



# Untersuchungen zur Opsonin-Aktivität von CRP, SAP, A $\beta$ <sub>42</sub> und SAA und deren Rolle bei der Schaumzellbildung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät IV – Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Berta Schulz**

aus Concepción, Chile

August 2006

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.08.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. G. Schmitz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin am Klinikum der Universität Regensburg. Die fakultätsinterne Betreuung übernahm Prof. Dr. A. Buschauer, Institut für Pharmazeutische und medizinische Chemie II.

Prüfungsausschuß:

Vorsitz: Prof. Dr. Sigurd Elz

1. Gutachter: Prof. Dr. Armin Buschauer

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Schmitz

3. Prüfer: Prof. Dr. Jörg Heilmann

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Allgemeine Charakteristika der Atherosklerose.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Stoffwechsel der Lipoproteine.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Struktur und Klassifizierung.....	2
1.2.2 Stoffwechsel der Lipoproteine.....	3
1.2.2.1 Intestinale Lipidresorption und exogener Stoffwechsel.....	4
1.2.2.2 Transport der Lipide.....	5
1.2.2.3 Synthese ApoB-haltiger Lipoproteine in der Leber und endogener Stoffwechsel.....	5
<b>1.3 Zellulärer Cholesterinstoffwechsel.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Sphingolipidstoffwechsel und seine biologische Bedeutung.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Sphingolipid-Interaktion mit Glycerolipidsignalwegen.....</b>	<b>16</b>
<b>1.6 Monozyten, Makrophagen, Lipide und Inflammation.....</b>	<b>17</b>
1.6.1 Makrophagen und modifizierte Lipide.....	17
1.6.2 Makrophagen und Opsonine.....	20
1.6.2.1 C-reaktives Protein.....	20
1.6.2.2 Serum Amyloid P Protein (SAP).....	22
1.6.2.3 $\beta$ -Amyloid(1-42) Peptid.....	23
1.6.2.4 Serum Amyloid A (SAA).....	25
<b>2. Ziele dieser Doktorarbeit.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>

<b>3.1 Medium, Lösungen und Chemikalien.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Bestimmung der Bindung zwischen Opsoninen und Lipoproteinen</b>	
<b>mittels ELISA.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Biotin-Markierung des Antikörpers anti-CRP.....	29
3.2.2 Bindungsbestimmung durch ELISA.....	29
<b>3.3 Elutriation der Monozyten.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Zellkultur.....</b>	<b>32</b>
3.4.1 Kultur von humanen Monozyten.....	32
3.4.2 Kultur von humanen Makrophagen.....	32
<b>3.5 Präparative Lipoproteintrennung.....</b>	<b>33</b>
3.5.1 Sequenzielle Ultrazentrifugation.....	33
3.5.2 Dialyse der Lipoproteinfraktionen.....	34
3.5.3 Analytik der Lipoproteinfraktionen.....	34
<b>3.6 Modifizierungen des LDL.....</b>	<b>35</b>
3.6.1 E-LDL Präparation.....	35
3.6.2 Ox-LDL Präparation.....	35
<b>3.7 Opsonisierung der Lipoproteine.....</b>	<b>35</b>
<b>3.8 Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Lipiden.....</b>	<b>36</b>
3.8.1 Proteinbestimmung.....	36
3.8.2 Dünnschichtchromatographie.....	36
3.8.3 Tandem Massespektrometrie.....	37
<b>3.9 Bestimmung der Oberflächen-Expression von Cer und</b>	
<b>Cer-Metaboliten auf Makrophagen.....</b>	<b>38</b>
<b>3.10 Durchflusszytometrische Analyse der gefärbten Zellen.....</b>	<b>39</b>

<b>3.11 Markierung des nativen und modifizierten LDL</b> .....	<b>40</b>
3.11.1 Markierung der Lipoproteine mit Dil.....	40
3.11.2 Analyse der Oberflächenbindung von Dil-gefärbten LDL und modifizierten LDL auf Monozyten und Makrophagen.....	40
3.11.3 Identifikation von Oberflächenrezeptoren für native und opsonisierte Lipoproteine auf Monozyten und Makrophagen.....	40
<b>3.12 Zelluläre Färbung und konfokale Mikroskopie</b> .....	<b>41</b>
<b>3.13 Statistik</b> .....	<b>42</b>
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1 Charakterisierung der Interaktion von Lipoproteinen mit Proteinen des     Immunsystems</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2 Analyse der Modifikation des zellulären Lipidstoffwechsels durch     opsonisierte Lipoproteine</b> .....	<b>48</b>
4.2.1 Analyse der zellulären Akkumulation von Cholesterin, Triglyzeriden und Cholesterinester in frisch isolierten Monozyten.....	48
4.2.2 Analyse der zellulären Akkumulation von Cholesterin, Triglyzeriden und Cholesterinester in Makrophagen.....	52
4.2.3 Analyse der zellulären Akkumulation von UC und EC in Monozyten und Makrophagen bei E-LDL in Abhängigkeit von der A $\beta$ <sub>42</sub> Konzentration.....	58
4.2.4 Analyse der zellulären Akkumulation von Sphingolipiden und Phospholipiden.....	60
4.2.5 Analyse der Oberflächen-Expression von Ceramiden und Metaboliten des SPM-Cer Stoffwechsels.....	63
4.2.6 Mikroskopische Beobachtung der Lipidakkumulation in Makrophagen.....	65
<b>4.3 Untersuchung der Rezeptor-Wechselwirkungen nach Behandlung mit den     opsonierten Lipoproteinen</b> .....	<b>66</b>
4.3.1 Analyse der zellulären Bindung von opsonierten Lipoproteinen.....	66
4.3.2 Analyse der Oberflächen-Expression von Rezeptoren.....	67

4.3.2.1 Expression von Fc $\gamma$ Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) und CD36 auf Makrophagen.....	67
4.3.2.2 CRP Einfluss auf die Expression von Fc $\gamma$ R und CD36 auf Makrophagen.....	68
4.3.2.3 SAP Einfluss auf die Expression von Fc $\gamma$ R und CD36 auf Makrophagen.....	69
4.3.2.4 Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Monozyten.....	70
4.3.2.5 A $\beta$ <sub>42</sub> Einfluss auf die Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Monozyten.....	71
4.3.2.6 Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Makrophagen.....	72
4.3.2.7 A $\beta$ <sub>42</sub> Einfluss auf die Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Makrophagen.....	73
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 Charakterisierung der Bindung von Lipoproteinen an Proteine des Immunsystems.....</b>	<b>75</b>
<b>5.2 Analyse der Modifikation des zellulären Lipidstoffwechsels durch opsonisierte Lipoproteine.....</b>	<b>77</b>
5.2.1 Charakterisierung der zellulären Akkumulation von UC, TG und EC in frisch isolierten Monozyten.....	77
5.2.2 Charakterisierung der zellulären Akkumulation von UC, TG und EC in Makrophagen.....	79
5.2.3 Bestimmung der zellulären Akkumulation von Sphingolipiden und Phospholipiden.....	80
5.2.4 Analyse der Oberflächen-Expression von Ceramiden und Metaboliten des SPM-Cer Stoffwechsels.....	81
<b>5.3 Untersuchung der Rezeptor-Interaktionen der opsonierten Lipoproteine.....</b>	<b>82</b>
5.3.1 Bestimmung der Oberflächenbindung von opsonierten Lipoproteinen.....	82

5.3.2 Analyse der Oberflächen-Expression von Rezeptoren.....	83
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>88</b>

## Abkürzungen

ABCA1	ATP binding cassette transporter A1
A $\beta$ <sub>42</sub>	$\beta$ -Amyloid(1-42) Peptide
A $\beta$ <sub>40</sub>	$\beta$ -Amyloid(1-40) Peptide
ACEH	Acid-Cholesterinester-Hydrolase
ACAT	Acyl-Coenzym A:Cholesterin-Acyltransferase
AD	Alzheimer Krankheit
Ak	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
BSA	Rinderserum-Albumin
EC	Cholesterinester
Cer	Ceramide
CETP	Cholesterinester Transferprotein
CRP	C-Reaktives Protein
DC	Dünnschichtchromatographie
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanineperchlorate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-LDL	Enzymatisch degradiertes LDL
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc $\gamma$ R	Fc $\gamma$ Rezeptor
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FPRL1	Formyl Peptid Rezeptor-like 1
Gal	Galactosyl
Gb <sub>3</sub> Cer	Globotriaosylceramide
Glc	Glucosyl
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSL	Glycosphingolipid
HDL	High Density Lipoproteine
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
IDL	Intermediate Density Lipoproteine
Ig	Immunoglobulin

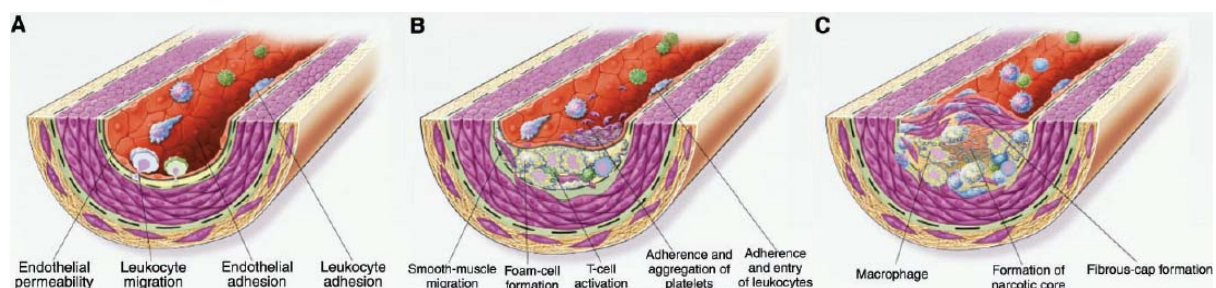
IL	Interleukin
IS	Internal Standard
LacCer	Lactosylceramide
LCAT	Lecitin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LP	Lipoproteine
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
Ox-LDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidylethanolamine
PE	Phycoerythrin
PLTP	Phospholipid Transferprotein
PM	Plasmamembran
RCT	Reverse Cholesteroltransport
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
SA-POD	Avidin-Peroxidase
SPM	Sphingomyelin
SPMase	Sphingomyelinase
SR	Scavenger receptor
CLA1	Scavenger receptor class B1
SREBP	Sterol responsive element binding protein
TG	Triglyceride
UC	Cholesterolin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

# 1. Einleitung

## 1.1 Allgemeine Charakteristika der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen. Atherosklerotische Läsionen sind Ursache klinischer Erkrankungen wie koronarer Herzkrankheiten, Aneurysmen, arterieller Verschlusskrankheiten, insbesondere der unteren Extremitäten und zerebrovaskulärer Erkrankungen (Braunwald, 1997; Breslow, 1997).

Manche Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Diabetes, Hypertension, Inflammation, Rauchen und Altern wurden als wichtige Faktoren bei der Entwicklung und Progression der Atherosklerose erkannt (Ross, 1999). Ein charakteristisches Merkmal der Atherosklerose ist die intra- und extrazelluläre Lipideinlagerung in die Intima der Arterien, kombiniert mit einer Infiltration von Makrophagen und T-Zellen, die zur Formation atherosklerotischer Plaques führt. Bei der Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen erfolgt zunächst eine Erhöhung der Permeabilität der Endothelschicht und der LDL Lipideinlagerung (Abb. 1A). Durch die LDL Lipideinlagerungen können sich atherogenische LDL Modifizierungen bilden, die zu inflammatorischen Prozessen führen können („Response to Retention Hypothesis“). Danach migrieren Monozyten aus der Zirkulation und differenzieren zu Makrophagen, welche durch Aufnahme von Lipiden Schaumzellen bilden. Diese Schaumzellen, in Kombination mit aktivierten glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten führen zum finalen Stadium der atherosklerotischen Läsion mit Bildung eines nekrotischen Kerns (Abb. 1B, C).



**Abbildung 1:** Schema der Entwicklung einer Läsion der koronaren Atherosklerose (Ross, 1999).

## 1.2 Stoffwechsel der Lipoproteine

Lipoproteine spielen eine wichtige physiologische Rolle für den Transport von Lipiden im Blut und sind entscheidend an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt. Lipoproteine können in verschiedene Klassen und Subklassen mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt werden. Im folgenden Kapitel soll der Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel näher erläutert werden.

### 1.2.1 Struktur und Klassifizierung

Lipoproteine sind meist sphärische Partikel, bestehend aus verschiedenen Apolipoproteinen (Apo) und einem Lipidmonolayer (überwiegend Phospholipide und freies Cholesterin). Der Kern setzt sich aus Triglyzeriden und Cholesterinestern zusammen. Aufgrund der nach außen gerichteten polaren Gruppen der Apoproteine sind die Lipoproteine im Blut löslich.

Lipoproteine unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Zusammensetzung und ihren physikalischen Eigenschaften. Die Dichte der Lipoproteine korreliert invers zu ihrem Durchmesser und spiegelt den Anteil an „leichten“ Kernlipiden und „schweren“ Hüllproteinen wider. Basierend auf ihrer unterschiedlichen Dichte, Größe und Lipid- bzw. Proteinkomposition lassen sich verschiedene Subklassen der Lipoproteine definieren (Tabelle 1).

Mittels Ultrazentrifugation kann man Lipoproteine in fünf Fraktionen auftrennen. Die größten Partikel mit der geringsten Dichte sind die Chylomikronen, gefolgt von Very Low Density Lipoproteinen (VLDL), Intermediate Density Lipoproteinen (IDL), Low Density Lipoproteinen (LDL) und schließlich den High Density Lipoproteinen (HDL), die in zwei Subklassen HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> aufgetrennt werden können. Chylomikronen, VLDL und IDL zählen zu den triglyzeridreichen, LDL und HDL zu den triglyzeridarmen Lipoproteinen.

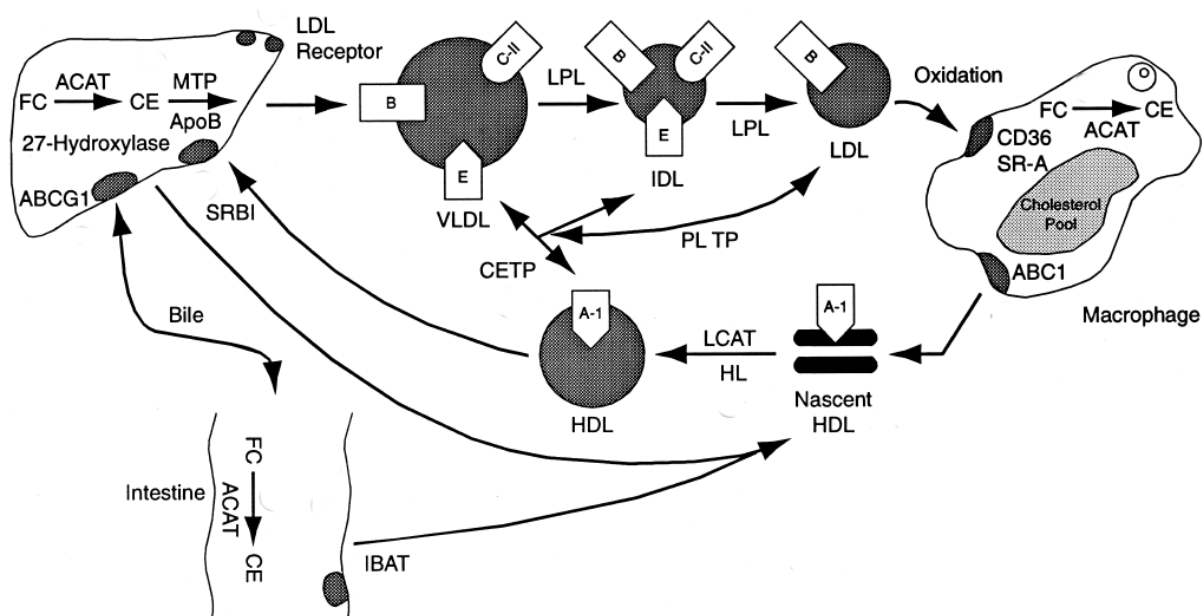
Alternativ zur Ultrazentrifugation kann eine weitere Subklassifizierung der Lipoproteine durch Elektrophorese entsprechend ihrer Ladung und Dichte erfolgen. Den einzelnen Lipoproteinklassen sind im Lipidstoffwechsel grundlegend verschiedene Funktionen zugeordnet, die in den nachfolgenden Kapiteln eingehender beschrieben werden.

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL <sub>2</sub>	HDL <sub>3</sub>
<b>Dichte [g/ml]</b>	< 0.93	0.93-1.006	1.006- 1.019	1.019- 1.063	1.063- 1.125	1.125- 1.210
<b>Durchmesser [nm]</b>	75-1200	30-80	25-35	18-25	9-12	5-9
<b>MG [10<sup>6</sup> Da]</b>	50-1000	10-80	5-10	2.3	0.36	0.175
<b>Elektrophoretische Mobilität</b>	keine	prä-β	prä-β	β	α	α
<b>Haupt- Apolipoproteine</b>	A, B-48, C, E	B-100, C, E	B-100, C, E	B-100	A, C	A, C

**Tabelle 1:** Physikalische Eigenschaften der humanen Lipoprotein-Klassen nach Havel und Kane (Havel and Kane, 1995).

## 1.2.2 Stoffwechsel der Lipoproteine

Der Stoffwechsel der ApoB-haltigen Lipoproteine gliedert sich in zwei metabolische Kaskaden (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Metabolismus der Lipoproteine (Davidson, 2001).

Die erste, der Stoffwechsel der Chylomikronen, ist für den Transport von Cholesterin und Triglyzeriden vom Darm ins Gewebe und in die Leber verantwortlich (exogener Stoffwechsel). Die zweite Kaskade, der Stoffwechsel der VLDL- und der LDL-Partikel, ist für die Versorgung der peripheren Gewebe mit Triglyzeriden zur Energiegewinnung und Cholesterin zum Aufbau von Membranen und zur Synthese von Hormonen verantwortlich (endogener Stoffwechsel).

### **1.2.2.1 Intestinale Lipidresorption und exogener Stoffwechsel**

Täglich werden Lipide mit der Nahrung konsumiert, die sich zu über 95 % aus langkettigen Triglyzeriden (TG), 3,3 % Phospholipiden (hauptsächlich Phosphatidylcholin) und 0,3 % Cholesterin zusammensetzen. Zusätzlich werden Phospholipide, Cholesterin und Gallensäuren aus der Gallenblase der Nahrung beigemischt und dienen der Solvatation der Nahrungslipide durch Formierung von Micellen.

Um die mit der Nahrung aufgenommenen TG zu resorbieren, werden sie unter der Einwirkung der Pankreaslipase im Duodenum in Fettsäuren, Mono- und Diacylglyzeride gespalten, die dann mit Gallensalzen, Phospholipiden und Cholesterin emulgiert werden. Die so gebildeten Micellen werden anschließend über passive Transportprozesse im Jejunum in die Enterozyten resorbiert. Am Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Enterozyten erfolgt die Resynthese zu TG und nach dem Transport der TG zum Golgi formieren diese zusammen mit Cholesterinestern und ApoB48 Chylomikronen, die in die Lymphe und den Blutkreislauf abgegeben werden (Ros, 2000).

Prinzipiell spielen sich bei der Resorption von Cholesterin und Cholesterinestern analoge Prozesse ab wie bei den TG. Nach der Emulgation von Cholesterin und Cholesterinestern mit Gallensalzen und Phospholipiden werden Cholesterinester durch Pankreasesterasen in Cholesterin und freie Fettsäuren hydrolysiert und im Jejunum resorbiert. Die Reveresterung von Cholesterin erfolgt in den Enterozyten durch das Enzym Acyl-Coenzym A:Cholesterinacyltransferase (ACAT). Schließlich werden die Cholesterinester ebenfalls in Form von Chylomikronen in die Lymphe und das Blut abgegeben (Ros, 2000).

### **1.2.2.2 Transport der Lipide**

Nach der Sekretion der Chylomikronen in den Blutkreislauf werden die TG durch die Lipoprotein Lipase (LPL) an der Oberfläche von Endothelzellen der Blutkapillaren rasch in freie Fettsäuren hydrolysiert und vor allem von Muskel- und Fettgewebe aufgenommen. Die dabei entstandenen Chylomikronen-Remnants erreichen die Leber, wo sie über Remnant-Rezeptoren wie dem LDL-Rezeptor in Hepatozyten internalisiert und abgebaut werden.

Somit erfüllen die nur 10-15 min im Blut verweilenden Chylomikronen die Aufgabe, Muskel- und Fettgewebe mit exogenen Triglyzeriden zu versorgen sowie das im Intestinum resorbierte Cholesterin zur Leber zu transportieren.

### **1.2.2.3 Synthese ApoB-haltiger Lipoproteine in der Leber, endogener Stoffwechsel und Rücktransport des Cholesterins**

Über VLDL werden neben Nahrungscholesterin und endogenem Cholesterin vor allem Triglyzeride zur Versorgung extrahepatischer Gewebe aus der Leber exportiert. Die VLDL werden am ER von Hepatozyten synthetisiert und setzen sich hauptsächlich aus Cholesterin, TG und ApoB-100 zusammen. Maßgeblich beteiligt an dieser VLDL Bildung ist das sog. microsomal triglyceride transfer protein (MTP), welches die TG mit ApoB100 fusioniert (Gordon, 2000).

Über den Golgi-Apparat werden VLDL in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran (PM) transportiert und ins Blut abgegeben. Zunächst werden die TG der VLDL wieder über LPL in freie Fettsäuren gespalten und diese von Muskel- und Fettgewebe aufgenommen. Ein Teil der VLDL-Remnants werden über den LDL-Rezeptor der Leber oder über den VLDL-Rezeptor extrahepatischer Zellen relativ schnell aus der Zirkulation entfernt (Yamamoto et al., 1995). Noch in der Zirkulation befindliche VLDL-Remnants metabolisieren über fortschreitende Hydrolyse in IDL und schließlich in LDL, das über LDL-Rezeptoren von Gewebezellen internalisiert werden kann. Entscheidend für die Bindung des LDL an den Rezeptor ist hierbei das ApoB100. Der resultierende Ligand-Rezeptor Komplex wird anschließend durch Endozytose in die Zelle internalisiert (Goldstein, 1977).

Beim Rücktransport des Cholesterins aus peripheren Geweben zur Leber spielen die HDL eine Schlüsselrolle. Deren lipidarme Vorstufen (freies ApoA-I, lipidarmes prä- $\beta$ -HDL) können prinzipiell auf 3 verschiedenen Wegen generiert werden (Fielding and Fielding, 1995). Erstens als naszente HDL in Hepatozyten oder der intestinalen

Mukosa (Castle et al., 1991; Danielsen et al., 1993), zweitens bei der Lipoprotein Lipase vermittelten Lipolyse von triglyzeridreichen Lipoproteinen VLDL, Chylomikronen (Musliner et al., 1991) und drittens bei der HDL-Interkonversion von HDL<sub>2</sub> zu HDL<sub>3</sub> unter Beteiligung des Cholesterinester Transferproteins (CETP) (Liang et al., 1994), des Phospholipid Transferproteins (PLTP) (Jiang et al., 1996), der Hepatischen Lipase (HL) oder des Scavenger Rezeptors Typ BI und seines humanen Homologen CLA1 (Barrans et al., 1994).

Lipidfreies ApoA-I bzw. lipidarme prä-β-HDL akquirieren von hepatischen und peripheren Zellen Cholesterin und Phospholipide (Forte et al., 1993; Asztalos et al., 1997). ApoA-I induziert an verschiedenen Zelltypen über den ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) einen Lipidefflux, der auch eine Internalisierung von ApoA-I und HDL<sub>3</sub> sowie eine Resekretion (Retroendozytose) von lipidierten Apolipoproteinen beinhaltet (Schmitz et al., 1985a; Takahashi et al., 1999). Die weitere Reifung zu sphärischen, lipidreichen HDL<sub>3</sub> bzw. HDL<sub>2</sub> involviert die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), die zu einer Veresterung des freien Cholesterins führt (Rye et al., 1999). Die Bildung von Cholesterinestern und die Einlagerung der Ester in den hydrophoben Kern der Lipoproteine führt zur Ausbildung sphärischer Partikel. Initial entstehen dabei HDL<sub>3</sub>, die durch weitere Cholesterinaufnahme sowie durch PLTP vermittelte Prozesse wie die Fusion mit anderen HDL<sub>3</sub>-Partikeln oder die Aufnahme von Oberflächenremnants aus triglyzeridreichen Lipoproteinen zu größeren HDL<sub>2</sub> reifen (Lusa et al., 1996; Jiang et al., 1999).

Die Entfernung von Lipid- bzw. Proteinkomponenten der HDL aus der Zirkulation erfolgt über verschiedene Wege (Krieger, 1999; Curtiss and Boisvert, 2000; Cohen et al., 1999). So können komplette HDL-Partikel über ApoE-Rezeptoren und den ApoA-I Rezeptor ATP Synthase β-Chain in die Leber aufgenommen werden. Alternativ existiert ein SR-BI vermittelter selektiver Mechanismus, bei dem nur HDL assoziiertes Cholesterin in die Leber aufgenommen wird und somit aus HDL<sub>2</sub>- wieder HDL<sub>3</sub>-Partikel entstehen. Cholesterinester von HDL<sub>2</sub> können aber auch über einen CETP vermittelten Transfer auf ApoB-haltige Lipoproteine übertragen und letztlich über den LDL-Rezeptorweg in die Leber aufgenommen werden.

Sowohl der SR-BI- als auch der CETP-Stoffwechselweg führen zur Regenerierung von HDL<sub>3</sub> sowie lipidarmen bzw. lipidfreien HDL-Vorläufern, welche wiederum als Akzeptoren für zelluläres Cholesterin fungieren können. Somit entsteht ein Zyklus, in dem permanent Akzeptoren für zelluläres Cholesterin generiert werden, die für einen

Rücktransport des Cholesterins aus peripheren Zellen zur Leber sorgen. Dieser Prozess wird als Reverser Cholesterintransport (RCT) bezeichnet.

Die Enterohepatische Zirkulation und der Reverse Transport von Cholesterin zur Leber über HDL sind Teil der Cholesterinhomöostase im gesamten Organismus. Darüber hinaus spielen sich auch auf zellulärer Ebene bedeutende Teilprozesse des Cholesteringleichgewichts ab.

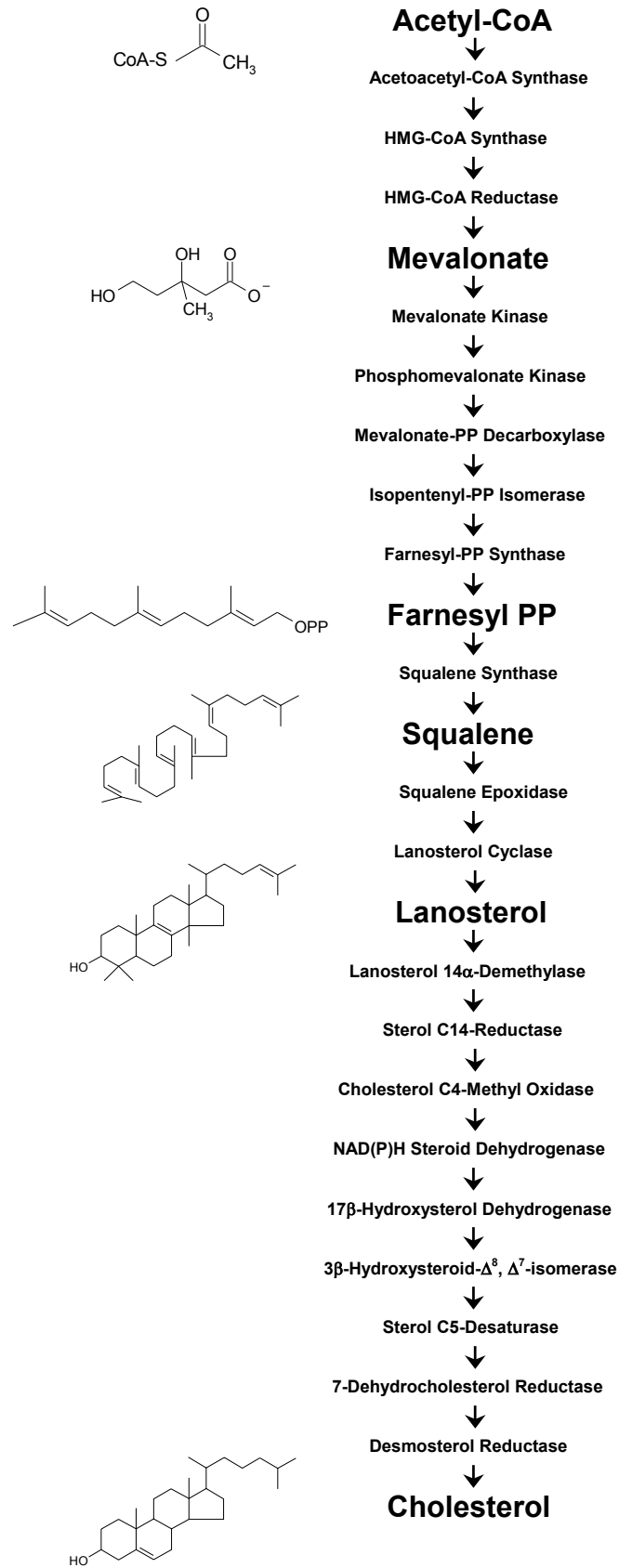
### **1.3 Zellulärer Cholesterinstoffwechsel**

Am meisten Cholesterin befindet sich mit 85 % in der Plasmamembran (PM), wobei hiervon ca. 95 % auf der zytosolischen Seite lokalisiert sind (Schroeder and Nemezc, 1990). Organellen, die direkt mit der Plasmamembran interagieren, z.B. das endoplasmatische Retikulum (ER), das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), Endosomen und Lysosomen weisen im Vergleich zu anderen Organellen einen relativ hohen Cholesterinanteil auf (Orci et al., 1981).

Obwohl das ER eine geringe Cholesterinkonzentration aufweist spielt es eine wichtige Rolle bei der Cholesterinhomöostase. Generell ist die Cholesterinsynthese und die Hydrolyse der Cholesterinester am ER lokalisiert.

Der initiale Schritt der Cholesterinbiosynthese ist die Kondensation von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA), katalysiert durch HMG-CoA-Synthase (Abbildung 3). Die folgende Hydrierung von HMG-CoA mit HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat repräsentiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Cholesterinbiosynthese, weshalb die HMG-CoA-Reduktase Expression und Aktivität eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Biosyntheserate von Sterolen spielt. Über mehrere enzymatische Schritte wird aus Mevalonat zunächst Farnesyl-PP generiert, aus dem mit Squalen-Synthase durch Dimerisierung Squalen synthetisiert wird.

Cyclisierung von Squalen führt zu Lanosterol, dem ersten Steroid der Cholesterinbiosynthese. Nach einer Reihe von Modifikationen mit verschiedenen Enzymen wird Lanosterol schließlich zu Cholesterin umgewandelt (Waterham, 2002; Goldstein, 2006).



**Abbildung 3:** Cholesterin Biosynthese (Goldstein, 2006).

Die Cholesterinkonzentration im ER ist unter anderem für die Cholesterinhomöostase von Bedeutung. So beschleunigt z.B. eine erhöhte Cholesterinmenge im ER zuerst die Degradation der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A Reduktase (HMG-CoA Reduktase) durch Bindung an Ubiquitine, und zweitens werden die sogenannten sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) in einem Komplex mit Scap und retention protein Insig im ER zurückgehalten. Wenn die Cholesterinkonzentration sinkt, wird der SREBPs/Scap/COPII Komplex am ER zum Golgi transportiert und dort enzymatisch degradiert. Die nun freien SREBPs erreichen den Zellkern und aktivieren die Transkription entscheidenden Gene für die LDL-Rezeptor Synthese und für die Enzyme der Cholesterinbiosynthese (Goldstein, 2006; Soccio and Breslow, 2004).

Eine zweite Quelle von Cholesterin für die Zelle ist die Aufnahme von exogenem Cholesterin aus der Nahrung. Dieser Transport erfolgt durch mehrere Lipoproteine. Die Hauptaufnahme in die Zelle von exogenem Cholesterin erfolgt über LDL. LDL bindet über ApoB100 an die LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Das so an die LDL-Rezeptoren gebundene LDL wird durch Clathrin-coated pits internalisiert und durch Fusion mit early Endosom (eE) weiter transportiert. Der niedrige pH-Wert in eE induziert die Trennung von LDL und LDL-Rezeptoren. Die LDL-Rezeptoren und andere recycling Proteine werden in Vesikeln aus den eE zum endocytic recycling compartment (ERC) transportiert. Auf ähnliche Weise können Teile des freien Cholesterins aus der eE Membran zum ERC geleitet werden. Die Hydrolyse von LDL Cholesterinestern zu freiem Cholesterin findet meistens in den late Endosomen und Lysosomen statt. Vesikel aus dem ERC transportieren LDL-Rezeptoren und andere Proteine und Lipide zur PM zurück. Der nicht wiederverwertete Inhalt des eE wird von late Endosomen aufgenommen, die zu Lysosomen differenzieren.

Freies Cholesterin ist zytotoxisch, weshalb es entweder zur Plasmamembran zum Efflux transportiert oder am ER über Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) zu CE transformiert und zusammen mit Triglyzeriden (TG) in Lipidtröpfchen als Reserve gespeichert wird. Die Einlagerung der Cholesterinester in zytoplasmatische Tröpfchen in Makrophagen stellt einen primären Schritt in der Formation von atherosklerotischen Läsionen dar, weshalb der intrazelluläre Transport von Cholesterin in diesen Zellen von großem Interesse ist. In Makrophagen ist der intrazelluläre Metabolismus des LDL-Cholesterins abhängig von dem zugrundeliegenden Mechanismus der Internalisierung.

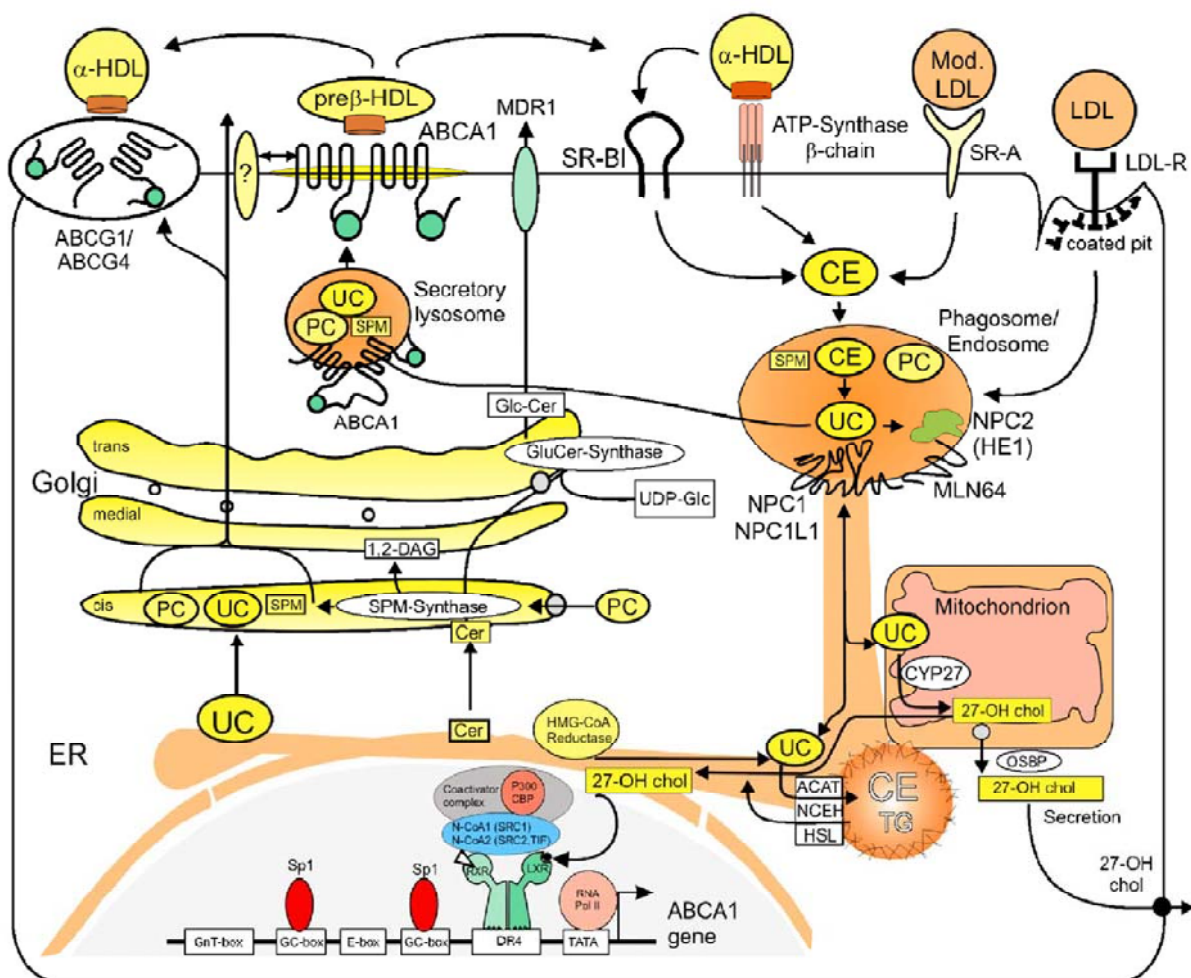
Der Cholesterinefflux aus Zellen erfolgt sowohl über passive als auch aktive Prozesse. So kann durch proteinfreie Phospholipid-Vesikel, Albumin, synthetische Cyclodextrine oder trypsiniertes HDL<sub>3</sub> ein langsamer und nicht sättigbarer Cholesterinefflux aus allen Zelltypen induziert werden (Rothblat et al., 1999; Zhao and Marcel, 1996). Es handelt sich hierbei um eine passive Diffusion von Cholesterin entlang eines Konzentrationsgradienten zwischen der Plasmamembran und dem extrazellulären Akzeptor. Im Gegensatz dazu induziert freies ApoA-I einen schnellen, sättigbaren Efflux von Cholesterin und Phospholipiden, der unter anderem von ABCA1 und dem Golgi-Apparat abhängig ist und zu einer effizienten Reduzierung der Cholesterinesterspeicher führt (Rothblat et al., 1999; Hara and Yokoyama, 1991; Oram and Yokoyama, 1996; Schmitz et al., 2000). So kann der ApoA-I induzierte Lipidefflux durch limitierte Proteolyse der Plasmamembran, niedrige Temperaturen sowie die Blockade der Golgi-Funktion gehemmt werden und ist somit abhängig von spezifischen Interaktionen mit der Plasmamembran und einer intakten Funktion des Golgi-Apparates (Mendez, 1995; Mendez, 1997). Als Resultat dieses ApoA-I vermittelten Lipidefflux entstehen HDL-ähnliche Partikel mit prä- $\beta$ -Mobilität.

Sphärische HDL<sub>3</sub>-Partikel induzieren sowohl einen passiven als auch einen aktiven Lipidefflux (Rothblat et al., 1999; Oram and Yokoyama, 1996). Der durch HDL<sub>3</sub>-induzierte Cholesterinefflux kann durch partielle Proteolyse des Partikels um etwa 50% gesenkt werden. Der verbleibende Efflux entspricht in seinen Eigenschaften einer passiven Diffusion, wobei jedoch der Nettoefflux durch die mit HDL<sub>3</sub> assoziierte LCAT-Aktivität verstärkt wird. Der durch Proteolyse blockierbare Anteil des HDL<sub>3</sub> vermittelten Lipidefflux ist auf das mit dem Partikel assoziierte ApoA-I zurückzuführen. Nach derzeitigen Modellvorstellungen kommt es zu einem Abdissoziieren des ApoA-I vom HDL<sub>3</sub> und einer nachfolgenden Induktion des ApoA-I vermittelten Lipidefflux. Proteinkinase C (PKC)-Inhibitoren, wie Sphingosin, blockieren den Lipidefflux, während PKC-Aktivatoren wie 1,2-Diacylglycerol einen stimulatorischen Effekt zeigen (Mendez et al., 1991).

Defekte beim ApoA-I vermittelten Lipidefflux können sich in verschiedenen Krankheitsbildern äußern wie z.B. bei Morbus Tangier, die unter anderem durch fast vollständiges Fehlen von lipidreichen,  $\alpha$ -migrierenden HDL charakterisiert ist (Assmann et al., 1990).

Eine weitere Möglichkeit des Efflux bieten ABC Transporter wie MDR1, ABCG1 und ABCG4.

Zudem existiert ein weiterer Mechanismus des Cholesterineffluxes über die mitochondriale Bildung des Oxysterols 27-Hydroxycholesterol oder 3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholestensäure. Sterol 27-hydroxylase (CYP27, eine Subklasse von CYP450), ein wichtiges Enzym des Cholesterinmetabolismus, ist in Makrophagen hoch exprimiert und liegt auf der Matrixseite der inneren mitochondrialen Membran. Es transformiert das in den Mitochondrien, die als cholesterinarme Organellen bekannt sind, aufgenommene Cholesterin in 27-Hydroxycholesterin oder 3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholestensäure (Abb. 4).



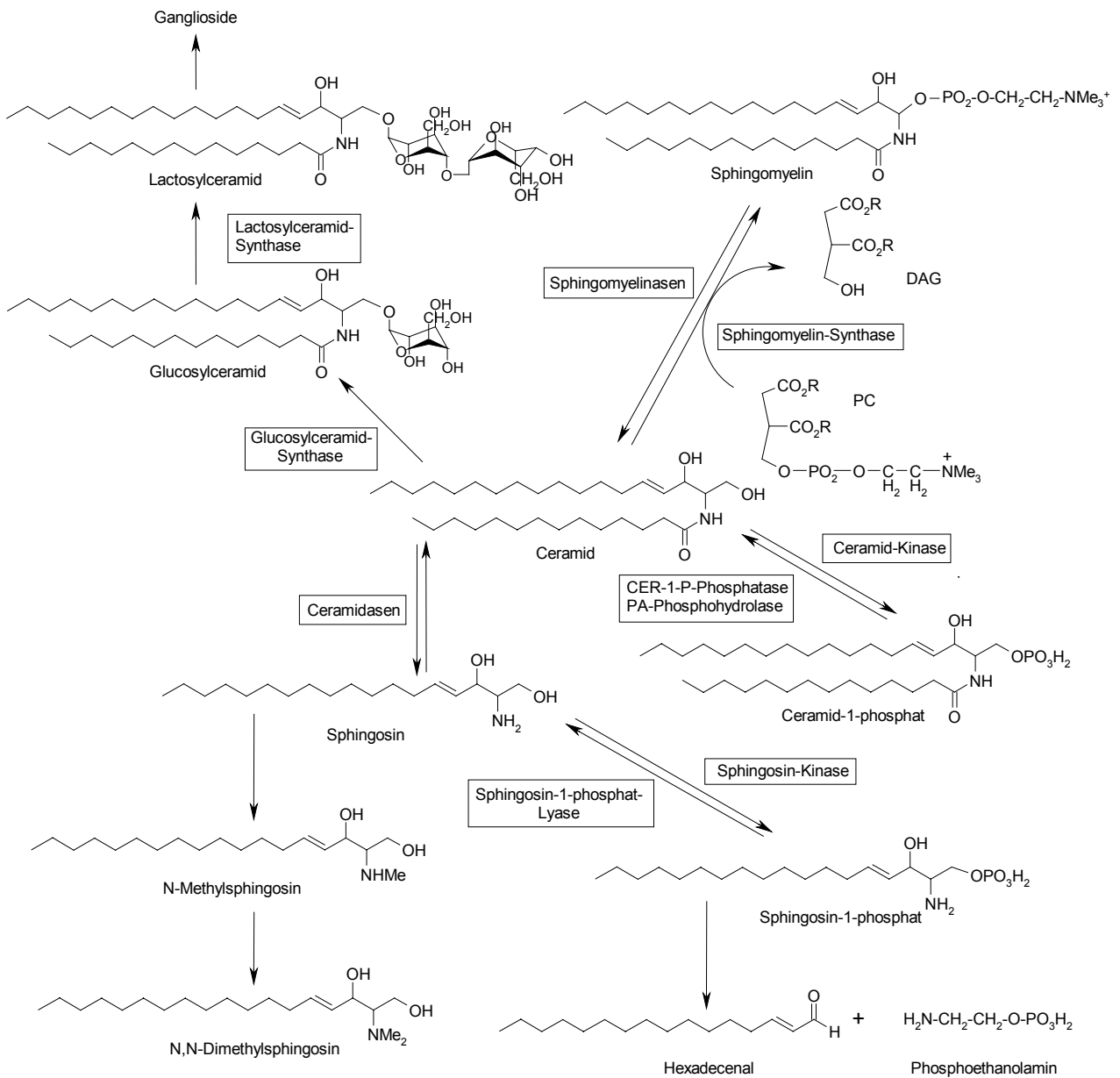
**Abbildung 4:** Cholesterin-Metabolismus in Makrophagen (Schmitz and Langmann, 2005).

Die Bildung dieser Oxysterole setzt einen entscheidenden Mechanismus in Gang, bei dem Makrophagen überflüssiges Cholesterin durch direkte Sekretion, unabhängig von lipophilen Akzeptoren, eliminieren können (Bjorkhem, 2002). Neuere Studien haben gezeigt, daß periphere Zellen Cholesterin in Form von 27-Hydroxycholesterin oder 3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholestensäure abgeben können und man vermutet, daß der Transport von Oxysterolen aus peripheren Zellen zur Leber zum Reversen Cholesterintransport beiträgt (Tall et al., 2002). Es ist bekannt, daß sich dieser Oxysterol Pathway invers zum ApoA-I vermittelten Efflux verhält (Westman et al., 1998), da Oxysterole die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase hemmen können.

Die bislang beschriebenen Mechanismen über den Cholesterinstoffwechsel in Monozyten/Makrophagen involvieren die physiologisch regulierbare Aufnahme und Verteilung der Lipide. Trotzdem kann die Expression zahlreicher Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen das Gleichgewicht stören, da manche dieser Rezeptoren modifizierte LDL erkennen und damit einen alternativen, schwer kontrollierbaren Weg für die Aufnahme exogene Lipide darstellen. Rezeptoren mit Affinität zu Ox-LDL sind CD36, Scavenger receptor class A-1 (SR-AI), CD68 und Lectin-like Ox-LDL receptor-1 (LOX-1). Obwohl Ox-LDL in engem Zusammenhang mit der Atherosklerose gebracht wird, scheint sich diese Charakteristik mehr auf ihre Kapazität zu Ausbildung von inflammatorischen Effekten als ihre Schaumzellbildungskapazität zu fokussieren (Steinberg, 1997; Kapinsky et al., 2001; Schmitz and Langmann, 2005).

## **1.4 Sphingolipidstoffwechsel und seine biologische Bedeutung**

Der Stoffwechsel der Sphingolipide kann grob in zwei Abschnitte eingeteilt werden, nämlich in die Biosynthese des zentralen Sphingolipids Ceramid und den Metabolismus von Ceramid. Die ersten drei Enzyme der Sphingolipid-Biosynthese sind gut charakterisiert und auf der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert (Hirschberg et al., 1993; Mandon et al., 1992) (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Ceramid-Metabolismus.

Die Sphingolipid-*de-novo*-Synthese beginnt mit der von Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase katalysierten Kondensation von Serin und Palmitoyl-CoA unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und CoA. Das entstandene 3-Ketosphinganin wird durch die NADPH-abhängige Ketosphinganin-Reduktase zum Sphinganin (4,5-Dihydrosphingosin, SPA) reduziert (Obeid et al., 2002). Anschließend überträgt Dihydroceramid-Synthase eine Fettsäure auf die Aminogruppe und es entsteht Dihydroceramid (DihCer) (Merrill and Jones, 1990). Schließlich wird durch die Einführung einer Doppelbindung an der 4,5-Position Ceramid (Cer) generiert. Die dafür verantwortliche Dihydroceramid-Desaturase ist auf der zytosolischen Seite des ER lokalisiert (Michel and van-Echten-Deckert, 1997).

Das zentrale Sphingolipid Cer kann über mehrere Wege metabolisiert werden (Abbildung 5). Auf degradativem Weg wird Cer zum einen über Ceramidasen zu Sphingosin (SPH) deacyliert, das über Sphingosin-Kinase zu Sphingosin-1-phosphat (SPP) phosphoryliert wird. Der Abbau von SPP mit Sphingosinphosphat-Lyase führt schließlich zu Hexadecenal und Ethanolamin-Phosphat (Phosphoethanolamin). Überdies kann die Aminogruppe des SPH auch methyliert werden, wobei N-Methylsphingosin und N,N-Dimethylsphingosin (ein Inhibitor von Sphingosinkinase) entstehen (Yatomi et al., 1996).

Unter der Einwirkung von Ceramid-Kinase wird aus Cer Ceramid-1-phosphat generiert (Dressler and Kolesnick, 1990; Hinkovska-Galcheva et al., 1998), das durch Ceramid-1-phosphat-Phosphatase und Phosphatidsäure-Phosphohydrolase wieder in Cer gespalten werden kann (Boudker and Futerman, 1993; Waggoner et al., 1996).

Eine weitere Möglichkeit der Cer-Metabolisierung ist der Aufbau von Sphingomyelin mit Sphingomyelin-Synthase. Dieser Schritt repräsentiert eine Verknüpfung des Phospholipid- mit dem Sphingolipid-Stoffwechsel, da hierbei eine Phosphocholin-Gruppe von Phosphatidylcholin (PC) unter Bildung von Diacylglycerol (DAG) auf Cer übertragen wird. Der reverse Weg wird durch Sphingomyelinase katalysiert. Als letzte Möglichkeit können Ceramide schließlich über Glucosylceramid-Synthase zu Glucosylceramiden und diese mit Lactosylceramid-Synthase zu Lactosylceramiden umgesetzt werden (Ichikawa and Hirabayashi, 1998). Diese können dann weiter zu Glycosylceramiden und Gangliosiden aufgebaut werden. Im folgenden soll detaillierter auf die Funktionen einiger Sphingolipide eingegangen werden.

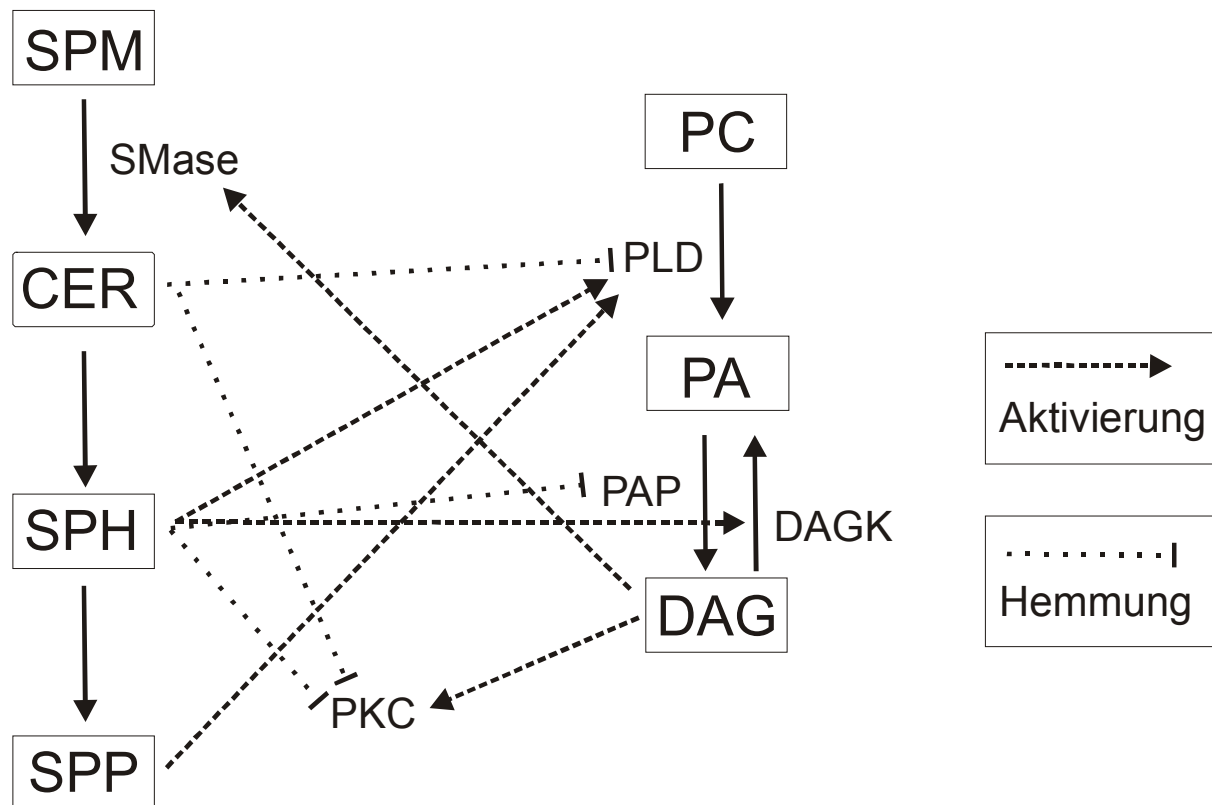
Glycosphingolipide (GSL) spielen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von zellulären Prozessen. Cer spielt bei der Induktion von Apoptose und der durch TNF, Interleukin(IL)-1 und IFN- $\gamma$  induzierten Differenzierung von Zellen eine bedeutende Rolle (Kolesnick and Golde, 1994; Hannun and Obeid, 1995). Cer imitiert manche Effekte von Lipopolisacchariden (LPS) (Pfeiffer et al., 2001; Wright et al., 1995) und induziert die Expression von pro-inflammatorischen IL-6 (Laulederkind et al., 1995), möglicherweise auf Grund ähnlicher Struktur wie der Lipid A Region des LPS (Joseph et al., 1994).

Lactosylceramid (LacCer/CDw17) befindet sich in plasmatischen Lipoproteinen, in mehreren Zelltypen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen sowie in Monozyten und Makrophagen (Chatterjee, 1998), in Fettstreifen und Plaque in der Intima (Mukhin et al., 1995; Chatterjee et al., 1997). LacCer kann die Atherosklerose durch Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen (Chatterjee and Ghosh, 1996; Bhunia et al., 1996; Bhunia et al., 1997) und von CD11b/CD18 (Mac-1) auf der Oberfläche humaner Neutrophile (Arai et al., 1998) fördern.

Die molekularen Strukturen von GSL erstrecken sich von einfachen Strukturen wie Cerebrosiden mit nur einem Zucker am C18 bis hin zu den komplexen Gangliosiden mit verzweigten sialylierten Kohlenhydraten. Im Zusammenhang mit der Atherosklerose spielt die Konzentration von Cer in Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle, ebenso bei der Apoptose sowie als ein Vorläufer der Vielzahl an Glycosphingolipiden (Kolesnick and Golde, 1994; Hannun and Obeid, 1995). Das neutrale GSL LacCer/CDw17 ist in Prozesse der Atherogenese involviert und dessen Regulation ist gekoppelt mit dem Lipidmetabolismus (Mukhin et al., 1995; Chatterjee et al., 1997; Chatterjee and Ghosh, 1996; Bhunia et al., 1996; Bhunia et al., 1997; Arai et al., 1998; Chatterjee et al., 1986; Chatterjee et al., 1988). GSL CD77 (globotriasylceramide/Gb<sub>3</sub>Cer) hat Einfluss auf Antikoagulanzen (Griffin et al., 2001) und die Signaltransduktion (Mangency et al., 1993). Der Komplex GSL CD65s (sialyliertes Dodecasaccharideceramide) ist möglicherweise bei der Adhäsion (Postigo et al., 1994; Wagers et al., 1997) und der zellulären Aktivierung beteiligt (Lund-Johansen et al., 1992).

## 1.5 Sphingolipid-Interaktion mit Glycerolipidsignalwegen

Sphingolipid- und Glycerophospholipidstoffwechsel sind nicht nur über die SPM-Synthesereaktion miteinander verknüpft, sondern beeinflussen wechselseitig verschiedene Enzyme (Abbildung 6). Von zentraler Bedeutung ist die Modulation der PLD Aktivität durch Sphingolipide (Spiegel and Milstien, 1996).



**Abbildung 6:** Interaktionen zwischen Sphingo- und Glycerophospholipiden (Gomez-Muños, 1998).

Während Ceramid die PLD hemmt, üben SPH (Gomez-Muños et al., 1995; Lavie and Liscovitch, 1990) und stärker noch SPP (Desai et al., 1992) einen aktivierenden Einfluss auf die PLD aus. SPH kann zudem die Bildung von DAG reduzieren, indem es sowohl die PA-Phosphohydrolase (Umwandlung von PA zu DAG) hemmt (Gomez et al., 1992; Jamal et al., 1991; Lavie et al., 1990), als auch die DAG-Kinase stimuliert (DAG → PA) (Sakane et al., 1989; Yamada et al., 1993). Dies könnte auch den inhibierenden Einfluss von SPH auf die PKC noch potenzieren (die klassischen und neuen Isoformen der PKC werden durch DAG aktiviert (Nishizuka, 1995)). SPP hingegen kann über eine Aktivierung der PLD und die anschließende PA-Hydrolyse PKC stimulieren. Auch Cer ist in der Lage, über indirekte Reduktion der DAG-

Produktion die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\varepsilon$  zu regulieren (Jones and Murray, 1995). Außerdem fand man, dass von der PC-PLC generiertes DAG die saure SPMase aktivieren kann (Schutze et al., 1992). Das komplexe Zusammenspiel zwischen Sphingolipid-, Phospholipid- und des Cholesterinstoffwechsel in Monozyten und Makrophagen ist bislang noch nicht eindeutig geklärt und ist deshalb Fokus aktueller Forschung.

## **1.6 Monozyten, Makrophagen, Lipide und Inflammation**

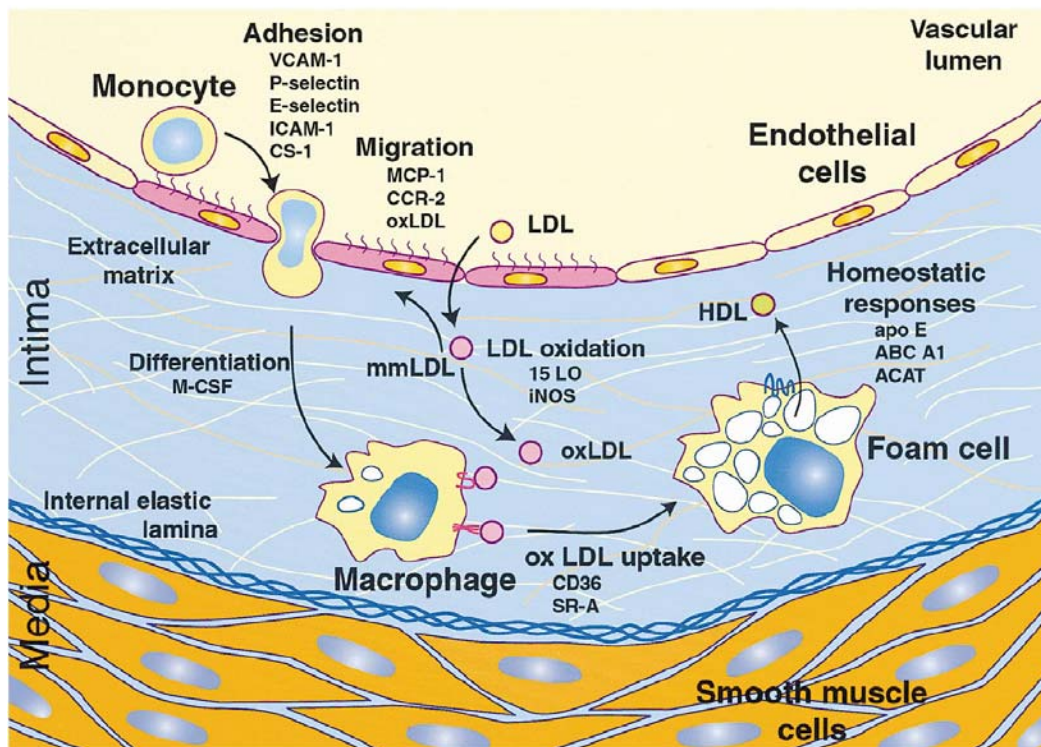
Die Inflammationshypothese hat in den letzten Jahren in der Erklärung der Mechanismen der Atherogenese an Bedeutung gewonnen. Sie zeigt einen lokalen Inflammationsstimulus induziert durch oxidierte low density Lipoproteine (Ox-LDL) oder einen infektiösen Prozess als mögliche Ursache des veränderten Milieus der Arterienwand und der Produktion einer Reihe von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und Chemokinen (Yeh, 2001), die als Katalysatoren der Akkumulation von Makrophagen bzw. Schaumzellen dienen.

Monozyten der Blutzirkulation werden durch Chemokine zur Migration zum beschädigten Endothelium animiert. Nach erfolgter Adhäsion gelangen die Monozyten mit Hilfe von Chemoattraktantien wie Chemokinen durch die Endothelzellen in die Gefäßwand. Die in der Intima gelagerten LDL Partikel werden modifiziert und von Monozyten durch Scavenger Rezeptoren gebunden und phagozytiert. Durch kontinuierliche Aufnahme von modifizierten LDL durch Scavenger Rezeptoren (CD36, SR-A1/2, usw.) entstehen aus den Makrophagen letztendlich Schaumzellen, da diese Aufnahme keiner negativen Feedback-Kontrolle unterliegt. Die aus LDL, Makrophagen und Schaumzellen freigesetzten Chemoattraktantien fördern wiederum die Einwanderung von Monozyten in die Intima und führen zu einer gesteigerten lokalen inflammatorischen Reaktion.

### **1.6.1 Makrophagen und modifizierte Lipide**

Es ist schon seit längerem bekannt, dass die Produkte der chemischen Modifizierung von nativem LDL wie die Acetylierung, intensiv von Makrophagen aufgenommen werden und zur Bildung der Schaumzellen beitragen (Goldstein et al., 1979). Obwohl acetyliertes LDL nicht *in vivo* synthetisiert wird, konnte es in einen *in vitro* Modell als atherogene Modifizierung identifiziert werden, was einen bedeutenden Schritt zum Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose repräsentierte.

Die wichtigste Modifizierung von LDL *in vivo* bei der Pathogenese der Atherosklerose ist oxidiertes LDL. LDL wird in der Mikroumgebung der Intima oxidiert und dieses Ox-LDL ist für Inflammation und Attraktion von Monozyten und anderen Leukozyten verantwortlich (Steinbrecher et al., 1984; Terkeltaub et al., 1994; Palinski et al., 1996; Jovinge et al., 1996; Kuhn et al., 1997; Pratico et al., 1998; Chisolm and Steinberg, 2000; Cyrus et al., 2001; Glass and Witztum, 2001) (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Einfluss von Ox-LDL auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Glass and Witztum, 2001).

Der atherogene Effekt von Ox-LDL ist in folgenden Beobachtungen zusammengefasst:

- Ox-LDL wurde aus atherosklerotischen Läsionen isoliert
- In Läsionen wurden Epitope gefunden, die mit Ox-LDL-Antikörpern reagieren
- Ox-LDL-Autoantikörper wurden in Patienten und Versuchstieren gefunden
- Antioxidantien können die Progression von Atherosklerose in Versuchstieren verzögern

Im Vergleich mit anderen LDL Modifizierungen besitzt Ox-LDL jedoch nach heutigem Wissensstand ein eher geringes Potential zur Induktion von Schaumzellen (Bhakdi et al., 1995; Kapinsky et al., 2001; van den Eijnden et al., 1999).

Andere Lipoprotein-Modifizierungen, die bei der Atherogenese eine Rolle spielen, sind advanced glycation end-products (AGE-LDL) (Vlassara, 1996), modifiziertes durch Phospholipase A<sub>2</sub> LDL (Hurt-Camejo et al., 2001), aggregiertes LDL (Khoo et al., 1988; Haberland et al., 2001) und enzymatisch degradiertes LDL (E-LDL) (Simionescu et al., 1986; Seifert et al., 1990; Bhakdi et al., 1995 ; Torzewski et al., 1998).

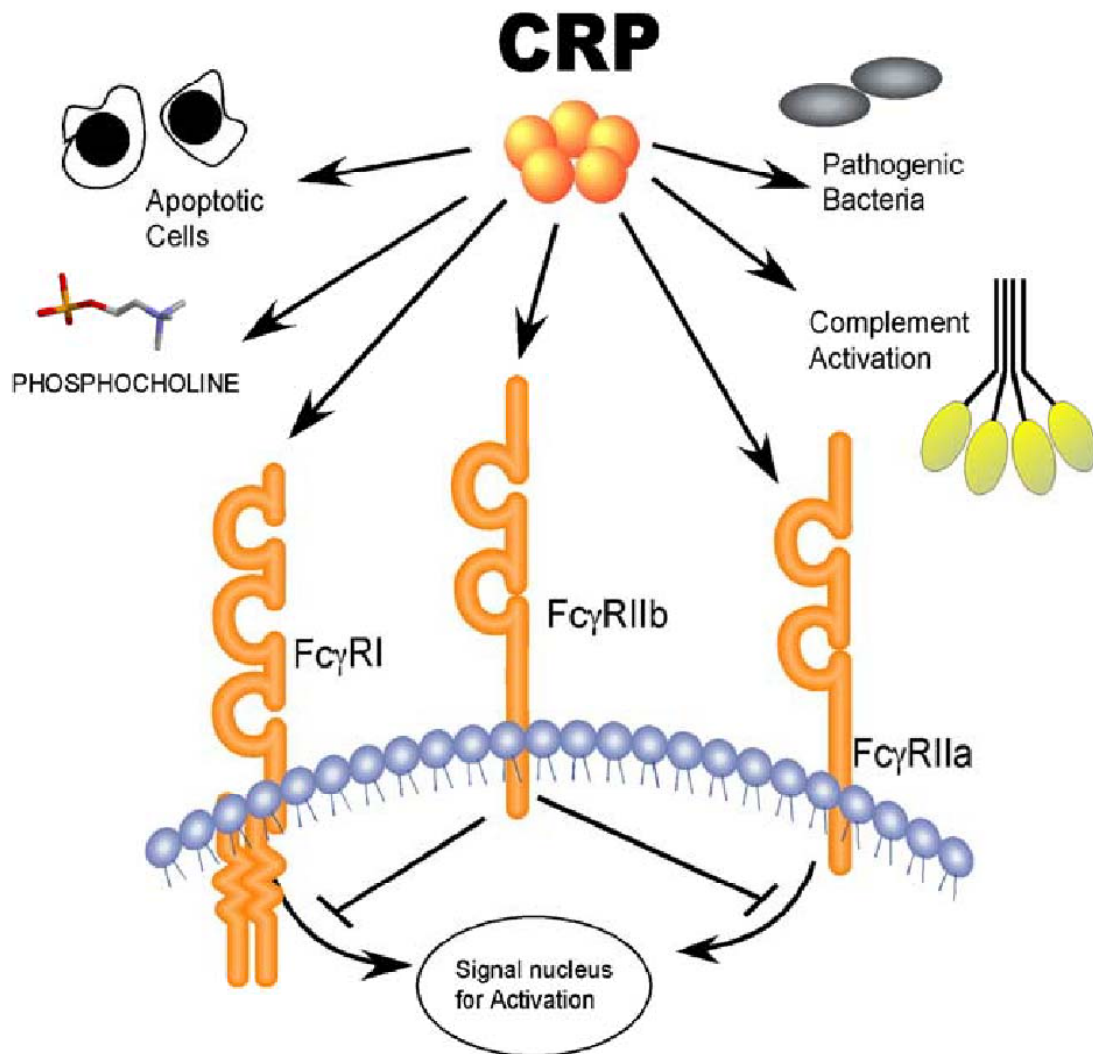
In den letzten Jahren zeigte sich, dass E-LDL auf Grund seiner Fähigkeit, Makrophagen in Schaumzellen zu verwandeln, eine bedeutende LDL Modifizierung bei der Atherogenese repräsentiert. E-LDL wird schnell von Makrophagen internalisiert. Bei diesem Prozess scheinen eine Reihe von noch nicht definitiv identifizierten Rezeptoren involviert zu sein (Bhakdi et al., 1995; Kapinsky et al., 2001; Kruth et al., 1999). E-LDL induziert in Makrophagen eine erhöhte Expression mehrerer Gene wie CLA1/SR-B1 (Kapinsky et al., 2001), des ABCA1 Transporters (Langmann et al., 2003) und Cathepsin H (Han et al., 2003). Überdies aktivieren hohe E-LDL Konzentrationen einen alternativen Weg des Komplementsystems (Bhakdi et al., 1995, Bhakdi et al., 2004), der möglicherweise über freies Cholesterin induziert wird. Alving et al. konnte zeigen, dass freies Cholesterin das Komplementsystem aktiviert (Alving et al., 1977). Außerdem induziert E-LDL eine selektive Adhäsion und Trans-Migration von Monozyten durch eine mono-Schicht von Endothelzellen (Klouché et al., 1999). Freie Fettsäuren in E-LDL stimulieren auf selektive Weise die Sekretion von IL-8 aus Endothelzellen und promovieren dadurch die Adhäsion und Transmigration von zirkulierenden Monozyten in die Intima (Suriyaphol et al., 2002). Mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper konnte die Einlagerung von E-LDL in Anwesenheit von CRP und aktivem Komplement in frühen Läsionen nachgewiesen werden (Bhakdi et al., 1999; Torzewski et al., 1998). Dieses aus frühen Läsionen isolierte E-LDL zeigt identische biochemische, ultrastrukturelle und immunologische Charakteristika wie ein *in vitro* hergestelltes E-LDL (Seifert et al., 1990). Auf Grund dieser Erkenntnisse spielt E-LDL in *in vitro* Modellen atherosklerotischer Prozesse eine wichtige Rolle.

## 1.6.2 Makrophagen und Opsonine

Es ist bekannt, dass Makrophagen und Opsonine wie Pentraxine in dem unspezifischen Abwehrsystem bei Inflammation eine entscheidende Rolle spielen. Auch wurde bereits gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Atherogenese und inflammatorischen Prozessen, an denen Opsonine wie CRP beteiligt sind, existiert. Außerdem könnten andere potentielle Opsonine wie SAP,  $\beta$ -Amyloid(1-42) Peptide und SAA auf Grund ihrer Bindungscharakteristik eine Rolle bei Atherosklerose spielen.

### 1.6.2.1 C-reaktives Protein

C-reaktives Protein (CRP) ist ein Akute-Phase Protein, mit einer zyklischen Pentamer-Form und einer charakteristischen Bindungsstelle, an der sich zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen befinden können (Volanakis, 2001; Du Clos, 2000; Shrive et al., 1996). Der Name CRP findet seine Ursache in seiner Reaktivität mit C-Polisaccharid von *Streptococcus pneumoniae* (Volanakis and Kaplan, 1971). Die Plasmakonzentration von CRP steigt als Antwort auf Inflammation, Trauma oder Infektion von weniger als 1  $\mu\text{g/ml}$  bis ca. 100  $\mu\text{g/ml}$  (Mold et al, 2002; Rosalki, 2001; Urieli-Shoval et al., 2000). Mehrere Studien schlagen vor, dass CRP auch als ein Marker bei der Beurteilung der subklinischen Atherosklerose und des kardiovaskulären Risikos eingesetzt werden könnte (Haverkate et al., 1997; Koenig et al., 1999; Hashimoto et al., 2001; Blackburn et al., 2001; Ridker, 2004).



**Abbildung 8:** Schema der CRP-Liganden und die Bindung an Fc $\gamma$  Rezeptoren (Marnell et al., 2005).

CRP bindet calciumabhängig an eine Vielzahl von Liganden (Abb. 8) wie z.B. bakterielles Phosphatidylcholin (PC) (Volanakis and Kaplan, 1971), Membran-Phospholipide (Volanakis and Wirtz, 1979), apoptotische Zellen (Gershov et al., 2000), Fibronectin (Salonen et al., 1984), Kern-Antigene (Robey et al., 1984; Du Clos, 1989) und Cholesterin (Taskinen et al., 2002). Die Bindung von CRP an Lipoproteine ist von enormer Relevanz, insbesondere bei der Erforschung der Atherosklerose, da CRP zusammen mit E-LDL und Komponenten des Komplementsystems in frühen Stadien der atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen wurde (Bhakdi et al., 1999; Torzewski et al., 1998). *In vitro* wurden die

Bindung von CRP an E-LDL (Bhakdi et al., 1999; Taskinen et al., 2002) und Ox-LDL (Chang, et al., 2002) nachgewiesen, während die Bindung an natives LDL noch kontrovers diskutiert wird (Zwaka et al., 2001; Taskinen et al., 2002).

CRP aktiviert zum einen den klassischen Weg des Komplementsystems durch Bindung an C1q (Claus et al., 1977), zum anderen interagiert es mit Fc $\gamma$  Rezeptoren (Fc $\gamma$ Rs). Insbesondere Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RII in phagozytischen Zellen führen zur Phagozytose (Bharadwaj et al., 1999; Stein et al., 2000; Marnell et al., 2005). So kann CRP die Liganden in direkter Form (Fc $\gamma$ Rs) oder indirekt durch das Komplementsystem (Komplement Rezeptoren) opsonisieren (Abb. 8).

### **1.6.2.2 Serum Amyloid P Protein (SAP)**

SAP gehört wie CRP zur Pentraxin Familie, deren wichtigste Charakteristika eine Pentamer-Ring-Struktur und calciumabhängige Bindungs-liganden sind (Gewurz et al., 1995). SAP ist ein Humanprotein im Serum mit einer Konzentration von ca. 40  $\mu$ g/ml (Pepys et al., 1978), die nur bis auf die doppelte Konzentration bei Sepsis Patienten ansteigen kann (Emsley et al., 1994). In Mäusen spielt SAP als Akute-Phase Protein dieselbe Rolle wie CRP bei Menschen (Pepys et al., 1979).

Bei Menschen wurde SAP in allen Typen von Amyloid-Einlagerungen nachgewiesen (Pepys et al., 1982) wie z.B. in Plaques von Alzheimer Patienten (Coria et al., 1988). SAP bindet calciumabhängig an Fibronectin (de Beer et al., 1981), C4b-binding Protein (de Beer et al., 1981; Schwalbe et al., 1990), Glycosaminoglycane (Hamazaki, 1987; Li et al., 1994), DNA und Chromatin (Pepys and Butler, 1987; Butler et al., 1990), Komponenten des Komplementsystem (Ying et al., 1993; Hutchcraft et al., 1981; Barbashov et al., 1997), aggregiertes IgG (Brown and Anderson, 1993), C-reaktiv Protein (Swanson et al., 1992; Christner and Mortensen, 1994), Lipopolysaccharide (LPS) (de Hass et al., 1998), Amyloid Fibrillen und  $\beta$ -Amyloid Peptide (Pepys et al., 1979; Hamazaki, 1995), Kollagene (Zahedi, 1996), Laminin (Zahedi, 1997) und apoptotische Zellen in einer chromatinunabhängigen Form (Familian et al., 2001). Ausserdem interagiert SAP auch spezifisch mit Phosphatidylethanolamin (PE) (Schwalbe et al., 1992) und Lipoproteinen wie high density lipoprotein (HDL) und very low density lipoprotein (VLDL) (Li et al., 1998). Die letztgenannte Bindung an Lipoproteine und ihre Existenz in humanen atherosklerotischen Läsionen (Li et al., 1995) lässt auf eine mögliche Beteiligung bei der Atherosklerose schließen. Andere wichtige Charakteristika von SAP



1.  $\alpha$ -Sekretase spaltet die extrazelluläre Domäne des APP Proteins nah an der Membran. Unter normalen Bedingungen ist es aktiver als  $\beta$ -Sekretase. Ihr Spaltprodukt ist ein lösliches Peptid mit Namen  $sAPP\alpha$ .
2.  $\beta$ -Sekretase spaltet ebenfalls in der extrazellulären Domäne des APP Proteins, jedoch nicht so nah an der Zellmembran. Die Spaltprodukte sind die sogenannten amyloidogenen Peptide  $\beta$ -Amyloid(1-40) ( $A\beta_{40}$ ),  $\beta$ -Amyloid(1-42) ( $A\beta_{42}$ ) und  $\beta$ -Amyloid(1-43) ( $A\beta_{43}$ ).
3.  $\gamma$ -Sekretase ist verantwortlich für die Spaltung von APP in der Transmembran-Domäne. Die Aktivität von  $\gamma$ -Sekretase erfordert allerdings die vorausgehende Spaltung von APP durch  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase, wobei verschiedene Peptide produziert werden.

Alle drei amyloidogenen Peptide wurden in Plaque und Kapillaren im Gehirn von Alzheimer Patienten mittels Immunfärbung nachgewiesen, wobei  $A\beta_{42}$  die dominierende Komponente war (Attems et al., 2004). Diese Einlagerung von  $A\beta$  Peptid ist das diagnostische Merkmal der Alzheimer Erkrankung (Hardy and Allsop, 1991).

Das Risiko, an AD zu erkranken wird von Faktoren wie der Hypercholesterinämie begünstigt. Da die Hypercholesterinämie auch mit dem Atherosklerose-Risiko in Verbindung steht, könnte eine Überlappung zwischen beiden Krankheiten, insbesondere zwischen AD und der cerebrovasculären Atherosklerose, möglich sein (Sparks, 1997; Markesbury, 1997; Jellinger and Mittler-Ferstl, 2003). Mehrere Studien untermauern diese Hypothese:

1. Bei mehr als 70 % von AD Patienten konnte Atherosklerose nachgewiesen werden (Esiri et al, 1999; Casserly and Topol, 2004)
2. Erhöhte Konzentrationen von Cholesterin in der Zellmembran stimulieren die Produktion von amyloidogenen  $A\beta$  Peptiden (Casserly and Topol, 2004)
3.  $A\beta$  Peptide wurden in atherosklerotischen Plaque nachgewiesen (De Meyer et al., 2002)
4.  $A\beta_{42}$  wurde als potentes und direktes neurotoxisches Agens und als Ursache der Aktivierung von Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen identifiziert (Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Minagar et al., 2002)

5. sAPP $\alpha$  komplexiert VLDL und steigert dessen Aufnahme in Fibroblasten durch der LRP Rezeptor (Scharnagl et al. 1999)
6. A $\beta_{40}$  interagiert mit LDL und Ox-LDL, die schneller als die ungebundenen Peptide in glatte Muskelzellen aufgenommen werden (Stanyer et al., 2004)

Auf Grund der Identifizierung von A $\beta_{42}$  als bedeutendstes amyloidogenes Peptid bei der Alzheimer-Erkrankung (Xia, 2000; McLaurin and Fraser, 2000) stieg das Interesse, dessen Bindungsfähigkeit an Lipoproteine und den biologischen Einfluss auf Makrophagen zu erforschen. Weiterhin lassen sich weitere, sehr wichtige Charakteristika von A $\beta_{42}$  aufzählen, wie z.B. die Internalisierung in Makrophagen über formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) und die Interaktion mit den Rezeptoren LRP, CD36 und Rezeptor-Komplex CD36/CD11/CD18/CD47 (Yazawa et al., 2001; Coraci et al., 2002; Moore et al., 2002; Khoury et al., 2003; Bamberg et al., 2003; Laporte et al., 2004). Darüber hinaus hat A $\beta_{42}$  die Fähigkeit, Hefe-Partikel opsonisieren zu können (Laporte et al., 2004).

#### **1.6.2.4 Serum Amyloid A (SAA)**

SAA gehört zu den humanen Akute-Phase Proteinen, deren Blutspiegel nach Inflammation oder extensiver Gewebeschädigung bis um das 1000-fache ansteigen können (Uhlir and Whitehead, 1999). Das normale Niveau von SAA im Blut liegt bei ca. 2,3  $\mu\text{g/ml}$ . In Zirkulation bei normalen Konzentrationen ist SAA als Apolipoprotein mit HDL assoziiert (Benditt and Eriksen, 1977; Benditt et al., 1979), während bei hohen Blutkonzentrationen von SAA dessen weitere Bindung an HDL die Dissoziation von Apolipoprotein A-I (ApoA-I) aus HDL steigert und die anti-atherogene Kapazität von HDL hemmt (Van Lenten et al., 1995). Interessanterweise wurde SAA auch als Komplex mit LDL und VLDL im Plasma von Patienten mit Atherosklerose gefunden (Marhaug et al., 1982; Ogasawara et al., 2004).

Freies SAA wurde an inflammatorischen Stellen nachgewiesen (Kumon et al., 1999; Meek et al., 1994), darüber hinaus wird eine Rolle von SAA bei lokaler Inflammation vermutet.

Überdies ist SAA bei Inflammation (Uhlir and Whitehead, 1999), Chemotaxis (Kumon et al., 2002) und pathogenischen Einlagerungen von Amyloid A Fibril in Amyloidose involviert (Uhlir and Whitehead, 1999).

SAA wurde als ein potentes Agens zur Induktion des Cholesterinefflux mit zwei Lipid-Bindungsdomänen identifiziert (Kisilevsky and Tam, 2002). Außerdem induziert freies SAA einen ABCA1-abhängigen und Energie-unabhängigen passiven Cholesterinefflux (Kisilevsky and Tam, 2003).

Es wurde gezeigt, dass Makrophagen die primären Aufnahme-, Metabolismus- und Degradationsstellen von SAA sind (Takahashi et al., 1989; Kluve-Beckerman et al., 2002).

Einige epidemiologische Studien haben eine klare Relevanz von CRP und SAA als Frühindikator für cardiovasculäre Erkrankungen in gesunden Probanden festgestellt (Danesh et al., 2000; Ridker et al., 1997; Haverkate et al., 1997; Ridker et al., 2000). Andere Studien zeigen die Signifikanz dieser Marker in der Prognose von Patienten mit Akutem Koronar Syndrom (Liuzzo et al., 1994; Biasucci et al., 1999; Morrow et al., 2000; Mueller et al., 2002). Auch wurde die plasmatische Bestimmung von zirkulierenden Komplexen aus SAA und LDL als sensitiven Marker im Vergleich mit CRP und SAA für die Prognose in Patienten mit stabiler Koronar Herzkrankheit auf Grund der Beteiligung von oxidativen Prozessen bei der Formation dieser Komplexe identifiziert (Ogasawara et al., 2004).

SAA interagiert mit formyl peptide seven-transmembrane-spanning G-protein-coupled receptors (FPR and FPR1), die bei der Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  und der Aktivierung der Protein Kinase C involviert sind (He et al., 2003).

## 2. Ziele dieser Doktorarbeit

Die Arbeit kann generell in zwei Teile aufgegliedert werden. Der erste Teil untersucht die Interaktion von LDL und dessen atherogenen Modifizierungen Ox-LDL und E-LDL mit bestimmten Opsoninen.

Der zweite Teil befasst sich mit Experimenten zur Bestimmung des metabolischen Einflusses der Opsonisierung von LDL und der modifizierten Spezies in Monozyten und Makrophagen bzw. den zellulären Cholesterin und Phospholipid Metabolismus und die Expression der Rezeptoren Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RII/CD32, Fc $\gamma$ RIII/CD16, FPRL1, CLA1, CD91 und CD36. Die Zellanalyse der lipidbeladenden Monozyten und Makrophagen wurde auf drei verschiedenen Wegen, nämlich der Dünnschichtchromatographie, der Tandem-Massenspektrometrie und der Durchflusszytometrie durchgeführt, um die verschiedenen Stoffwechselwege umfangreich zu untersuchen.

Die schon bekannte Opsonin-Fähigkeit des CRP hat in den letzten Jahren an Bedeutung bei der Erforschung der Atherosklerose gewonnen und somit unser Interesse an weiteren potentiellen Opsoninkandidaten wie SAP, A $\beta$ <sub>42</sub> und SAA geweckt. Die aus der Opsonisierung der verschiedenen Lipoproteine gewonnenen Ergebnisse sollten miteinander verglichen werden und damit könnte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der möglichen Zusammenhänge zwischen Inflammation und Atherosklerose beitragen.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Medium, Lösungen und Chemikalien

#### Zellkultur Reagenzien

- Makrophagen-SFM Medium (Invitrogen, Deutschland)
- M-CSF, human (rec. aus E. Coli, R&D Systems, USA)
- PBS (W/O  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , Gibco BRL, Deutschland)
- Cholesterinesterase (Roche, Schweiz)
- Trypsin (SAA, Schweiz)
- BSA (Lipid frei),  $\text{CuSO}_4$ , Dimethyl Sulfoxid (DMSO), Natrium Dodecylsulfat (SDS), 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat (Dil) und Natriumazid (Sigma, Deutschland)
- C-reaktive Protein (CRP) und Serum Amyloid P (SAP) (Calbiochem, USA)
- Amyloid  $\beta$ -Protein (1-42) ( $\text{A}\beta_{42}$ ) und rec. humanes Serum Amyloid A Protein (SAA) (Bachem, Deutschland)

#### Zellkultur Materialien

- 6-Lochplatten, ultra low attachment (Costar Corning, Deutschland)
- 6-Lochplatte, cell+ (Sarstedt, USA)

#### Lauf- und Lösungsmittel

Die Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographie und die Hochleistungs-Flüssigchromatographie hatten HPLC-Qualität und wurden von Merck KG, Deutschland oder J. T. Baker, Deutschland bezogen. Die Extraktionslösungsmittel hatten analytische Qualität und wurden von Merck oder Roth, Deutschland bezogen. Das verwendete Wasser wurde in einer Milli Q (Millipore, Bedford MA, USA) Wasserentsalzungsanlage entionisiert (18 M $\Omega$ ).

## Kits

- BCA, Protein Assay Kit (Pierce, USA)
- Biotin Labeling Kit (Roche, Deutschland)

## Laborgeräte

- Heraeus 6000 Brutschrank (Heraeus, Deutschland)
- ELISA reader (Tecan, Deutschland)
- Spektrophotometer (Shimatzu, USA)
- CAMAG TLC scanner II (MuttENZ, Schweiz)
- Triple Quadrupol Massenspektrometer Quattro Ultima (Micromass, UK)
- FACSCalibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Deutschland)

## **3.2 Bestimmung der Bindung zwischen Oponinen und Lipoproteinen mittels ELISA**

### **3.2.1 Biotin-Markierung des Antikörpers anti-CRP**

Die Biotin-Markierung des Antikörpers anti-CRP (Tabelle 2) wurde nach Anweisung der Hersteller durchgeführt (Roche, Deutschland). Zuerst wurde die Biotin-Lösung auf 2 mg/ml in DMSO verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden unter Rühren 15 µl zu der Antikörperlösung (1 mg/ml) gegeben und 2 h bei Raumtemperatur (RT) unter mäßigem Rühren inkubiert. Überschüssiges, nicht abreagiertes Biotin wird durch Gelfiltration über eine vorbereitete Sephadex<sup>®</sup> G-25-Säule abgetrennt. In 1,5 ml Eppendorf-Cups wurden 10 Tropfen (0,5 ml) der Probe gesammelt. Von den ersten vier Pools, in denen sich das markierte Protein befindet, wurde die Extinktion mit einem Spektrophotometer (Shimatzu, USA) bei 280 nm gemessen und vereint die zwei oder drei Proben mit der höchsten Extinktion zur Bildung eines Ausgangspools.

### **3.2.2 Bindungsbestimmung durch ELISA**

Die untersuchten Lipoproteine wurden auf eine Mikrotiterplatte (Nunc, Denmark) in einer Konzentration von 40 µg/ml Protein appliziert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Um die nicht gebundenen Lipoproteine zu entfernen wurde die Platte dreimal mit

Waschpuffer (3 % BSA (w/v) in Puffer A) gewaschen. Danach wurden die Proteine (CRP, SAP, SAA und A $\beta_{42}$ ) in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und 2 h bei RT (CRP und SAP) oder bei 37°C (SAA und A $\beta_{42}$ ) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die entsprechenden Antikörper (Ak) (Tabelle 2) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Bei Ak ohne Peroxidase (POD) wurden Avidin-POD (Amersham, UK) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert (Abb. 10A). Die POD Reaktion wurde durch Zugabe von ABTS<sup>®</sup>-Lösung (Roche, Deutschland) induziert und in einem ELISA Reader (Tecan, Deutschland) bei 405 nm gemessen.

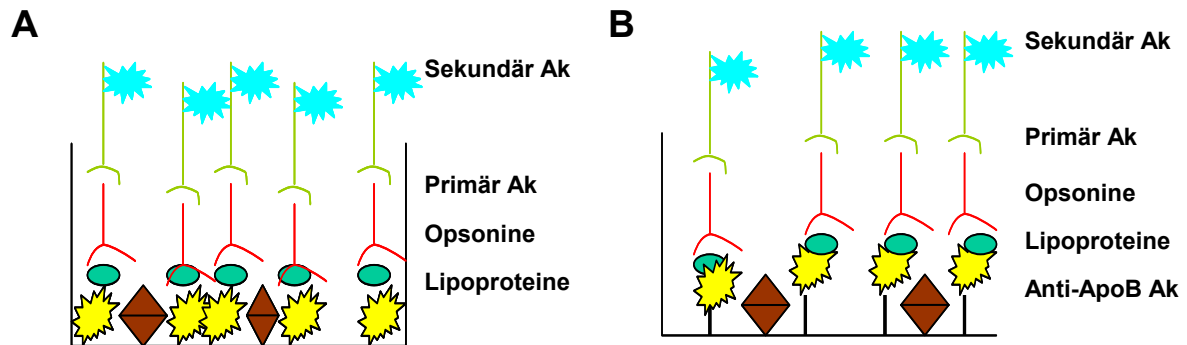
Als Puffer A wurde folgende Komposition verwendet:

- 10 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 2 mM CaCl<sub>2</sub> oder EDTA
- pH 7,4 mit NaCl einstellen

Antigen	Klon	Vertrieb	Markierung
$\beta$ -Amyloid	10H3	Endogen	Biotin
CRP	4C2	Serotec	Unconjugate (*Biotin)
SAP	5.4D.3B	Dianova	Biotin
SAA	T-SAA2	Anogen	Peroxidase

**Tabelle 2:** Spezifische Antikörper, verwendet im ELISA. \* Der Antikörper gegen CRP (4C2) wurde von uns biotiniliert.

Ein alternatives Protokoll basiert auf einem ELISA-Sandwich (Abb. 10B). Hierbei wurden zuerst die Platte mit Ak Anti-ApoB100 (Amersham, UK) beschichtet. Die Oponine und Lipoproteine wurden in Eppendorf-Cups inkubiert, auf die beschichtete Platte appliziert, 1 h bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde eine Lösung mit den Ak gegen die Oponine hinzugegeben. Die Messung erfolgte wie vorher geschrieben. Auf die Anti-ApoB100-beschichtete Platte wurden auch nicht komplexierte Lipoproteine zugegeben und mit einem ApoB100-Biotin Ak (Calbiochem, USA) detektiert.



**Abbildung 10:** Schema der zwei ELISA-Varianten für die Analyse der Opsonisierung.

### 3.3 Elutriation der Monozyten

Monozyten wurden aus venösem Blut durch Leukapherese in einem Spectra Cell-separator (Gambo BCT) gewonnen. Nach der Leukapherese wurden die Monozyten mittels Gegenstromelutriation (J2-MC Zentrifuge mit JE-6B Rotor, Beckmann) gereinigt (Muller et al., 1993). Die Reinheit der isolierten Monozyten war > 95% und wurde durch FACS-Analyse bestätigt.

Die gewonnenen Monozyten wurden mit PBS (w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde mit einem Sysmex Counter bestimmt.

Als Laufpuffer wurde folgende Komposition verwendet:

- PBS (w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ )
- 1,0 % (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung
- 0,5 % (w/v) BSA
- 0,1 % (w/v) Glucose

Die Monozytenkonzentration jeder Fraktion wurde mittels Durchflusszytometrie auf Grund der verschiedenen Scatter-Eigenschaften der Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten bestimmt. Tabelle 3 zeigt das entsprechende Zentrifugationsprotokoll.

<b>Rotation:</b>	<b>2040 rpm</b>	
<b>Rotor Temperatur:</b>	<b>15 °C</b>	
	<b>Flussgeschwindigkeit (ml/min)</b>	<b>Volumen der Fraktion (ml)</b>
<b>Beladung</b>	7	-
<b>Vorlauf</b>	9	150
<b>Fraktionen 1 - 4</b>	12	50
<b>Fraktionen 5 - 8</b>	15	50
<b>Fraktionen 9 - 12</b>	18	50
<b>Fraktionen 13 - 16</b>	20	50
<b>Fraktionen 17 - 19</b>	22	50
<b>Fraktionen 20 - 22</b>	24	50

**Tabelle 3:** Zentrifugationsprotokoll für die Isolierung von Monozyten.

### 3.4 Zellkultur

Alle Inkubationen fanden bei 37°C in einer wassergesättigten 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt.

#### 3.4.1 Kultur von humanen Monozyten

Im ersten Schritt wurden die Zellen in Makrophagen-SFM Medium über Nacht inkubiert. Nach 16 h wurden gleichzeitig mit Beginn der Stimulation 50 ng/ml humanes M-CSF zugegeben. Für Bestimmungen des Lipidgehalts wurden die Zellen in adhärennten 6-Lochplatten (Cell+, Sartledt) inkubiert. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden nicht adhärennte 6-Lochplatten (Costar) verwendet (Abb. 11).

#### 3.4.2 Kultur von humanen Makrophagen

Die frisch gewonnenen Monozyten wurden in Makrophagen-SFM Medium mit 50 ng/ml humanem M-CSF kultiviert. Nach einer viertägigen Differenzierungsperiode wurden 40 µg/ml Lipoproteine oder Komplexe zugesetzt.

Die Bestimmung des Lipidgehalts und die durchflusszytometrischen Analysen bei Makrophagen wurden analog der Methode bei Monozyten durchgeführt (Abb.11).

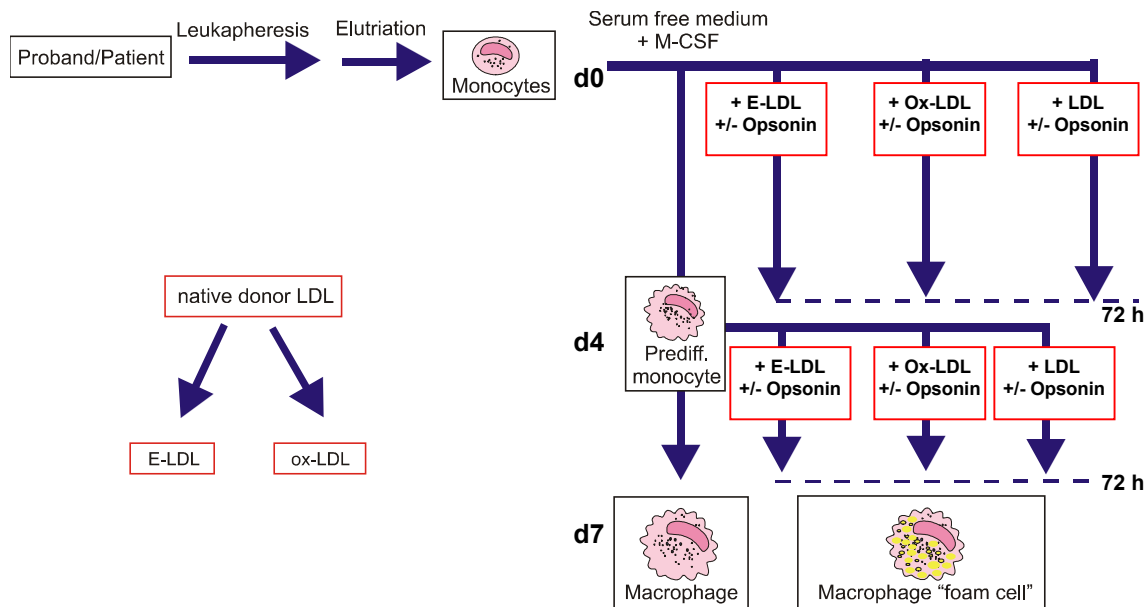


Abbildung 11: Inkubationsschema von Monozyten und Makrophagen.

## 3.5 Präparative Lipoproteintrennung

### 3.5.1 Sequenzielle Ultrazentrifugation

Für die erste Trennung geht man von rekalkifiziertem Plasma mit einer Elektrolytdichte von  $d=1,006$  g/ml aus. In mehreren Ultrazentrifugationsschritten bei den entsprechenden Dichtebereichen erhält man die verschiedenen Lipoproteinfraktionen im Überstand (Tabelle 4) (Havel et al. 1955). Die Unterstände werden nach jeder Zentrifugation (18-48 h bei  $4^{\circ}\text{C}$ ) durch Zugabe von NaBr auf die neue Dichte eingestellt. Die Berechnung der benötigten NaBr-Menge erfolgt entsprechend der Formel:

$$m \text{ NaBr [g]} = V \text{ [ml]} \times \frac{(\text{neue Dichte} - \text{alte Dichte})}{(1 - 0,312 \times \text{neue Dichte})}$$

Lipoprotein-Fraktion	Dichtebereich [g/ml]	Zentrifugalkraft [g]	Rotationsgeschw. [U/min]	Dauer [h]
VLDL	<1,006	250.000	58.000	18
IDL	1,006-1,019	250.000	58.000	24
LDL	1,019-1,063	250.000	58.000	24
HDL	1,063-1,21	180.000	48.000	48
HDL2	1,063-1,125	180.000	48.000	36
HDL3	1,125-1,25	180.000	48.000	48
Gesamt	1,006-1,21	180.000	48.000	48

**Tabelle 4:** Lipoproteinpräparation durch sequenzielle Ultrazentrifugation (Rotor 70 TI)

Der nach der letzten Zentrifugation verbleibende Überstand wird als Lipoprotein defizientes Serum (LPDS) bezeichnet.

### 3.5.2 Dialyse der Lipoproteinfraktionen

Nach der Zentrifugation wurden alle Lipoproteinfraktionen dialysiert, um das NaBr zu entfernen. Dazu wurden Dialyseschläuche aus regenerierter Zellulose mit einer Trenngrenze (MWCO) von 12.000-14.000 g/mol (Serva, Deutschland) für 15 min ausgekocht und am Ende autoklaviert. Die Lipoproteinfraktionen wurden eingefüllt und dreimal 2 h gegen Puffer A und dreimal 2 h gegen Puffer B dialysiert.

#### Puffer A (10-fach)

450 g NaCl

5,6 g EDTA

ad 5000 ml H<sub>2</sub>O

pH 7,4 mit NaOH einstellen

#### Puffer B (10-fach)

450 g NaCl

ad 5000 ml H<sub>2</sub>O

pH 7,4 mit NaOH einstell

Die Pufferlösungen wurden zur Lagerung 10-fach konzentriert angesetzt und vor Gebrauch mit Wasser verdünnt.

### 3.5.3 Analytik der Lipoproteinfraktionen

Nach der Dialyse wurden die Lipoproteinfraktionen steril filtriert (Porengröße 0,45 µm). Der Proteingehalt wurde nach Lowry (Lowry et al., 1951) mit BSA als Standard

bestimmt. Die Qualität der Fraktion wurde mittels dem Elektrophorese-System Rapidophor (LipoScript, Test-Kit Lipidophor All In 12, Immuno AG, USA) überprüft. Dabei wurden die Lipoproteinfraktionen auf einem albuminhaltigen Agarmedium ihrer elektrophoretischen Mobilität entsprechend aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Präzipitation durch Polyanionen, was eine quantitative Auswertung ermöglichte.

## **3.6 Modifizierungen des LDL**

### **3.6.1 E-LDL Präparation**

Die enzymatische Modifikation von LDL entspricht im wesentlichen den publizierten Protokollen von Bhakdi et al. und Suriyaphol et al. (Bhakdi et al., 1995; Suriyaphol et al., 2002), mit der Ausnahme, dass im Fall der Bindung an CRP die Einwirkung der Neuraminidase entfällt. Entsprechend wird LDL (2 mg Protein/ml) mit Trypsin (6,6 mg/ml) und Cholesterinesterase (40 mg/ml) bei 37°C für 24-48 h inkubiert. Das Vorliegen von Oxidationsprodukten wird über eine Bestimmung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) ausgeschlossen (Steinbrecher et al., 1984). Eine Kontamination mit LPS (Lipopolysaccharid) wird mit Hilfe eines Limulus Endotoxin-Assays überprüft.

### **3.6.2 Ox-LDL Präparation**

Die Oxidation von LDL erfolgt nach dem gängigen Verfahren von Wieland et al. unter Verwendung von  $\text{CuSO}_4$  (Wieland et al., 1993), welches eine nicht-präzipitierte, oxidierte Modifikation des LDL liefert. Dazu wird eine Lösung von LDL (1 mg Protein/ml) gegen  $\text{CuSO}_4$  (5 mM, 24-48 h, 4°C). Anschließend wird die Lösung zuerst 1 Mal gegen eine Lösung aus 240  $\mu\text{M}$  EDTA in PBS und danach gegen PBS (4 Mal, 4°C) dialysiert.

## **3.7 Opsonisierung der Lipoproteine**

Die Opsonisierung der Lipoproteine wurde bei der optimalen, durch die ELISA Versuche ermittelten, Konzentration ausgeführt. Alle Opsonisierungsexperimente wurden in Anwesenheit von 40  $\mu\text{g/ml}$  Lipoprotein in Eppendorf-Cups durchgeführt.

Die Inkubation der Lipoproteine mit 15 µg/ml CRP erfolgte in Anwesenheit von CaCl<sub>2</sub> (4 mM) für 2 h bei RT. Analog wurden 40 µg/ml SAP in 2 mM CaCl<sub>2</sub> bei RT 2 h inkubiert. SAA und Aβ<sub>42</sub> wurden 2 h lang bei 37°C mit 15 µg/ml SAA bzw. 16 µg/ml Aβ<sub>42</sub> mit den Lipoproteinen inkubiert. Nach der Komplexierung der Lipoproteine mit den Oponinen wurden diese sofort auf die Zellkultur pipettiert.

## **3.8 Bestimmung der intrazellulären Akkumulation von Lipiden**

Monozyten und Makrophagen, die in adhärennten Platten inkubiert werden, wurden für unterschiedliche Inkubationszeiten mit opsonierten und nicht opsonierten LDL, E-LDL und Ox-LDL (40 µg/ml) wie bereits beschrieben inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation zweimal mit PBS gewaschen, in 0,2 % SDS lysiert und die zellulären Lipide anschließend nach dem Verfahren von Bligh and Dyer (1959) extrahiert. Die Extrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) (Schmitz et al., 1984; Schmitz et al., 1984) oder Tandem Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) (Brugger et al., 1997; Liebisch et al., 1999) analysiert.

### **3.8.1 Proteinbestimmung**

Das Protein der Zellhomogenate wurde mit einem BCA zwei-Komponenten Kit (Pierce, USA) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem ELISA Reader (Tecan, Deutschland) bei 500 nm. Als Standards wurde Rinderserum-Albumin (BSA) im Konzentrationsbereich 25–1500 µg/ml verwendet.

### **3.8.2 Dünnschichtchromatographie**

Der Lipidextrakt wurde in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1/1) so gelöst, dass die Lipidkonzentration ca. 1 µg/µl entsprach. Volumina mit 1 und 8 µg Protein wurden auf eine 10 x 20 cm Silica Gel HPTLC Platte (Merck, Deutschland) aufgetragen und mit einer 80:20:1 (v/v/v) Mischung aus n-Hexan, Diethylether und Eisessig (> 99 %) entwickelt. Die DC Platten wurden danach 8 s in einer Lösung aus Wasser/Methanol/Schwefelsäure (15:15:1 v/v/v) mit 3,2 g/l MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O gefärbt. Nach der Färbung wurden die Platten kurz bei Raumtemperatur getrocknet und danach bei 110°C 30 min erhitzt. Die Lipide wurden in einem CAMAG TLC scanner II (Muttens, Schweiz) in Relation

zu fluorimetrischen Messungen eines externen Standards aus Cholesterin/Triolein/Cholesteryl Oleoate (Sigma, Deutschland) im Konzentrationsbereich 50–250 µg/ml bestimmt.

### 3.8.3 Tandem Massenspektrometrie

Die Proben wurden über direkte Injektion (flow injection) mit einem HTS PAL Autosampler (Zwingen, Schweiz) und einer Agilent 1100 Pumpe (Waldbronn, Deutschland) dem Tandem Massenspektrometer (Quattro Ultima, Micromass, UK) zugeführt. Dazu wurde ein Gemisch aus Methanol und Chloroform (3/1, v/v) mit 10 mM Ammoniumacetat verwendet (Liebisch et al., 1999, Liebisch et al., 2006). Die Internen Standardsubstanzen der UC, EC, Sphingo- und Phospholipide sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Spezies	Abkürzung
C28:0 Phosphatidylcholin	PC 28:0
C44:0 Phosphatidylcholin	PC 44:0
C14:0 Ceramid	Cer 14:0
C17:0 Ceramid	Cer 17:0
C28:0 Phosphatidylethanolamin	PE 28:0
C16-4Me Phosphatidylethanolamin	PE 16-4Me
C17:0 Cholesterinester	EC 17:0
C22:0 Cholesterinester	EC 22:0
D <sub>7</sub> -Cholesterin	D <sub>7</sub> -UC

**Tabelle 5:** Interne Standards

Als Kalibratoren wurden folgende Standards gespiket (Tabelle 6):

<b>Spezies</b>	<b>Abkürzung</b>
C40:0, C34:1, C36:2, C38:4 Phosphatidylcholin	PC 40:0, 34:1, 36:2, 38:4
C16:0, C18:0, C20:0, C24:0, C24:1 Ceramid	Cer 16:0, 18:0, 20:0, 24:0, 24:1
C16:0, C18:0, C18:1 Sphingomyelin	SPM 16:0, 18:0, 18:1
C34:1, C36:2, C38:4, C40:6 Phosphatidylethanolamin	PE 34:1, 36:2, 38:4, 40:6
Cholesterin	UC
C16:0, C18:1, C18:0 Cholesterinester	EC 16:0, 18:1, 18:0

**Tabelle 6:** Kalibratoren

### **3.9 Bestimmung der Oberflächen-Expression von Cer und Cer-Metaboliten auf Makrophagen**

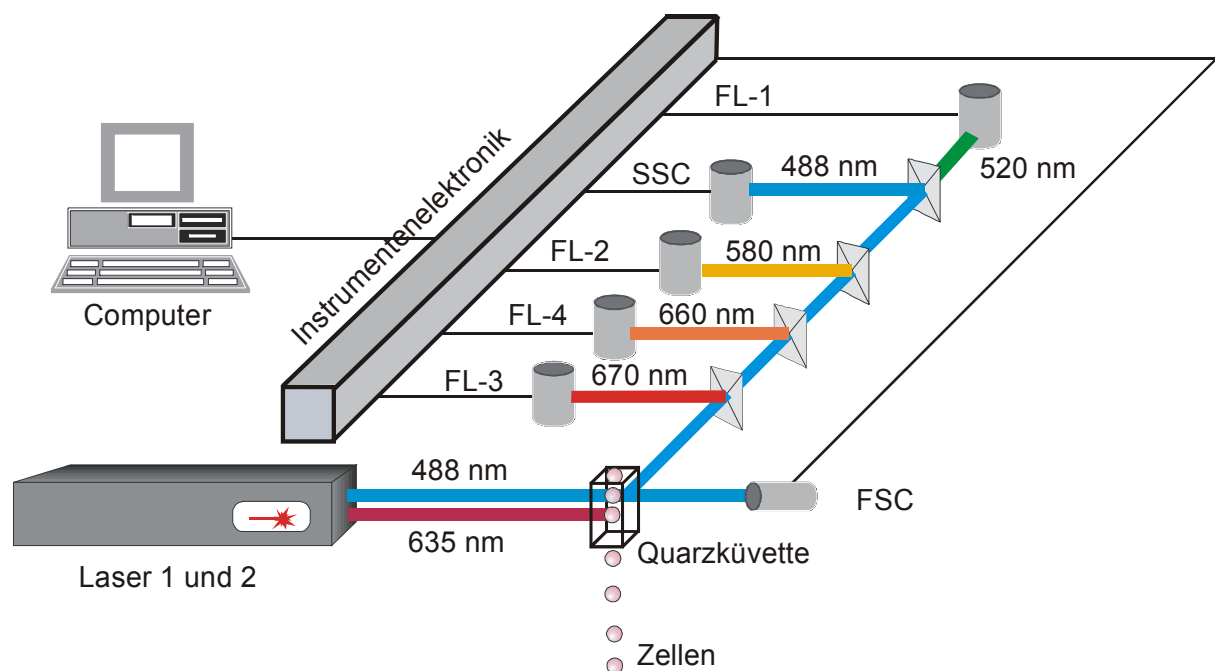
Nach 4 Tagen Differenzierung wurden die Makrophagen mit Komplexen aus LDL, E-LDL und A $\beta$ <sub>42</sub> in Costar Platten 16 h inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert und zweimal gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in PBS/0,5 % BSA in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$  resuspendiert und mit einer gesättigten Konzentration der entsprechenden Antikörper (Tab. 7) 15 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper für die durchflusszytometrischen Messungen waren direkt fluorochrom-markiert oder durch weitere Inkubation mit fluorochrom-markierten, sekundären Reagenzien indirekt markiert. Vor der Messung wurden die Zellen stets zweimal mit PBS/0,5 % BSA Puffer gewaschen.

Antigen	Klon	Vertrieb	Markierung
Cer	MID15B4	Alexis	Biotin
CDw17	G035	Becton-Dickinson	FITC
CD65s	VIM2	Caltag	FITC
CD77	38-13	Coulter/Immunotech	Goat anti rat-PE
GM1 (Cholera Toxin Subunit B)		Molecular Probes	Alexa Fluor 488
Goat F(ab)'2 anti mouse Ig		Becton-Dickinson	FITC
Goat F(ab)'2 anti rat IgM		Dianova	PE

**Tabelle 7:** Spezifische Antikörper, verwendet bei der Durchflusszytometrie. PE (Phycoerythrin), FITC (Fluorescein isothiocyanat).

### 3.10 Durchflusszytometrische Analyse der gefärbten Zellen

Die zellulären Licht-Scatter Signale und drei Fluoreszenzsignale von 20.000 Zellen je Probe wurden in einem FACSCalibur Durchflusszytometer analysiert (Abb. 12) (Kapinski et al., 2004). Die Datenermittlung erfolgte mit Hilfe der Cellquest Software (Becton Dickinson, Deutschland).



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.

## **3.11 Markierung des nativen und modifizierten LDL**

### **3.11.1 Markierung der Lipoproteine mit Dil**

5 µl von 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyaninperchlorat (Dil) in einer Konzentration von 3 mg/ml, verdünnt in DMSO, wurden mit 500 µl lipoproteinarmen Serums verdünnt. Danach wurden 500 µl natives oder modifiziertes LDL (1 mg/ml) zugegeben und 12 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung mit den Dil-markierten Lipoproteinen wurde vom freien Farbstoff durch Ultrazentrifugation in NaBr-Gradient Lösung ( $d < 1,063$  g/ml) getrennt. Am Schluss wurde die Lösung mit den gefärbten Lipoproteinen reichlich gegen PBS dialysiert (Pitas et al., 1981).

### **3.11.2 Analyse der Oberflächenbindung von Dil-gefärbten LDL und modifizierten LDL auf Monozyten und Makrophagen**

Um die Bindung von mit Dil-vorgefärbten LDL und modifizierten LDL bzw. E-LDL und Ox-LDL an Monozyten und Makrophagen zu analysieren, wurden zu  $5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Makrophagenmedium 5 µg Dil-Lipoproteine gegeben und 60 min bei 4°C in Polypropylenröhrchen inkubiert, dann bei RT zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach Waschen mit 3 ml PBS wurde die zellassoziierte Dil-Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch analysiert (FL2) (Abb. 12).

### **3.11.3 Identifikation von Oberflächenrezeptoren für native und opsonisierte Lipoproteine auf Monozyten und Makrophagen**

Monozyten und Makrophagen wurden in nicht adhärenente Platten inkubiert und danach in FACS-Tubes überführt. Immunostaining und Durchflusszytometrie wurden gemäß den vorläufigen Protokollen von Rothe et al. und Allen et al. untersucht (Rothe et al., 1996; Allen et al., 1992). Zusammengefasst wurden die Zellen in PBS resuspendiert und zweimal gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Zellen mit PBS/0,5 % BSA auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^5/100$  µl verdünnt und mit einer gesättigten Konzentration der entsprechenden Antikörper (Tab. 8) 15 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper für die durchflusszytometrischen Messungen waren direkt fluorochrom-markiert oder durch weitere Inkubation mit fluorochrom-markierten, sekundären Reagenzien indirekt markiert. Vor der Messung wurden die

Zellen zweimal mit PBS/0,5 % BSA Puffer gewaschen. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet.

Antigen	Klon	Vertrieb	Markierung
CD64/Fc $\gamma$ RI	32.2	Caltag	PE
CD32/Fc $\gamma$ RII	C1KMS	Caltag	PE
CD16/Fc $\gamma$ RIII	3G8	Caltag	PE
CD36	SMO	Ancell	Biotin
CD36	FA6-152	Beckmann	FITC
CD91	8G1	Progen	Biotin
CLA1	25	Becton-Dickinson	Unconjugate
Peptide fFML		Molecular Probes	FITC
Goat F(ab)'2 anti mouse Ig		Becton-Dickinson	FITC
Goat F(ab)'2 anti mouse Ig		Becton-Dickinson	PE

**Tabelle 8:** Spezifische Antikörpern verwendet im Durchflusszytometrie. PE (Phycoerythrin), FITC (Fluorescein isothiocyanat).

### 3.12 Zelluläre Färbung und konfokale Mikroskopie

Für die floureszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme in Makrophagen von E-LDL und A $\beta$ <sub>42</sub>-E-LDL, wurden 4 Tage vordifferenzierte Makrophagen 2 h bei 37°C mit opsonierte und nicht-opsonierte E-LDL in LAB-TEK Borosilikat Schale (Nunc International, USA) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min bei RT mit 100 nM Nilrot (Molecular Probe, USA) gefärbt. Schließlich wurden die Makrophagen mit PBS gewaschen und mikroskopisch analysiert. Der Floureszenz des Farbstoffes Nilrot wurde durch einem TCS 4D invers konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Leica Lasertechnik, Deutschland) ausgerüstet mit einer ArKr 75 mV gemischte Ion-Laser (Melles Griot, Omnichrome, USA) für Multiparameter Zellanalyse. Die Fluoreszenzbilder wurden mit ein 568 nm Laser Linie (Exzitation) gemessen und mit eine 680/30 Bandpassfilter (Emission) bestimmt. Acquisition

wurde mit den ScanWare software vorgeführt. Der Analyse der Bildern wurde durch Metamorph software (Universal Imaging, USA) durchgeführt.

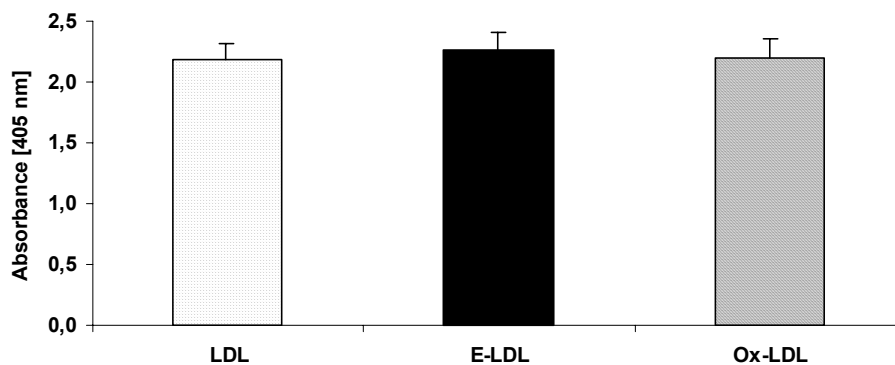
### **3.13 Statistik**

Sofern nicht anders angegeben wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus mehreren unabhängigen Messungen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels Student's t-Test ermittelt. Als signifikant wurden Unterschiede ab  $p < 0,05$  gewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Interaktion von Lipoproteinen mit Proteinen des Immunsystems

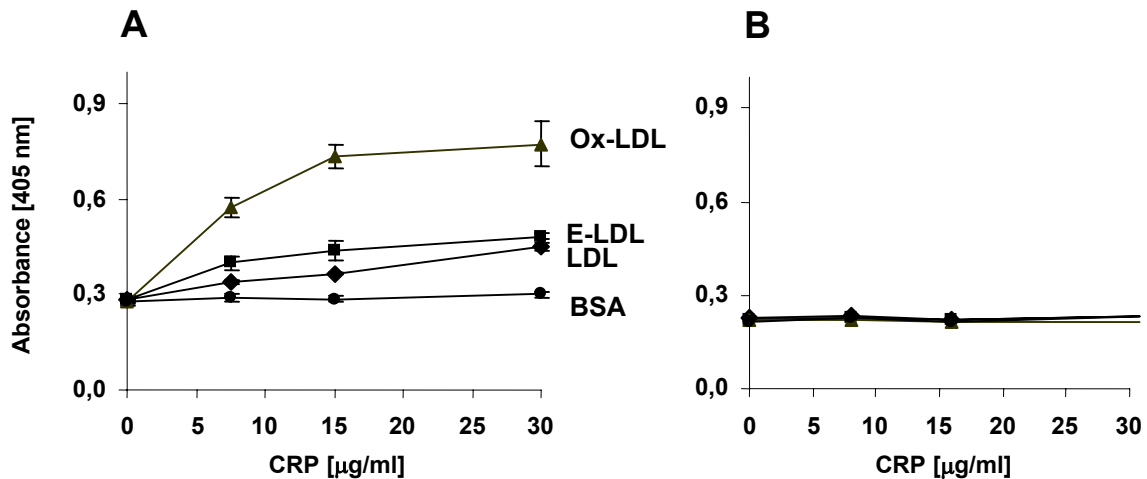
Zunächst wurde zur Untersuchung der Opsonisierung der Lipoproteine (LP) die Bindung von C-reaktivem Protein (CRP), Serum Amyloid P (SAP),  $\beta$ -Amyloid(1-42) Peptid ( $A\beta_{42}$ ) und Serum Amyloid A (SAA) in einem ELISA-Format analysiert. Um festzustellen, ob die drei Lipoproteine LDL, E-LDL und Ox-LDL an die Mikrotiter-Platte binden, wurde anfangs deren Bindungsaffinität nach Inkubation der Platte mit den LP und einem ApoB100 Antikörper durch ein ELISA-Protokoll überprüft. Alle drei Lipoproteine zeigten dabei identische Bindungsaffinität an die ELISA-Platte (Abb. 13).



**Abbildung 13: Bindung von LDL, E-LDL und Ox-LDL an die ELISA-Platte.**

Prüfung der Verteilung der Lipoproteine in der ELISA-Platte. N=3

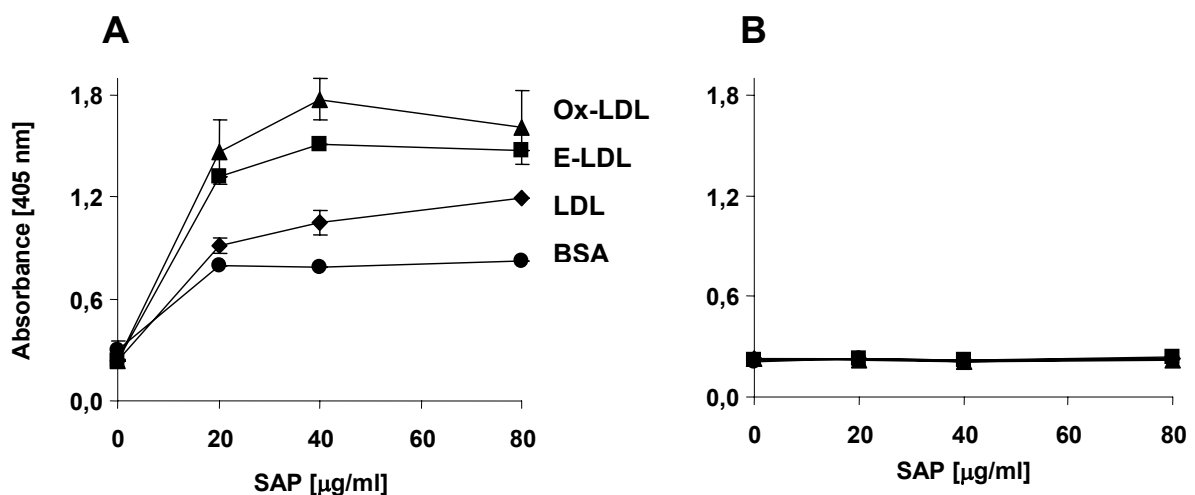
Als nächstes wurden die Protein/Lipoprotein Bindungsaffinitäten untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, daß das Akute-Phase Protein und Pentraxin CRP in Anwesenheit von Calcium über einen weiten Konzentrationsbereich dosisabhängig an Ox-LDL, E-LDL und LDL bindet. Die höchste Bindung wird hierbei für Ox-LDL bei 15  $\mu$ g/ml CRP erreicht, ohne weitere Steigerung bei höheren Konzentrationen von CRP (Abb. 14A). Die Bindung an E-LDL und LDL steigt jedoch zwischen 15  $\mu$ g/ml und 30  $\mu$ g/ml CRP noch geringfügig an. BSA wurde stets als Kontrolle der unspezifischen Antikörperbindung mit den LP eingesetzt. Bei der Untersuchung in Anwesenheit von EDTA an Stelle von Calcium zeigte sich bei allen drei LP keine Bindung (Abb. 14B).



**Abbildung 14: Bindung von CRP an die verschiedenen Lipoproteine.**

Die Graphik zeigt einen Vergleich zweier ELISA in Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  (A) oder EDTA (B). N=3

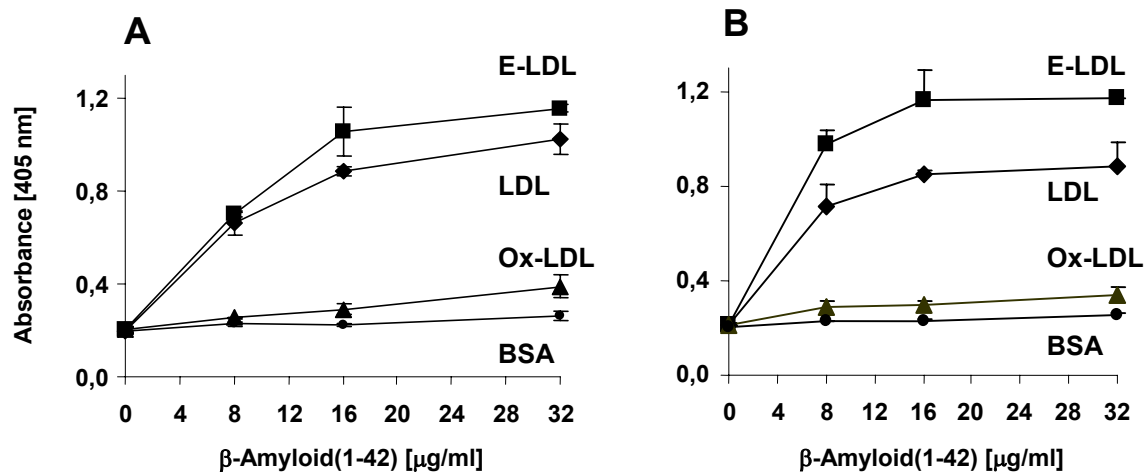
Das zweite Pentraxin, SAP, bindet an dieselben Lipoproteine mit ähnlicher Calcium-Abhängigkeit wie CRP (Abb. 15A). Die Bindung an Ox-LDL und E-LDL zeigten eine Sättigung bei 40  $\mu\text{g/ml}$  SAP, während die Bindung an LDL zwischen 40  $\mu\text{g/ml}$  und 80  $\mu\text{g/ml}$  SAP noch weiter anstieg. Mit EDTA statt  $\text{CaCl}_2$  ließ sich bei SAP wie bei CRP keine Bindung beobachten (Abb. 15B).



**Abbildung 15: Bindung von SAP an die verschiedenen Lipoproteine.**

Die Graphik zeigt einen Vergleich zweier ELISA in Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  (A) oder EDTA (B). N=3

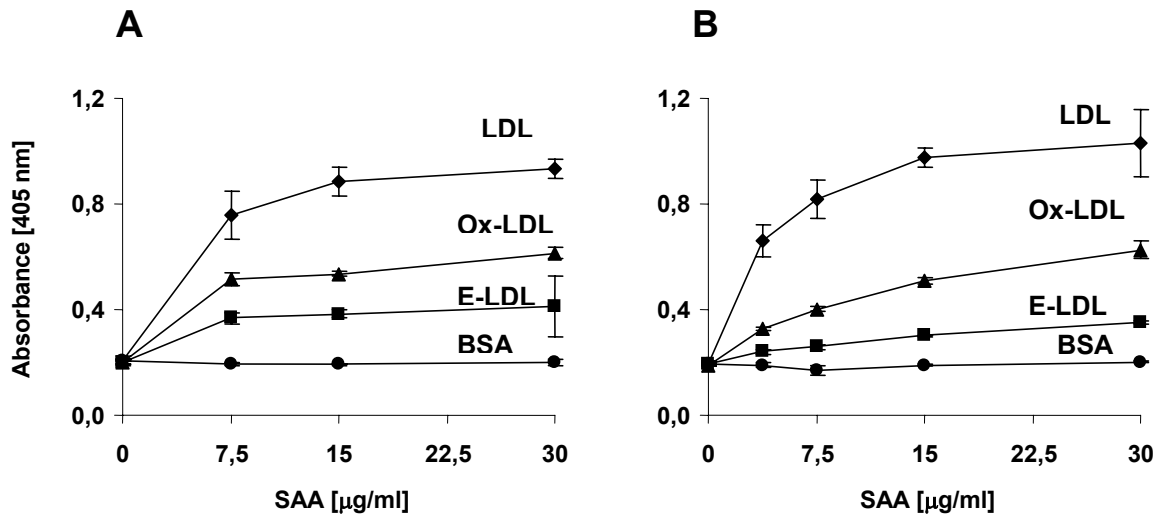
Das A $\beta_{42}$  Peptid unterscheidet sich von CRP und SAP durch eine Calcium unabhängige Bindung, wobei E-LDL die am stärksten ausgeprägte Bindung an A $\beta_{42}$  in Vergleich zu LDL und Ox-LDL aufwies. Eine Sättigung lässt sich für E-LDL und LDL bei 16  $\mu\text{g/ml}$  A $\beta_{42}$  beobachten, während die Bindung an Ox-LDL zwischen 16  $\mu\text{g/ml}$  und 32  $\mu\text{g/ml}$  noch anstieg (Abb. 16A, B).



**Abbildung 16: Bindung von A $\beta_{42}$  an die verschiedenen Lipoproteine.**

Die Graphik zeigt einen Vergleich zweier ELISA in Lösung mit CaCl<sub>2</sub> (A) oder EDTA (B). N=3

Das zweite wichtige humane Akute-Phase Protein SAA zeigt eine A $\beta_{42}$ -ähnliche, Calcium unabhängige Bindung an die untersuchten Lipoproteine. Allerdings wird die höchste und am stärksten ausgeprägte Bindung bei LDL bei einer Konzentration von 15  $\mu\text{g/ml}$  SAA beobachtet, ohne eine weitere Steigerung bei höheren Konzentrationen (Abb. 17). Die Bindung an Ox-LDL und E-LDL zeigte keine deutliche Sättigung im untersuchten Konzentrationbereich von SAA. Die Lösungen mit CaCl<sub>2</sub> (Abb. 17A) zeigten keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich mit den entsprechenden Lösungen mit EDTA (Abb. 17B).

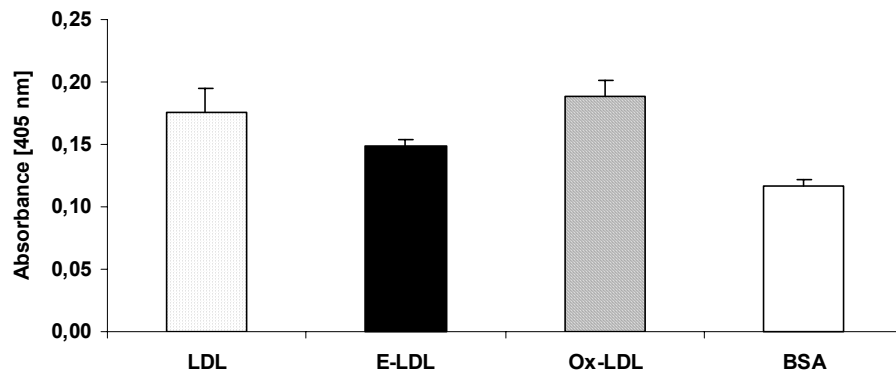


**Abbildung 17: Bindung von SAA an die verschiedenen Lipoproteine.**

Die Graphik zeigt einen Vergleich zweier ELISA in Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  (A) oder EDTA (B). N=3

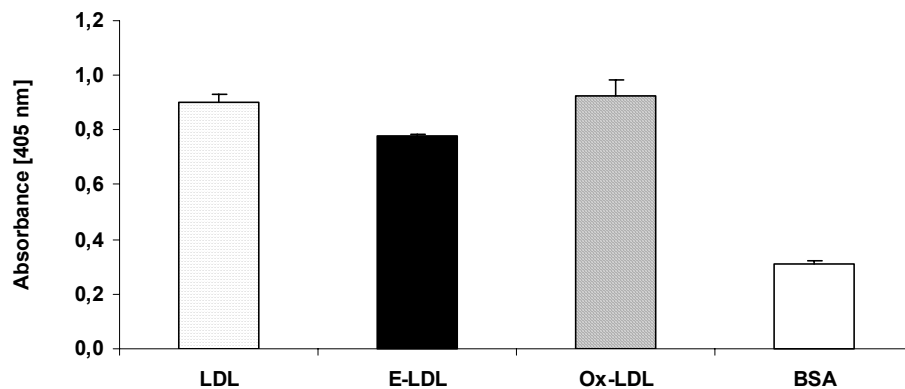
Da Strukturänderungen der Lipoproteine bei der Bindung an die Plattenoberfläche ihre Bindung an die Opsonine möglicherweise beeinflussen könnten, wurde die Bindung von CRP und  $\text{A}\beta_{42}$  statt in ELISA-Platten in Eppendorf-Cups untersucht. Dabei zeigte der Vergleich der verschiedenen Lipoproteine mit BSA, daß alle drei LP von beiden Proteinen analog wie in Platten opsonisiert wurden (Abb. 18 und 19).

Um zu überprüfen, ob die Bindung der Lipoprotein Komplexe über ApoB100 an den entsprechenden Antikörper auf der ELISA-Platte erfolgt, wurde ein Experiment mit verschiedenen freien Lipoproteinen durchgeführt. Aus Abbildung 20 ist ersichtlich, daß die Bindungen aller drei LP an die ELISA-Platte sehr ähnliche Profile aufweisen wie bei den Bindungen in Cups (Abbildungen 18 und 19; Opsonin/Lipoprotein Komplexe), wobei E-LDL wieder die geringste Affinität zur Bindung an den ApoB100 Antikörper zeigt. Die stärkste Bindungsaffinität zeigte Ox-LDL, gefolgt von LDL.



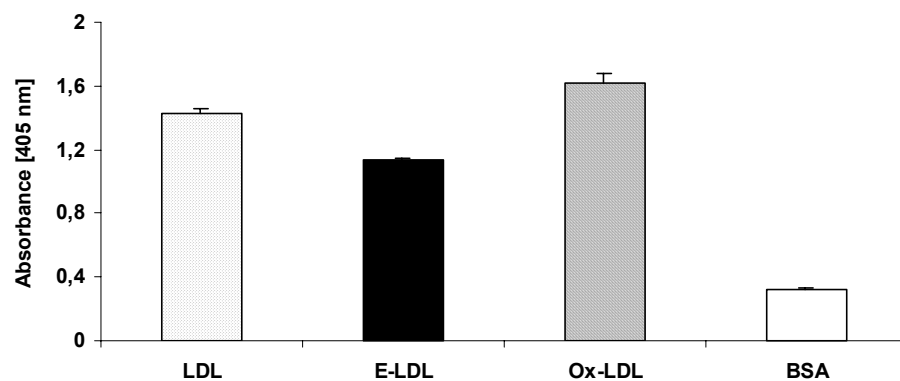
**Abbildung 18: Bindung von CRP an die Lipoproteine in Cups.**

Die Inkubation erfolgte in  $\text{CaCl}_2$ -haltigem Puffer, 15  $\mu\text{g/ml}$  CRP und 40  $\mu\text{g/ml}$  Lipoproteine. N=3, mit ELISA gemessen



**Abbildung 19: Bindung von  $\text{A}\beta_{42}$  an die Lipoproteine in Cups.**

Die Inkubation erfolgte in EDTA-Puffer, 16  $\mu\text{g/ml}$   $\text{A}\beta_{42}$  und 40  $\mu\text{g/ml}$  Lipoproteine. N=3, mit ELISA gemessen



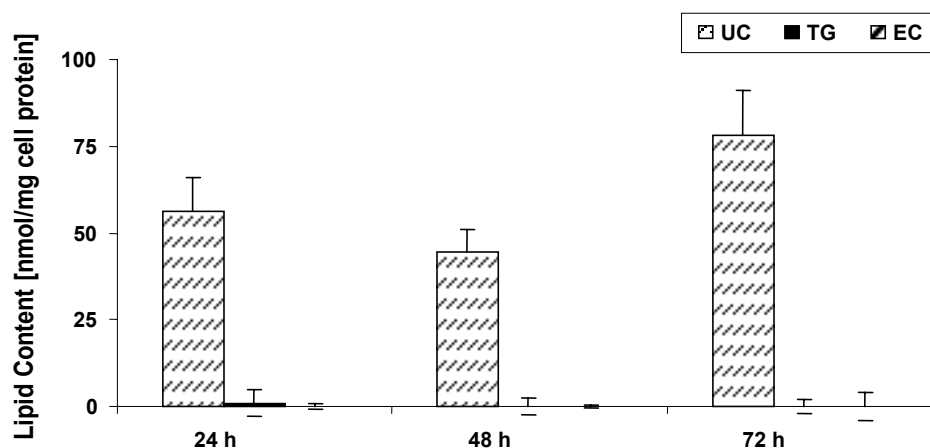
**Abbildung 20: Bindung von LDL, E-LDL und Ox-LDL an die ELISA-Platte, beschichtet mit ApoB100 Antikörper.**

## 4.2 Analyse der Modifikation des zellulären Lipidstoffwechsels durch opsonisierte Lipoproteine

In einem zweiten Schritt wurden die biologischen Effekte der opsonierten Lipoproteine auf den zellulären Lipidstoffwechsel von Monozyten und Makrophagen analysiert. Hierbei kamen die in Abbildung 11 (Material und Methoden) gezeigten Kulturmodelle in Kombination mit verschiedenen Methoden der Lipidanalytik zur Anwendung. Der zelluläre Lipidstoffwechsel wurde durch Inkubation von Monozyten des Blutes mit präformierten Komplexen der verschiedenen modifizierten Lipoproteine mit Akute-Phase Proteinen in Langzeitansätzen (24 h, 48 h, 72 h) kinetisch untersucht. Die nach 4 Tagen differenzierten Makrophagen wurden in Kurz- und Langzeitansätzen (zwischen 30 min und 72 h) kinetisch untersucht.

### 4.2.1 Analyse der zellulären Akkumulation von Cholesterin, Triglyzeriden und Cholesterinestern in frisch isolierten Monozyten

Zunächst wurden die zellulären Konzentrationen von Cholesterin (UC), Triglyzeriden (TG) und Cholesterinestern (EC) in frisch isolierten Monozyten, die unter nicht aktivierten Bedingungen (24 h, 48 h und 72 h) inkubiert wurden, mit Dünnschicht-Chromatographie (DC) ermittelt. Insgesamt betrug die Konzentration von UC bei allen drei Zeitpunkten unter 100 nmol/mg Zellprotein, während TG und EC auf Grund geringer Konzentrationen mit DC nicht detektierbar waren (Abb. 21).

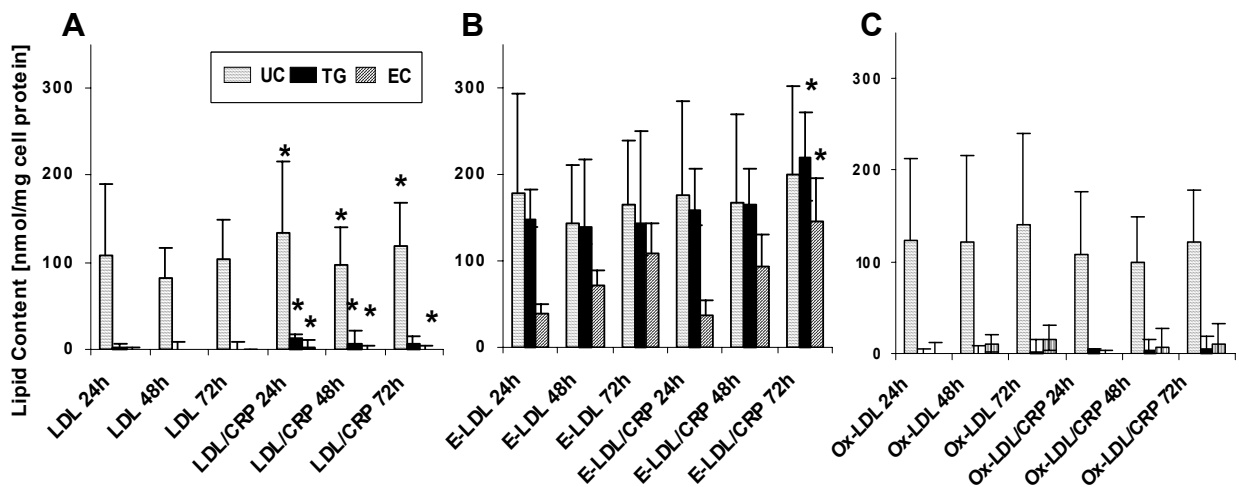


**Abbildung 21: DC-Bestimmung der Konzentration von UC, TG und EC in Monozyten.**

Dokumentiert sind die Konzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h. N=5

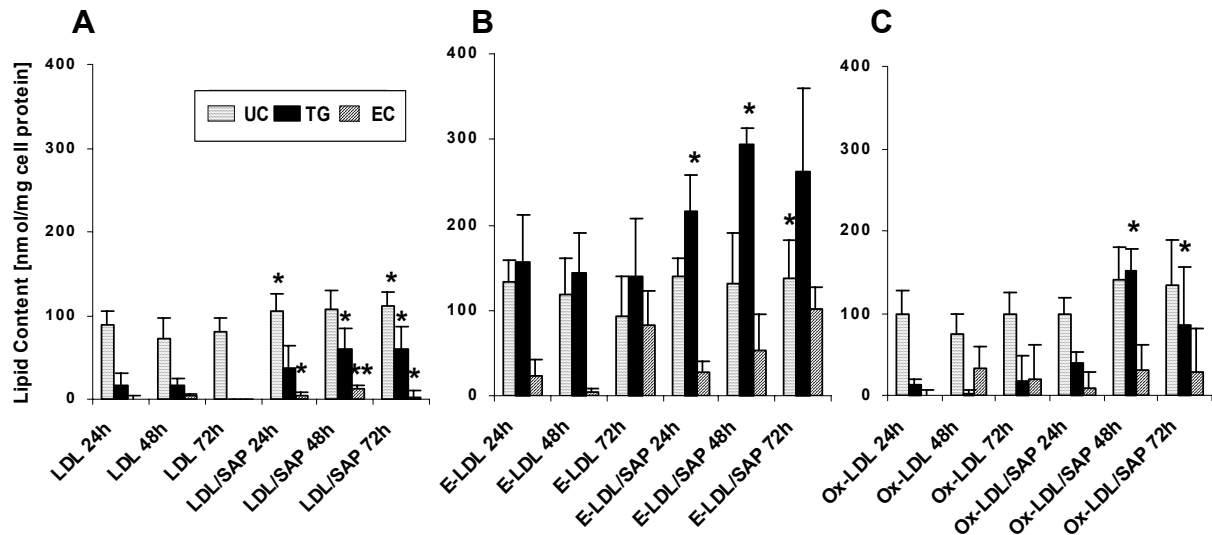
Die mit Komplexen aus LDL und CRP inkubierten Monozyten zeigten eine gesteigerte Akkumulation von TG, UC und EC bereits nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen (Abb. 22A). Verglichen mit LDL ist bei E-LDL ein deutlicher Einfluss zu beobachten. Die Opsonisierung mit CRP steigert diesen Effekt jedoch nicht wesentlich (Abb. 22A, B). Die Lipidakkumulation mit Ox-LDL blieb unter diesen Bedingungen nahezu konstant (Abb. 22C).

Die Opsonisierung der LP mit SAP zeigte bei Inkubation mit frischen Monozyten vor allem eine Beeinflussung der Akkumulation von Triglyzeriden, die bereits bei 24-stündiger Inkubation bei E-LDL ausgeprägt war (Abb. 23B). Auch bei LDL und Ox-LDL, die in Abwesenheit von SAP kaum eine Akkumulation von Triglyzeriden zeigten, trat nach 48-stündiger Inkubation eine deutliche Akkumulation dieser Lipide auf (Abb. 23A, C).



**Abbildung 22: DC-Bestimmung der Konzentration von UC, TG und EC in Monozyten nach Inkubation mit LP oder LP/CRP-Komplexen.**

Dokumentiert ist die zelluläre Konzentration der Neutrallipide nach Inkubation mit LDL bzw. LDL/CRP (A), E-LDL bzw. E-LDL/CRP (B) und Ox-LDL bzw. Ox-LDL/CRP (C) nach 24 h, 48 h und 72 h. \* $p < 0,05$  im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=5

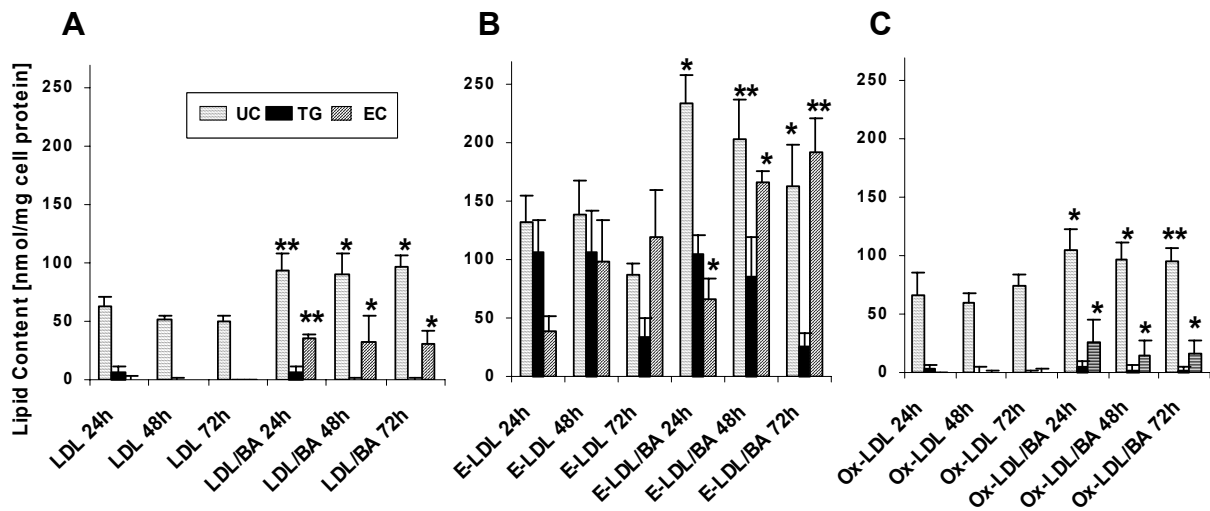


**Abbildung 23: DC-Bestimmung der Konzentration von UC, TG und EC in Monozyten nach Inkubation mit LP oder LP/SAP-Komplexen.**

Dokumentiert ist die zelluläre Konzentration der Neutrallipide nach Inkubation mit LDL bzw. LDL/SAP (A), E-LDL bzw. E-LDL/SAP (B) und Ox-LDL bzw. Ox-LDL/SAP (C) nach 24 h, 48 h und 72 h. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=5

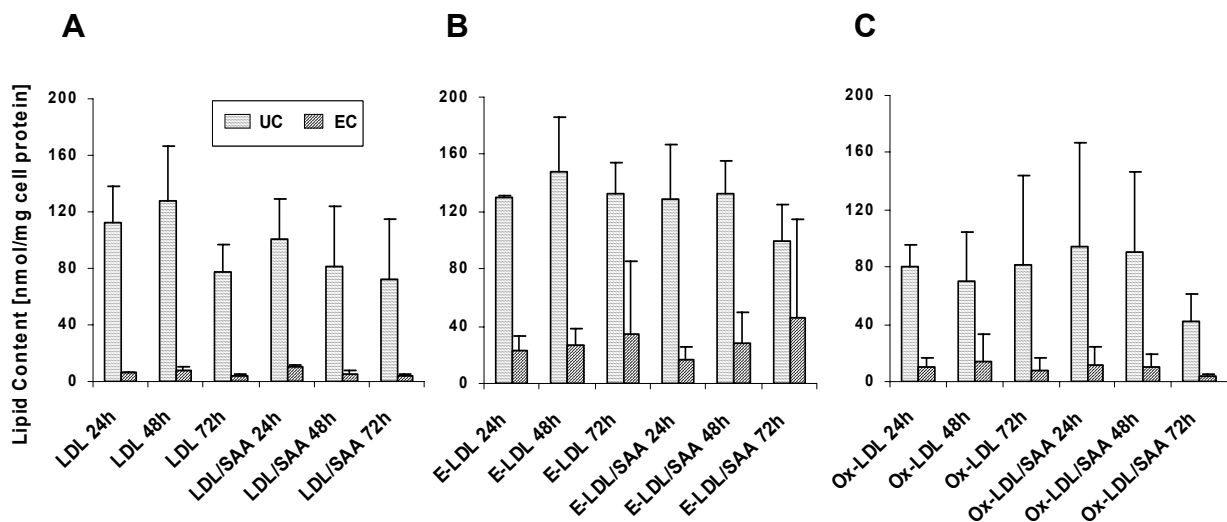
Die Opsonisierung mit  $A\beta_{42}$  führte bei allen drei Lipoproteinen zu einer selektiven Steigerung der Akkumulation mit freiem und verestertem Cholesterin in frischen Monozyten bereits nach 24-stündiger Inkubation (Abb. 24A, B, C). Der größte Einfluss wurde bei E-LDL/ $A\beta_{42}$  (Abb. 24B) beobachtet, wobei eine deutliche zeitabhängige Akkumulation von EC und gleichzeitige zeitabhängige Senkung der zellulären UC-Akkumulation auftrat.

Die erst am Ende dieser Arbeit etablierte massenspektrometrische Analyse (ESI-MS/MS) von Monozyten, inkubiert mit Komplexen aus Lipoproteinen und SAA, zeigten keine besondere Akkumulation von freiem und verestertem Cholesterin verglichen mit den unkomplexierten Lipoproteinen (Abb. 25A, B, C).



**Abbildung 24: DC-Bestimmung der Konzentration von UC, TG und EC in Monozyten, vorbehandelt mit LP oder LP/A $\beta$ <sub>42</sub>.**

Dokumentiert ist die zelluläre Konzentration der Neutrallipide nach Inkubation mit LDL bzw. LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> (A), E-LDL bzw. E-LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> (B) und Ox-LDL bzw. Ox-LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> (C) nach 24 h, 48 h und 72 h. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=5

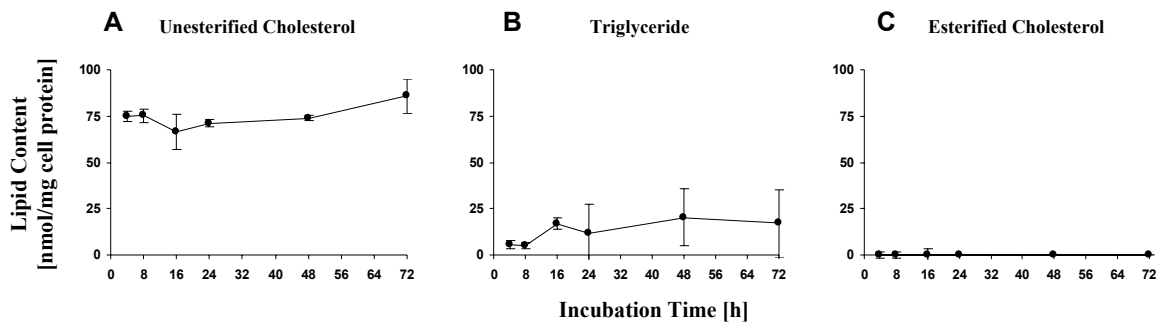


**Abbildung 25: ESI-MS/MS-Bestimmung der Konzentration von UC und EC in Monozyten nach Inkubation mit LP oder LP/SAA.**

Dokumentiert ist die zelluläre Konzentration der Neutrallipide nach Inkubation mit LDL bzw. LDL/SAA (A), E-LDL bzw. E-LDL/SAA (B) und Ox-LDL bzw. Ox-LDL/SAA (C) nach 24 h, 48 h und 72 h. N=5

## 4.2.2 Analyse der zellulären Akkumulation von Cholesterin, Triglyzeriden und Cholesterinestern in Makrophagen

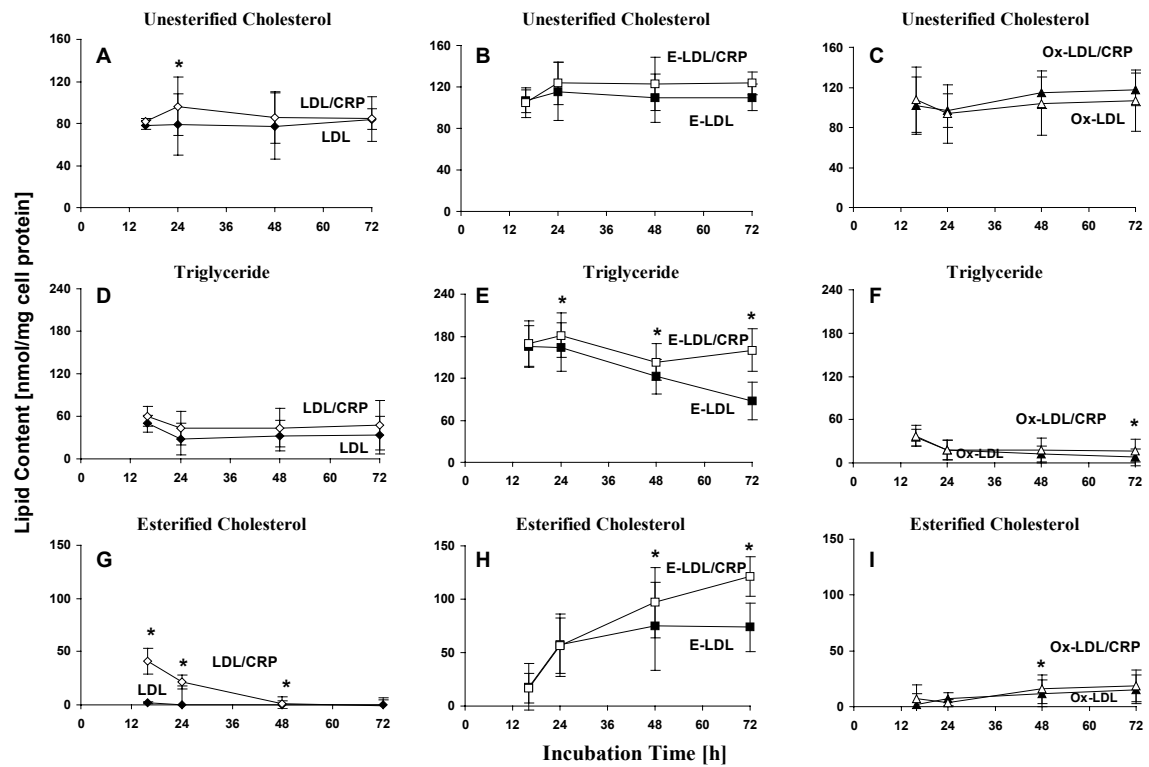
Die Bestimmung von UC, TG und EC in M-CSF vordifferenzierten Makrophagen über einen Zeitraum von 4 Tagen zeigte eine relativ konstante UC Konzentration von ca. 75 nmol/mg Zellprotein (Abb. 26A), während die Konzentration der TG nach einem Anstieg zwischen 8 und 16 Stunden relativ konstant bei ca. 20 nmol/mg Zellprotein blieb (Abb. 26B). Der Gehalt an EC blieb unter der Messgrenze (Abb. 26C).



**Abbildung 26: Bestimmung der Konzentration von UC, TG und EC in Makrophagen** nach Inkubation in Kulturmedium für 4 h, 8 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. N=6

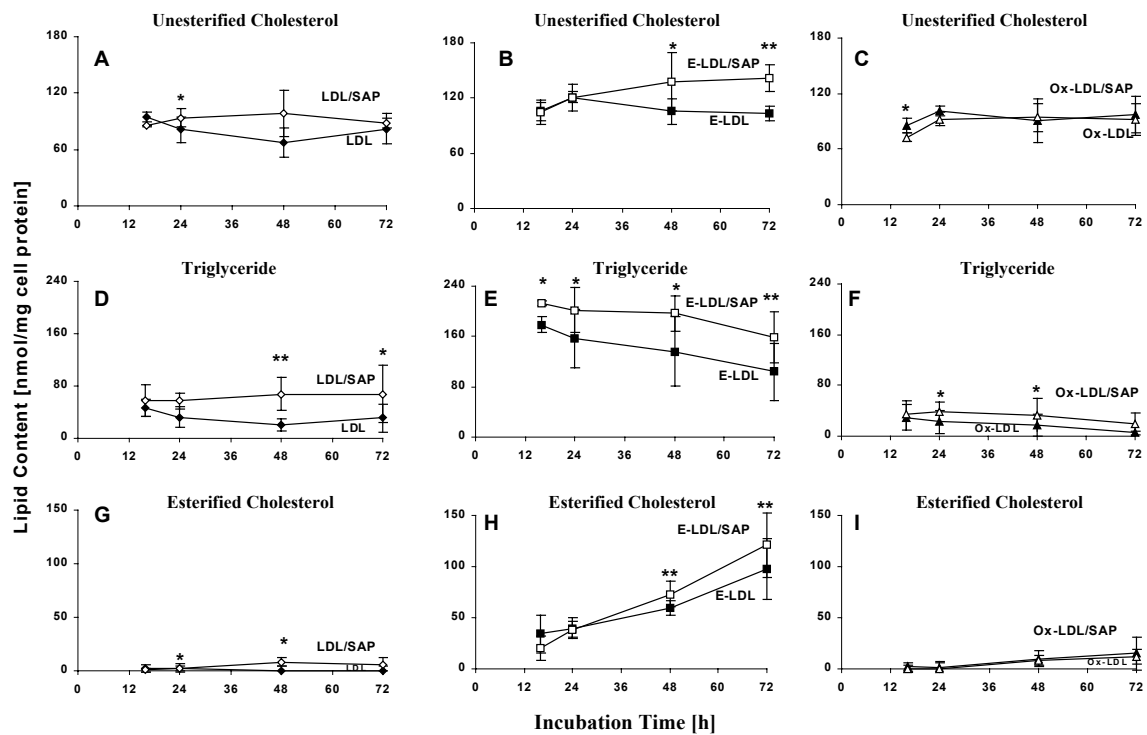
Vier Tage vordifferenzierte Makrophagen zeigten unter den gleichen Bedingungen wie bei den Experimenten mit Monozyten vor allem eine ausgeprägte Steigerung der zellulären Menge von Triglyzeriden und Cholesterinestern nach Inkubation mit E-LDL/CRP Komplexen im Vergleich zu E-LDL allein (Abb. 27E, H). Bei LDL wurde nur anfangs eine Steigerung von Cholesterinestern durch CRP beobachtet (Abb. 27G), während die Lipidakkumulation bei Ox-LDL unbeeinflusst blieb (Abb. 27C, F, I).

In ähnlicher Weise wie bei Monozyten induzierte SAP in Komplexen mit Lipoproteinen bei Beladung von vordifferenzierten Makrophagen eine vorwiegende Akkumulation von Triglyzeriden, die für E-LDL früh (Abb. 28E) und für LDL (Abb. 28 A) und Ox-LDL (Abb. 28F) zu einem späteren Zeitpunkt eintrat. E-LDL/SAP Komplexe zeigten auch eine Steigerung von freiem und verestertem Cholesterin (Abb. 28B, H).



### Abbildung 27: Bestimmung der Konzentration der Neutrallipide in Makrophagen

nach Inkubation mit LDL oder LDL/CRP, E-LDL oder E-LDL/CRP und Ox-LDL oder Ox-LDL/CRP für 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. \*p < 0,05 im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=6



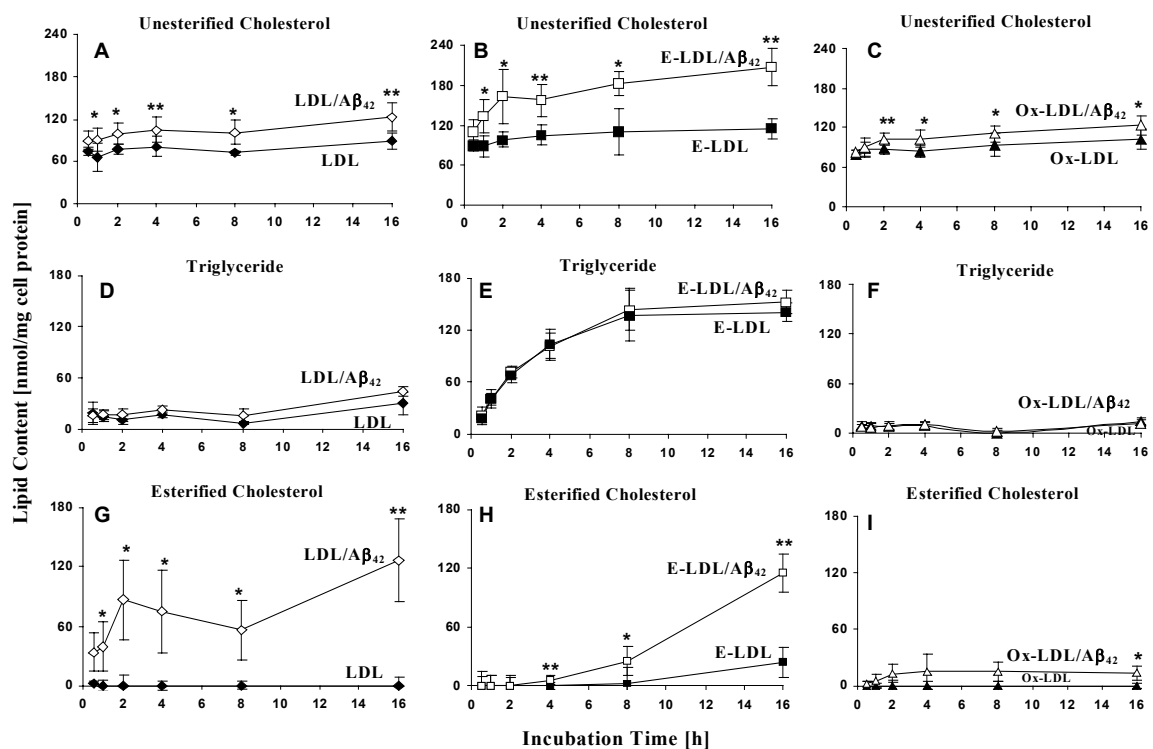
**Abbildung 28: Bestimmung der Konzentration der Neutrallipide in Makrophagen**

nach Inkubation mit LDL oder LDL/SAP, E-LDL oder E-LDL/SAP und Ox-LDL oder Ox-LDL/SAP für 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP.  $N=6$

Die Opsonisierung mit  $A\beta_{42}$  bewirkte auch bei vordifferenzierten Makrophagen eine selektive Steigerung der Akkumulation von UC (Abb. 29A, B, C) und EC (Abb. 29G, H, I) bei allen drei Lipoproteinen nach 1-stündiger Inkubation. Bei TG konnte kein Einfluss beobachtet werden (Abb. 29D, E, F). Die am höchsten aufgeprägte Akkumulation von UC und EC zeigte die Behandlung der Makrophagen mit E-LDL/ $A\beta_{42}$ . Interessanterweise zeigte die Akkumulation von EC nach Behandlung mit LDL/ $A\beta_{42}$  einen frühen Anstieg gefolgt von relativ konstanten Konzentrationen im späteren Verlauf (Abb. 29G). Die EC Konzentrationen zeigten nach Inkubation mit E-LDL/ $A\beta_{42}$  eine Zeitabhängigkeit und eine ungesättigte Steigerung (Abb. 29H).

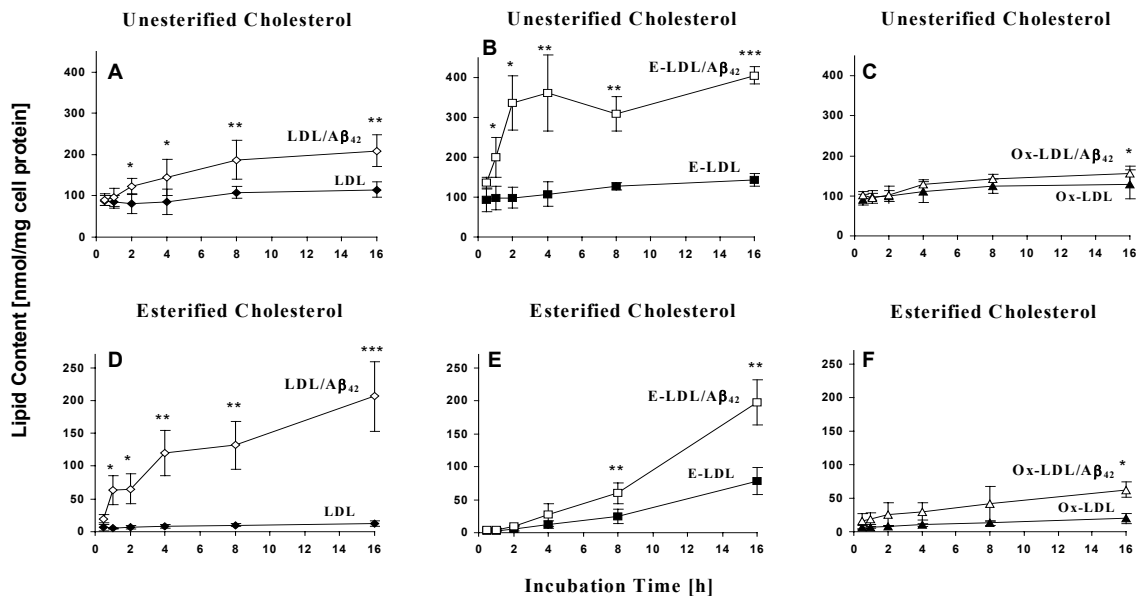
Bei Anwendung moderner, empfindlicher und zuverlässiger Analysemethoden wie der Elektrospray-Ionisierungs Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) konnte die allgemeine Akkumulation von UC und EC, die durch DC bestimmt wurde (Abb. 29), bestätigt werden (Abb. 30). Nach Behandlung der Zellen mit dem LDL/ $A\beta_{42}$  Komplex zeigten diese eine zeitabhängige und bei 16 h gesättigte Steigerung der

zellulären UC Akkumulation. Bei EC hingegen stieg die Akkumulation kontinuierlich an (Abb. 30A, D). Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Inkubation mit E-LDL/A $\beta_{42}$  gefunden (Abb. 30B, E). Begleitend konnte festgestellt werden, dass die Akkumulation von EC im Vergleich mit den zwei anderen opsonisierten Lipoproteinen LDL und Ox-LDL am höchsten war. Inkubationen mit opsonisiertem Ox-LDL zeigten ähnliche UC- und EC-Akkumulationsmuster wie bei DC (Abb. 30C, F und 29C, I). Ein wichtiger Aspekt bei dem Vergleich zwischen den Ergebnissen mit Tandem-Massenspektrometrie und Dünnschichtchromatographie ist die Messgrenze (Nachweisgrenze) bzw. die Empfindlichkeit der Methoden. UC konnte über beide Methoden ohne Probleme quantifiziert werden, jedoch war die Quantifizierung der zellulären EC Konzentrationen mittels DC nicht immer möglich, da die Konzentrationen unterhalb der Messgrenze lagen.



**Abbildung 29: DC-Bestimmung der Konzentrationen von UC, TG und EC in Makrophagen**

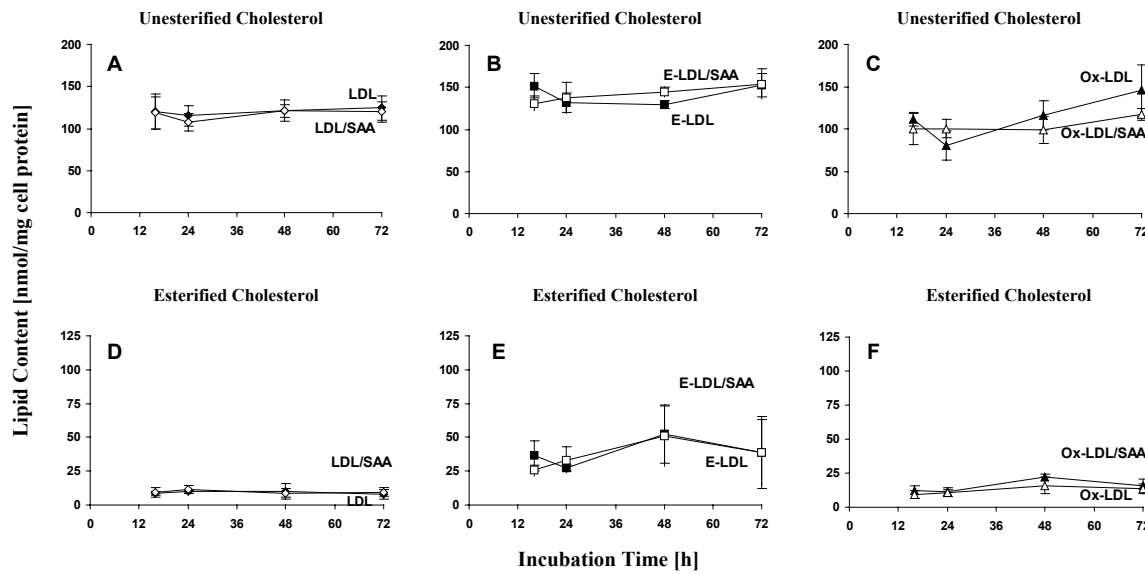
nach Inkubation mit LDL oder LDL/A $\beta_{42}$ , E-LDL oder E-LDL/A $\beta_{42}$  und Ox-LDL oder Ox-LDL/A $\beta_{42}$  für 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 16 h. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=6



**Abbildung 30: ESI-MS/MS-Bestimmung der Konzentrationen von UC und EC in Makrophagen**

nach Inkubation mit LDL oder LDL/A $\beta_{42}$ , E-LDL oder E-LDL/A $\beta_{42}$  und Ox-LDL oder Ox-LDL/A $\beta_{42}$  für 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 16 h. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=6

Die SAA Opsonisierung bewirkte bei vordifferenzierten Makrophagen im Gegensatz zu A $\beta_{42}$  keine selektive Steigerung der Akkumulation von UC (Abb. 31A, B, C) und EC (Abb. 31D, E, F).



### Abbildung 31: Bestimmung der Konzentrationen von UC und EC in Makrophagen

nach Inkubation mit LDL oder LDL/SAA, E-LDL oder E-LDL/SAA und Ox-LDL oder Ox-LDL/SAA für 16 h, 24 h, 48 h und 72 h im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=6

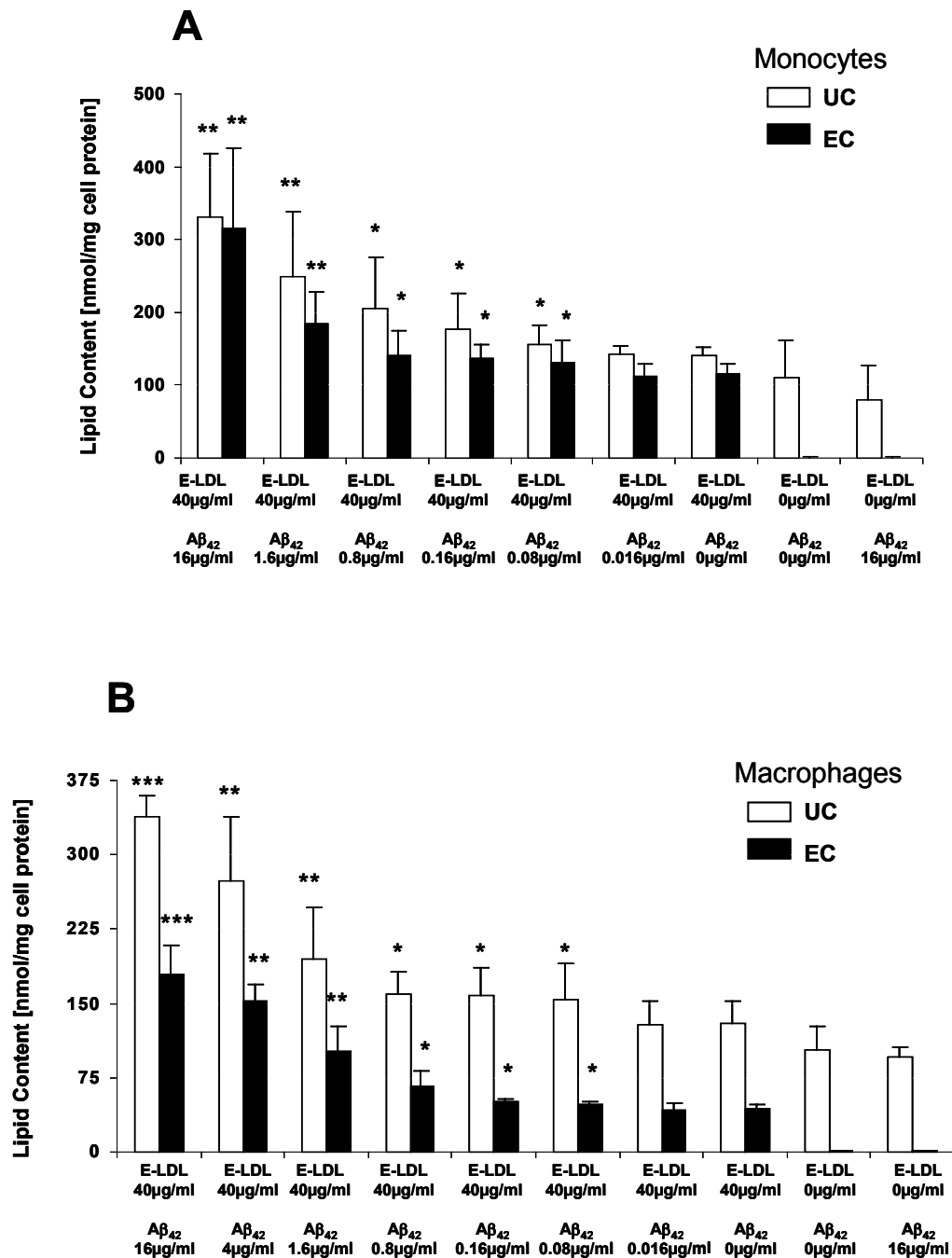
Insgesamt zeigten die Untersuchungen zur Beeinflussung der Akkumulation von Triglyzeriden und Cholesterin in frischen Monozyten und in vier Tage differenzierten Makrophagen auf der einen Seite vom Reifestadium der Zellen und der Art des verwendeten Lipoproteins abhängige Modifikationen der Lipidakkumulation, die auf unterschiedlich effektive Internalisierung, vermittelt durch spezifische Rezeptoren, hindeutet. Darüber hinaus wurde eine selektive Beeinflussung des Lipidstoffwechsels, wie des Stoffwechsels der Triglyzeride im Falle des SAP, oder von Cholesterin im Falle des  $\beta$ -Amyloid Peptids, beobachtet, die Anzeichen für die selektive Modulation auch intrazellulärer Transport- und Stoffwechselvorgänge sind.

### **4.2.3 Analyse der zellulären Akkumulation von UC und EC in Monozyten und Makrophagen bei E-LDL in Abhängigkeit von der A $\beta$ <sub>42</sub> Konzentration**

Auf Grund der niedrigeren Blut- und Liquor cerebrospinalis-Konzentration von A $\beta$ <sub>42</sub> im Vergleich zu der hier verwendeten Konzentration, wurde E-LDL (40  $\mu$ g/ml) mit Konzentrationen von A $\beta$ <sub>42</sub> im Bereich von 0,016  $\mu$ g/ml bis 16  $\mu$ g/ml opsonisiert. Dazu wurden frisch isolierte Monozyten für 72 h und vier Tage vordifferenzierte Makrophagen für 16 h mit E-LDL oder opsonisiertem E-LDL behandelt und anschließend die zelluläre Konzentration von UC und EC mittels ESI-MS/MS bestimmt.

Dabei konnte ein signifikanter Einfluss der Opsonisierung von E-LDL durch A $\beta$ <sub>42</sub> in Gegensatz zu nur mit E-LDL inkubierten Monozyten (Abb. 32A) und Makrophagen (Abb. 32B) bis zu einer 200-fachen Verdünnung beobachtet werden. Beide Zelltypen zeigten dabei auch einen konzentrationsabhängigen Effekt des Opsonins auf die Lipidakkumulation (Abb. 32A, B).

Als Kontrolle wurden Zellen, inkubiert mit der höchsten A $\beta$ <sub>42</sub>-Konzentration von 16  $\mu$ g/ml und unbehandelte Zellen, verwendet. Auch hier zeigte A $\beta$ <sub>42</sub> keinen Einfluss auf den zellulären Lipidgehalt im Vergleich mit nicht inkubierten Monozyten oder Makrophagen (Abb. 32A, B).

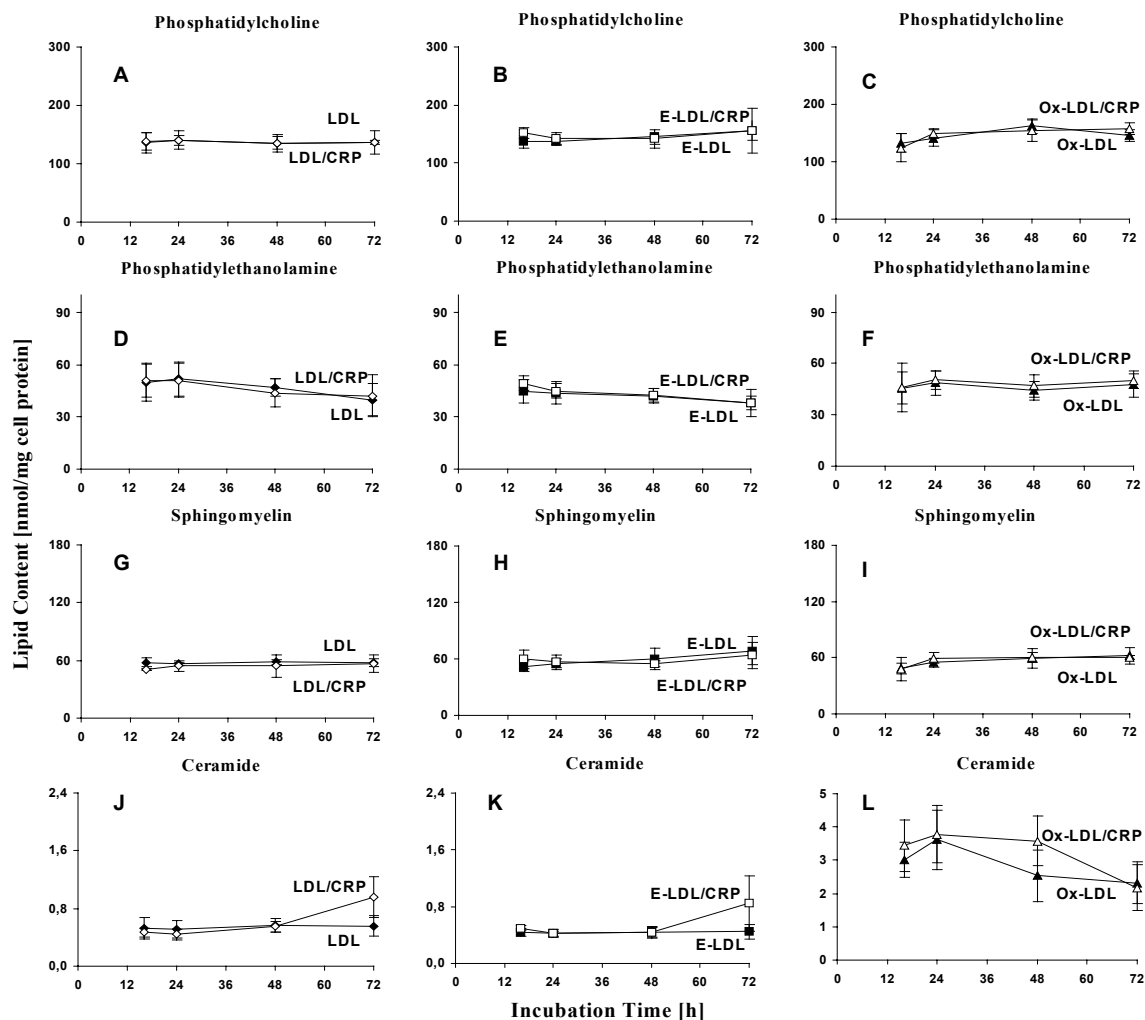


**Abbildung 32: Bestimmung der Konzentrationen von UC und EC in Monozyten und Makrophagen**

nach Inkubation mit E-LDL oder E-LDL/Aβ<sub>42</sub>. Überprüft wurden verschiedene Konzentrationen der Opsonin Aβ<sub>42</sub>. Monozyten (A) wurden 72 h behandelt, während die Inkubation von Makrophagen (B) 16 h betrug. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten E-LDL. N=6

#### 4.2.4 Analyse der zellulären Akkumulation von Sphingolipiden und Phospholipiden

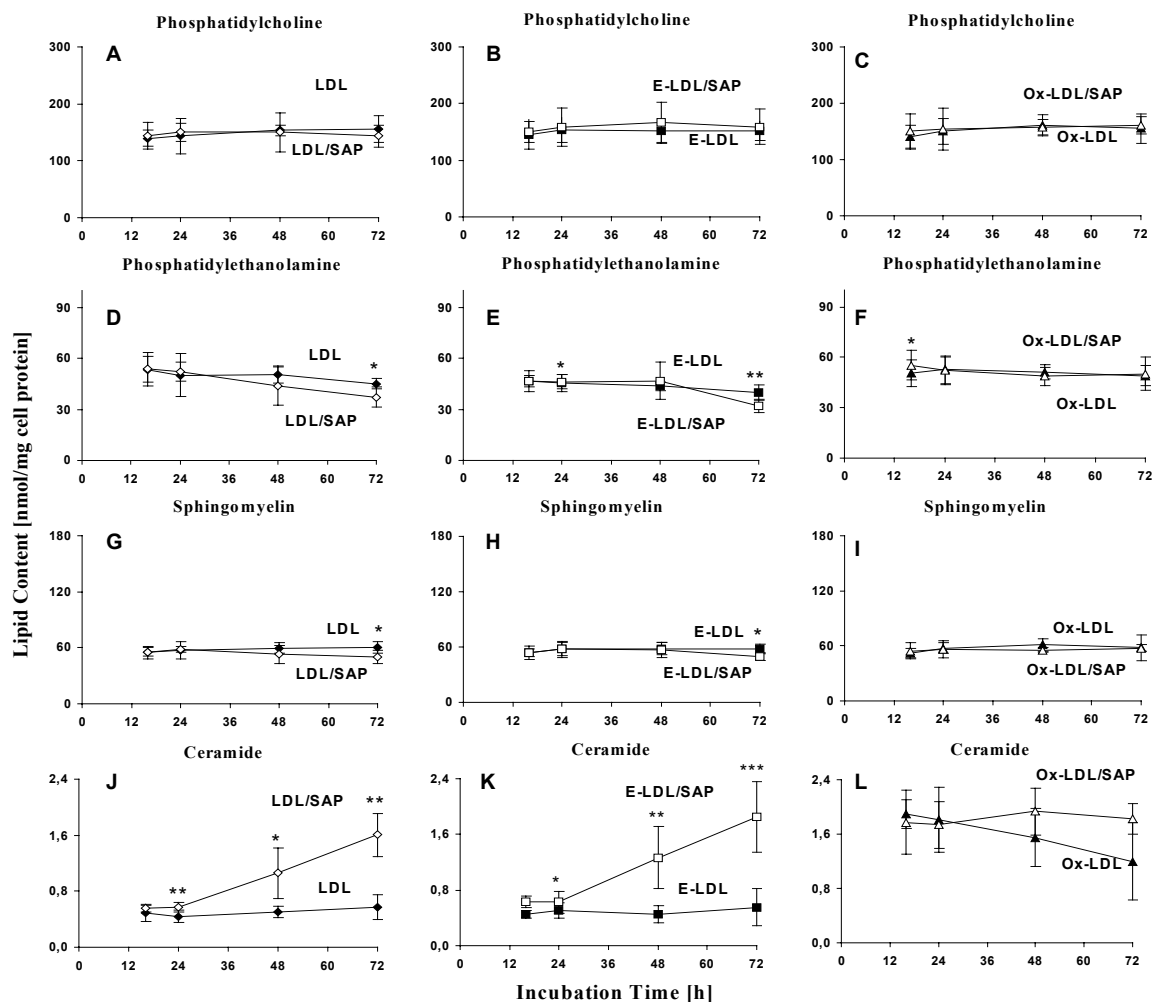
Da die selektive Modifikation der zellulären Lipidkonzentrationen durch Lipoproteine, die mit SAP,  $\beta$ -Amyloid und CRP opsonisiert wurden, auf eine veränderte Komposition der Zellmembran hindeutet, wurde mittels der ESI-Tandem-Massenspektrometrie eine weitere Methode zur Analyse der zellulären Sphingolipide und Phospholipide angewendet. In diesen Experimenten zeigte sich bei Beladung vordifferenzierter Makrophagen mit Komplexen aus Lipoproteinen und CRP kein Einfluss auf die zellulären Konzentrationen von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SPM) oder Ceramid (Cer) (Abb. 33).



**Abbildung 33: Bestimmung der Phospho- und Sphingolipide in Makrophagen**

nach Inkubation mit LDL oder LDL/CRP, E-LDL oder E-LDL/CRP und Ox-LDL oder Ox-LDL/CRP für 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. N=6

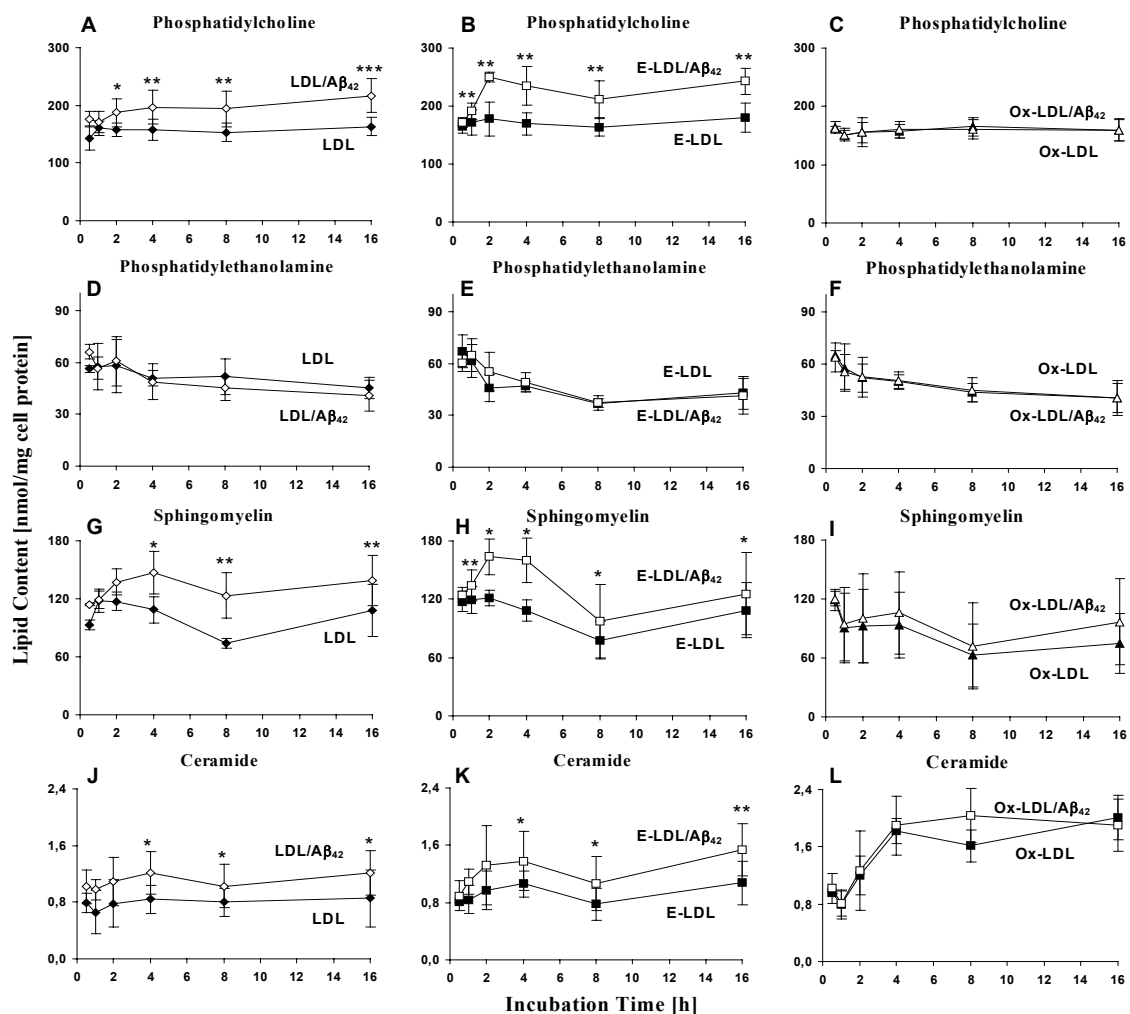
Andererseits konnte bei den Komplexen mit LDL/SAP und E-LDL/SAP eine zeitabhängige, signifikante Steigerung der zellulären Cer-Konzentration (Abb. 34J, K), verglichen mit nicht opsonierten Lipoproteinen, beobachtet werden. Ox-LDL zeigte bei kurzen Inkubationszeiten einen deutlichen Einfluss auf den zellulären Cer-Gehalt. Dieser Effekt wurde durch die Opsonisierung nicht beeinflusst (Abb. 34L). Die Konzentrationen von PE (Abb. 34D, E) und SPM (Abb. 34G, H) zeigten signifikante Abnahmen nur nach 72 h Behandlung mit LDL/SAP oder E-LDL/SAP, während bei der Inkubation mit opsonisiertem Ox-LDL keine Veränderung beobachtet wurde (Abb. 34F, I). Die zellulären PC-Konzentrationen wurden von keinem der Lipoprotein/SAP Komplexe besonders beeinflusst (Abb. 34A, B, C).



**Abbildung 34: Bestimmung der Phospho- und Sphingolipide in Makrophagen**

nach Inkubation mit LDL oder LDL/SAP, E-LDL oder E-LDL/SAP und Ox-LDL oder Ox-LDL/SAP für 16 h, 24 h, 48 h und 72 h. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zwischen opsonierten und nicht opsonierten LP. N=6

Nach Behandlung der Makrophagen mit LDL/A $\beta_{42}$  oder E-LDL/A $\beta_{42}$  lässt sich eine signifikante Steigerung der zellulären Konzentrationen von PC (Abb. 35A, B), SPM (Abb. 35G, H) und Cer (Abb. 35J, K) im Vergleich zur Inkubation mit LDL und E-LDL nachweisen, während die zellulären PE-Konzentrationen (Abb. 35D, E) unbeeinflusst bleiben. Die Opsonisierung von Ox-LDL mit A $\beta_{42}$  führte zu keiner Änderung der zellulären PC-, PE-, SPM- oder Cer-Konzentrationen (Abb. 35C, F, I, L) im Vergleich zu nicht opsonisiertem Ox-LDL. Hierbei wurde auch ein Einfluss von Ox-LDL auf den zellulären Cer-Gehalt beobachtet.



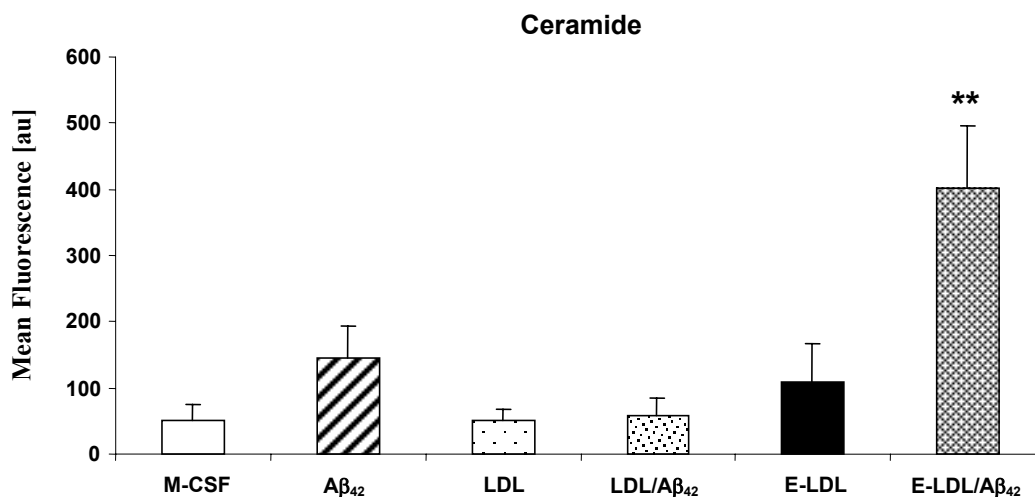
**Abbildung 35: Bestimmung der Phospholipide und Sphingolipide in Makrophagen**

nach Inkubation mit LDL oder LDL/A $\beta_{42}$ , E-LDL oder E-LDL/ A $\beta_{42}$  und Ox-LDL oder Ox-LDL/ A $\beta_{42}$  für 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 16 h. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten LP. N=6

#### 4.2.5 Analyse der Oberflächen-Expression von Ceramiden und Metaboliten des SPM-Cer Stoffwechsels

Die Untersuchungen zur zellulären Akkumulation von Sphingolipiden und Phospholipiden unterstützen den Verdacht, dass das  $\beta$ -Amyloid-Peptid über eine Modulation des Cholesterinstoffwechsels hinaus den Stoffwechsel von Membranphospholipiden beeinflussen kann. Aus diesem Grund wurden Cer und die Metaboliten des SPM-Cer Stoffwechsels auf der Oberfläche von vordifferenzierten Makrophagen mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Die Oberflächen-Expression von Cer zeigte nach der Inkubation der Zellen mit dem Komplex E-LDL/ $A\beta_{42}$  eine starke Zunahme, während für unbehandelte Zellen (M-CSF),  $A\beta_{42}$ , LDL, LDL/ $A\beta_{42}$  und E-LDL keine wesentliche Beeinflussung beobachtet werden konnte (Abb. 36).

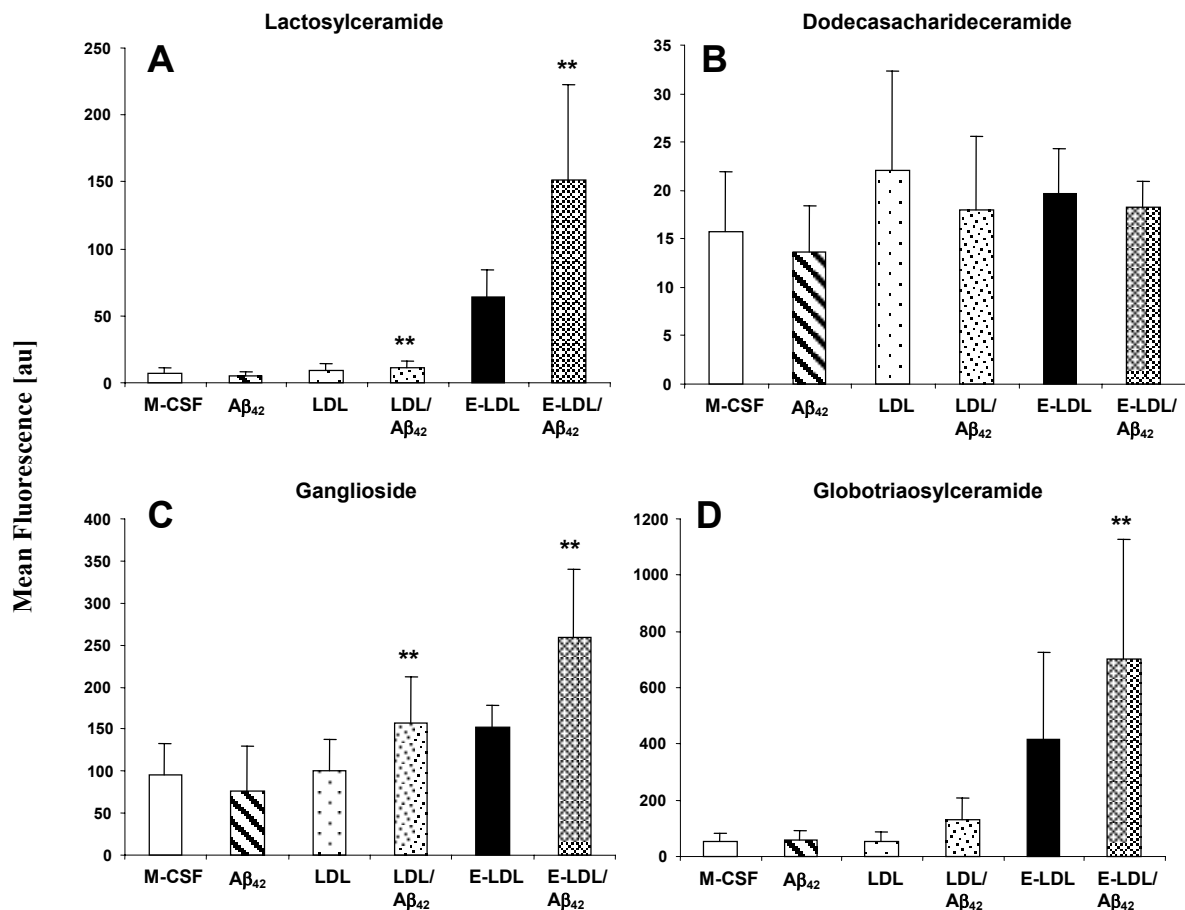


**Abbildung 36: Bestimmung der Ceramid-Expression auf Makrophagen**

nach 16-stündiger Inkubation mit (von links nach rechts): Kulturmedium (M-CSF),  $A\beta_{42}$ , LDL, LDL/ $A\beta_{42}$ , E-LDL, E-LDL/ $A\beta_{42}$ . \*\* $p < 0,01$  im Vergleich zwischen opsonisierten und nicht opsonisierten E-LDL. N=5

Die Analyse der Expression der Ceramid-Stoffwechselprodukte auf der Zellmembran wies eine ausgeprägte Steigerung der Expression von Lactosylceramid (Abb. 37A) und Gangliosiden (Abb. 37C) nach Behandlung der Makrophagen mit LDL/ $A\beta_{42}$  und E-LDL/ $A\beta_{42}$  im Vergleich zur Inkubation mit  $A\beta_{42}$ , LDL, E-LDL und M-CSF auf. Eine signifikante Zunahme der Expression von Globotriaosylceramide lässt sich nach

Inkubation mit LDL/A $\beta_{42}$  und E-LDL/A $\beta_{42}$  nur bei opsonisiertem E-LDL beobachten, während die Behandlung mit A $\beta_{42}$ , LDL und nur mit M-CSF keinen Einfluss auf die Bestimmung zeigte (Abb. 37D). Die Expression von Dodecasacharid-Ceramid (Abb. 37B) lässt auf keine Beeinflussung seitens der getesteten Stoffe schließen.

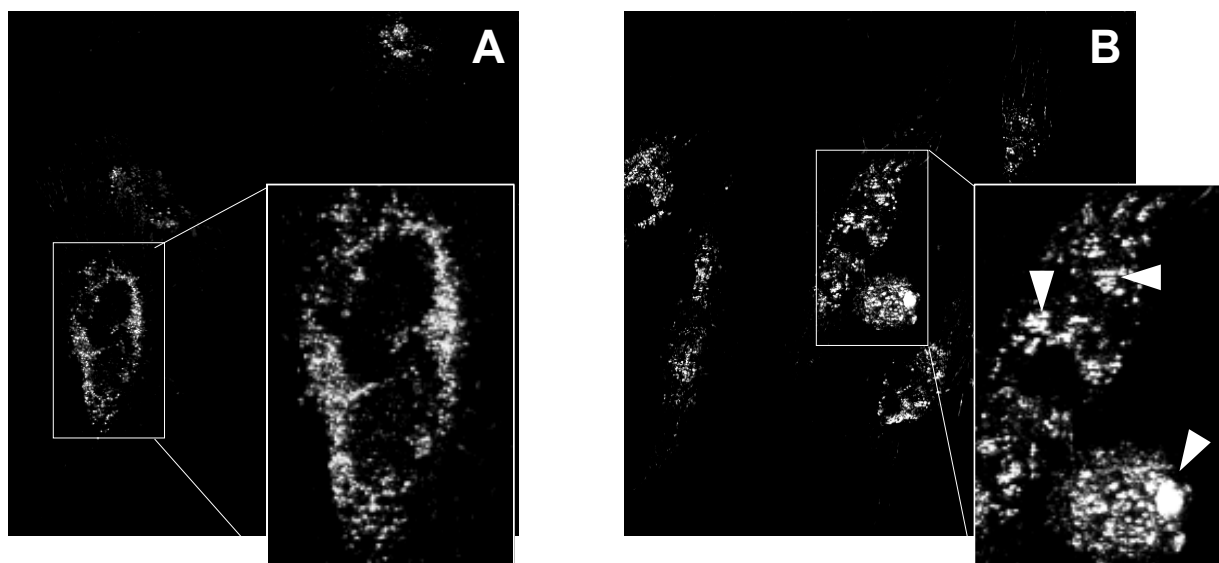


**Abbildung 37: Bestimmung der Expression von Ceramid-Metaboliten auf Makrophagen**

nach Inkubation mit M-CSF allein, A $\beta_{42}$ , LDL oder LDL/A $\beta_{42}$  und E-LDL oder E-LDL/A $\beta_{42}$  für 16 h. \*\*p < 0,01 im Vergleich zwischen opsonierten und nicht opsonierten LP. N=5

#### 4.2.6 Mikroskopische Beobachtung der Lipidakkumulation in Makrophagen

Für die mikroskopische Analyse der zellulären Aufnahme des E-LDL/A $\beta_{42}$  Komplexes durch Makrophagen wurden die zellulären Lipidvesikel mit dem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff Nilrot gefärbt. Makrophagen, die mit nicht opsonisiertem E-LDL inkubiert wurden, zeigten kleine homogen verteilte punktförmige Fluoreszenzstrukturen (Abb. 38A), während die mit E-LDL/A $\beta_{42}$  behandelten Makrophagen große intensive Fluoreszenzvesikel aufwiesen (Abb. 38B). Die hohe Fluoreszenz dieser Vesikel lässt eine hohe Akkumulation von Lipiden bzw. UC und EC vermuten. Die Fluoreszenzintensität ist bei der Inkubation mit dem opsonisierten E-LDL um 30 % höher als nur bei E-LDL. Die morphologische Analyse der Vesikelgröße zeigte bei E-LDL/A $\beta_{42}$  Partikelgrößen bis zu 3,5  $\mu\text{m}$  (Abb. 38A), während in mit E-LDL behandelten Zellen die maximale Größe der Partikel 0,8  $\mu\text{m}$  betrug (Abb. 38B).



**Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopie der Bestimmung von Nilrot in Makrophagen.**

Originale Bildgröße ist 100 x 100  $\mu\text{m}$ . A: Fluoreszenz Nilrot Bild von Zellen, vorbehandelt mit E-LDL. B: Fluoreszenz Nilrot Bild von Zellen, vorbehandelt mit E-LDL/A $\beta_{42}$ . Die Pfeile zeigen große und intensive Strukturen, die mit dem Fluorochrom gefärbt wurden.

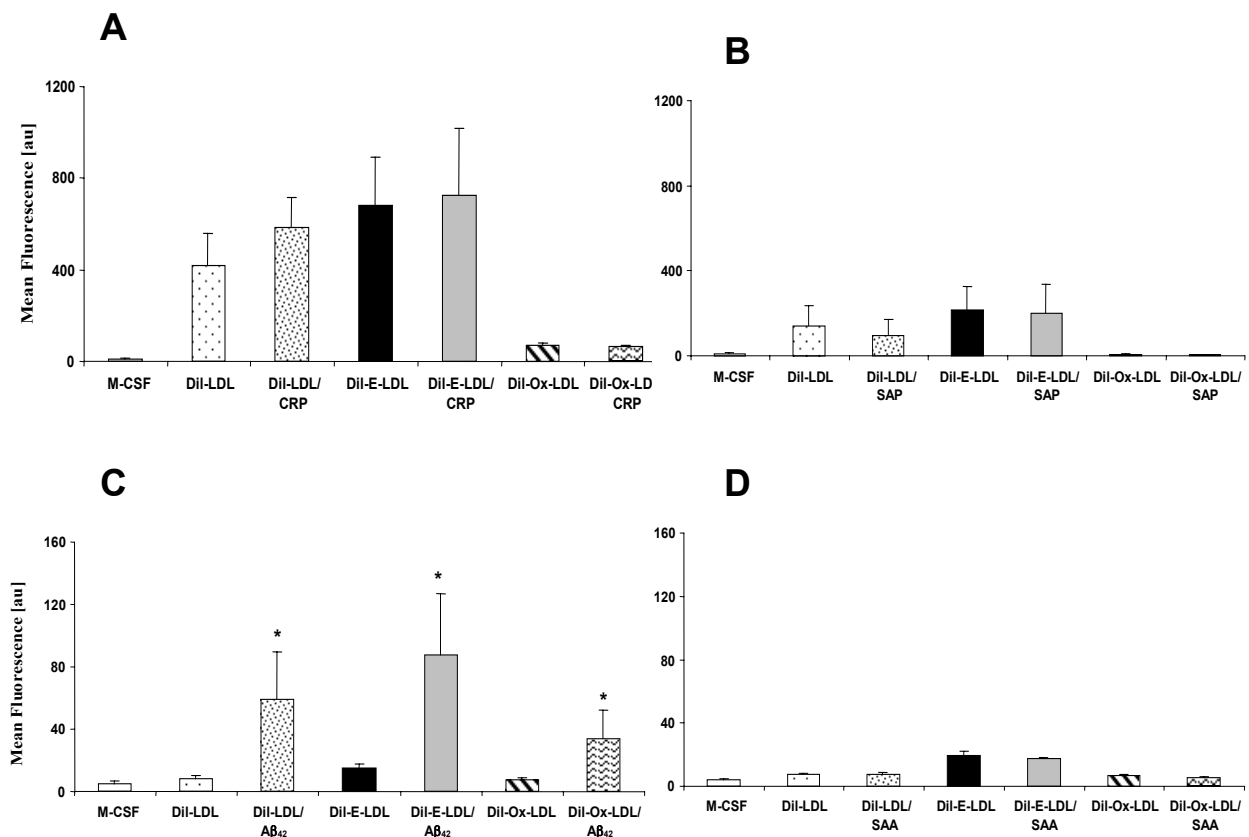
### **4.3 Untersuchung der Rezeptor-Wechselwirkungen nach Behandlung mit den opsonisierten Lipoproteinen**

Die Rezeptor-Wechselwirkung nach der Opsonisierung wurde in zwei Ansätzen experimentell charakterisiert. So wurde erstens die zelluläre Bindung der LP und zweitens der Einfluss auf die Expression bestimmter Rezeptoren untersucht.

#### **4.3.1 Analyse der zellulären Bindung von opsonisierten Lipoproteinen**

In einem ersten Ansatz wurde die Oberflächenbindung der opsonisierten und nicht opsonisierten Lipoproteine nach Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil analysiert. Diese Untersuchungen ergaben eine ausgeprägte Steigerung der zellulären Bindung aller drei untersuchten Lipoproteine (Dil-LDL, Dil-E-LDL, Dil-Ox-LDL) durch  $A\beta_{42}$  (Abb. 39C). Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung einer Lipidakkumulation, jedoch erscheint die Oberflächenbindung von Dil-Ox-LDL zu hoch im Vergleich zur durch  $A\beta_{42}$  induzierten Lipidakkumulation.

CRP, SAP und SAA (Abb. 39 A, B, D) zeigten im Gegensatz dazu nur einen geringfügigen Einfluss auf die Bindung der verschiedenen Lipoproteine.



**Abbildung 39: Bestimmung der Bindung von opsonierten und nicht opsonierten Dil-markierten Lipoproteinen auf Makrophagen** nach Inkubation für 1 h auf Eis. Die Opsonisierung der Lipoproteine wurde in Anwesenheit von CRP (A), SAP (B), Aβ<sub>42</sub> (C) oder SAA (D) durchgeführt. N=5

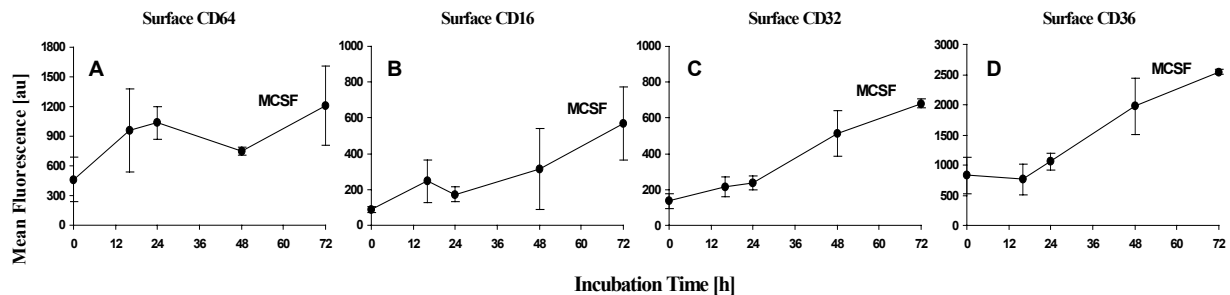
### 4.3.2 Analyse der Oberflächen-Expression von Rezeptoren

In einem zweiten Ansatz wurden einige wichtige bekannte Rezeptoren für CRP und SAP auf der Oberfläche von vordifferenzierten Makrophagen und Rezeptoren für Aβ<sub>42</sub> auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen untersucht.

#### 4.3.2.1 Expression von Fcγ Rezeptoren (FcγR) und CD36 auf Makrophagen

Als Kontrolle zu den folgenden Versuchen wurde die Oberflächen-Expression der drei FcγR (FcγRI/CD64, FcγRII/CD32 und FcγRIII/CD16) und des Scavenger Rezeptors CD36 auf vordifferenzierten Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Bei FcγRII/CD32, FcγRIII/CD16 und CD36 lässt sich eine zeitabhängige kontinuierliche Steigerung der Expression dieser Rezeptoren über 72 h beobachten

(Abb. 40B, C, D), während bei Fc $\gamma$ RI/CD64 eine klare Zunahme der Expression innerhalb von 24 h nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Kultivierung induzierte keine weitere Steigerung der Rezeptor-Expression (Abb. 40A).

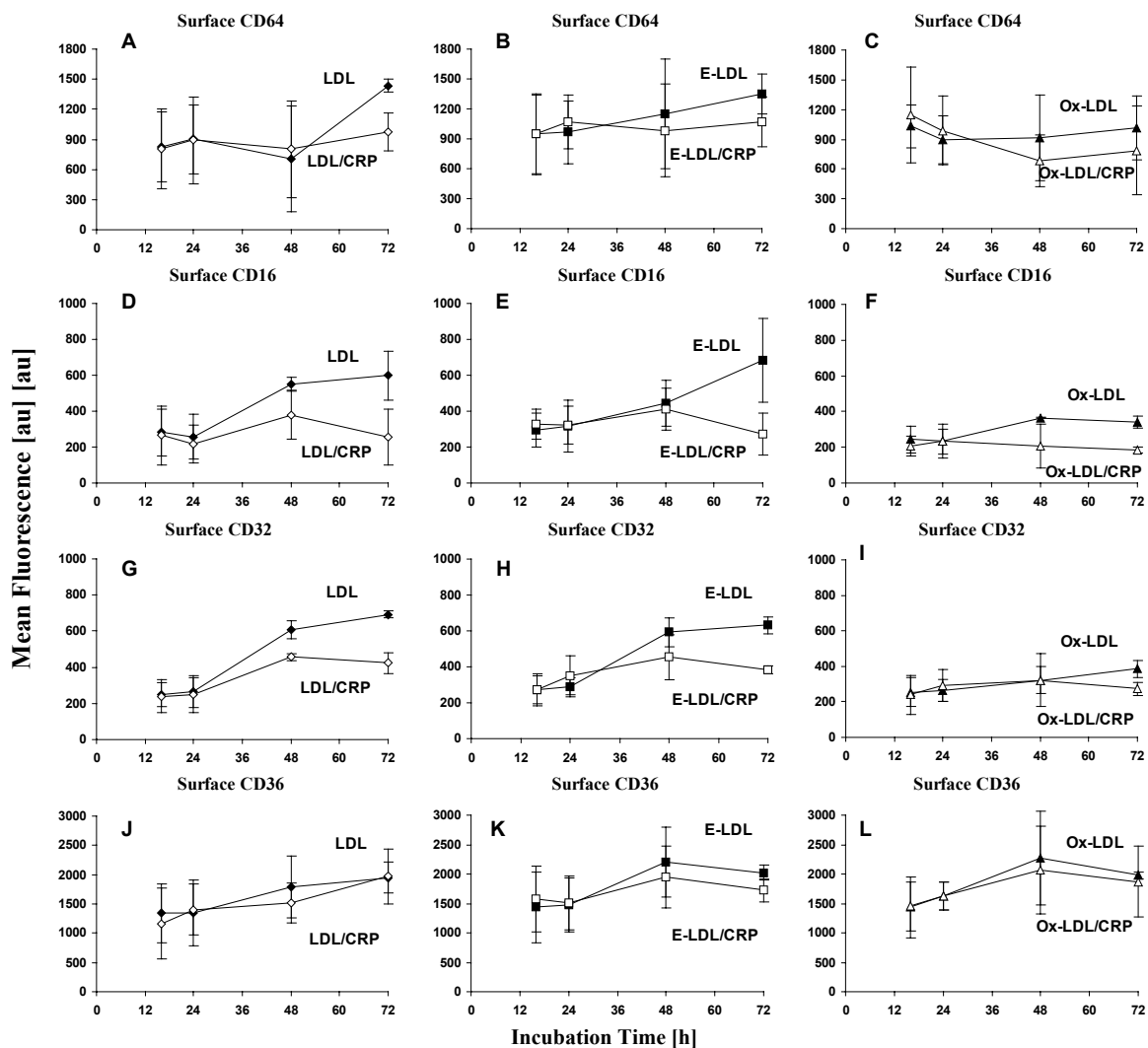


**Abbildung 40: Bestimmung der Expression von Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RII/CD32, Fc $\gamma$ RIII/CD16 und CD36 auf Makrophagen.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 0 h, 16 h, 24 h, 48 h und 72 h Zellinkubation in Medium, supplementiert mit M-CSF. N=3

#### 4.3.2.2 CRP Einfluss auf die Expression von Fc $\gamma$ R und CD36 auf Makrophagen

Danach wurde der Einfluss der Opsonisierung der LP mit CRP auf die Expression der Fc $\gamma$  Rezeptoren und CD36 bestimmt. Die Makrophagen, die mit Komplexen aus CRP und Lipoproteinen behandelt wurden, zeigten eine Verminderung der Expression von Fc $\gamma$ RIII/CD16 (Abb. 41D, E, F) und Fc $\gamma$ RII/CD32 (Abb. 41G, H, I) während die Expression von Fc $\gamma$ RI/CD64 (Abb. 41A, B, C) und CD36 (Abb. 41J, K, L) durch CRP lediglich gering beeinflusst wurde. Die reduzierten Expressionen von CD32 und Fc $\gamma$ RIII/CD16 zeigten sich relativ deutlich nach einer Inkubationszeit von 72 h, insbesondere bei Fc $\gamma$ RIII/CD16. Im Vergleich zur normalen Expression von CD36 auf Makrophagen zeigte die Inkubation mit nicht opsonisierten LP reduzierte Expressionen.



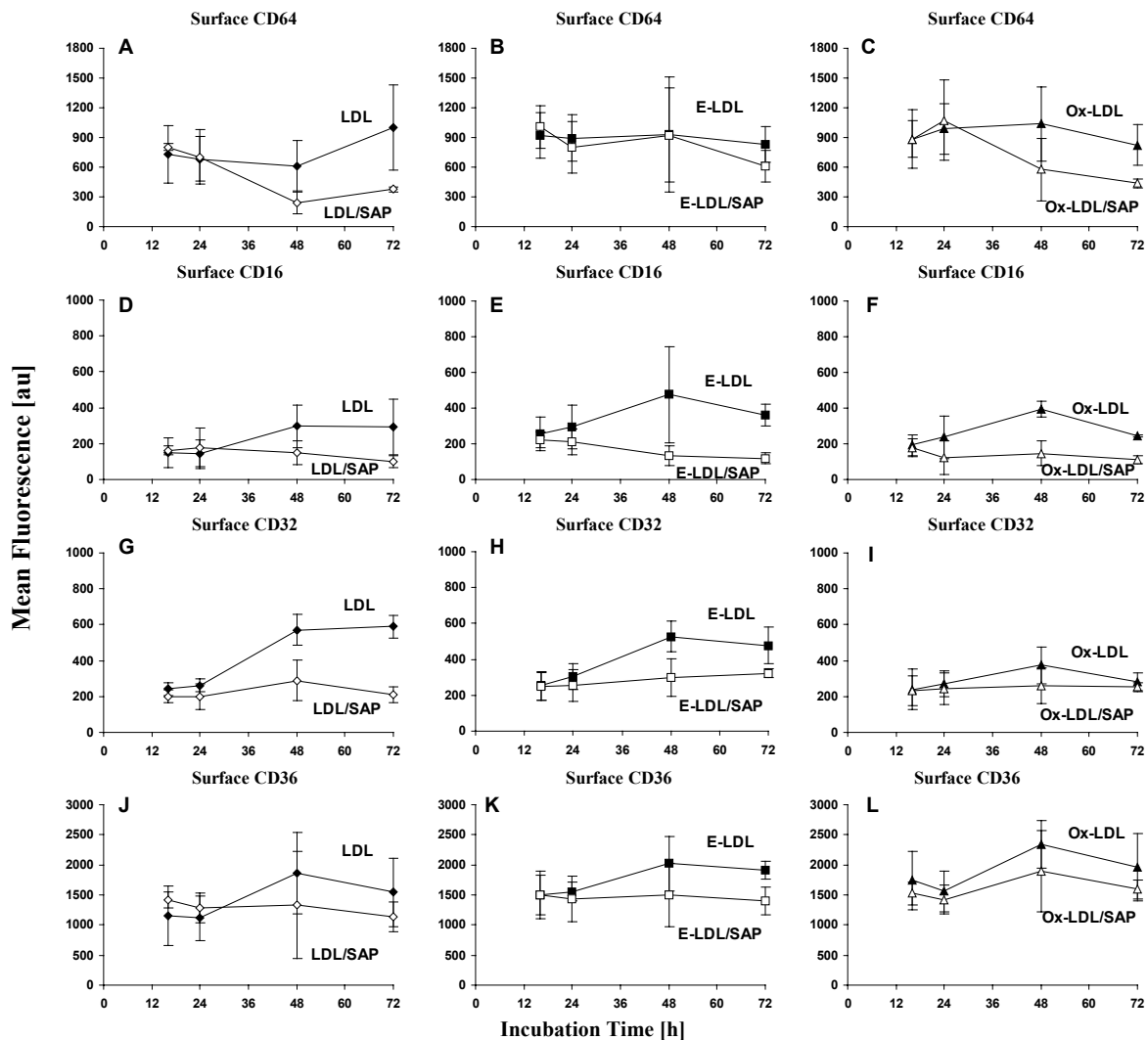
**Abbildung 41: Bestimmung der Expression von Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RII/CD32, Fc $\gamma$ RIII/CD16 und CD36 auf Makrophagen.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 16 h, 24 h, 48 h und 72 h Zellinkubation mit LP oder Komplexen aus LP mit CRP. N=3

#### 4.3.2.3 SAP Einfluss auf die Expression von Fc $\gamma$ R und CD36 auf Makrophagen

Bei SAP lässt sich nach der Behandlung der Makrophagen mit SAP-komplexierten LP eine ausgeprägte Reduktion der Expression aller drei Fc $\gamma$  Rezeptoren sowie von CD36 beobachten. Interessanterweise ist der Einfluss des SAP/LP Komplexes auf die Expression von Fc $\gamma$ RIII/CD16 (Abb. 42D, E, F) und Fc $\gamma$ RII/CD32 (Abb. 42G, H, I) besonders stark.

Im Vergleich mit CRP zeigte SAP eine ausgeprägte Zeitabhängigkeit bei der Reduktion der Expression von CD16, CD32 und CD36.



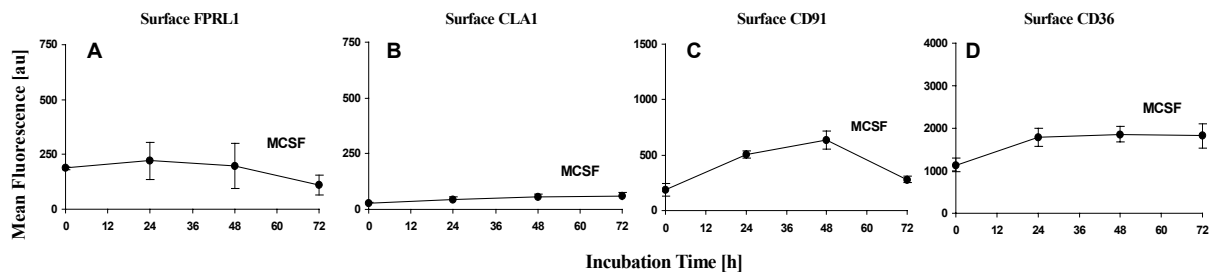
**Abbildung 42: Bestimmung der Expression von Fc $\gamma$ RI/CD64, Fc $\gamma$ RII/CD32, Fc $\gamma$ RIII/CD16 und CD36 auf Makrophagen.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 16 h, 24 h, 48 h und 72 h Zellinkubation mit LP oder LP/SAP Komplexen. N=3

#### 4.3.2.4 Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Monozyten

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Expressionen der Rezeptoren FPRL1, CLA1, CD91 und CD36 auf frisch isolierten Monozyten oder Monozyten, die unter nicht aktivierten Bedingungen kultiviert wurden, untersucht (d.h. Inkubation in Kulturmedium ohne M-CSF). Die höchste Expression zeigte sich bei CD36, wobei

bereits nach 24 h eine Sättigung zu beobachtet war (Abb. 43D). Die Expression von CD91 erreichte ein Maximum bei 48 h und sinkt danach wieder auf nahezu das Anfangsniveau nach 72 h (Abb. 43C). FPRL1 zeigte eine leichte aber kontinuierlich sinkende Expression (Abb. 43A). Die niedrigste Expression war bei CLA1 zu beobachten (Abb. 43B).

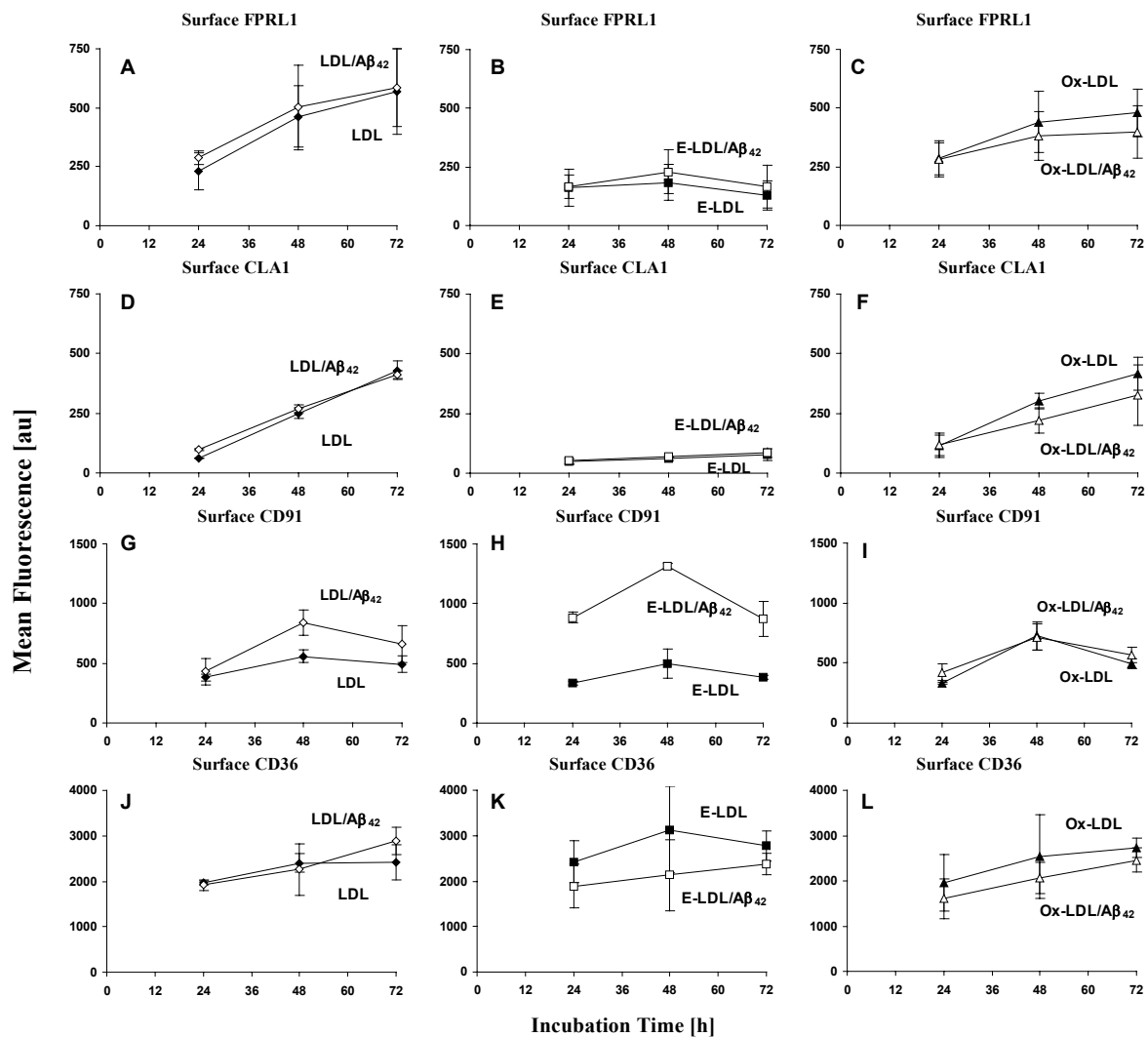


**Abbildung 43: Bestimmung der Expression von FPRL1, CLA1, CD91 und CD36 auf Monozyten.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h Zellinkubation in Kulturmedium. N=3

#### 4.3.2.5 $A\beta_{42}$ Einfluss auf die Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Monozyten

Bei der Bestimmung der Expression des FPRL1 Rezeptors nach Inkubation mit durch  $A\beta_{42}$  opsonierten und nicht opsonierten LP lassen sich zeitabhängige, opsonierungs-unabhängige Anstiege bei den Inkubationen mit LDL (Abb. 44A) und Ox-LDL (Abb. 44C) beobachten, während für E-LDL kein Einfluss festgestellt werden konnte (Abb. 44B). Ein ähnliches Muster zeigte sich auch bei CLA1 nach analoger Behandlung (Abb. 44D, E, F). Interessanterweise trat bei Anwesenheit von  $A\beta_{42}$  eine Steigerung der Expression von CD91 nach 48 h und 72 h für LDL (Abb. 44G) und nach bereits 24 h für E-LDL (Abb. 44H) auf, während für Ox-LDL allein oder als Komplex mit  $A\beta_{42}$  (Abb. 44I) sowie für nicht opsonierte LDL und E-LDL kein derartiger Effekt beobachtet werden konnte. Schließlich zeigte die Expression von CD36 kaum eine Steigerung in Abhängigkeit von der Opsonisierung bei allen drei LP (Abb. 44J, K, L).

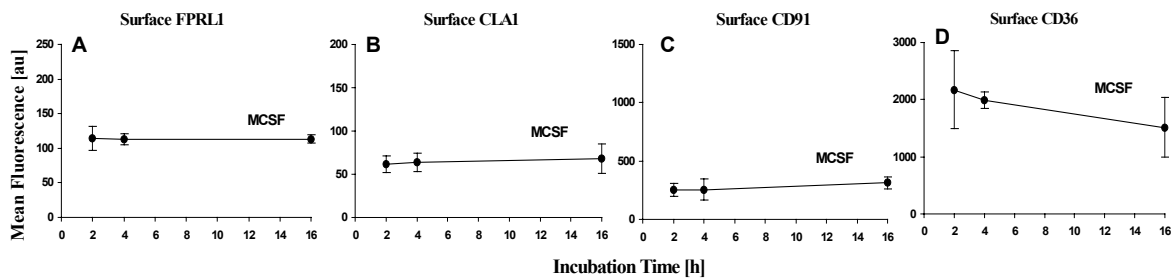


**Abbildung 44: Bestimmung der Expression von FPRL1, CLA1, CD91 und CD36 auf Monozyten.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubation. N=3

#### 4.3.2.6 Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Makrophagen

Zunächst wurden bei Makrophagen die Expressionen von FPRL1 (Abb. 45A), CLA1 (Abb. 45B), LRP/CD91 (Abb. 45C) und CD36 (Abb. 45D) nach einer Inkubationszeit von 2 h, 4 h und 16 h in Medium mit M-CSF bestimmt. Dabei zeigten sich außer einer geringen Senkung von CD36 kaum zeitabhängigen Änderungen.



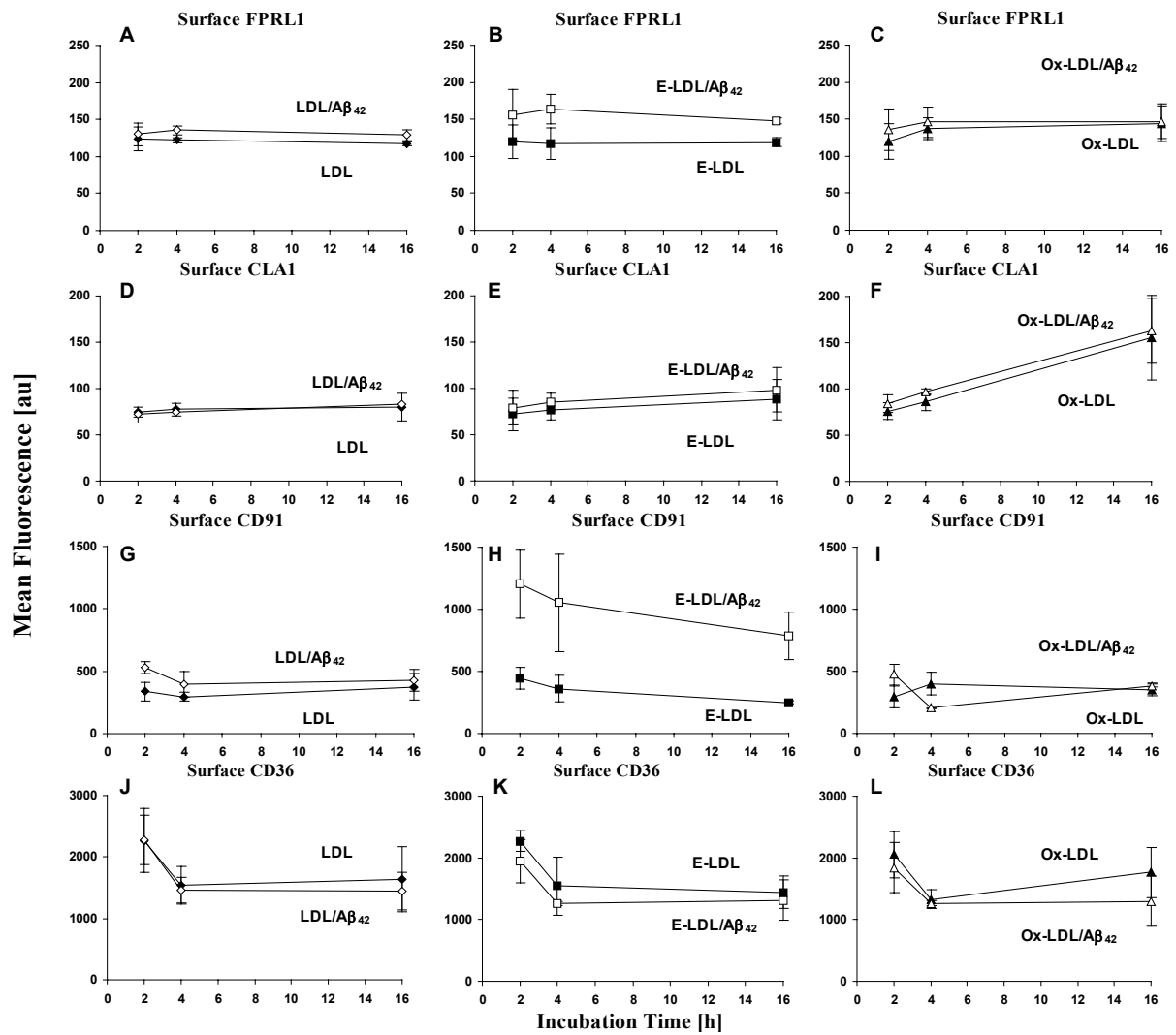
**Abbildung 45: Bestimmung der Expression von FPRL1, CLA1, CD91 und CD36 auf Makrophagen.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 2 h, 4 h und 16 h Inkubation. N=3

#### 4.3.2.7 A $\beta_{42}$ Einfluss auf die Expression von FPRL1, CLA1, LRP/CD91 und CD36 auf Makrophagen

Danach wurden dieselben Rezeptoren auf Makrophagen nach Inkubation mit Komplexen aus LP und A $\beta_{42}$  bzw. nicht opsonierten LP untersucht.

Die Expression von FPRL1 zeigte eine geringe Steigerung nach Inkubation mit dem LDL/A $\beta_{42}$  Komplex (Abb. 46A), eine stärkere Expression nach Behandlung mit E-LDL/A $\beta_{42}$  (Abb. 46B) aber keine Änderung für Ox-LDL/A $\beta_{42}$  (Abb. 46C) im Vergleich zu nicht komplexierten LP. Die Expression von CLA1 wurde von A $\beta_{42}$  nicht beeinflusst (Abb. 46D, E, F), jedoch konnte ein zeitabhängiger Anstieg der Expression nach Behandlung mit nicht opsonierten Ox-LDL beobachtet werden (Abb. 46F). Die Inkubation mit E-LDL/A $\beta_{42}$  führte zu einer etwa 2-fachen Steigerung der Expression von CD91 bereits nach 24 h Inkubation (Abb. 46H), während nach Behandlung mit LDL/A $\beta_{42}$  (Abb. 46G) nur ein geringer Einfluss und mit Ox-LDL/A $\beta_{42}$  (Abb. 46I) überhaupt kein Einfluss im Vergleich zu nicht opsonierten LP beobachtet werden konnte. Die Expression von CD36 in dem hier untersuchten Zeitraum zeigte keinen Effekt nach Inkubation mit LP/A $\beta_{42}$  Komplexen sowie von nicht komplexierten LP (Abb. 46J, K, L) im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen (Abb. 45).



**Abbildung 46: Bestimmung der Expression von FPRL1, CLA1, CD91 und CD36 auf Makrophagen.**

Dokumentiert wurden die Rezeptor-Expressionen nach 2 h, 4 h und 16 h Inkubation. N=3

## 5. Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Bindung von Lipoproteinen an Proteine des Immunsystems

In der Literatur sind bereits mehrere Vorschriften zur Untersuchung der Bindung von Proteinen (CRP, SAP, SAA, A $\beta$ <sub>42</sub>) an verschiedene Lipoproteine (LDL, Ox-LDL, E-LDL) mit ELISA-Format dokumentiert (Li et al., 1998; Chang et al., 2002; Stanger et al., 2004; van Tits et al., 2005). Es gibt ein breites Spektrum von Bestimmungsmöglichkeiten wie z.B. die radioaktive Markierung der Proteine oder der LP oder die Verwendung von spezifischen Antikörpern für diese Substanzen.

Bei unseren Experimenten zur Bestimmung der Bindung der verschiedenen Proteine und Peptide an LDL und seine modifizierten Formen (E-LDL und Ox-LDL) wurden markierte Antikörper verwendet. zur Entwicklung eines ELISA-Formats für die Analytik der Oberflächenbindung der Lipoproteine (Liganden) sind Parameter wie deren Bindungsaffinität an die verwendeten Platten von großer Bedeutung. Bei diesen Experimenten konnte eine analoge Bindungsaffinität aller drei untersuchten Lipoproteine an die Mikrotiter-Platten festgestellt werden. Anschließend wurden die Bindungen der verschiedenen Proteine oder Peptide, die sich an die auf der Platte fixierten Lipoproteine komplexiert hatten, weiter untersucht.

Der Nachweis von CRP zusammen mit Lipoproteinen und Komponenten des Komplementsystems in atherosklerotischen Läsionen (Bhakdi et al., 1999; Torzewski et al., 1998) hat großes Interesse an der Entschlüsselung der Zusammenhänge zwischen diesen drei Komponenten hervorgerufen. In unseren aktuellen Studien wurde die Priorität auf die Bestimmung der möglichen Opsonisierung der Lipoproteine durch CRP gesetzt. Die Opsonisierung von LDL durch CRP wurde in einer aktuellen Arbeit (Zwaka et al., 2001) angedeutet und durch unsere Ergebnisse bestätigt, was gegen die fehlende Bindung von CRP an LDL, beschrieben von Taskinen et al. (Taskinen et al., 2002), spricht. Eine mögliche Erklärung für diese Kontroverse könnte in der direkten Markierung des CRP liegen, die die schwache Bindung an LDL stören könnte. Auch verlief die Opsonisierung von E-LDL und Ox-LDL ohne Probleme (Bhakdi et al., 1999; Taskinen et al., 2002; Chang, et al., 2002). Alle diese Resultate verstärken die Vermutung, daß CRP eine wichtige Rolle bei der Formation von Schaumzellen spielt.

Auf Grund seiner Interaktion mit Lipoproteinen, seiner Identifizierung in humanen atherosklerotischen Läsionen (Li et al., 1998; Li et al., 1995), der ähnlichen Struktur, der calcium-abhängigen Bindungsfähigkeit wie CRP und der Komplement Aktivierungs-Kapazität (Gewurz et al., 1995) lässt sich für SAP ebenfalls eine Beteiligung bei der Atherosklerose vermuten. Unsere Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die Bindung von SAP an LDL, E-LDL und Ox-LDL in einer calcium-abhängigen Form. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SAP als Opsonin für native und modifizierte Formen von LDL bei der Atherosklerose möglicherweise relevant sein könnte.

Auch für  $\beta$ -Amyloid(1-42) Peptid zeigen unsere Daten erstmals eine Opsonisierung der drei hier untersuchten Lipoproteine. In dieser Richtung wurden bis jetzt nur die Bindung von  $A\beta_{40}$  an LDL und Ox-LDL und der Effekt ihrer Aufnahme in glatte Muskelzellen untersucht (Stanyer et al., 2004). Im Vergleich mit unseren Ergebnissen hatte diese Arbeitsgruppe eine bessere Bindung der Peptide  $A\beta_{40}$  an Ox-LDL, wobei der Unterschied zu unseren Daten in der Natur der Peptide liegen könnte. Eine weitere, ähnliche Arbeit bezieht sich auf die Untersuchung der Interaktion von sAPP $\alpha$  mit VLDL und dessen Aufnahme in Fibroblasten durch der LRP Rezeptor, was eine Beteiligung der  $\beta$ -Amyloid Peptide bei cardiovasculären Erkrankungen vermuten lässt (Scharnagl et al. 1999).

Unsere Ergebnisse der Experimente zur Bindung von SAA an LDL, E-LDL und Ox-LDL sind vergleichbar mit den Literaturangaben, die Bindungen von SAA an HDL, LDL oder VLDL beschrieben haben (Van Lenden et al., 1995; Marhaug et al., 1982; Ogasawara et al., 2004). Allerdings wurden hier zirkulierende Komplexe nachgewiesen und nicht in vitro immobilisierte Lipoproteine wie bei unseren Untersuchungen.

Chang et al. (Chang et al., 2002) argumentiert, daß CRP nur an LDL bindet, weil die Immobilisierung von LDL an der Plattenoberfläche eine Strukturänderung des LDL nach sich zieht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Komplexierung in Lösung durchgeführt und danach als bereits gebildeter Komplex auf eine mit ApoB100-Antikörper beschichtete Platte aufgetragen. Interessanterweise wurden bei diesen Analysen unsere Ergebnisse durch das erste ELISA-Protokoll bestätigt, ohne einen Einfluss der Platte auf die Lipoproteine beobachten zu können. Bei LDL und Ox-LDL wurden vergleichbare Bindungsaffinitäten an CRP und  $A\beta_{42}$  beobachtet,

während E-LDL diesbezüglich die niedrigste Tendenz zur Komplexierung zeigte. Es ist nicht auszuschließen, dass bei der enzymatischen Modifizierung die ApoB100 Konzentration auf der LP-Oberfläche reduziert wurde.

## **5.2 Analyse der Modifikation des zellulären Lipidstoffwechsels durch opsonisierte Lipoproteine**

Alle Zellen unseres Organismus haben zahlreiche Mechanismen, um ein gesundes Lipidgleichgewicht, insbesondere des Cholesterins aufgrund seiner Zytotoxizität, zu gewährleisten (Kellner-Weibel et al., 1998). Da jedoch die modifizierten Formen von LDL alternative Wege wie über spezifische Rezeptoren benutzen können, gerät die zelluläre Homöostase aus der Balance. Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, sind detailliertere Einblicke in den zellulären Lipidstoffwechsel von großer Bedeutung (Tabas, 2002).

### **5.2.1 Charakterisierung der zellulären Akkumulation von UC, TG und EC in frisch isolierten Monozyten**

Im Rahmen der Atherogenese werden die in der Intima vorhandenen LDL Partikel modifiziert und von Monozyten durch Scavenger Rezeptoren wie CD36 oder SR-A1/2 gebunden und aufgenommen. Durch kontinuierliche Aufnahme von modifizierten LDL entstehen aus den Makrophagen letztendlich Schaumzellen, da diese Aufnahme keiner negativen Feedback-Kontrolle unterliegt (Østerud, 2003).

Alternativ zum bereits bekannten Weg der Aufnahme von Lipoproteinen über Scavenger Rezeptoren galt unser Interesse einem möglicherweise weiteren Weg zur Aquirierung von LP, welcher über eine Opsonisierung der LP möglich sein könnte. Dazu wurden frisch isolierte Monozyten mit den opsonisierten Lipoproteinen konfrontiert und die Änderungen in der Lipidkonzentration bestimmt.

Die hierbei verwendete Konzentration von nativem und modifiziertem LDL bewirkte eine minimale (LDL und Ox-LDL) und mittlere (E-LDL) Änderung der zellulären Lipidkonzentration (Kapinsky et al., 2001). Um einen Vergleich der Ergebnisse der Inkubation mit verschiedenen opsonisierten Lipoproteinen möglich zu machen, wurden die Versuche nur mit einer einzigen Konzentration aller drei Lipoproteine durchgeführt.

Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse bei der Bestimmung von UC, TG und EC nach Inkubation mit den nicht komplexierten Lipoproteinen nur bei E-LDL einen deutlichen Einfluss auf die Lipidakkumulation in der Zelle, ähnlich wie die Ergebnisse vorheriger Studien (Kapinsky et al., 2001). Stark erhöhte UC-Konzentrationen und eine signifikante TG-Akkumulation bei früh inkubierten Zellproben beruhen möglicherweise auf der Internalisierung der Lipoproteine und der durch die enzymatische Modifizierung gesteigerten Cholesterin- und Triglyzeridkonzentrationen (Suriyaphol et al., 2002; Taskinen et al., 2002). Die zeitabhängige zelluläre Abnahme von UC und die Zunahme von EC deuten auf eine Aktivierung des normalen intrazellulären Lipidstoffwechsels mit Umwandlung von toxischem UC in die Speicherform EC hin (Soccio and Breslow, 2004; Maxfield and Wüstner, 2002; Tabas, 2002).

Unsere Ergebnisse sprechen für eine Erhöhung der Aufnahme aller drei Lipoproteine nach Opsonisierung mit CRP, SAP oder A $\beta$ <sub>42</sub>. Interessanterweise sind diese erhöhten Akkumulationen opsonisierter Lipoproteine nicht in allen drei Fällen gleich, was für verschiedene Internalisierungsmechanismen spricht. So beobachten wir den stärksten Opsonin-Effekt bei A $\beta$ <sub>42</sub>, den zweitstärksten bei SAP und den schwächsten bei CRP bzgl. der Aufnahme von Lipoproteinen. Die signifikant erhöhte Aufnahme der durch CRP opsonisierten LDL bestätigt die Ergebnisse einer weiteren Arbeitsgruppe (Zwaka et al., 2001). Bei der Opsonisierung durch SAP zeigte sich eine ungewöhnlich hohe Konzentration an TG, die möglicherweise aus den Lipoproteinen stammt und auf eine Selektivität der Bindung von SAP an TG-reiche Lipoproteine schließen lassen könnte. Eine andere Erklärung könnte der direkte Einfluss von SAP auf den intrazellulären TG-Stoffwechsel sein.

Die stärkste Akkumulation intrazellulärer Lipide nach Opsonisierung der Lipoproteine durch A $\beta$ <sub>42</sub> zeigte sich bei E-LDL. Bei den E-LDL-A $\beta$ <sub>42</sub>-Komplexen konnten durch DC-Messungen erhöhte UC und TG beobachtet werden, was konform mit der Tatsache ist, dass E-LDL hauptsächlich aus UC und TG aufgebaut ist (Taskinen et al., 2002).

LDL und Ox-LDL enthalten hohe Konzentrationen von UC und EC (Oxidation von LDL ändert minimal die Menge von EC in den Lipoproteinen), was auf die erhöhte Konzentration von UC und EC in Monozyten zurückzuführen sein könnte.

SAA scheint zwar Bindungsfähigkeiten zu haben, aber es zeigte keine Opsonisierungsfähigkeit.

## 5.2.2 Charakterisierung der zellulären Akkumulation von UC, TG und EC in Makrophagen

Um die Reaktion von Makrophagen auf opsonisierte Lipoproteine zu untersuchen, wurden Monozyten mit M-CSF vier Tage in vitro differenziert.

Bei unseren Experimenten mit Makrophagen ist die intrazelluläre Akkumulation von Lipiden nach Inkubation mit opsonierten Lipoproteinen stärker gestiegen als bei Inkubation mit nicht komplexierten Lipoproteinen. Diese Beobachtung repräsentiert einen wichtigen Schritt zum besseren Verständnis der Rolle dieser Opsonine im Prozess der Schaumzellbildung und impliziert darüber hinaus eine Rolle bei der Formation atherosklerotischer Läsionen. Die zeitabhängigen Änderungen in der Akkumulation von Lipiden in Makrophagen bei Opsonisierung mit CRP und SAP folgen einem ähnlichen Muster wie bei unter analogen Bedingungen inkubierten Monozyten. Andererseits war die Akkumulation von Lipiden nach Behandlung der Makrophagen mit A $\beta$ <sub>42</sub> bereits nach 16 h so stark ausgeprägt, daß ein längerer Inkubationszeitraum für unsere Experimente nicht erforderlich war.

Makrophagen, behandelt mit Komplexen aus SAA und Lipoproteinen, zeigten keine Akkumulation von Lipiden, welche auch nicht bei nativen Lipoproteinen allein beobachtet werden konnte (Kapinsky et al, 2001). Der Unterschied im Zeitablauf der Akkumulation der Lipide in Makrophagen spricht für die Aktivierung verschiedener Mechanismen, abhängig von den Opsoninen.

Obwohl die Konzentrationen von A $\beta$ <sub>42</sub> in unseren Experimenten ca. 100-fach höher waren als in Liquor cerebrospinalis oder Blutplasma (Nägga et al., 2002; Fujiwara et al., 2003), lässt sich vermuten, dass lokal auftretende Konzentrationen von A $\beta$ <sub>42</sub>, z.B. innerhalb artherosklerotischer Läsionen, eventuell deutlich höher sind, wenn wichtige Quellen für A $\beta$ -Peptide wie aktivierte Plättchen, Calciumakkumulation und hohe Cholesterinlevel begleitend interagieren (De Meyer et al. 2002; Sjögren et al., 2006; Pierrot et al., 2004; Li et al, 1998). Es wurde gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten bei Hypercholesterin-Patienten größere Mengen von A $\beta$  freisetzen, was eine mögliche Beteiligung bei der gestörten Homöostase bei Thrombose und Atherosklerose nahe legt und zu vaskulärer Zerstörung von A $\beta$  führt (Smith et al., 2001).

### 5.2.3 Bestimmung der zellulären Akkumulation von Sphingolipiden und Phospholipiden

Die selektive Modifikation des zellulären Lipidgehalts durch mit CRP, SAP und  $\beta$ -Amyloid opsonierte Lipoproteine deuten auf eine unmittelbare Beeinflussung des zellulären Lipidgehaltes und möglicherweise der Zusammensetzung der Zellmembran, induziert durch Opsonine, hin.

Sphingolipide, Phospholipide und Cholesterin sind wichtige Bestandteile der Zellmembranen und sind bei mehreren wichtigen zellulären Prozessen involviert. Ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Cholesterin, Phospholipiden und Sphingolipiden in der zellulären Membran spielt eine wichtige Rolle bei der Fluidität von Membran-Domänen (Simons and Ikonen, 2000; Simons and Ehehalt, 2002; Maxfield and Wüstner, 2002). UC und SPM zählen zu den Hauptbestandteilen der Rafts und sind an einer Vielzahl von zellulären Reaktionen beteiligt (Ohanian and Ohanian, 2001). SPM ist unter anderem ein Metabolit des zentralen Sphingolipids Cer, welches bei der Induktion von Apoptose eine Rolle spielt.

Die Experimente zeigten keinen Einfluss von CRP/LP auf die zellulären Konzentrationen von PC, PE, SPM und Cer. SAP/LP scheint jedoch einen starken Einfluss auf die zelluläre Cer-Konzentration und den zeitabhängigen Anstieg der PE- und SPM-Level zu haben. Ein gänzlich verschiedenes Akkumulationsmuster wurde nach Behandlung von Makrophagen mit  $A\beta_{42}$  beobachtet, bei der eine Erhöhung der Konzentrationen von PC, SPM und Cer nach Inkubation mit opsonisiertem LDL und E-LDL gemessen wurde. Ox-LDL an sich verursacht eine Akkumulation der zellulären Cer-Konzentration (Kinscherf et al., 1997; Deigner et al., 2001), die durch eine Opsonisierung nicht verstärkt wurde. PC und SPM sind natürliche Bestandteile von LDL und der modifizierten Formen (Taskinen et al., 2002). Deshalb könnte die Internalisierung der Lipoproteine in die Zellen eine Erklärung für die Zunahme der PC und der SPM Konzentrationen sein.

Die Transformation von Cer in SPM und umgekehrt kann von deren zellulärer Konzentration beeinflusst werden, d.h. nach Akkumulation von SPM könnte zur Kompensation aus SPM Cer generiert werden. Allerdings kann die Akkumulation von Cer, verursacht durch Opsonisierung von LDL und E-LDL mit SAP, dadurch nicht erklärt werden, es sei denn, dass SAP eine schnelle Umwandlung von SPM zu Cer fördert oder SAP durch noch nicht bekannte Mechanismen die Cer Synthese und

Akkumulation unterstützt. Des Weiteren stellt sich die Frage, warum die Behandlung der Zellen mit Komplexen aus CRP und LP keinen Einfluss auf die Konzentrationen von Phospholipiden und Sphingolipiden hat. Diese Beobachtung verstärkt die Vermutung, daß ein Zusammenhang zwischen mehreren zellulären Mechanismen besteht, die von bestimmten aktivierten oder regulierenden Faktoren abhängen.

#### **5.2.4 Analyse der Oberflächen-Expression von Ceramiden und Metaboliten des SPM-Cer Stoffwechsels**

Die Zellmembran wie auch alle anderen Organellmembranen bestehen unter anderem aus Sphingolipiden und Phospholipiden nebst Metaboliten des Sphingolipidstoffwechsels wie Cer, Lactosylceramid, Dodecasacharidceramid, Ganglioside und Globotriaosylceramide. Der GSL Metabolismus kann durch Lipoproteine reguliert werden. So stimuliert z.B. Ox-LDL in spezifischer Weise die Biosynthese von LacCer durch die Steigerung der Aktivität von Uridindiphosphat(UDP)-galactosyl(Gal):glucosyl(Glc)Cer und  $\beta$ 1-4Galtransferase (GalT-2) (Chatterjee et al., 1996), während natives LDL einen konträren Effekt hat (Chatterjee et al., 1986; Chatterjee et al., 1988). Alle untersuchten GSL können in eine direkte Beziehung zu Atherosklerose gebracht werden, z.B. kann LacCer durch Stimulation der Proliferation von glatten Muskelzellen (Chatterjee and Ghosh, 1996; Bhunia et al., 1996; Bhunia et al., 1997) und der Expression von CD11b/CD18 (Mac-1) auf der Oberfläche humaner Neutrophile (Arai et al., 1998) die Atherosklerose fördern. Dodecasaccharidceramid ist möglicherweise bei der Adhäsion (Postigo et al., 1994; Wagers et al., 1997) und der zellulären Aktivierung beteiligt (Lund-Johansen et al., 1992). Das Gangliosid (GM1) ist bei der Aktivierung der Thrombozyten und der Förderung der Formation von Schaumzellen involviert (Yatomi et al., 1996; Bergelson, 1995).

Globotriaosylceramide haben Einfluss auf Antikoagulanzen (Griffin et al., 2001) und die Signaltransduktion (Mangeney et al., 1993). Aufgrund der Beteiligung der Cer-Metaboliten in der Pathogenese der Atherosklerose wurden durch Verwendung spezifischer Antikörper auf der Oberfläche von Makrophagen sowohl Cer wie auch dessen Metabolite bestimmt. Die Makrophagen wurden mit durch  $A\beta_{42}$  opsonisiertes LDL oder E-LDL behandelt. Die Ergebnisse deuten auf eine unterschiedliche Verteilung von Cer in der Zelle hin. So zeigte sich ein stark progressiver Einfluss der E-LDL/ $A\beta_{42}$  Komplexe auf die Oberflächenkonzentration von Cer auf Makrophagen an, während LDL/ $A\beta_{42}$  zwar keine Änderung der Konzentration von Ceramiden auf

der Zelloberfläche induzierte, aber dennoch die gesamte zelluläre Cer-Konzentration steigerte. Deshalb könnte man nach Behandlung der Zellen mit LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> erhöhte Mengen an Cer im Golgi Apparat vermuten (Munro, 2003).

Die Bestimmung der Oberflächen-Expression der Cer-Metaboliten legen nahe, dass auch andere Gründe für die unveränderte Cer-Konzentration auf der Zellmembran in Erwägung gezogen werden könnten. Nach Inkubation der Zellen mit LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> wurde nämlich eine erhöhte Oberflächen-Expression von zwei Cer-Metaboliten (LacCer, Ganglioside) beobachtet, im Gegensatz zur Behandlung nur mit LDL. Vermutlich unterliegt Cer auf Makrophagen einer schnellen Interkonversion in die Metaboliten LacCer und Ganglioside. Bei Behandlung mit E-LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> war die Akkumulation von Cer so groß, dass eine gleichzeitige Quantifizierung von Cer und dessen Metabolite auf der Oberfläche gut möglich war. Für diese Theorie spricht auch, dass zwei Stufen der Metabolisierung von Cer erreicht werden, nämlich die Ganglioside und Globotriacylceramide. Die Bedeutung der Bestimmung von Typ und Menge von Cer bzw. Metaboliten auf der Oberfläche liegt darin, dass jedes der akkumulierten GSL eine spezifische biologische und pathologische Rolle spielt.

### **5.3 Untersuchung der Rezeptor-Interaktionen der opsonisierten Lipoproteine**

Das Begriff „Opsonin“ involviert das Konzept von Molekülen mit der Fähigkeit, Partikel oder Organismen für die Phagozytose erkennbarer zu machen. Dabei sind mehrere Mechanismen im Spiel wie z.B. die Erkennung dieser über Opsonin-Rezeptoren (Nauta et al., 2003).

#### **5.3.1 Bestimmung der Oberflächenbindung von opsonisierten Lipoproteinen**

Um die Opsonin-Aktivität der verwendeten Proteine und Peptide genauer zu untersuchen, wurde die Oberflächenbindung der komplexierten Lipoproteine bestimmt. Dafür wurden die Makrophagen auf Eis gelegt, um ihre biologischen Funktionen so weit wie möglich zu hemmen. Unter maximaler Hemmung der zellulären Aktivität wurde dann die Bindung der Opsonin/Lipoprotein-Komplexe charakterisiert, d.h. die Interaktion mit den bis dahin auf der Oberfläche expremierten Rezeptoren. Unsere Resultate zeigten große Unterschiede in der Bindung der

komplexierten und nicht komplexierten Lipoproteine. Es wurde nur bei Inkubation mit den Komplexen aus A $\beta$ <sub>42</sub>/Lipoproteinen eine signifikante Bindung beobachtet. Das lässt auf einen starken Einfluss der involvierten Rezeptoren, deren Expression durch die Oponine bzw. der Lipoproteine vermindert bzw. gesteigert werden könnte, schließen.

### 5.3.2 Analyse der Oberflächen-Expression von Rezeptoren

Es ist bekannt, daß LDL und Ox-LDL die Fähigkeit haben, mit Scavenger Rezeptoren zu interagieren (de Villiers and Smart, 1999). E-LDL induziert in Makrophagen eine erhöhte Expression mehrerer Gene wie CLA-1/SR-B1 und CD36 (Kapinsky et al., 2001). CRP interagiert mit Fc- $\gamma$  Rezeptoren (Fc $\gamma$ Rs), insbesondere Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RII (Bharadwaj et al., 1999; Stein et al., 2000). SAP stimuliert die Phagozytose durch die Rezeptoren Fc $\gamma$ RI und besonders Fc $\gamma$ RIII (Mold et al., 2001; Bharadwaj et al., 2001). A $\beta$ <sub>42</sub> interagiert mit den Rezeptoren FPRL1, LRP und CD36 (Yazawa et al., 2001; Coraci et al., 2002; Moore et al., 2002; Khoury et al., 2003; Bamberg et al., 2003; Laporte et al., 2004).

Die Oberflächen-Expression von Rezeptoren bei Makrophagen ohne Behandlung mit LP oder Komplexen zeigte deutliche Unterschiede in Intensität und im Reaktionsprofil, wobei der am stärksten exprimierte Rezeptor CD36 ist. Die Expression von Fc $\gamma$ -Rezeptoren zeigte ebenfalls eine Zeitabhängigkeit, wobei die niedrigste Expression Fc $\gamma$ RIII/CD16 aufweist. Die zeitabhängige Reduktion der Expression der drei Fc $\gamma$ -Rezeptoren lässt auf eine Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe schließen, wobei die Rezeptoren nicht neu synthetisiert werden. Komplexe aus SAP und Lipoproteinen zeigten ähnliche Effekte, jedoch mit einer starken Reduktion der Rezeptoren Fc $\gamma$ RII/CD32 und Fc $\gamma$ RIII/CD16, vermutlich aufgrund der besonderen Affinität von SAP zu diesen zwei Rezeptoren (Mold et al., 2001; Bharadwaj et al., 2001). CD36 scheint nur durch den Einfluss der Lipoproteine reduziert zu werden.

Die Bestimmung der Expression der Rezeptoren FPRL1, CLA1 und LRP auf Monozyten zeigte eine schwächere Expression von CLA1 auf der Oberfläche der Makrophagen, während die Expression der anderen zwei Rezeptoren eine zeit-unabhängige Expression aufwies. Eine deutliche Erhöhung der Rezeptorexpression LRP/CD91 nach der Inkubation der Zellen mit E-LDL/A $\beta$ <sub>42</sub> spricht für einen

besonderen Einfluss der Opsonine auf diesen Rezeptor (Laporte et al., 2004). Interessanterweise verstärken LDL und Ox-LDL die Expression von CLA1 wahrscheinlich auf Grund direkter Interaktion beider Komponenten mit dem Rezeptor. Möglicherweise ist die Folge die Auslösung eines intrazellulären Signals zur Befreiung der vorsynthetisierten Rezeptoren und/oder deren Neusynthese (de Villiers and Smart, 1999).

Bei Makrophagen wurden die gleichen Rezeptoren wie bei Monozyten untersucht. Einen ähnlich starken Einfluss auf die Expression des Rezeptors CD91 nach Behandlung der Zellen mit E-LDL/A $\beta_{42}$  könnte CD91 bei der Interaktion zwischen Makrophagen und A $\beta_{42}$  spielen. Wegen der kurzen Inkubationszeit wurde die Expression der anderen Rezeptoren nicht besonders verändert, außer CLA1 durch die Inkubation mit Ox-LDL. Dieser Einfluss von Ox-LDL auf den CLA1 Rezeptor ist ähnlich dem bei Monozyten. LDL hingegen zeigte auf die Expression von CLA1 in Makrophagen keine Veränderung. Möglicherweise könnte eine längere Inkubation den Einfluss von LDL auf CLA1 auch bei Makrophagen bestätigen.

Insgesamt lassen sich die gewonnenen Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen:

Alle vier Proteine bzw. Peptide CRP, SAP, A $\beta_{42}$  und SAA zeigten die Fähigkeit, die Lipide LDL, Ox-LDL und E-LDL zu opsonisieren, jedoch wiesen deren pathophysiologische Bedeutungen in Monozyten und Makrophagen deutliche Differenzen auf. So war die höchste Akkumulation von Lipiden in den Zellen und auf deren Oberfläche nach der Opsonisierung mit A $\beta_{42}$  zu beobachten. Möglicherweise könnten Ausbildungen vaskulärer Veränderungen unter besonderen Bedingungen wie Hypercholesterinämie oder gestörtem Cholesterin-Efflux (niedriges HDL, reduzierte ABCA1-Expression) auf Grund der Opsonisierung mit A $\beta_{42}$  von großer Bedeutung sein. Vaskuläre Veränderungen könnten sich bei Alzheimer Patienten zu einer vaskulären Dementia entwickeln.

Der SAP Einfluss auf die Akkumulation von Lipiden ist zwar geringer als bei  $\beta$ -Amyloid Peptid, aber dennoch relevant. Dies begründet sich nicht nur in der Opsonisierung der Lipide sondern auch auf seiner Fähigkeit, das Komplementsystem zu aktivieren und damit durch Komplement-Rezeptoren die Phagozytose zu stimulieren und die Schaumzellbildung und Atherosklerose zu fördern.

Die Opsonisierung mit CRP zeigte sich zwar nur einen begrenzten Einfluss auf die

Lipidakkumulation, jedoch lässt sich vermuten, dass unter Bedingungen wie chronischer Entzündung (deutlich erhöhte Blutkonzentration von CRP) noch stärkere atherosklerotische Effekte eintreten könnten.

SAA aber zeigt deutlich, dass die Bindung an die Liganden nicht unbedingt einen pathologischen Effekt auslösen muß.

Die Ergebnisse schaffen eine Basis zum besseren Verständnis der Opsonisierung von LDL, Ox-LDL und E-LDL mit CRP, SAP, A $\beta$ <sub>42</sub> und SAA und inspiriert zu weiteren Studien über die Regulation der Cholesterinkonzentration im Blut und der Atherogenese.

## 6. Zusammenfassung

Die Schaumzellbildung ist ein wichtiges Merkmal bei der Ausbildung der Atherosklerose. Bei diesem Prozess spielen Monozyten und Makrophagen, Lipoproteine und Substanzen des Immunsystems eine entscheidende Rolle. Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit die humanen Blutproteine CRP, SAP, A $\beta$ <sub>42</sub> und SAA auf ihre Fähigkeit, Lipoproteine wie LDL und dessen chemisch modifizierten Produkte Ox-LDL und E-LDL zu opsonisieren, untersucht. Des Weiteren wurde überprüft, welche pathophysiologische Bedeutung die opsonisierten Lipoproteine für Monozyten und Makrophagen haben. Die Experimente konnten zeigen, dass alle vier Proteine in der Lage waren, LDL, Ox-LDL und E-LDL zu opsonisieren, jedoch wiesen die Effekte der vier Opsonine auf die Lipidakkumulation und die Expression von bestimmten Rezeptoren an der Oberfläche von frisch isolierten humanen Blut-Monozyten und 4 Tage in vitro vordifferenzierten Makrophagen deutliche Differenzen auf.

Der größte Einfluss auf den Lipidgehalt in der Zelle und auf die Zellmembran von Monozyten und Makrophagen konnte nach der Opsonisierung der Lipoproteine, insbesondere von E-LDL mit A $\beta$ <sub>42</sub> beobachtet werden. Mit steigender Dosis von A $\beta$ <sub>42</sub> zeigte sich auch eine gesteigerte Lipidakkumulation bis hin zu Konzentrationen, die in vivo bei Hypercholesterinämie, bei ABCA1-Defizienz und gestörtem Cholesterin-Efflux oder der Aktivierung von Thrombozyten auftreten können. Außerdem zeigte sich eine deutlich gesteigerte Rezeptor-Expression von LDL Receptor Related Protein (LRP/CD91) und dem FMLP-Rezeptor FPRL1. Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal den starken Opsonin Effekt von A $\beta$ <sub>42</sub> bei dessen Bindung an Lipoproteine. Die Opsonisierung der Lipoproteine mit dem Pentraxin SAP in Monozyten und Makrophagen wirkte sich, verglichen mit der Opsonisierung mit A $\beta$ <sub>42</sub>, etwas geringer auf die Akkumulation von Lipiden aus, war aber immerhin signifikant. Die zelluläre Aufnahme der durch SAP opsonisierten Lipoproteine führt zu einer Reduktion der Oberflächen-Expression der Fc $\gamma$  Rezeptoren Fc $\gamma$ RII/CD32 und Fc $\gamma$ RIII/CD16 und dem Scavenger Rezeptor CD36. Auch diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Beteiligung von SAP bei der Schaumzellbildung und somit bei der Atherogenese hin. Da SAP auch zur Komplementaktivierung beiträgt, könnte sich dieser Effekt noch verstärken.

Obwohl das human Akute-Phase Protein CRP nur eine begrenzte Opsoninfähigkeit bzw. Lipidakkumulation zeigte, könnte es jedoch bei chronischer Entzündung, bei der

die Blutkonzentration von CRP häufig erhöht ist, zu einer gesteigerten Schaumzellbildung und zu atherosklerotischen Läsionen führen.

Die Experimente mit dem human Akute-Phase Protein SAA konnten schließlich zeigen, dass zwar eine Bindung an die Lipoproteine stattfindet, die aber nicht unbedingt die Lipidakkumulation in Monozyten und Makrophagen beeinflusst.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse helfen ein besseres Verständnis der Opsonisierung von LDL, Ox-LDL und E-LDL mit CRP, SAP, A $\beta$ <sub>42</sub> und SAA und deren biologische Bedeutung bei der Atherosklerose und der Alzheimer Erkrankung zu erlangen. Dass Opsonine zur Schaumzellbildung und der Atherogenese beitragen, konnte im Rahmen der Dissertation gezeigt werden.

Weiterführende Fragen über diese Studien hinaus sind z.B. die genauen Mechanismen der Aufnahme dieser Opsonin-Komplexe, den folgenden intrazellulären Metabolismus der Komplexe und der Einfluss auf weitere intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge.

## 7. Literaturverzeichnis

**Allen C.A., Broom M.F. and Chadwick V.S.** (1992) Flow cytometry analysis of the expression of neutrophil FMLP receptors. *J. Immunol. Methods.* **149**, 159-164.

**Alving C.R., Richards R.L. and Guirguis A.A.** (1977) Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J. Immunol.* **118**, 342-347.

**Arai T., Bhunia A.K., Chatterjee S. and Bulkley G.B.** (1998) Lactosylceramide stimulates human neutrophils to upregulate Mac-1, adhere to endothelium, and generate reactive oxygen metabolites in vitro. *Circ. Res.* **82**(5), 540-547.

**Assmann G., von Eckardstein A. and Brewer H.B.J.** (1990) Familial High Density Lipoprotein Deficiency: Tangier Disease. In *Metabolic Bases of Inherited Disease* (Edited by Scriver C.A., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D.) p. 2053. McGraw-Hill, New York.

**Asztalos B., Zhang W., Roheim P.S. and Wong L.** (1997) Role of free apolipoprotein A-I in cholesterol efflux. Formation of pre- $\alpha$ -migrating high-density lipoprotein particles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1630-1636.

**Attems J., Lintner F. and Jellinger K.A.** (2004) Amyloid  $\beta$  peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta. Neuropathol.* **107**, 283-291.

**Bamberg M., Harris M., McDonald D., Husemann J. and Landreth G.** (2003) A cell surface receptor complex for fibrillar  $\beta$ -amyloid mediates microglial activation. *J. Neurosci.* **23**(7), 2665-2674.

**Barbashov S.F., Wang C. and Nicholson-Weller A.** (1997) Serum amyloid P component forms a stable complex with human C5b6. *J. Immunol.* **158**(8), 3830-3835.

**Barrans A., Collet X., Barbaras R., Jaspard B., Manent J., Vieu C., Chap H. and Perret B.** (1994) Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* **269**, 11572-11577.

**Benditt E.P. and Eriksen N.** (1977) Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 4025-4028.

**Benditt E.P., Eriksen N. and Hanson R.H.** (1979) Amyloid protein SAA is an apolipoprotein of mouse plasma high density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4092-4096.

**Bergelson L.D.** (1995) Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. *Immunol. Today.* **16**(10), 483-486.

**Bhakdi S., Dorweiler B. and Kirchmann R.** (1995) On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J. Exp. Med.* **182**, 1959-1971.

**Bhakdi S, Dorweiler B, Kirchmann R, Torzewski J, Weise E, Trantum-Jensen J, Walev I. and Wieland E.** (1995) On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J. Exp. Med.* **182**(6), 1959-1971.

**Bhakdi S., Torzewski M., Klouche M. and Hemmes M.** (1999) Complement and atherogenesis. Binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2348-2354.

**Bhakdi S., Torzewski M., Paprotka K., Schmitt S., Barsoom H., Suriyaphol P., Han S., Lackner K.J. and Husmann M.** (2004) Possible protective role for CRP in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before the detrimental terminal sequence. *Circulation.* **109**, 1870-1876.

**Bharadwaj D., Stein M.P., Volzer M., Mold C. and Du Clos TW.** (1999) The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J. Exp. Med.* **190**(4), 585-590.

**Bharadwaj D., Mold C., Markham E. and Du Clos T.W.** (2001) Serum amyloid P component binds to Fc $\gamma$  receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J. Immunol.* **166**, 6735-6741.

**Bhunja A.K., Han H., Snowden A. and Chatterjee S.** (1996) Lactosylceramide stimulates Ras-GTP loading, kinases (MEK, Raf), p44 mitogen-activated protein kinase, and c-fos expression in human aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271**(18), 10660-10666.

**Bhunja A.K., Han H., Snowden A. and Chatterjee S.** (1997) Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **272**(25), 15642-15649.

**Biasucci L.M., Liuzzo G., Grillo R.L., Calgiuri G., Rebuffi A.G., Buffon A., Summaria F., Ginnetti F., Fadda G. and Maseri A.** (1999) Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation.* **99**, 855-860.

**Bjorkhem I.** (2002) Do oxysterols control cholesterol homeostasis?. *J. Clin. Invest.* **110**(6), 725-730.

**Blackburn R., Giral P., Bruckert E., Andre J.M., Gonbert S., Bernard M., Chapman M.J. and Turpin G.** (2001) Elevated C-reactive protein constitutes an independent predictor of advanced carotid plaques in dyslipidemic subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**(12), 1962-1968.

**Boudker O. and Futerman A.H.** (1993) Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **268**, 22150-22155.

**Braunwald E.** (1997) Shattuck lecture – cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1360-1369.

**Breslow J.L.** (1997) Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat. Med.* **3**, 600-601.

**Boudker O. and Futerman A.H.** (1993) Detection and characterization of ceramide-1-phosphate phosphatase activity in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **268**, 22150-22155.

**Brown M.R. and Anderson B.E.** (1993) Receptor-ligand interactions between serum amyloid P component and model soluble immune complexes. *J. Immunol.* **151**(4), 2087-2095.

**Butler P.J., Tennent G.A. and Pepys M.B.** (1990) Pentraxin-chromatin interactions: serum amyloid P component specifically displaces H1-type histones and solubilizes native long chromatin. *J. Exp. Med.* **172**(1), 13-18.

**Casserly I. and Topol E.** (2004) Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet.* **363**, 1139-1146.

**Castle C.K., Pape M.E., Marotti K.R. and Melchior G.W.** (1991) Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J. Lipid. Res.* **32**, 439-447.

**Chang M., Binder C., Torzewski M. and Witztum J.L.** (2002) C-reactive protein binds oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *PNAS.* **99**(20), 13043-13048.

**Christner R.B. and Mortensen R.F.** (1994) Specificity of the binding interaction between human serum amyloid P-component and immobilized human C-reactive protein. *J. Biol. Chem.* **269**(13), 9760-9766.

**Chatterjee S.** (1998) Sphingolipids in atherosclerosis and vascular biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**(10), 1523-1533.

**Chatterjee S., Clarke K.S. and Kwiterovich P.O. Jr.** (1986) Regulation of synthesis of lactosylceramide and long chain bases in normal and familial hypercholesterolemic cultured proximal tubular cells. *J. Biol. Chem.* **261**(29), 13474-13479.

**Chatterjee S., Dey S., Shi W.Y., Thomas K. and Hutchins G.M.** (1997) Accumulation of glycosphingolipids in human atherosclerotic plaque and unaffected aorta tissues. *Glycobiology.* **7**(1), 57-65.

**Chatterjee S. and Ghosh N.** (1996) Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology.* **6**(3), 303-311.

**Chatterjee S., Ghosh N., Castiglione E. and Kwiterovich P.O. Jr.** (1988) Regulation of glycosphingolipid glycosyltransferase by low density lipoprotein receptors in cultured human proximal tubular cells. *J. Biol. Chem.* **263**(26), 13017-13022.

**Chisolm G.M. and Steinberg D.** (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free. Radic. Biol. Med.* **28**(12), 1815-1826.

**Claus D.R., Siegel J., Petras K., Osmand A.P. and Gewurz H.** (1977) Interaction of C-reactive protein with the first component of human complement. *J. Immunol.* **119**, 187-192.

**Cohen J.C., Vega G.L. and Grundy S.M.** (1999) Hepatic lipase: new insights from genetic and metabolic studies. *Curr. Opin. Lipidol.* **10**, 259-267.

**Coraci I.S., Husemann J., Berman J.W., Hulette C., Dufour J.H., Campanella G.K., Luster A.D., Silverstein S.C. and El Khoury J.B.** (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to  $\beta$ -amyloid fibrils. *Am. J. Pathol.* **160**, 101-112.

**Coria F., Castano E., Prelli F., Larrondo-Lillo M., van Duinen S., Shelanski M.L. and Frangione B.** (1988) Isolation and characterization of amyloid P component from Alzheimer's disease and other types of cerebral amyloidosis. *Lab. Invest.* **58**(4), 454-458.

**Corti R., Hutter R., Badimon J.J. and Fuster V.** (2004) Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, Inflammation and Thrombosis. *J. Thrombosis and Thrombolysis.* **35**(1), 35-44.

**Curtiss L.K. and Boisvert W.A.** (2000) Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 243-251.

**Cyrus T., Pratico D., Zhao L., Witztum J.L., Rader D.J., Rokach J., Fitzgerald G.A. and Funk C.D.** (2001) Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* **103**(18), 2277-2282.

**Danesh J., Whincup P., Walker M., Lennon L., Thomson A., Appleby P., Gallimore J.R. and Pepys M.B.** (2000) Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analysis. *Br. Med. J.* **321**, 199-204.

**Danielsen E.M., Hansen G.H. and Poulsen M.D.** (1993) Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J. Cell. Biol.* **120**, 1347-1356.

**Davidson M.A.** (2001) Introduction: utilization of surrogate markers of atherosclerosis for the clinical development of pharmaceuticals agents. *Am. J. Cardiol.* **87**(16), 1-7.

**de Beer F.C., Baltz M.L., Holford S., Feinstein A. and Pepys M.B.** (1981) Fibronectin and C4-binding protein are selectively bound by aggregated amyloid P component. *J. Exp. Med.* **154**(4), 1134-1139.

**De Hass C.J., van der Tol M.E., van Kessel K.P., Verhoef J. and van Strijp J.A.** (1998) A synthetic lipopolysaccharide (LPS)-binding peptide based on amino acids 27-39 of serum amyloid P component inhibits LPS-induced responses in human blood. *J. Immunol.* **161**, 3607-3615.

**De Meyer G., De Cleen D., Cooper S., Knaapen M., Jans D., Martinet W., Herman A., Bult H. and Kock M.** (2002) Platelet phagocytosis and processing of beta-amyloid precursor protein as a mechanism of macrophage activation in atherosclerosis. *Circ. Res.* **90**, 1197-1204.

**De Villiers W. and Smart E.J.** (1999) Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J. Leukoc. Biol.* **66**, 740-746.

**Deigner H.P., Claus R., Gehrke C., Bibak N., Blaess M., Cants M. and Kinscherf R.** (2001) Ceramide induces aSMase expression: implication for Ox-LDL-induced apoptosis. *FASEB. J.* **15**(3), 807-814.

**Desai N.N., Zhang H., Olivera A., Mattie M.E. and Spiegel S.** (1992) Sphingosine-1-phosphate, a metabolite of sphingosine, increases phosphatidic acid levels by phospholipase D activation. *J. Biol. Chem.* **267**, 23122-23128.

**Dressler K.A. and Kolesnick R.N.** (1990) Ceramide 1-Phosphate, a novel Phospholipid in Human Leukemia (HL-60) Cells. *J. Biol. Chem.* **265** (25), 14917-14921.

**Du Clos T.W.** (1989) C-reactive protein reacts with the U1 small nuclear ribonucleoprotein. *J. Immunol.* **143**, 2553-2559.

**Du Clos T.W.** (2000) Function of C-reactive protein. *Ann. Med.* **32**, 274-280 .

**Emsley J., White H.E., O'Hara B.P., Oliva G., Srinivasan N., Tickle I.J., Blundell T.L., Pepys M.B. and Wood S.P.** (1994) Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature.* **367**, 338-345.

**Esiri M.M, Nagy Z. and Jobst K.A.** (1999) Cerebrovascular disease and dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet.* **354**, 919-920.

**Familian A., Zwart B., Huisman H.G., Rensink I., Roem D., Hordijk P.L., Aarden L.A. and Hack C.E.** (2001) Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells. *J. Immunol.* **167**, 647-654.

**Forte T.M., Goth-Goldstein R., Nordhausen R.W. and McCall M.R.** (1993) Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles. *J. Lipid. Res.* **34**, 317-324.

**Fielding C.J. and Fielding P.E.** (1995) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid. Res.* **36**, 211-228.

**Fujiwara Y., Takahashi M., Tanaka M., Hoshi T., Someya T. and Shinkai S.** (2003) Relationships between Plasma  $\beta$ -Amyloid Peptide 1-42 and atherosclerotic Risk Factors in community-based older populations. *Gerontology.* **49**, 374-379.

**Gershov D., Kim S., Brot N. and Elkon K.B.** (2000) C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **192**, 1353-1364.

**Gewurz H., Zhang X.H. and Lint T.F.** (1995) Structure and function of the pentraxins. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 54-64.

**Glass C. and Witztum J.** (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell.* **104**(23), 503-516.

**Goldstein J.L. and Brown M.S.** (1977) The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 897-930.

**Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K. and Brown M.S.** (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**(1), 333-337.

**Goldstein J.L., DeBose-Boyd R.A., and Brown M.S.** (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* **124**(13), 35-46.

**Gomez-Muños A., Waggoner D.W., O'Brien L. and Brindley D.N.** (1995) Interaction of ceramides, sphingosine, and sphingosine 1-phosphate in regulating DNA synthesis and phospholipase D activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 26318-26325.

**Gomez M.A., Hamza E.H. and Brindley D.N.** (1992) Effects of sphingosine, albumin and unsaturated fatty acids on the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolases in rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1127**, 49-56.

**Gonzalez-Scarano F. and Baltuch G.** (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 219-240.

**Gordon D.A. and Jamil H.** (2000) Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **1486**, 72-83.

**Griffin J.H., Fernandez J.A. and Deguchi H.** (2001) Plasma lipoproteins, hemostasis and thrombosis. *Thromb. Haemost.* **86**(1), 386-394.

**Haberland M.E., Mottino G., Le M. and Frank J.S.** (2001) Sequestration of aggregated LDL by macrophages studied with freeze-etch electron microscopy. *J. Lipid. Res.* **42**(4), 605-619.

**Hardy J. and Allsop D.** (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* **12**, 383-388.

**Haverkate F., Thompson S.G., Pyke S.D., Gallimore J.R. and Pepys M.B.** (1997) Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet.* **349**(9050), 462-466.

**Hamazaki H.** (1987) Ca<sup>2+</sup>-mediated association of human serum amyloid P component with heparan sulfate and dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* **262**(4), 1456-1460.

**Hamazaki H.** (1995) Ca<sup>2+</sup>-dependent binding of human serum amyloid P-component to Alzheimer's beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **270**, 10392-10394.

**Han S.R., Momeni A., Strach K., Suriyaphol P., Fenske D., Paprotka K., Hashimoto S.I., Torzewski M., Bhakdi S. and Husmann M.** (2003) Enzymatically modified LDL induces cathepsin H in human monocytes: potential relevance in early atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 661-667.

**Hannun Y.A. and Obeid L.M.** (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends. Biochem. Sci.* **20**(2), 73-77.

**Hara H. and Yokoyama S.** (1991) Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **266**, 3080-3086.

**Hashimoto H., Kitagawa K., Hougaku H., Shimizu Y., Sakaguchi M., Nagai Y., Iyama S., Yamanishi H., Matsumoto M. and Hori M.** (2001) C-reactive protein is an independent predictor of the rate of increase in early carotid atherosclerosis. *Circulation.* **104**(1), 63-67.

**Havel R.J. and Kane J.P.** (1995) Structure and metabolism of plasma lipoproteins. In *Metabolic Bases of Inherited Disease* (Edited by Scriver C.A., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D.), p. 1841. McGraw-Hill, New York.

**Haverkate F., Thompson S.G., Pyke S.D., Gallimore J.R. and Pepys M.B.** (1997) Prediction of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet.* **349**, 462-466.

**He R., Sang H. and Ye R.D.** (2003) Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood.* **101**, 1572-1581.

**Hinkovska-Galcheva V.T., Boxer L.A., Mansfield P.J., Harsh D., Blackwood A. and Shayman J.A.** (1998) The formation of ceramide-1-phosphate during neutrophil phagocytosis and its role in liposome fusion. *J. Biol. Chem.* **273**, 33203-33209.

**Hirschberg K., Rodger J. and Futerman A.H.** (1993) The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem. J.* **290**, 751-757.

**Hutchcraft C.L., Gewurz H., Hansen B., Dyck R.F. and Pepys M.B.** (1981) Agglutination of complement-coated erythrocytes by serum amyloid P-component. *J. Immunol.* **126**(3), 1217-1219.

**Hurt-Camejo E., Camejo G., Peilot H., Oorni K. and Kovanen P.** (2001) Phospholipase A(2) in vascular disease. *Circ. Res.* **89**(4), 298-304.

**Ichikawa S. and Hirabayashi Y.** (1998) Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends. Cell. Biol.* **8**, 198-202.

**Jamal Z., Martin A., Gomez M.A. and Brindley D.N.** (1991) Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J. Biol. Chem.* **266**, 2988-2996.

**Jellinger K.A. and Mittler-Ferstl E.** (2003) The impact of cerebrovascular lesions in alzheimer disease—a comparative autopsy study. *J. Neurol.* **250**(9), 150-155.

**Jerome W.G. and Yancey P.G.** (2003) The role of microscopy in understanding atherosclerotic lysosomal lipid metabolism. *Microsc. Microanal.* **9**, 54-67.

**Jialal I. And Chait A.** (1989) Differences in the metabolism of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein by human endothelial cells: inhibition of cholesterol esterification by oxidatively modified low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **30**, 1561-1568.

**Jiang X., Francone O.L., Bruce C., Milne R., Mar J., Walsh A., Breslow J.L. and Tall A.R.** (1996) Increased prebeta-high density lipoprotein, apolipoprotein AI, and phospholipid in mice expressing the human phospholipid transfer protein and human apolipoprotein AI transgenes. *J. Clin. Invest.* **98**, 2373-2380.

**Jiang X.C., Bruce C., Mar J., Lin M., Ji Y., Francone O.L. and Tall A.R.** (1999) Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J. Clin. Invest.* **103**, 907-914.

**Jones M.J. and Murray A.W.** (1995) Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C-alpha translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **270**, 5007-5013.

**Joseph C.K., Wright S.D., Bornmann W.G., Randolph J.T., Kumar E.R., Bittman R., Liu J. and Kolesnick R.N.** (1994) Bacterial lipopolysaccharide has structural similarity to ceramide and stimulates ceramide-activated protein kinase in myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **269**(26), 17606-17610.

**Jovinge S., Ares M.P., Kallin B. and Nilsson J.** (1996) Human monocytes/macrophages release TNF-alpha in response to Ox-LDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**(12), 1573-1579.

**Kannel W.B., Castelli W.P. and Gordon T.** (1979) Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann. Intern. Med.* **90**, 85-91.

**Kapinsky M., Torzewski M., Büchler C., Duong C.Q., Rothe G. and Schmitz G.** (2001) Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1004-1010.

**Kellner-Weibel G., Jerome W.G., Small D.M., Warner G.J., Stoltenberg J.K., Kearney M.A., Corjay M.H., Phillips M.C. and Rothblat G.H.** (1998) Effects of intracellular free cholesterol accumulation on macrophage viability: a model for foam cell death. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **18**(3), 423-431.

**Khoo J.C., Miller E., McLoughlin P. and Steinberg D.** (1988) Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self- aggregation. *Arteriosclerosis.* **8**, 348-358.

**Khoury J., Moore K., Means T., Leung J., Terada K., Toft M., Freeman M. and Luster A.** (2003) CD36 mediates the innate host response to  $\beta$ -amyloid. *J. Exp. Med.* **197**(12), 1657-1666.

**Kisilevsky R. and Tam S.P.** (2002) Acute phase serum amyloid A, cholesterol metabolism, and cardiovascular disease. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* **21**, 291-305.

**Kinscherf R., Claus R., Deigner H.P., Nauen O., Gehrke C., Hermetter A., Russwurm S., Daniel V., Hack V. and Metz J.** (1997) Modified low density lipoprotein delivers substrate for ceramide formation and stimulates the sphingomyelin-ceramide pathway in human macrophages. *FEBS. Lett.* **405**(1), 55-59.

**Kisilevsky R. and Tam S.P.** (2003) Macrophagen cholesterol efflux and the active domains of serum amyloid A 2.1. *J. Lipid. Res.* **44**(12), 2257-2269.

**Klouche M., May A.E., Hemmes M., Meßner M., Kanse S.M., Preissner K.T. and Bhakdi S.** (1999) enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 784-793.

**Kluve-Beckerman B., Manaloor J.J. and Liepnieks J.J.** (2002) A pulse-chase study tracking the conversion of macrophage-endocytosed serum amyloid A into extracellular amyloid. *Arthritis. Rheum.* **46**, 1905-1913.

**Koenig W., Sund M., Frohlich M., Fischer H.G., Lowel H., Doring A., Hutchinson W.L. and Pepys M.B.** (1999) C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation.* **99**(2), 237-242.

**Kolesnick R. and Golde D.W.** (1994) The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell.* **77**(3), 325-328.

**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**, 523-558.

**Kruth H.S.** (2001) Lipoprotein cholesterol and atherosclerosis. *Curr. Mol. Med.* **1**, 633-653.

**Kruth H.S., Zhang W.Y., Skarlatos S.I., et al.** (1999) Apolipoprotein B stimulates formation of monocyte-macrophage surface-connected compartments and mediates uptake of low density lipoprotein-derived liposomes into these compartments. *J. Biol. Chem.* **274**, 7495-7500.

**Kuhn H., Heydeck D., Hugou I. and Gniwotta C.** (1997) In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**(5), 888-893.

**Kumon Y., Hosokawa T., Suehiro T., Ikeda Y., Sipe J. and Hashimoto K.** (2002) Acute-phase, but not constitutive serum amyloid A (SAA) is chemotactic for cultured human aortic smooth muscle cells. *Amyloid.* **9**, 237-241.

**Kumon Y., Suehiro T., Hashimoto K., Nakatani K. And Sipe J.D.** (1999) Local expression of acute phase serum amyloid A mRNA in rheumatoid arthritis synovial tissue and cells. *Rheumatol.* **26**, 785-790.

**Langmann T., Schumacher C., Morham S.G., Honer C., Heimerl S., Moehle C. and Schmitz G.** (2003) ZNF202 is inversely regulated with its target genes ABCA1 and apoE during macrophage differentiation and foam cell formation. *J. Lipid. Res.* **44**, 968-977.

**Laulederkind S.J., Bielawska A., Raghov R., Hannun Y.A. and Ballou L.R.** (1995) Ceramide induces interleukin 6 gene expression in human fibroblasts. *J. Exp. Med.* **182**(2), 599-604.

**Laporte V., Lombard Y., Levy-Benezra R., Tranchet C., Poindron P. and Warter J.** (2004) Uptake of A(beta) 1-40- and A(beta) 1-42-coated yeast by microglial cells: a role for LRP. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 451-461.

**Lavie Y. and Liscovitch M.** (1990) Activation of phospholipase D by sphingoid bases in NG108-15 neural-derived cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 3868-3872.

**Lavie Y., Piterman O. and Liscovitch M.** (1990) Inhibition of phosphatidic acid phosphohydrolase activity by sphingosine. Dual action of sphingosine in diacylglycerol signal termination. *FEBS. Lett.* **277**, 7-10.

**Li Q-X., Whyte S., Tanner J.E., Evin G., Beyreuther K. and Master C.** (1998) Secretion of Alzheimer's Disease A $\beta$  amyloid peptide by activated human platelets. *Lab. Invest.* **78**, 461-469.

**Li X.A., Hatanaka K., Guo L., Kitamura Y. and Yamamoto A.** (1994) Binding of serum amyloid P component to heparin in human serum. *Biophys. Biochem. Acta.* **1201**(2), 143-148.

**Li X.A., Hatanaka K., Ishibashi-Ueda H., Yutani C. and Yamamoto A.** (1995) Characterization of serum amyloid P component from human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **15**(2), 252-257.

**Li X.A., Yutani C. and Shimakado K.** (1998) Serum amyloid P component associates with high density lipoprotein as well as very low density lipoprotein but not low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 249-252.

**Liang, H.Q., Rye K.A. and Barter P.J.** (1994) Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J. Lipid. Res.* **35**, 1187-1199.

**Liebisch G., Drobnik W., Reil M., Trümbach B., Arnecke B., Olgemöller A., Roscher A. and Schmitz G.** (1999) Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular lipid extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (EMI-MS/MS). *J. Lipid. Res.* **40**, 1539-1546.

**Liebisch G., Binder M., Schifferer R., Langmann T., Schulz B. and Schmitz G.** (2006) High Throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochem. Biophys. Acta.* **1761**, 121-128.

**Liuzzo G., Biasucci L.M., Gallimore J.R., Grillo R.L., Rebuffi A.G., Pepys M.B. and Maseri A.** (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N. Engl. J. Med.* **331**, 417-4124.

**Lowry O.H., Rosebrough N.J., Lewis A.F. and Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

**Lund-Johansen F., Olweus J., Horejsi V., Skubitz K.M., Thompson J.S., Vilella R. and Symington F.W.** (1992) Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens (CD15, sialyl-CD15, CDw17, and CDw65). *J. Immunol.* **148**(10), 3221-3229.

**Lusa S., Jauhiainen M., Metso J., Somerharju P. and Ehnholm C.** (1996) The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochem. J.* **313** ( Pt 1), 275-282.

**Maclaurin J. and Fraser P.E.** (2000) effect of amino-acid substitution on Alzheimer's amyloid- $\beta$  peptide-glycosaminoglycan interactions. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6353-6361.

**Mandon E.C., Ehses I., Rother J., van-Echten E. and Sandhoff K.** (1992) Subcellular localization and membrane topologie of serine palmitoyltransferase, 3-dehydroshinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **267**, 11144-11148.

**Mangeny M., Lingwood C.A., Taga S., Caillou B., Tursz T. and Wiels J.** (1993) Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. *Cancer. Res.* **53**(21), 5314-5319.

**Marhaug G., Sletten K. and Husby G.** (1982) Characterization of amyloid related protein SAA complexed with serum lipoprotein (apoSAA). *Clin. Exp. Immunol.* **50**, 382-389.

**Markesbury W.R.** (1997) oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free. Radic. Biol. Med.* **23**, 134-147.

**Marnell L., Mold C. and Du Clos T.** (2005) C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clin. Immunol.* **117**, 104-111.

**Maxfield F.R., and Wüstner D.** (2002) Intracellular cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* **110**, 891-898.

**McLaurin J., Yang D. and Fraser P.E.** (2000) Review: modulating factors in amyloid-beta formation. *J. Struct. Biol.* **130**, 259-270.

**Meek R.L., Urieli-shoval S. and Benditt E.P.** (1994) Expression of apolipoprotein serum amyloid A mRNA in human atherosclerotic lesions and cultured vascular cells: implication for serum amyloid A function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3186-3190.

**Mendez A.J., Oram J.F. and Bierman E.L.** (1991) Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor- dependent efflux of intracellular cholesterol. *J. Biol. Chem.* **266**, 10104-10111.

**Mendez A.J.** (1995) Monensin and brefeldin A inhibit high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux from cholesterol-enriched cells. Implications for intracellular cholesterol transport. *J. Biol. Chem.* **270**, 5891-5900.

**Mendez A.J.** (1997) Cholesterol efflux mediated by apolipoproteins is an active cellular process distinct from efflux mediated by passive diffusion. *J. Lipid. Res.* **38**, 1807-1821.

**Merrill A.H.J. and Jones D.D.** (1990) An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1044**, 1-12.

**Michel C. and van-Echten-Deckert E.** (1997) Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS. Lett.* **416**, 153-155.

**Minagar A., Shapshak P., Fujimura R., Ownby R., Heyes M. and Eisdorfer C.** (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **202**, 13-23.

**Mold C., Gresham H.D. and Du Clos T.W.** (2001) Serum amyloid P component (SAP) and C-reactive protein (CRP) mediate phagocytosis through murine Fc $\gamma$  receptors. *J. Immunol.* **166**, 1200-1205.

**Mold C., Rodriguez W., Rodic-Polic B. and Du Clos T.W.** (2002) C-reactive protein mediates protection from lipopolisaccharide through interactions with Fc $\gamma$ R. *J. Immunol.* **169**, 7019-7025.

**Moore K., El Khoury J., Medeiros L., Terada K., Geula C., Luster A. and Freeman M.** (2002) A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of  $\beta$ -amyloid. *Biol. Chem.* **49**(277), 47373-47379.

**Morrow D.A., Rifai N., Antman E.M., Weiner D.L., McCabe C.H., Cannon C.P. and Braunwald E.** (2000) Serum amyloid A predicts early mortality in acute coronary syndromes: a TIMI 11A substudy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 358-362.

**Mortensen R.F., Osmand A.P., Lint T.F. and Gewurz H.** (1976) Interaction of C-reactive protein with lymphocytes and monocytes: complement-dependent adherence and phagocytosis. *J. Immunol.* **117**, 774-781.

**Mueller C., Buettner H.J., Hodgson J.M., Marsch S., Perruchoud A.P., Roskamm H. and Neumann F.J.** (2002) Inflammation and long-term mortality after non-ST elevation acute coronary syndrome treated with a very early invasive strategy in 1042 consecutive patients. *Circulation.* **105**, 1412-1415.

**Mukhin D.N., Chao F.F. and Kruth H.S.** (1995) Glycosphingolipid accumulation in the aortic wall is another feature of human atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**(10), 1607-1615.

**Musliner T.A., Long M.D., Forte T.M., Nichols A.V., Gong E.L., Blanche P.J. and Krauss R.M.** (1991) Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J. Lipid. Res.* **32**, 917-933.

**Munro S.** (2003) Earthworms and lipid couriers. *Nature.* **426**, 775-776.

**Nägga K., Gottfries J., Blennow K. and Marcusson J.** (2002) Cerebrospinal fluid phospho-tau, total tau and  $\beta$ -Amyloid1-42 in the differentiation between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **14**, 183-190.

**Nauta A.J., Daha M.R., van Kooten C. and Roos A.** (2003) Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *TRENDS. Immunol.* **24**(3), 148-154.

**Nishizuka Y.** (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB. J.* **9**, 484-496.

**Obeid L.M., Okamoto Y. and Mao C.** (2002) Yeast sphingolipids: metabolism and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**, 163-171.

**Ogasawara K., Mashiba S., Wada Y., Sahara M., Uchida K., Aizawa T. and Kodama T.** (2004) A serum amyloid A and LDL complex as a new prognostic marker in stable coronary artery disease. *Atherosclerosis.* **174**, 349-356.

**Ohanian J. and Ohanian V.** (2001) Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell. Mol. Life. Sci.* **58**(14), 2053-68.

**Olivera A. and Spiegel S.** (2001) Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular junctions. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* **64**, 123-134.

**Oram J.F. and Yokoyama S.** (1996) Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J. Lipid. Res.* **37**, 2473-2491.

**Orci L., Montesano R., Meda P., Malaisse L.F., Brown D., Perrelet A. and Vassalli P.** (1981) Heterogeneous distribution of filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 293-297.

**Østerud B. and Bjørklid E.** (2003) Role of monocytes in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **83**, 1069-1072.

**Palinski W., Horkko S., Miller E., Steinbrecher U.P., Powell H.C., Curtiss L.K. and Witztum J.L.** (1996) Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma. *J. Clin. Invest.* **98**(3), 800-814.

**Pepys M.B., Baltz M.L., Gomer K., Davis J.S. and Doenhoff M.** (1979) Serum amyloid P component is an acute phase reactant in mouse. *Nature.* **278**, 259-261.

**Pepys M.B. and Butler P.J.** (1987) Serum amyloid P-component is the major calcium-dependent specific DNA-binding protein of the serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 308-313.

**Pepys M.B., Dash A.C., Markham R.E., Thomas H.C., Williams B.D. and Petrie A.** (1978) Comparative clinical study of Protein SAP (amyloid P component) and C-reactive protein in serum. *Clin. Exp. Immunol.* **32**, 119-124.

**Pepys M.B., Baltz M.L., de Beer F.C., Dyck R.F., Holford S., Breathnach S.M., Black M.M., Tribe C.R., Evans D.J. and Feinstein A.** (1982) Biology of serum amyloid P component. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**, 286-298.

**Pepys M.B., Dyck R.F., de Beer F.C., Skinner M. and Cohen A.S.** (1979) Binding of serum amyloid P-component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin. Exp. Immunol.* **38**, 284-293.

**Pfeiffer A., Bottcher A., Orso E., Kapinsky M., Nagy P., Bodnar A., Spreitzer I., Liebisch G., Drobnik W., Gempel K., Horn M., Holmer S., Hartung T., Multhoff G., Schutz G., Schindler H., Ulmer A.J., Heine H., Stelter F., Schutt C., Rothe G., Szollosi J., Damjanovich S., Schmitz G.** (2001) Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur. J. Immunol.* **31**(11), 3153-3164.

**Pierrot N., Ghisdal P., Caumont A. and Octave J.** (2004) Intraneuronal amyloid- $\beta$ 1-42 Production Triggered by Sustained Increase of Cytosolic Calcium Concentration Induces Neuronal Death. *J. Neurochem.* **88**, 1140-1150.

**Postigo A.A., Marazuela M., Sanchez-Madrid F. and de Landazuri M.O.** (1994) B lymphocyte binding to E- and P-selectins is mediated through the de novo expression of carbohydrates on in vitro and in vivo activated human B cells. *J. Clin. Invest.* **94**(4), 1585-1596.

**Pratico D., Tangirala R.K., Rader D.J., Rokach J. and FitzGerald G.A.** (1998) Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat. Med.* **4**(10), 1189-1192.

**Ridker P.M., Hennekens C.H., Buring J.E. and Rifai N.** (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N. Engl. J. Med.* **342**, 836-843.

**Ridker P.M.** (2004) High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. *Am. Heart. J.* **148**, 19-26.

**Ridker P.M., Cushman M., Stampfer M.J., Tracy R.P. and Hennekens C.H.** (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N. Engl. J. Med.* **336**, 973-979.

**Robey F.A., Jones K.D., Tanaka T. and Liu T.Y.** (1984) Binding of C-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles. A possible physiological role of C-reactive protein. *J. Biol. Chem.* **259**, 7311-7316.

**Rosalki S.B.** (2001) C-reactive protein. *Int. J. Clin. Pract.* **55**(4), 269-270.

**Ros E.** (2000) Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* **151**, 357-379.

**Ross R.** (1999) Atherosclerosis-An Inflammatory disease. *N. Eng. J. Med.* **340**, 115-126.

**Rothblat G.H., Llera-Moya M., Atger V., Kellner-Weibel G., Williams D.L. and Phillips M.C.** (1999) Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J. Lipid. Res.* **40**, 781-796.

**Rothe G., Gabriel H., Kovacs E., Klucken J., Stohr J., Kindermann W. and Schmitz G.** (1996) Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1437-1447.

**Rye K.A., Clay M.A. and Barter P.J.** (1999) Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis*. **145**, 227-238.

**Sakane F., Yamada K. and Kanoh H.** (1989) Different effects of sphingosine, R59022 and anionic amphiphiles on two diacylglycerol kinase isozymes purified from porcine thymus cytosol. *FEBS. Lett.* **255**, 409-413.

**Salonen E.M., Vartio T., Hedman K. and Vaheri A.** (1984) Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein *J. Biol. Chem.* **259**, 1496-1501.

**Scharnagl H., Tisljar U., Winkler K., Hüttinger M., Nauck M.A., Groß W., Wieland H., Ohm T.G. and März W.** (1999) The  $\beta$ A4 Amyloid peptide complexes to and enhances the uptake of  $\beta$ -very low density lipoproteins by the low density lipoprotein receptor-related protein and heparan sulfate proteoglycans pathway. *Lab. Invest.* **79**, 1271-1286.

**Schmitz G., Robenek H., Lohmann U. and Assmann G.** (1985a) Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO. J.* **4**, 613-622.

**Schmitz G., Kapinski W. and Orsó E.** (2000) ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Lipidol.* **11**, 493-501.

**Schmitz G. and Orsó E.** (2001) Intracellular cholesterol and phospholipid trafficking: comparable mechanisms in macrophages and neuronal cells. *Neurochem. Res.* **26**, 1045-1068.

**Schmitz G. and Langmann T.** (2005) Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1735**, 1-19.

**Schroeder F. and Nemezc G.** (1990) Transmembrane Cholesterol Distribution. In *Advances in Cholesterol Research* (Edited by Esfahani M. and Swaney J.B.), p. 47 Telford Press, Caldwell.

**Schutze S., potthoff K., Machleidt T., Berkovic D., Wiegmann K. and Kronke M.** (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell.* **71**, 765-776.

**Schwalbe R.A., Dahlback B. and Nelsestuen G.L.** (1990) Independent association of serum amyloid P component, protein S, and complement C4b with complement C4b-binding protein and subsequent association of the complex with membranes. *J. Biol. Chem.* **265**(35), 21749-21757.

**Schwalbe R.A., Dahlback B., Coe J.E. and Nelsestuen G.L.** (1992) Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry*. **31**, 4907-4915.

**Seifert P.S., Hugo F., Tranum-Jensen J., Zahringer U., Muhly M. and Bhakdi S.** (1990) Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J. Exp. Med.* **172**(2), 547-557.

**Shrive A.K., Cheetham G.M., Holden D., Myles D.A., Turnell, W.G., Volanakis J.E., Pepys M.B., Bloomer A.C. and Greenhough T.J.** (1996) Three dimensional structure of human C-reactive protein. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 346-354.

**Simons K. and Ehehalt R.** (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 891-898.

**Simons K. and Ikonen E.** (2000) How cells handle cholesterol. *Science*. **290**, 1721-1726.

**Simionescu N., Vasile E., Lupu F., Popescu G. and Simionescu M.** (1986) Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am. J. Pathol.* **123**(1), 109-125.

**Singh S. and Singh P.P.** (2001) serum amyloid P component-induced colony-stimulating factors production by macrophages. *Scand. J. Immunol.* **52**(2), 155-161.

**Sjögren M, Mielke M, Gustafson D, Zandi P, Skoog I.** Cholesterol and Alzheimer's Disease-is there a Relation?. *Mech Ageing Dev* 2006;127:138-147.

**Sparks D.L.** (1997) Coronary artery disease, hypertension, ApoE and cholesterol: a link to Alzheimer's disease?. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **826**, 128-146.

**Spiegel S. and Milstien S.** (1996) Sphingoid bases and phospholipase D activation. *Chem. Phys. Lipids.* **80**, 27-36.

**Stanyer L., Betteridge D.J. and Smith C.** (2004) Potenciation of  $\beta$ -amyloid polymerisation by low-density lipoprotein enhances the peptide's vasoactivity. *Biochem. Biophys. Acta.* **1670**, 147-155.

**Stein M.P., Mold C. and Du Clos T.W.** (2000) C-reactive protein binding to murine leukocytes requires Fc gamma receptors. *J. Immunol.* **164**(3), 1514-1520.

**Steinberg D. (1997)** Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **272** (34), 20963-20966.

**Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Leake D.S., Witztum J.L. and Steinberg D. (1984)** Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**(12), 3883-3887.

**Soccio R.E. and Breslow J.L. (2004)** Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1150-1160.

**Sun Y.X., Minthon L., Wallmark A., Warkentin S., Blennow K. and Janciauskiene S. (2003)** Inflammatory markers in matched plasma and cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **16**, 136-144.

**Suriyaphol P., Fenske D., Zähringer U., Han S., Bhakdi S. und Hussmann M. (2002)** Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells. Role of free fatty acids. *Circulation.* **106**, 2581-2587.

**Swanson S.J., Christner R.B. and Mortensen R.F. (1992)** Human serum amyloid P-component (SAP) selectively binds to immobilized or bound forms of C-reactive protein (CRP). *Biochem. Biophys. Acta.* **1160**(3), 309-316.

**Tabas I. (2002)** Consequences of cellular cholesterol accumulation: basis concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* **110**, 905-911.

**Takahashi M., Yokota T., Kawano H., Gondo T., Ishihara T. and Uchino F. (1989)** Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **415**, 411-419.

**Takahashi Y. and Smith J.D. (1999)** Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 11358-11363.

**Tall A.R., Costet P. and Wang N. (2002)** regulation and mechanisms of macrophages cholesterol efflux. *J. Clin. Invest.* **110**, 899-904.

**Taskinen S., Kovanen P.T., Jarva H., Meri S. and Pentikäinen M.O. (2002)** Binding of C-reactive protein to modified low density lipoprotein (LDL) particles: identification of unesterified cholesterol as a novel ligand for CRP. *Biochem. J.* **367**(Pt 2), 403-412.

**Terkeltaub R., Banka C.L., Solan J., Santoro D., Brand K. and Curtiss L.K.** (1994) Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arterioscler. Thromb.* **14**(1), 47-53.

**Torzewski M., Klouche M., Hock J., Messner M., Dorweiler B., Torzewski J., Gabbert H.E. and Bhakdi S.** (1998) Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**(3), 369-378.

**Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P. and Abraham W.C.** (2003) Role of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* **70**, 1-32.

**Uhlir C.M. and Whitehead A.S.** (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur. J. Biochem.* **265**, 501-523.

**Urieli-Shoval S., Linke R.P. and Matzner Y.** (2000) Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr. Opin. Hematol.* **7**(1), 64-69.

**Van den Eijnden M.M., van Noort J.T., Hollaar L., van der Laarse A. and Bertina R.M.** (1999) Cholesterol or triglyceride loading of human monocyte-derived macrophages by incubation with modified lipoproteins does not induce tissue factor expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(2), 384-392.

**Van Lenten B.J., Hama S.Y., de Beer F.C., Stafforini D.M., McIntyre T.M., Prescott S.M., La Du B.N., Fogelman A.M. and Navab M.** (1995) Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response-loss of protective effects of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J. Clin. Invest.* **96**, 2758-2767.

**Vlassara H.** (1996) Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann. Med.* **28**(5), 419-426.

**Volanakis J.E.** (2001) Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol. Immunol.* **38**, 189-197.

**Volanakis J.E. and Wirtz K.W.** (1979) Interaction of c-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature.* **281**(5727), 155-157.

**Volanakis J.E. and Kaplan M.H.** (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **136**, 612-614.

**Wagers A.J., Stoolman L.M., Kannagi R., Craig R. and Kansas G.S.** (1997) Expression of leukocyte fucosyltransferases regulates binding to E-selectin: relationship to previously implicated carbohydrate epitopes. *J. Immunol.* **159**(4), 1917-1920.

**Waggoner D.W., Gomez M.A., Dewald J. and Brindley D.N.** (1996) Phosphatidate phosphohydrolase catalyzes the hydrolysis of ceramide 1-phosphate, lysophosphatidate, and sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **271**, 16506-16509.

**Westman J., Kallin B., Bjorkhem I., Nilsson J. and Diczfalusy U.** (1998) Sterol 27-hydroxylase- and apoAI/phospholipid-mediated efflux of cholesterol from cholesterol-laden macrophages: evidence for an inverse relation between the two mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**, 554-561.

**Waterham H.R.** (2002) Inherited disorders of cholesterol biosynthesis. *Clin. Genet.* **61**, 393-403.

**Wieland E., Parthasarathy S. and Steinberg D.** (1993) Peroxidase-dependent metal-independent oxidation of low density lipoprotein in vitro: a model for in vivo oxidation?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 5929-5933.

**Wright S.D. and Kolesnick R.N.** (1995) Does endotoxin stimulate cells by mimicking ceramide?. *Immunol. Today.* **16**(6), 297-302.

**Xia W.** (2000) Role of presenilin in  $\gamma$ -secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Exp. Gerontol.* **35**, 453-460.

**Yamada K., Sakane F., Imai S. and Takemura H.** (1993) Sphingosine activates cellular diacylglycerol kinase in intact Jurkat cells, a human T-cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* **1169**, 217-224.

**Yamamoto T., Hoshino A., Takahashi S., Kawarabayasi Y., Iijima H. and Sakay J.** (1995) The role of the very low density lipoprotein receptor in the metabolism of plasma lipoproteins containing ApoE. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **748**, 217-224.

**Yatomi Y., Igarashi Y. and Hakomori S.** (1996) Effects of exogenous gangliosides on intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and functional responses in human platelets. *Glycobiology.* **6**(3), 347-353.

**Yatomi Y., Ruan F., Megidish T., Toyokuni T., Hakomori S. and Igarashi Y.** (1996) N,N-Dimethylsphingosine Inhibition of Sphingosine Kinase and Sphingosine 1-Phosphate Activity in Human Platelets. *Biochem.* **35**, 626-633.

**Yazawa H., Yu Z-X., Takeda K., Le Y., Gong W., Ferrans V.J., Oppenheim J.J., Li C.H. and Wang J.M.** (2001)  $\beta$ -Amyloid peptide (A $\beta$ 42) is internalized via the G-protein-coupled receptor FPRL1 and forms fibrillar aggregates in macrophages. *FASEB. J.* **15**, 2454-2462.

**Yeh E.T.H., Anderson H.V. and Pasceri V.** (2001) C-reactive protein: linking inflammation to cardiovascular complications. *Circulation.* **104**, 974-975.

**Ying S.C., Gewurz A.T., Jiang H. and Gewurz H.** (1993) Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the A chain collagen-like region of C1q. *J. Immunol.* **150**(1), 169-176.

**Zahedi K.** (1996) Characterization of the binding of serum amyloid P to type IV collagen. *J. Biol. Chem.* **271**(25), 14897-14902.

**Zahedi K.** (1997) Characterization of the binding of serum amyloid P to laminin. *J. Biol. Chem.* **272**(4), 2143-2148.

**Zhao Y. and Marcel Y.L.** (1996) Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry.* **35**, 7174-7180.

**Zwaka T.P., Hombach V. and Torzewski J.** (2001) C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation.* **103**, 1194-1197.

**Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:**

**Liebisch G., Binder M., Schifferer R., Langmann T., Schulz B. and Schmitz G.**  
(2006) High Throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochem. Biophys. Acta.* **1761**, 121-128.

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Regensburg, den 21. August 2006

Berta Elena Schulz Bañares

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Schmitz für die interessante Themenstellung und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Buschauer herzlich für die fakultätsinterne Betreuung danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Gregor Rothe, Herrn Dr. Michael Torzewski und insbesondere Herrn Dr. Stefan Barlage, die durch viele Diskussionen und Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderen Dank möchte ich Ella, Gerhard, Jolanthe, Carsten, Doreen, Birgit, Margot, Astrid, Connie und Otti ausdrücken.

Für ein Gelingen einer guter Arbeit sind eine heitere Atmosphäre im Labor, im Büro, am Balkon oder dem Kaffeeraum essentiell und deshalb gilt nicht minder mein Dank Gilda, Daniela, Irina, Wolfgang Hauer, Prof. Dr. Aslanidis, Guido und Rania, Ahmed, Andrea, Alfons, Alfred, Bettina, Harry und das Routine Team.

Meine Freunde aus Regensburg und der Welt möchte ich auch danken, wie Stephan Laib, Peter, Roland Reichenbach..., Bettina Wiessmann, Satoko Kuga, Javy, Nancy.

Además quiero agradecer en forma especial a mis colegas y amigos de la Universidad de Concepción como también a la universidad misma por su apoyo incondicional en el desarrollo y finalización de mi doctorado.

Por supuesto reciba también mis agradecimientos la DAAD por el apoyo financiero entregado.

A mis queridos padres y familia dedico este trabajo y les agradezco el inmenso apoyo a la distancia.

Mi más especial agradecimiento hago llegar a mi querido Bernd, quién me ha ayudado a mantener mi frente en alto y a salir de todas dificultades con mucho amor y paciencia. Gracias por estar a mi lado en todo momento, directa o indirectamente.