf and Gupta, 2011, PrabhuDas et al., 2017, Shen et al., 2018), Nervenzellen (Berney et al., 2019), glatten Muskelzellen, Keratinozyten und Adipozyten vor (Shen et al., 2018). SR-B1 vermittelt die selektive Cholesterinaufnahme in die Zellen (Acton et al., 1996, Krieger and Kozarsky, 1999, Trigatti et al., 2000) und spielt somit eine Schlüsselrolle im HDL-Stoffwechsel und RCT (Connelly and Williams, 2004, Trigatti et al., 2000). Im Gegensatz zum klassischen endozytären LDL-Rezeptor-Weg bindet SR-B1 beim selektiven Aufnahmeweg an HDL und das Cholesterin des Kerns wird an die Plasmamembran abgegeben, ohne dass gleichzeitig das gesamte HDL-Partikel aufgenommen und abgebaut wird (Al-Jarallah and Trigatti, 2010, Connelly and Williams, 2004, Krieger, 1999) und ohne, dass ApoA-1 mit übertragen wird. Dabei vermittelt SR-B1 einen bidirektionalen Fluss von unverestertem Cholesterin, Phospholipiden (Al-Jarallah and Trigatti, 2010, Mineo and Shaul, 2012), Triglyceriden und fettlöslichen Vitaminen, einschließlich α -Tocopherol zwischen HDL und den Zellen (Al-Jarallah and Trigatti, 2010).

1.5 SR-B1 und seine protektive Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Interaktion zwischen HDL und SR-B1 spielt eine maßgebliche Rolle im RCT (Getz and Reardon, 2018). Auch ist bekannt, dass HDL eine wichtige Rolle in der positiven Beeinflussung der Atherogenese spielt (Abedi et al., 2023, Lee et al., 2021).

Darüber hinaus gibt es einige Hinweise darauf, dass SR-B1 einen protektiven Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose ausübt:

Apo-E defiziente Mäuse mit Inaktivierung von Makrophagen-SR-B1 entwickelten nach zwölf Wochen einer Futterdiät signifikant mehr Atherosklerose in der proximalen Aorta als Apo-E defiziente Mäuse mit SR-B1 Expression auf Makrophagen. Diese Unterschiede traten trotz Abwesenheit signifikanter Unterschiede in Plasmalipiden, Lipoproteinprofilen, HDL-

Einleitung

Subpopulationen und Cholesterinausfluss auf und bietet somit einen Hinweis darauf, dass SR-B1 eine antiatherogene Rolle spielt (Zhang et al., 2003).

Apo-E und SR-B1 Doppel-Knockout-Mäuse entwickelten unter normaler Futterdiät nicht nur stärkere Atherosklerose in der Aortenhöhle, sondern auch spontane verschlussartige atherosklerotische Läsionen in den Koronararterien, die zu verminderter Herzfunktion, Myokardinfarkt und Tod im Alter von 5-8 Wochen führten. Innerhalb von 8 Wochen starben alle Doppel-Knockout-Mäuse und keine Kontrollmaus (nur ApoE Knockout) (Braun et al., 2002).

Eine vorübergehende hepatische Überexpression von SR-B1 bei Mäusen senkte den HDL-Cholesterinspiegel nach 7 Tagen um 55 %, was darauf hindeutet, dass eine SR-B1 Überexpression den HDL-Stoffwechsel beeinflusst. Bei LDL-Rezeptor-defizienten, SR-B1 überexprimierenden Mäusen konnte ebenfalls eine Verringerung der Atherosklerose mit frühen und fortgeschrittenen Läsionen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Der mittlere HDL-Cholesterinspiegel korrelierte signifikant mit den atherosklerotischen Läsionen (Kozarsky et al., 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hepatische Überexpression von SR-B1 den Plasma-HDL-Spiegel senkt und zu einem erheblichen Anstieg des biliären Cholesterins führt. Dies deutet darauf hin, dass SR-B1 für den hepatischen HDL-Stoffwechsel wichtig sein kann und die Entwicklung und das Fortschreiten von Atherosklerose beeinflussen kann (Kozarsky et al., 1997, Zhang et al., 2005).

Dagegen zeigte sich bei SR-B1-defizienten Mäusen eine massive Akkumulation von cholesterinreichem HDL im Blutkreislauf, was auf eine gestörte Abgabe an die Leber hindeutet. Die Daten zeigen, dass SR-B1-Mangel zu einer Deregulierung der Cholesterinhomöostase in der Arterienwand und Anfälligkeit für Atherosklerose führt (Van Eck et al., 2003).

In ernährungsinduzierten pro-atherosklerotischen Mausmodellen waren Makrophagen mit einem SR-B1-Mangel mit einer verringerten Anzahl an apoptotischen Ereignissen assoziiert, was eine beschleunigte Atheroskleroseprogression zur Folge hatte. Dies deutet darauf hin, dass eine verringerte Apoptose-Anfälligkeit von Makrophagen zu einem beschleunigten Plaquewachstum beitragen kann (Galle-Treger et al., 2019).

Darüber hinaus stimuliert HDL über SR-B1-vermittelte Signalwege die Migration von Endothelzellen, was die Integrität der endothelialen Monoschichten in vivo fördert. Dies kann dazu beitragen, die Gefäßgesundheit zu optimieren (Seetharam et al., 2006, Zhu et al., 2008).

Einleitung

1.6 SR-B1 in Endothelzellen

SR-B1 wird auf Endothelzellen exprimiert (Huang et al., 2019, Shen et al., 2018, Yu et al., 2021). An Endothelzellen bewirkt HDL durch die Bindung am SR-B1 die Hochregulierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), welche Stickstoffmonoxid (NO) erzeugt (Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001, Saddar et al., 2010), indem sie L-Arginin in L-Citrullin umwandelt (Mineo et al., 2006). Dabei erfordert die Stimulation von eNOS eine Phosphorylierung an Ser-1179, welche durch Akt- und Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinasen vermittelt wird (Mineo et al., 2003). Voraussetzung für die Kopplung der eNOS-Stimulation an die Interaktion zwischen HDL und SR-B1 ist die Bindung von ApoA1 (Yuhanna et al., 2001).

Die HDL-abhängige Produktion von NO durch eNOS wirkt vasoprotektiv, da sie eine NO-abhängige Vasodilatation der Gefäße bewirkt, was zur Normalisierung beeinträchtigter Endothelfunktion führen kann (Spieker et al., 2002, Zeiher et al., 1994). Zusätzlich bewirkt physiologische Scherspannung am Endothel eine durch SR-B1 vermittelte Expression von eNOS (Zhang et al., 2016).

Darüber hinaus deuten Daten darauf hin, dass eine gestörte Endothelfunktion in Zusammenhang mit niedrigen HDL-Leveln steht (Kuvin et al., 2003).

Zusätzlich weist NO die Fähigkeit auf, die endotheliale Aktivierung zu begrenzen und die Monozyteneinwanderung zu hemmen, was für anti-atherogene und entzündungshemmende Eigenschaften spricht (De Caterina et al., 1995). Somit liegt im Endothel der SR-B1-Signalweg der Aufrechterhaltung der Integrität der Intimaschicht zugrunde (Saddar et al., 2010).

1.7 eNOS in Caveolen

eNOS ist in Endothelzellen hauptsächlich mit Caveolae assoziiert (Mineo et al., 2006, Yuhanna et al., 2001). Caveolae sind cholesterinreiche Plasmamembraneinstülpungen, die in einer Vielzahl von Zelltypen vorkommen und spielen unter anderem eine Rolle bei Signaltransduktion, Endozytose und Mechanoprotektion (Root et al., 2015). Sie sind angereichert mit Glykosphingolipiden, Cholesterin, Sphingomyelin und lipidverankerten Membranproteinen (Mineo et al., 2006, Shaul and Anderson, 1998). Caveolin ist als integrales Membranprotein mit 21 bis 24 kDa ein Hauptbestandteil von Caveolae-Membranen (Scherer et al., 1996). Es gibt mindestens 4 Caveolin-Isoformen (Caveolin-1 α , Caveolin-1 β , Caveolin-2 und Caveolin-3), wobei Caveolin-1 und Caveolin-2 ubiquitär exprimiert werden.

HDL bewirkt eine eNOS-Aktivierung in isolierten Caveolae-Membranen von Endothelzellen, was darauf hindeutet, dass der Rezeptor und eNOS dort mechanisch gekoppelt sind

Einleitung

(Saddar et al., 2010). Caveolin-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Aktivität der eNOS im Endothel, indem es mit eNOS einen heteromeren Komplex bildet und so dessen katalytische Aktivität erheblich hemmt. Diese Hemmung kann durch Ca²⁺-Calmodulin aufgehoben werden, da diese den eNOS-Caveolin-Komplex unterbricht und so als allosterischer Aktivator von eNOS fungiert (Ju et al., 1997, Michel et al., 1997).

1.8 SCARB-1 Varianten und KHK- Risiko

Genetische Varianten der SCARB1-Promotorregion sind signifikant mit den Plasmaspiegeln assoziiert, da sie die SR-B1-Expression beeinflussen und zur Anfälligkeit für koronare Herzkrankheiten (KHK) beitragen (Hu et al., 2022, Webb et al., 2017, Zeng et al., 2017, Manichaikul et al., 2012).

Es wurden bereits zahlreiche Signalwege entdeckt, welche signifikant an der Entstehung der KHK beteiligt sind, darunter der *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) rs11057830, welcher am Lipoprotein- und Lipidstoffwechsel beteiligt ist (Zarkasi et al., 2022). Dieser befindet sich im ersten Intron des SCARB1-Gens auf 12q24.31 (GWAS Catalog, 2024). Darüber hinaus sind SCARB-1-Polymorphismen mit niedrigen HDL-Spiegeln assoziiert (McCarthy et al., 2003).

1.9 Acetylsalicylsäure und KHK-Risiko

Laut S3-Leitlinie 2024 stellt Acetylsalicylsäure (ASS) in einer Dosierung von 100 mg pro Tag das Arzneimittel 1. Wahl in der Langzeittherapie bei chronischer KHK dar (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, 2024). ASS bewirkt durch eine Acetylierung der nicht-selektiven Cyclooxygenase 1 und 2 (COX-1 und COX-2) eine irreversible Hemmung dieser Enzyme. COX stellen aus dem Substrat Arachidonsäure die pro-inflammatorischen Stoffe Prostaglandin G und H her, welche wichtig für die Herstellung weiterer Prostanoiden sind, zum Beispiel für Thromboxan A₂. Thromboxan A₂ wirkt aktivierend auf Thrombozyten und verursacht deren Agglutination zur Blutstillung. Daher wird ASS bereits seit Jahren als Analgetikum, Antipyretikum und antiphlogistisches Medikament eingesetzt. Später verlagerte sich die Hauptindikation durch die Prävention thrombotischer, kardiovaskulärer Komplikationen durch die COX-1 Hemmung innerhalb von Thrombozyten auf die Thrombozytenaggregationshemmung (Dzeshka et al., 2016).

Darüber hinaus ist ASS in der Lage, durch direkte Acetylierung der eNOS die Freisetzung von NO im Endothel zu verursachen. Dieser Vorgang scheint unabhängig von der COX-Hemmung zu sein (Taubert et al., 2004).

Zusätzlich sind weitere Mechanismen für die atheroprotektiven Eigenschaften von ASS bekannt. In menschlichen Makrophagen konnte eine erhöhte Expression und Funktion von

Einleitung

SR-B1 nach ASS-Behandlung nachgewiesen werden, welche ebenfalls unabhängig von der COX-Hemmung waren (Tancevski et al., 2006).

Laut einer Metastudie mit 10.859 Betroffenen mit Zustand nach Herzinfarkt zeigte eine ASS-Behandlung eine statistisch signifikante Reduktion von nicht tödlichen, wiederkehrenden Herzinfarkten (Baigent et al., 2009).

1.10 Vitamin E und KHK-Risiko

Vitamin E ist der Sammelbegriff für eine Gruppe fettlöslicher Verbindungen, bestehend aus α -, β -, γ - und δ - Tocopherolen, bzw. Trienolen. Jedoch deckt nur das α -Tocopherol den menschlichen Vitamin E-Bedarf. Es befindet sich hauptsächlich in Zell- und Organellmembranen und wird über den Urin wieder ausgeschieden (Burton and Ingold, 1989, Traber, 2007). Eine wichtige Funktion des α -Tocopherols ist seine starke kettenunterbrechende, antioxidative Eigenschaft, die die Kettenreaktion der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren verhindert (Burton and Ingold, 1989, Rizvi et al., 2014, Traber, 2007). So fungiert es als erste Verteidigungslinie gegen Lipidperoxidationen und schützt die Zellmembranen vor dem Einfluss freier Radikale (Rizvi et al., 2014).

Der SR-B1 ist an der intestinalen Aufnahme und dem Transport von Vitamin E in den Enterozyten beteiligt. Dabei könnten Cholesterin, Carotinoide und Vitamin E um den SR-B1 konkurrieren (Reboul et al., 2006). SR-B1 kann also die Aufnahme von Vitamin E aus HDL auslösen (Rigotti et al., 2003). In SR-B1-defizienten Mäusen konnte eine fehlerhafte Aufnahme von Vitamin E und kardiovaskuläre Pathologien beobachtet werden, was auf eine wichtige Rolle des SR-B1 bei der Aufnahme von Vit. E hindeutet (Mardones et al., 2002).

Es gibt Hinweise darauf, dass Vitamin E die endotheliale Dysfunktion durch Regulierung der eNOS und daraus folgende Produktion von NO aufheben kann. In Mausstudien konnten hohe Dosen von Vitamin E einen Anstieg der eNOS-Aktivität und des NO-Spiegels in Aorten von hypertensiven, als auch in normotensiven Mäusen bewirken und somit die Endothelfunktion verbessern (Ülker et al., 2003).

Darüber hinaus konnte in einer randomisierten kontrollierten Studie mit weiblichen Teilnehmerinnen eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Todesfälle von Frauen in der Vitamin E-Gruppe beobachtet werden (Lee et al., 2005).

1.11 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob der SNP rs11057830 im SR-B1-Gen Unterschiede in der basalen Expression von eNOS und SR-B1 zwischen den Zelllinien (Wildtyp und Mutanten) hervorruft. Zudem soll analysiert werden, ob diese genetische

Einleitung

Veränderung die Effizienz der NO-Produktion in Relation zur Menge der exprimierten eNOS beeinflusst. Dabei stehen sowohl unbehandelte Zelllinien als auch Zelllinien im Fokus, die mit verschiedenen Substanzen wie ASS, Vitamin E (Trolox), HDL und einem NO-Donor behandelt wurden. Abschließend sollen eNOS und Caveolin mittels immunhistochemischer Färbung visuell dargestellt werden, um diese bezüglich ihrer Ausprägung und Lokalisation unter den Zelllinien vergleichen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Liste der verwendeten Materialien

Materialien	Hersteller
4–15% Mini-PROTEAN™ TGX Stain-Free™ Protein Gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Blotting- Filterpapier	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Cellstar® 96-Well Cell Cultureplate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar® Cell Culture Dishes, PS, 145/20 mm, vents, TC, sterile	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser 18 x 18 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Dermagrip Nitrile Examination Gloves S	WRP Asia Pacific Sdn Bhd, Sepang, Malaysia
Eppendorf Pipette Research plus, fix, 10µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette Research plus, fix, 1000µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Pipette Research plus, fix, 200µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filrpur S 0,2	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
Microplate 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Nalgene™ Kryoröhrchen 2ml	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
neoLabLine Aluminiumblock MTP-Form	Neolab, Heidelberg, Deutschland
neoLabLine Eisbad klein	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Neubauer- Zählkammer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Objektträger 76 x 26 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Parafilm®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
pipetus® 100-240 Volt	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
SafeSeal Tube 1,5mL	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland

Material und Methoden

Serological Pipet, sterile, 50mL	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
Serological Pipet, sterile, 10 mL	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
Serological Pipet, sterile, 25 mL	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
Serological Pipet, sterile, 5 mL	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
SurPhob, 10µL	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
SurPhob, 1000µL	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
SurPhob, 200µL	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
TC-Plate 24-Well Zell+, F	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
TC-Plate 6-Well Standard, F	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
Tube 15mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Tube 50mL	Sarstedt AG & Co KG, Lümbrecht, Deutschland
Zellschaber, 28cm, lang, blau, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellspachtel, 20cm	Tissue Culture and Laboratory Technology, Gravesano, Schweiz

Tabelle 1: Liste der verwendeten Materialien

2.2 Chemikalien

Liste der verwendeten Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol -dihydrochlorid (DAPI)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Acetylsalicylsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Anti- eNOS Antibody	Abcam, Cambridge, England
Anti-Scavenging-Receptor SR-B1 Antibody	Abcam, Cambridge, England
Bromophenol blue	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Caveolin 1 Monoclonal Antibody	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
cOmplete™, Mini, EDTA-free proteaseinhibitor-cocktail	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Diethylenetriamine/nitric oxide adduct (Deta/NO)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Material und Methoden

Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Ethanol absolute for analysis EMSURE®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fluorescein (FITC) AffiniPure™ Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Fluorescein (FITC) AffiniPure™ Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Gibco™ DMEM	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ FCS	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Gibco™ MEM NEAA (100X)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH& Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH& Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Human High Density Lipoprotein Purified	EMD Millipore Cooperation; Burlington; USA
Hydrochloric Acid 1,0 M	Reagecon, Shannon Free Zone, Co. Clare, Ireland
Immobilon Forte Western HRP Substrate	EMD Millipore Cooperation, Burlington, USA
Methanol ROTISOLV® Pestilyse® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH& Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
NP-40 (RIPA)	United States Biological, Salem, USA
Penicillin-Streptomycin (10mg/mL)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PhosSTOP™	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunoglobulins	Agilent, Santa Clara, USA
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins	Agilent, Santa Clara, USA
Purelab® Flex 1	ELGA LabWater; High Wycombe, Großbritannien
ROTI®Histofix	Carl Roth GmbH& Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Mark western plus	Carl Roth GmbH& Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Sodium deoxycholate (RIPA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris (TBS)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris base	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden am Taunus, Deutschland
Tris HCl	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden am Taunus, Deutschland

Material und Methoden

Triton x-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol ≥ 99,0 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Reagenzien und Chemikalien

2.3 Geräte

Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
AXIO Vert.A1	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
dry bath FB15101	Thermo Fischer Scientific, Asheville LLC, USA
Fresco™ 17 Mikrozentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Asheville LLC, USA
HERA Freeze HDE Series	Thermo Fischer Scientific, Asheville LLC, USA
Heracell 150i CO2 incubator	Thermo Fischer Scientific, Asheville LLC, USA
IKA Rocker 3D digital	IKA, Staufen, Deutschland
Infinite® M Plex, multimode microplate reader, monochromator optics	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Integra Vacusafe 158 3xx	Integra Biosciences AG, Biebertal, Deutschland
Konfokales Mikroskop Model TL LED S/N	Leica Mikroskop Systems CSCS Systems, Wetzlar, Deutschland
Labinco L46 (vortexer)	Labinco BV, Breda, Niederlande
Lauda Aqualine AL 12	LAUDA DR.R.WOBSEER GmbH & CO.KG, Lauda Königshafen, Deutschland
Liebherr Comfort No Frost (-20°C Freezer)	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Manitowoc Flockeneisbereiter UFP0200A	Kälte-Berlin, Berlin, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Photometer multilabel plate reader Victor	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
Sartorius Präzisionswaage M-Prove	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Sonifizierer (Cycle 0,5, Amplitude 80%) mit Sonotrode MS1	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Taumelrollenmischer (5-Rollen) CAT RM 5	Ingenieurbüro CAT, M.Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Thermo Heraeus B 6060 Brutschrank Incubator	Heraeus, Hanau, Deutschland

Trans-Blot-Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Herasafe Typ KS 18	Thermo electron corporation, Langensfeld, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

2.4 Methoden

Die *Standard Operating Procedures* (SOPs) des Labors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sind im Anhang aufgeführt.

2.4.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wird die Zelllinie EA.hy 926 verwendet. Dies ist eine humane endotheliale Hybridzelllinie, die aus der Fusion humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) und einer menschlichen Lungenkarzinomzelllinie A549 hervorgegangen ist.

Zusätzlich zur ursprünglichen Zelllinie EA.hy 926 wurden zwei weitere Zelllinien verwendet. Dies sind EA.hy 926 Zellen, bei denen mithilfe von Elektroporation und der CRISPR-Cas9-Methode eine Mutation (SNP rs11057830) des SCARB-1 Gens erzeugt wurde. Die Zellen wurden von Greta Brede im Rahmen der Masterarbeit zur Verfügung gestellt (Brede, 2023). In die Versuchsreihen wurde eine EA.hy 926 Zelllinie mit einer SCARB-1 Mutationsrate von 25 % der Allele (Mutante, im Folgenden abgekürzt als MUT) und eine EA.hy 926 Zelllinie mit einer Mutationsrate von 0 % der Allele (Kontrolle der Mutante, welche der CRISPR-Cas9-Methode ohne resultierende Mutation unterzogen wurde. Im Folgenden abgekürzt als MUT_K) aufgenommen.

Alle EA.hy 926 Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Das Kulturmedium wurde mit 10 % fötalem Kälberserum (FBS), 1 % Penicillin-Streptomycin (PS), 1 % HEPES und 1 % nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA) angereichert.

Die Zellen wurden in 145/20 mm Petrischalen bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % in einem CO₂-Inkubator inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Zur Sicherstellung der Zellvitalität und -integrität wurden die Zellen regelmäßig unter einem inversen Mikroskop beobachtet.

2.4.2 Zellsplitting

Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80-90 % durch Trypsinisation passagiert. Zum Passagieren der EA.hy 926-Zellen wurden die folgenden Schritte durchgeführt: Zunächst wurde das verbrauchte Kulturmedium vollständig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen.

Material und Methoden

Danach wurden die Zellen mit Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bedeckt und für drei Minuten im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden dann mit einem Zellschaber von der Petrischalenoberfläche gelöst. Nach der Trypsinisation wurde DMEM hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und die Zellsuspension für drei Minuten bei 1.300 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert.

Die resuspendierten Zellen wurden in neue Petrischalen überführt und mit ausreichend frischem Kulturmedium versehen. Die Petrischalen wurden zurück in den CO₂-Inkubator gestellt und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen weiterkultiviert.

2.4.3 Kryokonservierung

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung kryokonserviert. Dafür wurden diese zunächst durch das übliche Zellsplittingverfahren vorbereitet und in DMEM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in einem Falcon-Röhrchen zentrifugiert (drei Minuten bei 1.300 U/min). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in einer vorbereiteten Kryokonservierungslösung resuspendiert. Diese Lösung bestand aus 90 % fötalem Kälberserum (FBS) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO).

Die resuspendierten Zellen wurden in Kryoröhrchen pipettiert, jeweils 1 ml pro Kryoröhrchen und mit einer Zelldichte von maximal 2×10^6 /ml. Anschließend wurden die Röhrchen in ein kontrolliertes Gefriersystem (Mr. Frosty Gefrierkontainer) platziert. Dieses System wurde dann max. zwei Wochen bei -80 °C in einem Tiefkühlgerät gelagert.

Danach wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C für die Langzeitlagerung transferiert.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurden die Kryoröhrchen schnell in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen verblieb. Der Inhalt wurde dann vorsichtig in vorgewärmtes Kulturmedium überführt, um das DMSO zu verdünnen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (fünf Minuten bei 1.300 U/min) gesammelt, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Petrischalen überführt und unter den zuvor beschriebenen Bedingungen kultiviert.

2.4.4 Zellzahlbestimmung

Zunächst wurden die Zellen durch das übliche Zell-Splitting-Verfahren vorbereitet und in DMEM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension homogenisiert.

Material und Methoden

Eine 10 µl Probe der Zellsuspension wurde entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Zählkammer wurde unter einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung betrachtet. Die Zellen in den vier großen Quadraten der Zählkammer wurden gezählt.

Die Gesamtzahl der Zellen pro Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times 10^4 \times \text{Volumen}$$

2.4.5 Bestimmen der Wachstumskurven

Die Wachstumskurven der Zellen wurden mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay bestimmt, die am 1., 3., 5. und 7. Tag nach dem Aussäen der Zellen durchgeführt wurden. Hierzu wurden pro Well 1.500 Zellen des Wildtyps, der 25 %-Mutanten und 0 %-Mutanten in 96-Well-Platten ausgesät. Für jeden Messtag wurden acht Wells vorbereitet. Am jeweiligen Messtag wurde das Medium aus den Wells abgesaugt. MTT wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit Medium verdünnt und 200 µl pro Well für zwei Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung abgesaugt.

Um die entstandenen Formazankristalle zu lösen, wurden in jedes Well 200 µl DMSO gegeben und für 10 Minuten inkubiert. Die Wells wurden resuspendiert und die DMSO-Lösung in eine Proteinbestimmungsplatte pipettiert, wobei für die Doppelbestimmung jedes Wells jeweils zweimal 100 µl pipettiert wurden. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Das entstandene Formazan kann als proportional zur Zellzahl von lebenden Zellen gewertet werden. Die mithilfe des MTT-Assays gewonnenen Daten wurden genutzt, um die Wachstumskurven der Zellen zu erstellen.

2.4.6 Zellbehandlung mit ASS, HDL, DETA/NO und Trolox

Zur Untersuchung der Wirkung von ASS, HDL, DETA/NO und Trolox (Vitamin-E-Derivat) auf die SR-B1- und eNOS-Expression in EA.hy 926-Wildtypzellen und deren SCARB-Mutanten (MUT und MUT_K) wurden die folgenden Schritte durchgeführt:

Zunächst wurden 500.000 Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM inkubiert, um eine ausreichende Zelladhäsion und -verteilung zu gewährleisten.

Nach der 24-stündigen Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Wells wurden jeweils mit frischem Medium, das verschiedene Konzentrationen an ASS, HDL, DETA/NO und Trolox enthielt, behandelt. Die Konzentrationen von ASS, Trolox und DETA/NO betragen 0,5 mM, 0,25 mM und 0,125 mM. Bei der Behandlung mit HDL wurden die

Material und Methoden

Konzentrationen 50 µg/ml und 25 µg/ml gewählt. Bei allen Behandlungen wurde ein Well als Kontrolle verwendet und erhielt nur frisches DMEM ohne zusätzliche Substanz.

Die Zellen wurden anschließend für festgelegte Zeiträume von 24 Stunden und 48 Stunden unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen geerntet.

2.4.7 Proteinisolation

Zur Ernte der Zellen wurde das Medium aus den Wells abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinierung von der Well-Oberfläche gelöst und das Trypsin anschließend durch Zugabe der gleichen Menge Medium inaktiviert. Zur vollständigen Ablösung wurden alle Wells mit einem Zellschaber bearbeitet. Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und abzentrifugiert (eine Minute bei 13.000 U/min). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet für nachfolgende Western-Blots mit 40 µl Radioimmunpräzipitationspuffer (RIPA-Puffer) resuspendiert. Dabei wurden die Zellpellets stets auf Eis gekühlt, um die Proteaseaktivität zu hemmen. Zur Freisetzung der Proteine wurden die Proben sonifiziert (10 Stöße). Zur längeren Verwahrung der Proben wurden diese bei -80 °C eingefroren.

Zusammensetzung RIPA-Puffer

Inhaltsstoffe	Menge
Tris HCl (50 mM)	0,78 g
NaCl (150 mM)	0,87 g
NP-40 (1 %)	1 ml
Sodium deoxylat (0,5 %)	0,5 g
SDS (0,1 %)	0,1 g
H ₂ O	100 ml

Tabelle 4: Zusammensetzung RIPA-Puffer

2.4.8 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Proben wurde das BCA (Bicinchoninsäure) Assay verwendet. Die BCA-Reagenzlösung wurde frisch aus den Bestandteilen Workreagent A und B im Verhältnis 1:50 hergestellt.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt. Anschließend wurden 10 µl der verdünnten Proben sowie der Standardreihe (BSA-Standards) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Material und Methoden

Daraufhin wurden 200 µl der zuvor hergestellten BCA-Reagenzlösung zu jedem Well hinzugefügt. Die Platte wurde leicht geschüttelt, um eine vollständige Durchmischung der Reagenzien zu gewährleisten.

Die Absorption wurde nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen. Die gemessenen Absorptionswerte der Standardproben wurden zur Erstellung einer Standardkurve verwendet, anhand derer die Proteinmengen in den Proben berechnet wurden.

2.4.9 SDS-Page

Zur Analyse der Proteinproben mittels Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben zunächst auf eine Konzentration von 30 µg Protein pro Probe verdünnt. Dies wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser erreicht, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl entstand. Anschließend wurden die Proben mit 5 µl Lemmli-Puffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach der Hitzeinkubation wurde das entstandene Kondenswasser durch Zentrifugation zurück in die Proben überführt.

Es wurden jeweils 12 µl der vorbereiteten Proben in die Taschen von 4 bis 15 % Protean-Gelen geladen. Zunächst wurden die Gele für 10 Minuten bei einer Spannung von 100 V betrieben, um die Proben gleichmäßig in die Gelmatrix einwandern zu lassen. Anschließend wurde die Spannung auf 160 V erhöht und die Gelelektrophorese fortgesetzt, bis die Bromphenolblau-Färbung den unteren Rand des Gels erreichte.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele aus den Gelkassetten entnommen und im ChemiDoc-System fotografiert.

Zusammensetzung Lemmli-Puffer

Inhaltsstoffe	Menge
252 mM Tris-HCl	2,5 ml
40 % Glycerol	4 ml
8 % SDS	0,8 g
0,01 % Bromphenolblau	eine Spatelspitze
H ₂ O	Ad 10 ml

Tabelle 5: Zusammensetzung Lemmli-Puffer

Zusammensetzung Laufpuffer

Inhaltsstoffe	Menge
25 mM Tris, pH 8,3-8,8	30,3 g
192 mM Glycin	144,2 g
0,1 % SDS	10 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

Tabelle 6: Zusammensetzung Laufpuffer

2.5 Western-Blot

Für den *semi-dry* Blot wurde das Proteingel nach der SDS-PAGE in Transferpuffer eingebettet. Zwei Stücke Whatman-Papier und eine Nitrozellulosemembran wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt.

Der Aufbau des Blotting-Sandwiches erfolgte wie folgt: Zunächst wurde ein mit Transferpuffer getränktes Stück Whatman-Papier auf die Anode des Blotting-Systems gelegt. Darauf wurde die Nitrozellulosemembran platziert, gefolgt vom Proteingel. Abschließend wurde das zweite Stück Whatman-Papier auf das Gel gelegt. Luftblasen wurden herausgerollt.

Der Transfer der Proteine erfolgte im *semi-dry* Blotting-System für 10 Minuten bei 2,5 Ampere und 25 Volt. Nach dem Blotting wurde die Nitrozellulosemembran in einer Lösung aus TBS-T (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20) und 5 % BSA (Rinderserumalbumin) für eine Stunde geblockt.

Zusammensetzung Transferpuffer 25-fach konzentriert

Inhaltsstoffe	Menge
Tris Base	36,4 g
Glycin	180 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

Tabelle 7: Zusammensetzung Transferpuffer 25-fach konzentriert

Zusammensetzung Blotting Puffer

Inhaltsstoffe	Menge
Transfer Puffer 25-fach konzentriert	40 ml
Methanol	50 ml
H ₂ O	Ad 500 ml

Tabelle 8: Zusammensetzung Blotting Puffer

Zusammensetzung TBS

Inhaltsstoffe	Menge
Tris	12,1 g
NaCl	87,7 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung TBS

Zusammensetzung TBS-T

Inhaltsstoffe	Menge
TBS (10-fach konzentriert)	100 ml
Tween	1 ml
ddH ₂ O	900 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung TBS-T

2.6 Immunmarkierung der Proteine

Für die Immunmarkierung der Proteine wurden die Membranen in 50 ml Falcons über Nacht auf dem Taumelrollenmischer mit einer Lösung aus Primärantikörpern bei 4 °C inkubiert. Die eNOS-Antikörper wurden dabei mit 5 % BSA in TBS-T im Verhältnis 1:1000 verdünnt, die SR-B1-Antikörper im Verhältnis 1:2000. Diese Inkubationsprozesse von eNOS- und SR-B1-Antikörpern wurden stets nacheinander durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen drei mal fünf Minuten mit TBS-T auf dem Taumelrollenmischer gewaschen. Dann wurden für die Markierung der gebundenen Primärantikörper Anti-Rabbit-Sekundär-Antikörper im Verhältnis 1:5000 in TBS-T in die Falcons gefüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Als letzten Schritt wurden die Membranen erneut drei mal fünf Minuten mit TBS-T auf dem Taumelrollenmischer gewaschen, um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Aufgenommen wurden die Blots im ChemiDoc-System mit *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Blotting-Substrat und in TBS bei 4 °C aufbewahrt.

2.7 Immunhistochemiefärbung von eNOS und Caveolin

Für die Immunhistochemie-Färbung wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät. Jedes Well enthielt 110.000 Zellen des Wildtyps bzw. Mutante und MUT_K, die auf Deckgläsern ausgesät wurden. Diese Deckgläser wurden später für die konfokale Mikroskopie auf Objektträger geklebt. Für die Negativkontrolle wurde ein zusätzliches Well mit Wildtypzellen ausgesät. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert.

Material und Methoden

Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen einmal mit 700 ml PBS gespült, um das Kulturmedium zu entfernen. Zur Fixierung der Zellen wurden sie anschließend mit 700 ml 4-prozentigem Formalin bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert und danach erneut zweimal mit PBS gespült.

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit 0,2 % Triton in PBS 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend zweimal mit PBS gespült. Nun wurde 30 Minuten mit 3 % BSA und 0,1 % Triton geblockt. Im Anschluss wurden die Deckgläschen aus den 6-Well-Platten entnommen und in eine Metallkammer überführt, die mit einem feuchten Tuch und Parafilm ausgelegt war, um ein Austrocknen zu verhindern. Zur Behandlung mit den Primärantikörpern wurden die Deckgläschen über Nacht bei 4 °C mit Antikörperlösung inkubiert. Dafür wurden die eNOS-Antikörper 1:200 und die Caveolin-Antikörper 1:250 mit 3 % BSA und 0,1 % Triton verdünnt. Am folgenden Tag wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen und nacheinander je eine Stunde mit Anti-Mouse-Antikörpern (Alexa 488) für Caveolin und mit Anti-Rabbit-Antikörpern (Alexa 594) für eNOS bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Negativkontrollen wurden zwei Deckgläschen mit Wildtypzellen nur mit Sekundärantikörpern behandelt und nicht mit Primärantikörpern markiert. Danach wurden die Deckgläschen inklusive Negativkontrollen dreimal mit PBS gewaschen und mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:1000 in PBS fünf Minuten inkubiert, um den Zellkern zu färben. Für die Negativkontrollen wurde ein Deckgläschen mit DAPI behandelt und eines ohne belassen. Als letzten Schritt wurden die Deckgläser dreimal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und die Deckgläser mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf Objektträger geklebt. Die Präparate wurden dann mithilfe von konfokaler Mikroskopie visuell aufbereitet.

2.8 Chemilumineszenzdetektion zur Bestimmung von NO

Zur Bestimmung von Stickstoffmonoxid (NO) in den Proben wurde in dieser Arbeit die Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion eingesetzt. Diese Methode umfasst zwei aufeinanderfolgende Prozesse: die chemische Freisetzung von gasförmigem NO aus nitrosylierten Vorstufen und dessen anschließenden quantitativen Nachweis über eine lichtemittierende Gasphasenreaktion. Zu definierten Zeitpunkten (nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation) wurden Überstände der Mediumproben entnommen, in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt und bis zur Messung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Für die Freisetzung des NO wurden jeweils 25 µl der Proben in eine Reduktionslösung aus Kaliumiodid (45 mmol/l) und molekularem Iod (10 mmol/l) in Eisessig injiziert. Unter diesen sauren Bedingungen reduziert Iodid nitrosylierte Verbindungen oder Nitrit zu gasförmigem NO, das unmittelbar in die Gasphase übertritt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem

Material und Methoden

wasserummantelten, temperierten und gasdicht verschlossenen Reaktionsgefäß kontinuierlich mit Stickstoff durchströmt, um das freigesetzte NO in den Detektionspfad zu überführen.

Der Nachweis des NO erfolgte anschließend in der Gasphase durch Reaktion mit Ozon (O_3). Dabei bildet sich angeregtes Stickstoffdioxid (NO_2^*), das beim Rückfall in den Grundzustand Licht im nahen Infrarotbereich abstrahlt. Diese Chemilumineszenz ist proportional zur NO-Konzentration und wurde mittels Photomultiplier gemessen.

Es ist zu beachten, dass auch in unbehandelten Proben ohne aktive NO-Synthese ein messbares NO-Signal entstehen kann. Dieses beruht auf der chemischen Reduktion von im Medium vorhandenen Vorstufen wie Nitrit oder spontan gebildeten Nitrosylverbindungen, die unabhängig von enzymatischer Aktivität durch die KI/I₂-Reaktion ebenfalls NO freisetzen. Daraus ergibt sich eine basale Hintergrundlumineszenz, die experimentell als Baseline erfasst und bei der Auswertung berücksichtigt werden muss. Die Durchführung geeigneter Negativkontrollen war daher essenziell, um die tatsächliche NO-Freisetzung durch zelluläre Aktivität quantifizieren zu können. Zur Entfernung von Störsubstanzen wurde der Gasstrom vor Eintritt in den Detektor durch eine gekühlte Waschflasche mit Natriumhydroxid-Lösung (1 mol/l, 0 °C) geleitet, um Reste von Iod und Säuren abzufangen. Um stabile Messbedingungen und minimales Grundlinienrauschen zu gewährleisten, wurde der Stickstofffluss während des gesamten Messzyklus konstant gehalten. Ein zwischen Waschflasche und Detektor installiertes Manometer diente der Druckkontrolle. Das NO-Signal wurde mit einer Frequenz von 2 Hz erfasst. Die nachfolgende Signalverarbeitung (Signalglättung, Basislinienkorrektur und Peak-Integration) erfolgte mithilfe der Software ChromProcessor. Die Bestimmung der NO-Konzentrationen beruhte auf einer zuvor erstellten Standardkurve mit frisch angesetzten NO-haltigen Referenzlösungen definierter Konzentration. Standard- und Probenlösungen wurden jeweils mit einer gasdichten Hamilton-Spritze in das Reaktionssystem injiziert. Jede Probe wurde in Doppelansatz vermessen, der Mittelwert der beiden Messwerte wurde zur Auswertung herangezogen.

$$NO - \text{Produktion} = \left(\frac{NO - \text{Wert in Probe}}{\text{Gesamtprotein in Probe}} \right) \div \text{rel. eNOS} - \text{Menge in Probe}$$

2.9 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 8 durchgeführt. Für die Wachstumskurven, die Western Blots der mit ASS, Trolox, HDL und DETA/NO behandelten Zellen sowie die NO-Produktion der behandelten Zellen wurde ein Two-Way-ANOVA-Test

Material und Methoden

verwendet. Für die Western Blots der unbehandelten Zelllinien (eNOS und SR-B1) und die NO-Produktion der unbehandelten Zellen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, um Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu analysieren. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und $p < 0,0001$ (****). Fehlerbalken in den Diagrammen repräsentieren die Standardabweichungen. Die Western Blots wurden mithilfe der Image Lab-Software und GraphPad Prism-8-Software ausgewertet. Alle Grafiken und Signifikanzmarkierungen wurden in GraphPad Prism 8 erstellt und visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumskurven WT, MUT und MUT_K

Wachstumskurven der Zelllinien WT, MUT und MUT_K

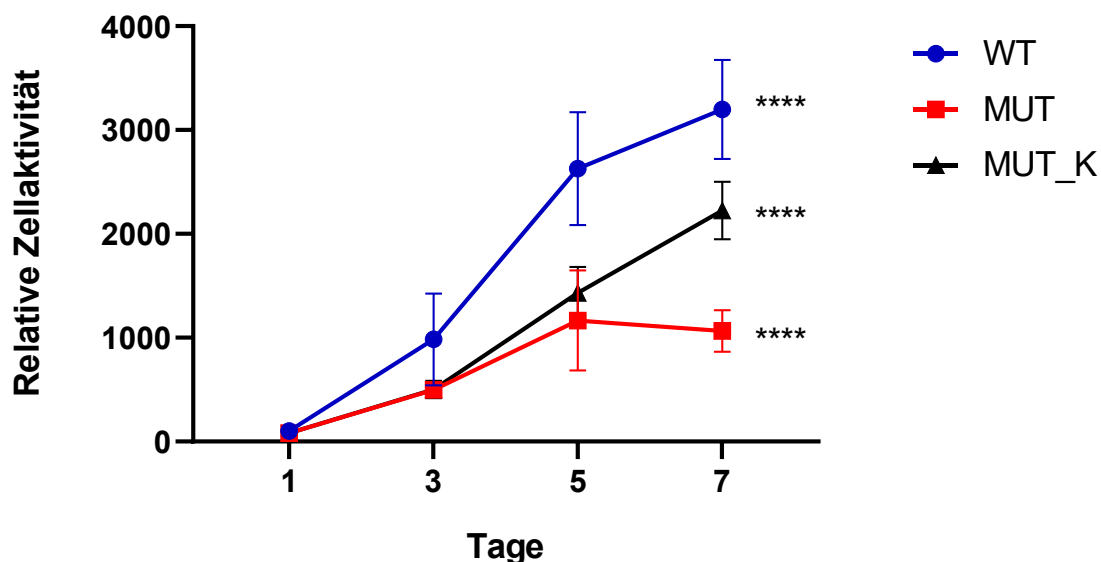


Abb. 2: Wachstumskurven der Zelllinien WT, MUT und MUT_K. Gemessen mittels MTT-Assay an Tag 1, 3, 5 und 7 (n=8).

Abb. 2 zeigt die Wachstumskurven der drei Zelllinien WT, MUT und MUT_K, ermittelt durch MTT-Assays aus insgesamt acht unabhängigen Experimenten. Die Assays wurden jeweils an Tag 1, 3, 5 und 7 durchgeführt und die Daten auf die gemittelten Werte des WT an Tag 1 normalisiert. Über die Zeit nimmt die Zellaktivität in allen drei Linien zu, jedoch mit deutlichen Unterschieden im Wachstum. Die WT-Zelllinie zeigt die höchste Zellaktivität und ein kontinuierlich starkes Wachstum, gefolgt von der Zelllinie MUT_K, die moderat ansteigt. Die Zelllinie MUT weist hingegen die geringste Zellaktivität auf und zeigt den geringsten Zuwachs über die Zeit. Die Unterschiede des Wachstums zwischen den Zelllinien sind statistisch signifikant (Two-Way ANOVA *Interaction Factor* $p < 0,0001$).

Ergebnisse

3.2 eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K

eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K

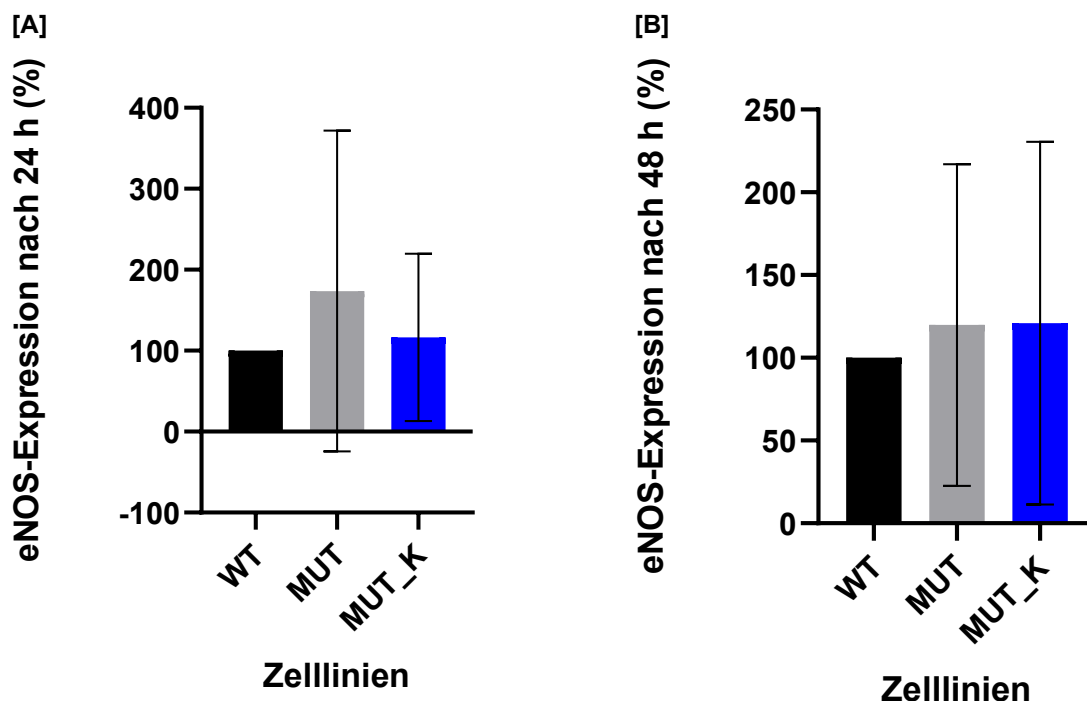


Abb. 3: eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K. Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=20).

Abb. 3 zeigt die relative eNOS-Expression in den unbehandelten Zelltypen WT, MUT und MUT_K, gemessen nach 24 und 48 Stunden mittels Western Blot. Es werden zusammengefasste Daten aus insgesamt 20 unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Western Blots dargestellt. Die Daten wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten auf die gemittelten Daten des WT normalisiert. Nach 24 Stunden ist die eNOS-Expression in allen Zelllinien annähernd auf gleichem Niveau. Nach 48 Stunden zeigt sich die Expression in allen Zelltypen ebenfalls ohne statistisch signifikanten Unterschied. Die Standardabweichungen zeigen große Schwankungen zu beiden Zeitpunkten.

3.3 SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K

SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K

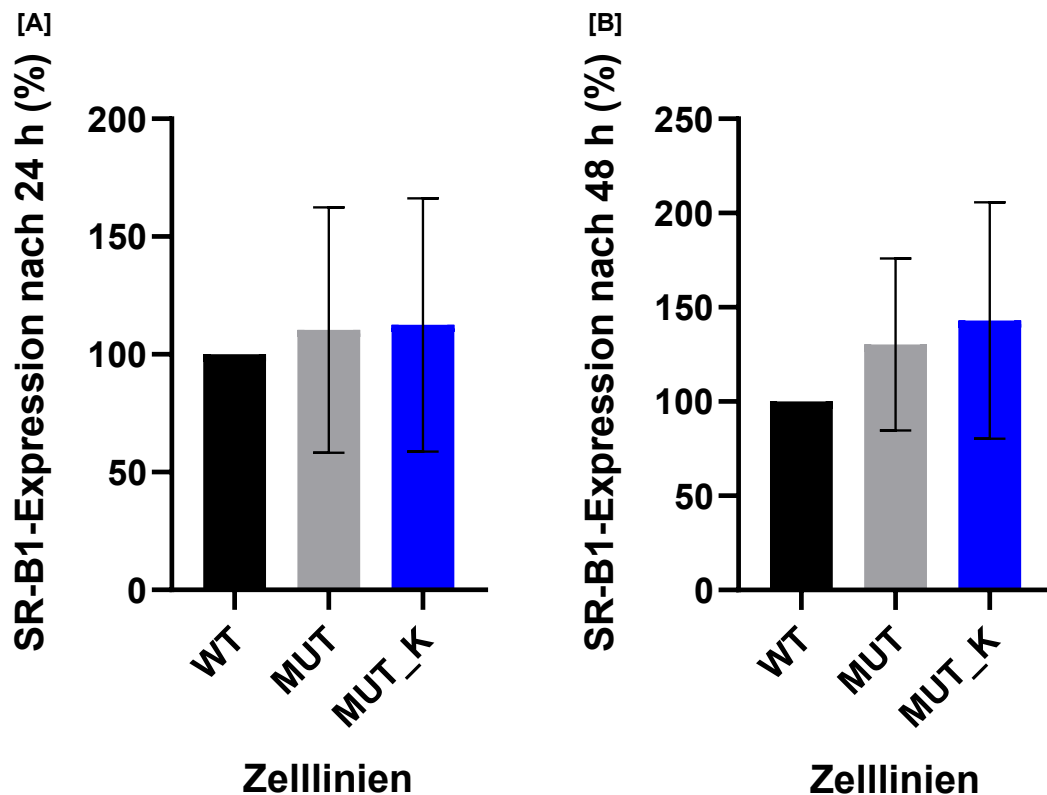


Abb. 4: **SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K.** Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=12).

Abb. 4 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse von 12 Western Blots zur SR-B1-Expression in den drei unbehandelten Zelllinien (WT, MUT und MUT_K) nach 24 und 48 Stunden. Die Daten wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten auf den Mittelwert des unbehandelten WT normalisiert. Nach 24 Stunden ist die SR-B1-Expression in allen Zelllinien vergleichbar. Auch nach 48 Stunden sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien zu vermerken.

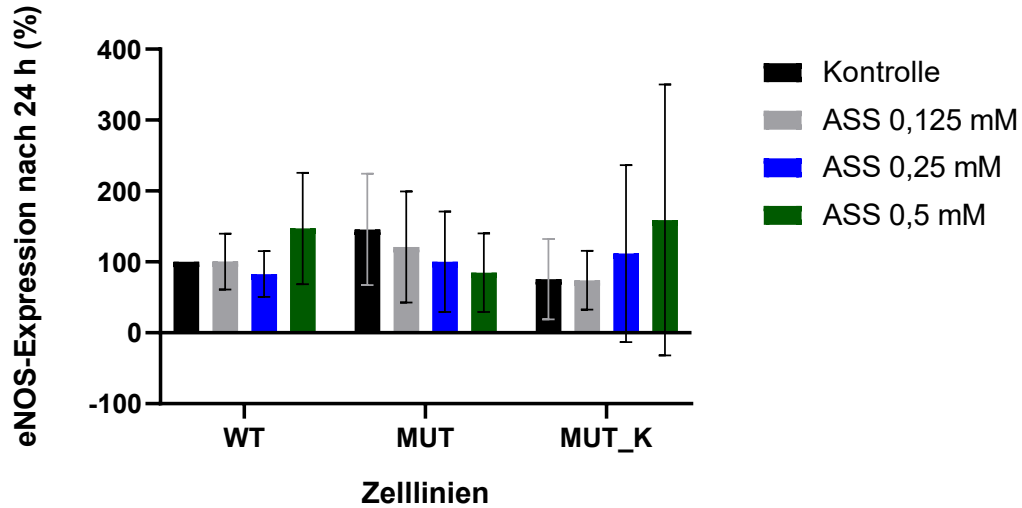
Ergebnisse

3.4 ASS-Behandlung

3.4.1 eNOS-Expression nach ASS-Behandlung

eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach ASS-Behandlung

[A]



[B]

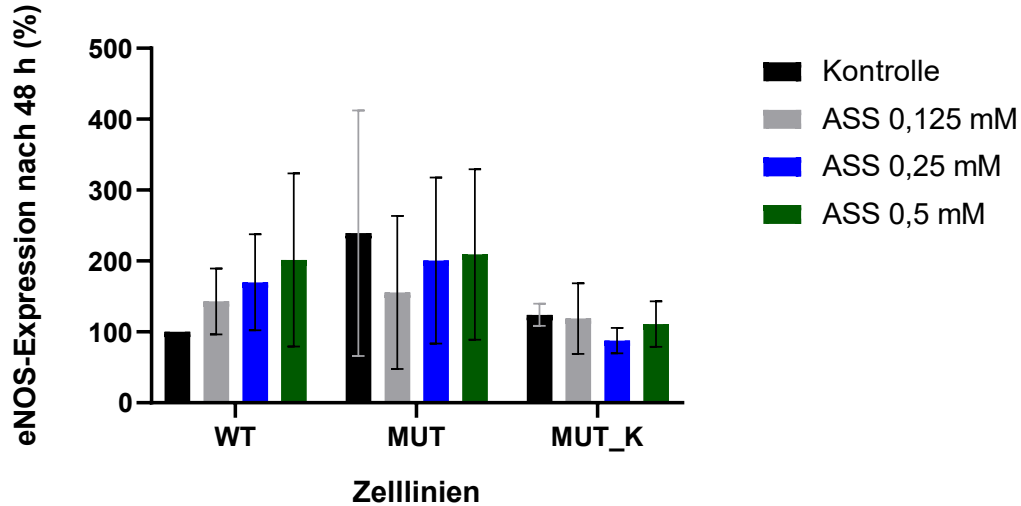


Abb. 5: eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach ASS-Behandlung. Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=5).

Abb. 5 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aus fünf durchgeführten Western Blots zur Bestimmung der eNOS-Expression nach 24- und 48-stündiger ASS-Behandlung in

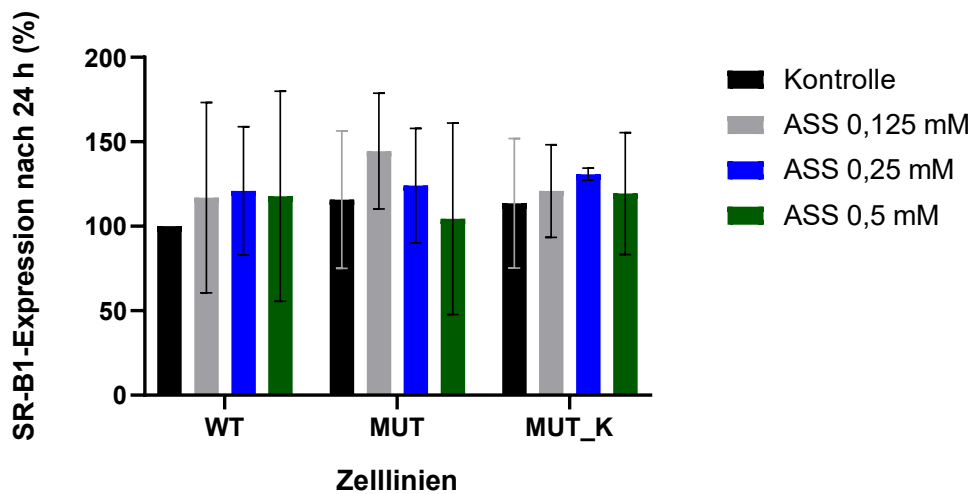
Ergebnisse

verschiedenen Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K. Alle Durchgänge wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt und die Daten wurden auf die gemittelten Daten der WT-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normalisiert. In WT, MUT und MUT_K bleibt die eNOS-Expression nach 24 Stunden unabhängig von der ASS-Konzentration stabil und vergleichbar zur Kontrolle. Nach 48 Stunden zeigen die Daten ebenfalls keinen statistisch signifikanten Trend und große Standardabweichungen.

3.4.2 SR-B1-Expression nach ASS-Behandlung

SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach ASS-Behandlung

[A]



[B]

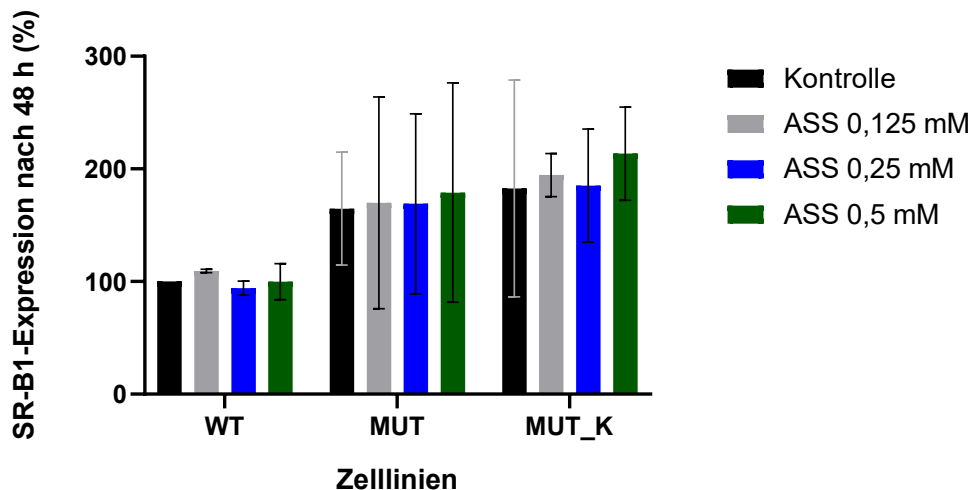


Abb. 6: **SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach ASS-Behandlung.** Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

Ergebnisse

Abb. 6 zeigt die zusammengefassten Daten von drei Western Blots zur Bestimmung der SR-B1-Expression nach 24- und 48-stündiger ASS-Behandlung in verschiedenen Konzentrationen. Die Experimente wurden unter den gleichen Bedingungen an den Zelllinien WT, MUT und MUT_K durchgeführt und die Daten wurden auf die gemittelten Daten der WT-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normalisiert. In WT und MUT bleibt nach 24 h die SR-B1-Expression über alle ASS-Konzentrationen hinweg konstant und zeigt keine Trends. Auch in MUT_K sind die Werte stabil und vergleichbar zur Kontrolle, unabhängig von der ASS-Dosis. Nach 48h zeigt sich ebenfalls keine signifikante Tendenz der SR-B1 Expression in allen Zelllinien, unabhängig von der ASS-Konzentration.

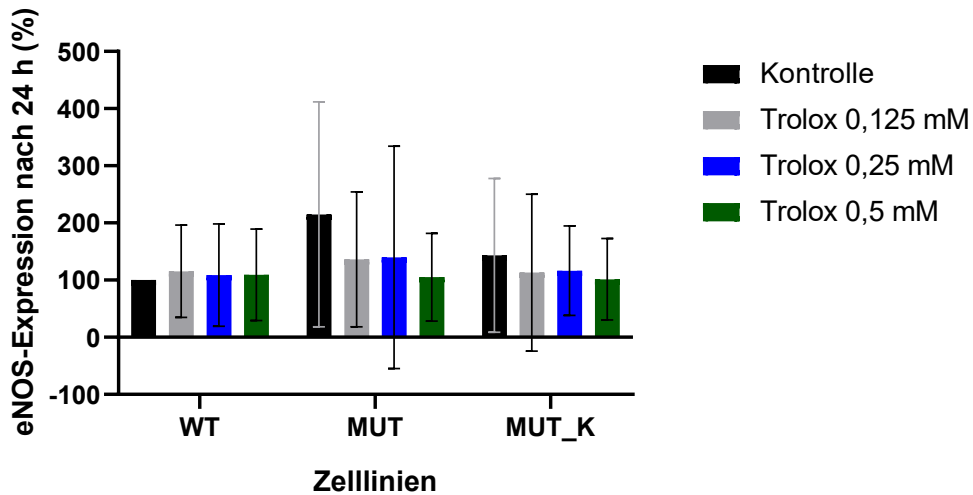
Ergebnisse

3.5 Trolox-Behandlung

3.5.1 eNOS-Expression nach Trolox-Behandlung

eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach Trolox-Behandlung

[A]



[B]

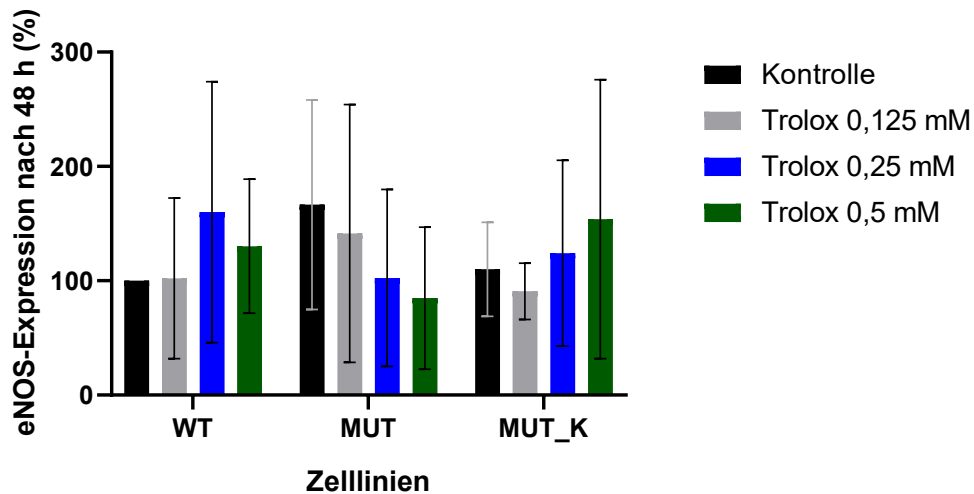


Abb. 7: **eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach Trolox-Behandlung.** Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=5).

Abb. 7 veranschaulicht die Daten aus fünf Western Blots, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Die Daten wurden auf die gemittelten Daten der WT-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normalisiert. Gezeigt ist die Expression von eNOS nach

Ergebnisse

einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit Trolox in unterschiedlichen Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K. In allen Zelllinien variieren die Werte nach 24 Stunden ohne erkennbaren Trend. Nach 48 Stunden zeigen die Daten ebenfalls keinen konsistenten oder dosisabhängigen Effekt auf die eNOS-Expression.

3.5.2 SR-B1-Expression nach Trolox-Behandlung

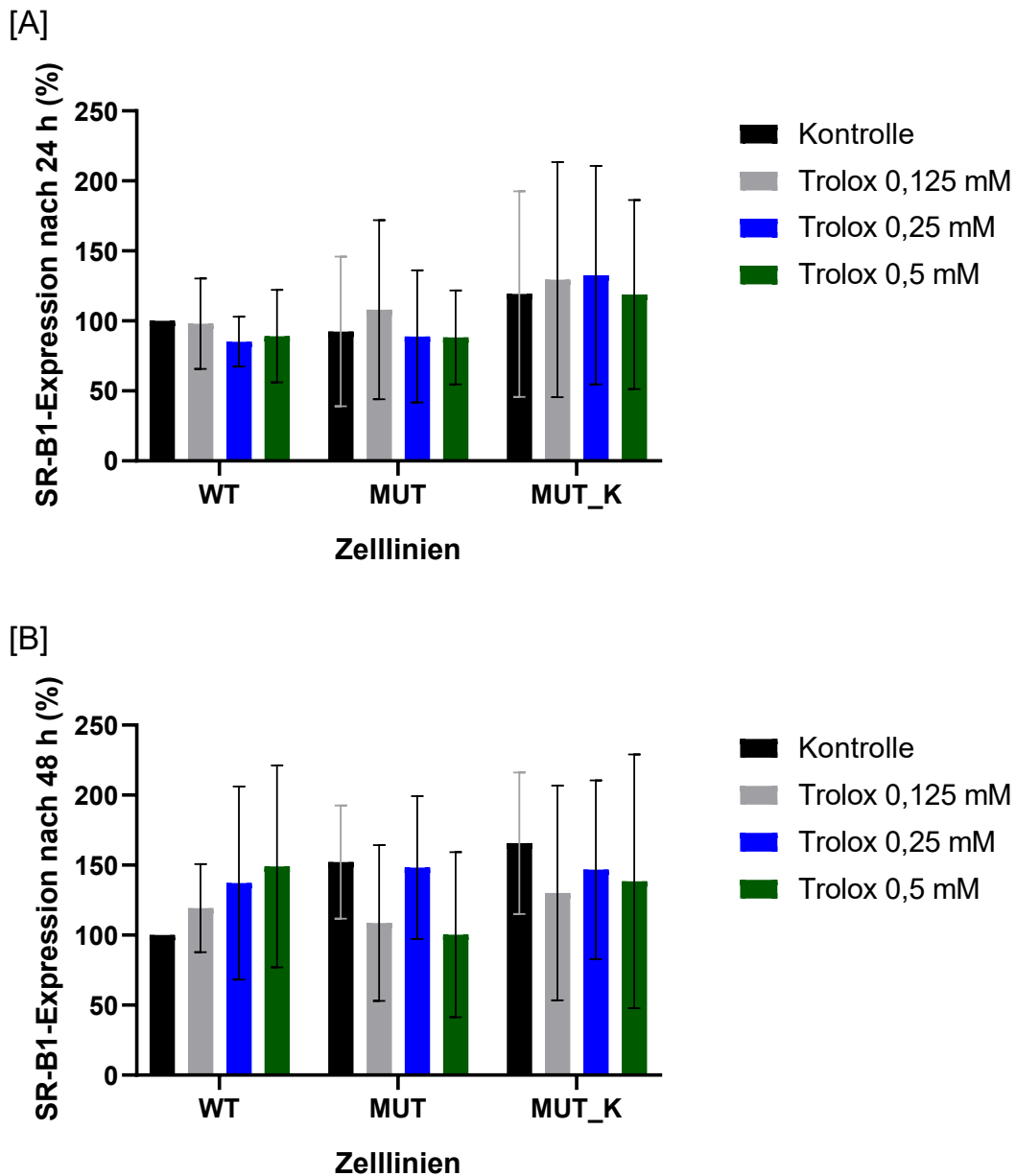
SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach Trolox-Behandlung

Abb. 8: **SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach Trolox-Behandlung.** Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

In Abb. 8 sind die zusammengefassten Ergebnisse aus drei Western Blots zur Analyse der SR-B1-Expression nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit Trolox in verschiedenen Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K dargestellt. Die Daten wurden auf die gemittelten Daten der WT-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt

Ergebnisse

normalisiert. In allen Zelllinien bleibt die SR-B1-Expression nach 24 Stunden über alle Trolox-Konzentrationen hinweg mit nur minimalen Abweichungen von der Kontrolle stabil. Nach 48 Stunden zeigen die SR-B1-Expressionen ebenfalls keinen klaren Trend, unabhängig von den Trolox-Konzentrationen.

Ergebnisse

3.6 HDL-Behandlung

3.6.1 eNOS-Expression nach HDL-Behandlung

eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach HDL-Behandlung

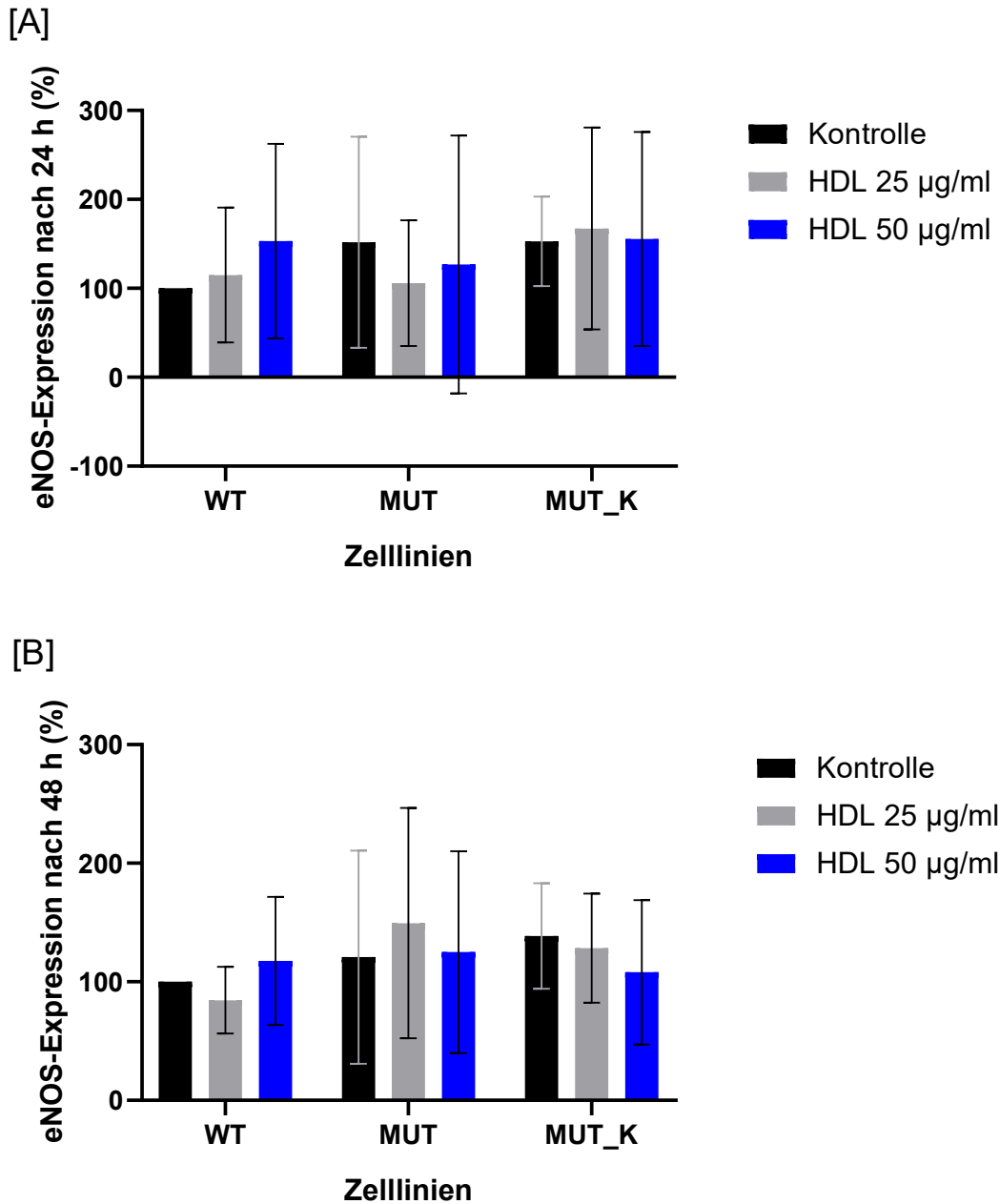


Abb. 9: eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach HDL-Behandlung. Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=5).

Abb. 9 zeigt die zusammengefassten Daten von 5 unter den gleichen Bedingungen durchgeführten Western Blots. Aufgeführt ist die eNOS-Expression nach einer 24- und 48-

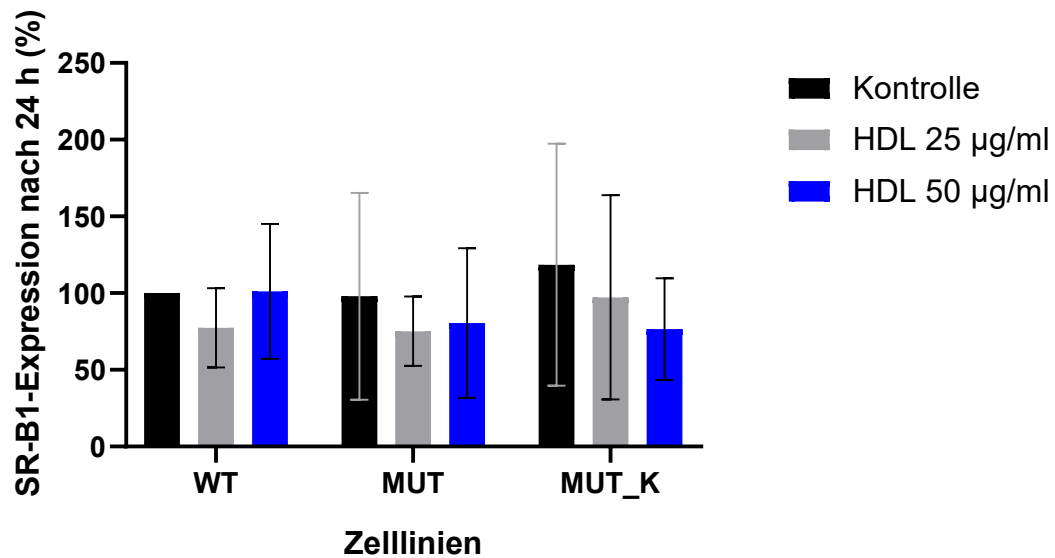
Ergebnisse

stündigen Behandlung mit HDL in Konzentrationen von 25 µg/ml und 50 µg/ml, gemessen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K. Normalisiert wurden die Daten auf die der WT-Kontrolle der jeweiligen Zeit. In allen Zelllinien bleiben nach 24 Stunden die eNOS-Expressionen unabhängig von der HDL-Konzentration weitgehend konstant und zeigen keine auffälligen Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch nach 48 Stunden zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrolle in allen Zelllinien.

3.6.2 SR-B1-Expression nach HDL-Behandlung

SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach HDL-Behandlung

[A]



[B]

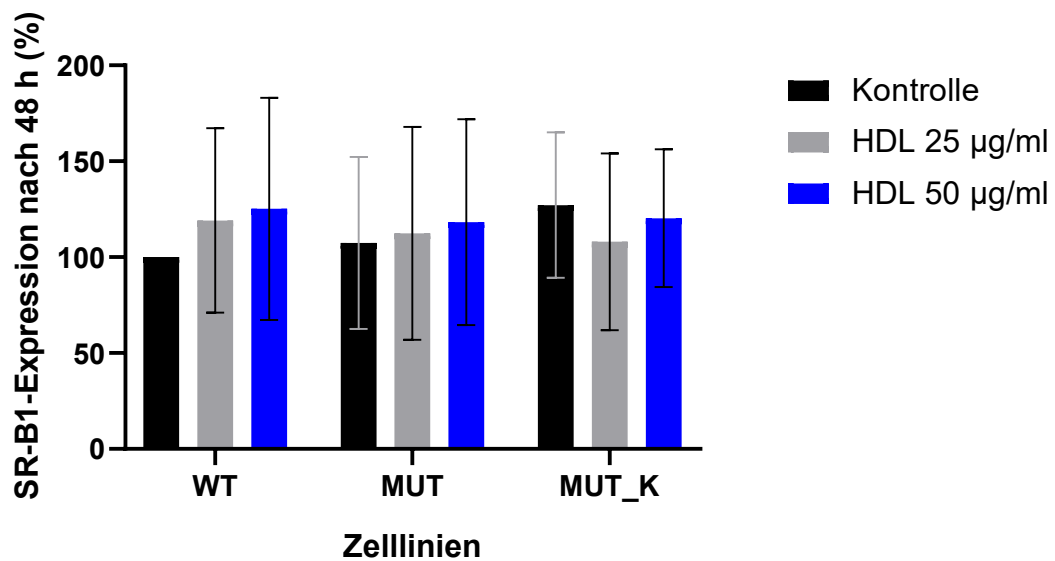


Abb. 10: **SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach HDL-Behandlung.** Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

Abb. 10 veranschaulicht die Ergebnisse von drei Western Blots zur Analyse der SR-B1-Expression nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit HDL in Konzentrationen von

Ergebnisse

25 µg/ml und 50 µg/ml in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K. Alle drei Durchgänge wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Daten wurden auf die gemittelten Daten der WT-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normalisiert. In allen Zelllinien bleibt die SR-B1-Expression sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden stabil, wodurch sich keine signifikanten Tendenzen erkennen lassen.

Ergebnisse

3.7 DETA/NO-Behandlung

3.7.1 eNOS-Expression nach DETA/NO-Behandlung

eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach DETA/NO-Behandlung

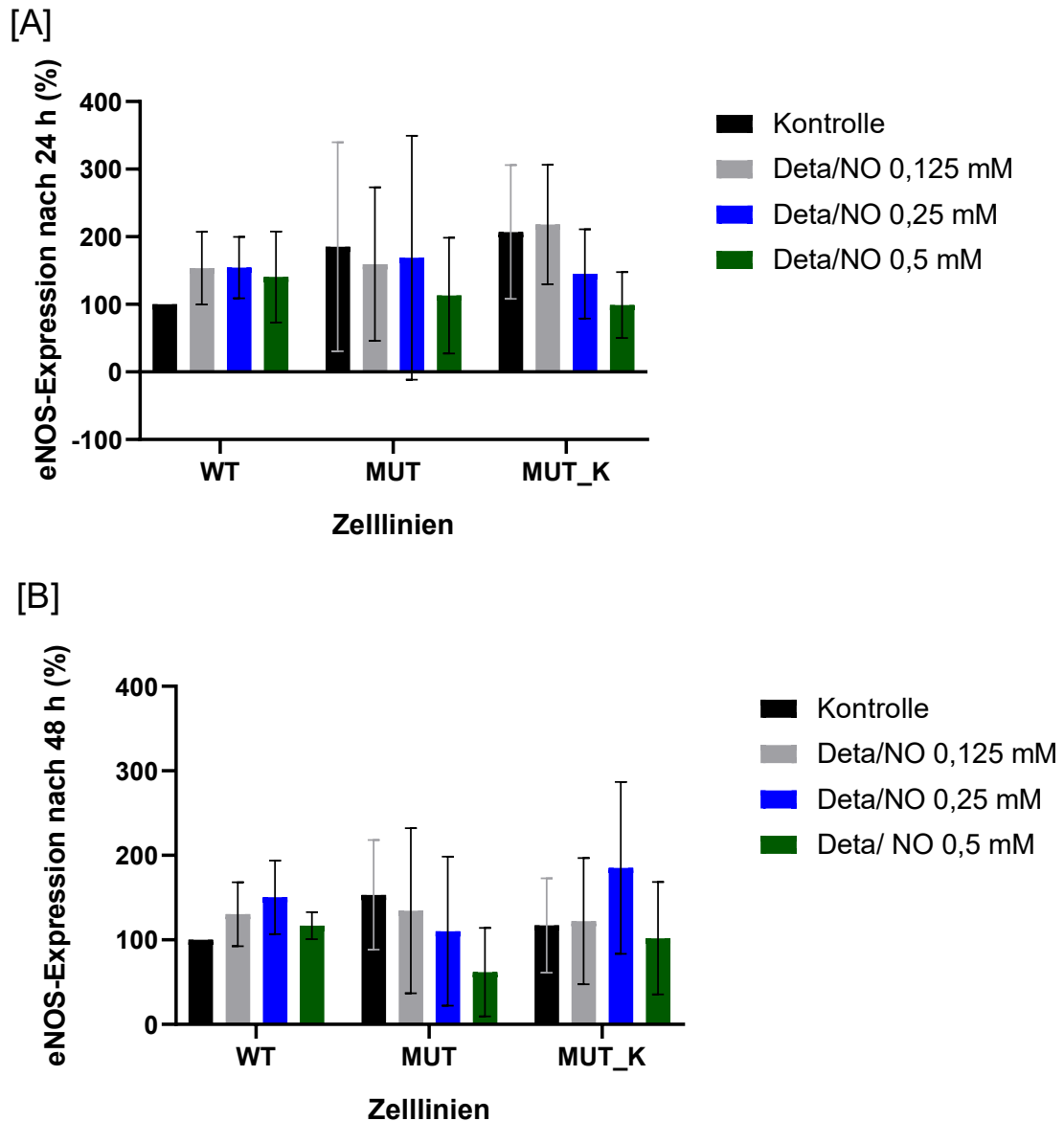


Abb. 11: eNOS-Expression in WT, MUT und MUT_K nach DETA/NO-Behandlung. Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=5).

Abb. 11 stellt die zusammengefassten Ergebnisse von fünf Western Blots zur Analyse der eNOS-Expression nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit Deta/NO in verschiedenen Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K dar. Alle Western

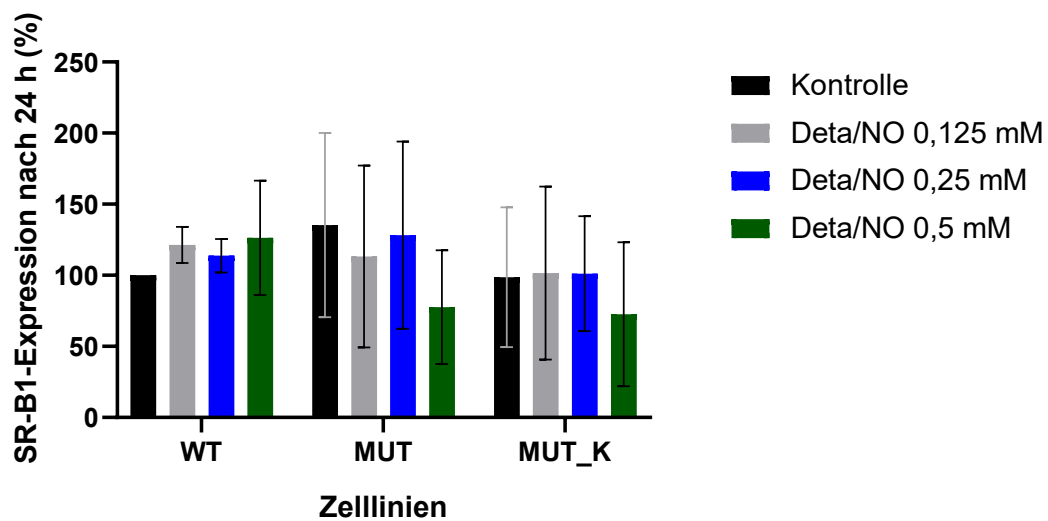
Ergebnisse

Blots wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Daten wurden nach den jeweiligen Zeitpunkten auf die Daten der WT-Kontrolle normalisiert. Nach 24 und 48 Stunden bleiben in allen Zelllinien die eNOS-Werte über die getesteten Konzentrationen konstant und es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

3.7.2 SR-B1-Expression nach DETA/NO-Behandlung

SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach DETA/NO-Behandlung

[A]



[B]

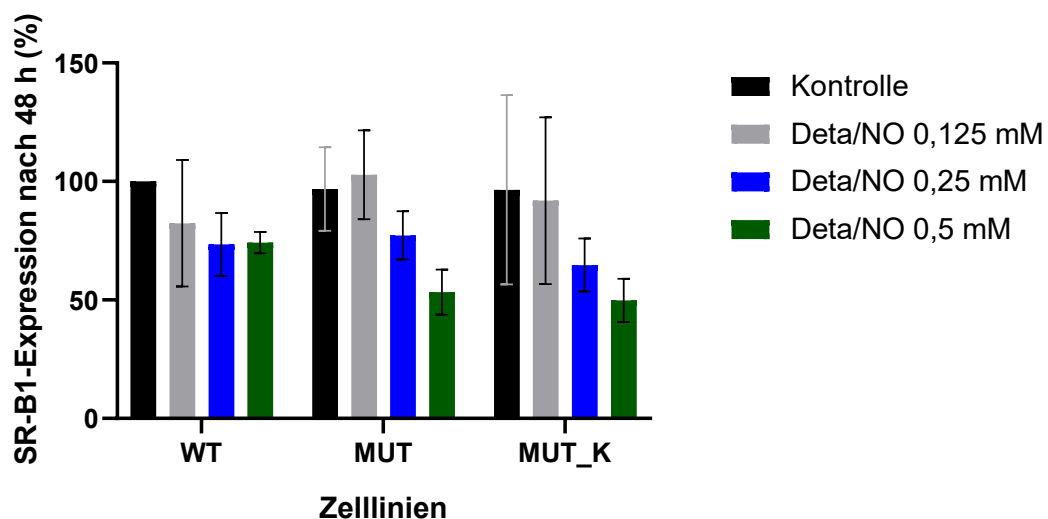


Abb. 12: SR-B1-Expression in WT, MUT und MUT_K nach DETA/NO-Behandlung. Bestimmt mittels Western Blot nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

Ergebnisse

Abb. 12 zeigt die Daten aus drei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Western Blots. Aufgeführt ist die SR-B1-Expression nach einer 24- und 48-stündigen DETA/NO-Behandlung in verschiedenen Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K. Die Daten wurden auf die gemittelten Daten der WT-Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt normalisiert. In WT, MUT und MUT_K bleiben die Expressionen nach 24 Stunden über die meisten Bedingungen hinweg stabil und zeigen keine deutlichen Abweichungen zur Kontrolle. Nach 48 Stunden zeigen die SR-B1-Expressionen besonders in den Zelllinien MUT und MUT_K eine sinkende Tendenz, welche jedoch keine statistische Signifikanz aufweist.

3.8 Bestimmung der NO-Produktion

3.8.1 NO-Produktion der unbehandelten Zelllinien

Relative NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K

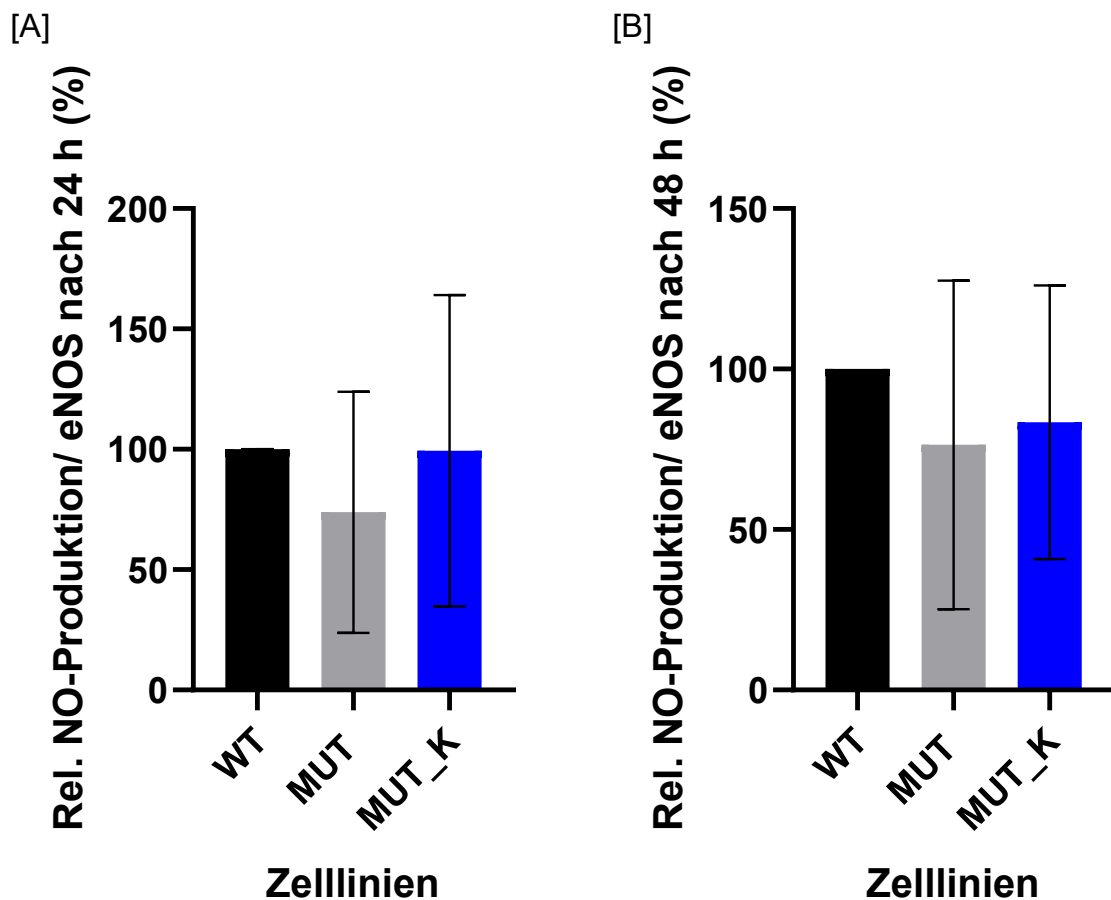


Abb. 13: Relative NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K. Bestimmt mittels Chemilumineszenzdetektion nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

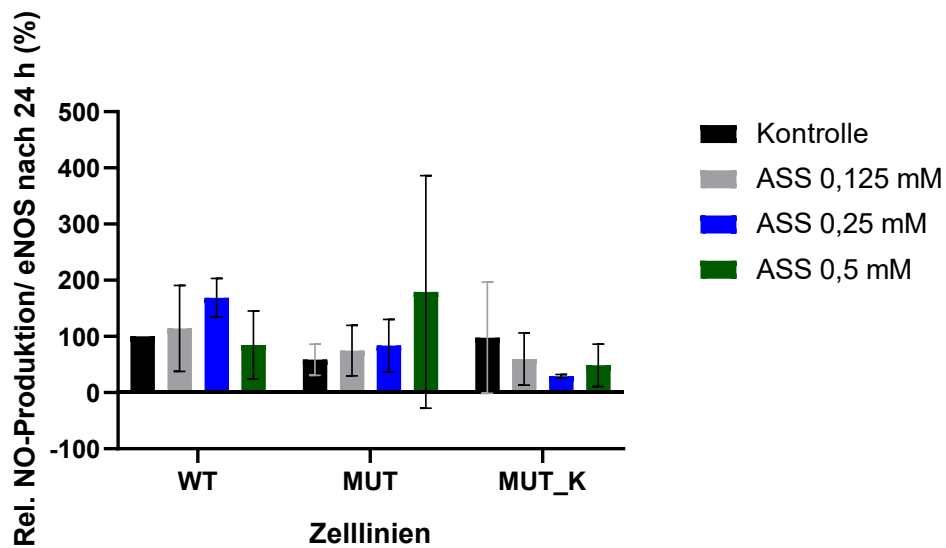
Ergebnisse

Abb. 13 zeigt die relative NO-Produktion pro eNOS-Menge in den Proben in unbehandelten Zelllinien WT, MUT und MUT_K nach 24 und 48 Stunden Bebrütung, gemessen mittels Chemilumineszenzdetektion. Die NO-Produktionen nach sowohl 24 als auch nach 48 Stunden zeigen sich in ähnlichen Bereichen ohne signifikante Abweichungen.

3.8.2 NO-Produktion nach ASS-Behandlung

NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K nach ASS-Behandlung

[A]



[B]

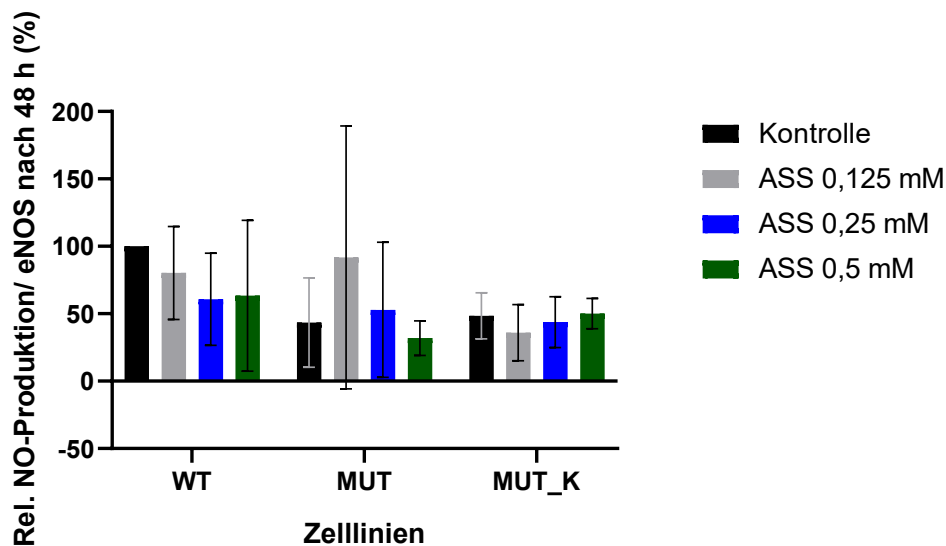


Abb. 14: NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K nach ASS-Behandlung.

Bestimmt mittels Chemilumineszenzdetektion nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

Ergebnisse

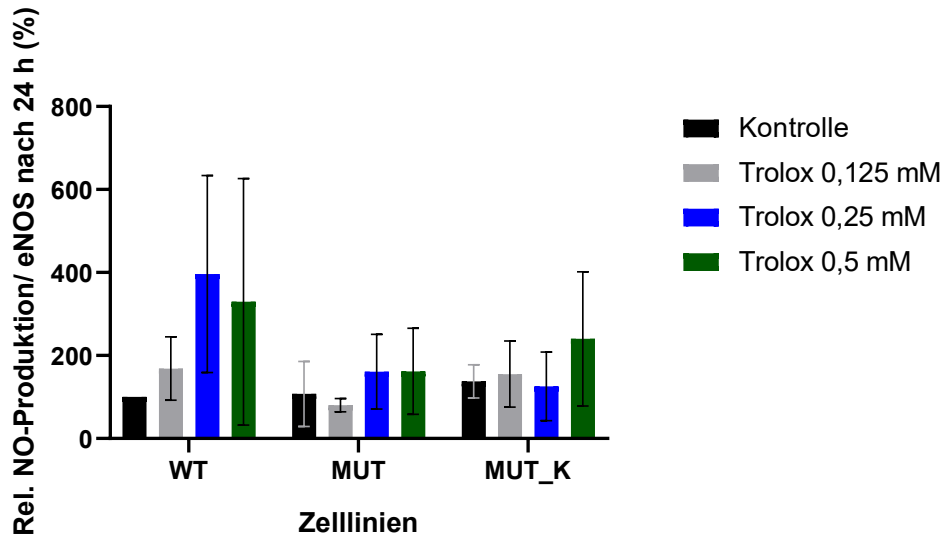
Abb. 14 zeigt die relative NO-Produktion pro eNOS-Menge in den Proben nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit verschiedenen ASS-Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K. Diese wurden mittels Chemilumineszenzdetektion gemessen. Die Daten sind auf die der WT-Kontrolle normalisiert. In WT, MUT und MUT_K bleiben die NO-Werte zu beiden Zeitpunkten über alle ASS-Konzentrationen hinweg stabil und vergleichbar mit der Kontrolle.

Ergebnisse

3.8.3 NO-Produktion nach Trolox-Behandlung

NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K nach Trolox-Behandlung

[A]



[B]

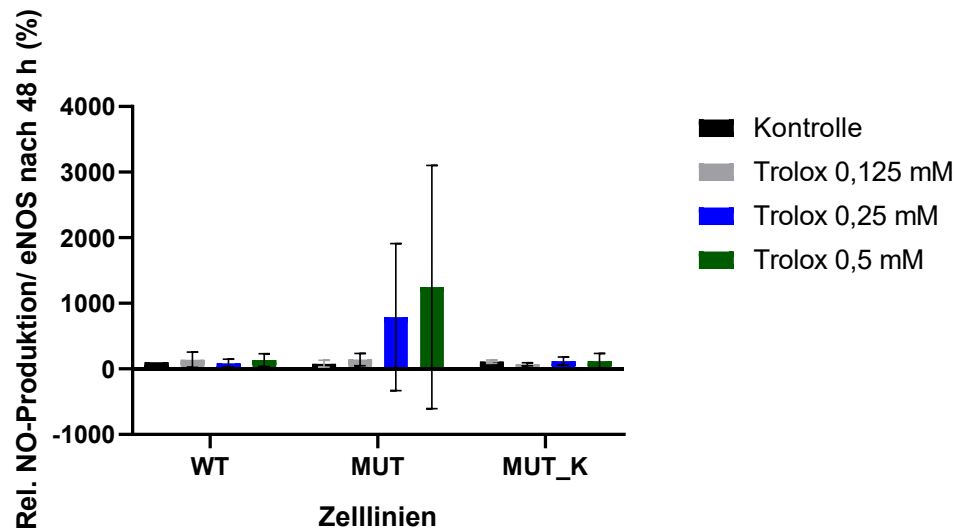


Abb. 15: NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K nach Trolox-Behandlung. Bestimmt mittels Chemilumineszenzdetektion nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

Abb. 15 stellt die relative NO-Produktion pro eNOS-Menge in den Proben nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit verschiedenen Trolox-Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K dar. Die Daten sind auf die der WT-Kontrolle normalisiert. In der Zelllinie WT ist nach 24 Stunden bei 0,25 mM und 0,5 mM Trolox ein deutlicher Anstieg der NO-Produktion zu beobachten. In den Zelllinien MUT und MUT_K bleibt die NO-Produktion

Ergebnisse

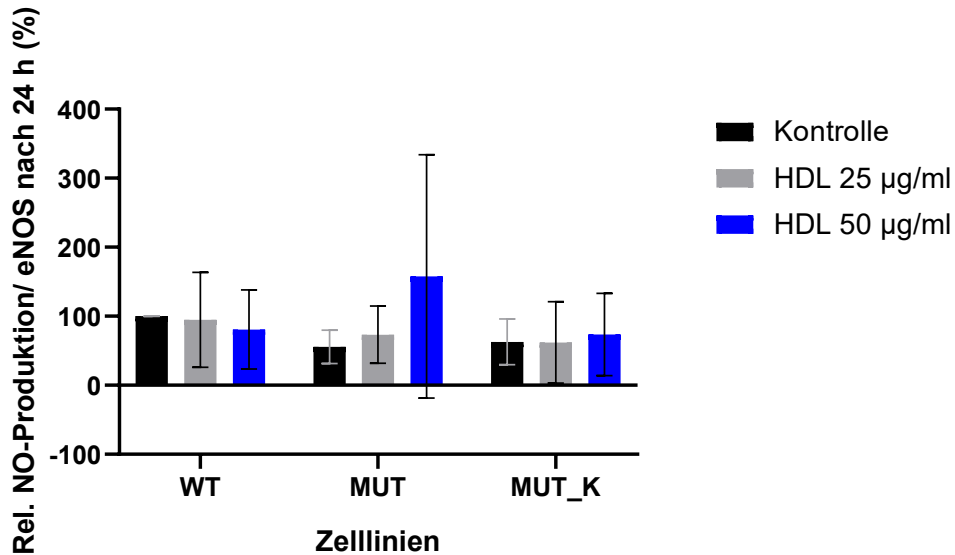
hingegen über alle getesteten Konzentrationen hinweg konstant und zeigt keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Auch nach 48 Stunden bleiben die NO-Werte in WT und MUT_K über alle Konzentrationen hinweg stabil und zeigen keine signifikanten Abweichungen zur Kontrolle. MUT zeigt bei den Konzentrationen von 0,25 und 0,5 mM einen hohen Anstieg von NO, jedoch mit großer Standardabweichung.

Ergebnisse

3.8.4 NO-Produktion nach HDL-Behandlung

NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K nach HDL-Behandlung

[A]



[B]

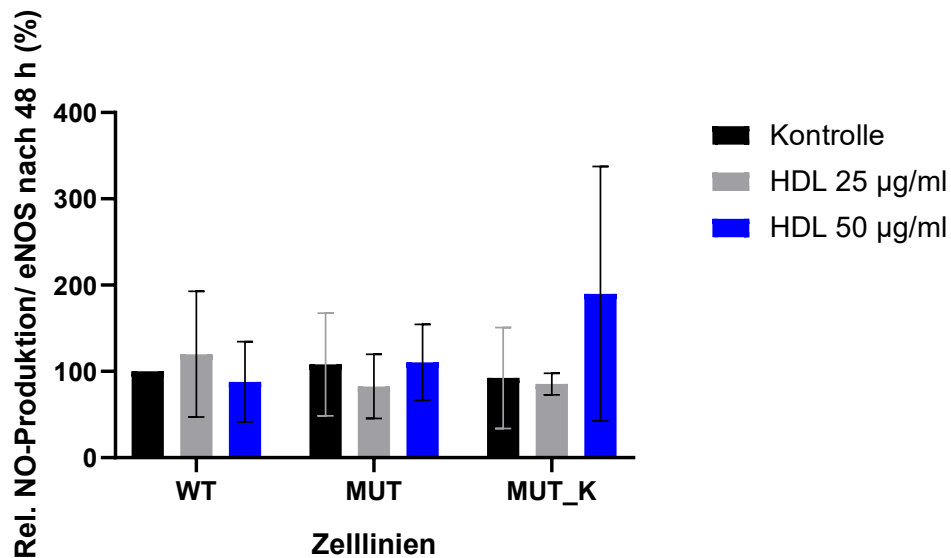


Abb. 16: NO-Produktion pro eNOS-Menge in WT, MUT und MUT_K nach HDL-Behandlung. Bestimmt mittels Chemilumineszenzdetektion nach 24 h [A] und 48 h [B] nach aussähen (n=3).

Abb. 16 veranschaulicht die relative NO-Produktion pro eNOS-Menge in den Proben nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung mit verschiedenen HDL-Konzentrationen in den Zelllinien WT, MUT und MUT_K, gemessen mittels Chemilumineszenzdetektion. Die NO-Produktion nach 24 Stunden HDL-Behandlung bleibt im WT und MUT_K über alle

Ergebnisse

Bedingungen hinweg stabil. In MUT zeigt sich bei 50 µg/ml HDL ein leichter Anstieg, jedoch ohne signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Nach 48 Stunden Behandlung bleiben im WT und MUT die NO-Werte über alle Bedingungen hinweg stabil und vergleichbar mit der Kontrolle. In MUT_K ist bei 50 µg/ml HDL ein leichter Anstieg der NO-Produktion zu beobachten, jedoch ohne klare Signifikanz.

3.9 Immunhistochemische Färbung

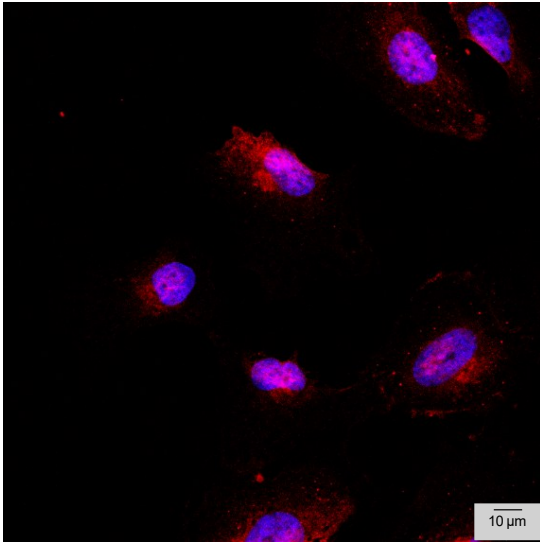


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung von eNOS in WT. Rot: eNOS. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

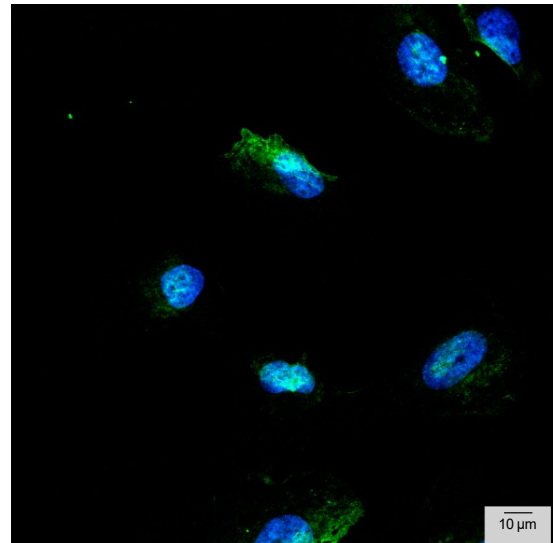


Abb. 18: Immunhistochemische Färbung von Caveolin in WT. Grün: Caveolin. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

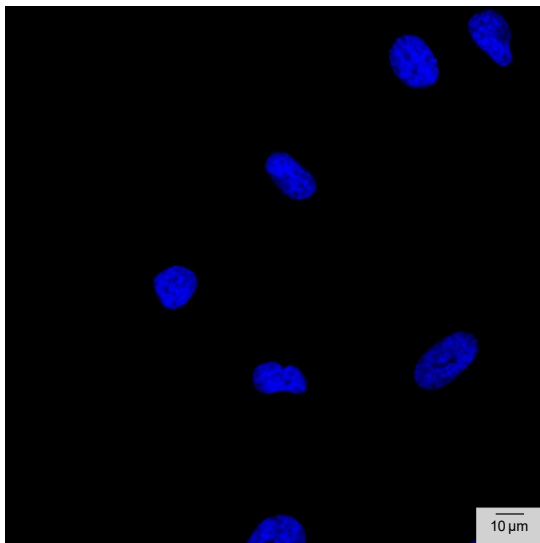


Abb. 19: Immunhistochemische Färbung des Zellkerns in WT. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

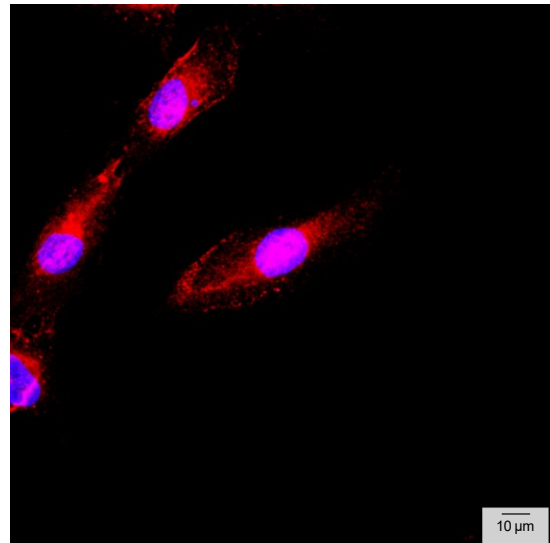


Abb. 20: Immunhistochemische Färbung von eNOS in MUT. Rot: eNOS. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

Ergebnisse

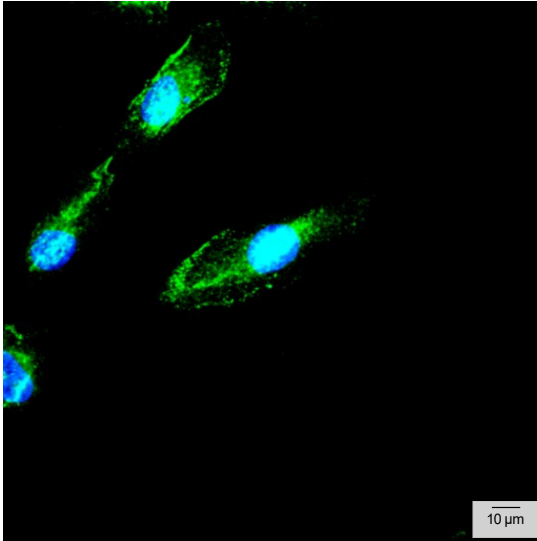


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung von Caveolin in MUT. Grün: Caveolin. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

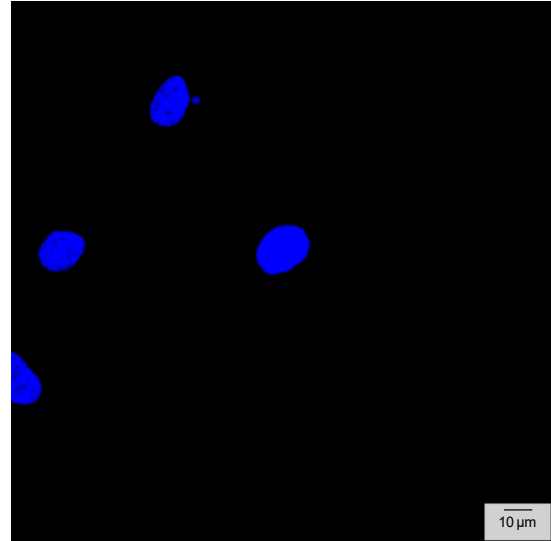


Abb. 22: Immunhistochemische Färbung des Zellkerns in MUT. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

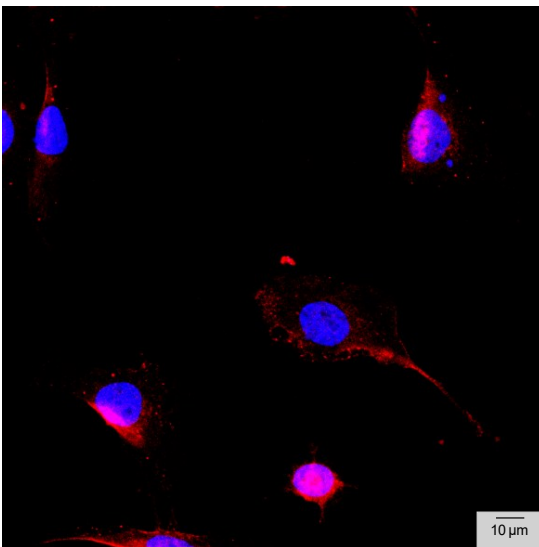


Abb. 23: Immunhistochemische Färbung von eNOS in MUT_K. Rot: eNOS. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

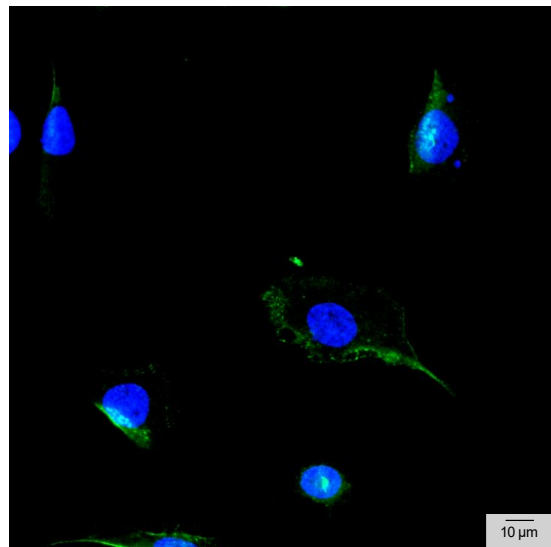


Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von Caveolin in MUT_K. Grün: Caveolin. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

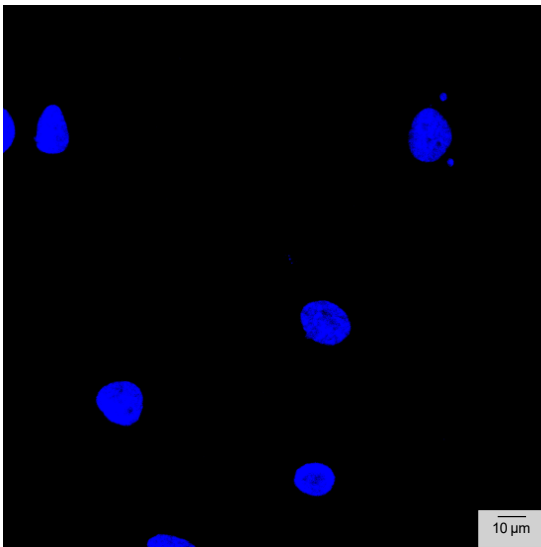


Abb. 25: Immunhistochemische Färbung des Zellkerns in MUT_K. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

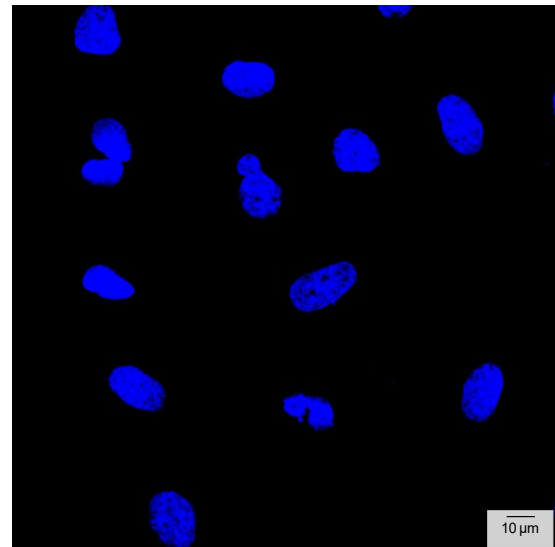


Abb. 26: Negativkontrolle Caveolin mit DAPI in WT. Blau: Zellkern (DAPI). Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.



Abb. 27: Negativkontrolle Caveolin ohne DAPI in WT. Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

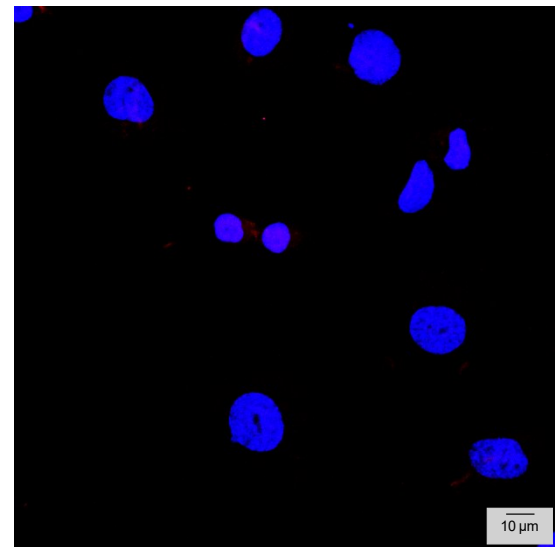


Abb. 28: Negativkontrolle eNOS mit DAPI in WT. Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

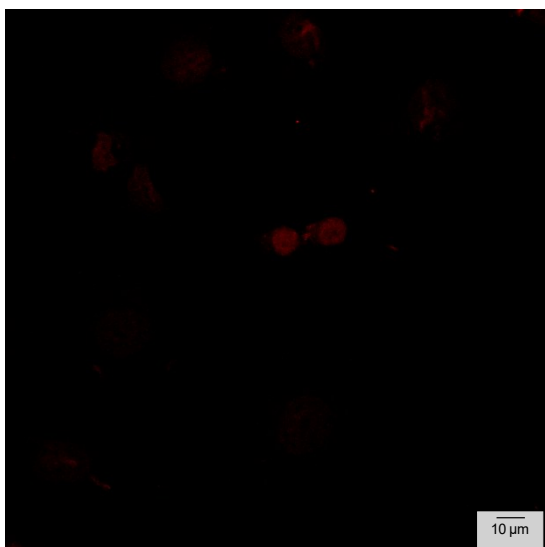


Abb. 29: Negativkontrolle eNOS ohne DAPI in WT. Aufgenommen mit einem 63x-Ölimmersionsobjektiv.

Auf den Abbildungen 17 bis 29 sind die Ergebnisse der Immunhistochemie-Färbung dargestellt. Dabei wurde in WT, MUT und MUT_K eNOS und Caveolin mittels spezifischer Antikörper markiert und mit Lasern verschiedener Wellenlängen sichtbar gemacht. Verglichen unter den Zelllinien untereinander (WT, MUT und MUT_K) erscheinen die gefärbten Areale der eNOS- und Caveolin-Färbung annähernd deckungsgleich. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien erscheint die Färbung von eNOS und Caveolin in MUT_K jedoch etwas weniger intensiv. Die Negativkontrollen mit und ohne DAPI zeigen, dass die Sekundärantikörper in Abwesenheit der Primärantikörper keine Strukturen markierten.

4 Diskussion

4.1 Der WT weist ein schnelleres Zellwachstum auf als die übrigen Zelllinien

Zur Zellcharakterisierung und Einordnung des WT und der neu entstandenen Zelllinien MUT und MUT_K wurden mehrere MTT-Assays unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Abb. 2). Ziel hierbei war es, Wachstumskurven für jede Zelllinie anzufertigen und mögliche Folgen der SR-B1-Mutation auf das Zellwachstum zu ermitteln. Der WT zeigt eine deutlich raschere Zellteilungsrate als MUT und MUT_K. Zum Zeitpunkt des 7. Tages wies der WT eine nahezu dreimal so hohe Zellaktivität auf, als MUT und eine ca. doppelt so hohe Zellaktivität als MUT_K.

HDL fördert über SR-B1 die Reendothelialisierung des Endothels (Seetharam et al., 2006). Möglicherweise wird durch SR-B1 auch die Zellteilungsrate beeinflusst, was zu einer deutlich steileren Wachstumskurve im WT mit intaktem SCARB-1-Gen geführt haben könnte. Jedoch zeigt auch die Zelllinie MUT_K, welche trotz der Behandlung mit CRISPR-Cas 9 keine Mutation im SCARB-1-Gen aufweist, eine langsamere Zellteilungsrate als der WT. Aus diesem Grund sollte in Betracht gezogen werden, dass die im Rahmen der CRISPR-Methode durchgeführte Elektroporation einen Einfluss auf die behandelten Zellen haben könnte und deren Zellteilungsrate beeinflusst. Somit könnte ein Unterschied in den Zellteilungsraten vorhanden sein, ohne dass die Mutation im SCARB-1-Gen einen direkten Einfluss ausübt.

4.2 Die eNOS-Expression unterscheidet sich nicht in den Zelllinien

Ziel dieser Untersuchung war es, mögliche Unterschiede in der Expression von eNOS im Wildtyp und der übrigen Zelllinien zu untersuchen. Der SNP rs11057830 im SCARB-1-Gen, welcher sich in MUT wiederfindet, ist mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert (Zarkasi et al., 2022). In dieser Studie sollte untersucht werden, ob das erhöhte KHK-Risiko mit einer unterschiedlichen Expression der eNOS in Verbindung stehen könnte, da bereits die Induktion von eNOS durch SR-B1 gezeigt werden konnte (Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001, Saddar et al., 2010). Es wäre möglich, dass durch den SNP im SCARB-1-Gen eine Beeinträchtigung der Induktion bzw. Expression der eNOS ausgelöst worden sein könnte, wodurch der atheroprotektive Effekt durch NO (Spieker et al., 2002, Zeiher et al., 1994) geringer ausfallen könnte. Jedoch zeigen die Ergebnisse (Abb. 3) keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression der eNOS in den

Diskussion

unterschiedlichen Zelltypen. Demnach ist davon auszugehen, dass die Ursache für das erhöhte KHK-Risiko nicht in einem Unterschied der Menge der produzierten eNOS in den einzelnen Zelltypen zu finden ist.

4.3 Die SR-B1-Expression unterscheidet sich nicht in den Zelltypen

HDL spielt eine wichtige Rolle in der positiven Beeinflussung der Atherogenese (Abedi et al., 2023, Lee et al., 2021). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von SR-B1 den Plasma-HDL-Spiegel senkt und somit das Fortschreiten der Atherosklerose beeinflussen könnte (Kozarsky et al., 1997, Zhang et al., 2005). Ziel der Untersuchung (Abb. 4) war es, einen möglichen Unterschied, der das erhöhte Risiko für KHK erklären könnte, in der Expression des SR-B1 in den unterschiedlichen Zelllinien darzustellen, da der SNP rs11057830 eventuell einen Einfluss auf die Expression des Proteins in den Zelllinien MUT bzw. MUT_K ausüben könnte. Abb. 4 zeigt jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression von SR-B1 zwischen WT, MUT und MUT_K. Schlussfolgernd ist anzunehmen, dass das erhöhte Risiko für KHK nicht durch eine unterschiedliche Expression des SR-B1 bedingt ist.

4.4 ASS hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1

ASS bewirkt eine direkte Acetylierung der eNOS, was eine Freisetzung von NO zur Folge hat (Taubert et al., 2004). Darüber hinaus ist der vasoprotektive Effekt von ASS bereits bekannt (Baigent et al., 2009, Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin, 2024).

Auch konnte bereits gezeigt werden, dass ASS eine erhöhte Expression und Funktion von SR-B1 in Makrophagen zur Folge hatte (Tancevski et al., 2006).

Ziel dieser Untersuchung war es deshalb, einen möglichen Einfluss von ASS auf die Expression von eNOS und SR-B1 in EA.hy 926 WT, MUT und MUT_K darzustellen. Zusätzlich sollte beurteilt werden, ob die Expression durch die Zelllinien von eNOS und SR-B1 unterschiedlich von den ASS-Behandlungen beeinflusst wird.

Die Ergebnisse in Abb. 5 und 6 zeigen, dass die Behandlung mit ASS unabhängig von den Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1 hatte. Der von Tancevski et al., 2006 gezeigte Effekt von ASS auf SR-B1 in Makrophagen konnte in EA.hy 926 somit nicht bestätigt werden. Die von Taubert et al., 2004 beschriebene Acetylierung der eNOS und die daraus folgende erhöhte Produktion von NO scheint nicht durch eine Induktion der Expression von eNOS in EA.hy 926 bedingt zu sein.

Diskussion

Jedoch weichen die Zellmodelle von Taubert et al., 2004 und Tancevski et al., 2006 von dem in dieser Arbeit gewähltem Zellmodell ab. Dies kann zu abweichenden Ergebnissen führen.

4.5 Trolox hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1

Reboul et al., 2006 zeigten, dass der SR-B1 an der intestinalen Aufnahme und dem Transport von Vit. E beteiligt ist. In SR-B1 defizienten Mäusen zeigten sich nach Mardones et al., 2002 eine fehlerhafte Aufnahme von Vit. E und kardiovaskuläre Pathologien. Zusätzlich konnten hohe Dosen an Vit. E die eNOS in Mäusen regulieren und daraus folgend die NO-Produktion anheben (Ülker et al., 2003). Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an Trolox (Vit. E-Derivat) auf die Expression von eNOS und SR-B1 in den Zelllinien untersucht werden und beurteilt werden, ob sich die Expressionen der Proteine unter den einzelnen Zelllinien nach der Behandlung unterscheiden. Die Daten in Abb. 7 und 8 zeigen, dass die Behandlungen mit unterschiedlichen Trolox-Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Expression von eNOS- und SR-B1 hatten. Demnach konnte die Regulation der eNOS und die vermehrte Produktion von NO, die Ülker et al., 2003 an Mausmodellen beobachtete, nach den hier vorliegenden Daten nicht durch eine erhöhte Expressierung des Enzyms bedingt gewesen sein. Jedoch sollte man bei der Interpretation der Daten bedenken, dass es sich bei Ülker et al., 2003 um in vivo Studien an Mäusen handelte und diese sich demnach sehr vom hier vorliegenden Studienaufbau (in-vitro-Studien an EA.hy 926) unterscheiden und dies zu abweichenden Ergebnissen führen kann.

4.6 HDL hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1

SR-B1 ist ein hoch affiner Rezeptor für HDL (Acton et al., 1996). Nach Kozarsky et al., 1997 und Zhang et al., 2005 ist SR-B1 wichtig für den HDL-Stoffwechsel; Van Eck et al., 2003 zeigte an SR-B1 defizienten Mausmodellen eine massive Akkumulation von HDL.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Behandlung von SR-B1 mit HDL eine Beeinflussung von dessen Expression in EA.hy 926 zur Folge hat.

Darüber hinaus bewirkt HDL an Endothelzellen nach Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001 und Saddar et al., 2010 durch die Bindung am SR-B1 eine Induktion der eNOS, welche daraufhin mehr NO produziert. Darum war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von HDL auf die Expression von eNOS in EA.hy 926 zu

Diskussion

untersuchen. Den Daten, die in Abb. 9 und 10 dargestellt sind, kann man jedoch entnehmen, dass die HDL-Behandlungen weder auf die eNOS- noch auf die SR-B1-Expression einen Einfluss hatten. Dies könnte bedeuten, dass eine Behandlung von SR-B1 mit dessen Liganden HDL keinen Einfluss auf die Expression von SR-B1 der Zelle haben könnte. Ebenfalls könnte man nach den vorliegenden Daten annehmen, dass HDL zwar eine Induktion von eNOS mit vermehrter NO-Entstehung bewirkt (Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001 und Saddar et al., 2010), diese jedoch nicht durch eine vermehrte Expression von eNOS verursacht wird. Auch bei der Interpretation dieser Daten sollte man bedenken, dass sich die Zellmodelle der oben aufgeführten Arbeiten zu denen in dieser Arbeit unterscheiden und dies zu abweichenden Ergebnissen führen kann.

4.7 DETA/NO hat keinen Einfluss auf die Expression von eNOS und SR-B1

Die Bindung von HDL an SR-B1 bewirkt eine Aktivierung der eNOS, welche anschließend NO produziert (Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001, Saddar et al., 2010). Deshalb war eines der Ziele dieser Arbeit, den Einfluss von NO auf die eNOS-Expression in den Zellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte der Einfluss von NO auf die Expression von SR-B1 überprüft werden. Den in den Abbildungen 11 und 12 dargestellten Daten kann man entnehmen, dass NO zu keiner Beeinflussung der Expression von eNOS und SR-B1 geführt hat. Ausgehend von den in dieser Arbeit erhobenen Daten lässt sich sagen, dass die Induktion von eNOS durch SR-B1 Aktivierung nicht durch eine verstärkte Expression von eNOS bedingt zu sein scheint. Auch scheint die Expression von SR-B1 unabhängig von der Substratkonzentration der eNOS zu sein.

4.8 Die eNOS-Effizienz unterscheidet sich nicht in unbehandelten und behandelten WT, MUT und MUT_K

ASS kann durch direkte Acetylierung der eNOS die Freisetzung von NO am Endothel verursachen (Taubert et al., 2004).

Auch scheint Trolox in der Lage zu sein, die eNOS-Aktivität zu regulieren und so die NO-Spiegel anzuheben (Ülker et al., 2003).

Darüber hinaus zeigten Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001 und Saddar et al., 2010, dass die Bindung von HDL am SR-B1 die Hochregulierung von eNOS und die daraus folgende NO-Produktion bewirkt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Menge der NO-Produktion pro Menge an vorhandener eNOS in den unterschiedlichen Zelltypen unterscheidet und ob sich

Diskussion

dementsprechend ein Unterschied in der Effizienz der eNOS darstellen lässt. Darüber hinaus wurden die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen an ASS, Trolox und HDL ausgesetzt, um den Einfluss auf die NO-Produktion durch eNOS in den unterschiedlichen Zelltypen zu untersuchen. Abb. 13 zeigt, dass sich die Effizienz der NO-Produktion durch eNOS im unbehandelten Zustand der Zelllinien sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden nicht statistisch signifikant unterscheidet.

Auch nach ASS-, Trolox- und HDL- Behandlung konnte in keiner der Zelllinien ein statistisch signifikanter Anstieg der NO-Produktion nachgewiesen werden (Abb. 14-16). Dementsprechend konnten die Ergebnisse von Taubert et al., 2004, Ülker et al., 2003, Mineo et al., 2006, Mineo and Shaul, 2006, Yuhanna et al., 2001 und Saddar et al., 2010 in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Man sollte bei der Interpretation der Daten jedoch bedenken, dass sich die Methoden dieser Arbeit deutlich von den oben aufgeführten Arbeiten unterscheiden. Taubert et al., 2004 verwendeten zur Messung der eNOS-Aktivität einen L-[3H] Citrullin/L-[3H] Arginin-Umwandlungsassay in EA-hy 926. Ülker et al., 2003 verwendeten ebenfalls einen L-[3H] Citrullin/L-[3H] Arginin-Umwandlungsassay zur Messung der eNOS-Aktivität in Ratten-Aorten. Auch Yuhanna et al., 2001 wählten als Methode zur Messung der eNOS-Aktivität den L-[3H] Citrullin/L-[3H] Arginin-Umwandlungsassay in Schafsendothelzellen. Die Tatsache, dass sich sowohl Modelle als auch Methoden der genannten Arbeiten zu dieser Arbeit unterscheiden, könnte die unterschiedlichen Ergebnisse bedingen. Darüber hinaus ist die in dieser Arbeit gewählte Methode der Chemilumineszenzdetektion zur Messung von NO in Proben anfällig für Ungenauigkeiten und Fehler, da Abweichungen in der Temperatur, dem Stickstofffluss und der Kalibrierung die Messergebnisse beeinflussen können.

4.9 Immunhistochemische Färbung von eNOS und Caveolin in den Zelllinien

eNOS ist in Endothelzellen hauptsächlich mit Caveolae assoziiert (Mineo et al., 2006, Yuhanna et al., 2001). Caveolin ist ein Membranprotein und Hauptbestandteil von Caveolae-Membranen (Scherer et al., 1996).

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit abschließend eNOS und Caveolin mittels immunhistochemischer Färbung in allen drei Zelllinien visuell dargestellt werden und die Kollokalisation von eNOS und Caveolin gezeigt werden.

In den Abbildungen 17 bis 29 sind die Färbungen von eNOS und Caveolin in WT, MUT und MUT_K gezeigt. Es ist zu sehen, dass die Färbungen von eNOS und Caveolin größtenteils deckungsgleich erscheinen, was die Arbeiten von Mineo et al., 2006 und Yuhanna et al., 2001 bestätigt.

4.10 Kritische Beleuchtung der eigenen Ergebnisse

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollten mehrere methodische Aspekte berücksichtigt werden, die potenziell die Aussagekraft und Validität der Daten beeinflussen könnten. Ein zentraler Punkt ist die unterschiedliche Zellteilungsrate der untersuchten Zelllinien. Insbesondere in der Wildtyp-Zelllinie könnte durch die schnellere Zellproliferation eine frühzeitigere Kontaktinhibition eingetreten sein. Diese tritt ein, wenn die Zellteilungsrate durch mechanische Einschränkungen beeinträchtigt wird (Puliafito et al., 2011). Zudem könnte mit 500.000 Zellen/Well eine zu hohe Ausgangszellzahl ausgesät worden sein, was durch den dichten Zellbewuchs bereits am Tag nach dem Setzen der Zellen ersichtlich war. Dies könnte den Zellstoffwechsel ebenfalls negativ beeinflusst haben, beispielsweise durch eine limitierte Versorgung mit Nährstoffen oder Sauerstoff.

Ein weiterer Aspekt betrifft die eingesetzten Dosen von ASS, Trolox, HDL und DETA/NO sowie die gewählten Zeitabstände für die Messungen. Es ist möglich, dass die verwendeten Konzentrationen der Substanzen zu niedrig oder die Intervalle zwischen den Messungen zu kurz waren, um einen messbaren Effekt auf die Proteinexpression oder den Zellstoffwechsel zu erzielen. Zukünftige Experimente sollten daher unterschiedliche Dosisbereiche und längere Zeiträume einbeziehen, um mögliche Effekte besser zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, die Ergebnisse der einzelnen Versuchsdurchgänge zu reproduzieren. Dies gibt Anlass dafür, die Existenz der Mutation in den untersuchten Zelllinien infrage zu stellen. Es ist denkbar, dass die Mutation entweder nicht konsistent vorliegt, also nicht alle Zellen den SNP rs11057830 tragen, oder dass eine Mutation in nur 25 % der Allele nicht ausreicht, um signifikante funktionelle Effekte zu zeigen. Zudem ist es möglich, dass viele kleine interindividuelle Unterschiede, die durch die CRISPR-Cas9-Behandlung entstanden sein könnten, in den Zelllinien zu den abweichenden Ergebnissen geführt haben könnten.

Ein weiterer potenziell relevanter Faktor ist die Lokalisation des untersuchten SNPs innerhalb des Gens. Der SNP rs11057830 liegt auf dem Intron des SCARB-1-Gens (GWAS Catalog, 2024). Introns werden im Rahmen der posttranskriptionalen Prozessierung der prä-mRNA in der Regel entfernt und codieren nicht direkt für Proteinsequenzen (Alberts et al., 2002). Daher ist es möglich, dass sich der SNP rs11057830 in seiner intronischen Position nicht unmittelbar auf die Genexpression, Proteinstruktur oder Funktion von eNOS oder SR-B1 auswirkt. Mögliche regulatorische Effekte auf das Spleißen oder die Transkriptstabilität könnten vorhanden sein, müssen aber nicht zwingend zu messbaren Veränderungen der Funktion bzw. Expression von eNOS und SR-B1 führen. Dies könnte

Diskussion

ein weiterer Grund dafür sein, dass keine Unterschiede zwischen den mutierten Zelllinien und dem Wildtyp nachweisbar waren.

Diese methodischen Einschränkungen sollten bei der Interpretation der Ergebnisse und der Planung zukünftiger Experimente berücksichtigt werden, um die Aussagekraft der Studienergebnisse weiter zu verbessern.

4.11 Schlussfolgerung

Die Resultate dieser Studie deuten darauf hin, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Expression von eNOS und SR-B1 oder der NO-Produktion zwischen den Zelllinien WT, MUT und MUT_K gibt, weder im unbehandelten Zustand noch nach ASS-, Trolox-, HDL- oder DETA/NO-Behandlung. Es scheint, dass die Mechanismen, die mit dem SNP rs11057830 im SCARB-1-Gen und dem damit assoziiertem höheren kardiovaskulären Risiko in Verbindung stehen, nicht durch Variationen in der Proteinexpression oder der NO-Produktion erklärbar sind. Auch wenn die Zellteilungsrate des WT höher ist, weisen die Daten darauf hin, dass die SR-B1-Mutation die Proteinexpression und die Effizienz der eNOS nicht unmittelbar beeinflusst. Die Aussagekraft der Ergebnisse könnte durch methodische Einschränkungen wie eine möglicherweise zu hohe Ausgangszellzahl oder ungeeignete Konzentrationen und Messzeitpunkte beeinträchtigt worden sein. Eine Mutation in lediglich 25 % der Allele könnte außerdem nicht genügen, um funktionelle Wirkungen zu belegen. Diese Faktoren sollten in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse betonen die Notwendigkeit weiterer Studien, um die genauen Mechanismen zu klären, die durch genetische Veränderungen im SCARB-1-Gen beeinflusst werden könnten. Um ein besseres Verständnis für die funktionellen Folgen dieser Variationen zu erlangen, sollten künftige Versuche optimierte Bedingungen sowie eine größere Auswahl an Zellmodellen und Analyseverfahren berücksichtigen.

5 Literaturverzeichnis

- ABE, R. J., ABE, J. I., NGUYEN, M. T. H., OLMSTED-DAVIS, E. A., MAMUN, A., BANERJEE, P., COOKE, J. P., FANG, L., POWNALL, H. & LE, N. T. 2022. Free Cholesterol Bioavailability and Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 24, 323-336.
- ABEDI, F., SADEGHI, M., OMIDKHODA, N., KELESIDIS, T., RAMEZANI, J., SAMADI, S. & MOHAMMADPOUR, A. H. 2023. HDL-cholesterol concentration and its association with coronary artery calcification: a systematic review and meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 22, 60.
- ACTON, S., RIGOTTI, A., LANDSCHULZ, K. T., XU, S., HOBBS, H. H. & KRIEGER, M. 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271, 518-20.
- AL-JARALLAH, A. & TRIGATTI, B. L. 2010. A role for the scavenger receptor, class B type I in high density lipoprotein dependent activation of cellular signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 1239-48.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. 2002. RNA Processing. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York: Garland Science.
- ÄRZTLICHES ZENTRUM FÜR QUALITÄT IN DER MEDIZIN 2024. Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Langfassung, Version 7.0. Berlin.
- ASHRAF, M. Z. & GUPTA, N. 2011. Scavenger receptors: Implications in atherothrombotic disorders. *Int J Biochem Cell Biol*, 43, 697-700.
- BAIGENT, C., BLACKWELL, L., COLLINS, R., EMBERSON, J., GODWIN, J., PETO, R., BURING, J., HENNEKENS, C., KEARNEY, P., MEADE, T., PATRONO, C., RONCAGLIONI, M. C. & ZANCHETTI, A. 2009. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 373, 1849-60.
- BERNEY, E., SABNIS, N., PANCHOO, M., RAUT, S., DICKERMAN, R. & LACKO, A. G. 2019. The SR-B1 Receptor as a Potential Target for Treating Glioblastoma. *J Oncol*, 2019, 1805841.
- BRAUN, A., TRIGATTI, B. L., POST, M. J., SATO, K., SIMONS, M., EDELBERG, J. M., ROSENBERG, R. D., SCHRENZEL, M. & KRIEGER, M. 2002. Loss of SR-BI

Literaturverzeichnis

- Expression Leads to the Early Onset of Occlusive Atherosclerotic Coronary Artery Disease, Spontaneous Myocardial Infarctions, Severe Cardiac Dysfunction, and Premature Death in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circulation Research*, 90, 270-276.
- BREDE, G. 2023. *Homology-directed repair-mediated CRISPR/Cas9 genome editing of SCARB1 in human vascular endothelial cells using ribonucleoprotein complex*
Master of Science, Heinrich-Heine-Universität.
- BRUFAU, G., GROEN, A. K. & KUIPERS, F. 2011. Reverse Cholesterol Transport Revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31, 1726-1733.
- BURTON, G. W. & INGOLD, K. U. 1989. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci*, 570, 7-22.
- CAO, G., GARCIA, C. K., WYNE, K. L., SCHULTZ, R. A., PARKER, K. L. & HOBBS, H. H. 1997. Structure and Localization of the Human Gene Encoding SR-BI/CLA-1: EVIDENCE FOR TRANSCRIPTIONAL CONTROL BY STEROIDOGENIC FACTOR 1*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 33068-33076.
- CHOU DHURY, R. P., RONG, J. X., TROGAN, E., ELMALEM, V. I., DANSKY, H. M., BRESLOW, J. L., WITZTUM, J. L., FALLON, J. T. & FISHER, E. A. 2004. High-density lipoproteins retard the progression of atherosclerosis and favorably remodel lesions without suppressing indices of inflammation or oxidation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24, 1904-1909.
- CONNELLY, M. & WILLIAMS, D. 2004. Connelly, M. A. & Williams, D. L. Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* 15, 287-295. *Current opinion in lipidology*, 15, 287-95.
- DE CATERINA, R., LIBBY, P., PENG, H. B., THANNICKAL, V. J., RAJAVASHISTH, T. B., GIMBRONE, M. A., JR., SHIN, W. S. & LIAO, J. K. 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 96, 60-8.
- DOOLE, F. T., KUMARAGE, T., ASHKAR, R. & BROWN, M. F. 2022. Cholesterol Stiffening of Lipid Membranes. *The Journal of Membrane Biology*, 255, 385-405.

Literaturverzeichnis

- DZESHKA, M. S., SHANTSILA, A. & LIP, G. Y. 2016. Effects of Aspirin on Endothelial Function and Hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 18, 83.
- GALLE-TREGER, L., MOREAU, M., BALLAIRE, R., POUPEL, L., HUBY, T., SASSO, E., TROISE, F., POTI, F., LESNIK, P., LE GOFF, W., GAUTIER, E. L. & HUBY, T. 2019. Targeted invalidation of SR-B1 in macrophages reduces macrophage apoptosis and accelerates atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 116, 554-565.
- GETZ, G. S. & REARDON, C. A. 2018. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *International Journal of Molecular Sciences*, 19.
- GWAS CATALOG. 2024. Variant: rs11057830 [Online]. European Bioinformatics Institute (EBI). Available: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/variants/rs11057830> [Accessed 11 September 2025].
- HU, S., HU, D., WEI, H., LI, S.-Y., WANG, D., LI, C.-Z., JIANG, J., WANG, D., CUI, G. & WANG, D. 2022. Functional Deletion/Insertion Promoter Variants in SCARB1 Associated With Increased Susceptibility to Lipid Profile Abnormalities and Coronary Heart Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8.
- HUANG, L., CHAMBLISS, K. L., GAO, X., YUHANNA, I. S., BEHLING-KELLY, E., BERGAYA, S., AHMED, M., MICHAELY, P., LUBY-PHELPS, K., DAREHSHOURI, A., XU, L., FISHER, E. A., GE, W. P., MINEO, C. & SHAUL, P. W. 2019. SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. *Nature*, 569, 565-569.
- JU, H., ZOU, R., VENEMA, V. J. & VENEMA, R. C. 1997. Direct Interaction of Endothelial Nitric-oxide Synthase and Caveolin-1 Inhibits Synthase Activity*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 18522-18525.
- KOZARSKY, K. F., DONAHEE, M. H., GLICK, J. M., KRIEGER, M. & RADER, D. J. 2000. Gene Transfer and Hepatic Overexpression of the HDL Receptor SR-BI Reduces Atherosclerosis in the Cholesterol-Fed LDL Receptor-Deficient Mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20, 721-727.
- KOZARSKY, K. F., DONAHEE, M. H., RIGOTTI, A., IQBAL, S. N., EDELMAN, E. R. & KRIEGER, M. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 387, 414-417.

Literaturverzeichnis

- KRIEGER, M. 1999. Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu Rev Biochem*, 68, 523-58.
- KRIEGER, M. & KOZARSKY, K. 1999. Influence of the HDL receptor SR-BI on atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 10.
- KUVIN, J. T., PATEL, A. R., SIDHU, M., RAND, W. M., SLINEY, K. A., PANDIAN, N. G. & KARAS, R. H. 2003. Relation between high-density lipoprotein cholesterol and peripheral vasomotor function. *The American Journal of Cardiology*, 92, 275-279.
- LEE, I.-M., COOK, N. R., GAZIANO, J. M., GORDON, D., RIDKER, P. M., MANSON, J. E., HENNEKENS, C. H. & BURING, J. E. 2005. Vitamin E in the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and CancerThe Women's Health Study: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 294, 56-65.
- LEE, J. J., CHI, G., FITZGERALD, C., KAZMI, S. H. A., KALAYCI, A., KORJIAN, S., DUFFY, D., SHAUNIK, A., KINGWELL, B., YEH, R. W., BHATT, D. L. & GIBSON, C. M. 2021. Cholesterol Efflux Capacity and Its Association With Adverse Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8.
- LIBBY, P., RIDKER, P. M. & MASERI, A. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-1143.
- LUO, J., YANG, H. & SONG, B.-L. 2020. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 225-245.
- MANICHAIKUL, A., NAJ, A. C., HERRINGTON, D., POST, W., RICH, S. S. & RODRIGUEZ, A. 2012. Association of SCARB1 variants with subclinical atherosclerosis and incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 1991-9.
- MARDONES, P., STROBEL, P., MIRANDA, S., LEIGHTON, F., QUIÑONES, V., AMIGO, L., ROZOWSKI, J., KRIEGER, M. & RIGOTTI, A. 2002. Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. *J Nutr*, 132, 443-9.
- MCCARTHY, J. J., LEHNER, T., REEVES, C., MOLITERNO, D. J., NEWBY, L. K., ROGERS, W. J. & TOPOL, E. J. 2003. Association of genetic variants in the HDL

Literaturverzeichnis

- receptor, SR-B1, with abnormal lipids in women with coronary artery disease. *J Med Genet*, 40, 453-8.
- MICHEL, J. B., FERON, O., SACKS, D. & MICHEL, T. 1997. Reciprocal Regulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by Ca²⁺-Calmodulin and Caveolin*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 15583-15586.
- MINEO, C., DEGUCHI, H., GRIFFIN, J. H. & SHAUL, P. W. 2006. Endothelial and Antithrombotic Actions of HDL. *Circulation Research*, 98, 1352-1364.
- MINEO, C. & SHAUL, P. W. 2006. Circulating cardiovascular disease risk factors and signaling in endothelial cell caveolae. *Cardiovascular Research*, 70, 31-41.
- MINEO, C. & SHAUL, P. W. 2012. Functions of scavenger receptor class B, type I in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 23, 487-493.
- MINEO, C., YUHANNA, I. S., QUON, M. J. & SHAUL, P. W. 2003. High Density Lipoprotein-induced Endothelial Nitric-oxide Synthase Activation Is Mediated by Akt and MAP Kinases*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 9142-9149.
- OHASHI, R., MU, H., WANG, X., YAO, Q. & CHEN, C. 2005. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM: An International Journal of Medicine*, 98, 845-856.
- OUIMET, M., BARRETT, T. J. & FISHER, E. A. 2019. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*, 124, 1505-1518.
- PRABHUDAS, M. R., BALDWIN, C. L., BOLLYKY, P. L., BOWDISH, D. M. E., DRICKAMER, K., FEBBRAIO, M., HERZ, J., KOBZIK, L., KRIEGER, M., LOIKE, J., MCVICKER, B., MEANS, T. K., MOESTRUP, S. K., POST, S. R., SAWAMURA, T., SILVERSTEIN, S., SPETH, R. C., TELFER, J. C., THIELE, G. M., WANG, X. Y., WRIGHT, S. D. & EL KHOURY, J. 2017. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol*, 198, 3775-3789.
- PULIAFITO, A., HUFNAGEL, L., NEVEU, P. J., STREICHAN, S. J., SIGAL, A., FYGENSON, D. K. & SHRAIMAN, B. I. 2011. Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 739 - 744.

Literaturverzeichnis

- RADER, D. J., ALEXANDER, E. T., WEIBEL, G. L., BILLHEIMER, J. & ROTHBLAT, G. H. 2009. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 50, S189-S194.
- REBOUL, E., KLEIN, A., BIETRIX, F., GLEIZE, B., MALEZET-DESMOULINS, C., SCHNEIDER, M., MARGOTAT, A., LAGROST, L., COLLET, X. & BOREL, P. 2006. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem*, 281, 4739-45.
- RIGOTTI, A., MIETTINEN, H. E. & KRIEGER, M. 2003. The Role of the High-Density Lipoprotein Receptor SR-BI in the Lipid Metabolism of Endocrine and Other Tissues. *Endocrine Reviews*, 24, 357-387.
- RIZVI, S., RAZA, S. T., AHMED, F., AHMAD, A., ABBAS, S. & MAHDI, F. 2014. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 14, e157-65.
- ROOT, K. T., PLUCINSKY, S. M. & GLOVER, K. J. 2015. Recent progress in the topology, structure, and oligomerization of caveolin: a building block of caveolae. *Curr Top Membr*, 75, 305-36.
- SADDAR, S., MINEO, C. & SHAUL, P. W. 2010. Signaling by the high-affinity HDL receptor scavenger receptor B type I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 144-50.
- SCHERER, P. E., OKAMOTO, T., CHUN, M., NISHIMOTO, I., LODISH, H. F. & LISANTI, M. P. 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 131-5.
- SEETHARAM, D., MINEO, C., GORMLEY, A. K., GIBSON, L. L., VONGPATANASIN, W., CHAMBLISS, K. L., HAHNER, L. D., CUMMINGS, M. L., KITCHENS, R. L., MARCEL, Y. L., RADER, D. J. & SHAUL, P. W. 2006. High-Density Lipoprotein Promotes Endothelial Cell Migration and Reendothelialization via Scavenger Receptor-B Type I. *Circulation Research*, 98, 63-72.
- SHAUL, P. W. & ANDERSON, R. G. W. 1998. Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 275, L843-L851.
- SHEN, W. J., AZHAR, S. & KRAEMER, F. B. 2018. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol*, 80, 95-116.

Literaturverzeichnis

- SPIEKER, L. E., SUDANO, I., HÜRLIMANN, D., LERCH, P. G., LANG, M. G., BINGGELI, C., CORTI, R., RUSCHITZKA, F., LÜSCHER, T. F. & NOLL, G. 2002. High-Density Lipoprotein Restores Endothelial Function in Hypercholesterolemic Men. *Circulation*, 105, 1399-1402.
- SUCHARSKI, H. C. & KOENIG, S. N. 2022. Mechanisms of Lipoproteins and Reverse Cholesterol Transport in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *In: PARINANDI, N. L. & HUND, T. J. (eds.) Cardiovascular Signaling in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing.
- TANCEVSKI, I., WEHINGER, A., SCHGOER, W., ELLER, P., CUZZOCREA, S., FOEGER, B., PATSCH, J. R. & RITSCH, A. 2006. Aspirin regulates expression and function of scavenger receptor-BI in macrophages: studies in primary human macrophages and in mice. *Faseb j*, 20, 1328-35.
- TARDIF, J.-C., GRÉGOIRE, J., L'ALLIER, P. L., IBRAHIM, R., LESPÉRANCE, J., HEINONEN, T. M., KOUZ, S., BERRY, C., BASSER, R., LAVOIE, M.-A., GUERTIN, M.-C., RODÉS-CABAU, J., ATHEROSCLEROSIS-SAFETY, E. O. R. O. & EFFICACY INVESTIGATORS, F. T. 2007. Effects of Reconstituted High-Density Lipoprotein Infusions on Coronary Atherosclerosis A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 297, 1675-1682.
- TAUBERT, D., BERKELS, R., GROSSER, N., SCHRÖDER, H., GRÜNDEMANN, D. & SCHÖMIG, E. 2004. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. *British Journal of Pharmacology*, 143.
- TRABER, M. G. 2007. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr*, 27, 347-62.
- TRIGATTI, B., RIGOTTI, A. & KRIEGER, M. 2000. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 11, 123-131.
- TSAO, C. W., ADAY, A. W., ALMARZOOQ, Z. I., ANDERSON, C. A. M., ARORA, P., AVERY, C. L., BAKER-SMITH, C. M., BEATON, A. Z., BOEHME, A. K., BUXTON, A. E., COMMODORE-MENSAH, Y., ELKIND, M. S. V., EVENSON, K. R., EZENLIAM, C., FUGAR, S., GENEROSO, G., HEARD, D. G., HIREMATH, S., HO, J. E., KALANI, R., KAZI, D. S., KO, D., LEVINE, D. A., LIU, J., MA, J., MAGNANI, J. W., MICHOS, E. D., MUSSOLINO, M. E., NAVANEETHAN, S. D., PARIKH, N. I., POUDEL, R., REZK-HANNA, M., ROTH, G. A., SHAH, N. S., ST-ONGE, M.-P.,

Literaturverzeichnis

- THACKER, E. L., VIRANI, S. S., VOEKS, J. H., WANG, N.-Y., WONG, N. D., WONG, S. S., YAFFE, K., MARTIN, S. S., EPIDEMIOLOGY, O. B. O. T. A. H. A. C. O., COMMITTEE, P. S. & SUBCOMMITTEE, S. S. 2023. Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 147, e93-e621.
- ÜLKER, S., MCKEOWN, P. P. & BAYRAKTUTAN, U. 2003. Vitamins Reverse Endothelial Dysfunction Through Regulation of eNOS and NAD(P)H Oxidase Activities. *Hypertension*, 41, 534-539.
- VAN ECK, M., TWISK, J., HOEKSTRA, M., VAN RIJ, B. T., VAN DER LANS, C. A. C., BOS, I. S. T., KRUIJT, J. K., KUIPERS, F. & VAN BERKEL, T. J. C. 2003. Differential Effects of Scavenger Receptor BI Deficiency on Lipid Metabolism in Cells of the Arterial Wall and in the Liver *. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 23699-23705.
- VON BIRGELEN, C., HARTMANN, M., MINTZ, G. S., BAUMGART, D., SCHMERMUND, A. & ERBEL, R. 2003. Relation between Progression and Regression of Atherosclerotic Left Main Coronary Artery Disease and Serum Cholesterol Levels as Assessed with Serial Long-Term (≥ 12 Months) Follow-Up Intravascular Ultrasound. *Circulation*, 108, 2757-2762.
- WEBB, T. R., ERDMANN, J., STIRRUPS, K. E., STITZIEL, N. O., MASCA, N. G. D., JANSEN, H., KANONI, S., NELSON, C. P., FERRARIO, P. G., KÖNIG, I. R., EICHER, J. D., JOHNSON, A. D., HAMBY, S. E., BETSHOLTZ, C., RUUSALEPP, A., FRANZÉN, O., SCHADT, E. E., BJÖRKEGREN, J. L. M., WEEKE, P. E., AUER, P. L., SCHICK, U. M., LU, Y., ZHANG, H., DUBE, M.-P., GOEL, A., FARRALL, M., PELOSO, G. M., WON, H.-H., DO, R., VAN IPEREN, E., KRUPPA, J., MAHAJAN, A., SCOTT, R. A., WILLENBORG, C., BRAUND, P. S., VAN CAPELLEVEEN, J. C., DONEY, A. S. F., DONNELLY, L. A., ASSELTA, R., MERLINI, P. A., DUGA, S., MARZILIANO, N., DENNY, J. C., SHAFFER, C., ELMOKHTARI, N. E., FRANKE, A., HEILMANN, S., HENGSTENBERG, C., HOFFMANN, P., HOLMEN, O. L., HVEEM, K., JANSSON, J.-H., JÖCKEL, K.-H., KESSLER, T., KRIEBEL, J., LAUGWITZ, K. L., MAROULI, E., MARTINELLI, N., MCCARTHY, M. I., VAN ZUYDAM, N. R., MEISINGER, C., ESKO, T., MIHAILOV, E., ESCHER, S. A., ALVER, M., MOEBUS, S., MORRIS, A. D., VIRTAMO, J., NIKPAY, M., OLIVIERI, O., PROVOST, S., ALQARAWI, A., ROBERTSON, N. R., AKINSANSYA, K. O., REILLY, D. F., VOGT, T. F., YIN, W., ASSELBERGS, F. W.,

Literaturverzeichnis

- KOOPERBERG, C., JACKSON, R. D., STAHL, E., MÜLLER-NURASYID, M., STRAUCH, K., VARGA, T. V., WALDENBERGER, M., ZENG, L., CHOWDHURY, R., SALOMAA, V., FORD, I., JUKEMA, J. W., AMOUYEL, P., KONTTO, J., NORDESTGAARD, B. G., FERRIÈRES, J., SALEHEEN, D., SATTAR, N., SURENDRAN, P., WAGNER, A., YOUNG, R., HOWSON, J. M. M., et al. 2017. Systematic Evaluation of Pleiotropy Identifies 6 Further Loci Associated With Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 69, 823-836.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2021. *Cardiovascular diseases (CVDs)* [Online]. Available: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [Accessed Sep 27 2024].
- YU, L., DAI, Y. & MINEO, C. 2021. Novel Functions of Endothelial Scavenger Receptor Class B Type I. *Current Atherosclerosis Reports*, 23, 6.
- YUHANNA, I. S., ZHU, Y., COX, B. E., HAHNER, L. D., OSBORNE-LAWRENCE, S., LU, P., MARCEL, Y. L., ANDERSON, R. G. W., MENDELSON, M. E., HOBBS, H. H. & SHAUL, P. W. 2001. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nature Medicine*, 7, 853-857.
- ZARKASI, K. A., ABDULLAH, N., ABDUL MURAD, N. A., AHMAD, N. & JAMAL, R. 2022. Genetic Factors for Coronary Heart Disease and Their Mechanisms: A Meta-Analysis and Comprehensive Review of Common Variants from Genome-Wide Association Studies. *Diagnostics (Basel)*, 12.
- ZEIHER, A. M., SCHÄCHLINGER, V., HOHNLOSER, S. H., SAURBIER, B. & JUST, H. 1994. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation*, 89, 2525-2532.
- ZENG, T. T., TANG, D. J., YE, Y. X., SU, J. & JIANG, H. 2017. Influence of SCARB1 gene SNPs on serum lipid levels and susceptibility to coronary heart disease and cerebral infarction in a Chinese population. *Gene*, 626, 319-325.
- ZHANG, W., YANCEY, P. G., SU, Y. R., BABAEV, V. R., ZHANG, Y., FAZIO, S. & LINTON, M. F. 2003. Inactivation of Macrophage Scavenger Receptor Class B Type I Promotes Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*, 108, 2258-2263.

Literaturverzeichnis

- ZHANG, Y., DA SILVA, J. R., REILLY, M., BILLHEIMER, J. T., ROTHBLAT, G. H. & RADER, D. J. 2005. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 2870-2874.
- ZHANG, Y., LIAO, B., LI, M., CHENG, M., FU, Y., LIU, Q., CHEN, Q., LIU, H., FANG, Y., ZHANG, G. & YU, F. 2016. Shear stress regulates endothelial cell function through SRB1-eNOS signaling pathway. *Cardiovascular Therapeutics*, 34, 308-313.
- ZHU, W., SADDAR, S., SEETHARAM, D., CHAMBLISS, K. L., LONGORIA, C., SILVER, D. L., YUHANNA, I. S., SHAUL, P. W. & MINEO, C. 2008. The Scavenger Receptor Class B Type I Adaptor Protein PDZK1 Maintains Endothelial Monolayer Integrity. *Circulation Research*, 102, 480-487.
- ZIPES, D. P., LIBBY, P., BONOW, R. O., MANN, D. L., TOMASELLI, G. F. & BRAUNWALD, E. 2015. *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine*, Philadelphia, Elsevier.

6 Anhang

6.1 Standard Operating Procedures

Im Folgenden sind die SOPs des Labors der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgeführt.

Enzymatisches Passagieren mit Trypsin-EDTA

PBS 37°C

(Trypsin-EDTA) - 1:10 mit PBS verdünnt → 3 - 4 ml je T25

5 - 7 ml je T75

10 ml je T175

Medium abgießen oder absaugen

Zellen mit PBS waschen

Trypsin-EDTA-Lösung 3-5 Minuten/37°C

Zufügen der gleichen Menge Medium

Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen

↻ 1300 rpm = 300g /RT für 5 Minuten

Überstand absaugen

Pellet mit 1ml oder mehr je nach Pelletgröße Medium gut resuspendieren

Zellzahl bestimmen und in Zellkulturflasche mit entsprechender

Wachstumsfläche ausplattieren

Zellzählung mit Trypanblau

10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblaulösung gut mischen = 1:2 Verdünnung

In einer Neubauer-Zählkammer die 4 äußeren Großquadrate meanderförmig auszählen und den Mittelwert bilden.

Zellzahl x 2 x 10⁴ = Zellkonzentration / mL

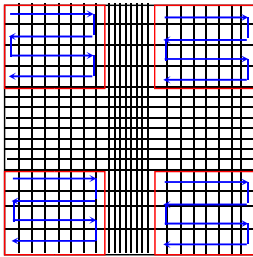
Zellzahl / mL x Suspensionsvolumen = Gesamtzellzahl

Vitale Zellen sind ungefärbt, tote Zellen färben sich blau an, da sich durch Membranläsionen die Proteine der Zellen anfärben.

Berechnung des prozentualen Anteils vitaler Zellen:

Anhang

Anzahl ungefärbte Zellen / (Anzahl gefärbte + ungefärbte Zellen) x 100%



Kryokonservierung

Medium

Einfriermedium = FCS + 10 % DMSO (4°C)

- Medium absaugen
- PBS waschen
- Trypsin-EDTA 3 - 5 Minuten / 37°C
- Zufügen der gleichen Menge Medium
- Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- 1300 rpm 300g / RT für 5 Minuten
- Überstand absaugen
- Pellet mit 1ml (10 ml) Medium resuspendieren
- Zellzahl bestimmen

Max. 2×10^6 Zellen in 1000 μ L FCS/DMSO aufnehmen und in ein Kryoröhrchen überführen

Zellen **sofort** in einem vorgekühlten Cryo-Container bei -80°C einfrieren

Sollen die Zellen für längere Zeit konserviert werden, müssen sie in flüssigen Stickstoff überführt werden (frühestens nach ca. 24 Std., spätestens nach 14 Tagen)

Auftauen von Zellen

- Medium auf 37°C vorgewärmt
- Aussaat Bsp. ca. 5000 Zellen / cm^2
- 10 - 50 ml Medium in einem Röhrchen vorlegen
- Zellen im Wasserbad antauen lassen
- Zellsuspension **sofort** in das 50 ml Röhrchen überführen und resuspendieren
- 1300 rpm 300g / RT für 5 Minuten
- Überstand absaugen
- Pellet mit 1ml Medium resuspendieren

Anhang

- Evtl. Zellzahl bestimmen
- Medium in entsprechender Kulturflasche / Wellplatte vorlegen / Zellen ausplattieren

MTT-Assay

Der Ansatz erfolgt in 96 Mikrotiterplatten Flachboden (durchsichtig)

Stammlösung (5 mg/ml MTT aufgelöst in PBS bei 4°C, MTT ist lichtempfindlich, aufgelöst ist es 2 Wochen haltbar, < 0°C ist es 6 Monate haltbar)

MTT-Stammlösung 1:10 im Zellkulturmedium verdünnen = Gebrauchslösung

- Medium absaugen
- 100µl der MTT- Gebrauchslösung auf die Zellen pipettieren und mit 2 BlankWells ebenso verfahren
- 2h Inkubation im Brutschrank
- Überstand absaugen
- 200µl DMSO in jedes Well (auch in die Blank-Wells)
- 10 min Inkubation im Brutschrank
- Im Victor messen, Absorbance bei 540nm (570nm)

Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

RIPA+Complete

1 Tablette Complete, Mini in 10 ml RIPA lösen (bei sehr starker Proteaseaktivität 1 Tab./7 ml RIPA). Aliquots a 1 ml machen und diese bei -20°C lagern (12 Wochen!!)

Durchführung: Proteinisolation

Zellen:

Zellpellet in RIPA+Complete kann für längere Zeit bei -80°C aufbewahrt werden. Zur Zell-Lyse stark vortexen, anschließend Probe sonifizieren (2 x 30 sec) (10 Stöße).

Gewebe:

Gewebestück in RIPA+Complete homogenisieren, anschließend mehrmals sonifizieren, Zelltrümmel für 10 min bei 10 000 rpm und 4°C abzentrifugieren und Überstand in ein neues Eppi sammeln.

Herstellung des BSA-Standards

Jede Ampulle enthält 1 ml BSA-Standard in einer Konzentration von 2 mg/ml.

Anhang

Sensitivität beträgt 125-2000 µg/ml = 0,125-2 µg/µl (zum Vergleich: der Dc Protein Assay Kit von BioRad hat eine Sensitivität von 0,2-1,5 µg/µl).

Standard in saubere Eppis ansetzen und Reste bei -20°C aufbewahren.

Kennzeichnung:

In was ist Standard angesetzt?

Wer hat angesetzt?

Wann wurde angesetzt?

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA-Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	H	100 von G	400
0 = BLANK	I	0	400

Herstellung des BCA Working Reagent (WR)

Volumen des WR nach folgender Formel bestimmen:

$(\# \text{ standard} + \# \text{ Proben}) \times (\# \text{ Anzahl Replikate}) \times (\text{Volumen WR pro Probe} = 200 \mu\text{l}) =$
Volumen WR

WR ansetzen: 50 Teile Reagent A + 1 Teil Reagent B (50:1, Reagent A:B)

Microplate Assay Protocol

Proben werden 1:6 mit PBS verdünnt, dicke Zellpellets werden / können auch bis 1:20 verdünnt. (4µl Probe und 20µl PBS =1:6) mixen!!!

- Je 10 µl Standard bzw. Probe in eine 96well Platte pipettieren (Duplets!)
- 200 µl WR zusetzen und Platte auf dem Schüttler für 30 sec platzieren

Anhang

- Platte mit einem Deckel / Folie schließen und 30 min bei 37°C (Brutschrank) inkubieren
- Platte auf RT abkühlen
- Absorption bei 562 nm (Inkubationszeit kann bis auf 2 h verlängert werden). Die Absorption kann generell bei einer Wellenlänge von 540-590 nm gemessen werden.

Western-Blot-Semi-Dry-Blotting

Vor Gebrauch: Laemmli-Puffer mit 20 % Mercaptoethanol zusetzen!! (80 µl

Laemmli + 20 µl Mercapto)

Proben mit Laemmli-Puffer (1:4 zur Probe) versetzen und 5 min bei 95 °C erhitzen.

Proben sofort auf Eis und das Gel beladen, Proteinleiter nicht vergessen!!!

Bei Verwendung eines 10 er Kamm

Maximales Probenvolumen bei 0,75 mm Gelen: ~25 µl

Maximales Probenvolumen bei 1,0 mm Gelen: ~35 µl

Maximales Probenvolumen bei 1,5 mm Gelen: ~45 µl

Bei Verwendung eines 15 er Kamm

Maximales Probenvolumen bei 1,0 mm Gelen: bis 16 µl

SDS-PAGE

Kammer mit Laufpuffer auffüllen, mit 60 V starten und sobald die Proteine durch das Sammelgel gewandert sind mit 110-130 V fortsetzen, 20 min.

Dauer: 1-2 Stunden. Stoppen, wenn der Marker anfängt auszulaufen.

Mini-Protean TGX Stain-Free Gels werden nach dem Gellauf im ChemiDoc MP detektiert, das ist notwendig für die Normalisierung der Proben!!!!

Transfer

Nach dem Gellauf erfolgt die Aufnahme des Gels mit dem ChemiDoc MP

Kurz die Gele in Blotting-Puffer äquilibrieren lassen.

Blotting-Papier und Membran werden vor dem Aufbau in Blotting-Puffer befeuchtet. Luftblasen entfernen!

Anhang

Transfer wie aufgelistet aufbauen:

- Kathode (roter Deckel)
- 1 x 2,5 mm Blotting-Papier
- Gel
- Nitrocellulose-Membran
- 1 x 2,5 mm Blotting-Papier
- Anode (unten)

Transferzeit: hängt ab vom Wassergehalt des Gels, Bsp. 12%iges Gel

15 min, andere Gele für 10-30 min blotten!

Optional (früher): Anschließend Ponceau S-Färbung der Membran (2-3 min). Membran mit Wasser und anschließend mit TBS / 0,1 % Tween20 entfärben.

Immunmarkierung

Je nach Antikörper und Herstellerangaben sind Puffer und Inkubationszeiten unterschiedlich. Die tatsächliche Vorgehensweise kann daher von diesem Protokoll abweichen (siehe AK-data sheet)

- Blocken der Membran für 1 Std. bei RT mit TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) + 5 % Milchpulver oder 5 % BSA (oder ON bei 4°C)
- Inkubation mit dem 1. AK in TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) + BSA oder Milchpulver (1-5 %) für 2 Std. bei RT oder ON bei 4°C
- 3 x 5 min waschen mit TBS/T (=Waschpuffer)
- Inkubation mit dem 2. AK in Waschpuffer für 1 Std. bei RT (DUNKEL)
- 3 x 5 min waschen mit Waschpuffer (DUNKEL), die Blots werden in TBS aufbewahrt.
Detektion mit ChemiDoc MP

Immunhistochemie-Färbung

- Adhärente Zellen CTS / MD 3×10^4 auf Glasplättchen über Nacht inkubieren
- Waschen mit PBS (RT)
- Fixieren mit 4% PFA (eingefroren) 10 min bei RT
- 2x waschen mit PBS
- 10 min permeabilisieren mit 0,2% TritonX in PBS
- Blocken mit 3% BSA +0,1% Triton X
- Zugabe von eNOS-/Caveolin-AK Verdünnung 1:1000 in PBS+ 0,1% Triton
- Inkubation über Nacht

Anhang

- 3x mit PBS waschen
- 2. AK Alexa 488/ Alexa 594 in PBS + 0,1% TritonX
- Inkubation bei RT
- 3x mit PBS waschen
- 5 min DAPI (1:1000 in PBS)
- 3x waschen mit PBS
- 4X waschen mit A. dest.
- Eindecken mit DAKO