

2. I. Zusammenfassung

Es besteht ein inverser Zusammenhang zwischen der HDL-Konzentration im Blut und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen. HDL haben verschiedene potentiell antiatherogene Funktionen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden: die über zelluläre Signaltransduktionswege vermittelte Induktion von Cholesterinefflux und die Beeinflussung des Zellwachstums. Ziel der Arbeit war es, die durch HDL induzierten Signaltransduktionswege diesen beiden Funktionen durch *in vitro* Versuche an kultivierten menschlichen Fibroblasten zuzuordnen.

Zellwachstum wurde mit einem fluorimetrischen Test mittels Inkorporation von Bromdeoxyuridin in die DNA der Zellen gemessen. Zur Untersuchung des Cholesterineffluxes wurde die im Zellüberstand akkumulierende Cholesterinmasse mit Hilfe einer ultrasensitiven gaschromatographischen Methode ermittelt. HDL induzierten in humanen Hautfibroblasten konzentrationsabhängig Netto-Cholesterin-Massenefflux und Zellwachstum. Der Cholesterinefflux war im HDL-Konzentrationsbereich bis 100 µg/ml bis zu 6 mal effektiver als der Cholesterinefflux nur in Anwesenheit eines unspezifischen Cholesterinakzeptors (1000 µg/ml Albumin). Die durch HDL induzierte DNA-Synthese erreichte etwa 80 % des durch Vollmedium induzierten Wertes.

Mit Hilfe verschiedener Inhibitoren wurde gezeigt, daß der HDL-induzierte Cholesterin-Massenefflux über eine G-Protein-abhängige Aktivierung der PC-spezifischen Phospholipasen C und D induziert wird. Die bei der PC-Hydrolyse entstehenden Second Messenger Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidsäure (PA) waren an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux beteiligt: DAG über eine Aktivierung von PKC und die nachfolgende Phosphorylierung zellulärer Proteine, die unter der Kontrolle Serin- / Threonin-spezifischer Phosphatasen stehen; PA über die Umwandlung in DAG und möglicherweise auch direkt über nicht identifizierte Mechanismen. Für die bei der PC-Hydrolyse gebildeten wasserlöslichen Produkte Cholin und Phosphorylcholin konnte keine Beteiligung an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux gezeigt werden. Die mit der PC-Hydrolyse assoziierte Cholesterinefflux-Signalkaskade konnte durch das Hauptstrukturprotein der HDL, Apo-A-I, induziert werden und war mit der Phosphorylierung von Proteinen mit den molekularen Massen von 14, 65 und 71 kDa assoziiert.

Die durch HDL ebenfalls induzierte Aktivierung von PI-PLC war nicht an der Induktion von Cholesterin-Massenefflux beteiligt. Die Aktivierung von PI-PLC war – zusammen mit der Aktivierung von PC-PLC – an der Induktion der mitogenen Wirkung der HDL beteiligt. Der bei der PI-Hydrolyse gebildete Second Messenger Inositoltriphosphat (IP₃) induzierte die

Mobilisierung zellulären Calciums. Durch Ca^{2+} aktivierte Effektoren sind Phospholipase A_2 (PLA_2) und MAP-Kinase. Für das bei der PC-Hydrolyse mittels PC-PLC entstehende Phosphorylcholin konnte ebenfalls eine Beteiligung an der Induktion von Zellwachstum gezeigt werden. Die für die mitogene Wirkung der HDL phosphorylierten Proteine werden sowohl durch Serin- / Threonin-spezifische Phosphatasen als auch durch Tyrosin-spezifische Phosphatasen reguliert; die Phosphorylierung dieser Proteine mit Molekulargewichten zwischen 14 und 81 kDa wurde nicht durch Apo-A-I induziert. Mit HDL assoziierte Lysosulphatide konnten als mögliche Induktoren der mitogenen Wirkung aufgezeigt werden. Der durch HDL induzierte Cholesterin-Massenefflux und das durch HDL induzierte Wachstumsverhalten werden somit in kultivierten Fibroblasten durch unterschiedliche Liganden und Signaltransduktionswege getriggert, wobei die PC-PLC in beide Signalwege, die PI-PLC ausschließlich in den mitogenen Signalweg involviert ist. Die Regulation (und *in vitro* Verstärkung) des Cholesterin-Masseneffluxes durch Phosphatase-Inhibitoren zeigt einen neuen möglichen Ansatz einer antiateriosklerotischen Therapie auf.

2. II. Summary

Epidemiological studies revealed a strong inverse correlation between high density lipoprotein (HDL) cholesterol plasma levels and the incidence of cardiovascular disease. This finding is usually explained by the ability of HDL to remove cholesterol from peripheral cells for delivery in the liver. An additional proposed function of HDL which may influence atherogenesis is the modulation of cell growth.

In this study, the influence of HDL-induced cell signalling on cholesterol excretion and mitogenesis was examined. DNA synthesis was assessed by measuring bromdeoxyuridine (BrdU) incorporation into DNA using a commercially available ELISA. Cholesterol efflux was measured by gas-liquid-chromatography. In cholesterol-loaded human skin fibroblasts, low concentrations of HDL (< 100 µg/ml) induced cholesterol mass efflux in a non-linear concentration-dependent manner. A strong proliferative effect of HDL (upto 80 % of the effect induced by foetal calf serum) reached saturation at concentrations of 500 – 750 µg/ml.

By use of different inhibitors it was shown that HDL-induced cholesterol mass efflux in cultivated human skin fibroblasts occurs via a G-protein-dependent activation of phosphatidylcholine (PC)-specific phospholipases C and D. The produced lipid second messengers diacylglycerol (DAG) and phosphatidic acid (PA) were found to be involved in this process. DAG (via activation of protein kinase C) induced the phosphorylation of proteins with apparent molecular masses of 14 to 81 kDa. These phosphoproteins were regulated by serine- /threonine-, but not by tyrosine-specific phosphatases. The water-soluble products of PC-hydrolysis (cholin and phosphorylcholin) were not directly involved in cholesterol mass efflux *in vitro*. The HDL-induced effects on PC-hydrolysis and cholesterol efflux could be mimicked by apolipoprotein A-I (apo-A-I), the main protein constituent of HDL. Apo-A-I induced the phosphorylation of proteins with apparent molecular weights of 14, 65 and 71 kDa.

HDL induced activation of phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) was not involved in the activation of cholesterol efflux in cholesterol loaded cells. PI-PLC activation, however, was involved in the mitogenic effect of HDL. The second messenger inositoltrisphosphate (IP₃) initiated the release of cellular Ca²⁺. Ca²⁺-dependent downstream effectors activated by HDL are phospholipase A₂ (PLA₂) and MAP-kinase. The HDL-dependent mitogenic response was regulated by both serine- /threonine- and tyrosine-specific phosphatases. Lysosulphatides were found at least partly responsible for the described mitogenic effects.

In conclusion, HDL-induced cholesterol efflux and mitogenesis are induced by different ligands and are regulated by different cell signalling pathways in cultivated human skin fibroblasts. The cell signalling molecules involved in these pathways (kinases, phosphatases and phosphoproteins) might be potential targets for an antiatherogenic therapy.