

**Charakterisierung des zellulären
Lipideffluxes von primären, humanen
Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät IV – Pharmazie und Chemie der
Universität Regensburg**

vorgelegt von

**Rainer Schifferer
aus Marktl**

Promotionsgesuch eingereicht am: 09.01.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. G. Schmitz

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Elz

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Buschauer

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Schmitz

3. Gutachter: Prof. Dr. J. Heilmann

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 2001 bis Januar 2006 in der Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Schmitz.

Danksagung

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

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Gerhard Liebisch für die ausgezeichnete, umfassende Betreuung sowie die zahlreichen Diskussionen und die stets gutgelaunte Leitung der Arbeitsgruppe. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem ehemaligen Leiter der Arbeitsgruppe Herrn Dr. Wolfgang Drobnik für die hervorragende Einführung in die Thematik sowie die aufschlussreichen Anregungen.

Allen Mitarbeitern des Institutes sei für das freundliche, hilfreiche und unterstützende Klima gedankt.

Für die Unterstützung bei Zellkultur, Experimenten und anderen Labortätigkeiten will ich Conny, Astrid, Otti und insbesondere den immer hilfsbereiten und zuvorkommenden Mitarbeiterinnen aus unserer Arbeitsgruppe Doreen und Jolanthe danken.

Ein großes Dankeschön auch an meine Mitstreiter und Bürokollegen Margot, Marion, Christoph, Bernd und Sascha, an das Squash- und Sportteam sowie an den „Apotheker-Stammtisch“.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meiner Freundin Yvonne sowie bei meinem Bruder, meiner Mutter und meinem leider im Februar 2005 verstorbenen Vater für die großartige Unterstützung mit Rat und Tat bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	14
1.1 Lipoproteine	16
1.1.1 Resorption von Nahrungslipiden.....	18
1.1.2 LDL und andere ApoB-haltige Lipoproteine.....	18
1.1.3 HDL und ApoA-I.....	20
1.2 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1).....	22
1.2.1 Transskriptionelle Regulation	23
1.2.2 Zelluläre Lokalisation und Regulation auf Proteinebene.....	24
1.2.3 Zelluläre Funktion und Interaktion mit Proteinen.....	25
1.3 Lipidefflux.....	27
1.3.1 Aqueous Diffusion.....	29
1.3.2 ABCA1 spezifische Lipidierung von ApoA-I	29
2 Zielsetzung	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Etablierung eines Lipidefflux-Systems mit primären, humanen Monozyten/Makrophagen	32
3.1.1 Abhängigkeit des Effluxes von Zellzahl und Beladung	32
3.1.2 Einfluss des Entladungsmediums auf den spezifischen Efflux ...	34
3.1.3 Abhängigkeit des Lipideffluxes von Monozyten-Spendern	35
3.1.4 Abhängigkeit des Lipideffluxes von Plasmaspendern.....	36
3.2 Etablierung einer ESI-MS/MS-basierten Analytik des Lipideffluxes ...	38
3.2.1 Vergleich des Lipideffluxes zwischen MS und radioaktivem Label	38
3.2.2 Effluxmodell mit Fibroblasten.....	40
3.2.2.1 Vergleich der Lipidmuster von Zellen und Entladungsmedien	40
3.2.2.2 Speziesprofil von Phosphatidylcholin	41
3.2.2.3 Speziesprofil von Sphingomyelin.....	43

3.2.2.4	Speziesprofil der Cholesterinester	44
3.2.3	Lipidmuster im Effluxmodell an Monozyten/Makrophagen	47
3.2.3.1	Vergleich der Lipidmuster von Zellen und Entladungsmedien	47
3.2.3.2	Speziesprofil von Phosphatidylcholin	49
3.2.3.3	Speziesprofil von Sphingomyelin	51
3.2.3.4	Effluxprofil der PC- und SPM-Spezies unter Verwendung von deuteriertem Cholin	52
3.2.3.5	Speziesprofil der Cholesterinester	54
3.3	Modulation des Lipideffluxes durch Sphingolipide und Rolle der PKC	57
3.3.1	Einfluss von Sphingolipiden auf den Lipidefflux	57
3.3.2	Proteinexpression der PKC-Isoformen in Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen	59
3.3.3	Modulation der PKC-Expression	61
3.4	Effekte von K ⁺ -Kanal-Inhibitoren im Lipidefflux-System	63
3.4.1	Modulation des spezifischen Lipideffluxes	63
3.4.1.1	Einfluss auf Fibroblasten	63
3.4.1.2	Einfluss auf Monozyten/Makrophagen	65
3.4.2	Modulation zellulären Cholesterinkonzentrationen während der Entladungsphase	67
3.4.2.1	Fibroblasten	67
3.4.2.2	Monozyten/Makrophagen	68
3.4.3	Modulation zellulären Cholesterinkonzentrationen während der Beladungsphase	69
3.4.3.1	Fibroblasten	69
3.4.3.2	Monozyten/Makrophagen	70
3.4.4	Vergleich von K ⁺ -Kanal-Inhibitoren mit dem ACAT-Inhibitor S-58035 im Lipidefflux-System	71
3.4.5	Einfluss von Modulatoren purinerger Rezeptoren auf den Lipidefflux	74

4 Diskussion.....	76
4.1 Lipidefflux von Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten	76
4.1.1 Etablierung eines Effluxsystems mit primären, humanen Monozyten	76
4.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung des Lipideffluxes ...	78
4.2 Einfluss von Sphingolipiden auf den Lipidefflux und Rolle der PKC ..	83
4.2.1 Modulation des spezifischen Lipideffluxes durch Sphingolipide .	83
4.2.2 Modulation der PKC-Expression.....	85
4.3 Einfluss von K ⁺ -Kanal-Inhibitoren auf den Lipidefflux	87
4.3.1 Modulation des spezifischen Lipideffluxes	87
4.3.2 Modulation des zellulären Cholesteringehaltes	88
4.3.3 Einfluss von P ₂ -Modulatoren auf den spezifischen Lipidefflux ...	89
5 Material und Methoden.....	91
5.1 Chemikalien	91
5.1.1 Lösungsmittel (LM)	91
5.1.2 Radiochemikalien	91
5.1.3 Lipidstandards	91
5.1.4 Beladungs-/Lipidefflux-Modulatoren	91
5.2 Verbrauchsmaterial und Geräte.....	92
5.2.1 Materialien und Zusätze zur Zellkultur	92
5.2.2 Kulturgefäße	92
5.3 Zellkultur	93
5.3.1 Einfrieren und Auftauen von Fibroblasten.....	93
5.3.2 Vitalitätsprüfung	93
5.3.3 Mycoplasmentest.....	94
5.3.4 Kultur von primären Hautfibroblasten	94
5.3.5 Kultur von humanen Monozyten	94
5.4 Lipoproteine	95
5.4.1 Sequentielle Ultrazentrifugation	95

5.4.2	Dialyse der Lipoproteinfaktionen	95
5.4.3	Analytik der Lipoproteinfaktionen.....	96
5.4.4	Präparation von E-LDL	96
5.5	Beladungs- und Lipidefflux-Phase	97
5.5.1	Untersuchung der Beladungsphase.....	97
5.5.2	Lipidefflux von Fibroblasten	97
5.5.3	Lipidefflux mit Monozyten/Makrophagen	98
5.6	Aufarbeitung und Lipidextraktion	99
5.6.1	Lipidextraktion.....	99
5.6.2	Analytik mit Szintilationszähler.....	99
5.6.3	Analytik mittels ESI-MS/MS	100
5.7	Berechnung des Lipideffluxes	102
5.7.1	Lipidefflux	102
5.7.2	Spezifischer Lipidefflux	102
5.8	Proteinanalytik	103
5.8.1	Messung der Proteinkonzentrationen	103
5.8.2	Subzelluläre Fraktionierung	103
5.8.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	103
5.8.4	Coomassie-Färbung	104
5.8.5	Western Blot	104
6	Zusammenfassung	106
7	Publikationen	109
8	Literaturverzeichnis	109

Abkürzungen

4-AP	4-Aminopyridin
Abb	Abbildung
ABCA1	„ATP-binding cassette transporter A1“
Ac-LDL	Acetyliertes LDL
ACAT	Acetyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase
ACEH	Saure Cholesterinesterhydrolase
ADP	Adenosindiphosphat
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BK	„broad conductance“
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	„cluster of differentiation“
CE	Cholesterinester
Cer	Ceramid
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
CFTR	„cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
CHO	„chinese hamster ovary“
Ci	Curie
CTX	Charybdotoxin
DAG	Diacylglycerin
DC	Dünnschichtchromatographie

Cdc	„cell division cycle“
DMEM	„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“
DMS	Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	„decay per minute“
E-LDL	Enzymatisch modifiziertes LDL
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
FACS	„fluorescence-activated cell sorting“
FC	Freies Cholesterin
FCS	Fötales Kälberserum
Glibencl.	Glibenclamid
GIRK	„G-protein-coupled inward rectifier K ⁺ -channel“
GSL	Glykosphingolipide
HDL	„high density lipoprotein“
HL	Hepatische Lipase
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HRP	„horseradish peroxidase“
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
IDL	„intermediate density lipoprotein“
IL	Interleukin

INF	Interferon
ITX	Iberiotoxin
KCl	Kaliumchlorid
LCAT	Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase
LDL	„low density lipoprotein“
LOX	„lectin-like oxidised LDL-receptor“
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	„LDL-receptor related protein“
LXR	„liver-X-receptor“
M-CSF	„macrophage-colony stimulating factor“
MDR1	„multidrug resistance“-Permeabilitäts-Glykoprotein 1
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-Ribonucleinsäure“
MS	Massenspektrometrie
NCEH	Neutrale Cholesterinesterhydrolase
Ox-LDL	Oxidiertes LDL
P-Rezeptoren	Purinerge Rezeptoren
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDZ	„PSD95-discs large ZO1-protein“
PE	Phosphatidylethanolamin
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipid
PLC	Phospholipase C
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PMA	Phorbolmyristylacetat
PPAR	„peroxisome proliferator-activated receptor“
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RCT	Reverser Cholesterintransport
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	„small interfering“ Ribonukleinsäure
SNARE	„soluble-N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors“
SK	„small conductance“
SPM	Sphingomyelin
SPMase	Sphingomyelinase
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SR-A	Scavengerrezeptor A
SR-BI	Scavengerrezeptor BI
SREBP	„sterol response element binding protein“
SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor

SUV	„small unilamellar vesicles“
TC	„total cholesterol“
TD	Tangier-Krankheit
TE	Tris-EDTA
TEA	Tetraethylammoniumchlorid
TG	Triglycerid
TGF	„tumor growth factor“
TMD	Transmembranäre Domäne
TNF	Tumornekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitmonolaurat
UV	Ultraviolett
VLDL	„very low density lipoprotein“

1 Einleitung

Obwohl in den vergangen 30 Jahren große Fortschritte in der Erforschung und Bekämpfung atherosklerotischer Erkrankungen gemacht wurden, stellen diese nach wie vor die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen dar (Bericht des Bundesministeriums für Gesundheit 2005; Braunwald 1997; Breslow 1997).

Mit der Entdeckung und Charakterisierung des LDL-Rezeptors, sowie der Regulation des Schlüsselenzyms in der Cholesterinbiosynthese, der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) durch Brown und Goldstein wurden die Grundsteine in der Aufklärung der Atherogenese gelegt. Die momentan akzeptierte Theorie sieht die Atherosklerose als multifaktorielle, entzündliche Erkrankung (Lusis 2000; Ross 1999). Sie gründet auf den Hypothesen einer „response to injury“ (Ross 1999) sowie einer „response to retention“ (Schwenke et al. 1989a; Schwenke et al. 1989b), welche zusammen dem komplexen Erscheinungsbild der Atherosklerose weitgehend gerecht werden. Als Auslöser wird eine endotheliale Dysfunktion angesehen, welche durch verschiedene inflammatorische Stimuli zur Infiltration von Monozyten führt. Die so initiierte Schaumzellbildung mit Ablagerung von Cholesterin und Ca^{2+} -Salzen setzt sich oft unbemerkt fort, bis die im Laufe der Zeit ausgebildeten „vulnerable plaques“ aufbrechen. Eine dadurch ausgelöste Thrombusbildung kann letztendlich zum Gefäßverschluss mit Herzinfarkt oder Schlaganfall führen.

Die Substanzklasse der Statine, Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, stellt momentan das Mittel der Wahl zur dauerhaften Senkung erhöhter LDL-Cholesterinwerte dar. Wie in zahlreichen epidemiologischen Studien gezeigt (4S-study 1994; Downs et al. 1998; Nissen et al. 2004), stellt dies einen bedeutenden Beitrag zur Senkung der Mortalität in der Atherosklerose dar. Physiologisch besteht daneben aber auch die Möglichkeit des sogenannten reversen Cholesterintransports (RCT); hierbei wird Cholesterin aus peripheren Zellen heraus und nachfolgend über HDL_3 zur Leber transportiert. Die von

Glomset entwickelte Hypothese des reversen Cholesterintransportes (Glomset 1968) geht von einer initialen Entladung peripherer Zellen hin zu extrazellulären Lipidakzeptoren wie ApoA-I und HDL₃-Vorstufen aus. Diese Entladung wird im Wesentlichen durch den ATP-binding-cassette Transporter A1 (ABCA1) vermittelt, welcher 1999 als defektes Gen in der Tangier Krankheit charakterisiert wurde (Bodzioch et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999; Rust et al. 1999). Mit der Vermittlung des Lipideffluxes stellt ABCA1 den ersten Schritt im RCT dar und nimmt somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose ein.

Im Zuge des Effluxes zellulärer Lipide entstehen durch das Einwirken plasmatischer Enzyme, wie v. a. der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), reife HDL-Partikel. Leberzellen können HDL durch die Expression von ApoE-Rezeptoren als Holopartikel internalisieren sowie über SR-BI selektiv Cholesterinester (CE) aus den HDL-Partikeln aufnehmen. Hepatisch aufgenommenes Cholesterin wird anschließend zu Gallensäuren katabolisiert oder in unveresterter Form zusammen mit Gallensäuren und Phospholipiden in die Galle sezerniert. Nachfolgend wird Cholesterin entweder fäkal ausgeschieden oder über den enterohepatischen Kreislauf wieder vom Darm aufgenommen. Somit besteht in einer Erhöhung des zellulären Lipideffluxes und der damit verbundenen Stimulation des RCT ein weiterer Ansatzpunkt in der Bekämpfung der Atherosklerose. Dies wird durch bereits verwendete Pharmaka wie Nikotinsäure (Niaspan[®]) erreicht, welche durch eine Erhöhung der HDL zum RCT beiträgt. Der therapeutische Nutzen einer Stimulation des Lipideffluxes und damit des reversen Cholesterintransportes zeigt sich ferner in einer Reduktion des Koronararterienvolumens durch die Infusion von ApoA-I Milano (Navab et al. 2005a; Nissen et al. 2003; Rothblat et al. 2002).

1.1 Lipoproteine

In der Entstehung der Atherosklerose spielen Lipoproteine eine bedeutende Rolle, was sich in der positiven Korrelation der LDL sowie der negativen Korrelation der HDL zur koronaren Herzkrankheit zeigt (Castelli et al. 1986; Stamler et al. 1986). Lipoproteine sind überwiegend sphärische, makromolekulare Transportpartikel und bestehen aus einer Hülle von verschiedenen Apolipoproteinen (Apo) und polaren Lipiden, welche wasserunlösliche Lipide umgeben. Lipoproteine besitzen einen hydrophoben, hauptsächlich aus Triglyceriden (TG) und Cholesterinestern (CE) bestehenden Kern, sowie einen diesen Kern umgebenden Lipidmonolayer aus überwiegend Phospholipiden und unverestertem Cholesterin. Die in diesem Lipidmonolayer verankerten amphiphilen Apolipoproteine weisen mit Ausnahme des ApoB eine hohe Wasserlöslichkeit auf und können unter den einzelnen Lipoproteinen ausgetauscht werden.

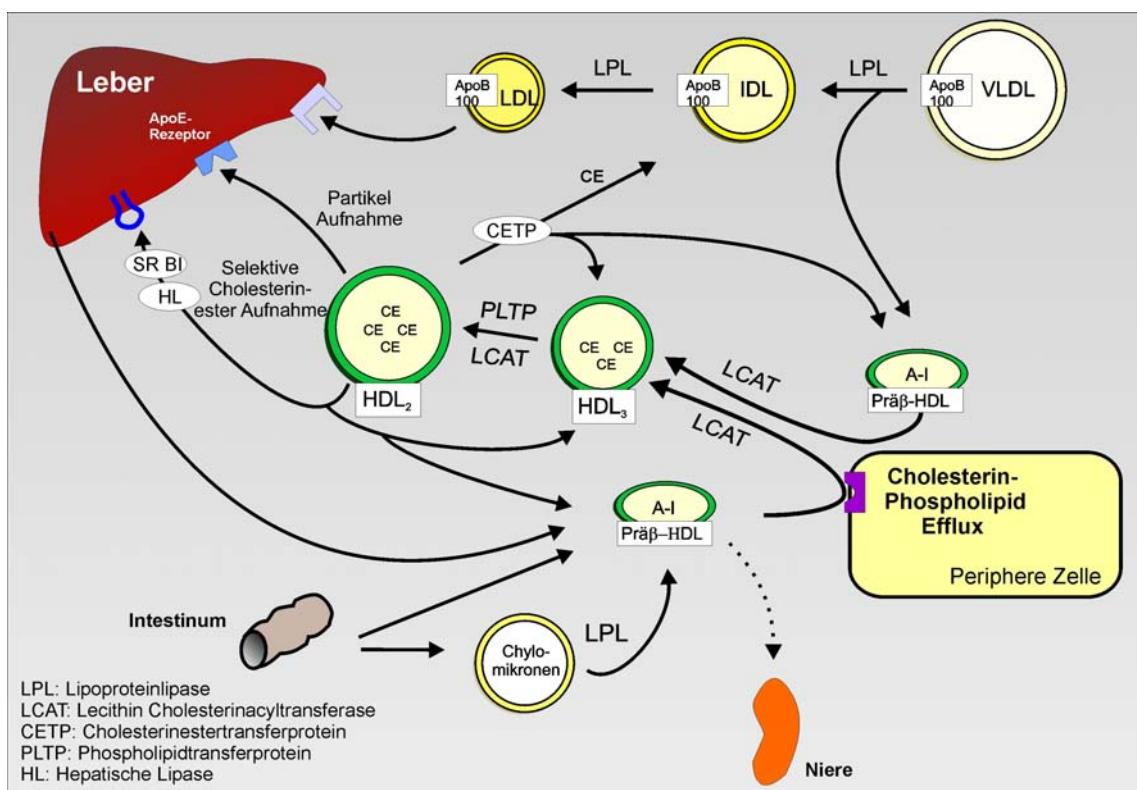


Abb. 1: Stoffwechsel der Lipoproteine.

Die Einteilung der Lipoproteine erfolgt aufgrund ihrer Dichte in Chylomikronen, Very Low Density Lipoproteine (VLDL), Low Density Lipoproteine (LDL), Intermediate Density Lipoproteine (IDL) und High Density Lipoproteine (HDL). Die Hauptklassen können wiederum in Unterklassen aufgeteilt werden, wobei v. a. die Unterteilung von HDL in HDL₂ und HDL₃ gebräuchlich ist.

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL ₂	HDL ₃
Dichte [g/ml]	< 0.93	0.93- 1.006	1.006- 1.019	1.019- 1.063	1.063- 1.125	1.125- 1.210
Durchmesser [nm]	75-1200	30-80	25-35	18-25	9-12	5-9
MG [10⁶ Da]	50-1000	10-80	5-10	2.3	0.36	0.175
Elektrophoretische Mobilität	keine	prä-β	prä-β	β	α	α
Haupt-Apolipoproteine	A, B-48, C, E	B-100, C, E	B-100, C, E	B-100	A, C	A, C
Cholesterin [%]	2	7	9	8	5	4
PL [%]	7	18	19	22	33	25
TG [%]	86	55	23	6	5	3
CE [%]	3	12	29	42	17	13
Apolipoproteine [%]	2	8	19	22	40	55

Tab. 1: Physikalische Eigenschaften und Zusammensetzung in Gewichtsprozenten der humanen Lipoprotein-Klassen nach Havel und Kane (HAVEL et al. 1955).

Chylomikronen, VLDL und IDL zählen zu den triglyceridreichen, LDL und HDL hingegen zu den triglyceridarmen Lipoproteinen. Neben der Auftrennung mittels Ultrazentrifugation können Lipoproteine auch aufgrund ihrer

elektrophoretischen Mobilität in Lipoproteine mit α - und β -Mobilität unterteilt werden.

1.1.1 Resorption von Nahrungslipiden

Die Resorption von Nahrungslipiden durch die Enterozyten der Jejunum-Mukosa erfolgt in Form von mizellar an Gallensalze gebundenem Cholesterin und freien Fettsäuren. Dabei werden täglich bis zu 0,8 g Cholesterin exogen aufgenommen, während hingegen bis zu 1,2 g durch endogene Biosynthese entstehen (Stark 2003). Nach Veresterung zu Cholesterinestern durch Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) bzw. zu Triglyceriden werden diese mit anderen Lipiden, ApoB-48, A-I, A-II und A-IV im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zu Chylomikronen zusammengefügt und über den Golgi-Apparat in die Lymphbahn abgegeben (Ros 2000). Über den Ductus thoracicus gelangen sie in den Blutkreislauf, wo sie von zirkulierenden HDL ApoC-II aufnehmen können. Durch ApoC-II wird die endothelgebundene Lipoproteinlipase (LaRosa et al. 1970) aktiviert und nachfolgend Triglyceride wieder zu freien Fettsäuren hydrolysiert. Mit dem Verlust an Triglyceriden verringert sich auch die Affinität der Chylomikronen zu ApoC-II, welches somit im Austausch gegen ApoE auf HDL übertragen werden kann. Hierbei entstehen durch die Abspaltung von Phospholipiden sowie von ApoA-I und ApoA-IV die sogenannten „Chylomikronen-Remnents“. Diese cholesterinreichen Remnents können über ApoE erkennende Rezeptoren, wie den LDL-Rezeptor und das LDL-Rezeptor Related Protein (LRP) in Hepatozyten aufgenommen werden. Ferner ist auch eine Endozytose der Chylomikronen-Remnents über „non-clathrin coated pits“ in Makrophagen (Elsegood et al. 2001) beschrieben.

1.1.2 LDL und andere ApoB-haltige Lipoproteine

LDL stellt mit ca. 80 % den Hauptanteil an frei zirkulierendem Cholesterin dar. Neben der intestinalen Synthese ist auch die Leber im Stande, ApoB-haltige Lipoproteine zu sezernieren. So werden am Endoplasmatischen Retikulum (ER) von Hepatozyten VLDL (mit ApoB-100, E und C) synthetisiert, über den Golgi-Apparat in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran (PM) transportiert und

nachfolgend ins Blut abgegeben. Die TG der VLDL können durch Einwirken der Lipoproteinlipase in freie Fettsäuren gespalten und als solche in Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden. Große VLDL-Remnants mit einem hohen Anteil an ApoE werden durch Aufnahme über den LDL-Rezeptor der Leber oder über den VLDL-Rezeptor extrahepatischer Zellen relativ schnell aus der Zirkulation entfernt (Yamamoto et al. 1995). Die länger in der Zirkulation verweilenden kleineren VLDL-Remnants hingegen werden unter weiterem Verlust an Triglyceriden und ApoE durch fortlaufende Hydrolyse zuerst zu IDL und schließlich zu LDL metabolisiert. Letztere besitzen beinahe ausschließlich ApoB-100 als Apolipoprotein und werden durch dessen Bindung an den LDL-Rezeptor endozytiert. Der LDL-Rezeptor wird in einem Recycling-Prozess wieder auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei die Hydrolyse der Cholesterinester durch die lysosomale Saure-Cholesterinester-Hydrolase (ACEH) (Owen et al. 2002). Dabei ist jedoch die zelluläre Lipidaufnahme über LDL-Rezeptoren ebenso wie die Cholesterinbiosynthese über HMG-CoA-Reduktase durch einen negativen Feedback-Mechanismus streng geregelt (Goldstein et al. 1985). Diese Regulation erfolgt durch die Expression von „Cholesterin-Sensoren“, den Sterol Response Element Binding Proteinen (SREBP's). Ist intrazellulär zu viel Cholesterin vorhanden, wird die Expression des LDL-Rezeptors sowie der HMG-CoA-Reduktase vermindert, wodurch es letztendlich zum Absinken der erhöhten Cholesterinspiegel kommt. Durch Oxidation (Ox-LDL) oder enzymatische Degradierung (E-LDL) modifizierte LDL umgehen den Schutzmechanismus der Zellen, da sie über Scavengerrezeptoren, v. a. der CD36-Familie (mit SR-A und SR-BI) und LOX-1 (lectin-like oxidised LDL-receptor-1) (Sawamura et al. 1997) ohne negative Feedback-Regulation aufgenommen werden – es kommt zur ungehinderten Akkumulation von Cholesterin. Da zu viel freies Cholesterin (FC) cytotoxisch ist (Feng et al. 2003), wird es am rauen ER mittels ACAT in Ester überführt. Die hierbei entstehenden Cholesterinester werden zusammen mit Triglyceriden in Form von cytoplasmatischen Lipidtröpfchen („lipid droplets“) gespeichert, die Schaumzellen ihr charakteristisches Aussehen verleihen. Dieser Influx atherogener Lipoproteine führt in Makrophagen zur ungehinderten

Akkumulation von Lipiden und damit zur Entstehung von Schaumzellen (Steinberg et al. 1989).

1.1.3 HDL und ApoA-I

Mit einem Anteil von bis zu fünf Molekülen ApoA-I pro reifem α -HDL-Partikel ist ApoA-I das Hauptapolipoprotein der HDL und spielt auch in deren Genese eine zentrale Rolle. So akquirieren von der Leber und von intestinaler Mukosa sezernierte ApoA-I von hepatischen und peripheren Zellen Cholesterin und Phospholipide (Asztalos et al. 1997; Forte et al. 1993). Durch die sukzessive Aufnahme von Lipiden entgehen diese HDL-Vorläufer einer unmittelbaren renalen Exkretion. Zu welchem Anteil dabei deren Reifung zu HDL-Partikeln durch extrazelluläre oder intrazelluläre Lipidierung von ApoA-I stattfindet, ist Gegenstand der aktuellen Diskussion. Extern zugegebenes ApoA-I induziert an ABCA1 exprimierenden Zelltypen einen Efflux von Phospholipiden und Cholesterin, jedoch wurde auch eine Internalisierung von ApoA-I und HDL₃ mit nachfolgender Resekretion von lipidierten Apolipoproteinen beschrieben (Neufeld et al. 2004; Schmitz et al. 1985b; Takahashi et al. 1999). Somit kann man zumindest von einer partiellen intrazellulären Lipidierung ausgehen. Die bei der Lipidierung von ApoA-I entstehenden diskoidalen „nascent“- oder „prä- β “-HDL weisen eine prä- β -Mobilität auf und können in drei Subklassen unterteilt werden. So entwickeln sich lipidarme, 5-6 nm große prä- β_1 -HDL durch sukzessive Lipidaufnahme über prä- β_2 -HDL (12-15 nm) hin zu prä- β_3 -HDL (15-25 nm). Mit letzteren findet man neben Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) auch Cholesterinester-Transferprotein (CETP) assoziiert. Bei der Inkubation von Fibroblasten mit lipidfreiem ApoA-I konnte ferner auch eine Entstehung von α -migrierenden Partikeln beobachtet werden (Zhang et al. 1998). Diese prä- α -HDL unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Phospholipidkomposition sowohl von der Plasmamembran als auch von plasmatischem HDL (Sviridov et al. 2002). Für die weitere Reifung der kleineren α_3 -HDL zu großen, lipidreichen sphärischen α_1 -HDL ist LCAT involviert, die zur Veresterung des freien Cholesterins und dem nachfolgenden Einbau der CE zusammen mit Triglyceriden in den hydrophoben Kern der Lipoproteine führt

(Sviridov et al. 2002). Durch weitere Cholesterinaufnahme sowie das Einwirken von Phospholipid-Transferprotein (PLTP), welches die Fusion mit anderen HDL₃-Partikeln oder die Aufnahme von Oberflächenremnents aus triglyceridreichen Lipoproteinen bewirkt, entwickeln sich aus den HDL₃ größere HDL₂ (Jiang et al. 1996; Lusa et al. 1996).

Zur Entfernung von Lipid- bzw. Proteinkomponenten der HDL aus der Zirkulation finden sich in der Literatur verschiedene Wege. So können HDL über deren Bindung an ApoE-Rezeptoren als Holopartikel bzw. an noch nicht bekannte HDL-Rezeptoren hepatisch internalisiert werden (Curtiss et al. 2000). Ebenso besteht ein SR-BI vermittelter Mechanismus, bei dem selektiv Cholesterinester aus den HDL-Partikeln in die Leber aufgenommen werden (Krieger 1999). Ferner wurde auch eine Bindung von HDL assoziiertem ApoA-I an die β -Kette der ATP-Synthase gezeigt (Martinez et al. 2003b). Diese Stoffwechselwege führen zur Regenerierung von HDL₃ und seinen lipidärmeren Vorläufern, welche wiederum im reversen Cholesterintransport als Akzeptoren für zelluläres Cholesterin fungieren können.

1.2 ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)

Der ATP-binding cassette transporter A1 stellt ein 2261 Aminosäuren (AS) umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 240 kDa dar. Der murine ABCA1 wurde 1994 von einer Gruppe um Chimini (Luciani et al. 1994) kloniert, während die Klonierung des humanen Gens 1999 von Langmann et al. (Langmann et al. 1999) publiziert wurde; humanes ABCA1 besteht typischer Weise aus zwei transmembranären Domänen (TMD) mit sechs Helices zur Substrat-Translokation sowie zwei intrazellulären ATP-bindenden Domänen (ABC) mit zwei Prolin, Glutamin, Serin und Threonin (PEST)-Sequenzen. 1999 wurde ABCA1 als ursächlich defektes Gen der Tangier-Krankheit (TD) am Institut für Klinische Chemie in Regensburg gleichzeitig mit zwei weiteren Gruppen entdeckt (Bodzioch et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999; Rust et al. 1999). Die Tangier-Krankheit wurde ursprünglich 1960 von Fredrickson an zwei Geschwistern von der Insel Tangier in Chesapeake Bay (Virginia, USA) beschrieben (Freeman 1999) und ist durch das beinahe vollständige Fehlen von plasmatischem ApoA-I und HDL charakterisiert. Im Körper von Patienten mit Tangier-Krankheit finden sich Schaumzellen, die keinen durch ApoA-I induzierbaren spezifischen Lipidefflux zeigen. Klinische Symptome der Tangier-Krankheit äußern sich in vergrößerten, orange gefärbten Mandeln mit peripheren Neuropathien und Hepatosplenomegalie sowie z. T. mit der Entwicklung von koronaren Herzkrankheiten (Francis et al. 1995). Durch die Fehlfunktion in der ABCA1 vermittelten Lipidierung von ApoA-I, dem ersten Schritt im RCT, ist die Tangier Erkrankung auch als Modell für die Atherogenese interessant.

Die Bedeutung des RCT spiegelt sich ferner in ABCA1-defizienten Mäusen wider, welche durch ein beinahe vollständiges Fehlen von plasmatischem HDL sowie durch einen gestörten intrazellulären Lipidtransport und einen damit verbundenen reduzierten Lipidefflux charakterisiert sind (Orso et al. 2000). Obwohl auch in ABCA1-defizienten Mäusen bereits eine Schaumzellbildung zu beobachten ist, kommt es erst nach Transplantation von ABCA1-defizientem Knochenmark in ApoE-defiziente oder LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse zu

ausgeprägten atherosklerotischen Veränderungen (Aiello et al. 2002; Aiello et al. 2003).

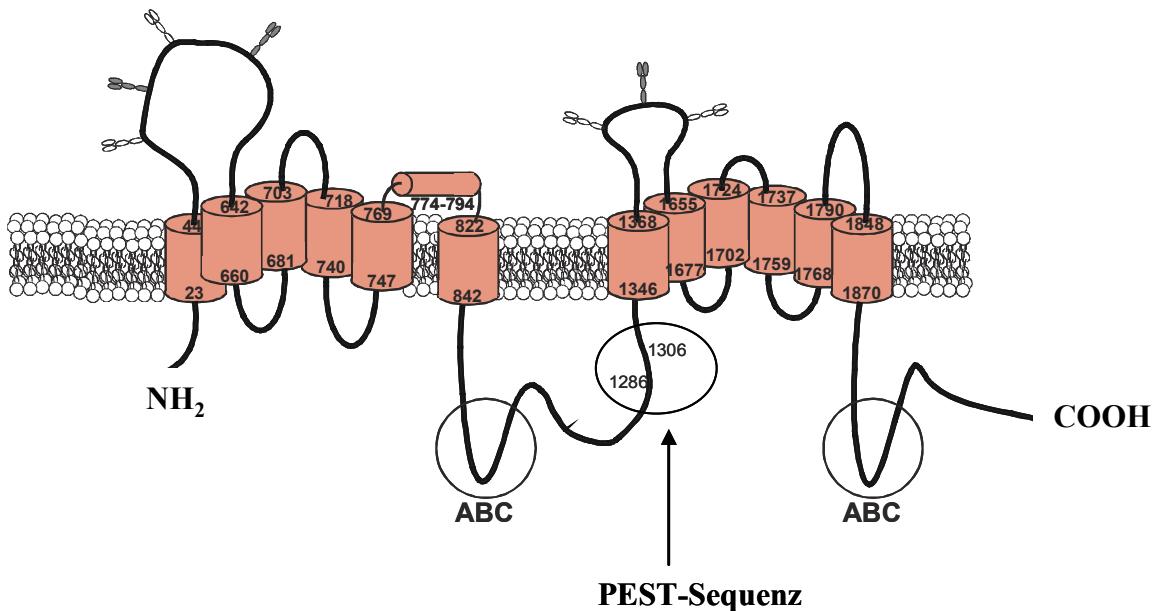


Abb. 2: ABCA1. Angegeben sind die ATP-Bindungskassetten (ABC), die PEST-Sequenz und die transmembranären Domänen; die Zahlen bedeuten die Positionen der jeweiligen Aminosäuren im Protein.

Eine Überexpression von ABCA1 in Makrophagen und Hepatozyten dagegen führt sowohl zu einem Anstieg von lipidarmen prä-β-HDL als auch von reifen HDL-Partikeln (Singaraja et al. 2002; Vaisman et al. 2001).

1.2.1 Transskriptionelle Regulation

Die Regulation des ABCA1 auf transskriptioneller Ebene umfasst ein ganzes Netzwerk von Faktoren (Schmitz et al. 2005). So sind vor allem Sterole und Fettsäuren als physiologische Modulatoren des LXR/RXR- und des SREBP-Signaltransduktionsweges bekannt. Aber auch das Zinkfingerprotein 202 (ZNF202) stellt einen natürlichen Repressor der ABCA1 und ABCG1 Genexpression dar (Langmann et al. 2003). Ebenso konnte in glatten Muskelzellen für SREBP-2 eine regulierende Wirkung über Bindung an den Promotor des ABCA1 gezeigt werden (Zeng et al. 2004); dabei führte eine

cholesterinfreie Inkubation der Zellen über eine Aktivierung von SREBP-2 zu einem Absinken der mRNA des ABCA1 und einem gleichzeitigen Ansteigen der mRNA des LDL-Rezeptors. Daneben konnte auch für exogene Liganden wie Retinoide (Langmann et al. 2005), cAMP und PPAR-Liganden, sowie für Östrogene (Srivastava 2002) und bestimmte Pharmaka wie Verapamil (Suzuki et al. 2004) und Niacin (Rubic et al. 2004) ein stimulierender Effekt auf die Genexpression des ABCA1 gezeigt werden. Für Statine sind dagegen ebenso wie für Zytokine sehr unterschiedliche Angaben zu finden: Während für Pitavastatin (Zanotti et al. 2004), TGF- β (Panousis et al. 2001) sowie für IL-10 (Rubic et al. 2004) und IL-1 β (Kronqvist et al. 1999) stimulierende Eigenschaften beschrieben sind, kommt es unter dem Einfluss von Fluvastatin, Atorvastatin, Simvastatin und Lovastatin (Sone et al. 2004) sowie von INF γ (Wang et al. 2002a) und TNF α (Khovidhunkit et al. 2003) zu einer Downregulation der ABCA1-mRNA.

1.2.2 Zelluläre Lokalisation und Regulation auf Proteinebene

Neben der intrazellulären Lokalisation im Cytosol und in Endosomen, findet man ABCA1 in Lubrol-WX resistenten Mikrodomänen der Plasmamembran (Drobnik et al. 2002). Ferner konnte von Denis (Denis et al. 2004) ein überwiegendes Vorliegen des ABCA1 als Tetramer/Oligomer in der Plasmamembran von humanen Fibroblasten gezeigt werden. Mit einer Halbwertszeit von gut einer Stunde in murinen Makrophagen unterliegt ABCA1 dabei einem relativ raschen Turnover (Wang et al. 2002b). Zur proteolytischen Degradation des ABCA1 trägt maßgeblich die Thiolprotease Calpain bei. Calpain bindet an eine PEST-Sequenz des ABCA1 (Wang et al. 2003) und spaltet diese. Dieser Effekt kann durch Proteinkinase A (PKA) verstärkt sowie durch ApoA-I inhibiert werden (Martinez et al. 2003a; Wang et al. 2003). Die ABCA1 stabilisierende Wirkung von ApoA-I konnte auch von einer anderen Gruppe gezeigt werden, wenngleich deren Ergebnisse mit WI-38-Zellen (humanen Fibroblasten-Zelllinie) diesbezüglich eine Involvierung der Proteinkinase C (PKC) nahelegten (Martinez et al. 2003a; Yamauchi et al. 2003). Im Gegensatz dazu wurde aber auch eine über PKA vermittelte Phosphorylierung des ABCA1 gezeigt, wobei

die hierbei verwendeten murinen Makrophagen mit Mutationen in der Nukleotid-Bindungsstelle des ABCA1 einen stark verminderten spezifischen Phospholipidefflux zeigten (See et al. 2002). Ferner wiesen PEST-Deletionsmutanten des ABCA1 neben einer verringerten Internalisierung auch Defekte im Cholesterinefflux auf (Chen et al. 2005). Somit lässt die Vielzahl an regulierenden Faktoren auf eine wichtige Rolle von ABCA1 bei der zellulären Cholesterinhomöostase schließen.

1.2.3 Zelluläre Funktion und Interaktion mit Proteinen

Eine zentrale Funktion des ABCA1 besteht in der Vermittlung des Lipideffluxes und damit verbundenen intrazellulären Transportvorgängen. Daneben ermöglicht ABCA1 aber auch die Sekretion von lipophilen Vitaminen (Chen et al. 2005; Oram et al. 2001; Orso et al. 2000), ApoE (Chen et al. 2005; Von Eckardstein et al. 2001) und IL-1 β (Chen et al. 2005; Hamon et al. 2002).

In Analogie zu anderen Mitgliedern der ABC-Familie wie dem CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, = ABCC7) und dem SUR1 (Sulfonylharstoff-Rezeptor, = ABCC8) wurden auch für ABCA1 diesen beiden Proteinen ähnliche Interaktionen und Funktionen vorgeschlagen (Schmitz et al. 2002). Im Gegensatz zum MDR1 (multidrug resistance-Permeabilitäts Glykoprotein 1), einem weiteren Mitglied der ABC-Transporter-Familie, zeigt ABCA1 jedoch keine ATPase-Aktivität und fungiert daher eher als Regulatorprotein im Substrattransport (Szakacs et al. 2001). Für mehrere Proteine konnten bereits Interaktionen mit ABCA1 gezeigt werden; so binden β 2- und α 1-Syntrophin sowie auch Lin7 über eine PDZ-Domäne an den C-Terminus von ABCA1 (Munehira et al. 2004; Schmitz et al. 2002).

Ebenso wurde eine direkte Interaktion des ABCA1 mit der Rho-GTPase cdc42 gezeigt, welche die Filopodienformation und Migration von Makrophagen (Diederich et al. 2001) sowie den intrazellulären Lipidtransport (Tsukamoto et al. 2001) kontrolliert. Mit Syntaxin 13 konnte ein weiteres ABCA1-interagierendes Protein identifiziert werden, das am vesikulären Transport von ABCA1 zur Plasmamembran im SNARE-Komplex beteiligt ist (Bared et al. 2004).

Für Phospholipase C (PLC) und PKC existieren bereits seit längerem Untersuchungen zum Lipidefflux, welche jedoch konträre Ergebnisse darlegen. So konnte für HDL₃ eine Aktivierung der PLC sowie der Phospholipase D (PLD) (Mollers et al. 1995; Walter et al. 1996) gezeigt werden, was zu einem Anstieg des PKC aktivierenden Diacylglycerin (DAG) führte; in Untersuchungen mit PKC-Inhibitoren wurde einerseits eine Reduktion des Effluxes (Li et al. 1995; Li et al. 1997; Mendez et al. 1991) beobachtet, andererseits wurde dadurch kein Effekt (Oram et al. 1996; Trümbach 1997) auf den Lipidefflux nachgewiesen.

1.3 Lipidefflux

Der Efflux von Phospholipiden und Cholesterin aus peripheren Zellen stellt den ersten Schritt im RCT dar und ist damit in der Atherogenese von zentraler Bedeutung. Wie schon eingangs unter 1.1 und 1.2 beschrieben, besteht die primäre Funktion des ABCA1 in der Vermittlung des spezifischen Lipideffluxes zu extrazellulärem ApoA-I.

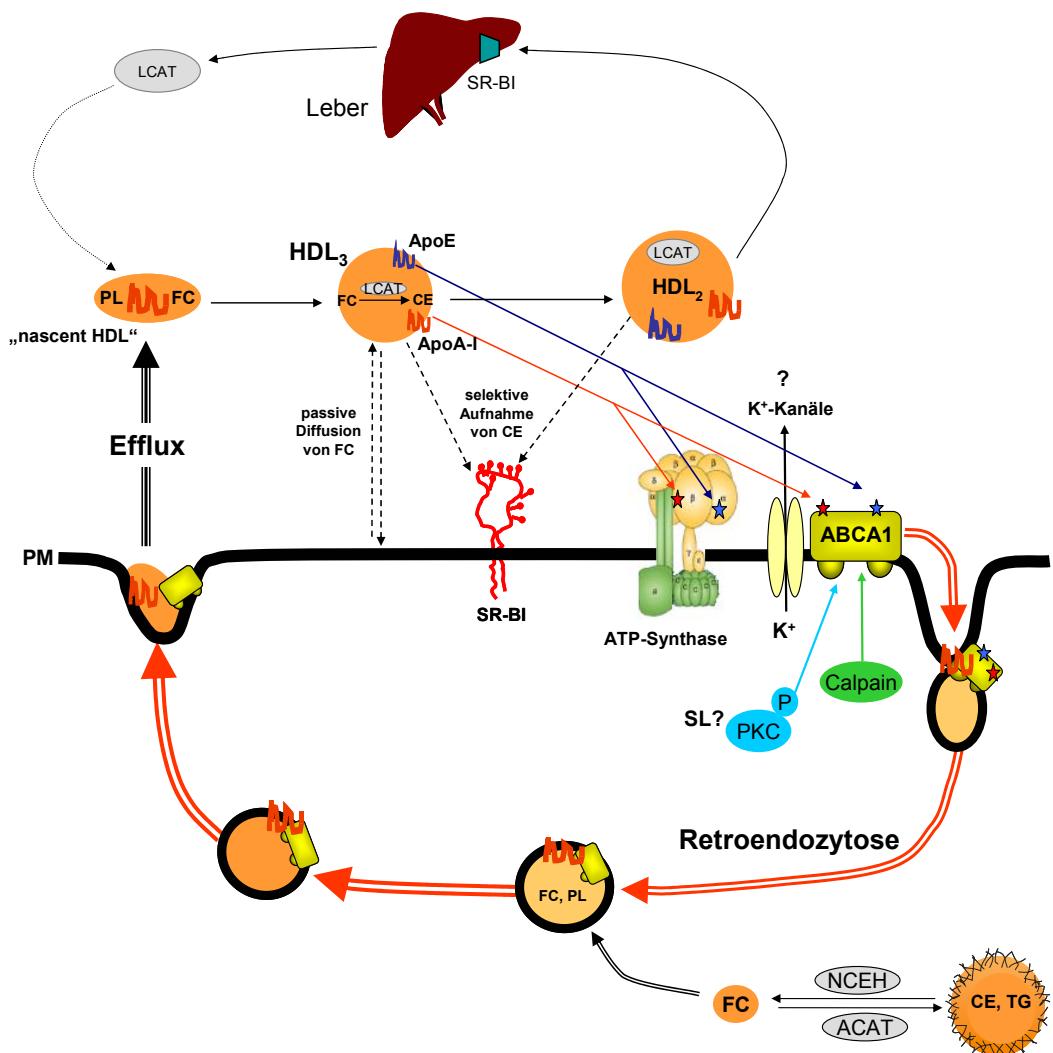


Abb. 3: Retroendozytose-Modell des Lipideffluxes. NCEH: Neutrale Cholesterinester-Hydrolase, PM: Plasmamembran, SL: Sphingolipide.

Man geht von einer Internalisierung von ApoA-I zusammen mit ABCA1 in das endozytotische Kompartiment aus; ein Teil der Apolipoproteine wird dabei bereits in frühen Endosomen über ABCA1 lipidiert, während der andere Teil in späten Endosomen oder Lysosomen mit Cholesterin und Phospholipiden beladen werden kann. Nach erfolgter Lipidierung werden die ApoA-I-Partikel zur Zelloberfläche zurücktransportiert und als „nascent HDL“ freigesetzt. Dieser Prozess wird als Retroendozytose bezeichnet und ist bei Patienten mit Tangier-Erkrankung gestört (Schmitz et al. 1985a), wodurch die dabei zu beobachtenden niedrigen HDL-Konzentrationen zu erklären sind.

Neben diesem spezifischen, durch ApoA-I induzierten Efflux existiert mit der passiven Diffusion von Cholesterin und Phospholipiden aber auch ein von ABCA1 unabhängiger Mechanismus (basaler Efflux). In humanen Makrophagen trägt die Sekretion von ApoE zu diesem basalen Efflux mit bei; jedoch korreliert der basale Efflux nur partiell mit der als weiterem Lipidakzeptor sekretierten Menge an ApoE (Cignarella et al. 2005). Auch für ABCG1 und ABCG4 konnte eine Beteiligung am HDL-induzierten Lipideffluxes gezeigt werden; dieser geht mit einer Erhöhung der Umverteilung von intrazellulärem Cholesterin zur Plasmamembran einher und führt zu einem nachfolgenden unspezifischen Austausch mit HDL-Cholesterin (Wang et al. 2004).

Ebenso konnte für SR-BI eine HDL-Rezeptorwirkung sowie ein Efflux zu phospholipidhaltigen Akzeptoren gezeigt werden (Acton et al. 1996; Ji et al. 1997); der SR-BI spezifische Efflux basiert jedoch auf einem bidirektionalem Austausch von Lipiden, so dass es im Falle einer Interaktion von peripheren Zellen mit HDL zu einer Beladung peripherer Zellen mit Cholesterin kommt (Yancey et al. 2000). Dies zeigt sich auch in Untersuchungen der Gruppe um Tall, die durch Transfektion von SR-BI in ABCA1 exprimierende Zellen eine Reduktion des spezifischen Effluxes beobachtete (Chen et al. 2000).

Makrophagen besitzen darüber hinaus die Möglichkeit, durch mitochondriale Oxidation aus Cholesterin 27-Hydroxycholesterin und 24(S),25-Epoxycholesterin (Brown et al. 2000) zu bilden und diese nachfolgend

unabhängig von extrazellulären Lipidakzeptoren zu sezernieren (Bjorkhem et al. 1999).

1.3.1 Aqueous Diffusion

Die „Aqueous Diffusion“-Theorie geht auf Georg Rothblat zurück und basiert auf einer Desorption von freiem Cholesterin aus der Plasmamembran mit anschließender Diffusion durch eine angrenzende Wasserschicht zu extrazellulären Akzeptoren (Johnson et al. 1991). Die Richtung der Diffusion erfolgt entlang des Konzentrationsgradienten und ist grundsätzlich in beide Richtungen möglich. Hierbei stellt an HDL gebundene LCAT die treibende Kraft für einen Cholesterinefflux dar, indem LCAT durch Veresterung von freiem Cholesterin den Konzentrationsgradienten aufrechterhält.

Bei niedrigen Lipidkonzentrationen im Akzeptor stellt die wässrige Umgebung eine starke Diffusionsbarriere dar, wobei die Transferrate fast ausschließlich von der Anzahl an Zusammenstößen von Cholesterin und Akzeptor abhängt. Bei höheren Konzentrationen dagegen wird die Desorption von der Zelloberfläche der limitierende Schritt, so dass eine höhere Aktivierungsenergie benötigt wird; dies zeigt sich auch in der temperaturabhängigen Regulation des basalen Effluxes (Johnson et al. 1991). Die Desorptionsrate wird weiterhin durch die Packungsdichte der Lipide an der Zelloberfläche beeinflusst; so begünstigen mehrfach ungesättigte Phospholipide sowie ein hohes PC/SPM-Verhältniss den Cholesterinefflux (Lund-Katz et al. 1988). Aber auch die Struktur des Akzeptors trägt maßgeblich zur Diffusionsrate bei; so konnte bei gleichen Konzentrationen an Phospholipiden im Akzeptormolekül ein vierfach schnellerer Efflux zu diskoidalen Komplexen mit ApoA-I gezeigt werden als zu SUV's (small unilamellar vesicles) (Phillips et al. 1998).

1.3.2 ABCA1 spezifische Lipidierung von ApoA-I

ApoA-I induziert durch seine Interaktion mit ABCA1 exprimierenden Zellen einen sättigbaren Efflux von Cholesterin und Phospholipiden, der zu einer effizienten Reduzierung der Cholesterinesterspeicher führt. Der induzierte Lipidefflux kann 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). Man geht dabei heute von einer initialen Bindung von ApoA-I über seine amphiphatischen Helices an ABCA1 aus (Fitzgerald et al. 2004). Dieser sättigbare, hochaffine ($K_d = 7 \text{ nM}$) Komplex zeigte eine Halbwertszeit von ca. 25 Minuten und seine Dissoziation führt zur Freisetzung von cholesterinbeladenem ApoA-I. Bei der Bindung von ApoA-I an ABCA1 scheint ein „linearer Pfeil“ aus zwei α -Helices mit sauren Aminosäuredomänen im ApoA-I-Molekül von besonderer struktureller Bedeutung zu sein (Forte et al. 1993; Natarajan et al. 2004). Da jedoch auch oral verfügbare ApoA-I-mimetische Peptide aus D-Aminosäuren wie „D-4F“ (Navab et al. 2005b) an ABCA1 binden und Lipidefflux induzieren, kann es sich dabei aber nicht um eine Rezeptor-Ligand-Bindung im klassischen Sinne handeln. Diese synthetischen Apolipoproteine weisen mit einer zunehmenden Anzahl an Phenylalanin (F) eine verstärkte Bindung an ABCA1 sowie eine damit einhergehende Induktion des Lipideffluxes auf (Datta et al. 2004). Wie schon von Schmitz (Schmitz et al. 1985b) vorgeschlagen, wird ApoA-I nach erfolgter Bindung an die Zelloberfläche zusammen mit ABCA1 in frühe Endosomen internalisiert (Neufeld et al. 2004). ABCA1 kann dabei sowohl in frühen Endosomen als auch in der Plasmamembran die Beladung von ApoA-I mit Cholesterin und Phospholipiden ermöglichen; die lipidierten ApoA-I werden vesikulär an die Plasmamembran zurücktransportiert und als „nascent HDL“ sezerniert. Diese Ergebnisse lassen den vorgeschlagenen „2-step“-Mechanismus, in welchem der Efflux von Phospholipiden dem von Cholesterin vorausgeht und erst in einem sekundären Schritt der ausgebildete phosholipidreiche Komplex den Cholesterinefflux induziert (Fielding et al. 2000), unwahrscheinlich erscheinen. So findet sich in der Literatur auch eine Publikation einer Gruppe um Oda, welche diesen „2-step“-Mechanismus widerlegt (Smith et al. 2004).

2 Zielsetzung

Am Institut wurde 1999 der der Tangier-Krankheit zugrunde liegende Defekt im ABCA1-Gen und dem damit verbundenen Fehlen eines Lipideffluxes zu ApoA-I veröffentlicht (Bodzioch et al. 1999).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte das dabei bereits etablierte, radioaktive Effluxsystem mit Fibroblasten auf Monozyten/Makrophagen übertragen werden. Als Ausgangsmaterial dienten von freiwilligen Spendern mittels Leukapherese gewonnene Monozyten, welche zu Makrophagen differenziert und mit enzymatisch modifiziertem LDL beladen wurden.

Zu einer näheren Charakterisierung des Lipideffluxes sollten die beiden Zellsysteme mit einer massenspektrometrisch basierten Quantifizierung verschiedener Lipidgehalte in Zellen und Effluxmedien eingehend untersucht und verglichen werden. Dabei sollte neben den Unterschieden einzelner Lipidspezies hinsichtlich ihres prozentualen Anteils in Zellen und Medien auch die Frage geklärt werden, ob durch ABCA1 bestimmte Lipide/Lipidspezies spezifisch nach außen transportiert werden.

Anschließend sollte sowohl mit Fibroblasten als auch mit Monozyten/Makrophagen der Einfluss von Sphingolipiden sowie von K⁺-Kanal-Inhibitoren und Modulatoren purinreger Rezeptoren auf den spezifischen Lipidefflux und die Lipidhomöostase untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Lipidefflux-Systems mit primären, humanen Monozyten/Makrophagen

Am Institut existierten bereits Vorarbeiten, das an humanen Fibroblasten etablierte Efflux-Modell mit ^{14}C -Cholesterin und ^3H -Cholin auf Monozyten zu übertragen. Dazu wurden 150.000 Monozyten in 6-Lochplatten mit 50 ng/ml M-CSF zu Makrophagen differenziert und nachfolgend mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{14}C -Cholesterin und ^3H -Cholin gelabeltem E-LDL beladen. Da dies in der Entladung mit ApoA-I immer wieder zu stark schwankenden und damit unbefriedigenden Ergebnissen im spezifischen Lipidefflux führte, sollten bestimmte Einflussfaktoren untersucht und somit das System optimiert werden.

3.1.1 Abhängigkeit des Effluxes von Zellzahl und Beladung

Durch mehrere Waschschritte im Verlauf der Experimente kam es immer wieder zu unterschiedlich hohen Verlusten an Zellen. Daher wurde zuerst versucht, dies durch eine größere Anzahl an ausgesäten Monozyten bzw. mit einer steigenden Konzentration an E-LDL im Beladungsmedium zu kompensieren.

Es zeigte sich, dass mit 150.000 sowie mit 250.000 ausgesäten Monozyten ein relativ niedriger Cholesterinefflux (FC) zu beobachten war (Abb. 4); für Phospholipide (PL) ergab sich bei 150.000 ausgesäten Monozyten mit beinahe 8 % ein sehr hoher spezifischer Efflux, der jedoch mit steigender Anzahl an Monozyten wieder abfiel. Im Bereich von 500.000 bis 1.000.000 an ausgesäten Monozyten ergab sich ein hinreichender spezifischer Lipidefflux von ca. 5 %, welcher jedoch eine größere Standardabweichung aufwies.

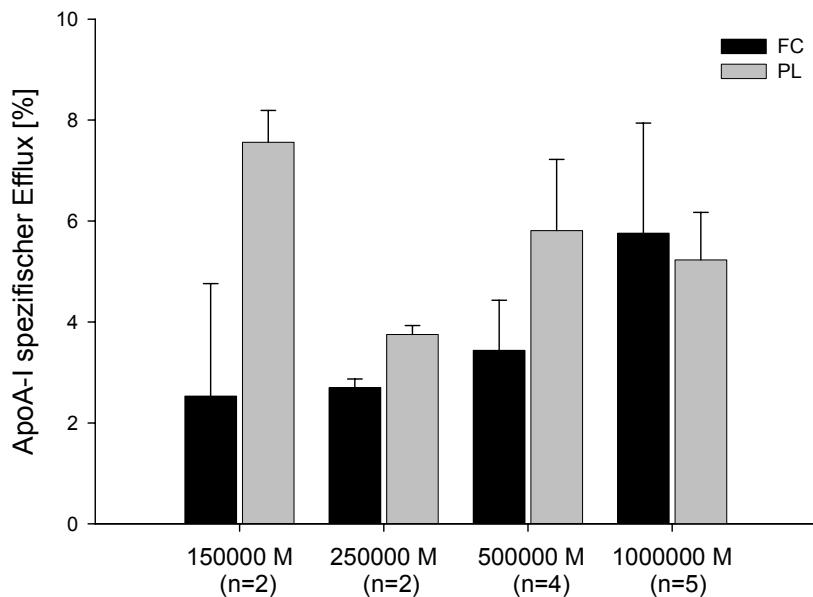


Abb. 4: Abhängigkeit des Cholesterin- und Phospholipid- Effluxes von der Anzahl ausgesäter Monozyten. Die Versuche wurden mit einer Beladung von 40 µg/ml E-LDL über 24 Stunden durchgeführt; M gibt die Anzahl ausgesäter Monozyten an. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) von n unabhängigen Experimenten.

Bei einer Aussaat von 1.000.000 Monozyten war immer wieder zu beobachten, dass sich ein Großteil der Monozyten nicht absetzen konnte. Somit wurden in den weiteren Experimenten 750.000 Monozyten ausgesät. Darauf aufbauend wurde versucht, den spezifischen Lipidefflux durch eine Beladung mit unterschiedlichen Konzentrationen an E-LDL weiter zu optimieren.

Aus Abbildung 5 ist ersichtlich, dass in diesen beiden Experimenten alle fünf verwendeten E-LDL-Konzentrationen zu einem relativ niedrigen spezifischen Efflux von Cholesterin führten (2 % - 3 %). Die Beladung im Bereich von 20 µg/ml bis 40 µg/ml E-LDL ergab gegenüber 5 µg/ml E-LDL v. a. für PL einem höheren spezifischen Efflux; aber auch für FC war in diesem Konzentrationsbereich ein höherer spezifischer Efflux zu beobachten. Daneben wies der spezifische Lipidefflux bei einer Beladung mit 40 µg/ml E-LDL die geringsten Standardabweichungen auf. Die Beladung der Zellen mit 60 µg/ml sowie mit 80 µg/ml E-LDL führte v. a. für FC zu einem Abfallen des spezifischen Lipideffluxes. Somit wurde im Folgenden die Beladung der

Monozyten/Makrophagen in den Efflux-Experimenten mit 40 µg/ml E-LDL vorgenommen, zumal damit auch eine Vergleichbarkeit mit anderen am Institut durchgeföhrten Experimenten gegeben war.

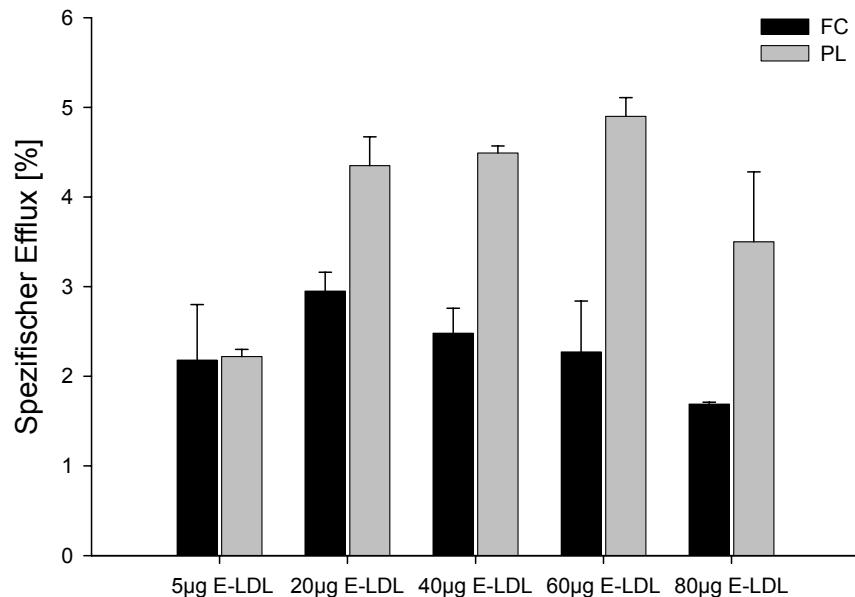


Abb. 5: Abhängigkeit des Cholesterin- und Phospholipideffluxes von der Beladung. Die Versuche wurden in zwei unabhängigen Experimenten an jeweils 750.000 ausgesäten Monozyten durchgeföhrten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) von zwei Experimenten.

Zusammenfassend führte die Beladung von 750.000 ausgesäten Monozyten mit 40 µg/ml E-LDL zu einem optimalen Ergebnis hinsichtlich des spezifischen Lipideffluxes. Dabei wurde ein spezifischer Lipidefflux von 3-4 % für Cholesterin und 4-5 % für Phospholipide erreicht, der jedoch auch eine gewisse Schwankungsbreite aufwies.

3.1.2 Einfluss des Entladungsmediums auf den spezifischen Efflux

In den Efflux-Experimenten an Fibroblasten enthielt das Entladungsmedium jeweils 0,2 % BSA. Da von Fibroblasten ein höherer Wert für den spezifischen Efflux erhalten wurde, wurde versucht, diese Inkubation mit BSA im

Entladungsmedium auch auf das Monozyten/Makrophagen-Modell zu übertragen.

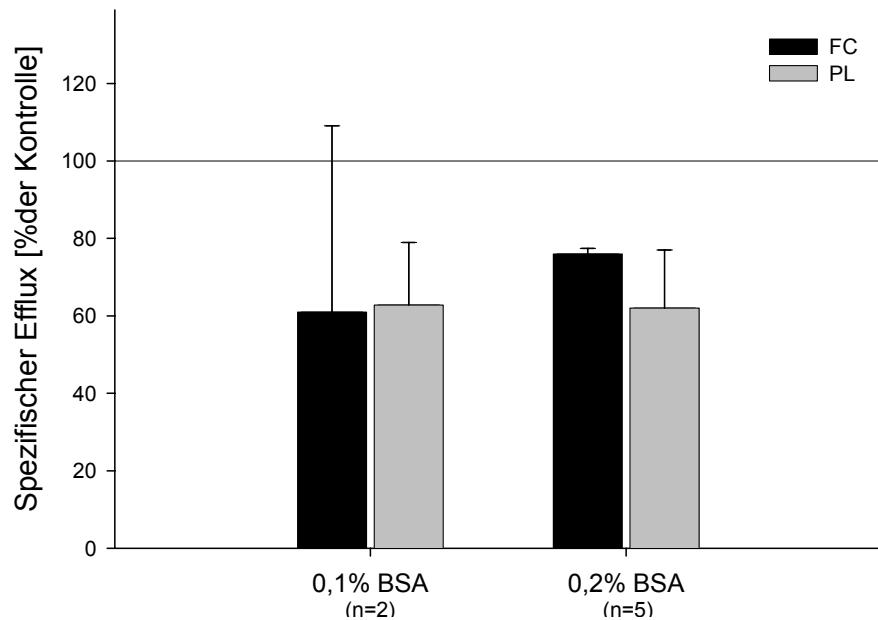


Abb. 6: Abhängigkeit des spezifischen Cholesterin- und Phospholipideffluxes von der dem Entladungsmedium zugesetzten BSA-Menge. Als Kontrolle (100 % spezifischer Efflux) dienten Werte aus Medien, denen kein BSA zugesetzt wurde. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der jeweiligen Anzahl (n) an unabhängigen Experimenten.

In den Experimenten zeigte sich durchgehend eine hemmende Wirkung von BSA auf den spezifischen Lipidefflux, welcher überwiegend auf einer Anhebung des basalen Effluxes beruhte. So führte bei Makrophagen schon der Zusatz von 0,1 % BSA zum Entladungsmedium zu einem Absinken des spezifischen Effluxes von Cholesterin und Phospholipiden auf 60 % der Kontrolle. Dies zeigte sich auch beim Zusatz von 0,2 % BSA, wobei hier nur noch ein Absinken des spezifischen Effluxes auf 78 % der Kontrolle zu beobachten war (Abb. 6).

3.1.3 Abhängigkeit des Lipideffluxes von Monozyten-Spendern

Im Gegensatz zur Inkubation von Fibroblasten wurden im Modell mit primären, humanen Monozyten in den Experimenten jeweils Zellen von unterschiedlichen Spendern verwendet, was eine zusätzliche Variable im Lipidefflux darstellte. Im

Folgenden wurden die an zwei aufeinander folgenden Tagen gewonnenen Monozyten unter Verwendung gleicher Materialchargen hinsichtlich des Effluxes von Cholesterin und Phospholipiden verglichen (Abb. 7).

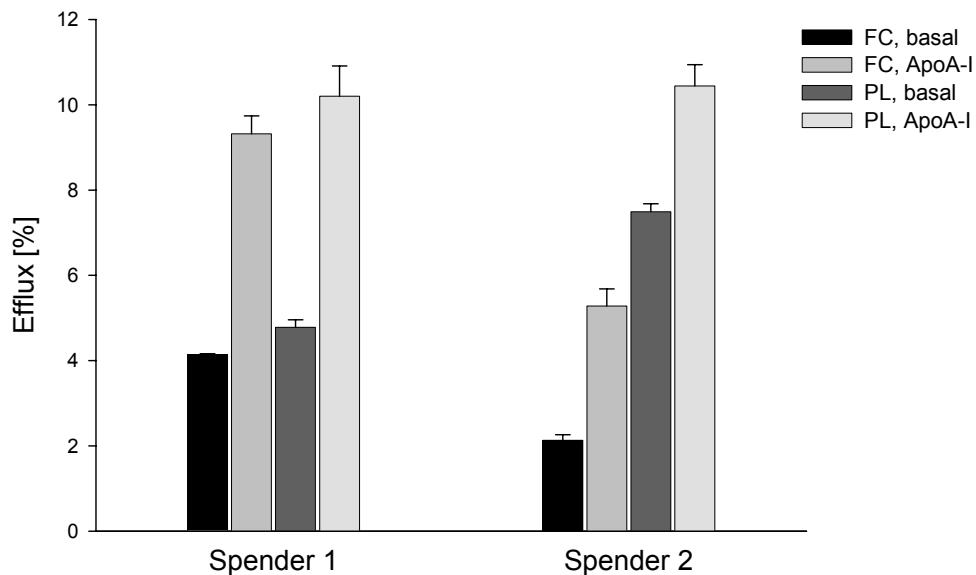


Abb. 7: Abhängigkeit des Cholesterin- und Phospholipideffluxes von verschiedenen Monozyten-Spendern. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

Bei der identischen Beladung der Monozyten/Makrophagen von zwei verschiedenen Spendern zeigten sich sowohl im basalen als auch im spezifischen Lipidefflux deutliche Unterschiede. So ergab sich für Spender 1 ein spezifischer Cholesterinefflux von 5,3 % (4,1 % basal) gegenüber 3,1 % (2 % basal) für Spender 2. Ebenso deutliche Differenzen waren im spezifischen Phospholipidefflux mit 5,3 % (4,7 % basal) für Spender 1 gegenüber nur 2,9 % (7,5 % basal) für Spender 2 zu beobachten.

3.1.4 Abhängigkeit des Lipideffluxes von Plasmaspendern

Mit der Expression von Scavengerrezeptoren haben Makrophagen die Möglichkeit, unkontrolliert modifiziertes LDL aufzunehmen. Im Gegensatz zu Fibroblasten werden Monozyten/Makrophagen mit modifiziertem LDL beladen. Die Inkubation von Makrophagen mit enzymatisch modifiziertem LDL führt zwar einerseits zu einer stärkeren Beladung mit Lipiden, andererseits verzichtet man

dadurch auf eine definierte Beladung mit Cholesterin, da LDL von verschiedenen Plasmaspendern verwendet wird. Dieser Einflussfaktor von Plasmaspendern auf den Lipidefflux zeigte sich in Experimenten an Monozyten eines Spenders (Abb. 8) durch Beladung der Zellen mit jeweils 40 µg/ml E-LDL von drei verschiedenen Plasmaspendern (E-LDL 1 bis E-LDL3).

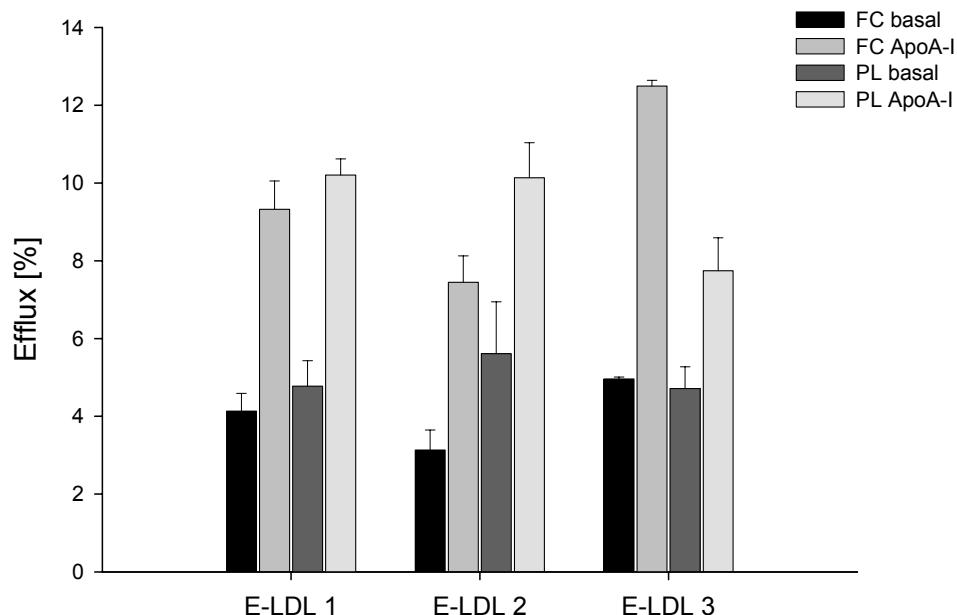


Abb. 8: Abhängigkeit des Cholesterin- und Phospholipideffluxes von verschiedenen Plasmaspendern. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

Eine Beladung von Monozyten mit E-LDL von verschiedenen Spendern innerhalb eines Versuchsansatzes zeigte in Abhängigkeit vom verwendeten E-LDL sowohl Schwankungen im basalen (3,13 % bis 4,96 % für Cholesterin und 4,72 % bis 5,62 % für Phospholipide) als auch im ApoA-I stimulierten Efflux (7,45 % bis 12,49 % für Cholesterin und 7,44 % bis 10,2 % für Phospholipide). Daraus ergaben sich für FC mit 4,3 % bis 7,5 % sowie für PL mit 2,7 % bis 5,5 % auch größere Unterschiede im spezifischen Lipidefflux.

3.2 Etablierung einer ESI-MS/MS-basierten Analytik des Lipideffluxes

Eine Analytik des Lipideffluxes mittels Massenspektrometrie liefert umfassende und zugleich detaillierte Informationen, z. B. über die einzelnen Lipidklassen sowie Fettsäure-Muster der Lipide. In Vorarbeiten von Dr. Liebisch wurde die Quantifizierung der zellulären Lipide um eine Cholesterinbestimmung ergänzt sowie auf Medien ausgeweitet, was die Berechnung des prozentualen Lipideffluxes ermöglicht. Ebenso kann durch die Verwendung deuterierter Spezies die Biosynthese sowie der Stoffwechsel der einzelnen Lipide betrachtet werden.

3.2.1 Vergleich des Lipideffluxes zwischen MS und radioaktivem Label

Um die Vergleichbarkeit der beiden Methoden darzustellen, wurden Monozyten/Makrophagen in einem parallelen Versuchsansatz einerseits mit ^{14}C -Cholesterin und ^3H -Cholin, andererseits für die Quantifizierung mittels MS ungelabelt inkubiert.

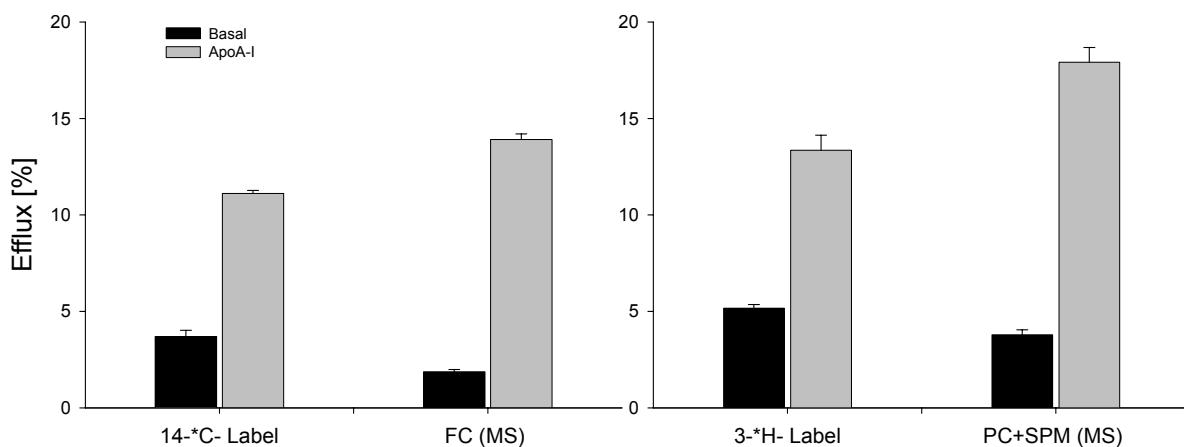


Abb. 9: Vergleich des Cholesterin- und Phospholipideffluxes zwischen radioaktivem Label und MS in Monozyten/Makrophagen (n=1). In der MS-Analytik wurden die Werte für PC und SPM zu PL zusammengefasst, was den nach außen transportierten ^3H -Cholinwerten entspricht. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung

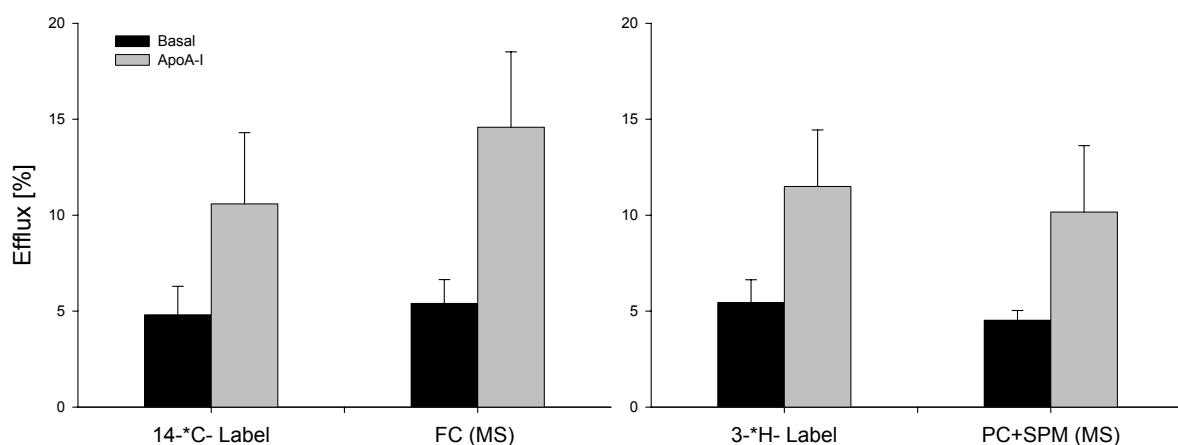


Abb. 10: Vergleich des Cholesterin- und Phospholipideffluxes zwischen radioaktivem Label und MS in Monozyten/Makrophagen (n=8). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus acht unabhängigen Experimenten jeweils mit 3-fach Bestimmung.

Aus Abbildung 9, welche Werte aus einem Experiment (n=1) mit Schaumzellen darstellt, ergab sich hinsichtlich beider Methoden eine gute Vergleichbarkeit sowohl des basalen als auch des ApoA-I spezifischen Effluxes. In der MS-Analytik zeigten sich dabei geringfügig höhere Werte für den spezifischen Lipidefflux; dies leitete sich aus den etwas niedrigeren Werten für basalen Lipidefflux ab.

Vergleicht man die beiden Methoden über mehrere Experimente (n=8) hinweg, setzt sich dies bei deutlich größeren Standardabweichungen fort, siehe Abbildung 10. Dabei zeigten sich im Vergleich der beiden Methoden mit der MS-Analytik leicht erhöhte Werte im Cholesterinefflux sowie etwas erniedrigte Werte im PL-Efflux. Für Fibroblasten ergaben sich in mehreren, hier nicht abgebildeten Experimenten ähnliche Ergebnisse, welche jedoch etwas weniger starken Schwankungen unterlagen.

In den obigen Abbildungen 9 und 10 zeigte sich sowohl im basalen als auch im spezifischen PL- und FC-Efflux bei Monozyten/Makrophagen eine gute Korrelation der beiden Methoden.

3.2.2 Effluxmodell mit Fibroblasten

3.2.2.1 Vergleich der Lipidmuster von Zellen und Entladungsmedien

Mit Hilfe der MS können aus einer Probe neben Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPM) und FC weitere Lipidspezies, wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Lyso-PC (LPC), Ceramid (Cer) und CE, sowohl in Zellen als auch in Medien quantifiziert werden.

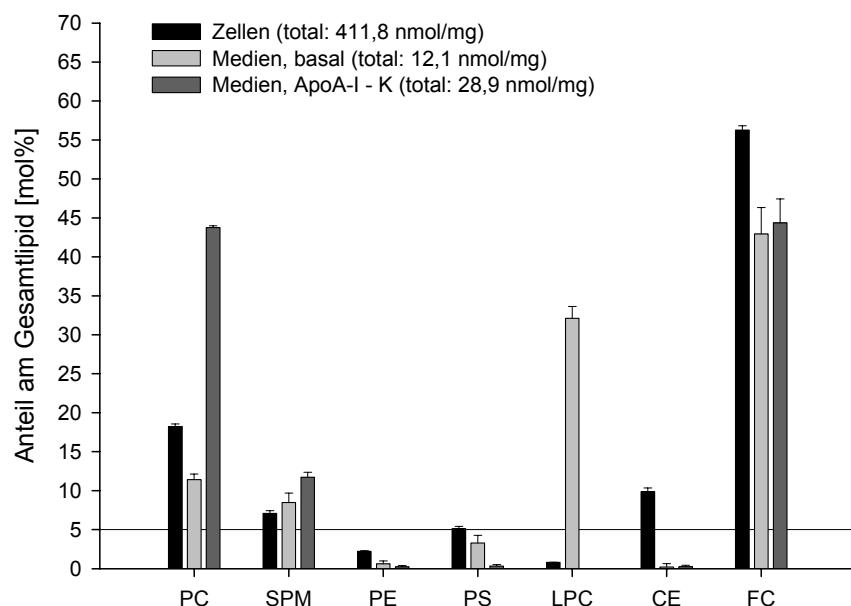


Abb. 11: Hauptlipide in Fibroblasten und Medien. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung. In Klammern ist jeweils die Gesamtmenge der analysierten Lipide der Fraktion/mg Zellprotein angegeben.

Fibroblasten zeigten zellulär einen sehr hohen Anteil an unverestertem Cholesterin (FC, ca. 60 %), dagegen aber nur gut 10 % CE und knapp 20 % PC. Im basalen, BSA-haltigen Medium fiel der bis über 30 % große Anteil an LPC auf, welcher nur basal, d.h. nicht aufgrund einer Stimulation mit ApoA-I nach außen transportiert wird. Subtrahiert man die basale von der durch ApoA-I nach außen transportierten Menge an Lipid, erhält man die tatsächlich auf Induktion durch ApoA-I spezifisch transportierte Lipidmenge; diese setzte sich

zu jeweils knapp 45 mol % aus FC und PC, sowie zu ca. 10 mol % aus SPM zusammen.

Während PS, das noch zu beinahe 5 % in basalen Medien nachgewiesen werden konnte, nahmen PE, LPC und CE in spezifisch nach außen transportierten Medien (ApoA-I – K, K = Kontrolle) nur einen verschwindend geringen Anteil am Gesamtlipid ein.

	PL/TC	PC/SPM	CE/FC
Zellen	0,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4	0,15 ± 0,05
Basale Medien	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,2	
Spezifische Medien	0,9 ± 0,2	3,8 ± 0,7	

Tab. 2: Verhältnisse der Lipidspezies in Fibroblasten und Medien. „PL“ stellt die Summe der Werte für PC, SPM, PE, PS und LPC dar. „TC“ bezeichnet die Summe von FC und CE. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

In Fibroblasten ergab sich ein mehr als sechsfacher Überschuss von freiem Cholesterin gegenüber CE. Vergleicht man die Verhältnisse von Phospholipiden und TC in Zellen gegenüber spezifisch nach außen transportierten Medien, so ergab sich mit 0,5 in Zellen ein niedrigeres PL/TC-Verhältnis als mit 0,9 in Medien. Dabei fiel der Überschuss von PC gegenüber SPM (2,8-fach) in Zellen ebenso auf wie das beinahe ausgeglichene PC/SPM-Verhältnis von 1,3 in basalen Medien. Letzteres steigerte sich jedoch in spezifisch nach außen transportierten Medien auf einen annähernd vierfachen Überschuss von PC.

3.2.2.2 Speziesprofil von Phosphatidylcholin

Zur näheren Charakterisierung des Effluxes wurde die Zusammensetzung von Zellen und Medien bezüglich der PC-Spezies analysiert. Aus den Werten „Medien, ApoA-I – K“ in Abbildung 12 A) sowie v. a. aus Abbildung 12 B) ist abzulesen, ob eine bestimmte Spezies spezifisch nach Induktion durch ApoA-I nach außen transportiert wird (positive Werte in Abb. 12 B).

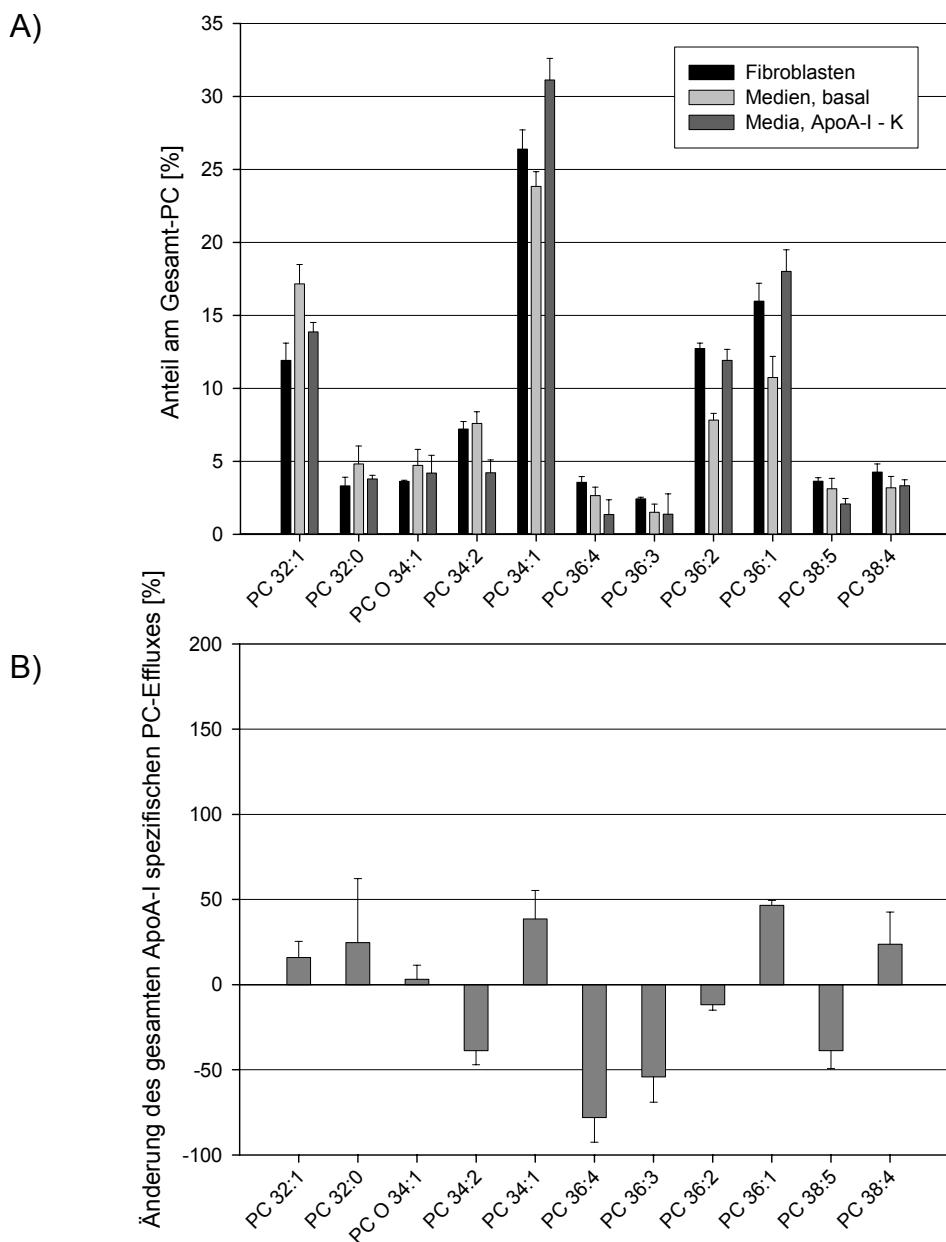


Abb. 12: PC-Spezies in Zellen und Medien. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der einzelnen PC-Spezies am Gesamt-PC (A) sowie die Änderung des ApoA-I spezifischen Effluxes (ApoA-I – K) der einzelnen PC-Spezies bezogen auf den gesamten, ApoA-I spezifischen PC-Efflux (100 %) (B). Der PC-Efflux betrug $14,5\% \pm 0,7\%$. Spezies, die weder in Fibroblasten noch in Monozyten/Makrophagen einen Anteil von 5 % erreicht hatten, wurden nicht abgebildet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

In der obigen Abbildung 12 wies die PC-Spezies 34:1 den höchsten Anteil in Zellen und Medien auf (Abb. 12 A) und verzeichnete dabei eine Steigerung von über 40 % (Abb. 12 B) gegenüber dem gesamten ApoA-I spezifischen PC-

Efflux. Insgesamt wurden in Fibroblasten mit den Spezies PC 32:1, 34:1 und 36:1 überwiegend einfach ungesättigte PC-Spezies spezifisch via ABCA1 transportiert. Dies zeigte sich am deutlichsten für die Hauptspezies PC 34:1 in einem Anstieg des prozentualen Anteils von 26,9 % in Fibroblasten auf 31,6 % im ApoA-I spezifischen Medium (Abb. 12 A) sowie einer damit verbundenen Steigerung des ApoA-I spezifischen Effluxes um 41,2 % gegenüber dem gesamten ApoA-I spezifischen PC-Efflux (Abb. 12 B). Die zweifach ungesättigten PC-Spezies PC 34:2 und PC 36:2 hingegen, welche mit 7 % und 12,9 % zu den Hauptspezies zählten, zeigten wie auch die mehrfach ungesättigten Spezies PC 36:3/4 und PC 38:5 in den spezifisch nach außen transportierten Medien einen geringeren prozentualen Anteil als zellulär (Abb. 12 A) sowie einen reduzierten Efflux im Vergleich zum gesamten ApoA-I spezifischen PC-Efflux (Abb. 12 B). Der Anteil einfach ungesättigter PC-Spezies am gesamten ApoA-I spezifischen PC-Efflux um $33,7\% \pm 10,6\%$ erhöht, während sich Anteil mehrfach ungesättigter PC-Spezies um $22,0\% \pm 15,8\%$ reduzierte.

3.2.2.3 Speziesprofil von Sphingomyelin

Wie aus Abbildung 13 ersichtlich, stellte SPM 16:0 mit knapp 45 % die dominierende Spezies im SPM-Muster sowohl der Zellen als auch der Medien dar (Abb. 13 A), zeigte dabei aber nur eine marginale Steigerung des ApoA-I spezifischen Effluxes gegenüber dem gesamten ApoA-I spezifischen SPM-Efflux (Abb. 13 B). Die Spezies SPM 14:0, SPM 16:1 und SPM 24:2 hatten zwar in Fibroblasten einen zellulären Anteil von knapp unter 5 % (Abb. 13 A), wiesen aber mit einem Anstieg von ca. 50 % (SPM 14:0 und 16:1) sowie von ca. 80 % (SPM 24:2) gegenüber dem gesamten ApoA-I spezifischen SPM-Efflux einen deutlich erhöhten ApoA-I spezifischen Efflux auf. Die Spezies 24:1 und 24:0 hingegen fanden sich in Zellen zu etwas höheren Anteilen als in Medien (Abb. 13 A) und stellten auch im ApoA-I spezifischen Efflux mit -23,7 % (SPM 24:1) sowie mit -77,3 % (SPM 24:0) einen niedrigeren prozentualen Anteil dar als der gesamte ApoA-I spezifische SPM-Efflux (Abb. 13 B).

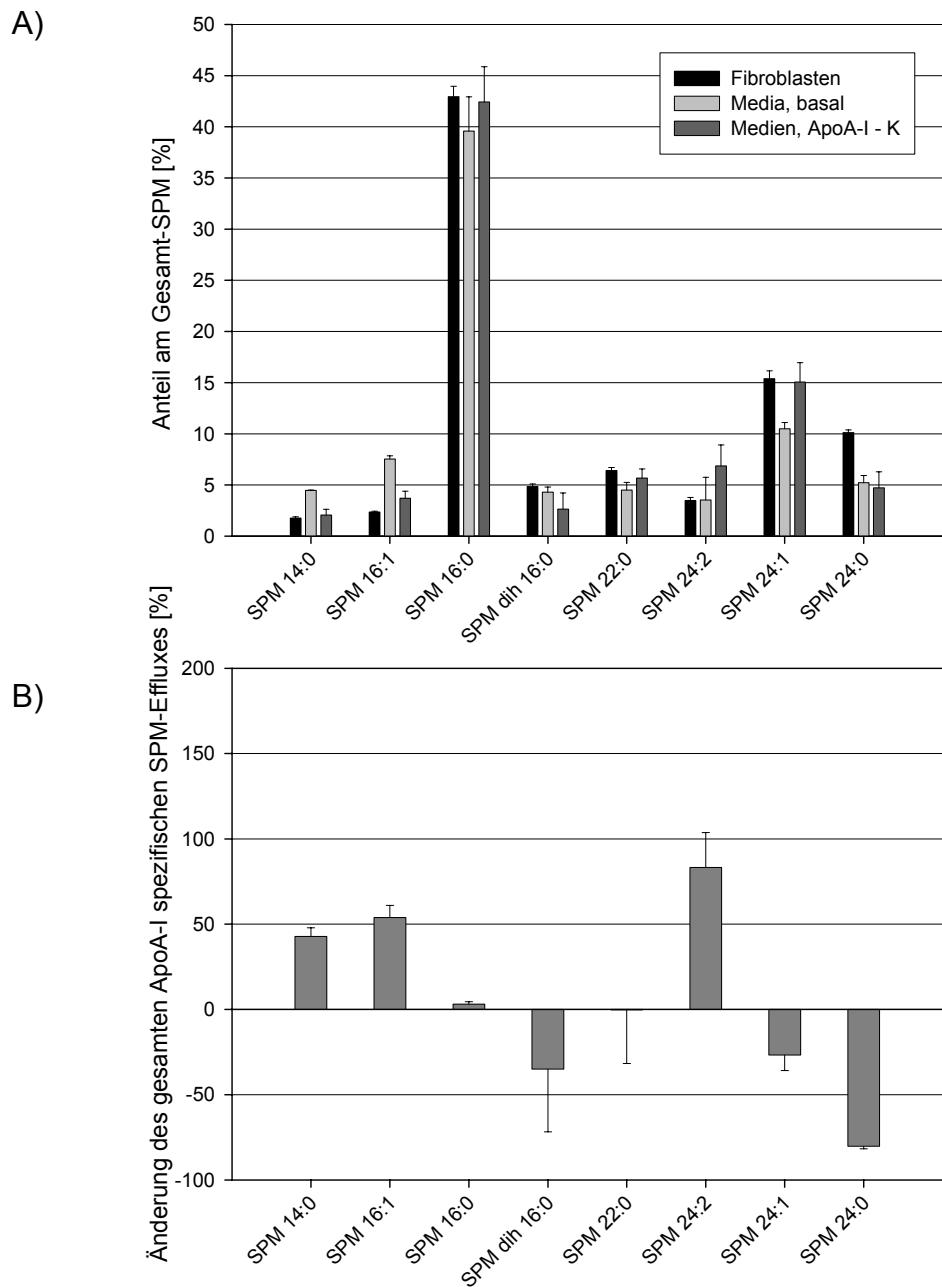


Abb. 13: SPM-Spezies in Fibroblasten und Medien. Der ApoA-I spezifische SPM-Efflux in dem dargestellten Experiment betrug $5,4\% \pm 0,3\%$. Durchführung und Berechnung analog Abbildung 12.

3.2.2.4 Speziesprofil der Cholesterinester

Bei der Entladung von Zellen mit HDL₃ konnte eine partielle Beladung der Zellen mit Cholesterin beobachtet werden; weiter war es aufgrund des großen

Cholesterinüberschusses im Entladungsmedium nicht möglich, plausible Werte für den HDL₃ spezifischen Efflux zu messen. In Folge dessen wurden im gleichen Ansatz Fibroblasten zusätzlich zur Inkubation mit 10 µg/ml ethanolischer Cholesterinlösung (¹²C) gleichzeitig mit 5 µg/ml ¹³C₃-Cholesterin beladen, um eine eventuelle Beladung durch HDL₃ nachzuvollziehen. In Abbildung 14 wurde zunächst die prozentuale zelluläre Verteilung von ¹²C-CE und ¹³C₃-CE gezeigt.

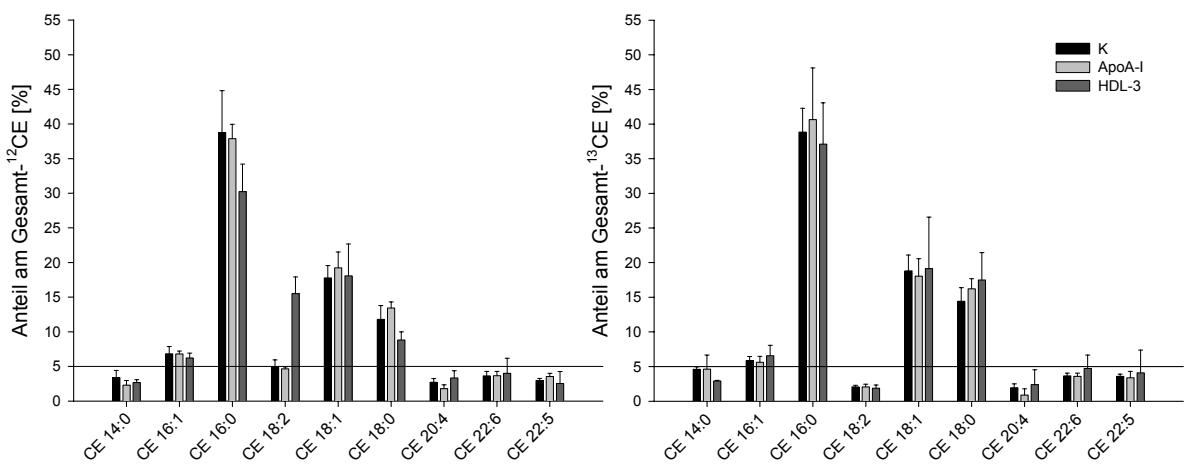


Abb. 14: Prozentuale Verteilung der CE-Spezies in Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden unter Zusatz von 5 µg/ml ¹³C₃-Cholesterin mit 10 µg/ml ethanolischer Cholesterinlösung beladen; die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 6-fach Bestimmung.

Aus der obigen Abbildung ist der beinahe identische prozentuale Einbau von Fettsäuren in die CE von natürlichem ¹²C-Cholesterin (¹²CE, links) sowie von ¹³C₃-Cholesterin (¹³CE, rechts) ersichtlich, wobei CE 16:0 mit ca. 40 % in Fibroblasten die dominierende Spezies darstellte. Bei der Veresterung von ¹³C₃-FC wurde im Gegensatz zu ¹²C-FC ein geringerer Anteil von CE 18:2 gefunden, während CE 18:1 und CE 18:0 einen etwas höheren Anteil aufwiesen. Ferner stellten die CE-Spezies mit den FS 18:1 und 18:0 mit 18 % bzw. 15 % neben CE 16:0 die Hauptspezies dar. Kumulativ ergab sich mit 3,85 nmol/mg ein knapp halb so großer Einbau von ¹³C₃-Cholesterin in CE gegenüber den natürlichen ¹²C-Spezies (8,79 nmol/mg). Betrachtet man die zellulären CE-Verhältnisse nach Entladung mit ApoA-I im Vergleich zum beladenen Zustand, stellten sich kaum Unterschiede in der prozentualen Verteilung der einzelnen

Spezies dar; nach Entladung der Fibroblasten mit 100 µg/ml HDL₃ fiel jedoch die starke prozentuale Zunahme der ¹²C-CE 18:2 (von 4,9 % auf 15,5 % der Gesamt-CE) auf.

Dies wurde in der Darstellung der absoluten Menge der entsprechenden CE-Spezies nach der Entladung mit ApoA-I/HDL₃ (vgl. Abbildung 15) noch deutlicher.

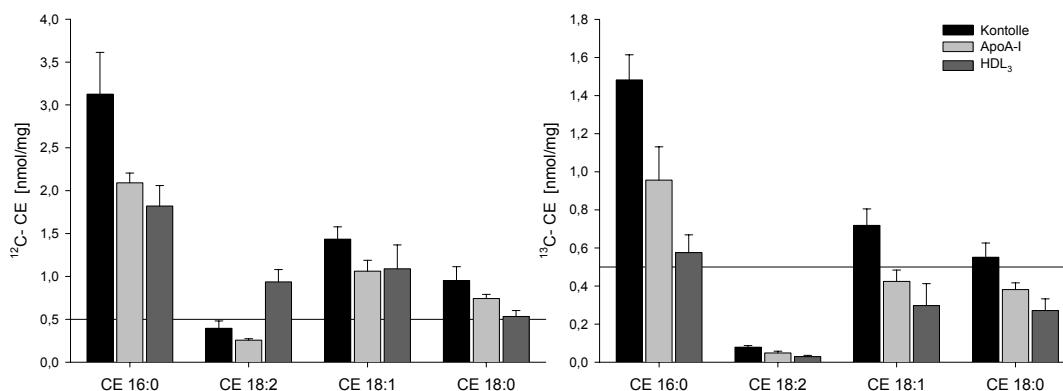


Abb. 15: Anteil verschiedener CE-Spezies in Fibroblasten. Im Anschluss an die in Abbildung 14 beschriebene Beladung wurden die Zellen durch Zugabe von 10 µg/ml ApoA-I bzw. 100 µg/ml HDL₃ über 20 h entladen. Zur Entfernung von anhaftendem HDL₃ wurden die Zellen vor der Aufarbeitung drei Mal mit PBS gewaschen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 6-fach Bestimmung.

Hierbei zeigte sich eine durchgehende Abnahme der dargestellten CE-Spezies sowohl auf Entladung mit ApoA-I als auch mit HDL₃; diese fiel mit einer Reduktion von 1,5 nmol/mg auf weniger als 0,6 nmol/mg durch HDL₃ für ¹³C₃-CE 16:0 am deutlichsten aus, wobei die Entladungseffekte von HDL₃ im Gegensatz zu ApoA-I bei den ¹²C-CE-Spezies weniger deutlich ausgeprägt waren. Für CE 18:1 kehrte sich dieser Entladungseffekt durch HDL₃ bei den natürlichen CE-Spezies um, so dass nur noch eine leichte Verringerung der zellulären CE beobachtet werden konnte. Bei CE 18:2 hingegen kam es zu einer Verdopplung auf ca. 1 nmol/mg Zellprotein gegenüber nicht entladenen Kontrollzellen und somit für diese CE-Spezies zu einer deutlichen Beladung durch HDL₃.

Dabei stellten jedoch CE 18:1 (17,9 %) und v. a. CE 18:2 (48,9 %) auch den prozentual höchsten Anteil der CE-Spezies im HDL₃-Partikel dar (vgl. Tab. 3).

	CE 16:1	CE 16:0	CE 18:2	CE 18:1	CE 18:0
LDL	5,0 ± 0,9%	9,8 ± 0,8%	55,9± 3,3%	15,1± 1,3%	6,2 ± 0,6%
E-LDL	5,2 ± 0,6%	9,7 ± 0,9%	53,2± 5,9%	14,9± 1,6%	5,9 ± 0,3%
HDL₃	8,1 ± 1,1%	11,2± 0,6%	48,9± 3,8%	17,9± 1,0%	0,9 ± 0,1%

Tab. 3: Anteil der Cholesterinester in verschiedenen Lipoproteinklassen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

3.2.3 Lipidmuster im Effluxmodell an Monozyten/Makrophagen

Nachfolgend ist die unter 3.2.2 beschriebene Charakterisierung des Lipideffluxes mit Hilfe der MS-basierten Analytik für Monozyten/Makrophagen dargestellt.

3.2.3.1 Vergleich der Lipidmuster von Zellen und Entladungsmedien

Am Modell E-LDL-beladener Monozyten/Makrophagen zeigte sich zellulär mit ca. 60 % der sehr hohe Anteil an Cholesterin, wovon gut 20 % als CE und 40 % unverestert vorlagen. Mit 20 % am zellulären Lipid stellte PC den dritten Hauptbestandteil dar, wogegen SPM, PE, PS und LPC jeweils einen Anteil von weniger als 10 % an den gemessenen Lipiden aufwiesen. Im basalen Medium fiel mit über 20 % der hohe, basal nach außen transportierte Anteil an CE auf, welcher aber nur basal, d.h. nicht aufgrund einer Stimulation mit ApoA-I nach außen transportiert wird. PC und FC hingegen wurden zwar basal ins Medium transportiert, jedoch vergrößerte sich ihr prozentualer Anteil im spezifisch nach außen transportierten Medium von 11 % auf 18 % (PC) bzw. von 54 % auf 65 % (FC).

SPM wies in Zellen und Medien jeweils einen Anteil von ca. 10 % auf. PS und PE wurden kaum ($\leq 3\%$) ins Medium abgegeben, stellten aber mit etwas weniger als 5 % auch nur einen kleinen Anteil am zellulären Gesamtlipid dar.

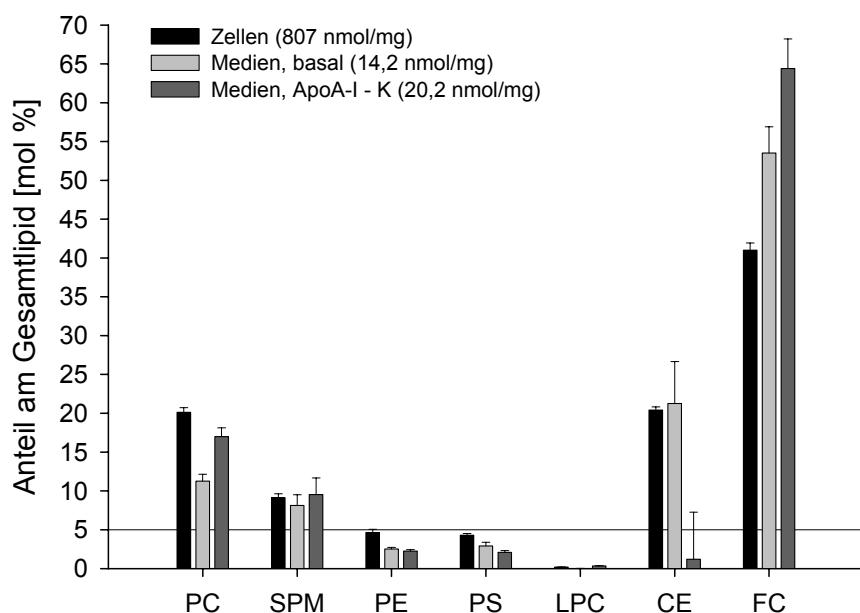


Abb. 16: Hauptlipide in Monozyten/Makrophagen und Medien. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung. In Klammern ist jeweils die Menge an Gesamtlipid der Fraktion/mg Zellprotein angegeben.

LPC dagegen war zu einem verschwindend geringen prozentualen Anteil in Zellen und Medien von beladenen Monozyten/Makrophagen vorhanden.

	PL/TC	PC/SPM	CE/FC
Zellen	$0,7 \pm 0,05$	$2,2 \pm 0,05$	$0,6 \pm 0,3$
Basale Medien	$0,3 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$
Spezifische Medien	$0,4 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	

Tab. 4: Verhältnisse der Lipidspezies in Monozyten/Makrophagen und Medien. Bezeichnungen analog Tab. 2. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

Monozyten/Makrophagen zeigten in den spezifisch nach außen transportierten Medien einen annähernd zweifach höheren Cholesteringehalt („total cholesterol“, TC) gegenüber PL, wobei mehr als doppelt so viel PC als SPM vorlag. Hinsichtlich der zellulären Lipidverhältnisse war in Schaumzellen mit

einem PL/TC-Verhältnis von 0,7 ein leichter Überschuss an Cholesterin zu beobachten; hierbei zeigte sich zellulär sogar ein zweifach höherer PC-Gehalt gegenüber SPM. In den basalen Medien lag bei einem mehr als dreifachen Überschuss von TC gegenüber PL ein beinahe ausgeglichenes PC/SPM-Verhältnis von 1,2 vor. Letzteres steigerte sich in spezifischen Medien auf einen knapp zweifachen Überschuss von PC.

3.2.3.2 Speziesprofil von Phosphatidylcholin

Das in Abbildung 17 dargestellte Muster der PC-Spezies wies PC 34:1 und PC 34:2 als Hauptkomponenten sowohl in Monozyten/Makrophagen als auch in Medien aus, wobei sich deren prozentualer Anteil von zellulär ca. 19 % auf 20,3 % (PC 34:2) bzw. von 18,3 % auf 22,1 % (PC 34:1) in den ApoA-I spezifisch nach außen transportierten Medien erhöhte (Abb. 17 A). Dabei wurde auch eine Erhöhung des ApoA-I spezifischen Effluxes um 18,3 % (PC 34:2) sowie um 56,7 % (PC 34:1) bezogen auf den gesamten ApoA-I spezifischen Efflux beobachtet. Ein ähnliches Verhalten konnte bei den PC-Spezies PC 32:1, PC 32:0 und der alkylierten Spezies PC-O-34:1 beobachtet werden, für welche sich ein höherer prozentualer Anteil in Medien als in Zellen (Abb. 17 A) sowie eine Steigerung des ApoA-I spezifischen PC-Effluxes um 51,2 % (PC 32:1), 28,1 % (PC 32:0) und 26,9 % (PC-O-34:1) errechnete (Abb. 17 B). Dagegen zeigten sich für die weiteren Hauptspezies in Monozyten/Makrophagen, PC 36:3 (18,1 %) und PC 36:2 (14,3 %), zellulär höhere Werte als in ApoA-I spezifisch nach außen transportierten Medien (12,4 % bzw. 11,6 %) sowie in basalen Medien (ca. 11 % für beide PC-Spezies). Ferner konnte sowohl für die Spezies PC 36:3 mit -23,2 % als auch für PC 36:2 mit -20,7 % ein deutlich erniedrigter Anteil am ApoA-I spezifischen Efflux gegenüber dem gesamten ApoA-I spezifischen PC-Efflux beobachtet werden. Insgesamt zeigten die langkettigeren PC-Spezies (mit den zu geringeren prozentualen Anteilen vorhandenen Spezies PC 36:4, 36:1, 38:5 und 38:4) ein konträres Verhalten gegenüber den kurzkettigeren PC-Spezies (PC mit 32 und 34 C-Atomen, Abb. 17 A).

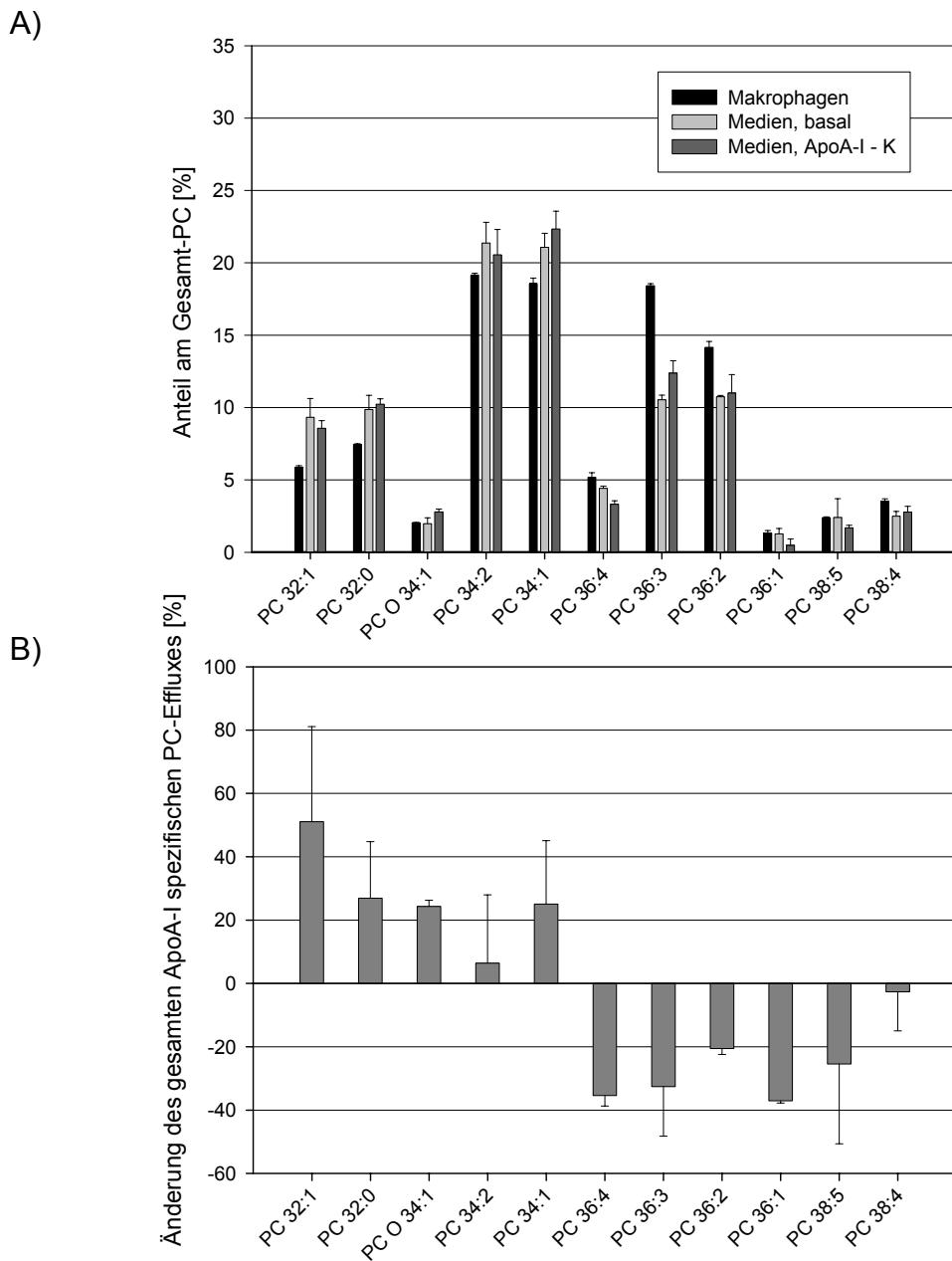


Abb. 17: PC-Spezies in Monozyten/Makrophagen und Medien. Der PC-Efflux in dem dargestellten Experiment betrug $6,1\% \pm 0,3\%$. Berechnung analog Abbildung 12.

Dies verdeutlichte sich für die dargestellten PC-Spezies mit 32 und 34 C-Atomen, für welche in Abbildung 17 B) ein erhöhter ApoA-I spezifischer Efflux gefunden wurde - im Gegensatz zu den PC-Spezies mit 36 und 38 C-Atomen, für welche ein erniedrigter ApoA-I spezifischer Efflux beobachtet wurde. Der Anteil einfach ungesättigter PC-Spezies steigerte sich um $27,6\% \pm 23,5\%$,

während sich der Anteil mehrfach ungesättigten PC-Spezies am gesamten ApoA-I spezifischen PC-Efflux um $20,6\% \pm 11,0\%$ erniedrigte.

3.2.3.3 Speziesprofil von Sphingomyelin

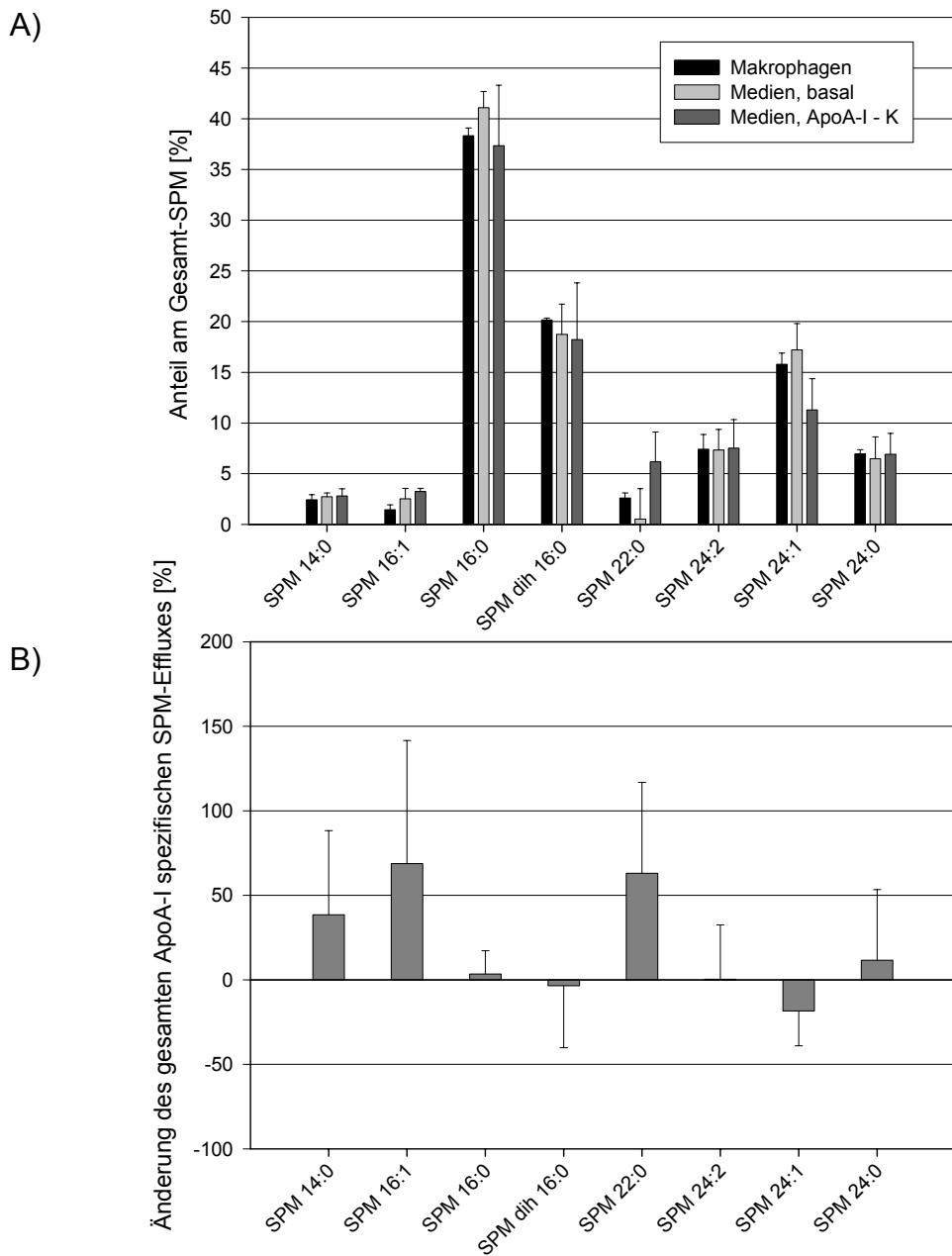


Abb. 18: SPM-Spezies in Monozyten/Makrophagen und Medien. Der SPM-Efflux in dem dargestellten Experiment betrug $3,4\% \pm 0,4\%$. Berechnung analog Abbildung 12.

Das Spezies-Muster für SPM zeigte in Monozyten/Makrophagen mit ca. 40 % SPM 16:0 in Zellen und Medien als dominierende Spezies (Abb. 18 A), welche

im ApoA-I spezifischen Medium mit +2,3 % jedoch nur einen leicht höheren Anteil aufwies als der gesamte ApoA-I spezifische SPM-Efflux (Abb. 18 B). In Monozyten/Makrophagen stellten die Dihydrospezies Dihydro-SPM 16:0 mit ca. 20 % den zweithöchsten prozentualen Anteil der SPM-Spezies dar. Dihydro-SPM 16:0 wies dabei ebenso wie SPM 24:1 in den ApoA-I spezifisch nach außen transportierten Medien einen etwas geringeren prozentualen Anteil auf als in Zellen (Abb. 18 A), was sich ferner in einem erniedrigten ApoA-I spezifischen Efflux von -6,7 % (Dihydro-SPM 16:0) sowie von -21,1 % (SPM 24:1) äußerte (Abb. 18 B). Die Spezies SPM 14:0, SPM 16:1, SPM 22:0 und SPM 24:0 stellten zwar in Monozyten/Makrophagen einen zellulär etwas geringeren Anteil von knapp 5 % dar (Abb. 18 A), wiesen aber mit ca. +50 % (SPM 14:0 und 16:1), +61,8 % (SPM 22:0) und +12,4 % (SPM 24:0) einen deutlich höheren ApoA-I spezifischen Efflux auf als der gesamte ApoA-I spezifische SPM-Efflux.

3.2.3.4 Effluxprofil der PC- und SPM-Spezies unter Verwendung von deuteriertem Cholin

Aufgrund der größeren Mengen an PC, SPM und Cholesterin im HDL₃-Partikel ist eine Bestimmung des HDL₃ spezifischen Effluxes (HDL₃ – K) nicht möglich. Dies kann jedoch unter Verwendung deuterierter Spezies, die nicht im HDL₃-Partikel vorkommen, umgangen werden. Zur Bestimmung des HDL₃ spezifischen Effluxes wurden somit die Monozyten/Makrophagen zusätzlich zur Beladung mit E-LDL mit 50 µg/ml D₉-Cholin inkubiert und der spezifische Efflux für ApoA-I und HDL₃ bestimmt. Die 24-stündige Inkubation mit D₉-Cholin bewirkte dabei einen umgehenden Einbau in D₉-PC (74,5 % ± 21 % des gesamten PC) sowie in D₉-SPM (26,2 % ± 11,9 % des gesamten SPM). Ferner stellte sich neben dem ApoA-I spezifischen Efflux (4,6 % ± 0,7 % für D₉-PL) auch der HDL₃ spezifische Efflux (5,0 % ± 0,5 % für D₉-PL) in einem ähnlichen Rahmen dar wie der mittels Radioaktivität ermittelte Efflux (5,8 % ± 1,5 % für ApoA-I - K und 6,2 % ± 1,2 % für HDL₃ – K). Die gebildeten D₉-PC und D₉-SPM-Spezies zeigten dabei ein den natürlich vorkommenden PC- und SPM-Spezies weitgehend identisches Verteilungsmuster.

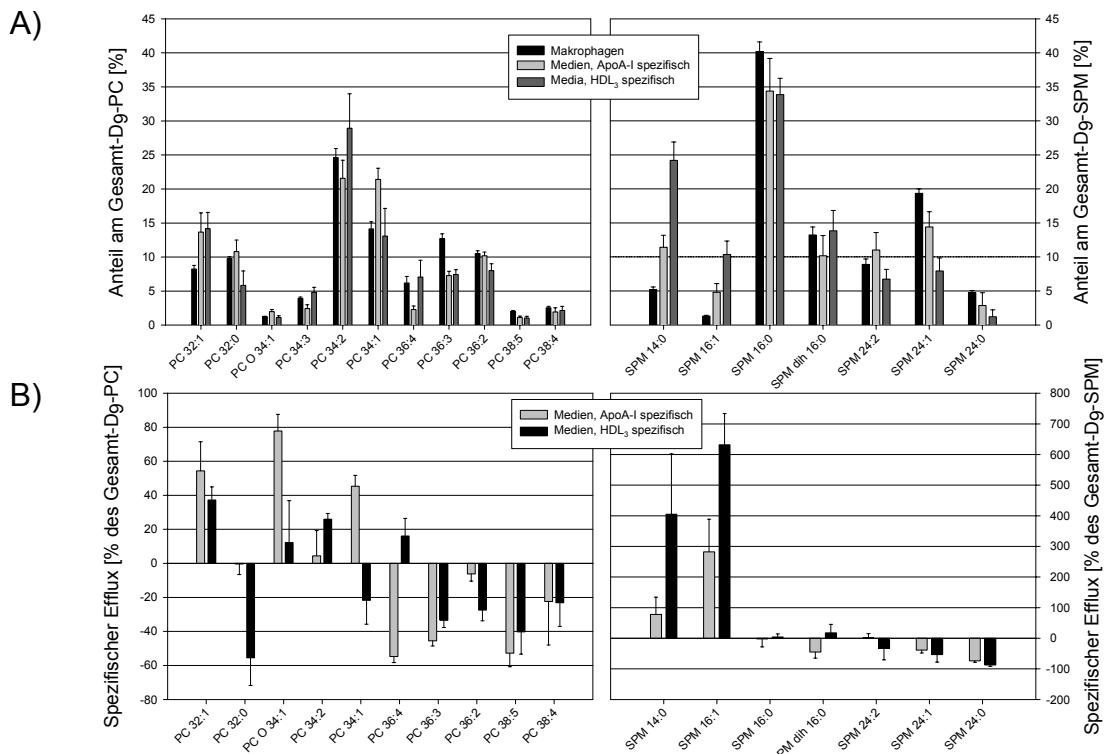


Abb. 19: Deuterierte PC und SPM-Spezies in Monozyten/Makrophagen und spezifischen Medien. Zusätzlich zur Berechnung analog Abbildung 12 wurden auch die prozentualen Anteile der einzelnen PC- und SPM-Spezies am Gesamt-PC/SPM (A) in HDL₃ spezifischen Medien sowie die Änderung der einzelnen PC- und SPM-Spezies bezogen auf den gesamten, HDL₃ spezifischen PC-Efflux (B) dargestellt.

Ähnlich den Verhältnissen der Experimente aus den Abbildungen 17 und 18, stellten sich auch in diesem Ansatz die Spezies D₉-PC 34:2 (24,4 %) und D₉-PC 34:1 (14,2 %) sowie D₉-SPM 16:0 (40,2 %) als Hauptspezies in Monozyten/Makrophagen dar (Abb. 19 A). Ebenso zeigte sich für die einfach ungesättigten PC-Spezies D₉-PC 32:1 (52,6 %) und D₉-PC 34:1 (46,1 %) ein erhöhter Anteil am ApoA-I spezifischen Efflux (Summe der einfach ungesättigten D₉-PC-Spezies: 41,9 % \pm 16,4 %), während für mehrfach ungesättigte D₉-PC-Spezies um -21,2 % \pm 9,3 % erniedrigter Anteil am ApoA-I spezifischen Efflux zu beobachten war. Bezuglich des HDL₃ spezifischen Effluxes ergab sich für die deuterierten PC-Spezies ein uneinheitliches Bild: Während die Hauptspezies D₉-PC 34:2 einen erhöhten HDL₃ spezifischen Efflux (+25,9 %) aufwies, ergab sich für die zweite Hauptspezies D₉-PC 34:1 ein um -21,6 % erniedrigter Anteil am HDL₃ spezifischen Efflux. Abgesehen von D₉-PC

36:4 (+17,3 %), zeigten die langkettigeren Spezies D₉-PC 36:3/2 und D₉-PC 38:5/4 einen durchgehend erniedrigten HDL₃ spezifischen Efflux (ca. 60 % - 80 %). Dahingegen stellte sich bezüglich der SPM-Spezies mit einer vierfachen Erhöhung für D₉-SPM 14:0 sowie einer mehr als sechsfachen Erhöhung für D₉-SPM 16:1 ein sehr deutliches Bild dar, zumal sich auch für die Spezies D₉-SPM 16:0 und D₉-Dihydro-SPM 16:0 ein leicht erhöhter HDL₃ spezifischer Efflux (7 % - 24 %) ergab. Dahingegen wiesen die Spezies D₉-SPM 24 einen reduzierten Anteil am HDL₃ spezifischen Efflux von ca. -80 % bis -30 % auf.

3.2.3.5 Speziesprofil der Cholesterinester

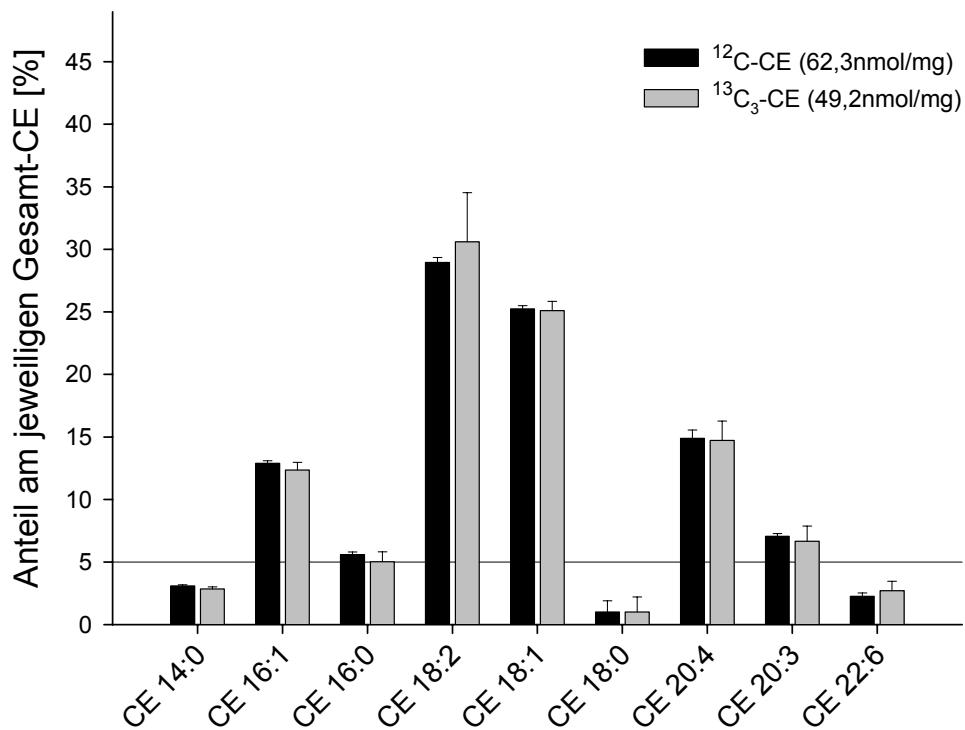


Abb. 20: CE-Spezies in Monozyten/Makrophagen. Durchführung analog Abbildung 10.

Aus Abbildung 20 ist der beinahe identische Einbau der abgebildeten FS in ¹²C-Cholesterin sowie von ¹³C₃-Cholesterin in Monozyten/Makrophagen ersichtlich; bei der Beladung mit E-LDL konnte in Monozyten/Makrophagen mit mehr als 25 % eine verstärkte Bildung von CE 18:2 und 18:1 beobachtet werden. CE

18:2 und CE 18:1 stellten auch die Hauptspezies in LDL und E-LDL (vgl. Tabelle 3) dar. Den drittgrößten Anteil am CE-Pool stellte CE 20:4 mit ca. 15 %; CE 16:1, die Hauptspezies in Fibroblasten, wies in Monozyten/Makrophagen einen Anteil von ca. 13 % am CE-Pool auf.

Wie schon aus Abbildung 16 ersichtlich, waren im Effluxmodell mit Monozyten/Makrophagen CE in Medien zu detektieren. Nachfolgend wurde in einem Experiment unter Verwendung einer zusätzlichen Beladung mit $^{13}\text{C}_3$ -Cholesterin die bei der Entladung durch ApoA-I und HDL₃ nach außen transportierte Menge an $^{13}\text{C}_3$ -CE sowie deren Spezies-Muster in Makrophagen und den jeweiligen nach außen transportierten Medien untersucht.

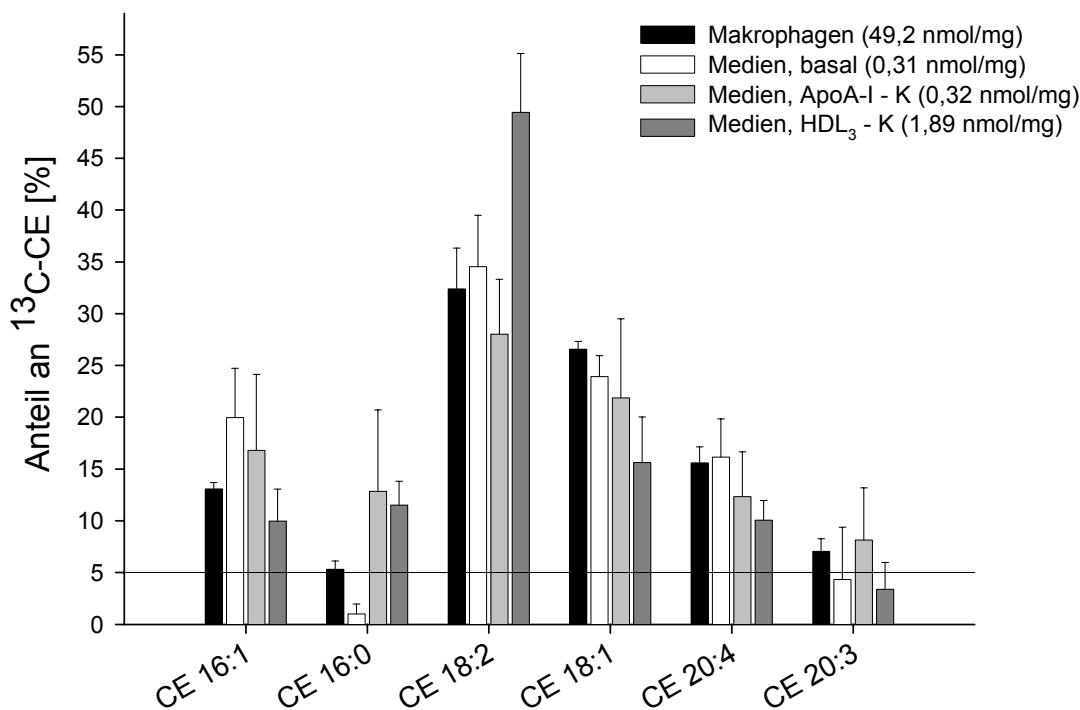


Abb. 21: CE-Spezies in Monozyten/Makrophagen und Medien. Durchführung analog Abbildung 10. In Klammern ist jeweils die Menge an Cholesterinestern der Fraktionen pro mg Zellprotein angegeben. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) aus einem Experimenten mit 6-fach Bestimmung.

Ähnlich wie in anderen Versuchen (vgl. Abbildung 20) ergab sich in diesem Experiment ein zelluläres Verteilungsmuster der CE-Spezies, in welchem CE 18:2 mit 32,4 % die Hauptspezies der abgebildeten CE darstellte (Abb. 21). CE

18:2 wies mit 34,5 % in basalen Medien sowie mit 28,0 % in ApoA-I spezifisch nach außen transportierten Medien einen den zellulären Verhältnissen vergleichbaren prozentualen Anteil auf; in HDL₃ spezifisch nach außen transportierten Medien erreichte CE 18:2 sogar einen Anteil von 49,4 % ± 5,7 % der dargestellten CE-Spezies. Gleichzeitig kam es bei der Entladung mit HDL₃ zu einem Anstieg an LPC (ca. 2,5-fach) im Entladungsmedium. Dabei stellten aber auch CE 18:2 (mit knapp 50 % der CE) und PC 34:2 (ca. 35 % der PC) prozentual den Haupteil der jeweiligen Spezies im HDL₃-Partikel.

Die beiden weiteren zellulären Hauptspezies CE 18:1 (26 %) und 20:4 (16 %) dagegen machten in ApoA-I spezifischen Medien nur noch einen Anteil von 22 % bzw. 12 % und in HDL₃ spezifischen Medien sogar nur noch einen Anteil von 16 % bzw. 10 % aus. CE 16:1 zeigte in ApoA-I spezifischen Medien einen Anstieg auf knapp 17 %, während es sich in HDL₃ spezifischen Medien von zellulär 13 % auf 10 % verringerte. CE 16:0, das in Fibroblasten mit ca. 40 % die Hauptspezies darstellte, verzeichnete sowohl für ApoA-I- als auch für HDL₃ spezifische Medien einen Anstieg von 5 % in Makrophagen auf ca. 12 % in diesen beiden Medien.

3.3 Modulation des Lipideffluxes durch Sphingolipide und Rolle der PKC

Aus Vorarbeiten am Institut mit Fibroblasten sowie aus der Literatur (Mendez et al. 1991; Trümbach 1997) gab es Hinweise auf einen PKC- und Efflux modulierenden Einfluss von Sphingolipiden.

3.3.1 Einfluss von Sphingolipiden auf den Lipidefflux

Der Einfluss der Sphingolipide sollte zuerst an Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen (6.3.3) im Effluxmodell überprüft und nachfolgend anhand von Expressionsdaten der PKC-Isoformen mittels Western-Blot näher untersucht werden.

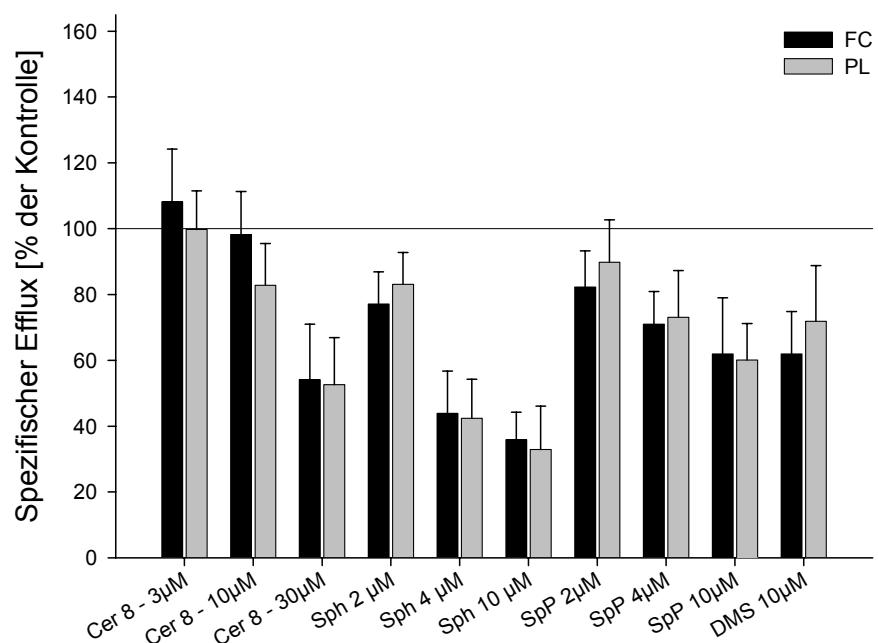


Abb. 22: Modulation des spezifischen Lipideffluxes durch Sphingolipide in Fibroblasten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus drei unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

Für C₈-Ceramid (Cer) zeigte sich die konzentrationsabhängige (3-30 μM) Absenkung des spezifischen Lipideffluxes auf ca. 55 % der Kontrolle. Dieser Effekt war bei Sphingosin (Sph, 2-10 μM) noch stärker ausgeprägt und erreichte

bei 10 μM Konzentration nur noch knapp 40 % der jeweiligen Kontrollen. Auch die Zugabe von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (SpP, 2-10 μM) sowie des Sphingosinkinase-Inhibitors Dimethylsphingosin (DMS, 10 μM) ergab eine Hemmung des spezifischen Lipideffluxes, welche jedoch nur gut 60 % betrug. Niedrigere Konzentrationen an DMS hatten keinen modulierenden Einfluss auf den spezifischen Lipidefflux, jedoch zeigten sich bei Konzentrationen über 10 μM zelltoxische Effekte.

Die aus den Efflux-Experimenten mit Fibroblasten erhaltenen Ergebnisse konnten im Modell mit Monozyten/Makrophagen nur bedingt bestätigt werden. Vor allem für Ceramid ergaben sich konträre Resultate.

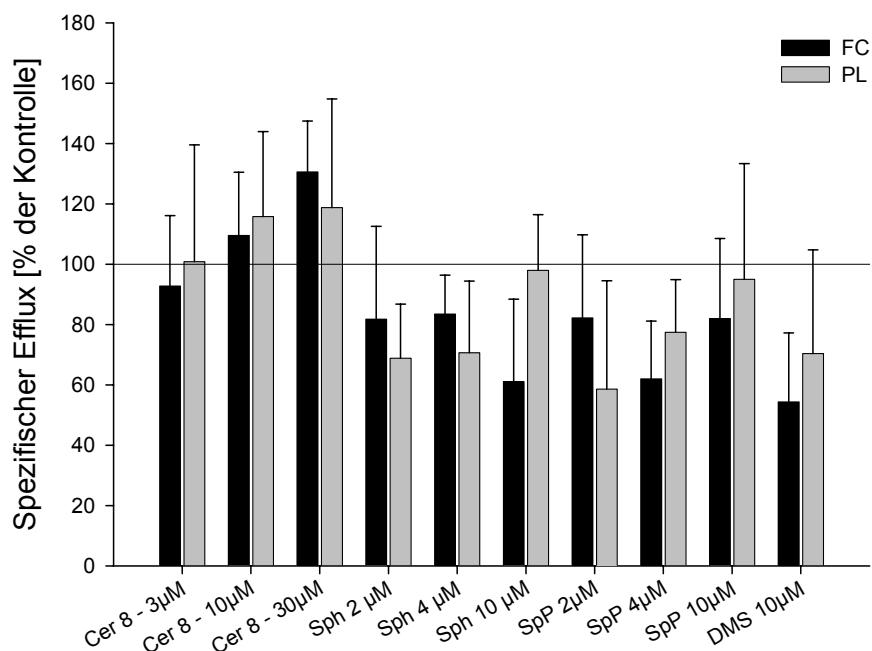


Abb. 23: Modulation des spezifischen Lipideffluxes durch Sphingolipide in Monozyten/Makrophagen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von 3 unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

Im Gegensatz zu Fibroblasten zeigte sich in Monozyten/Makrophagen mit Cer (3-30 μM) ein konzentrationsabhängiger Anstieg sowohl des Cholesterin- als auch des Phospholipideffluxes. Ebenso ergaben sich für Sph und S1P unterschiedliche Ergebnisse; während für Sph im FC-Efflux noch eine

konzentrationsabhängige Hemmung zu beobachten war, schien sich der hemmende Effekt für S1P (SpP, 2 μ M und 4 μ M) bei höheren Konzentrationen (10 μ M) wieder aufzuheben. DMS (10 μ M) zeigte auch in Schaumzellen mit bis zu ca. 60 % der Kontrolle eine deutliche Hemmung des Lipideffluxes.

3.3.2 Proteinexpression der PKC-Isoformen in Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen

Aufgrund der teilweise konträren Ergebnisse im Lipidefflux an Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen wurde zunächst untersucht, ob dies eventuell in einer Expression unterschiedlicher PKC-Isoformen begründet sein könnte.

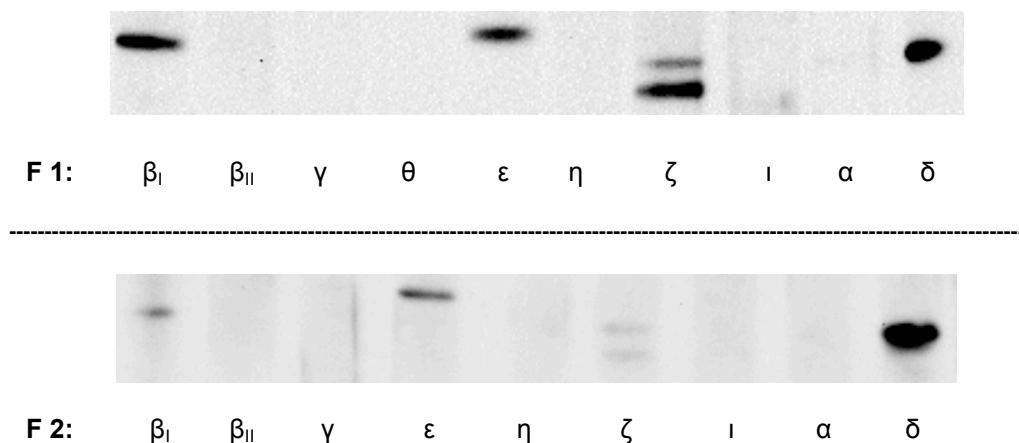


Abb. 24: PKC-Expressionsmuster humaner Fibroblasten (F1 und F2). Nach elektrophoretischer Auftrennung der homogenisierten Zellen und dem Transfer wurden die Membranen in 10 gleich große Stücke geschnitten und über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Dargestellt sind jeweils Ausschnitte der Blots zwischen 97 und 66 kDa.

Aus den in Abbildung 24 gezeigten Ausschnitten der Western-Blots ist ersichtlich, dass in humanen Fibroblasten PKC δ die am stärksten exprimierte Isoform darstellte. Für Spender „F1“ ließen sich daneben die ähnlich stark exprimierten Isoformen von PKC β_I , ϵ und ζ detektieren, welche in Fibroblasten von „F2“ deutlich schwächer exprimiert sind als PKC δ .

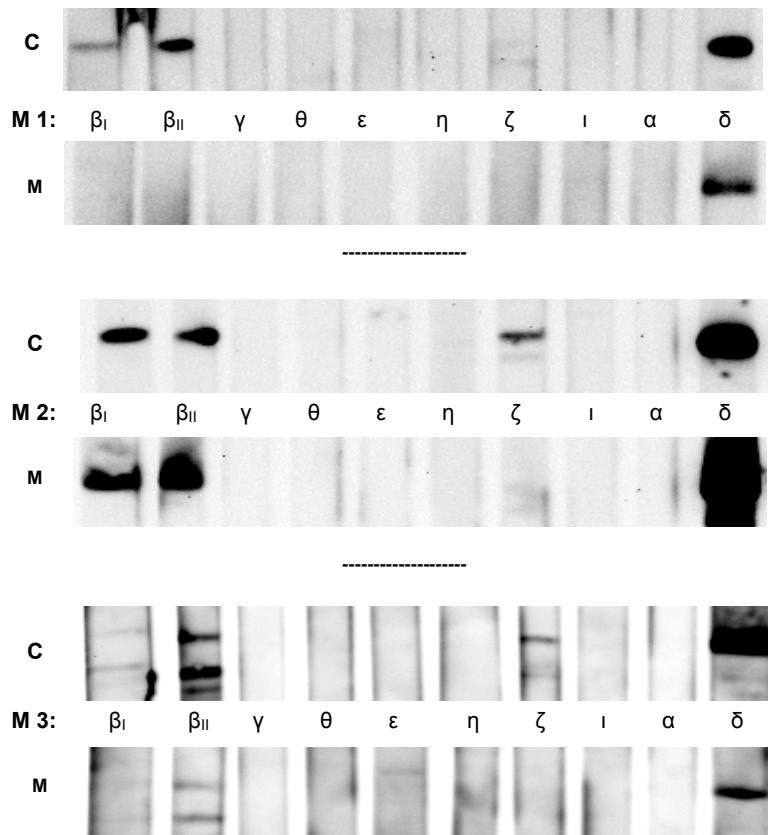


Abb. 25: PKC-Expressionsmuster verschiedener Monozyten-Spendern (M1, M2 und M3) in Cytosol (C)- und Membranfraktionen (M) von mit 40 µg/ml E-LDL-beladenen Makrophagen. Von beiden Fraktionen der beladenen Zellen wurden jeweils 200 µl in die Geltaschen gegeben; nach dem Transfer wurden die Membranen in 10 gleich große Stücke geschnitten und über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Dargestellt sind jeweils Ausschnitte der Blots zwischen 97 und 66 kDa.

Wie in Fibroblasten, ergab sich auch in Schaumzellen von Monozyten für PKC β_I und ζ ein spenderabhängiges Expressionsmuster. PKC β_{II} hingegen ließ sich in humanen Fibroblasten nicht im Western-Blot nachweisen.

Im Modell für E-LDL beladene Monozyten/Makrophagen waren vier Isoformen detektierbar (vgl. Abbildung 25). Die dominierende Isoform stellte PKC δ dar, wobei man jedoch keine überwiegende Lokalisation (im Cytosol oder an der Membran) zuordnen konnte. In Abhängigkeit vom Monozyten-Spender ergaben sich teilweise unterschiedlich starke Banden für die jeweiligen Isoformen β_I , β_{II} und ζ bezüglich deren Lokalisation im Cytosol (inaktiv) im Gegensatz zu Membran (aktivierte Form). Insgesamt ließ diese Lokalisation aber nur bei

Spender „M 2“ auf ein Vorliegen der Isoformen β_I , β_{II} und δ in der membrangebundenen, aktivierte Form schließen, während dies bei den Monozytenspendern „M 1“ und „M 3“ aber nicht zu beobachten war. Für PKC ζ war eine durchgängige Lokalisation (M 2 und 3, M 1 nur mit geringer Expression) im Cytosol (inaktiver Zustand) zu beobachten. Weitere, bzw. die in Fibroblasten gefundene Isoform PKC ϵ (s. Abbildung 24) konnten in Schaumzellen nicht nachgewiesen werden.

3.3.3 Modulation der PKC-Expression

Im Anschluss an die obigen Ergebnisse wurde die in der Literatur beschriebene Downregulation der PKC durch PMA (Hardy et al. 1995) durch Inkubation von Fibroblasten über 48 Stunden im Efflux-Modell untersucht. Parallel zum Lipid-Efflux wurde jeweils die zelluläre Protein-Expression der Isoformen PKC δ , ϵ , ζ und β_I im Western- Blot untersucht.

Sowohl die beiden „neuen“ PKC-Isoformen δ und ϵ also auch die „atypische“ Isoform ζ wiesen nach Inkubation der Fibroblasten mit 400 nM PMA eine deutlich geringere Menge an Protein auf.

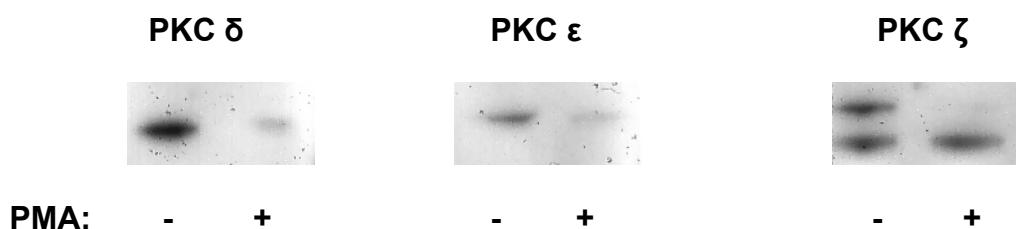


Abb. 26: Einfluss von PMA auf das PKC-Expressionsmuster in der Effluxphase. Die Fibroblasten wurden nach der Beladung mit Cholesterin über 48 h \pm PMA (400 nM) inkubiert und nachfolgend mit 10 μ g/ml ApoA-I entladen. Aufgetragene Menge pro Tasche: 10 μ g Zellprotein. Dargestellt sind Ausschnitte des Blots zwischen 97 und 66 kDa der jeweiligen Isoform.

Die Bedeutung für den Lipidefflux zeigte sich in den parallel durchgeföhrten Efflux-Experimenten, in welchen ein Absinken des spezifischen Effluxes auf $47,3\% \pm 9,8\%$ für FC sowie auf $51,3\% \pm 4,9\%$ für PL (jeweils in 3-fach Bestimmung) zu beobachten war. Der basale Efflux war dabei nur leicht

erniedrigt. Dieser hemmende Effekt auf den Lipidefflux zog sich konstant über mehrere Experimente (n=10) hinweg durch und zeigte sich auch in Monozyten/Makrophagen (n=3; spezifischer Efflux: $56,2\% \pm 19,3\%$ für FC, $59,8\% \pm 12,9\%$ für PL) bei einer gleichzeitigen Downregulation von PKC β_{II} und δ . Für die unter 3.3.2 beschriebenen Sphingolipide wurde kein modulierender Einfluss auf die Expression der PKC-Isoformen festgestellt.

3.4 Effekte von K⁺-Kanal-Inhibitoren im Lipidefflux-System

In Analogie zum Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR) der ABC-Transporterfamilie wurde der Einfluss von verschiedenen K⁺-Kanal-Inhibitoren auf den für ABCA1 charakteristischen ApoA-I spezifischen Lipidefflux und den damit zusammenhängenden zellulären Veränderungen an Fibroblasten sowie am entsprechenden Modell für Monozyten/Makrophagen untersucht.

3.4.1 Modulation des spezifischen Lipideffluxes

Eingangs wurde der Einfluss verschiedener K⁺-Kanal-Inhibitoren auf den Efflux von ¹⁴C-Cholesterin und ³H-Cholin-markierten PL zuerst in Fibroblasten und nachfolgend am Modell mit Monozyten/Makrophagen untersucht. Wurde der spezifische Efflux mittels Massenspektrometrie analysiert, wurden die Werte für PC und SPM in Medien sowie Zellen addiert und als spezifischer Efflux der Phospholipide „PL“ deklariert.

3.4.1.1 Einfluss auf Fibroblasten

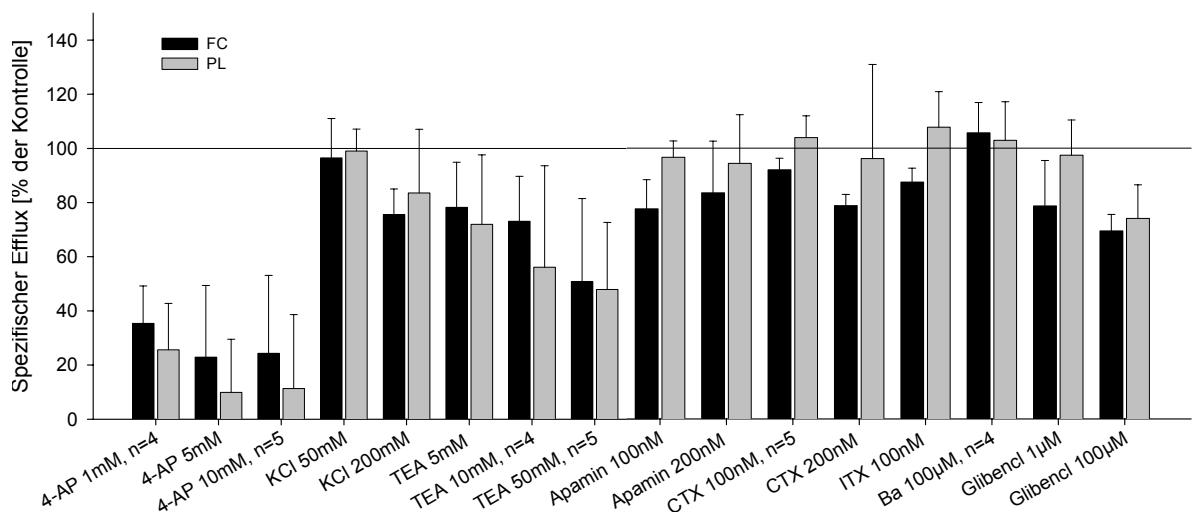


Abb. 27: Modulation des spezifischen Effluxes durch K⁺-Kanal-Inhibitoren (1) in Fibroblasten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von drei bzw. der gegebenenfalls angegebenen Anzahl (n) an unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

Die ausgeprägtesten Effekte an Fibroblasten (Abb. 27) ergaben sich für den unspezifischen K^+ -Kanal-Inhibitor 4-Aminopyridin (4-AP), welcher im Konzentrationsbereich von 1 - 10 mM ein annähernd konzentrationsabhängiges Absenken des spezifischen Effluxes auf 22 % für Cholesterin und ca. 15 % für Phospholipide zeigte. Ein weiterer in der Literatur beschriebener unspezifischer K^+ -Kanal-Inhibitor, Tetraethylammoniumchlorid (TEA), hemmte den spezifischen Lipidefflux um ca. 50 %. Hingegen zeigten Kaliumchlorid (KCl 50-200 mM) als auch die Hemmer von spannungsabhängigen K^+ -Kanälen, Charybdotoxin (CTX) und Iberiotoxin (ITX), Inhibitoren von BK (broad conductance)- K^+ -Kanälen sowie Apamin, ein Inhibitor von SK (small conductance)- K^+ -Kanälen, in den angegebenen Konzentrationen keine modulierenden Effekte auf den spezifischen Lipidefflux. Glibenclamid (Glibencl., 1 - 100 μ M) als Hemmer von spannungsabhängigen, ATP-sensitiven K^+ -Kanälen zeigte erst in höheren Konzentrationen eine leichte Absenkung des spezifischen Lipideffluxes auf ca. 75 %.

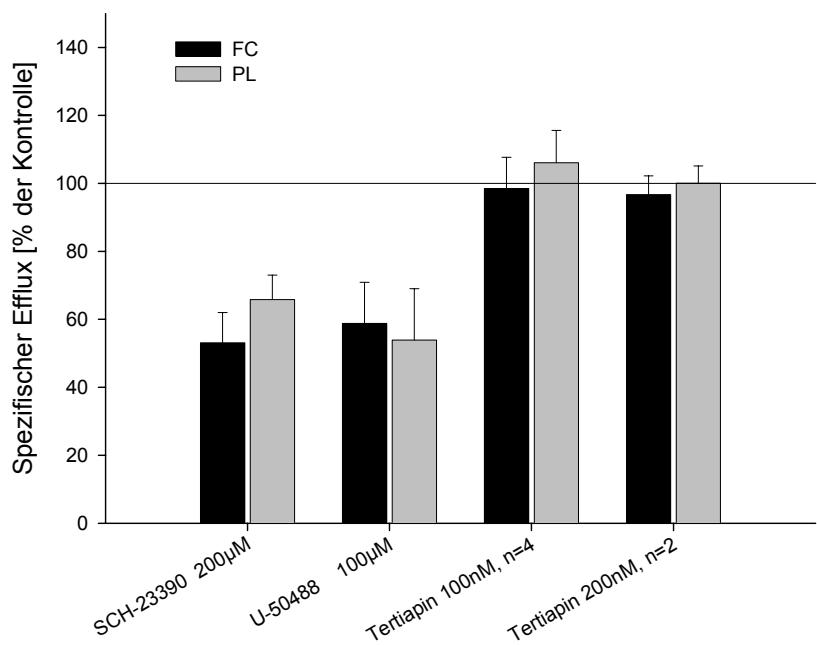


Abb. 28: Modulation des spezifischen Effluxes durch K^+ -Kanal-Inhibitoren (2) in Fibroblasten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von drei bzw. der gegebenenfalls angegebenen Anzahl (n) an unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

Die in Abbildung 28 dargestellten Effekte von GIRK-Inhibitoren auf den spezifischen Lipidefflux zeigten in Fibroblasten sowohl für SCH-23390 als auch für U-50488 in den angegebenen Konzentrationen eine Hemmung des spezifischen Lipideffluxes auf ca. 50 % der Kontrolle. Das ebenfalls als GIRK-Inhibitor beschriebene Tertiapin blieb in den angegebenen Konzentrationen ohne modulierenden Einfluss auf den spezifischen Lipidefflux.

3.4.1.2 Einfluss auf Monozyten/Makrophagen

Die unter 3.4.1.1 beschriebenen Effekte der K^+ -Kanal-Inhibitoren in Fibroblasten konnten im Modell mit Monozyten/Makrophagen nur bedingt bestätigt werden (Abb. 28). Bei der Modulation des spezifischen Lipideffluxes von Schaumzellen zeigten sich wie auch schon in den Efflux-Experimenten mit Sphingolipiden teilweise konträre Ergebnisse bei höheren Standardabweichungen.

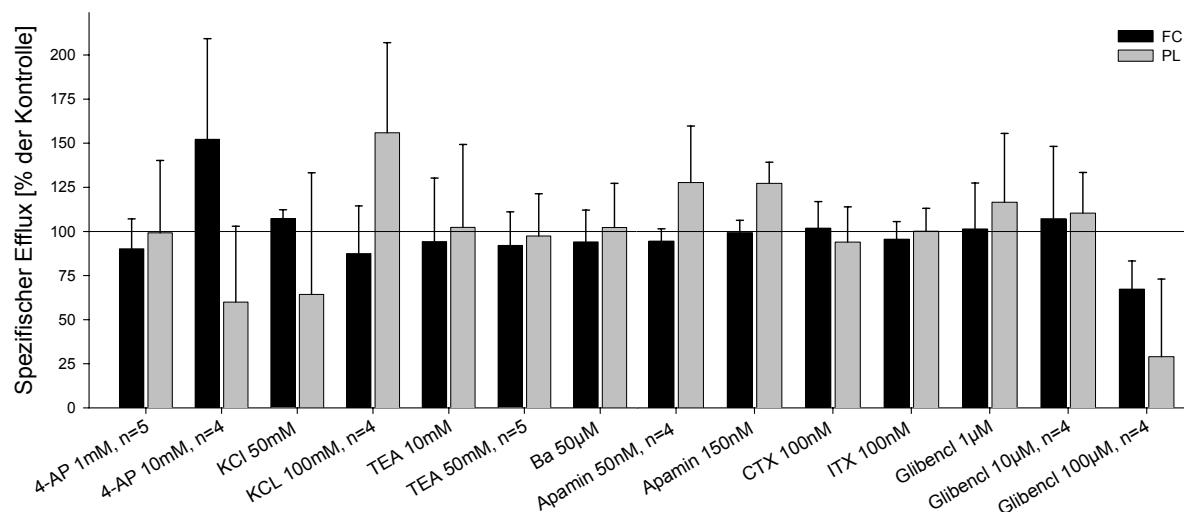


Abb. 29: Modulation des spezifischen Effluxes durch K^+ -Kanal-Inhibitoren(1) in Monozyten/Makrophagen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von drei bzw. der gegebenenfalls angegebenen Anzahl (n) an unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

4-AP (10 mM) zeigte in Makrophagen nur für PL eine Hemmung des spezifischen Effluxes, wohingegen es für Cholesterin sogar zu einem Anstieg auf 150 % der Kontrolle kam. Niedrigere Konzentrationen von 4-AP blieben ohne Effekte. Für KCl und Apamin ergaben sich ebenfalls diskrepante Ergebnisse im Lipidefflux; so hemmten KCl (50 mM) als auch Apamin (50 nM)

den PL-Efflux um ca. 60 % und 50 %, 100mM KCl jedoch stimulierte den Phospholipidefflux auf 150 %, während 150 nM Apamin den PL-Efflux auf 120 % der Kontrolle steigerte. Hinsichtlich des spezifischen Effluxes von FC blieben beide Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen ohne modulierenden Effekt. TEA zeigte wie auch Bariumchlorid (BaCl), CTX und ITX in Monozyten/Makrophagen keinen Effekt auf den Lipidefflux. Während Glibenclamid in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M kaum einen Einfluss auf den spezifischen Lipidefflux aufwies, zeigte sich bei einer Konzentration von 100 μ M ein Absenken des spezifischen Lipideffluxes auf 65 % (FC) sowie auf 32 % (PL) der jeweiligen Kontrollen.

Die unter 3.4.1.1 für Fibroblasten beschriebenen Effekte der GIRK-Inhibitoren konnten im Modell mit Monozyten/Makrophagen (Abb. 29) nur teilweise bestätigt werden.

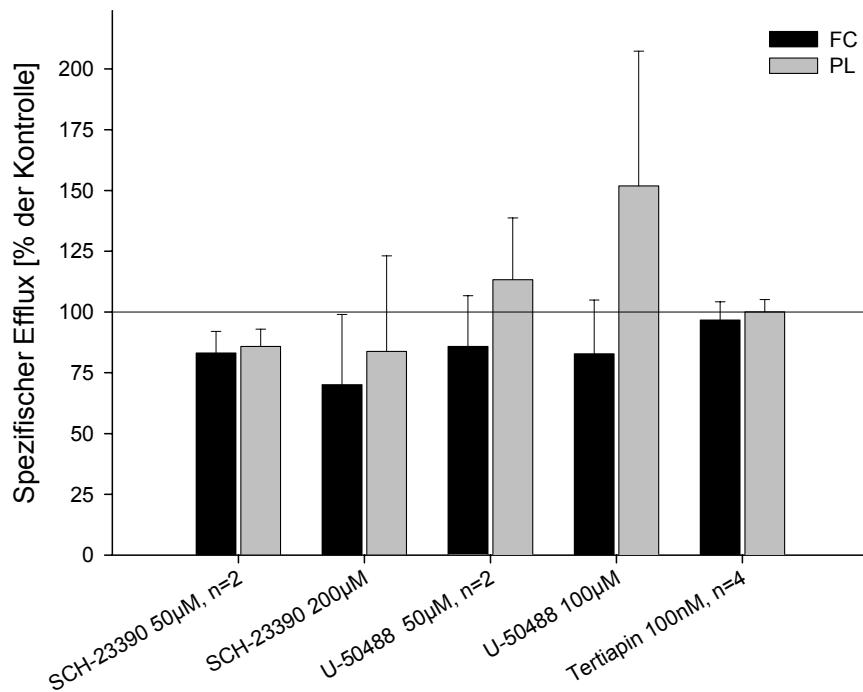


Abb. 30: Modulation des spezifischen Effluxes durch K^+ -Kanal-Inhibitoren (2) in Monozyten/Makrophagen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) von drei bzw. der gegebenenfalls angegebenen Anzahl (n) an unabhängigen Experimenten mit 3-fach Bestimmung.

SCH-23390 bewirkte in den angegebenen Konzentrationen ein leichtes Absenken des spezifischen Lipideffluxes, während U-50488 (100 μ M) den PL-Efflux auf ca. 150 % steigerte. Tertiapin zeigte wie bereits im Modell mit Fibroblasten (vgl. Abb. 27) auch an Monozyten/Makrophagen keinen modulierenden Einfluss auf den spezifischen Lipidefflux.

3.4.2 Modulation der zellulären Cholesterinkonzentration während der Entladungsphase

Bei der näheren Analyse des Lipideffluxes der K^+ -Kanal-Inhibitoren mit Hilfe der MS fielen die teilweise stark erniedrigten Werte für CE auf. So wurde nachfolgend die Veränderung des zellulären Cholesteringehaltes nach der 20-stündigen Effluxphase untersucht.

3.4.2.1 Fibroblasten

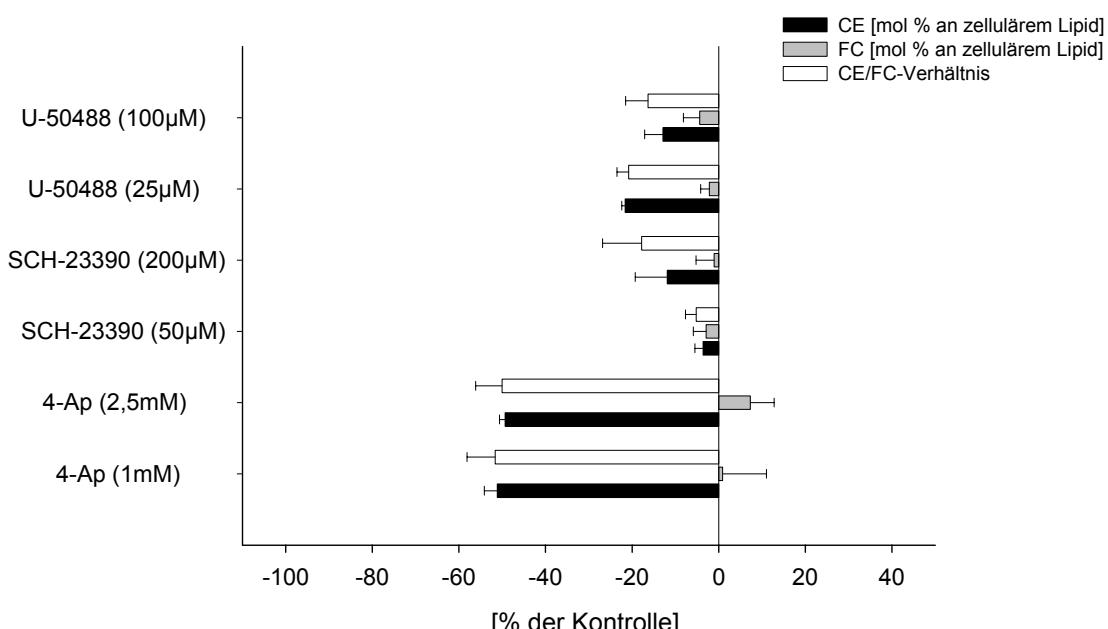


Abb. 31: Modulation des zellulären Lipidgehaltes während der Entladungsphase durch K^+ -Kanal-Inhibitoren in Fibroblasten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

Wie aus Abbildung 31 ersichtlich, führten alle in diesem Experiment eingesetzten Substanzen zu einer Abnahme des zellulären CE-Pools und damit

zu einer Reduktion des CE/FC-Verhältnisses; diese Effekte waren bei 4-AP (1 mM und 2,5 mM), welches auch wie unter 3.4.1.1 beschrieben im Lipidefflux in Fibroblasten den stärksten hemmenden Einfluss gezeigt hatte, mit mehr als -50 % am stärksten ausgeprägt. In beiden Konzentrationen kam es jeweils gleichzeitig zu einem leichten Anstieg an FC durch 4-AP.

Für die GIRK-Inhibitoren SCH-23390 und U-50488 ergab sich in den angegebenen Konzentrationen eine weniger deutliche Absenkung des CE-Gehaltes mit einer gleichzeitigen Reduktion von FC. Dabei war lediglich für SCH-23390 ein konzentrationsabhängiges Verhalten bezüglich des Cholesteringehaltes zu beobachten.

3.4.2.2 Monozyten/Makrophagen

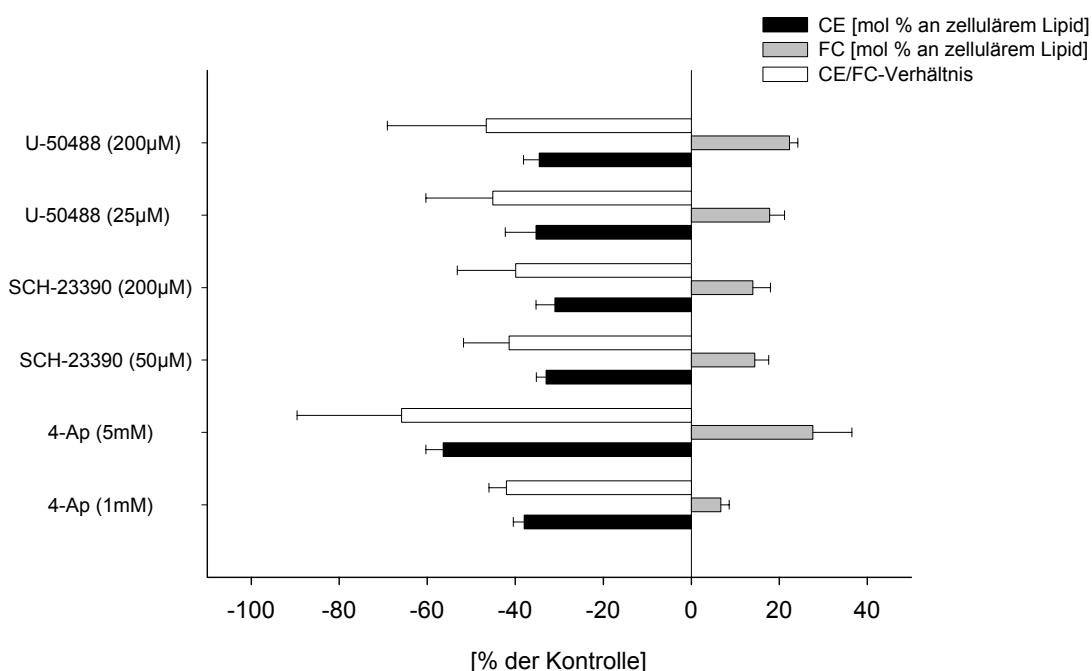


Abb. 32: Modulation des zellulären Lipidgehaltes während der Entladungsphase durch K⁺-Kanal-Inhibitoren in Monozyten/Makrophagen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

An der Variation der jeweiligen Dreifachwerte war die stärkere Schwankungsbreite der Makrophagen gegenüber dem Modell mit humanen Fibroblasten ersichtlich. Es zeigte sich auch hier in Monozyten/Makrophagen, welche bei einem CE/FC-Verhältnis von 0,9 einen bedeutend größeren Anteil

an CE bilden als Fibroblasten, eine durchgängige Reduktion des CE/FC-Verhältnisses; dieses beruhte auf einer verminderten Menge an CE sowie einem durchgängigen leichten Anstieg von FC (bis auf 25 %) gegenüber Kontrollzellen.

Für SCH-23390 (50 μ M und 200 μ M) sowie für U-50488 (25 μ M und 200 μ M) ergaben sich bei einer Reduktion des CE/FC-Verhältnisses um 35-40 % der Kontrolle in Abhängigkeit von der Konzentration kaum Unterschiede. 4-AP dagegen zeigte eine annähernd konzentrationsabhängige Absenkung des CE/FC-Verhältnisses auf ca. 65 % bei einer Konzentration von 5 mM.

3.4.3 Modulation zellulären Cholesterinkonzentrationen während der Beladungsphase

Nachdem sich in der 20-stündigen Entladungsphase schon deutliche Unterschiede bezüglich des zellulären Cholesteringehaltes ergeben hatten, wurde nachfolgend auch der Einfluss der K^+ -Kanal-Inhibitoren auf die dem Efflux vorangehende Beladungsphase untersucht. Hierzu wurden die Zellen während der Beladung für 24 Stunden mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert.

3.4.3.1 Fibroblasten

Unter dem Einfluss der eingesetzten K^+ -Kanal-Inhibitoren konnten die Fibroblasten weniger CE ausbilden, wodurch es zu einem deutlichen Absinken des CE/FC-Verhältnisses kam; 4-AP bewirkte schon bei 100 μ M eine Reduktion des CE-Pools um ca. 30 % bei einem gleichzeitigen Anstieg des freien Cholesterins auf knapp über 10 % der Kontrolle. Dieser Effekt war bei SCH-23390 und v. a. bei U-50488 im Vergleich zu den Efflux-Experimenten (siehe Abbildung 28) niedrigeren Konzentrationen mit einer Reduktion des CE-Gehaltes auf knapp 40 % (SCH-23390, 100 μ M) bzw. auf 60 % (U-50488, 50 μ M) der Kontrollen noch deutlicher ausgeprägt.

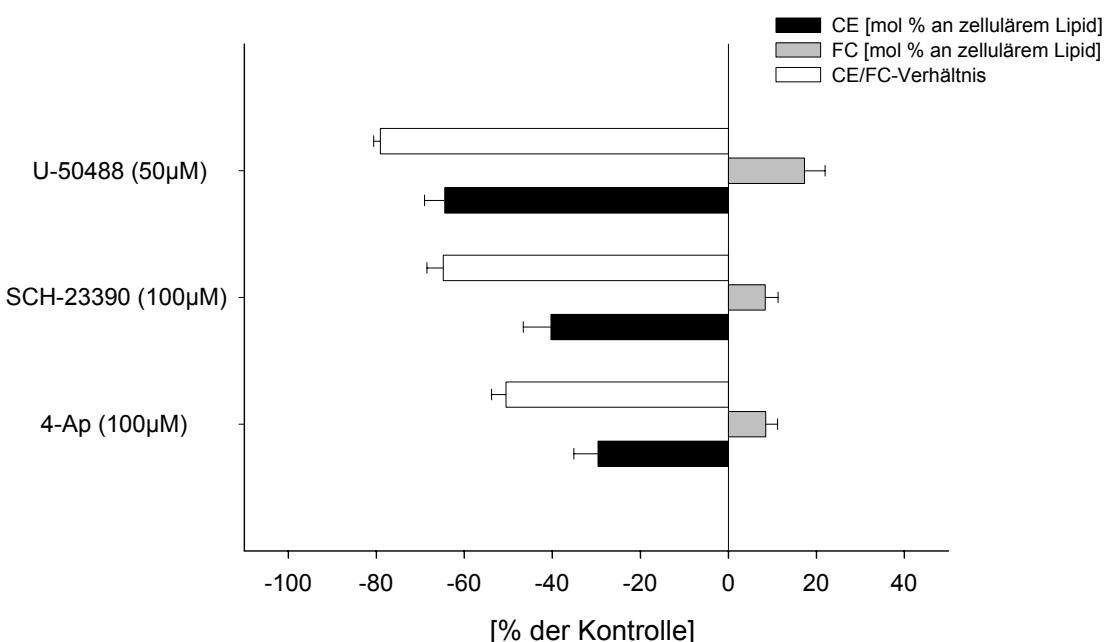


Abb. 33: Modulation des zellulären Lipidgehaltes durch K^+ -Kanal-Inhibitoren während der Beladungsphase in Fibroblasten. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

3.4.3.2 Monozyten/Makrophagen

Die in diesem Experiment eingesetzten Konzentrationen lagen im oberen Bereich der in der Literatur angegebenen. Die Monozyten/Makrophagen zeigten hierbei eine deutlich ausgeprägte Reduktion des CE-Pools und damit auch des CE/FC-Verhältnisses; ebenso kam es für die eingesetzten Substanzen zu einem Anstieg an unverestertem Cholesterin (FC) auf ca. 25 % der Kontrollen.

4-AP bewirkte während der 24-stündigen Beladungsphase ein konzentrationsabhängiges Abfallen des CE/FC-Verhältnisses um knapp 60 % (2,5 mM) bzw. 85 % (5 mM); das CE/FC-Verhältnis fiel bei der parallel zur Beladung durchgeföhrten Inkubation der Zellen mit den GIRK-Inhibitoren SCH-23390 (250 μ M) und U-50488 (200 μ M) um mehr als 80 % ab.

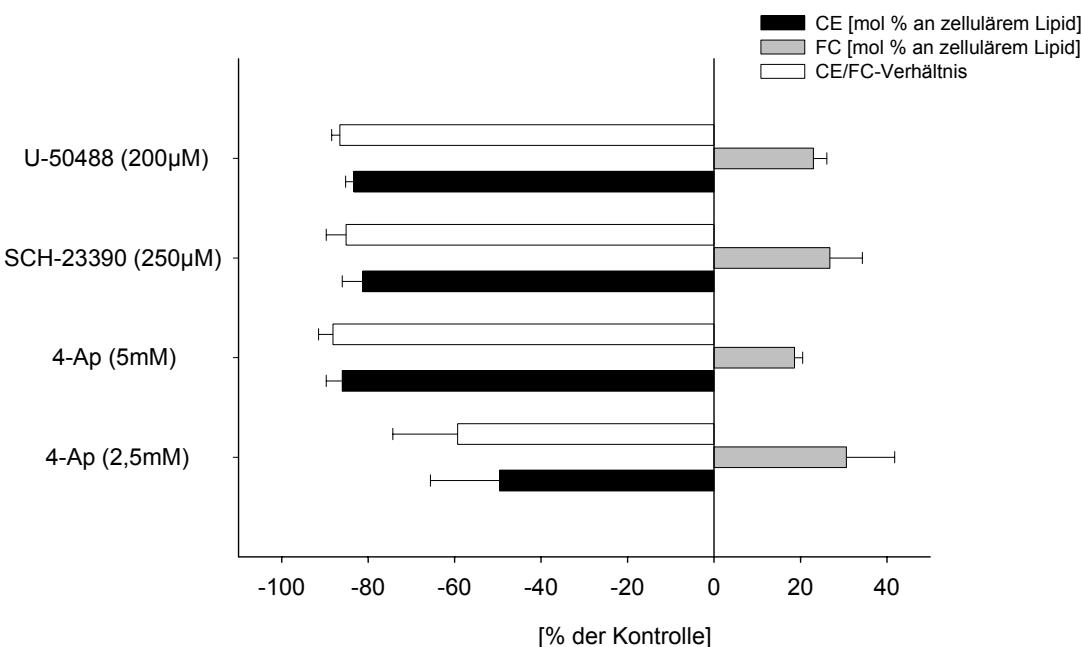


Abb. 34: Modulation zellulärer Lipidverhältnisse durch K^+ -Kanal-Inhibitoren während der Beladungsphase in Monozyten/Makrophagen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung

3.4.4 Vergleich von K^+ -Kanal-Inhibitoren mit dem ACAT-Inhibitor S-58035 im Lipidefflux-System

Die obigen Ergebnisse der Be- und Entladungsexperimente legten dar, dass die verwendeten K^+ -Kanal-Inhibitoren hinsichtlich der CE-Bildung ein Verhalten ähnlich einem ACAT-Inhibitor zeigten. Somit wurde in einem Experiment an Monozyten/Makrophagen der direkte Vergleich der K^+ -Kanal-Inhibitoren mit dem in der Literatur häufig verwendeten ACAT-Inhibitor S-58035 auf die Beladungs- und Effluxphase untersucht.

Der ACAT-Inhibitor S-58035 führte durch die Reduktion des CE-Pools um mehr als 40 % verbunden mit einem gleichzeitigen Anstieg von FC um knapp 40 % zu einem Absinken des CE/FC-Verhältnisses um ca. 60 % der Kontrollen. 4-AP zeigte diesbezüglich einen ähnlichen Effekt, welcher bei einem Anstieg von FC auf knapp 20 % zu einem noch ausgeprägteren Abfallen des CE/FC-Verhältnisses um ca. 75 % gegenüber den Kontrollzellen führte. Diese Verringerung des CE/FC-Verhältnisses zeigte sich durch die Inkubation mit den

GIRK-Inhibitoren SCH-23390 und U-50488 weniger deutlich. So führte SCH-23390 konzentrationsabhängig zu einem Absinken des CE/FC-Verhältnisses um ca. 15 % (100 μ M) und beinahe 40 % (200 μ M) gegenüber Kontrollen.

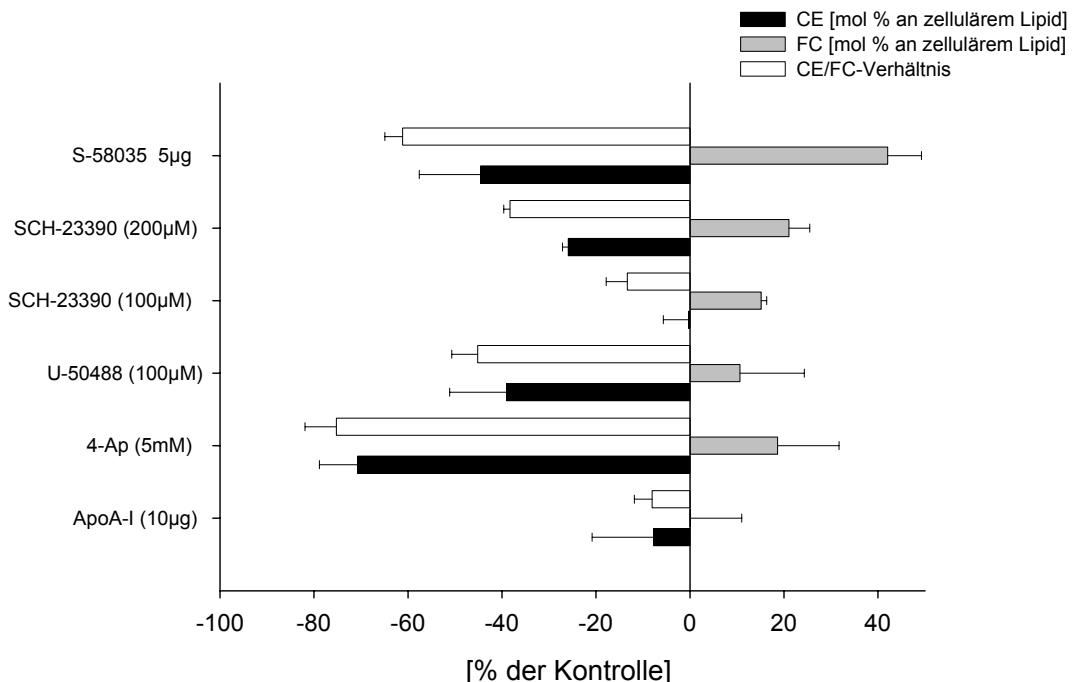


Abb. 35: Vergleich des Einflusses von K^+ -Kanal-Inhibitoren mit S-58035 auf die Beladung von Monozyten/Makrophagen. Die Makrophagen erhielten parallel zur 24-stündigen Inkubation mit 40 μ g/ml E-LDL die angegebene Menge/Konzentration der Substanz. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

U-50488 (100 μ M) verminderte das CE/FC-Verhältnis um ca. 45 %. ApoA-I, das zur Induktion des spezifischen Effluxes verwendet wird, bewirkte in diesem Beladungsansatz ein um 10 % verringertes CE/FC-Verhältnis gegenüber Kontrollzellen; dieses war lediglich auf die Reduktion des CE-Pools zurückzuführen, während der FC-Gehalt gegenüber den Kontrollzellen unverändert blieb.

In der Entladungsphase (Abb. 36) induzierte ApoA-I (10 μ g/ml) als Kontrolle einen spezifischen Efflux von 7,89 % (FC) und 5,31 % (PL). Dieser wurde durch die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit S-58035 (5 μ g), SCH-23390 (200 μ M), U-50488 (100 μ M) und dem Kaliumkanal-Öffner Pimarinsäure (PimA, 200 nM) nur unwesentlich moduliert. Durch eine 24-stündige Vorinkubation der Makrophagen mit diesen Substanzen, welche in der Beladungsphase

gleichzeitig mit E-LDL zugegeben worden waren, änderte sich der spezifische Efflux drastisch. So bewirkte der ACAT-Inhibitor S-58035 einen Anstieg des spezifischen Effluxes auf $138,7\% \pm 31,0\%$ für PL bzw. $305\% \pm 77,5\%$ für FC. Im Gegensatz zu S-58035 führte die Vorinkubation der Zellen mit den GIRK-Inhibitoren SCH-23390 und U-50488 zu einer geringfügigen Hemmung des spezifischen Lipideffluxes; diese wurde jedoch auch in einem vergleichbaren Ausmaß durch Inkubation der Schaumzellen in der Effluxphase mit den beiden GIRK-Inhibitoren erreicht.

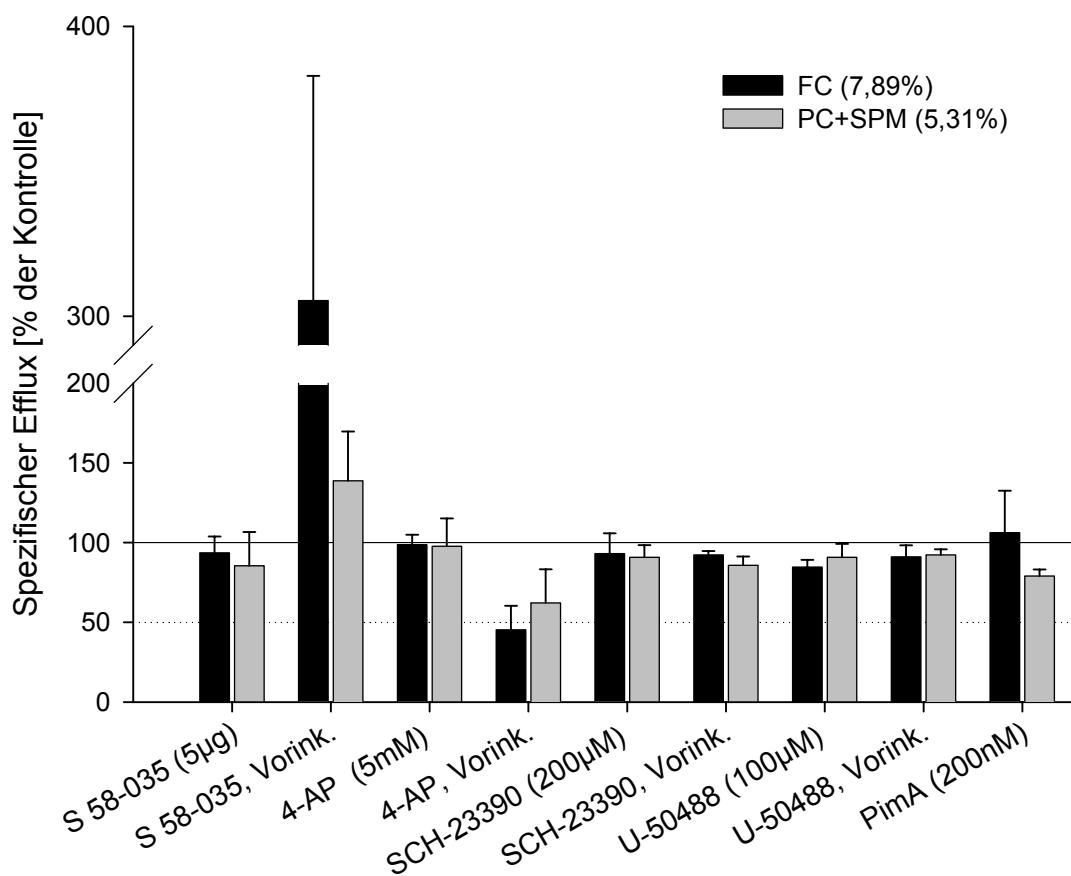


Abb. 36: Vergleich des Einflusses von K^+ -Kanal-Inhibitoren mit S-58035 auf den spezifischen Efflux in Monozyten/Makrophagen. Die mit „Vorink.“ gekennzeichneten Makrophagen wurden parallel zur 24-stündigen Beladungsphase mit $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ E-LDL mit der angegebenen Menge/Konzentration der Substanz inkubiert. Anschließend wurde die Effluxphase eingeleitet. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (SD) aus einem Experiment mit 3-fach Bestimmung.

Durch die Vorinkubation der Schaumzellen mit 4-AP (5 mM) war ein Abfallen des spezifischen Effluxes auf 45 % für FC sowie auf 62 % für PL der Kontrolle zu beobachten.

3.4.5 Einfluss von Modulatoren purinriger Rezeptoren auf den Lipidefflux

In der Literatur ist in verschiedenen Zellen eine Regulation von K⁺-Kanälen, insbesondere GIRK-Kanälen, durch purinerge Rezeptoren beschrieben (Luscher et al. 1997; Shankar et al. 2004). Nachfolgend wurde ein möglicher Einfluss von Modulatoren purinriger Rezeptoren auf den spezifischen Lipidefflux an Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen untersucht.

	[c]	Fibroblasten			Makrophagen		
		FC	PC	SPM	FC	PC	SPM
ATP (P2 Agonist)	10µM	11,8	31,5	28,7			
	100µM						
2-Me-S-ATP (P2 Agonist)	5µM	11,7	31,5	28,7			
	5µM	-20,5	5,8				
	10µM				5,1	-2,6	
	10µM				-10,2	-23,4	-19,4
Bz-ATP (P2X-Agonist)	50µM	-13,5	-10,7	-10,6	11,1	19,4	
	100µM				-47,6	-49,2	
ADP (P2Y-Agonist)	1µM				-46,5	-8,5	9,8
	10µM	-27,5	-30,1		-10,5	8,1	9,8
	100µM				-28,8	-16,7	-14,5
β-S-ADP (P2Y-Agonist)	10µM	-9,8	-0,2	-9,4	3,2	3,0	
2-Me-S-ADP (P2Y-Agonist)	10µM				-12,2	-18,2	
	10µM	39,2	29,6	13,6	-2,7	1,7	
Suramin (P2-Antagonist)	100µM	-58,1	-36,2	-43,8	-57,9	-43,5	-37,6
	100µM	-43,0	-58,5		-65,5	-16,6	-45,4
	200µM	-14,4	6,8	-10,0	-67,0	-46,8	-50,6
MRS-2179 (P2Y-Antagonist)	100µM	5,7	19,5	12,5	-32,2	36,3	-19,8
Clopidogrel (P2Y12 Antagonist)	0,3µM	-2,4	-5,3		-62,9	-73,8	-77,1
	0,3µM				-38,5	52,8	13,9
	1µM				-40,8	-44,5	-14,5
	1µM	1,2	2,7		-41,5	36,0	15,1
	3µM				12,7	-24,1	

Abb. 37: Einfluss von P2-Modulatoren auf den Lipidefflux in Fibroblasten und Monozyten/Makrophagen. Die hell-roten bzw. -grünen Felder bedeuten eine Hemmung (-) bzw. Steigerung des spezifischen Effluxes bis zu 50 % der Kontrolle; dunkel-rote bzw. -grüne Felder bedeuten eine Hemmung Steigerung bzw. Steigerung des spezifischen Effluxes um mehr als 50 % der Kontrolle.

Die unspezifischen Agonisten an P₂-Rezeptoren ATP und 2-Methyl-ATP zeigten in den angegebenen Konzentrationen uneinheitliche, relativ schwache

modulierende Eigenschaften. Dabei war weder durch P₂X- noch durch P₂Y-spezifische Liganden eine einheitliche Hemmung oder Steigerung des Lipideffluxes zu beobachten. Lediglich der unspezifische P₂-Antagonist Suramin zeigte eine deutliche und in Makrophagen auch konzentrationsabhängige Hemmung des Lipideffluxes.

Für MRS-2179, einen P₂-Y-Antagonisten mit einer gewissen Spezifität für P₂Y₁, ergaben sich sowohl in Monozyten/Makrophagen als auch in Fibroblasten teils stimulierende, teils hemmende Effekte. Clopidogrel, das in Plättchen über eine Hemmung von P₂Y₁₂ wirkt, zeigte bei einer Konzentration von 0,3 µM in Makrophagen stark hemmende Effekte auf den spezifischen Cholesterinefflux; jedoch scheint dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig zu sein und zeigte sich auch nicht für den PC- und SPM-Efflux.

4 Diskussion

4.1 Lipidefflux von Monozyten/Makrophagen und Fibroblasten

4.1.1 Etablierung eines Effluxsystems mit primären, humanen Monozyten

Mit der Identifizierung von ABCA1 als ursächlich defektem Gen in Patienten mit Tangier-Krankheit rückte zunehmend die Erforschung des damit verbundenen ApoA-I spezifischen Lipideffluxes in den Vordergrund. Das in der Literatur am häufigsten verwendete Zellsystem zur Untersuchung des Lipideffluxes stellen humane Fibroblasten dar (Bodzioch et al. 1999; Brooks-Wilson et al. 1999; Rust et al. 1999). Aus Hautstanzen gewonnene Fibroblasten sind weitgehend einfach zu kultivieren und über mehrere Passagen hinweg verfügbar, lassen sich aber nicht so stark mit Lipiden beladen wie Makrophagen. Dagegen werden Makrophagen als lipidbeladene Schaumzellen in atherosklerotischen Läsionen gefunden, womit von freiwilligen Spendern durch Elutriation gewonnene Monozyten/Makrophagen das Zellsystem darstellen, welches den physiologischen Vorgängen am nächsten kommt.

Am Institut existierten bereits Vorarbeiten mit 150.000 pro 6-Lochplatte ausgesäten Monozyten, welche mit 5 µg/ml E-LDL beladen wurden; da dies immer wieder zu stark schwankenden und damit unbefriedigenden Ergebnissen führte, wurde dieses System hinsichtlich der Anzahl an ausgesäten Monozyten sowie der Menge an E-LDL optimiert. Im Gegensatz zu Ox-LDL bewirkt E-LDL eine ausgeprägtere Transformation der Makrophagen zu Schaumzellen (Kapinsky et al. 2001). Durch Variation der Anzahl an ausgesäten Monozyten sowie der Menge an E-LDL wurden die für einen möglichst hohen spezifischen Lipidefflux optimalen Bedingungen herausgearbeitet. Hierbei konnte mit 750.000 ausgesäten Monozyten nach einer Beladung mit 40 µg/ml E-LDL für 24 Stunden ein spezifischer Lipidefflux von 3-4 % für Cholesterin und 4-5 % für Phospholipide erreicht werden. Mit der Inkubation von Monozyten verschiedener Spender mit E-LDL eines Plasmaspenders sowie der Inkubation von Monozyten eines Spenders mit E-LDL verschiedener Plasmaspender

konnte gezeigt werden, dass die dabei auftretenden Schwankungen durch die individuell unterschiedlichen Spender sowohl von Monozyten als auch von Plasma/E-LDL zu erklären sind. Dies kann zum Teil als Erklärung für Abweichungen zu den in der Literatur beschriebenen Werten für den Lipidefflux herangezogen werden. Ferner dienen die Unterschiede zwischen verschiedenen Monozyten- und Plasmaspendern auch als Begründung für die in Monozyten/Makrophagen beobachteten hohen Standardabweichungen in der Modulation des spezifischen Effluxes im Vergleich von mehreren Experimenten.

Die überwiegende Anzahl der Experimente zum Lipidefflux wird mit murinen Makrophagen wie J774, peritonealen Makrophagen der Maus oder aber mit der humanen Makrophagen-Zelllinie THP1 durchgeführt; die dabei verwendeten Makrophagen verhalten sich aber im Vergleich zu primären humanen Monozyten/Makrophagen stark unterschiedlich hinsichtlich des Lipideffluxes sowie dessen Regulation (Kiss et al. 2005).

Ferner verwenden die wenigen mit primären humanen Monozyten agierenden Arbeitsgruppen (Brown et al. 2000; Cullen et al. 1997; Langer et al. 2002; Wong et al. 2004) unterschiedliche Protokolle zur Beladung sowie zur Entladung, wodurch sich auch unterschiedliche und nur bedingt vergleichbare Angaben zum Lipidefflux ergeben; so findet man in Veröffentlichungen zum Lipidefflux teilweise nur Angaben zum Lipidgehalt in Zellen und Medien (Langer et al. 2002) oder es wird der Wert für den spezifischen Lipidefflux nicht angegeben (Kiss et al. 2005). In einer Arbeit von Wong et al. mit aus „Buffy-Coats“ isolierten Monozyten, welche mit ethanolischer Cholesterinlösung beladen wurden, wird ein basaler Efflux von ca. 6,5 % sowie ein ApoA-I induzierter Efflux von ca. 9 % angegeben (Wong et al. 2004). Diese Gruppe verwendete 25 µg/ml ApoA-I mit 0,1 % BSA im Effluxmedium; dadurch erscheint ein niedriger Wert von 2,5 % für den spezifischen Efflux plausibel, da wie unter 3.1.2 beschrieben, auch im Rahmen dieser Dissertation ein hemmender Effekt von BSA auf den spezifischen Efflux von Schaumzellen gezeigt werden konnte. Ferner wurde der basale Cholesterinefflux ohne einen Lipidakzeptor im Entladungsmedium mit ca. 12 % nach 24 Stunden beschrieben (Rodriguez et al. 2002), welcher sich nach 48 Stunden auf knapp 40 % erhöhte; wie auch von

Zhang et al. beschrieben, korreliert der basale Efflux dabei mit der sezernierten Menge an ApoE (Zhang et al. 1996) und stellt somit einen bedeutenden Anteil am Gesamtefflux dar. Ebenfalls sehr hohe Werte für den basalen Efflux (8-10 %) von primären, humanen Makrophagen finden sich in einer vor kurzem erschienenen Publikation (Cignarella et al. 2005).

4.1.2 Massenspektrometrische Charakterisierung des Lipideffluxes

Wie eingangs beschrieben, finden sich in der Literatur zum Lipidefflux mehrere quantitative Aussagen, jedoch wird nur wenig zur Art der nach außen transportierten Lipide angegeben. Lediglich für zelluläre Lipide finden sich Angaben in der Literatur (vgl. unten). Eine MS-basierte Analytik des Lipideffluxes ist, wie unter 3.3.1 gezeigt, hinsichtlich der Quantität gut mit den Ergebnissen mit radioaktivem Label vergleichbar. Sie ermöglicht darüber hinaus nicht nur eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Lipidspezies, sondern gibt darüber hinaus auch Einblicke in die Speziesprofile der jeweiligen Lipide. Dabei ist anzumerken, dass mit Hilfe der verwendeten MS-Analytik die in Schaumzellen beschriebenen hydroxylierten FC/CE-Spezies nicht mit erfasst wurden: Für diese Oxysterole konnte gezeigt werden, dass sie v. a. basal (ohne ApoA-I) mit teilweise mehr als 75 % in größerem Umfang nach außen transportiert werden als auf Stimulation durch ApoA-I oder HDL₃ (Westman et al. 1998); auf diesem Weg extrahepatisch gebildete hydroxylierte Cholesterinspezies nehmen dabei ungefähr einen Anteil von 4 % der im menschlichen Körper produzierten Gallensäuren ein (Lund et al. 1996). Eine Erweiterung der bestehenden Quantifizierung auf hydroxylierte Cholersterinspezies würde eine sinnvolle Ergänzung darstellen und könnte damit deren Anteil am Lipidefflux aufzeigen.

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Quantifizierung konnte in den Medien beider Zellmodelle nach Stimulation durch ApoA-I ein spezifischer Efflux von PC, SPM und FC beobachtet werden. Ferner wurden zwar von beiden Zelltypen basal auch PS, PE und LPC nach außen transportiert, jedoch ließ sich deren Menge nicht durch eine Zugabe von ApoA-I erhöhen. Darüberhinaus wurden die grundlegenden Unterschiede von Schaumzellen und beladenen

Fibroblasten sowohl im Lipidmuster von Zellen und Medien als auch im jeweiligen Speziesprofil von PC, SPM und Cholesterin aufgezeigt: So stellten sich Fibroblasten als ein Zellsystem mit einem PL/TC-Verhältnis von 0,5 in Zellen sowie von 0,9 im Effluxmedium dar, welches im Vergleich zu Monozyten/Makrophagen bedeutend weniger CE bildete (FC/CE-Verhältnis: 6,2). PC 34:1 (ca. 25 %), SPM 16:0 (ca. 50 %) sowie CE 16:0 (ca. 40 %) wurden dabei in cholesterinbeladenen Fibroblasten als stark dominierende Hauptspezies detektiert. Basale Medien von Fibroblasten enthielten ferner zu ca. 30 % LPC, welches in basalen Medien (ohne BSA) von Schaumzellen nicht detektiert werden konnte. Dadurch erscheint ein LPC-bindender Effekt von BSA wahrscheinlich; da ferner die Zugabe von BSA zum Entladungsmedium im Modell mit Monozyten/Makrophagen einen hemmenden Einfluss auf den spezifischen Lipidefflux gezeigt hatte (vgl. 3.1.2), könnte überlegt werden, den Anteil von BSA auch im Entladungsmedium von Fibroblasten zu reduzieren.

Im Gegensatz zu Fibroblasten wiesen Schaumzellen einen ca. zweifachen Überschuss von Cholesterin gegenüber Phospholipiden (PL/TC: 0,6 in Zellen und 0,4 in Medien) auf, wobei jeweils doppelt soviel PC als SPM sowie auch FC als CE vorlagen. Dabei kam es auch mit einer Beladung von 40 µg/ml E-LDL zu ausgewogeneren Speziesprofilen für PC, SPM und CE als in Fibroblasten; zusätzlich zu PC 34:1 waren auch PC 34:2 und 36:3 zu gleichen Anteilen als Hauptspezies in Schaumzellen vorhanden, wobei jedoch etwas höhere Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten zu beobachten waren. Zwar bildete SPM 16:0 mit einem Anteil von gut 40 % auch im Modell mit Monozyten/Makrophagen die Hauptspezies, jedoch wiesen hier Dihydro-SPM 16:0 sowie SPM 24:1 einen bedeutend höheren Anteil von ca. 20 % auf als in cholesterinbeladenen Fibroblasten. Ferner waren in Monozyten/Makrophagen CE 18:2 und CE 18:1 die Hauptspezies der Cholesterinester, während CE 16:1 mit knapp 15 % nur den viertgrößten Anteil darstellte.

Diese Ergebnisse stehen dabei nur teilweise im Einklang mit den wenigen vergleichbaren Daten aus der Literatur: So zeigten mit Cholesterin beladene Fibroblasten unter Zusatz eines ACAT-Inhibitors ein relativ hohes PC/FC-Verhältnis von 1, wiesen aber auch PC 34:1 sowie SPM 16:0 als Hauptspezies

der entsprechende Lipide aus (Blom et al. 2001). Dies könnte durch eine in diesem Versuchsansatz über freies Cholesterin gesteigerte PC-Biosynthese (Shiratori et al. 1994) erklärt werden, zumal auch in anderen Zelllinien durch die Zugabe eines ACAT-Inhibitors ein höheres PC/FC-Verhältnis gefunden wurde (Tabas et al. 1996).

Für Effluxmedien von Fibroblasten wurde durch Dünnschichtchromatographie ein PC/FC-Verhältnis von 0,4 bei einem 4,5-fachen Überschuss von PC gegenüber SPM in mit Cholesterin beladenen Fibroblasten gefunden (Gillotte-Taylor et al. 2002), was sehr gut mit den unter 3.3.2 gezeigten Ergebnissen übereinstimmt. In einer anderen Arbeit dagegen wurden für humane Makrophagen CE 16:0 und CE 20:4 als Hauptspezies beschrieben, während CE 18:1 und CE 18:2 in weitaus geringeren Konzentrationen gemessen wurden (Cullen et al. 1997); eine Erklärung dafür könnte die unterschiedliche Beladung mit 80 µg/ml Ac-LDL unter Verwendung von BSA-haltigem Medium sein. So stellt neben den zellspezifischen Unterschieden auch die Art der Beladung einen grundlegenden Unterschied zwischen den in der vorliegenden Dissertation verwendeten Zellmodellen dar. Dies äußerte sich im dargestellten, unterschiedlichen prozentualen Anteil der einzelnen Spezies von CE, PC und SPM zwischen Schaumzellen und Fibroblasten, und war auch in Medien zu beobachten. Darüber hinaus zeigte sich in beiden Zellmodellen für einfach ungesättigte PC-Spezies, insbesondere für die PC-Hauptspezies PC 34:1, in ApoA-I spezifischen Medien ein deutlich höherer prozentualer Anteil als in basalen Medien. Durch die Verwendung von deuteriertem Cholin wurde ferner eine massenspektrometrisch basierte Bestimmung des HDL₃ spezifischen Effluxes unter Einbeziehung der einzelnen PC- und SPM-Spezies in Monozyten/Makrophagen aufgezeigt. Während sich für die D₉-PC-Spezies im HDL₃ spezifischen Efflux ein im Vergleich zum ApoA-I spezifischen Efflux stark unterschiedliches und uneinheitliches Bild darstellte, ergab sich für die Spezies D₉-SPM 14:0 eine vierfache sowie für D₉-SPM 16:1 sogar eine sechsfache Erhöhung des HDL₃ spezifischen Effluxes. Insgesamt wurde durch Verwendung von deuteriertem Cholin der ApoA-I spezifische Efflux von einfach ungesättigten PC-Spezies mit der Hauptspezies PC 34:1 sowie der erniedrigte ApoA-I

spezifische Efflux von mehrfach ungesättigten PC-Spezies bestätigt; für die übrigen deuterierten als auch nicht deuterierten PC- und SPM-Spezies dagegen ließen sich weder bezüglich des ApoA-I spezifischen Effluxes noch bezüglich des HDL₃ spezifischen Effluxes einheitliche Zuordnungen treffen. Somit könnte man lediglich für PC 34:1 von einem präferentiellen Efflux durch ABCA1 ausgehen. Passend dazu wurde sowohl in Schaumzellen als v. a. auch in Fibroblasten ein signifikant erhöhter Anteil ungesättigter PC-Spezies in Membranmikrodomänen beschrieben, die in den Lipidefflux involviert sind (Drobnik et al. 2002).

Durch die zusätzliche Beladung der Zellen mit ¹³C₃-Cholesterin wurde auch eine massenspektrometrische Quantifizierung von Cholesterin in Zellen und Medien während der Entladungsphase mit HDL₃ ermöglicht. Dabei konnte in Fibroblasten vor allem für ¹²CE 18:2 eine Zunahme des prozentualen Anteils am zellulären ¹²CE-Pool von 5 % auf 15 % (bei einem Anstieg von 0,4 nmol/mg auf ca. 1 nmol/mg) beobachtet werden. Für die weiteren Spezies ¹²CE 16:0, 18:1 und 18:0 dagegen zeigte sich durch ApoA-I und HDL₃ eine weitgehende Entladung, wobei diese für ¹²CE 16:0 sowie 18:0 mit HDL₃ stärker ausgeprägt war als mit ApoA-I und sich nur für ¹²CE 18:1 in gleichem Ausmaß für ApoA-I und HDL₃ darstellte. Dagegen kam es für alle ¹³C₃-markierten CE durch HDL₃ im Zuge der Effluxphase zu einer stärkeren Reduktion als durch ApoA-I.

Bei der Entladung von Schaumzellen konnte ferner ein geringer Anteil an ¹³C-CE im Effluxmedium detektiert werden; dieser betrug im basalen Medium ca. 0,3 nmol/mg und steigerte sich mit ApoA-I auf 0,6 nmol/mg sowie mit HDL₃ auf 2,2 nmol/mg. Dabei zeigte sich gegenüber dem zellulären Anteil bei der Entladung in den spezifischen Medien mit ApoA-I v. a. eine Anreicherung von ¹³C-CE 16:0 und 16:1, während es bei der Entladung mit HDL₃ zu einem starken Anstieg von ¹³C-CE 18:2 kam. Da sich LCAT an HDL₃ (Glomset 1968) assoziiert findet, sind die hohen Werte für ¹³C-CE in HDL₃-Medien zu erklären und stehen im Einklang mit den in den Effluxmedien gemessenen erhöhten Werten für LPC sowie für die in HDL₃ zu ca. 50 % natürlich vorkommenden ¹²CE 18:2. Wie auch unter 3.2.3.1 für ¹²CE angeführt, betrug der Anteil der CE ca. 20 % am Gesamtlipid des basalen Effluxmedium. Im Gegensatz zu

Schaumzellen wurden in Fibroblasten keine CE im spezifischen Effluxmedium gefunden. Dafür können folgende Erklärungen in Betracht gezogen werden: Makrophagen besitzen im Gegensatz zu Fibroblasten zusätzlich die Möglichkeit, Apolipoproteine zu produzieren und nachfolgend zu sezernieren. So konnte in Makrophagen auch für ApoE eine Stimulation des FC-Effluxes gezeigt werden (Zhang et al. 1996), wobei dafür ein thermodynamisch begünstigter „Mikrosolubilisations-Prozess“ vorgeschlagen wurde. Über einen Efflux von CE dagegen ist wenig bekannt, jedoch wurde in Medien von Liposarkom-Zellen ein durch ApoE induzierter Efflux von CE beschrieben (Vassiliou et al. 2004). Von den Autoren wurde dabei eine Beteiligung von ABCA-1 vorgeschlagen, für welchen zudem auch eine den Efflux erhöhende Interaktion mit ApoE gezeigt worden war (Remaley et al. 2001). Da in Makrophagen ferner für ApoA-I eine Stimulation der ApoE-Sekretion beschrieben wurde (Kockx et al. 2004), scheint ein Beitrag von ApoE zum Gesamtefflux in Monozyten/Makrophagen naheliegend.

4.2 Einfluss von Sphingolipiden auf den Lipidefflux und Rolle der PKC

4.2.1 Modulation des spezifischen Lipideffluxes durch Sphingolipide

Sphingomyelin und dessen Metabolite Ceramid, Sphingosin (Sph) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) sind als bioaktive Moleküle beschrieben, welchen eine signifikante Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen zukommt (Levade et al. 2001). So akkumulieren Glykosyl- und Laktosylceramide in atherosklerotischen Plaques und stimulieren zudem die Proliferation von glatten Muskelzellen (Chatterjee et al. 1997); für modifizierte LDL (Auge et al. 1998) sowie für verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine (Coroneos et al. 1995) konnte eine aktivierende Wirkung auf den Sphingomyelin-Zyklus mit der Bildung von verschiedenen Sphingolipid-Metaboliten gezeigt werden. Des Weiteren wurde für Ceramid und Sphingosin ein Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptose (Coroneos et al. 1995; Hisano et al. 1999; Ohta et al. 1995; Spiegel et al. 1996) sowie auf die Zelladhäsion, Migration, den Gefäßtonus und Ionenströme beschrieben (Levade et al. 2001). Für Sphingosin, das vielfach als PKC-Inhibitor ($IC_{50}=10 \mu M$) eingesetzt wird, konnte wie auch für andere PKC-Inhibitoren bereits ein hemmender Effekt auf den Efflux gezeigt werden (Li et al. 1995; Mendez et al. 1991).

Der endogen durch Sphingosinkinase (SpK) gebildete Metabolit S1P führte bei der Inkubation mit Fibroblasten und Schaumzellen zu einer Hemmung des spezifischen Lipideffluxes auf ca. 70 % der Kontrollen. In einem ähnlichen Ausmaß bewirkte auch DMS, ein Inhibitor der SpK, eine Hemmung des spezifischen Lipideffluxes. Somit scheint der hemmende Effekt hauptsächlich durch Sph zu Stande zu kommen, wenngleich ein von der SpK-Hemmung unabhängiger Effekt auf den spezifischen Lipidefflux durch DMS bzw. durch S1P nicht ausgeschlossen werden kann. Auch der in Fibroblasten beobachtete hemmende Effekt von Ceramid, aus welchem endogen durch Ceramidase ebenfalls Sph gebildet werden kann, spricht für eine inhibitorische Wirkung von Sph auf PKC.

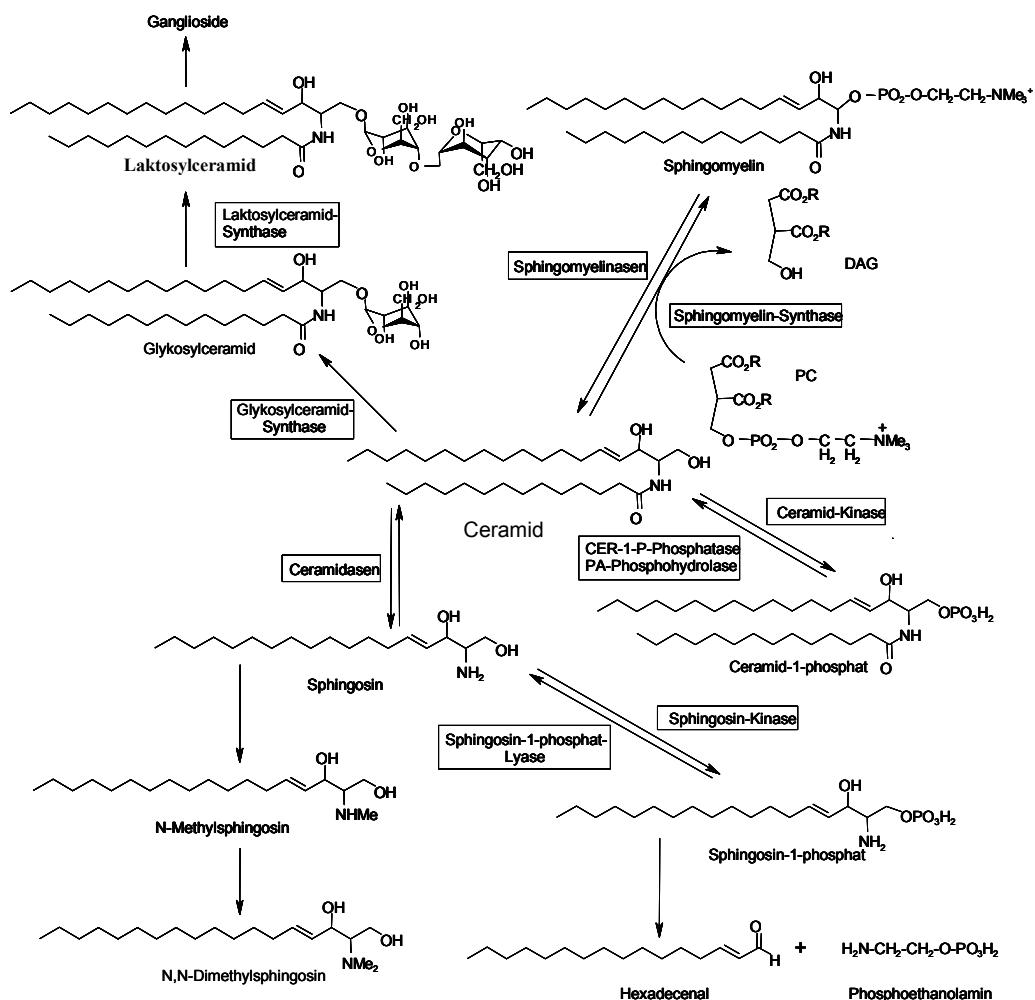


Abb. 38: Ceramid-Metabolismus

Passend zu diesen Ergebnissen konnte für Cer auch eine Aktivierung einer durch Calpain vermittelten Proteolyse der PKC (Tanabe et al. 1998) gezeigt werden; da auch ABCA1 durch Calpain degradiert wird, kann Cer somit von zwei Seiten inhibitorisch auf den Lipidefflux einwirken.

Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch in Monozyten/Makrophagen für Ceramid im Bereich von 3 μ M bis 30 μ M eine konzentrationsabhängige Stimulation des spezifischen Lipideffluxes; dies wurde zusammen mit einer gesteigerten Expression von ABCA1 an der Zelloberfläche von CHO-Zellen beschrieben (Witting et al. 2003), wobei in dieser Arbeit für Cer lediglich eine Stimulation des Cholesterineffluxes zu ApoA-I gezeigt wurde, ohne dabei auf den basalen Efflux

von Cer einzugehen. Da ABCA1 in den beiden unterschiedlichen Zelltypen in verschiedenen Membranmikrodomänen vorkommt (Drobnik et al. 2002), könnte man für Cer in Monozyten/Makrophagen auf einen zusätzlichen, dem Sph übergeordneten Effekt auf den Lipidefflux schließen.

Im Gegensatz zur PKC-Hemmung durch Sph ist für Cer auch eine stimulierende Wirkung auf bestimmte PKC-Isoformen beschrieben (Huwiler et al. 2000). Ferner entsteht bei Umsetzung von Cer zu SPM mittels Sphingomyelin-Synthase Diacylglycerol (DAG), ein Aktivator der PKC. DAG könnte somit zur Stimulation des Lipideffluxes führen, was mit den gefundenen Daten in Schaumzellen übereinstimmt. Ebenso könnte die stimulierende Wirkung von Cer auf den Lipidefflux auch mit einer bereits in CHO-Zellen beschriebenen Hemmung der ACAT (Ridgway 1995) in Verbindung gebracht werden, welche nachfolgend zu einem gesteigerten Efflux aus einem durch die ACAT-Hemmung erhöhten Pool an FC führt. Denkbar wäre aber auch eine durch Ceramid induzierte Aktivierung der Adenylatcyclase (Bosel et al. 1998), welche über eine Erhöhung von cAMP mit Aktivierung der PKA eine Steigerung des Lipideffluxes bewirkt (Kiss et al. 2005).

Somit scheint die Wirkung von Sphingolipiden auf den spezifischen Lipidefflux weiterhin unklar. Aufgrund der in der Arbeit dargestellten Daten könnte man sich eine Aufsummierung der Effekte von Cer und Sph mit einem in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedlichen Ceramid-Metabolismus vorstellen. So käme es durch Zugabe von Cer in Fibroblasten mittels Ceramidasen verstärkt zur Bildung von Sph, welches wiederum über eine Inhibierung der PKC den Lipidefflux hemmt. Im Gegensatz dazu würde es in Schaumzellen zu keiner raschen Ceramidspaltung kommen und damit die stimulierende Wirkung von Cer auf den spezifischen Lipidefflux im Vordergrund stehen.

4.2.2 Modulation der PKC-Expression

Für beide Zellmodelle wurde mit PKC β_I , β_{II} , ζ und δ ein ähnliches Expressionsmuster der PKC-Isoformen dargelegt, wobei zusätzlich in Fibroblasten PKC ϵ exprimiert wurde. Die in humanen Monozyten darüber hinaus beschriebenen PKC-Isoformen α , μ , ϵ und η (Monick et al. 1998) konnten

unter Verwendung gleicher Primärantikörper wie in der angegebenen Publikation nicht gefunden werden. Ferner konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation weder in Fibroblasten noch in Monozyten/Makrophagen eine präferentielle membrangebundene Lokalisation festgestellt werden, so dass man auch nicht von einer Aktivierung der PKC bzw. einer bestimmten Isoform während der Effluxphase mit ApoA-I ausgehen kann. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass neben der membrangebundenen Form auch andere aktivierte Formen für PKC gefunden wurden (Steinberg 2004). Während die in den Experimenten zum spezifischen Lipidefflux (vgl. 3.3.1) eingesetzten Sphingolipide nur einen geringen Einfluss auf die Expression der PKC-Isoformen in der Effluxphase zeigten, wurde durch PMA in beiden Zellmodellen eine starke Downregulation der am höchsten exprimierten Isoformen erreicht. Da diese Downregulation mit einem Absinken des spezifischen Lipideffluxes durch PMA auf ca. 50 % der Kontrollen verbunden war, kann man davon ausgehen, dass die Lipidefflux-Prozesse eng mit dem Vorhandensein einer ausreichenden Menge an PKC verknüpft sind.

Zusammenfassend konnte ein Einfluss von Sphingolipiden auf die Regulation des spezifischen Lipideffluxes gezeigt werden, wobei neben einer überwiegend hemmenden Wirkung der Sphingolipide jedoch für Ceramid ein zelltypspezifisches Verhalten zu beobachten war. Lediglich für PMA konnte die Hemmung des spezifischen Lipideffluxes mit einer gleichzeitigen Downregulation der am stärksten exprimierten PKC-Isoformen in Verbindung gebracht werden. Dieses Verhalten war jedoch für keines der verwendeten Sphingolipide zu beobachten. Mit den dargestellten Ergebnissen kann somit nicht geklärt werden, ob die hemmende Wirkung auf den spezifischen Lipidefflux auf einer Inhibition von PKC oder anderen Effekten der Sphingolipide beruht. Ob die hemmende Wirkung auf den Lipidefflux durch eine bestimmte PKC-Isoform vermittelt wird, könnte eventuell durch Experimente mit siRNA für die jeweiligen Isoformen geklärt werden.

4.3 Einfluss von K⁺-Kanal-Inhibitoren auf den Lipidefflux

4.3.1 Modulation des spezifischen Lipideffluxes

In Analogie zum Sulfonylharnstoff-Rezeptor (SUR) der ABC-Transporterfamilie wurde in der vorliegenden Dissertation zuerst der Einfluss von verschiedenen K⁺-Kanal-Inhibitoren auf den für ABCA1 charakteristischen, ApoA-I spezifischen Lipidefflux untersucht. Dabei zeigte lediglich Glibenclamid, als Inhibitor von ATP-sensitiven K⁺-Kanälen, in höheren Konzentrationen (100 µM) sowohl in Fibroblasten als auch in Monozyten/Makrophagen eine einheitliche Hemmung des spezifischen Lipideffluxes um ca. 50 %. Die konzentrationsabhängige Hemmung des Lipideffluxes durch Glibenclamid (1 - 1000 µM) wurde schon von mehreren Gruppen beschrieben (Favari et al. 2004; Fielding et al. 2000; Nieland et al. 2004). Dagegen konnte für Glibenclamid in verschiedenen Zellen aber auch eine Stimulation der PKC-Aktivität (Cooper et al. 1990; Davidson et al. 1991; Farese et al. 1991) dargelegt werden, welche eine Stimulation des Effluxes erwarten ließe. 4-AP und TEA, beides unspezifische Inhibitoren von K⁺-Kanälen, zeigten nur in Fibroblasten eine konzentrationsabhängige Hemmung des Lipideffluxes; dagegen zeigte sich für diese beiden Substanzen in Monozyten/Makrophagen ein stark schwankendes Bild mit teilweise stimulierendem Einfluss auf den spezifischen Efflux. Die anderen eingesetzten K⁺-Kanal-Inhibitoren Apamin, Charybdotoxin und Iberiotoxin wiesen ebenso wie das als GIRK-4-spezifischer Inhibitor beschriebene Tertiapin (Jein et al. 1998) keinen modulierenden Effekt auf den Lipidefflux auf. Die unspezifischen GIRK-Inhibitoren SCH-23390 (200 µM) und U-50488 (100 µM) zeigten hingegen wieder nur in Fibroblasten eine Hemmung des spezifischen Lipideffluxes auf ca. 60 % der Kontrollen, während sich in Schaumzellen ein uneinheitliches Bild mit teilweise sogar stimulierenden Effekten darstellte. Aus diesen Untersuchungen auf den spezifischen Lipidefflux lässt sich auf eine stärker ausgeprägte hemmende Wirkung von K⁺-Kanal-Inhibitoren in Fibroblasten schließen als in Monozyten/Makrophagen. Dabei ist anzumerken, dass sich die Effekte teilweise erst bei sehr hohen Inhibitor-Konzentrationen zeigten, diese sind jedoch auch in ähnlicher Weise in der Literatur zu finden (Qiu et al. 2002; Shankar et al. 2004).

Wie schon im Verhalten der Sphingolipide zu beobachten war, zeigten sich auch mit K⁺-Kanal-Inhibitoren im Modell mit Monozyten/Makrophagen deutlich höhere Schwankungen in der Modulation des spezifischen Lipideffluxes als mit Fibroblasten.

4.3.2 Modulation des zellulären Cholesteringehaltes

Deutlichere und einheitlichere Effekte zwischen Fibroblasten und Schaumzellen zeigten sich im Einfluss der K⁺-Kanal-Inhibitoren auf die zellulären Konzentrationen an FC und CE. In beiden Zellmodellen konnte sowohl während der Beladungs- als auch der Effluxphase durch Zugabe von 4-AP, SCH-23390 und U-50488 eine deutlich geringere Menge an Cholesterinestern (teilweise weniger als 20 % der Kontrollen) detektiert werden. Gleichzeitig kam es zu einem leichten Anstieg von unverestertem Cholesterin, was sich in einer starken Verminderung des CE/FC-Verhältnisses niederschlug. Ein ähnliches Verhalten von K⁺-Kanal-Inhibitoren wurde bereits für THP1-Makrophagen beschrieben (Nobusawa et al. 2000). Dabei zeigte sich der CE-vermindernde Effekt jedoch nur für Glibenclamid, während 4-AP und TEA keinen Effekt zeigten. Dies erscheint umso überraschender, als 4-AP in der vorliegenden Dissertation schon in Konzentrationen von 100 µM eine deutliche Reduktion der CE bewirkte.

Obwohl das oben beschriebene Verhalten Parallelen zu ACAT-Inhibitoren aufweist, konnte dies durch Inkubation von Monozyten/Makrophagen mit dem ACAT-Inhibitor S-58035 in der Beladungs- und Effluxphase nicht bestätigt werden. Die K⁺-Kanal-Inhibitoren zeigten in der Beladungsphase weitgehend ein dem ACAT-Inhibitor ähnliches Verhalten, wobei es jedoch durch Inkubation der Makrophagen mit S-58035 zu einer höheren intrazellulären Konzentration an FC kam. Während die Zugabe von S-58035 zum Effluxmedium keinen modulierenden Effekt zur Folge hatte, kam es durch die alleinige Zugabe des ACAT-Inhibitors zum Beladungsmedium in der nachfolgenden Entladungsphase zu einer Stimulation des spezifischen Lipideffluxes auf gut 300 % für Cholesterin und ca. 140 % für PL. Dagegen wiesen die verwendeten GIRK-Inhibitoren SCH-23390 und U-50488 bezüglich der Zugabe zur Beladungs-

bzw. Effluxphase kein unterschiedliches Verhalten auf: Beide Substanzen zeigten jeweils eine in gleichem Ausmaß hemmende Wirkung auf den spezifischen Lipidefflux. Für 4-AP kam es durch die Vorinkubation (Beladungsphase) sogar zu einer stärker hemmenden Wirkung auf den spezifischen Lipidefflux (Entladungsphase).

4.3.3 Einfluss von P₂-Modulatoren auf den spezifischen Lipidefflux

Neben den Parallelen zu ATP-sensitiven K⁺-Kanälen sind sowohl ABCA1 (Nofer et al. 2004) als auch Syntaxin 13 (Bared et al. 2004; Falcon-Perez et al. 2002; Li et al. 2004) Konstituenten des Adapter Protein-3 (AP-3) Pathways. Dieser vermittelt in der Plättchenaktivierung die Sekretion der „Dense Granules“ (Shankar et al. 2004) und ist ferner am synaptischen Vesikeltransport (Lin et al. 2000) sowie der Insulinsekretion aus den β -Zellen im Pankreas beteiligt (Nevins et al. 2005). Ferner wird auch die ATP-Regulation des CFTR durch purinerge Rezeptoren reguliert. In diesen Prozessen spielen GIRK-Kanäle und damit deren übergeordnete G-Proteinrezeptoren eine wichtige Rolle (Dorsam et al. 2004; Luscher et al. 1997; Shankar et al. 2004). So werden bei der „Dense Granule“-Sekretion aus Plättchen über P₂Y₁₂-Rezeptoren GIRK4-Kanäle aktiviert, wobei die G-Protein $\beta\gamma$ -Untereinheit direkt mit der zytosolischen Domäne von GIRK-4 interagiert (Kunkel et al. 1995). Eine Inhibierung von GIRK-4 erfolgt durch eine Reihe von Neurotransmittern, die über Pertussis Toxin (PTX)-insensitives G-Protein (Gq/11) zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führen (Kobrinsky et al. 2000; Lei et al. 2001). Dies hat die Hydrolyse von PIP₂ und damit über DAG eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zur Folge, welche GIRK-1 und GIRK-4 inhibitorisch phosphoryliert (Mao et al. 2004).

Somit wurde im Anschluss an die bereits erwähnten Effekte von GIRK-Inhibitoren auf den spezifischen Lipidefflux und den zellulären FC- und CE-Gehalt auch eine mögliche Regulation des spezifischen Lipideffluxes durch Agonisten und Antagonisten an purinergen Rezeptoren untersucht. Die unspezifischen Agonisten von P₂-Rezeptoren ATP und 2-Methyl-ATP (Burnstock et al. 2000; Lazarowski et al. 2003; Ralevic et al. 1998) zeigten

ebenso wie MRS-2179, das als spezifischer Inhibitor von P₂Y₁ beschrieben ist (Leon et al. 2003; Marteau et al. 2004), uneinheitliche und nur geringfügig modulierende Eigenschaften. Dabei war weder durch P₂X- noch durch P₂Y-spezifische Liganden eine einheitliche Hemmung oder Steigerung des Lipideffluxes zu beobachten. Lediglich der unspezifische P₂-Antagonist Suramin zeigte eine deutliche und in Makrophagen auch konzentrationsabhängige Hemmung des Lipideffluxes. Für das polyanionische Suramin, welches auch zur Behandlung der Trypanosomen-Infektion bedingten Schlafkrankheit zugelassen ist (Germanin[®]), muss man dabei jedoch von einer allgemein hemmenden Wirkung auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ausgehen (Hohenegger et al. 1998). Da ferner aber die verwendeten P₂-Agonisten kaum stimulierende Effekte auf den Lipidefflux aufwiesen, scheint eine Wirkung von Suramin über einem P₂-Antagonismus eher unwahrscheinlich. Clopidogrel, das in Plättchen spezifisch über eine Hemmung von P₂Y₁₂ wirkt (Dorsam et al. 2004), zeigte bei einer Konzentration von 0,3 µM in Makrophagen stark hemmende Effekte auf den spezifischen Cholesterinefflux; jedoch scheint dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig zu sein und zeigte sich auch nicht für den Phospholipidefflux. Darüber hinaus waren in Fibroblasten keine modulierenden Effekte auf den spezifischen Lipidefflux zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl durch K⁺-Kanal-Inhibitoren als auch durch P₂-Modulatoren ein regulierender Einfluss auf den spezifischen Lipidefflux zu beobachten ist. Welche K⁺-Kanäle bzw. purinergen Rezeptoren dabei jedoch eine stimulierende oder hemmende Wirkung auf den Lipidefflux ausüben, könnte eventuell in Effluxexperimenten mit siRNA geklärt werden. Die deutlicheren Effekte von K⁺-Kanal-Inhibitoren, insbesondere von GIRK-Inhibitoren, äußerten sich in stark verminderten zellulären Konzentrationen an Cholesterinestern. Diese führten jedoch durch Zugabe in der Beladungsphase nicht wie der ACAT-Inhibitor S-58035 zu einer deutlichen Stimulation des spezifischen Lipideffluxes.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien

5.1.1 Lösungsmittel (LM)

Wenn nicht anders angegeben, wurden die LM mit analytischer Qualität von Merck, Darmstadt bezogen und entionisiertes Wasser aus einer Wasserentsalzungsanlage MilliQ (Millipore, Bredford MA, USA) verwendet.

5.1.2 Radiochemikalien

[¹⁴C]-Cholesterin und [³H]-Cholinchlorid stammte von Amersham, Bad Homburg. Als Szintillations-Cocktail wurde Ultima Gold von Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim verwendet.

5.1.3 Lipidstandards

Der interne Standard D₇- Cholesterin wurde mit einer Reinheit größer als 98 % von Cambridge Isotope Laboratories, Andover MA, USA, ¹³C₃- Cholesterin (Reinheit >99 %) von Medical Isotopes, Pelham NH, USA und CE- Standards in höchster analytischer Reinheit von Sigma erhalten. Ammoniumacetat und Acetylchlorid stammten von Fluka, Buchs, Schweiz. Alle anderen Standards waren von Avanti Polar Lipids, USA mit einer Reinheit größer als 98 %.

5.1.4 Beladungs-/Lipidefflux-Modulatoren

ApoA-I (human, rekombinant) stammte von Calbiochem, Bad Soden, CTX, ITX, Tertiapin und Apamin von Alomone, Jerusalem, Israel. Alle anderen hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von Sigma, Taufkirchen bezogen.

5.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

5.2.1 Materialien und Zusätze zur Zellkultur

- Dulbecco's modified Eagles Medium DMEM mit 4,5 g/l Glutamin (BIOCHROM AG, Berlin) mit 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin
- Makrophagen Serum freies Medium M-SFM (Gibco BRL, Eggenstein)
- RPMI Medium (Gibco BRL, Eggenstein)
- M-CSF, recombinant, human (R&D Systems, Wiesbaden)
- Nichtessentielle Aminosäuren MEM (Gibco BRL, Eggenstein), 5 ml / 500 ml
- Fötales Kälberserum FCS (PanSystems, Aidenbach), 50 ml / 500 ml wenn nicht anders angegeben
- Rinderserumalbumin BSA (Sigma, Taufkirchen) 7,5 % sterile Lösung in PBS
- Trypsin (0,5 g/l) EDTA (0,2 g/l) (Sigma, Taufkirchen)
- Dulbecco's phosphate buffered saline PBS (Gibco BRL, Eggenstein)
- Natriumdodecylsulfat SDS, 0,2 % (2 g/l) (Roth, Karlsruhe)

5.2.2 Kulturgefäße

- Gewebekulturflaschen 75 cm² Wachstumsfläche (Nunc, Wiesbaden)
- 6-Lochplatten mit 3,5 cm Durchmesser; 9,6 cm² (Sarstedt, Newton, USA)
- 12-Lochplatten mit 2,25 cm Durchmesser; 4,0 cm² (Falcon, Wiesbaden)
- Gewebekultur-Petrischalen: 8,7 cm Durchmesser; 60 cm² (Falcon, Wiesbaden)

5.3 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Laminair Flow, Heraeus) durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in Kulturflaschen mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Osterode) kultiviert.

5.3.1 Einfrieren und Auftauen von Fibroblasten

Fibroblasten, die langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden sollten, wurden zunächst bei 1200 U/min pelletiert und in einer Konzentration von ca. 1x10⁶ Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (40 % RPMI 1640; 50 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots zu 1,8 ml in Kryo-Röhrchen gefüllt, bei -80 °C tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. Für längere Aufbewahrungszeiten wurden die Zellen unter Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren.

Sollten die tiefgefroren Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurde die Zellsuspension aufgetaut, in wenig Medium gewaschen und in frisches Kulturmedium überführt.

5.3.2 Vitalitätsprüfung

Mittels Trypanblau-Färbung wurde die Anzahl nicht mehr lebender Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden 100 µl einer Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung versetzt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl lebender sowie an abgestorbenen Zellen, die sich durch Trypanblau-Lösung anfärben ließen, mikroskopisch ermittelt. Ergab sich dabei für abgestorbene Zellen ein Anteil größer 5 % der Gesamt-Zellzahl, wurde die Substanz als zelltoxisch deklariert.

5.3.3 Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden sämtliche Zelllinien mit Hilfe des Mycoplasmen Detection Kits auf einen Mycoplasmenbefall untersucht.

5.3.4 Kultur von primären Hautfibroblasten

Aus Hautstanzen von freiwilligen Spendern wurden in DMEM mit 20 % FCS Primärkulturen von Fibroblasten herangezogen. Nach Ausbildung eines Monolayers wurden die anhaftenden Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, die damit gewonnenen Fibroblasten 1 : 3 gesplittet und in DMEM mit 10 % FCS bis zur erneuten Konfluenz kultiviert. Medienwechsel oder Waschschrifte wurden ausgeführt, indem die Zellen in sterilen Falcon-Röhrchen 5 min bei 1000 bis 1200 U/min zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert wurde. Für die Experimente wurden ausschließlich Passagen zwischen 3 und 18 verwendet, die in einer Dichte von 40.000 Fibroblasten/Loch in 12-Lochplatten ausgesät wurden. Für Experimente mit MS-Analytik wurden 80.000-100.000 Fibroblasten/Loch in 6-Lochplatten ausgesät.

5.3.5 Kultur von humanen Monozyten

Die Monozyten wurden von freiwilligen Spendern mittels Leukapherese gewonnen und durch Gegenstromelutriation bis zu einer Reinheit größer als 95 % aufgereinigt; die Kontrolle dabei erfolgte durch FACS-Analyse. Soweit nicht anders angegeben, wurden die erhaltenen Monozytenkonzentrate in MSF-Medium mit 50 ng/ml M-CSF ausgesät und über 4 Tage zu Makrophagen ausdifferenziert. Anschließend wurde das Medium für die eintägige Beladungsphase durch frisches Medium unter Zusatz von 40 µg/ml E-LDL ersetzt. Die Entladung erfolgte in lipidfreiem RPMI Medium unter Zusatz von 50 ng/ml M-CSF über einen Zeitraum von 18 - 20 Stunden.

5.4 Lipoproteine

5.4.1 Sequentielle Ultrazentrifugation

Ausgehend von rekalzifiziertem Plasma mit einer Dichte von 1,006 g/ml erhält man durch mehrere Ultrazentrifugationsschritte die entsprechenden Lipoproteinklassen im Überstand (Tabelle 1, nach Havel et al., 1955). Nach jedem Zentrifugationsschritt (18 – 48 h bei 4 °C) werden die Unterstände durch Zugabe von KBr auf die neue Dichte eingestellt.

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

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 – 1,210	180.000	48.000	48
Gesamt	1,006 – 1, 21	180.000	48.000	48

Tab. 5: Lipoproteinpräparation durch sequentielle Ultrazentrifugation (Rotor 70 TI)

5.4.2 Dialyse der Lipoproteinfaktionen

Um KBr wieder zu entfernen, wurden die erhaltenen Lipoproteinfaktionen in autoklavierte Dialyseschläuche aus regenerierter Zellulose mit einer

Trenngrenze (MWCO) von 12.000 – 14.000 g/mol (Serva, Heidelberg) 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 H₂O.

Puffer B (10-fach): 450 g NaCl ad 5000 ml H₂O.

Beide Pufferlösungen wurden mit 0,1 M NaOH auf ph 7,4 eingestellt und zur Lagerung zehnfach konzentriert angesetzt.

5.4.3 Analytik der Lipoproteinfaktionen

Nach der Dialyse wurden die Lipoproteinfaktionen steril filtriert (Porengröße 0,45 µm) und der Proteingehalt nach Lowry (LOWRY et al. 1951) mit BSA als Standard bestimmt. Die Qualität der Fraktionen wurde mittels dem Elektrophorese-System Rapidophor (LipoScript, Test-Kit Lipidophor All in 12, Immuno AG, Wien, Österreich) überprüft. Hierbei wurden die Lipoproteinfaktionen auf einem albuminhaltigen Agarmedium ihrer elektrophoretischen Mobilität entsprechend aufgetrennt; die anschließende Präzipitation mit Polyanionen ermöglicht eine quantitative Auswertung.

5.4.4 Präparation von E-LDL

Die enzymatische Modifikation des LDL erfolgte in leicht abgeänderter Form nach einer Vorschrift von Bakhdi (Bhakdi et al. 1995). Hierzu wurde LDL mit PBS auf eine Konzentration von 2 mg/ml und nachfolgend 5 ml dieser Lösung mit 160 µg Trypsin und 320µg Cholesterinesterase (Boehringer, Ingelheim) für 48 Stunden unter leichtem Schütteln bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Das somit erhaltene E-LDL wies eine milchige Trübung auf.

5.5 Beladungs- und Lipidefflux-Phase

Abhängig vom Zelltyp und der Fragestellung wurden verschiedene Label-, Beladungs- und Aufarbeitungsmethoden verwendet. Für Messungen mittels MS wurden die Fibroblasten oder Monozyten/Makrophagen ohne Isotopenzugabe bzw. mit 10 µg/ml ¹³C₃-Cholesterin und/oder 50 µg/ml D₉-Cholin inkubiert.

5.5.1 Untersuchung der Beladungsphase

Um den Einfluss potentiell modulierender Substanzen auf die Beladung der Zellen zu untersuchen, wurden die Fibroblasten oder Makrophagen direkt im Anschluss an die 24-stündige Beladungsphase aufgearbeitet und mittels MS analysiert.

5.5.2 Lipidefflux von Fibroblasten

Für die parallele Messung von Cholesterin- und Phospholipidefflux wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Mendez (Mendez et al. 1996) mit ¹⁴C-Cholesterin und ³H-Cholin gelabelt. Dazu wurden pro Loch 40.000 Fibroblasten in 12-Lochplatten ausgesät und 2 Tage in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Fibroblasten für 3 Tage in DMEM mit 10 % FCS und 1,5 µCi/ml ¹⁴C-Cholesterin inkubiert; nach Waschen mit PBS mit 0,2 % BSA wurden die Zellen mit 15 µg/ml Cholesterin in DMEM mit 0,2 % BSA über 24 h beladen. Danach wurde mit Medium gewaschen und für weitere 24 Stunden mit 10 µCi/ml ³H-Cholin in DMEM mit 0,2 % BSA inkubiert.

Vor der Efflux-Phase wurde das Medium abgenommen und zur Entfernung an der Zelloberfläche anhaftender radioaktiver Lipide zweimal mit 1 ml PBS mit 0,2 % BSA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1,0 ml frischem DMEM + 0,2 % BSA und den verschiedenen Modulatoren inkubiert. Nach einer Stunde erhielt ein Teil zur Induktion des Effluxes zusätzlich 10 µg/ml ApoA-I oder 100 µg/ml HDL₃ als Lipidakzeptoren.

5.5.3 Lipidefflux mit Monozyten/Makrophagen

Wie unter 5.3.5 beschrieben wurden die gewonnenen Monozyten in der jeweils angegebenen Anzahl in 6-Lochplatten ausgesät und differenziert. Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Beladung der Makrophagen mit 40 µg/ml E-LDL bei gleichzeitiger Zugabe von 1,5 µCi/ml ^{14}C -Cholesterin und 10 µCi/ml ^3H -Cholin. Die Chase-Phase wurde wie unter 5.5.2 angegeben eingeleitet, wobei als Efflux-Medium lipidfreies RPMI mit 50 ng/ml MCSF verwendet wurde.

5.6 Aufarbeitung und Lipidextraktion

Nach Ende der Effluxphase zu Untersuchungen des Lipideffluxes wurde das Medium abgenommen und bei 800 g für 10 min zentrifugiert, um abgelöste Zellen abzutrennen. Davon wurden 800 µl für die Lipidextraktion abgenommen; in den Beladungsexperimenten wurde dieser Schritt ausgelassen. Die Zellen wurden nach Abnehmen des Mediums mit 0,5 ml 0,2 % SDS mindestens 10 min bei 37 °C lysiert und nachfolgend in Spitzbodengläser überführt. Anschließend wurde mit 0,5 ml Wasser nachgewaschen und die vereinigten Zellextrakte für die Lipidextraktion verwendet.

5.6.1 Lipidextraktion

Die Gesamtlipidextraktion erfolgte nach einer Methode von Bligh und Dyer (BLIGH et al. 1959) und wurde ausschließlich in Glasgefäßen durchgeführt um Lipidverluste weitgehend zu vermeiden. Die entsprechenden Volumina der oben beschriebenen Zellextrakte und Medien wurden mit 3 ml einer Mischung aus Methanol und Chloroform (2/1) aufgefüllt und gut durchmischt. Nach einer Stunde wurde durch Zugabe von je 1 ml Chloroform und Wasser die Phasentrennung herbeigeführt. Daraufhin wurde gevortext und zur Vervollständigung der Phasentrennung für 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Die hierbei erhaltene, untere Chloroform-Phase wurde mit einer Pasteur-Pipette möglichst exakt abgenommen und in Szintvials überführt. Aus diesen wurde sodann mit Hilfe einer Gefriertrocknungszentrifuge (Christ, Osterode) das Lösungsmittel abgezogen.

5.6.2 Analytik mit Szintilationszähler

Nachfolgend wurden die unter 5.6.1 erhaltenen Rückstände in 100 µl Methanol aufgenommen, gevortext und mit 3 ml Szintcocktail Ultima Gold (Canberra-Packard, Dreieich) versetzt und in einem β-Flüssigszintilations-Zähler (Wallach 1410, Berthold, München) vermessen. Dieses Gerät kann die Aktivität verschiedener Isotope trennen und somit die beiden β-Strahler ¹⁴C-Cholesterin und ³H-Cholin voneinander unterscheiden.

5.6.3 Analytik mittels ESI-MS/MS

Für die MS-basierte Analytik wurden die Zellextrakte sowie die Medien mit den internen Standards der jeweiligen Lipide versetzt und der oben beschriebenen Lipidextraktion unterworfen. Die hieraus erhaltenen Proben wurden in einer 10 mM Ammoniumacetat-Lösung in Methanol/Chloroform (3:1) aufgenommen; davon wurden 20 µl mit Hilfe eines HTS PAL-Autosamplers (Zwingen, Schweiz) über eine binäre Pumpe (Agilent1100, Waldbronn) in den mit einer Elektrospray-Ionenquelle ausgestatteten Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Quattro Ultima (Micromass, Manchester, England) injiziert. Die Elektrospray-Ionisation der Lipide erfolgte dabei im Positiv-Ionen-Modus (ESI+):

Lipid	Scan	Literatur
PC, SPM	PIS m/z 184	(Liebisch et al. 2004)
LPC	PIS m/z 184	(Liebisch et al. 2002)
PE	NL m/z 141	(Brugger et al. 1997)
PS	NL m/z 185	(Brugger et al. 1997)
Cer	PIS m/z 264	(Liebisch et al. 1999)
FC, CE (Acetylierung)	PIS m/z 369	(Liebisch et al. 2005)

Tab. 6: Etablierte Methoden zur massenspektrometrischen Quantifizierung von Lipiden.

PIS: Parent ion scan, NL: Neutral loss scan.

D₉-Cholin enthaltendes PC und SPM wurde im PIS (m/z 193), ¹³C₃-FC und ¹³C₃-CE im PIS (m/z 372) analysiert. Die für die Quantifizierung der einzelnen Lipide notwendigen Geräteeinstellungen und internen Standards wurden aus Vorarbeiten von Dr. Liebisch übernommen (Liebisch et al. 1999; Liebisch et al. 2002; Liebisch et al. 2004). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der von der Firma mitgelieferten Software (Micromass, Manchester, England) sowie

einem von Dr. Liebisch programmierten Excel-Makro. $^{13}\text{C}_3$ -FC und $^{13}\text{C}_3$ -CE wurden unter Verwendung eines Korrekturfaktors hinsichtlich des Isotopen-Overlaps von natürlich vorkommendem FC und CE quantifiziert.

5.7 Berechnung des Lipideffluxes

5.7.1 Lipidefflux

Für die Berechnung des Effluxes des jeweiligen Lipides wurden die unter 5.6.1 und 5.7 erhaltenen Werte für Medien durch die Summe der Werte für Zellen und Medien dividiert und als Efflux in Prozent ausgedrückt; bei der MS-basierten Analyse des Cholesterineffluxes wurde die Summe der zellulären Werte für FC und CE verwendet.

5.7.2 Spezifischer Lipidefflux

Zur Berechnung des spezifischen Effluxes wurden die Effluxwerte der Kontrollzellen von den Effluxwerten der mit ApoA-I stimulierten Zellen subtrahiert und dieser Wert als spezifischer Efflux in Prozent bezeichnet.

Für eine Modulation des spezifischen Effluxes dieser Kontrolle wurden die Effluxwerte der Zellen mit der jeweiligen Substanz von den Zellen mit der Substanz und ApoA-I subtrahiert; anschließend wurde dieser Wert auf den spezifischen Effluxwert bezogen und als Modulation des spezifischen Effluxes in Prozent der Kontrolle ausgedrückt.

5.8 Proteinanalytik

5.8.1 Messung der Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationen der Zellhomogenisate wurde mit einem BCA zwei Komponenten Kit (Uptima/Interchim, Montlucon, Frankreich) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit einem ELISA Reader MR 5000 (DYNATECH Laboratories, Denkendorf) bei 500 nm. Als Standards wurde Rinderserum-Albumin (BSA) im Konzentrationsbereich 25 – 1500 µg/ml verwendet.

5.8.2 Subzelluläre Fraktionierung

In Anlehnung an ein Protokoll von Huang et al. (Huang et al. 1999) wurden die Zellen in cytosolische und membranäre Fraktionen aufgetrennt. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS für 10 Minuten mit 1 ml Extraktionspuffer (20 mM Tris, 2mM EDTA, 5mM EGTA, 10mM Mercaptoethanol, 5 µg/ml Leupeptin und 5 µg/ml Aprotinin) auf Eis inkubiert. Zur Auftrennung wurden die erhaltenen Zelllysate homogenisiert und 10 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pipette die cytosolische Fraktion (Überstand) von der Plasmamembran-Fraktion (Pellet) abgetrennt. Das Pellet wurde in 500 µl Suspensionspuffer (10 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 5 mM Mercaptoethanol, 5 µg/ml Leupeptin und 5 µg/ml Aprotinin) aufgenommen und mit Hilfe eines Sonifiers (Soniprep 150, MSE, Crawley, England) homogenisiert.

5.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in 4-12 % Bis-Tris-Fertiggelen (Invitrogen) aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Elektrophorese wurde bei 0,8 mA/cm² durchgeführt und anschließend das Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

5.8.4 Coomassie-Färbung

Zur Detektion der Proteine wurde eine Färbung mit Coomassie-Blau durchgeführt. Dazu wurden Gele oder Membranen zunächst für 5 bis 10 min in Färbelösung (0,25 % Coomassie Blue R250/L, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure) gelegt und anschließend in Entfärbelösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

5.8.5 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im „semi-dry-Verfahren“ auf PVDF-Membranen transferiert (Towbin et al. 1979). Dazu wurden je drei Whatman-Papierstücke in der entsprechenden Gelgröße in den Transferpuffern A (0,3 M Tris Base, pH 10,4; 20 % Methanol), B (25 mM Tris Base, pH 10,4; 20 % Methanol) und C (4 mM ϵ -Amino-n-Capronsäure, pH 7,6; 20 % Methanol) getränkt. Zunächst wurden je drei Whatman-Papierstücke A und B auf die Anodenplatte der Blotapparatur gelegt. Die Nitrozellulosemembran wurde mit Methanol befeuchtet, in Puffer B gespült und auf Whatman-Papierstücke B gelegt. Anschließend wurde das Gel aufgelegt, mit drei Lagen Whatman-Papier C bedeckt und die Apparatur mit der Kathodenplatte geschlossen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass der Aufbau luftblasenfrei ist, um einen vollständigen, flächendeckenden Proteintransfer zu ermöglichen. Der Transfer wurde mit 0,8 mA/cm² Gelfläche für 45-60 min durchgeführt. Die auf die PVDF-Membran geblotteten Proteine wurden anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert, welcher wiederum mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markierten Antikörper nachgewiesen wird. In beiden Fällen wurde die Membran nach dem Proteintransfer in 0,1 % PBS-Tween mit 1 % (w/v) Magermilchpulver für 30 min blockiert und anschließend für 1 Stunde mit den entsprechenden Antikörpern in der angegebenen Konzentration inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Membran mit PBS-Tween und einmaligem Waschen mit PBS, wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper versetzt. Vor der Detektion wurde die Membran fünfmal mit PBS-Tween und mindestens einmal mit PBS gewaschen. Die Detektion des HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte mit dem ECL-Western-Blot-System (Amersham). Die

Nachweisreaktion beruht auf einer Chemolumineszenz-Reaktion, die durch die HRP-katalysierte Oxidation eines Substrats (Luminol) hervorgerufen wird. Diese Lichtemission kann anschließend auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL) sichtbar gemacht werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das für Fibroblasten bereits etablierte System des spezifischen Lipideffluxes mit Apolipoprotein A-I (ApoA-I) auf von freiwilligen Spendern gewonnene Monozyten übertragen. Optimale Ergebnisse im spezifischen Lipidefflux wurden dabei nach einer viertägigen Differenzierung mit M-CSF, mit einer Zellzahl von 750.000 ausgesäten Monozyten sowie einer Beladung mit 40 µg/ml an enzymatisch modifiziertem LDL (E-LDL) erreicht. Der spezifische Lipidefflux betrug zwischen drei und acht Prozent für Cholesterin sowie zwischen drei und sechs Prozent für Phospholipide und war abhängig von den individuellen Unterschieden der jeweiligen Spender sowohl von Monozyten als auch von Plasma/E-LDL.

Zur näheren Charakterisierung des Lipideffluxes wurden mit Hilfe einer massenspektrometrischen Quantifizierung von Lipiden für beide Modelle die Unterschiede in Zellen und Medien bezüglich der Lipidklassen sowie deren Speziesmuster aufgezeigt. In Schaumzellen, welche aufgrund der Beladung mit E-LDL zellulär einen bedeutend höheren Anteil an Cholesterinestern (CE) aufwiesen, zeigte sich ebenso wie in Fibroblasten eine durch ApoA-I induzierte und somit für ABCA1 spezifische Entladung von Phosphatidylcholin (PC), Sphingomyelin (SPM) sowie v. a. von freiem Cholesterin (FC). Auf der Ebene der PC-Spezies ergab sich dabei für beide Zellmodelle eine präferentielle Entladung von einfach ungesättigten PC-Spezies, insbesondere von PC 34:1. Ferner konnte mittels massenspektrometrischer Analytik unter Verwendung von ¹³C₃-Cholesterin während der Effluxphase mit HDL₃ eine partielle Beladung der Zellen mit CE gezeigt werden. Ebenso wurden in Medien von Schaumzellen CE detektiert, deren Anteil sich in Medien sowohl mit ApoA-I als auch mit HDL₃ steigern ließ. Dieser Efflux von CE war in Fibroblasten nicht zu beobachten und ist vermutlich auf eine Induktion von ApoE zurückzuführen.

Um den Einfluss von Sphingolipiden auf den spezifischen Lipidefflux zu klären, wurden sowohl Fibroblasten als auch Schaumzellen in der Effluxphase mit verschiedenen Sphingolipiden inkubiert. Während Ceramid bei Schaumzellen

stimulierend auf den ApoA-I spezifischen Efflux wirkte, wurde bei Fibroblasten eine konzentrationsabhängige hemmende Wirkung beobachtet. Darüber hinaus zeigten sich für Sphingosin und Sphingosin-1-Phosphat in Fibroblasten etwas stärker inhibierende Effekte auf den spezifischen Lipidefflux als im Modell mit Monozyten/Makrophagen. Um ferner eine potentielle Wirkung der Sphingolipide über PKC näher zu charakterisieren, wurde die Expression der PKC-Isoformen sowie deren Modulation durch Sphingolipide untersucht. Dabei konnte lediglich durch Phorbolmyristylacetat eine Hemmung des Lipideffluxes mit einer parallelen Downregulation der PKC-Isoformen ϵ , δ und ζ beobachtet werden. Somit könnte man von einer den spezifischen Lipidefflux modulierenden Rolle der PKC ausgehen, welche v. a. durch die Proteinmenge von PKC bestimmt wird.

In Analogie zur Regulation des Sulfonylharnstoff-Rezeptors wurde ferner der Einfluss von K^+ -Kanal-Inhibitoren auf den spezifischen Lipidefflux untersucht. Bei der Inkubation der beiden Zellsysteme mit verschiedenen K^+ -Kanal-Inhibitoren zeigte sich nur für Glibenclamid ein einheitlich hemmender Effekt auf den spezifischen Lipidefflux. Darüber hinaus wurde ein deutlich ausgeprägter, hemmender Einfluss auf die zellulären CE-Konzentrationen während der Be- und Entladungsphase gefunden, welcher jedoch nicht mit dem Verhalten eines Inhibitors der Acetyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) vergleichbar war. Weiterhin wurde in Anlehnung an die Ergebnisse mit GIRK-Inhibitoren der Einfluss von Modulatoren purinerger Rezeptoren auf den spezifischen Lipidefflux untersucht. Die Modulatoren purinerger Rezeptoren zeigten hierbei nur schwache und im Vergleich der beiden Zelltypen stark unterschiedliche Wirkungen auf den spezifischen Lipidefflux. Der beobachtete hemmende Einfluss von Suramin sowie von Clopidogrel lässt auf unspezifische, nicht auf einer Hemmung purinerger Rezeptoren beruhende Effekte dieser Substanzen schließen, da auch Agonisten purinerger Rezeptoren teilweise inhibierende Effekte aufwiesen.

7 Publikationen

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Schifferer, R., Liebisch, G., S. Bandulik, T. Langmann, A. Dada, and G. Schmitz. 2006. ApoA-I induces a preferential efflux of monounsaturated phosphatidylcholine and medium chain sphingomyelin species from a cellular pool distinct of HDL₃ mediated phospholipid efflux lipid efflux; *J.Biol.Chem.*; eingereicht.

Langmann, T., G. Liebisch, C. Moehle, R. Schifferer, R. Dayoub, S. Heiduczek, M. Grandl, A. Dada, and G. Schmitz. 30-5-2005. Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux; *Biochim.Biophys.Acta* **1740**: 155-161.

Liebisch, G., M. Binder, R. Schifferer, T. Langmann, B. Schulz, and G. Schmitz. High Throughput Quantification of Cholesterol and Cholestryl Ester by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (ESI-MS/MS); *Biochim.Biophys.Acta*; akzeptiert.

8 Literaturverzeichnis

1. **4S-study** 19-11-1994. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S); *Lancet* **344**: 1383-1389.
2. **Acton, S., A. Rigotti, K.T. Landschulz, S. Xu, H.H. Hobbs, and M. Krieger.** 26-1-1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor; *Science* **271**: 518-520.
3. **Aiello, R.J., D. Brees, P.A. Bourassa, L. Royer, S. Lindsey, T. Coskran, M. Haghpassand, and O.L. Francone.** 1-4-2002. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**: 630-637.
4. **Aiello, R.J., D. Brees, and O.L. Francone.** 1-6-2003. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23**: 972-980.
5. **Asztalos, B., W. Zhang, P.S. Roheim, and L. Wong.** 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.
6. **Auge, N., I. Escargueil-Blanc, I. Lajoie-Mazenc, I. Suc, N. Andrieu-Abadie, M.T. Pieraggi, M. Chatelut, J.C. Thiers, J.P. Jaffrezou, G. Laurent, T. Levade, A. Negre-Salvayre, and R. Salvayre.** 22-5-1998. Potential role for ceramide in mitogen-activated protein kinase activation and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein; *J.Biol.Chem.* **273**: 12893-12900.
7. **Bared, S.M., C. Buechler, A. Boettcher, R. Dayoub, A. Sigrueuer, M. Grandl, C. Rudolph, A. Dada, and G. Schmitz.** 2004. Association of ABCA1 with syntaxin 13 and flotillin-1 and enhanced phagocytosis in tangier cells; *Mol.Biol.Cell* **15**: 5399-5407.
8. **Bericht des Bundesministeriums für Gesundheit.** 2005.
http://www.gbe-bund.de/pls/gbe/aktuelles.prc_ak_newsboard, 2005

9. **Bhakdi, S., B. Dorweiler, R. Kirchmann, J. Torzewski, E. Weise, J. Tranum-Jensen, I. Walev, and E. Wieland.** 1-12-1995. On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety; *J.Exp.Med.* **182**: 1959-1971.
10. **Bjorkhem, I., U. Diczfalussy, and D. Lutjohann.** 1999. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms; *Curr.Opin.Lipidol.* **10**: 161-165.
11. **BLIGH, E.G. and W.J. DYER.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification; *Can.J.Biochem.Physiol* **37**: 911-917.
12. **Blom, T.S., M. Koivusalo, E. Kuismanen, R. Kostiainen, P. Somerharju, and E. Ikonen.** 4-12-2001. Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membrane polyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading; *Biochemistry* **40**: 14635-14644.
13. **Bodzioch, M., E. Orso, J. Klucken, T. Langmann, A. Bottcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Buchler, M. Porsch-Ozcurumez, W.E. Kaminski, H.W. Hahmann, K. Oette, G. Rothe, C. Aslanidis, K.J. Lackner, and G. Schmitz.** 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease; *Nat.Genet.* **22**: 347-351.
14. **Bosel, A. and T. Pfeuffer.** 30-1-1998. Differential effects of ceramides upon adenylyl cyclase subtypes; *FEBS Lett.* **422**: 209-212.
15. **Braunwald, E.** 6-11-1997. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities; *N Engl J Med.* **337**: 1360-1369.
16. **Breslow, J.L.** 1997. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases; *Nat.Med.* **3**: 600-601.
17. **Brooks-Wilson, A., M. Marcil, S.M. Clee, L.H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J.A. Collins, H.O. Molhuizen, O. Loubser, B.F. Ouelette, K. Fichter, K.J. Ashbourne-Excoffon, C.W. Sensen, S. Scherer, S. Mott, M. Denis, D. Martindale, J. Frohlich, K. Morgan, B. Koop, S. Pimstone, J.J. Kastelein, J. Genest, Jr., and M.R. Hayden.** 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency; *Nat.Genet.* **22**: 336-345.

18. **Brown, A.J., G.F. Watts, J.R. Burnett, R.T. Dean, and W. Jessup.** 8-9-2000. Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketcholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture; *J.Biol.Chem.* **275**: 27627-27633.
19. **Brugger, B., G. Erben, R. Sandhoff, F.T. Wieland, and W.D. Lehmann.** 18-3-1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 2339-2344.
20. **Burnstock, G. and M. Williams.** 2000. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential; *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **295**: 862-869.
21. **Castelli, W.P., R.J. Garrison, P.W. Wilson, R.D. Abbott, S. Kalousdian, and W.B. Kannel.** 28-11-1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study; *JAMA* **256**: 2835-2838.
22. **Chatterjee, S.B., S. Dey, W.Y. Shi, K. Thomas, and G.M. Hutchins.** 1997. Accumulation of glycosphingolipids in human atherosclerotic plaque and unaffected aorta tissues; *Glycobiology* **7**: 57-65.
23. **Chen, W., D.L. Silver, J.D. Smith, and A.R. Tall.** 6-10-2000. Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages; *J.Biol.Chem.* **275**: 30794-30800.
24. **Chen, W., N. Wang, and A.R. Tall.** 10-6-2005. A PEST deletion mutant of ABCA1 shows impaired internalization and defective cholesterol efflux from late endosomes; *J.Biol.Chem.*
25. **Cignarella, A., T. Engel, A. Von Eckardstein, M. Kratz, S. Lorkowski, A. Lueken, G. Assmann, and P. Cullen.** 2005. Pharmacological regulation of cholesterol efflux in human monocyte-derived macrophages in the absence of exogenous cholesterol acceptors; *Atherosclerosis* **179**: 229-236.
26. **Cooper, D.R., M.C. Vila, J.E. Watson, G. Nair, R.J. Pollet, M. Standaert, and R.V. Farese.** 1990. Sulfonylurea-stimulated glucose transport association with diacylglycerollike activation of protein kinase C in BC3H1 myocytes; *Diabetes* **39**: 1399-1407.

27. **Coroneos, E., M. Martinez, S. McKenna, and M. Kester.** 6-10-1995. Differential regulation of sphingomyelinase and ceramidase activities by growth factors and cytokines. Implications for cellular proliferation and differentiation; *J.Biol.Chem.* **270**: 23305-23309.
28. **Cullen, P., M. Fobker, K. Tegelkamp, K. Meyer, F. Kannenberg, A. Cignarella, A. Benninghoven, and G. Assmann.** 1997. An improved method for quantification of cholesterol and cholesteryl esters in human monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography with identification of unassigned cholesteryl ester species by means of secondary ion mass spectrometry; *J.Lipid Res.* **38**: 401-409.
29. **Curtiss, L.K. and W.A. Boisvert.** 2000. Apolipoprotein E and atherosclerosis; *Curr.Opin.Lipidol.* **11**: 243-251.
30. **Datta, G., R.F. Epan, R.M. Epan, M. Chaddha, M.A. Kirksey, D.W. Garber, S. Lund-Katz, M.C. Phillips, S. Hama, M. Navab, A.M. Fogelman, M.N. Palgunachari, J.P. Segrest, and G.M. Anantharamaiah.** 18-6-2004. Aromatic residue position on the nonpolar face of class a amphipathic helical peptides determines biological activity; *J.Biol.Chem.* **279**: 26509-26517.
31. **Davidson, M.B., I.G. Molnar, A. Furman, and D. Yamaguchi.** 1991. Glyburide-stimulated glucose transport in cultured muscle cells via protein kinase C-mediated pathway requiring new protein synthesis; *Diabetes* **40**: 1531-1538.
32. **Denis, M., B. Haidar, M. Marcil, M. Bouvier, L. Krimbou, and J. Genest.** 1-10-2004. Characterization of oligomeric human ATP binding cassette transporter A1. Potential implications for determining the structure of nascent high density lipoprotein particles; *J.Biol.Chem.* **279**: 41529-41536.
33. **Diederich, W., E. Orso, W. Drobnik, and G. Schmitz.** 2001. Apolipoprotein AI and HDL(3) inhibit spreading of primary human monocytes through a mechanism that involves cholesterol depletion and regulation of CDC42; *Atherosclerosis* **159**: 313-324.
34. **Dorsam, R.T. and S.P. Kunapuli.** 2004. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation; *J.Clin.Invest* **113**: 340-345.

35. **Downs, J.R., M. Clearfield, S. Weis, E. Whitney, D.R. Shapiro, P.A. Beere, A. Langendorfer, E.A. Stein, W. Kruyer, and A.M. Gotto, Jr.** 27-5-1998. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study; *JAMA* **279**: 1615-1622.
36. **Drobnik, W., H. Borsukova, A. Bottcher, A. Pfeiffer, G. Liebisch, G.J. Schutz, H. Schindler, and G. Schmitz.** 2002. Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains; *Traffic*. **3**: 268-278.
37. **Elsegood, C.L., S. Pal, P.D. Roach, and J.C. Mamo.** 2001. Binding and uptake of chylomicron remnants by primary and THP-1 human monocyte-derived macrophages: determination of binding proteins; *Clin.Sci.(Lond)* **101**: 111-119.
38. **Falcon-Perez, J.M. and E.C. Dell'Angelica.** 2002. The pallidin (Pldn) gene and the role of SNARE proteins in melanosome biogenesis; *Pigment Cell Res.* **15**: 82-86.
39. **Farese, R.V., T. Ishizuka, M.L. Standaert, and D.R. Cooper.** 1991. Sulfonylureas activate glucose transport and protein kinase C in rat adipocytes; *Metabolism* **40**: 196-200.
40. **Favari, E., M. Lee, L. Calabresi, G. Franceschini, F. Zimetti, F. Bernini, and P.T. Kovanen.** 12-3-2004. Depletion of pre-beta-high density lipoprotein by human chymase impairs ATP-binding cassette transporter A1- but not scavenger receptor class B type I-mediated lipid efflux to high density lipoprotein; *J.Biol.Chem.* **279**: 9930-9936.
41. **Feng, B., P.M. Yao, Y. Li, C.M. Devlin, D. Zhang, H.P. Harding, M. Sweeney, J.X. Rong, G. Kuriakose, E.A. Fisher, A.R. Marks, D. Ron, and I. Tabas.** 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages; *Nat.Cell Biol.* **5**: 781-792.
42. **Fielding, P.E., K. Nagao, H. Hakamata, G. Chimini, and C.J. Fielding.** 21-11-2000. A two-step mechanism for free cholesterol and phospholipid efflux from human vascular cells to apolipoprotein A-1; *Biochemistry* **39**: 14113-14120.

43. **Fitzgerald, M.L., A.L. Morris, A. Chroni, A.J. Mendez, V.I. Zannis, and M.W. Freeman.** 2004. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux; *J.Lipid Res.* **45**: 287-294.
44. **Forte, T.M., R. Goth-Goldstein, R.W. Nordhausen, and M.R. McCall.** 1993. Apolipoprotein A-I-cell membrane interaction: extracellular assembly of heterogeneous nascent HDL particles; *J.Lipid Res.* **34**: 317-324.
45. **Francis, G.A., R.H. Knopp, and J.F. Oram.** 1995. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease; *J.Clin.Invest* **96**: 78-87.
46. **Freeman, M.W.** 28-9-1999. Effluxed lipids: Tangier Island's latest export; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**: 10950-10952.
47. **Gillotte-Taylor, K., M. Nickel, W.J. Johnson, O.L. Francone, P. Holvoet, S. Lund-Katz, G.H. Rothblat, and M.C. Phillips.** 5-4-2002. Effects of enrichment of fibroblasts with unesterified cholesterol on the efflux of cellular lipids to apolipoprotein A-I; *J.Biol.Chem.* **277**: 11811-11820.
48. **Glomset, J.A.** 1968. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction; *J.Lipid Res.* **9**: 155-167.
49. **Goldstein, J.L., M.S. Brown, R.G. Anderson, D.W. Russell, and W.J. Schneider.** 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system; *Annu.Rev.Cell Biol.* **1**: 1-39.
50. **Hamon, Y., O. Chambenoit, and G. Chimini.** 30-12-2002. ABCA1 and the engulfment of apoptotic cells; *Biochim.Biophys.Acta* **1585**: 64-71.
51. **Hardy, S.P., H.R. Goodfellow, M.A. Valverde, D.R. Gill, V. Sepulveda, and C.F. Higgins.** 3-1-1995. Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels; *EMBO J.* **14**: 68-75.
52. **HAVEL, R.J., H.A. EDER, and J.H. BRAGDON.** 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum; *J.Clin.Invest* **34**: 1345-1353.

53. **Hisano, N., Y. Yatomi, K. Satoh, S. Akimoto, M. Mitsumata, M.A. Fujino, and Y. Ozaki.** 15-6-1999. Induction and suppression of endothelial cell apoptosis by sphingolipids: a possible in vitro model for cell-cell interactions between platelets and endothelial cells; *Blood* **93**: 4293-4299.
54. **Hohenegger, M., M. Waldhoer, W. Beindl, B. Boing, A. Kreimeyer, P. Nickel, C. Nanoff, and M. Freissmuth.** 6-1-1998. Gsalpha-selective G protein antagonists; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 346-351.
55. **Huang, H.M., C.H. Weng, S.C. Ou, and T. Hwang.** 15-6-1999. Selective subcellular redistributions of protein kinase C isoforms by chemical hypoxia; *J.Neurosci.Res.* **56**: 668-678.
56. **Huwiler, A., T. Kolter, J. Pfeilschifter, and K. Sandhoff.** 31-5-2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling; *Biochim.Biophys.Acta* **1485**: 63-99.
57. **Ji, Y., B. Jian, N. Wang, Y. Sun, M.L. Moya, M.C. Phillips, G.H. Rothblat, J.B. Swaney, and A.R. Tall.** 22-8-1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux; *J.Biol.Chem.* **272**: 20982-20985.
58. **Jiang, X., O.L. Francone, C. Bruce, R. Milne, J. Mar, A. Walsh, J.L. Breslow, and A.R. Tall.** 15-11-1996. 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.
59. **Jin, W. and Z. Lu.** 22-9-1998. A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels; *Biochemistry* **37**: 13291-13299.
60. **Johnson, W.J., F.H. Mahlberg, G.H. Rothblat, and M.C. Phillips.** 1-10-1991. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins; *Biochim.Biophys.Acta* **1085**: 273-298.
61. **Kapinsky, M., M. Torzewski, C. Buchler, C.Q. Duong, G. Rothe, and G. Schmitz.** 2001. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **21**: 1004-1010.
62. **Khovidhunkit, W., A.H. Moser, J.K. Shigenaga, C. Grunfeld, and K.R. Feingold.** 2003. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR; *J.Lipid Res.* **44**: 1728-1736.

63. **Kiss, R.S., J. Maric, and Y.L. Marcel.** 2005. Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux; *J.Lipid Res.* **46**: 1877-1887.
64. **Kobrinsky, E., T. Mirshahi, H. Zhang, T. Jin, and D.E. Logothetis.** 2000. Receptor-mediated hydrolysis of plasma membrane messenger PIP2 leads to K⁺-current desensitization; *Nat.Cell Biol.* **2**: 507-514.
65. **Kockx, M., K.A. Rye, K. Gaus, C.M. Quinn, J. Wright, T. Sloane, D. Sviridov, Y. Fu, D. Sullivan, J.R. Burnett, S. Rust, G. Assmann, G.M. Anantharamaiah, M.N. Palgunachari, S.L. Katz, M.C. Phillips, R.T. Dean, W. Jessup, and L. Kritharides.** 18-6-2004. Apolipoprotein A-I-stimulated apolipoprotein E secretion from human macrophages is independent of cholesterol efflux; *J.Biol.Chem.* **279**: 25966-25977.
66. **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.
67. **Kronqvist, R., P. Leppimaki, P. Mehto, and J.P. Slotte.** 1999. The effect of interleukin 1 beta on the biosynthesis of cholesterol, phosphatidylcholine, and sphingomyelin in fibroblasts, and on their efflux from cells to lipid-free apolipoprotein A-I; *Eur.J.Biochem.* **262**: 939-946.
68. **Kunkel, M.T. and E.G. Peralta.** 3-11-1995. Identification of domains conferring G protein regulation on inward rectifier potassium channels; *Cell* **83**: 443-449.
69. **Laemmli, U.K.** 15-8-1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature* **227**: 680-685.
70. **Langer, C., B. Gansz, C. Goepfert, T. Engel, Y. Uehara, G. von Dehn, H. Jansen, G. Assmann, and A. Von Eckardstein.** 6-9-2002. Testosterone up-regulates scavenger receptor BI and stimulates cholesterol efflux from macrophages; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **296**: 1051-1057.
71. **Langmann, T., J. Klucken, M. Reil, G. Liebisch, M.F. Luciani, G. Chimini, W.E. Kaminski, and G. Schmitz.** 2-4-1999. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **257**: 29-33.

72. **Langmann, T., G. Liebisch, C. Moehle, R. Schifferer, R. Dayoub, S. Heiduczek, M. Grandl, A. Dada, and G. Schmitz.** 30-5-2005. Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux; *Biochim.Biophys.Acta* **1740**: 155-161.
73. **Langmann, T., C. Schumacher, S.G. Morham, C. Honer, S. Heimerl, C. Moehle, and G. Schmitz.** 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.
74. **LaRosa, J.C., R.I. Levy, P. Herbert, S.E. Lux, and D.S. Fredrickson.** 9-10-1970. A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **41**: 57-62.
75. **Lazarowski, E.R., R.C. Boucher, and T.K. Harden.** 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules; *Mol.Pharmacol.* **64**: 785-795.
76. **Lei, Q., E.M. Talley, and D.A. Bayliss.** 18-5-2001. Receptor-mediated inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels involves G(alpha)q family subunits, phospholipase C, and a readily diffusible messenger; *J.Biol.Chem.* **276**: 16720-16730.
77. **Leon, C., C. Ravanat, M. Freund, J.P. Cazenave, and C. Gachet.** 1-10-2003. Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **23**: 1941-1947.
78. **Levade, T., N. Auge, R.J. Veldman, O. Cuvillier, A. Negre-Salvayre, and R. Salvayre.** 23-11-2001. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology; *Circ.Res.* **89**: 957-968.
79. **Li, Q., M. Tsujita, and S. Yokoyama.** 7-10-1997. Selective down-regulation by protein kinase C inhibitors of apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux in macrophages; *Biochemistry* **36**: 12045-12052.
80. **Li, Q. and S. Yokoyama.** 3-11-1995. Independent regulation of cholesterol incorporation into free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux in rat vascular smooth muscle cells; *J.Biol.Chem.* **270**: 26216-26223.
81. **Li, W., M.E. Rusiniak, S. Chintala, R. Gautam, E.K. Novak, and R.T. Swank.** 2004. Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles; *Bioessays* **26**: 616-628.

82. **Liebisch, G., W. Drobnik, B. Lieser, and G. Schmitz.** 2002. High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry; *Clin.Chem.* **48**: 2217-2224.
83. **Liebisch, G., W. Drobnik, M. Reil, B. Trumbach, R. Arnecke, B. Olgemoller, A. Roscher, and G. Schmitz.** 1999. Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) ; *J.Lipid Res.* **40**: 1539-1546.
84. **Liebisch, G., B. Lieser, J. Rathenberg, W. Drobnik, and G. Schmitz.** 8-11-2004. High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm; *Biochim.Biophys.Acta* **1686**: 108-117.
84. **Liebisch, G., M. Binder, R. Schifferer, T. Langmann, B. Schulz, and G. Schmitz.** High Throughput Quantification of Cholesterol and Cholestryl Ester by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (ESI-MS/MS); *Biochim.Biophys.Acta*; **akzeptiert**
86. **Lin, R.C. and R.H. Scheller.** 2000. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis; *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **16**: 19-49.
87. **LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent; *J.Biol.Chem.* **193**: 265-275.
88. **Luciani, M.F., F. Denizot, S. Savary, M.G. Mattei, and G. Chimini.** 1-5-1994. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9; *Genomics* **21**: 150-159.
89. **Lund, E., O. Andersson, J. Zhang, A. Babiker, G. Ahlborg, U. Diczfalusy, K. Einarsson, J. Sjovall, and I. Bjorkhem.** 1996. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of intracellular cholesterol in humans; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **16**: 208-212.
90. **Lund-Katz, S., H.M. Laboda, L.R. McLean, and M.C. Phillips.** 3-5-1988. Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange; *Biochemistry* **27**: 3416-3423.
91. **Lusa, S., M. Jauhainen, J. Metso, P. Somerharju, and C. Ehnholm.** 1-1-1996. 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.

92. **Luscher, C., L.Y. Jan, M. Stoffel, R.C. Malenka, and R.A. Nicoll.** 1997. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons; *Neuron* **19**: 687-695.
93. **Lusis, A.J.** 14-9-2000. Atherosclerosis; *Nature* **407**: 233-241.
94. **Mao, J., X. Wang, F. Chen, R. Wang, A. Rojas, Y. Shi, H. Piao, and C. Jiang.** 27-1-2004. Molecular basis for the inhibition of G protein-coupled inward rectifier K(+) channels by protein kinase C; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 1087-1092.
95. **Marteau, F., D. Communi, J.M. Boeynaems, and G.N. Suarez.** 2004. Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleotides diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells; *J.Leukoc.Biol.* **76**: 796-803.
96. **Martinez, L.O., B. Agerholm-Larsen, N. Wang, W. Chen, and A.R. Tall.** 26-9-2003a. Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I; *J.Biol.Chem.* **278**: 37368-37374.
97. **Martinez, L.O., S. Jacquet, J.P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J.E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret, and R. Barbaras.** 2-1-2003b. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis; *Nature* **421**: 75-79.
98. **Mendez, A.J.** 17-3-1995. 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.
99. **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.
100. **Mendez, A.J., J.F. Oram, and E.L. Bierman.** 5-6-1991. Protein kinase C as a mediator of high density lipoprotein receptor-dependent efflux of intracellular cholesterol; *J.Biol.Chem.* **266**: 10104-10111.
101. **Mendez, A.J. and L. Uint.** 1996. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol and phospholipid efflux depend on a functional Golgi apparatus; *J.Lipid Res.* **37**: 2510-2524.

-
102. **Mollers, C., W. Drobnik, T. Resink, and G. Schmitz.** 1995. High-density lipoprotein and low-density lipoprotein-mediated signal transduction in cultured human skin fibroblasts; *Cell Signal.* **7:** 695-707.
103. **Monick, M.M., A.B. Carter, G. Gudmundsson, L.J. Geist, and G.W. Hunninghake.** 1998. Changes in PKC isoforms in human alveolar macrophages compared with blood monocytes; *Am.J.Physiol* **275:** L389-L397.
104. **Munehira, Y., T. Ohnishi, S. Kawamoto, A. Furuya, K. Shitara, M. Imamura, T. Yokota, S. Takeda, T. Amachi, M. Matsuo, N. Kioka, and K. Ueda.** 9-4-2004. Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1; *J.Biol.Chem.* **279:** 15091-15095.
105. **Natarajan, P., T.M. Forte, B. Chu, M.C. Phillips, J.F. Oram, and J.K. Bielicki.** 4-6-2004. Identification of an apolipoprotein A-I structural element that mediates cellular cholesterol efflux and stabilizes ATP binding cassette transporter A1; *J.Biol.Chem.* **279:** 24044-24052.
106. **Navab, M., G.M. Anantharamaiah, S. Hama, G. Hough, S.T. Reddy, J.S. Frank, D.W. Garber, S. Handattu, and A.M. Fogelman.** 2005a. D-4F and statins synergize to render HDL antiinflammatory in mice and monkeys and cause lesion regression in old apolipoprotein E-null mice; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25:** 1426-1432.
107. **Navab, M., G.M. Anantharamaiah, S.T. Reddy, S. Hama, G. Hough, V.R. Grijalva, N. Yu, B.J. Ansell, G. Datta, D.W. Garber, and A.M. Fogelman.** 2005b. Apolipoprotein A-I mimetic peptides; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **25:** 1325-1331.
108. **Neufeld, E.B., J.A. Stonik, S.J. Demosky, Jr., C.L. Knapper, C.A. Combs, A. Cooney, M. Comly, N. Dwyer, J. Blanchette-Mackie, A.T. Remaley, S. Santamarina-Fojo, and H.B. Brewer, Jr.** 9-4-2004. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease; *J.Biol.Chem.* **279:** 15571-15578.
109. **Nevins, A.K. and D.C. Thurmond.** 21-1-2005. A direct interaction between Cdc42 and vesicle-associated membrane protein 2 regulates SNARE-dependent insulin exocytosis; *J.Biol.Chem.* **280:** 1944-1952.

110. **Nieland, T.J., A. Chroni, M.L. Fitzgerald, Z. Maliga, V.I. Zannis, T. Kirchhausen, and M. Krieger.** 2004. Cross-inhibition of SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol transport by the small molecules BLT-4 and glyburide; *J.Lipid Res.* **45**: 1256-1265.
111. **Nissen, S.E., T. Tsunoda, E.M. Tuzcu, P. Schoenhagen, C.J. Cooper, M. Yasin, G.M. Eaton, M.A. Lauer, W.S. Sheldon, C.L. Grines, S. Halpern, T. Crowe, J.C. Blankenship, and R. Kerensky.** 5-11-2003. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial; *JAMA* **290**: 2292-2300.
112. **Nissen, S.E., E.M. Tuzcu, P. Schoenhagen, B.G. Brown, P. Ganz, R.A. Vogel, T. Crowe, G. Howard, C.J. Cooper, B. Brodie, C.L. Grines, and A.N. DeMaria.** 3-3-2004. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial; *JAMA* **291**: 1071-1080.
113. **Nobusawa, A., T. Taniguchi, Y. Fujioka, H. Inoue, H. Shimizu, Y. Ishikawa, and M. Yokoyama.** 2000. Glibenclamide inhibits accumulation of cholestryl ester in THP-1 human macrophages; *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **36**: 101-108.
114. **Nofer, J.R., G. Herminghaus, M. Brodde, E. Morgenstern, S. Rust, T. Engel, U. Seedorf, G. Assmann, H. Bluethmann, and B.E. Kehrel.** 6-8-2004. Impaired platelet activation in familial high density lipoprotein deficiency (Tangier disease) ; *J.Biol.Chem.* **279**: 34032-34037.
115. **Ohta, H., E.A. Sweeney, A. Masamune, Y. Yatomi, S. Hakomori, and Y. Igarashi.** 1-2-1995. Induction of apoptosis by sphingosine in human leukemic HL-60 cells: a possible endogenous modulator of apoptotic DNA fragmentation occurring during phorbol ester-induced differentiation; *Cancer Res.* **55**: 691-697.
116. **Oram, J.F., A.M. Vaughan, and R. Stocker.** 26-10-2001. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol; *J.Biol.Chem.* **276**: 39898-39902.
117. **Oram, J.F. and S. Yokoyama.** 1996. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids; *J.Lipid Res.* **37**: 2473-2491.

118. **Orso, E., C. Broccardo, W.E. Kaminski, A. Bottcher, G. Liebisch, W. Drobni, A. Gotz, O. Chambenoit, W. Diederich, T. Langmann, T. Spruss, M.F. Luciani, G. Rothe, K.J. Lackner, G. Chimini, and G. Schmitz.** 2000. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice; *Nat.Genet.* **24**: 192-196.
119. **Owen, J.S. and J.V. Mulcahy.** 2002. ATP-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis; *Atheroscler.Suppl* **3**: 13-22.
120. **Panousis, C.G., G. Evans, and S.H. Zuckerman.** 2001. TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma; *J.Lipid Res.* **42**: 856-863.
121. **Phillips, M.C., K.L. Gillotte, M.P. Haynes, W.J. Johnson, S. Lund-Katz, and G.H. Rothblat.** 1998. Mechanisms of high density lipoprotein-mediated efflux of cholesterol from cell plasma membranes; *Atherosclerosis* **137 Suppl**: S13-S17.
122. **Qiu, M.R., T.J. Campbell, and S.N. Breit.** 2002. A potassium ion channel is involved in cytokine production by activated human macrophages; *Clin.Exp.Immunol.* **130**: 67-74.
123. **Ralevic, V. and G. Burnstock.** 1998. Receptors for purines and pyrimidines; *Pharmacol.Rev.* **50**: 413-492.
124. **Remaley, A.T., J.A. Stonik, S.J. Demosky, E.B. Neufeld, A.V. Bocharov, T.G. Vishnyakova, T.L. Eggerman, A.P. Patterson, N.J. Duverger, S. Santamarina-Fojo, and H.B. Brewer, Jr.** 26-1-2001. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **280**: 818-823.
125. **Ridgway, N.D.** 28-4-1995. Inhibition of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in Chinese hamster ovary (CHO) cells by short-chain ceramide and dihydroceramide; *Biochim.Biophys.Acta* **1256**: 39-46.
126. **Rodriguez, A. and D.C. Usher.** 2002. Anti-atherogenic effects of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor, avasimibe (CI-1011), in cultured primary human macrophages; *Atherosclerosis* **161**: 45-54.
127. **Ros, E.** 2000. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk; *Atherosclerosis* **151**: 357-379.

128. **Ross, R.** 14-1-1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease; N. Engl. J. Med. **340**: 115-126.
129. **Rothblat, G.H., M. Llera-Moya, E. Favari, P.G. Yancey, and G. Kellner-Weibel.** 2002. Cellular cholesterol flux studies: methodological considerations; Atherosclerosis **163**: 1-8.
130. **Rubic, T., M. Trottmann, and R.L. Lorenz.** 1-2-2004. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in moncytoid cells by niacin; Biochem.Pharmacol. **67**: 411-419.
131. **Rust, S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J.C. Piette, J.F. Deleuze, H.B. Brewer, N. Duverger, P. Denefle, and G. Assmann.** 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1; Nat.Genet. **22**: 352-355.
132. **Sawamura, T., N. Kume, T. Aoyama, H. Moriwaki, H. Hoshikawa, Y. Aiba, T. Tanaka, S. Miwa, Y. Katsura, T. Kita, and T. Masaki.** 6-3-1997. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein; Nature **386**: 73-77.
133. **Schmitz, G., G. Assmann, H. Robenek, and B. Brennhausen.** 1985a. Tangier disease: a disorder of intracellular membrane traffic; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **82**: 6305-6309.
134. **Schmitz, G. and C. Buechler.** 2002. ABCA1: regulation, trafficking and association with heteromeric proteins; Ann.Med. **34**: 334-347.
135. **Schmitz, G. and T. Langmann.** 15-6-2005. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression; Biochim.Biophys.Acta **1735**: 1-19.
136. **Schmitz, G., H. Robenek, U. Lohmann, and G. Assmann.** 1985b. 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.
137. **See, R.H., R.A. Caday-Malcolm, R.R. Singaraja, S. Zhou, A. Silverston, M.T. Huber, J. Moran, E.R. James, R. Janoo, J.M. Savill, V. Rigot, L.H. Zhang, M. Wang, G. Chimini, C.L. Wellington, S.R. Tafuri, and M.R. Hayden.** 1-11-2002. Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux; J.Biol.Chem. **277**: 41835-41842.

138. **Shankar, H., S. Murugappan, S. Kim, J. Jin, Z. Ding, K. Wickman, and S.P. Kunapuli.** 1-9-2004. Role of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels in P2Y12 receptor-mediated platelet functional responses; *Blood* **104**: 1335-1343.
139. **Shiratori, Y., A.K. Okwu, and I. Tabas.** 15-4-1994. Free cholesterol loading of macrophages stimulates phosphatidylcholine biosynthesis and up-regulation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase; *J.Biol.Chem.* **269**: 11337-11348.
140. **Singaraja, R.R., C. Fievet, G. Castro, E.R. James, N. Hennuyer, S.M. Clee, N. Bissada, J.C. Choy, J.C. Fruchart, B.M. McManus, B. Staels, and M.R. Hayden.** 2002. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis; *J.Clin.Invest* **110**: 35-42.
141. **Smith, J.D., W. Le Goff, M. Settle, G. Brubaker, C. Waelde, A. Horwitz, and M.N. Oda.** 2004. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I; *J.Lipid Res.* **45**: 635-644.
142. **Sone, H., H. Shimano, M. Shu, M. Nakakuki, A. Takahashi, M. Sakai, Y. Sakamoto, T. Yokoo, K. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Nakagawa, K.T. Iida, H. Suzuki, H. Toyoshima, S. Horiuchi, and N. Yamada.** 9-4-2004. Statins downregulate ATP-binding-cassette transporter A1 gene expression in macrophages; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **316**: 790-794.
143. **Spiegel, S. and A.H. Merrill, Jr.** 1996. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation; *FASEB J.* **10**: 1388-1397.
144. **Srivastava, R.A.** 2002. Estrogen-induced regulation of the ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) in mice: a possible mechanism of atheroprotection by estrogen; *Mol.Cell Biochem.* **240**: 67-73.
145. **Stamler, J., D. Wentworth, and J.D. Neaton.** 28-11-1986. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT); *JAMA* **256**: 2823-2828.
146. **Stark, H.** 2003. Pharmazie unserer Zeit, 32.Jahrgang, Nr.6, S.464-71.
147. **Steinberg, D., S. Parthasarathy, T.E. Carew, J.C. Khoo, and J.L. Witztum.** 6-4-1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity; *N. Engl.J.Med.* **320**: 915-924.

148. **Steinberg, S.F.** 15-12-2004. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C δ ; Biochem.J. **384**: 449-459.
149. **Suzuki, S., T. Nishimaki-Mogami, N. Tamehiro, K. Inoue, R. Arakawa, S. Abe-Dohmae, A.R. Tanaka, K. Ueda, and S. Yokoyama.** 2004. Verapamil increases the apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol by induction of ABCA1 expression via Liver X receptor-independent mechanism; Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. **24**: 519-525.
150. **Sviridov, D. and P. Nestel.** 2002. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis; Atherosclerosis **161**: 245-254.
151. **Szakacs, G., T. Langmann, C. Ozvegy, E. Orso, G. Schmitz, A. Varadi, and B. Sarkadi.** 16-11-2001. Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter; Biochem.Biophys.Res.Commun. **288**: 1258-1264.
152. **Tabas, I., S. Marathe, G.A. Keesler, N. Beatini, and Y. Shiratori.** 13-9-1996. Evidence that the initial up-regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in free cholesterol-loaded macrophages is an adaptive response that prevents cholesterol-induced cellular necrosis. Proposed role of an eventual failure of this response in foam cell necrosis in advanced atherosclerosis; J.Biol.Chem. **271**: 22773-22781.
153. **Takahashi, Y. and J.D. Smith.** 28-9-1999. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **96**: 11358-11363.
154. **Tanabe, F., S.H. Cui, and M. Ito.** 6-1-1998. Ceramide promotes calpain-mediated proteolysis of protein kinase C beta in murine polymorphonuclear leukocytes; Biochem.Biophys.Res.Commun. **242**: 129-133.
155. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications; Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **76**: 4350-4354.
156. **Trümbach, B.** 1997. Untersuchungen zum High Density Lipoprotein-vermittelten Efflux von Lipiden in Morbus Tangier.

157. **Tsukamoto, K., K. Hirano, K. Tsujii, C. Ikegami, Z. Zhongyan, Y. Nishida, T. Ohama, F. Matsuura, S. Yamashita, and Y. Matsuzawa.** 28-9-2001. ATP-binding cassette transporter-1 induces rearrangement of actin cytoskeletons possibly through Cdc42/N-WASP; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **287**: 757-765.
158. **Vaisman, B.L., G. Lambert, M. Amar, C. Joyce, T. Ito, R.D. Shamburek, W.J. Cain, J. Fruchart-Najib, E.D. Neufeld, A.T. Remaley, H.B. Brewer, Jr., and S. Santamarina-Fojo.** 2001. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice; *J.Clin.Invest* **108**: 303-309.
159. **Vassiliou, G. and R. McPherson.** 2004. A novel efflux-recapture process underlies the mechanism of high-density lipoprotein cholestryl ester-selective uptake mediated by the low-density lipoprotein receptor-related protein; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**: 1669-1675.
160. **Von Eckardstein, A., C. Langer, T. Engel, I. Schaukal, A. Cignarella, J. Reinhardt, S. Lorkowski, Z. Li, X. Zhou, P. Cullen, and G. Assmann.** 2001. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages; *FASEB J.* **15**: 1555-1561.
161. **Walter, M., H. Reinecke, U. Gerdts, J.R. Nofer, G. Hobbel, U. Seedorf, and G. Assmann.** 15-11-1996. Defective regulation of phosphatidylcholine-specific phospholipases C and D in a kindred with Tangier disease. Evidence for the involvement of phosphatidylcholine breakdown in HDL-mediated cholesterol efflux mechanisms; *J.Clin.Invest* **98**: 2315-2323.
162. **Wang, N., W. Chen, P. Linsel-Nitschke, L.O. Martinez, B. Agerholm-Larsen, D.L. Silver, and A.R. Tall.** 2003. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I; *J.Clin.Invest* **111**: 99-107.
163. **Wang, N., D. Lan, W. Chen, F. Matsuura, and A.R. Tall.** 29-6-2004. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 9774-9779.
164. **Wang, X.Q., C.G. Panousis, M.L. Alfaro, G.F. Evans, and S.H. Zuckerman.** 1-5-2002a. Interferon-gamma-mediated downregulation of cholesterol efflux and ABC1 expression is by the Stat1 pathway; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **22**: e5-e9.

165. **Wang, Y. and J.F. Oram.** 15-2-2002b. Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1; *J.Biol.Chem.* **277**: 5692-5697.
166. **Westman, J., B. Kallin, I. Bjorkhem, J. Nilsson, and U. Diczfalusy.** 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.
167. **Witting, S.R., J.N. Maiorano, and W.S. Davidson.** 10-10-2003. Ceramide enhances cholesterol efflux to apolipoprotein A-I by increasing the cell surface presence of ATP-binding cassette transporter A1; *J.Biol.Chem.* **278**: 40121-40127.
168. **Wong, J., C.M. Quinn, and A.J. Brown.** 2004. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux; *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **24**: 2365-2371.
169. **Yamamoto, T., A. Hoshino, S. Takahashi, Y. Kawarabayasi, H. Iijima, and J. Sakai.** 17-1-1995. 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.
170. **Yamauchi, Y., M. Hayashi, S. Abe-Dohmae, and S. Yokoyama.** 28-11-2003. Apolipoprotein A-I activates protein kinase C alpha signaling to phosphorylate and stabilize ATP binding cassette transporter A1 for the high density lipoprotein assembly; *J.Biol.Chem.* **278**: 47890-47897.
171. **Yancey, P.G., M. Llera-Moya, S. Swarnakar, P. Monzo, S.M. Klein, M.A. Connelly, W.J. Johnson, D.L. Williams, and G.H. Rothblat.** 24-11-2000. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI; *J.Biol.Chem.* **275**: 36596-36604.
172. **Zanotti, I., E. Favari, A.C. Sposito, G.H. Rothblat, and F. Bernini.** 27-8-2004. Pitavastatin increases ABCA1-mediated lipid efflux from Fu5AH rat hepatoma cells; *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **321**: 670-674.

173. **Zeng, L., H. Liao, Y. Liu, T.S. Lee, M. Zhu, X. Wang, M.B. Stemerman, Y. Zhu, and J.Y. Shyy.** 19-11-2004. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism; *J.Biol.Chem.* **279**: 48801-48807.
174. **Zhang, W., B. Asztalos, P.S. Roheim, and L. Wong.** 1998. Characterization of phospholipids in pre-alpha HDL: selective phospholipid efflux with apolipoprotein A-I; *J.Lipid Res.* **39**: 1601-1607.
175. **Zhang, W.Y., P.M. Gaynor, and H.S. Kruth.** 8-11-1996. Apolipoprotein E produced by human monocyte-derived macrophages mediates cholesterol efflux that occurs in the absence of added cholesterol acceptors; *J.Biol.Chem.* **271**: 28641-28646.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Rainer Schifferer