

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten  
der Ludwigs-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. P.C. Weber

**Der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Expression und  
Regulation von Schlüsselrezeptoren der Cholesterin-  
Homöostase in Makrophagen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sabine Rode  
aus Garmisch-Partenkirchen

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhard L. Lorenz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Adelbert Roscher

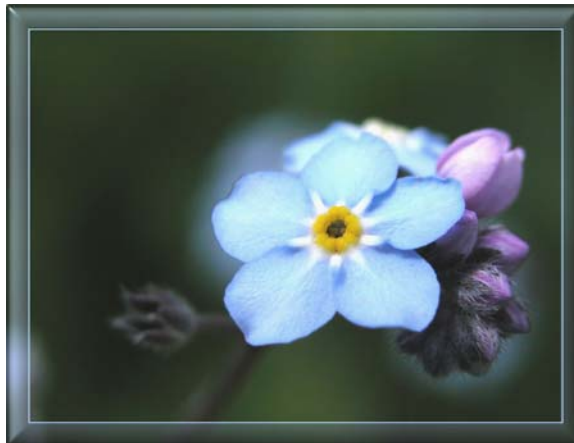
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Bernhard Heindl

Priv. Doz. Dr. Michael Weis

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2009

Gewidmet meiner Oma,  
Zeit ihres Lebens eine starke Frau,  
die immer für andere da war.



# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>1</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>11</b> |
| <b>1.1</b> | <b>ANTIOXIDANTIEN.....</b>  | <b>11</b> |
| <b>1.2</b> | <b><math>\alpha</math>-TOCOPHEROL.....</b>  | <b>12</b> |
| 1.2.1      | VORKOMMEN UND STRUKTUR .....  | 12        |
| 1.2.2      | PHYSIOLOGISCHE FUNKTION UND WIRKUNGSWEISE VON $\alpha$ -TOCOPHEROL – NICHT NUR EIN ANTIOXIDANS? ..... | 15        |
| 1.2.3      | REGULATION DER GENEXPRESSION DURCH $\alpha$ -TOCOPHEROL .....   | 16        |
| <b>1.3</b> | <b>ATHEROSKLEROSE .....</b>   | <b>18</b> |
| 1.3.1      | ATHEROGENESE .....  | 18        |
| 1.3.2      | NUKLEÄRE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN PPAR $\gamma$ UND LXR $\alpha$ .....                                  | 20        |
| 1.3.3      | LDL-REZEPTOR UND SCAVENGER REZEPTOR CD36 .....  | 23        |
| 1.3.4      | REVERSER CHOLESTERINTRANSPORT .....   | 26        |
| 1.3.5      | ABC-TRANSPORTER – ABCA1 UND ABCG1 .....   | 28        |
| 1.3.6      | DIE WIRKUNG VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DIE ATHEROSKLEROSE.....                                      | 32        |
| <b>2</b>   | <b>FRAGESTELLUNGEN.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>3.1</b> | <b>VERWENDETE CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.2</b> | <b>LÖSUNGEN UND PUFFER.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.3</b> | <b>VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.....</b>  | <b>40</b> |
| <b>3.4</b> | <b>VERWENDETE GERÄTE .....</b>  | <b>41</b> |
| <b>3.5</b> | <b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>   | <b>43</b> |
| 3.5.1      | KULTIVIERUNG VON THP-1 ZELLEN.....  | 43        |
| 3.5.2      | KULTIVIERUNG VON HEPG2-UND HEPG2 LXRE-LUC ZELLEN .....  | 43        |
| 3.5.3      | PRÄPARATION VON PBMCs.....  | 43        |

---

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| 3.5.4       | LAGERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN.....   | 44        |
| 3.5.5       | AUFNAHME- UND EFFLUX ASSAY .....  | 45        |
| 3.5.6       | TRANSFEKTION VON PMA-DIFFERENZIIERTEN THP-1 UND HEPG2.....                      | 46        |
| 3.5.7       | SELEKTION VON STABIL-TRANSFIZIERTEN ZELLEN .....                                | 47        |
| 3.5.8       | DURCHFLUßZYTOMETRIE / FACS .....  | 47        |
| <b>3.6</b>  | <b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>                                       | <b>49</b> |
| 3.6.1       | AGAROSEGELELEKTROPHORESE .....  | 49        |
| 3.6.2       | RESTRIKTIONSVERDAU .....  | 49        |
| 3.6.3       | TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> (DH5 $\alpha$ ) DURCH HITZESCHOCK.....        | 50        |
| 3.6.4       | KLONIERUNG .....  | 50        |
| 3.6.5       | PRÄPARATION VON PLASMID-DNA .....   | 51        |
| 3.6.6       | PLASMIDSEQUENZIERUNG.....   | 51        |
| 3.6.7       | PRÄPARATION VON GESAMT-RNA .....  | 52        |
| 3.6.8       | QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR .....   | 53        |
| <b>3.7</b>  | <b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....</b>   | <b>60</b> |
| 3.7.1       | ANZUCHT VON <i>E. COLI</i> .....  | 60        |
| 3.7.2       | GEFRIERKULTUREN VON <i>E. COLI</i> .....  | 60        |
| 3.7.3       | HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN.....                                    | 60        |
| <b>3.8</b>  | <b>PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....</b>  | <b>61</b> |
| 3.8.1       | GESAMTPROTEINEXTRAKTION .....   | 61        |
| 3.8.2       | PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY <sup>136</sup> .....                               | 61        |
| 3.8.3       | SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE .....                                       | 62        |
| 3.8.4       | IMMUNOBLOT .....  | 63        |
| 3.8.5       | LXRE- / PPRE- TRANSAKTIVIERUNGS-LUCIFERASE-ASSAY.....                           | 64        |
| <b>3.9</b>  | <b>ANALYSE VON LIPOPROTEINEN UND VITAMIN E.....</b>                             | <b>65</b> |
| 3.9.1       | ISOLIERUNG UND NACHWEIS VON LIPOPROTEINEN AUS PLASMA .....                      | 65        |
| 3.9.2       | HERSTELLEN VON NATIVEM UND OXIDIERTEM LDL.....                                  | 65        |
| 3.9.3       | DELIPIDIEREN VON HDL (dHDL).....  | 66        |
| 3.9.4       | LIPOPROTEIN-ELEKTROPHORESE .....  | 67        |
| 3.9.5       | EXTRAKTION ZELLULÄRER LIPIDE UND CHOLESTEROL-OXIDASE ASSAY .....                | 67        |
| 3.9.6       | EXTRAKTION SEKRETIERTER LIPIDE AUS RPMI-KULTURMEDIUM.....                       | 67        |
| 3.9.7       | OIL RED O-FÄRBUNG.....  | 68        |
| 3.9.8       | BESTIMMUNG DES VIT E-GEHALTS MITTELS HPLC .....                                 | 68        |
| <b>3.10</b> | <b>RADIOCHEMISCHE METHODEN.....</b>   | <b>69</b> |
| 3.10.1      | AUFNAHME-/EFFLUX-ASSAY MIT [ <sup>3</sup> H]-CHOLESTERIN-MARKIERTEM OXLDL ..... | 69        |
| <b>3.11</b> | <b>STATISTISCHE AUSWERTUNG.....</b>   | <b>70</b> |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>   | <b>71</b>  |
| 4.1      | ALLGEMEINER EXPERIMENTAUFBAU .....  | 71         |
| 4.2      | $\alpha$ -TOCOPHEROL-GEHALT VON MAKROPHAGEN.....  | 72         |
| 4.3      | WIRKUNG VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DIE SPEZIFISCHE mRNA EXPRESSION IN<br>MAKROPHAGEN .....                                    | 74         |
| 4.3.1    | TRANSKRIPTION DES SCAVENGER REZEPTORS CD36 .....  | 74         |
| 4.3.2    | TRANSKRIPTION DES LDL-REZEPTORS .....   | 75         |
| 4.3.3    | TRANSKRIPTION DER CHOLESTERIN-EXPORTER ABCA1 UND ABCG1 .....  | 76         |
| 4.3.4    | TRANSKRIPTION DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN PPAR $\gamma$ UND LXR $\alpha$ .....   | 78         |
| 4.4      | EINFLUß VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DIE AKTIVIERUNG VON LXRE UND PPRE .....  | 80         |
| 4.4.1    | ANALYSE DER AKTIVIERUNG VON PPRE MITHILFE DES REPORTERGENKONSTRUKTS PGL3-<br>PPRE(AcO)LUC.....                                  | 80         |
| 4.4.2    | ANALYSE DER AKTIVIERUNG VON LXRE MITHILFE DES REPORTERGENKONSTRUKTS pCMV-<br>LXRE-LUC .....                                     | 82         |
| 4.5      | MECHANISTISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT $\gamma$ -TOCOPHEROL.....   | 84         |
| 4.6      | DER EINFLUSS VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DIE PROTEINEXPRESSION ANALYSIERT<br>MITTELS DURCHFLUßZYTOMETRIE UND WESTERNBLOT ..... | 89         |
| 4.6.1    | CD36 PROTEINEXPRESSION NACH $\alpha$ -TOCOPHEROL-BEHANDLUNG.....  | 89         |
| 4.6.2    | ABCA1 PROTEINEXPRESSION NACH $\alpha$ -TOCOPHEROL-BEHANDLUNG .....  | 90         |
| 4.7      | EINFLUSS VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DIE ZELLULÄRE CHOLESTERIN-HOMÖOSTASE. 92  |            |
| 4.7.1    | [ $^3$ H]-CHOLESTERIN-AUFNAHME AUS [ $^3$ H]-CHOLESTERIN-MARKIERTEM oxLDL UND [ $^3$ H]-<br>CHOLESTERIN-EFFLUX AUF dHDL.....    | 92         |
| 4.7.2    | EINFLUß VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DEN ZELLULÄREN CHOLESTERIN-BESTAND .....   | 96         |
| 4.7.3    | EINFLUß VON $\alpha$ -TOCOPHEROL AUF DIE MIKROSKOPISCHE AKKUMULATION VON FETTTRÖPFCHEN  | 98         |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>102</b> |
| 5.1      | ZELLULÄRE $\alpha$ -TOCOPHEROL-AKKUMULATION IN MAKROPHAGEN.....   | 103        |
| 5.2      | $\alpha$ -TOCOPHEROL VERMINDERT DIE ZELLULÄRE LIPIDAUFNAHME .....   | 104        |
| 5.2.1    | $\alpha$ -TOCOPHEROL REDUZIERT DIE EXPRESSION DES NUKLEÄREN TRANSKRIPTIONSFAKTORS PPAR $\gamma$<br>104                          |            |
| 5.2.2    | $\alpha$ -TOCOPHEROL REDUZIERT DIE EXPRESSION DES SCAVENGER REZEPTORS CD36.....   | 106        |
| 5.2.3    | FUNKTIONELLE AUSWIRKUNG DER VERMINDERTEN CD36 EXPRESSION .....  | 107        |
| 5.2.4    | $\alpha$ -TOCOPHEROL BEEINFLUSST DIE TRANSKRIPTION DES LDL-REZEPTORS NICHT.....   | 109        |

---

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>5.3</b> | <b><math>\alpha</math>-TOCOPHEROL SUPPRIMIERT DEN ZELLULÄREN CHOLESTERIN-EXPORT .....</b>  | <b>110</b> |
| 5.3.1      | $\alpha$ -TOCOPHEROL BEEINFLUSST DIE EXPRESSION DES NUKLEÄREN TRANSKRIPTIONSFAKTORS LXR $\alpha$<br>110                          |            |
| 5.3.2      | $\alpha$ -TOCOPHEROL REDUZIERT DIE TRANSKRIPTION DER EFFLUX-TRANSPORTER ABCA1 UND<br>ABCG1 .....                                 | 112        |
| 5.3.3      | FUNKTIONELLE AUSWIRKUNG DER VERMINDERTEN ABCA1 UND ABCG1 EXPRESSION .....  | 114        |
| <b>5.4</b> | <b>MÖGLICHE RELEVANZ VON <math>\alpha</math>-TOCOPHEROL FÜR DIE ZELLULÄRE CHOLESTERIN-<br/>HOMÖOSTASE UND ATHEROGENESE .....</b> | <b>115</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>119</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATUR.....</b>  | <b>122</b> |
|            | <b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>   | <b>139</b> |
|            | <b>DANKSAGUNG.....</b>   | <b>141</b> |
|            | <b>ERKLÄRUNG .....</b>   | <b>142</b> |
|            | <b>LEBENS LAUF.....</b>  | <b>143</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                          |   |
|--------------------------|---|
| dd-PGJ <sub>2</sub>      | 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin D <sub>2</sub>                  |
| 9cRA                     | 9-cis Retinolsäure  |
| 22-HOC                   | 22-(R)-Hydroxycholesterol   |
| ABCA1                    | ATP binding cassette transporter A1                                       |
| ABCG1                    | ATP binding cassette transporter G1                                       |
| AP-1                     | Aktivator Protein-1   |
| Apo A-I                  | Apolipoprotein A-I  |
| APS                      | Ammoniumpersulfat   |
| ATP                      | Adenosintriphosphat   |
| bp                       | Basenpaare  |
| BSA                      | <i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserum-Albumin)                         |
| cDNA                     | komplementäre DNA   |
| CEHC                     | $\alpha$ -Carboxyl-Ethyl-Hydroxychroman                                   |
| CETP                     | cholesteryl ester transfer protein  |
| COX                      | Cyclooxygenase  |
| C <sub>t</sub> -Wert     | threshold cycle   |
| DEPC                     | Diethylpyrocarbonat   |
| DMSO                     | Dimethylsulfoxid  |
| dHDL                     | delipidiertes HDL   |
| DNA                      | Desoxyribonucleinsäure  |
| DNase                    | Desoxyribonuclease  |
| dNTPs                    | Nucleosidtriphosphate   |
| dsDNA                    | doppelstränige DNA  |
| DTT                      | Dithiotreitol   |
| EDTA                     | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| E.coli                   | Escherichia coli  |
| FACS<br><i>sorting</i> ) | Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence-activated cell</i> |
| FITC                     | Fluoresceinisothiocyanat  |
| FCS                      | <i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)                             |
| g                        | Erdbeschleunigung   |
| GAPDH                    | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                                  |



---

|                    |  |
|--------------------|--|
| HepG2              | humane Leberzelllinie                                    |
| HDL                | high density lipoprotein                                 |
| HMG-CoA            | Hydroxy-methyl-glutaryl-Coenzym A                        |
| HODE               | Hydroxyoctadecadiensäure                                 |
| HPLC               | High Performance Liquid Chromatography                   |
| HRP                | Meerrettichperoxidase ( <i>horse radish peroxidase</i> ) |
| IL                 | Interleukin  |
| kDa                | Kilodalton   |
| LB                 | luria broth  |
| LCAT               | Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase                     |
| LDL                | low density lipoprotein                                  |
| LDL-R              | LDL-Rezeptor   |
| LXR $\alpha$       | liver X receptor alpha                                   |
| LXRE               | liver X receptor - Element                               |
| MCS-F              | macrophage-colony stimulating factor                     |
| M-MLV              | moloney murine leukaemia virus                           |
| mRNA               | <i>messenger</i> RNA                                     |
| rRNA               | ribosomale RNA   |
| tRNA               | Transfer-RNA   |
| oxLDL              | oxidiertes LDL   |
| OD                 | optische Dichte  |
| PAGE               | Polyacrylamidgelelektrophorese                           |
| PBS                | Phosphat-gepufferte Salzlösung                           |
| PBS <sup>-/-</sup> | PBS ohne Kalzium und Magnesium                           |
| PBS <sup>+/+</sup> | PBS mit Kalzium und Magnesium                            |
| PBMCs              | periphere mononukleäre Blutzellen                        |
| PCR                | Polymerasekettenreaktion                                 |
| pd(N) <sub>6</sub> | Random Hexamer Primer                                    |
| PFA                | Paraformaldehyd  |
| PLTP               | phospholipid transfer protein                            |
| PKC                | Proteinkinase C  |
| PMA                | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat                            |
| PPAR $\gamma$      | peroxisome proliferator-activated receptor gamma         |
| PPRE               | peroxisome proliferator-activated receptor - Element     |

---

|             |   |
|-------------|---|
| RNA         | Ribonucleinsäure                              |
| RNase       | Ribonuclease                                  |
| RT          | Raumtemperatur                                |
| RT-PCR      | Reverse Transkription mit anschließender PCR  |
| RXR         | Retinolsäure-X-Rezeptor                       |
| SCAP        | SREBP cleavage activating protein             |
| SOD         | Superoxiddismutase                            |
| SREBP       | sterol regulatory element-binding protein     |
| SDS         | Natriumdodecylsulfat                          |
| SR-BI       | Scavenger Rezeptor BI                         |
| TAP         | Tocopherol associated protein                 |
| TBP         | Tocopherol binding protein                    |
| TEMED       | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin         |
| TBS-T       | Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween 20 |
| TGF $\beta$ | tumor growth factor beta                      |
| THP-1       | humane monozytäre Zelllinie                   |
| TRIS        | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan              |
| TTP         | $\alpha$ -Tocopherol-Transfer Protein         |
| U/min       | Umdrehungen pro Minute                        |
| VLDL        | very low density lipoprotein                  |

Es wurden die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elemente verwendet.

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Antioxidantien

Reaktive Sauerstoffspezies wie das Superoxidanion ( $O_2^-$ ), das Hydroxylradikal ( $OH^\cdot$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) sind Moleküle, die von Zellen in defizitären und in der Folge pathologischen Zuständen vermehrt produziert werden. Dies kann zu DNA-Strangbrüchen und Basenfehlpaarungen führen, aber auch zur Oxidation von Proteinen und Lipiden, die die Integrität der Zellmembranen schädigen. Neben zellulär enzymatischen Entgiftungssystemen, wie der Superoxiddismutase, der Glutathionperoxidase oder der Katalase, besitzen Zellen nicht-enzymatische Abwehrmechanismen wie hydrophile und hydrophobe Antioxidantien um oxidativen Stress zu verhindern (Abbildung 1) <sup>1</sup>. In den Mitochondrien und hydrophilen Kernkompartimenten sind hydrophile Antioxidantien wie Vitamin C und Glutathion zu finden, deren intrazelluläre Konzentration 1 - 10 mM beträgt. Hydrophobe Antioxidantien wie Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) und Carotinoide finden sich in Lipoproteinen und Membranen, wo sie entweder die Lipidperoxidation hemmen, indem sie Peroxidradikale ( $ROO^\cdot$ ) zerstören oder die Hydroperoxidbildung aus Singulett-Sauerstoff blockieren. Die Superoxiddismutase katalysiert die Reaktion vom Superoxidanion zum Wasserstoffperoxid, welches durch die Katalase und Glutathionperoxidase entgiftet wird.  $\alpha$ -Tocopherol fängt Lipidperoxidradikale durch Hydrogentransfer ab. Das stabilisierte Peroxidradikal ( $\alpha$ -Tocopheroxylradikal) wird z. B. mithilfe von Vitamin C oder Glutathion wieder zu  $\alpha$ -Tocopherol regeneriert <sup>2</sup>.

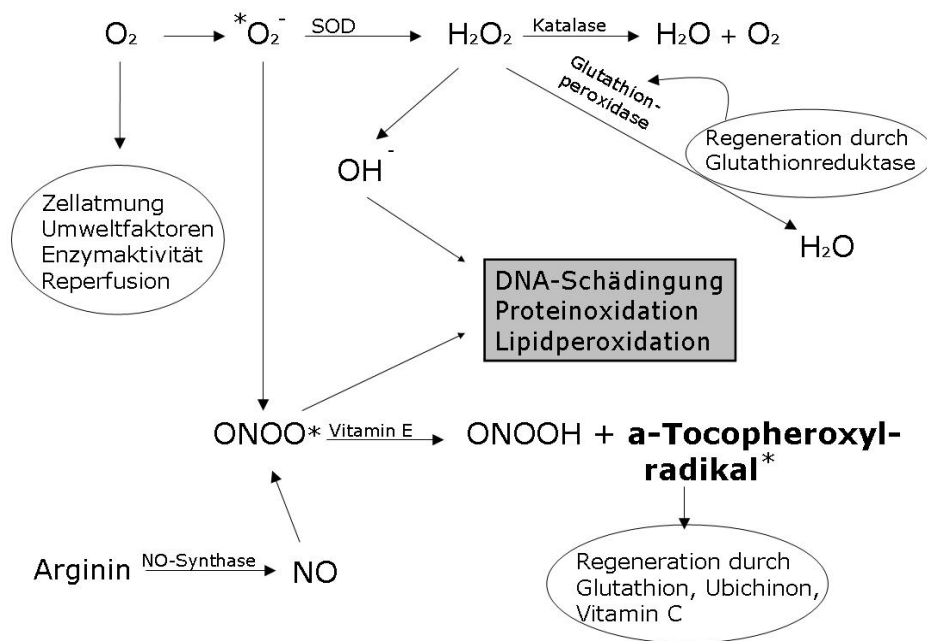


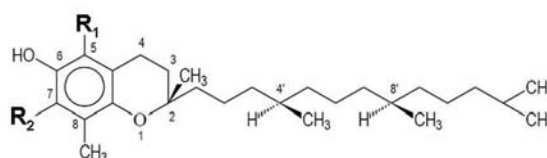
Abbildung 1: Antioxidantien (Vitamin E, SOD, Glutathionperoxidase oder Katalase) schützen die Zelle vor den Auswirkungen von oxidativem Stress und somit vor reaktiven Stickstoff- oder Sauerstoffspezies. Teilweise können Antioxidantien enzymatisch oder durch andere Antioxidantien wieder regeneriert werden z. B. die Glutathionperoxidase durch die Glutathionreduktase oder auch Vitamin E durch Vitamin C

## 1.2 α-Tocopherol

### 1.2.1 Vorkommen und Struktur

Entdeckt im Jahre 1922 als Reproduktionsfaktor bei Ratten<sup>3</sup>, werden dem Vitamin E protektive Effekte bei der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen, Krebs und chronischen Entzündungen zugeschrieben<sup>4</sup>. α-Tocopherol verhindert sowohl die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Membranen<sup>5</sup> als auch die Oxidation von LDL<sup>6</sup>. Es fungiert als Koenzym in Zellmembranen und dient als Radikalfänger. Essentiell ist es für die Fruchtbarkeit und die Fortpflanzung, aber es ist auch in die Entstehung der Erythrozyten involviert. In der Natur findet man α-Tocopherol vorwiegend in Getreidekeimen und pflanzlichen Ölen wie Weizenkeim- oder Sonnenblumenöl, sowie in Nüssen, grünem/gelbem Gemüse und Eigelb.

Der Sammelbegriff Vitamin E umfasst  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherole (Abbildung 2) und  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocotrienole, welche nach oraler Aufnahme im Darm mit Fettmicellen resorbiert werden und über Chylomikronen in den Blutkreislauf gelangen. Vier natürliche Tocopherol-Regioisomere sind bekannt. Synthetisches Vitamin E ist in der Regel ein Racemat der Stellungsisomere an der Seitenkette.



| Name                 | -R <sub>1</sub>  | -R <sub>2</sub>  | Regioisomere  |
|----------------------|------------------|------------------|---|
| $\alpha$ -Tocopherol | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> is 5,7,8 - trimethyltolcol |
| $\beta$ -Tocopherol  | -CH <sub>3</sub> | -H               | C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> is 5,8 - trimethyltolcol   |
| $\gamma$ -Tocopherol | -H               | -CH <sub>3</sub> | C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> is 7, 8 - trimethyltolcol  |
| $\delta$ -Tocopherol | -H               | -H               | C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub> is 8 - trimethyltolcol     |

Abbildung 2: Die Grundstruktur aller Vitamin E-Formen bildet ein an Position 6 hydroxylierter Chromanring, der an Position 2 bei den Tocopherolen mit einer gesättigten Seitenkette und bei den Tocotrienolen mit einer ungesättigten Seitenkette verknüpft ist. Tocopherole und Tocotrienole werden in Abhängigkeit von der Methylierung des Chromanrings in eine  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\delta$ -Form unterteilt

Von den natürlichen, alle RRR-Tocopherole, besitzt RRR- $\alpha$ -Tocopherol die stärkste biologische antioxidative Aktivität *in vivo*, welches nach Absorption in der Leber spezifisch mit VLDL sezerniert wird. Dieser Vorgang wird durch das  $\alpha$ -Tocopherol Transferprotein ( $\alpha$ -TTP) moduliert. Die übrigen Tocopherole und Tocotrienole werden bevorzugt über die Galle ausgeschieden. Der  $\alpha$ -Tocopherol-Plasmaspiegel liegt beim Menschen normalerweise bei 25  $\mu$ M und kann, abhängig von Menge und Dauer der Supplementierung, um den Faktor 2-3 angehoben werden<sup>7-9</sup>. Die Aufnahme in extrahepatische Gewebe erfolgt über LDL-Rezeptoren.  $\alpha$ -Tocopherol kann über den ABCA1, ein wichtiger Sterol-Effluxtransporter z. B. in Makrophagen (1.3.5), auf HDL übertragen werden oder als Haupteliminationsprodukt, das  $\alpha$ -Carboxyl-Ethyl-Hydroxychroman (CEHC), über die Niere ausgeschieden werden (Abbildung 3)<sup>4</sup>.

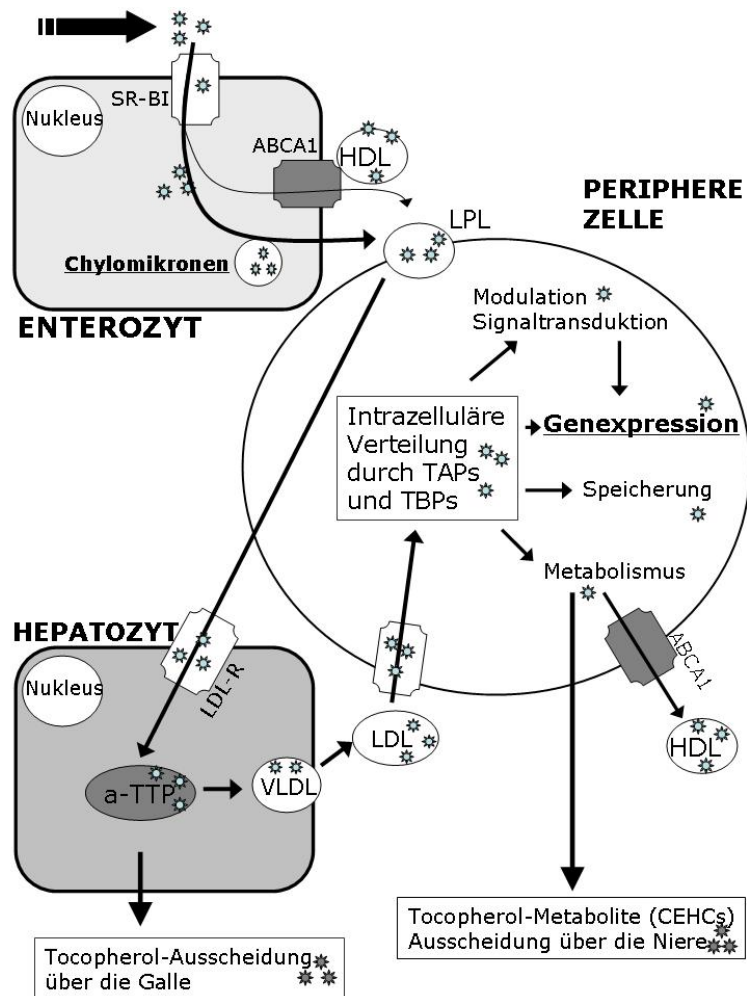


Abbildung 3: Tocopherole werden im Darm resorbiert und in Chylomikronen zu den peripheren Geweben transportiert. Nach Hydrolyse durch die Lipoproteinlipase (LPL) gelangt der größte Teil mit den Chylomikronen-Remnants zu den Hepatozyten und wird über den LDL-Rezeptor (LDL-R) aufgenommen. Das  $\alpha$ -Tocopherol wird spezifisch vom intrazellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Transfer-Protein ( $\alpha$ -TTP) in VLDL sezerniert und gelangt schließlich über LDL zu den peripheren Zellen. Sekretion erfolgt hauptsächlich über die Galle. Die  $\alpha$ -Tocopherol enthaltenden LDL-Partikel werden von den peripheren Zellen über den LDL-R aufgenommen. Das  $\alpha$ -Tocopherol wird intrazellulär durch Tocopherol-assoziierte Proteine (TAPs) und Tocopherol Bindeproteine (TBPs) zu seinen Wirkorten verteilt. In den Zellen moduliert das  $\alpha$ -Tocopherol Wege der Signaltransduktion (z.B. Proteinkinase C) oder nimmt direkten Einfluß auf die Genexpression. HDL wird über ABCA1 mit  $\alpha$ -Tocopherol angereichert. Ein Teil des Tocopherols wird zu CEHC metabolisiert und über die Niere ausgeschieden <sup>10, 11</sup>.

### 1.2.2 Physiologische Funktion und Wirkungsweise von $\alpha$ -Tocopherol – nicht nur ein Antioxidans?

Als Antioxidans wird jede Substanz definiert, die, auch wenn sie in geringerer Konzentration als die zu oxidierenden Substrate präsent ist, deren Oxidation verzögert, beziehungsweise ganz verhindert.

$\alpha$ -Tocopherol gilt als wirksamster Peroxid-Radikalfänger in Membranen und in Lipoproteinen (LDL) <sup>6, 12</sup>. Es entfaltet seine antioxidative Wirkung, indem es z. B. Peroxid-Radikale von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Phospholipiden in Membranen und Lipoproteinen reduziert (Abbildung 2).  $\alpha$ -Tocopherol ist im Plasma <sup>13</sup> und in Erythrozyten <sup>14</sup> das wichtigste lipidlösliche Antioxidationsmittel, welches Lipide gegen peroxidative Schäden zu schützen vermag und macht ca. 90% aller Gewebe-Tocopherole aus <sup>15</sup>.

Es existieren folgende Hinweise, dass die direkte antioxidative Wirkung nicht der einzige Mechanismus ist, über den  $\alpha$ -Tocopherol biologische Wirkung entfaltet.  $\alpha$ -Tocopherol übt immunstimulierende und anti-inflammatorische Wirkungen aus, die sich daraus ergeben, dass  $\alpha$ -Tocopherol in der Lage ist, Lysosomen zu stabilisieren, die IL-2-Produktion zu erhöhen und die Prostaglandin  $E_2$ -Synthese zu reduzieren <sup>16</sup>. Durch  $\alpha$ -Tocopherol wird die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen und IL-1 $\beta$  durch Hemmung des 5-Lipoxygenase-Reaktionsweges vermindert <sup>17</sup>. Außerdem können die Zelladhäsion und die enzymatische Superoxidanion-Produktion durch  $\alpha$ -Tocopherol gehemmt werden, welche zentrale Prozesse bei Entzündungsgeschehen ausmachen <sup>18-20</sup>.

Der Zusammenhang zwischen  $\alpha$ -Tocopherol und der Induktion von Signaltransduktionswegen beziehungsweise der Steigerung oder Hemmung der Transkriptionsaktivität wurde in unterschiedlichen Zellen untersucht. Die Arbeitsgruppe von Angelo Azzi fand heraus, dass  $\alpha$ -Tocopherol in der Lage ist, AP-1 zu aktivieren. Dies geschieht unter Bedingungen, unter denen die Proteinkinase C gehemmt oder inaktiviert wird <sup>21</sup>. Auch findet eine Verhinderung der AP-1 Aktivierung durch  $\alpha$ -Tocopherol statt, wenn die

Proteinkinase C stimuliert wird<sup>22</sup>. Diese Effekte konnten durch  $\gamma$ -Tocopherol, welches ähnliche antioxidative Eigenschaften besitzt, nicht ausgelöst werden. Daraus schlossen Azzi *et al.*, dass  $\alpha$ -Tocopherol in glatten Gefäßmuskelzellen durch stereospezifische Kontrolle von Signaltransduktionswegen wirken kann<sup>23, 24</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die totale und nicht-spezifische Transkriptionsaktivität in der Leber von Ratten höher war, wenn diesen 30 IU  $\alpha$ -Tocopherol-Acetat pro Kilogramm Körpergewicht zugefüttert wurde<sup>25</sup>. Auch Azzi *et al.* stellten fest, dass die Transkription mehrerer Gene durch  $\alpha$ -Tocopherol reguliert werden kann<sup>26</sup>. Durch  $\alpha$ -Tocopherol wurde z. B. eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -Tropomyosin beobachtet<sup>24</sup>. Die Kollagen- $\alpha$ -1(I) Genexpression in der Leber konnte durch eine Langzeit- oder Kurzzeit-Supplementation mit  $\alpha$ -Tocopherol gehemmt werden<sup>27</sup>.

### 1.2.3 Regulation der Genexpression durch $\alpha$ -Tocopherol

Bis heute sind ungefähr 30 Gene bekannt, deren mRNA Expression durch  $\alpha$ -Tocopherol beeinflusst wird. Diese Gene kodieren für Proteine der extrazellulären Matrix, Apoptosefaktoren, Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren und für Proteine, die Einfluß auf den Zellzyklus nehmen oder für den Metabolismus in den Zellen mitverantwortlich sind (Tabelle 1)<sup>28</sup>. Einige dieser Gene spielen bei der Atheroskleroseentstehung eine wichtige Rolle. So wird der CD36-Rezeptor, der die Aufnahme von oxLDL in glatte Gefäßmuskelzellen der Arterien befördert, herunterreguliert. Durch Inhibition der Genexpression der Zelladhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM wird die Adhäsion von Monozyten an die Endothelzellen der arteriellen Gefäße, ein wichtiger Faktor in der Atheroskleroseentstehung, verringert. Durch Induktion der Genexpression von  $\alpha$ -TTP reguliert das  $\alpha$ -Tocopherol in gewissem Rahmen auch seinen Plasmaspiegel selbst (Abbildung 3).



Tabelle 1: Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Genexpression der Atheroskleroseentstehung. Modifiziert nach Munteanu et al. <sup>28</sup>

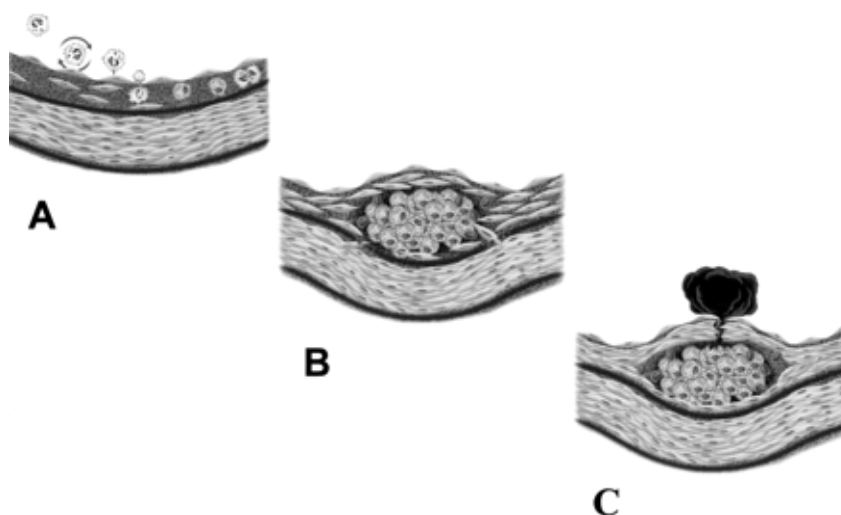
| KATEGORIE             | GENE                                | NORMALE FUNKTION   | EFFEKT $\alpha$ -Tocopherol |
|-----------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------|
| REZEPTOREN            | CD36, SR-BI, SR-AI/II               | Aufnahme von oxLDL in die Zelle                            | -                           |
| EXTRAZELL. MATRIX     | E-, L-Selektin, ICAM-1, Integrine,  | Monozytenadhäsion an Endothelzellen                        | -                           |
|                       | Kollagen 1a, Glycoprotein 2b        | Thrombozytenadhäsion                                       | -                           |
| WACHSTUMS-FAKTOREN    | CTGF                                | Proliferation und Plaquestabilisierung                     | -                           |
| INFLAMMATOR. ZYTOKINE | TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, | Chemotaxis von Entzündungszellen                           | -                           |
| ZELLZYKLUS-REGULATION | P27                                 | Inhibition der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen | -                           |
|                       | Cyclin d1, Cyclin E                 | Induktion der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen  | -                           |
| APOPTOSE              | CD95L                               | Apoptoseinduktion  | -                           |
|                       | Bcl2-L1                             | Apoptoseinhibition   | +                           |
| TRANSKRIPTION         | PPAR $\gamma$                       | Induktion der Transkription                                | +                           |
| METABOLISMUS          | HMG-CoA-Reduktase                   | Cholesterinsynthese  | +                           |
|                       | LDL-Rezeptor                        | Aufnahme von LDL   | +                           |
|                       | $\alpha$ -TTP                       | Regulation des Plasmaspiegels von $\alpha$ -Tocopherol     | +                           |

## 1.3 Atherosklerose

### 1.3.1 Atherogenese

Die Begriffe Atherosklerose und Arteriosklerose werden im Deutschen meist synonym gebraucht und stehen nach WHO-Definition für eine variable Kombination von Veränderungen der Intima arterieller Blutgefäße, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Ablagerung von Calziumsalzen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Weltweit stellt sie eine der häufigsten Erkrankungen dar, die sich jedoch klinisch meist erst im späteren Lebensalter in Form von Myokardinfarkt, Apoplex oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit manifestiert und häufig zum Tode führt. Im Jahr 2006 wurden für Deutschland 367.361 Todesfälle allein durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen registriert (Todesursachenstatistik, 2006, Statistisches Bundesamt Deutschland). Als erste morphologische Manifestationen finden sich oft bereits im Adoleszentenalter, die sogenannten Fettstreifen, in der Intima. Im Gefäß kommt es zur Endothelschädigung und somit zur Inflammationsreaktion durch Rekrutierung von Leukozyten, die über Adhäsionsmoleküle adhärieren und über Zytokinfreisetzung vermehrt in die Intima einwandern. Chemotaktisch werden weitere Monozyten angezogen, wandern in die Gefäßwand ein, differenzieren dort zu Makrophagen und phagozytieren modifizierte Lipide wie zum Beispiel oxLDL über Scavenger Rezeptoren. Es kommt zur Schaumzellbildung, in deren weiteren Verlauf phagozytiertes Material T-Lymphozyten über HLA-DR präsentiert wird. Die Inflammation wird durch diese Lymphozyten aufrechterhalten und gefördert, indem sie Wachstumsfaktoren wie  $\text{TNF}\alpha$  und Interferon  $\gamma$  freisetzen, und im weiteren Verlauf die Bindegewebsneubildung fördern. Es entstehen fibröse Plaques. T-Lymphozyten sekretieren jedoch auch Zytokine, die die Produktion von Kollagen in glatten Gefäßmuskelzellen behindern und die Expression von Matrixmetalloproteinasen in Makrophagen fördern. Dieser Prozess schwächt in einem späterem Stadium, dem Atherom, die fibröse Kappe, die die Abgrenzung des Blutes zum lipidreichen Kern der Plaque bildet. Das

auslösende Ereignis für einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall stellt dann meist die Ruptur solch eines Plaque mit nachfolgendem thrombotischen Verschuß des Gefäßes dar <sup>29-31</sup>.



*Abbildung 4: Pathogenese der Atherosklerose <sup>31</sup> A: Rekrutieren von Leukozyten und Endothelschädigung. Normalerweise adhäreren Leukozyten wenig am gesunden Endothel. Kommt es jedoch zu einer Entzündungsreaktion, so werden Adhäsionsmoleküle exprimiert, die eine Adhäsion der Leukozyten erlauben. Proinflammatorische Zytokine fördern die Migration derselben in die Intima. B: Monozyten differenzieren zu Makrophagen, exprimieren Scavenger Rezeptoren und phagozytieren Lipidpartikel, die zur Schaumzellbildung führen, das charakteristische Zeichen für eine atherosklerotische Läsion. Angelockte T-Lymphozyten sekretieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen fördern. C: T-Lymphozyten sekretieren Zytokine, die die Produktion von Kollagen in glatten Gefäßmuskelzellen behindern und die Expression von Matrixmetalloproteinasen in Makrophagen fördern. Dieser Prozess schwächt die fibröse Kappe, die die Abgrenzung des Blutes zum lipidreichen Kern des Plaque bildet. Sollte der Plaque rupturieren, formt sich ein Thrombus, der für die meisten akuten Komplikationen der Atherosklerose verantwortlich ist.*

Bei den Risikofaktoren der Atherosklerose wird zwischen unbeeinflussbaren wie Alter oder familiärer Disposition und beeinflussbaren wie Dyslipidämie oder Rauchen unterschieden. Beeinflussbare Risikofaktoren wie Diabetes, Dyslipidämien, Hypertonie aber auch Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel stellen einen wichtigen Angriffspunkt zur Prävention der Atherosklerose dar.

### 1.3.2 Nukleäre Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$ und LXR $\alpha$

LXRs (liver X receptor) und PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor) gehören zur Familie der Liganden-aktivierten nukleären Rezeptoren (nuclear hormone receptor superfamily of ligand-activated transcription factors), die nach Bindung an bestimmte Liganden die Expression von Genen insbesondere der Adipogenese und des Lipidmetabolismus regulieren<sup>32-34</sup>. Ubiquitär exprimiert fungieren sie als Cholesterin-Sensoren, die als Antwort auf einen erhöhten intrazellulären Cholesterinspiegel aktiviert werden. Im Anschluß wird eine ganze Reihe von Genen aktiviert, die in der Cholesterin-Absorption, dem –Efflux, dem –Transport und der –Exkretion eine wichtige Rolle spielen. Im Folgenden soll näher auf PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  eingegangen werden.

Substanzen, die PPAR aktivieren und die Proliferation von Peroxisomen induzieren, waren für die Namensgebung verantwortlich<sup>35</sup>. Neben PPAR $\gamma$  gehören auch PPAR $\alpha$  und PPAR $\beta$  (auch als PPAR $\delta$  oder NUC1 bezeichnet) zur Subfamilie der PPARs<sup>36, 37</sup>. Als Hauptfunktion von PPAR $\alpha$  gilt der Fettsäuremetabolismus, den der Rezeptor vor allem in der Leber, Niere und im Muskelgewebe reguliert<sup>38</sup>. Fibrate haben PPAR $\alpha$  als pharmakologische Zielstruktur, PPAR $\beta$  wird eine bedeutende Rolle in der Plazentation zugesprochen<sup>39</sup>.

Für PPAR $\gamma$  existieren 2 Isoformen (PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2), die in ihrer Aminosäurezusammensetzung differieren, wobei PPAR $\gamma$ 1 die in Menschen dominierende Form darstellt<sup>40</sup>. Fast ubiquitär im Organismus vertreten, weist PPAR $\gamma$  in einigen Geweben und Zellen eine besonders hohe Expression auf unter anderem im Fettgewebe, wo PPAR $\gamma$  in Adipozyten für die Differenzierung von Prä-Adipozyten notwendig ist<sup>41</sup>. Zu den Zellen, die besonders viel PPAR $\gamma$  enthalten, gehören auch Monozyten/Makrophagen, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, die in der Entwicklung der Atherosklerose eine große Rolle spielen<sup>42</sup>. *In vivo* lässt sich insbesondere in atherosklerotischen Läsionen und dort in Schaumzellen eine hohe Expressionsrate von PPAR $\gamma$  nachweisen. Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  mit anschließender Induktion regulierter Gene erfolgt durch Bindung

spezifischer Liganden und Bildung eines Heterodimers mit dem Retinolsäure-X-Rezeptor (RXR) <sup>43</sup>. Ein Modell der Genaktivierung durch PPAR $\gamma$  ist in Abbildung 5 <sup>44</sup> dargestellt. Es kommt zur Konformationsänderung bei PPAR $\gamma$  nach Ligandenbindung spezifischer Oxidationsprodukte von Fettsäuren, wodurch eine Bindung an RXR erst möglich wird. Dies führt zu einer Aktivierung abhängiger Gene, durch Bindung des PPAR-RXR-Komplexes an das PPAR Response Element (PPRE) in der Promotorregion eines Gens (z. B. CD36). Durch Anlagerung weiterer Proteine erfolgt schließlich die Transkription dieses DNA-Abschnittes in mRNA (Abbildung 5) <sup>43</sup>. RXR kann verschiedene Liganden u. a. 9cRA binden und nach Bindung mit PPAR das Zielgen durch Anlagerung an das PPRE aktivieren <sup>45</sup>. Auch RXR existiert, wie PPAR, in mehreren Isoformen (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$ , RXR $\gamma$ ) <sup>46</sup>, von denen die jeweilige RXR-Isoform eine bevorzugte Isoform von PPAR bindet <sup>42</sup>.

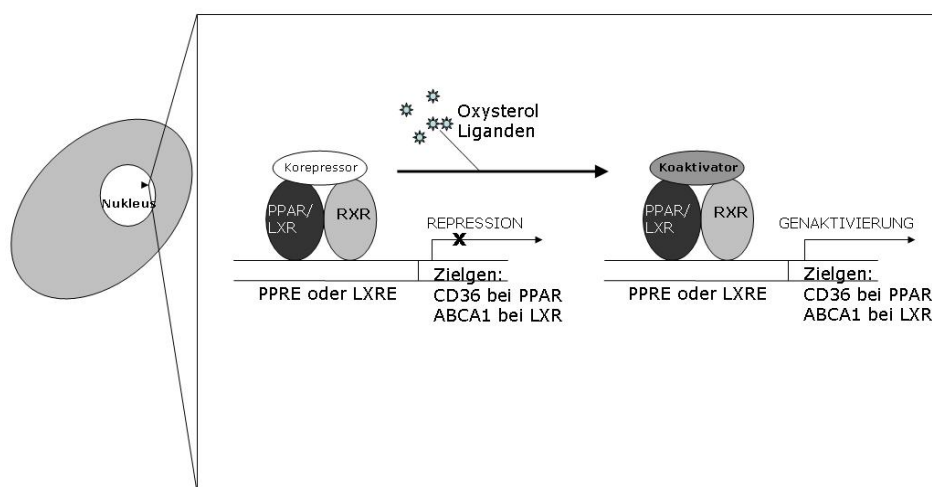


Abbildung 5: Schema der Aktivierung von PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  durch spezifische Liganden und Induktion der dadurch regulierten Gene. Nach Bindung an einen Liganden erfolgt eine Konformationsänderung des PPAR $\gamma$  bzw. LXR $\alpha$  Moleküls, die eine Anlagerung an RXR mit nachfolgender Induktion eines Zielgens durch PPRE bzw. LXRE Bindung ermöglicht. Eine Aktivierung des PPAR $\gamma$ -RXR-Komplexes ist auch durch spezifische RXR Liganden möglich, ebenso wie durch eine Kombination von PPAR $\gamma$  bzw. LXR $\alpha$  und RXR-Ligand. <sup>44</sup>

Wichtige aktivierende Liganden von PPAR $\gamma$  sind oxLDL-Partikel und darin enthaltene oxidierte Linolensäurederivate, speziell 9-(R/S) HODE, 13-(R/S) HODE, 9-oxoODE und 13-oxoODE. Auch Eicosanoide, insbesondere Prostaglandin J2 (PG-J2), 15-ddPGJ2, sowie Prostacyclin (PGI2) aktivieren PPAR $\gamma$  <sup>42</sup>. Interessanterweise gibt es auch eine Gruppe von synthetischen Liganden, die PPAR $\gamma$  wirksam aktivieren können. Hierbei handelt es sich um die Glitazone, eingesetzt als Antidiabetika. Besonders Troglitazon, Pioglitazon und Rosiglitazon gehören zu den stärksten Aktivatoren von PPAR $\gamma$  <sup>42</sup>. Da Glitazone in vielen *in vitro* – Untersuchungen Scavenger-Rezeptoren induzieren, könnte dies auch *in vivo* zur Bildung von Schaumzellen führen. Klinische Studien bezüglich der atherogenen Wirkung von PPAR $\gamma$  in Menschen wurden noch nicht durchgeführt, in Versuchen mit genetisch veränderten Mausmodellen konnten für PPAR $\gamma$  eher eine Hemmung der Atherogenese beobachtet werden <sup>47</sup>. Rosiglitazon verminderte die Entwicklung der Transplantations-Atherosklerose bei Ratten <sup>48</sup>. Ebenso zeigte PPAR $\gamma$  in zahlreichen *in vitro* – Versuchen antiinflammatorische Wirkungen im Sinne einer Suppression der Ausschüttung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Gelatinase B <sup>33, 49</sup>. Damit ist die Rolle von PPAR $\gamma$  in der Atherogenese nicht definitiv geklärt.

Während LXR $\alpha$  vor allem in der Leber, im Darm, im Fettgewebe und in Makrophagen exprimiert wird <sup>50</sup>, ist LXR $\beta$  ubiquitär vorhanden. LXRs sind Schlüsselregulatoren im Lipidmetabolismus und in der inflammatorischen Signalkaskade <sup>44</sup>, vor allem beim Katabolismus aber auch einer verringerten Absorption von Cholesterin und bei der Fettsäuresynthese (Tabelle 2) <sup>51</sup>.

Tabelle 2: LXR Zielgene

| LXR Zielgene                    | Angriffsstelle/Zielort  |
|---------------------------------|-------------------------|
| CYP7A1 (Maus)                   | + Gallensäuresynthese   |
| ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8      | + Sterolexport          |
| LXR $\alpha$ (Mensch)           | + Autoregulation        |
| SREBP-1c FAS                    | Cholesterinsynthese     |
| Apo E, Apo CI, Apo CII, Apo CIV | Lipoproteinmetabolismus |
| CETP, PLTP, LPL                 |                         |

Aktiviert werden LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  durch Oxysterole und oxidierte Derivate von Cholesterin wie 22-(R)-Hydroxycholesterol (22-OHC), 27-Hydroxycholesterol und 24(S),25-Epoxycholesterol<sup>52</sup>. In Abwesenheit eines Liganden ist am Zielgen ein Korepressor vorhanden, der die Transkription des Zielgens inhibiert<sup>53</sup>. Nach der Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung für LXR $\alpha$ , wodurch wie bei PPAR $\gamma$  eine Bindung an den RXR möglich wird, die dann zur Aktivierung der Genexpression im Nukleus führt, wenn der LXR-RXR-Komplex an das LXR Response Element (LXRE) in der Promotorregion eines Gens (z. B. ABCA1) bindet. Es erfolgt die Aktivierung der Transkription des Zielgens (Abbildung 5). Die ligandenbedingte Aktivierung von LXR inhibiert auch die Transkription von Promotoren einiger Gene (z. B. proinflammatorische Zytokine), die kein LXRE enthalten, ein als TRANS-Repression bezeichnetes und noch wenig verstandenes Phänomen. Im Tiermodell steigerten synthetische Liganden von LXR den zellulären Efflux von Cholesterin und reduzierten die Atherosklerose. Die Selektivität von Pharmaka für LXR $\alpha$  oder LXR $\beta$  stellt jedoch aufgrund ausgedehnter Homologien noch ein Problem dar<sup>54, 55</sup>. Bestenfalls hätte man einen starken Induktor für den Efflux (ABCA1) ohne Wirkung auf die Cholesterinsynthese (SREBP-1c).

### 1.3.3 LDL-Rezeptor und Scavenger Rezeptor CD36

Natives, unmodifiziertes LDL wird über Rezeptor-vermittelte Endozytose über den von Brown und Goldstein 1985 erstmals ausführlich beschriebenen LDL-R in die Zelle aufgenommen<sup>56</sup>. Dieser Prozeß basiert auf der Einstülpung von „coated pits“ an bestimmten Stellen der Zelloberfläche, an denen die mit LDL beladenen LDL-R durch Endozytose aufgenommen werden. Beim anschließenden lysosomalen Abbau des LDL Partikels innerhalb der Zelle werden Cholesterinester hydrolysiert und freies Cholesterin wird zum weiteren Metabolismus bereitgestellt. Der Cholesterinspiegel innerhalb der Zelle supprimiert die Transkription des LDL-R, sowie der HMG-CoA-Reduktase, ein Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese<sup>57</sup>.

Für die unkontrollierte Aufnahme von Cholesterin in Makrophagen müssen also andere Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Entdeckt wurde der erste einer Reihe, in Funktionsweise, Struktur und Regulation vom LDL-R völlig unterschiedlichen Scavenger Rezeptoren (engl. to scavenge – reinigen, Unrat vernichten) 1990, zunächst identifiziert als Rezeptor für acetyliertes LDL und mit SR-A bezeichnet <sup>58</sup>. Weitere Liganden sind z. B. oxidiertes LDL, das im Rahmen des oxidativen Stresses im Körper entstehen kann und demzufolge als natürlicher Ligand fungiert. Weitere Scavenger-Rezeptoren, in ihrer Struktur verschieden, wurden als Klasse B Scavenger Rezeptoren bezeichnet z.B. CD36 und SR-BI. Mittlerweile wurden mindestens 6 Klassen an Scavenger Rezeptoren identifiziert, wovon jedoch die Klassen A und B als die für den menschlichen Organismus am wichtigsten angesehen werden.

Anders als der LDL-R enthalten die Scavenger Rezeptoren Klasse A und B keine regulatorischen Sterol-Elemente in ihrer Promotorregion, sie werden deshalb auch bei hohen intrazellulären Cholesterinkonzentrationen exprimiert <sup>59</sup>. Durch die fehlende negative Rückkopplung kommt es damit zu einer ungehemmten Anhäufung von Cholesterinestern in Makrophagen, die letztendlich in der Bildung von Schaumzellen resultiert <sup>33</sup>.

CD36 gehört, wie der homologe SR-BI zu den Klasse B Scavenger Rezeptoren <sup>60, 61</sup>. Es ist ein 88 kDa großes Glykoprotein, welches insbesondere auf der Membran von Monozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und Enterozyten vorhanden ist <sup>62</sup>. CD36 wird stark dort exprimiert, wo Fette gespeichert oder wichtig als Energielieferant sind, z. B. in Adipozyten oder Kardiomyozyten <sup>63, 64</sup>. Zu den Liganden von CD36 gehören oxLDL, anionische Phospholipide, apoptotische Zellen, Thrombospondin, Kollagen sowie Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten <sup>59</sup>. Um die quantitative Bedeutung dieses Rezeptors für die Aufnahme von oxLDL in die Zellen abzuschätzen, wurde dieser in einer Studie von Nicholson *et al. in vitro* mit Antikörpern blockiert. Dies führte zu einem Absinken der Bindung von Kupfer-oxidiertem LDL um 60% <sup>65</sup>. In Studien mit CD36-defizienten Mäusen war die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen vermindert <sup>66</sup>. CD36 bindet auch natives LDL,



---

aber die Affinität zu oxLDL ist etwa 3-fach höher<sup>67</sup>. Als Scavenger Rezeptor bindet CD36 wahrscheinlich an den Lipid- und nicht den Protein-Anteil eines Lipoproteins. Dies zeigte sich in Versuchen mit experimentell delipidiertem oxLDL, welches nicht von CD36 gebunden wurde<sup>65</sup>. Die Fähigkeit von Phospholipiden um die Bindung am Rezeptor mit oxLDL zu konkurrieren, sowie die Vielzahl von gebundenen Lipoproteinen (HDL, IDL und VLDL) bestärken ebenso diese Annahme<sup>65, 67</sup>. Aufgrund der Bedeutung von CD36 für die Atherosklerose-Entstehung wurde dessen Regulation bereits vielfach untersucht. Eine Verminderung der CD36-Expression konnte für Lipopolysaccharide, IL-1, TGF $\beta$  und durch Verringerung des Zellmembran-Cholesterins nachgewiesen werden<sup>68, 69</sup>. Demgegenüber wird CD36 durch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und durch die Stimulation mit proatherogenen Zytokinen, z. B. IL-4 und MCS-F (Macrophage-colony stimulating factor) induziert<sup>68</sup>. Einen entscheidenden Einfluß auf die Expression von CD36 scheint jedoch vor allem der Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  zu haben. CD36 enthält in seiner Promotorregion ein PPAR $\gamma$  response element (PPRE) und kann damit durch aktiviertes PPAR $\gamma$  induziert werden (Abbildung 6). 1998 wurde erstmals die These einer Feed-Forward-Schleife von Nagy und Tontonoz postuliert, bei der Komponenten oxidativ modifizierter LDL, die von CD36 in die Zelle aufgenommen wurden, zu einer Aktivierung von PPAR $\gamma$  führen und damit die Expression von CD36 weiter stimulieren<sup>70</sup>. Durch unkontrollierte Expression von CD36 kommt es zur Akkumulation von Cholesterinestern in der Zelle und in der Folge zur Bildung von Schaumzellen, einem frühen Schritt der Atherogenese (Abbildung 6).

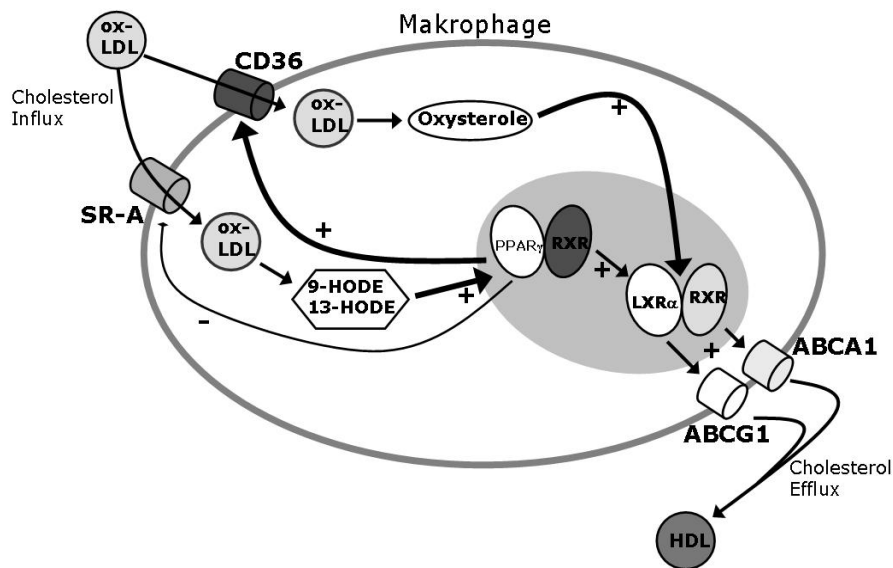
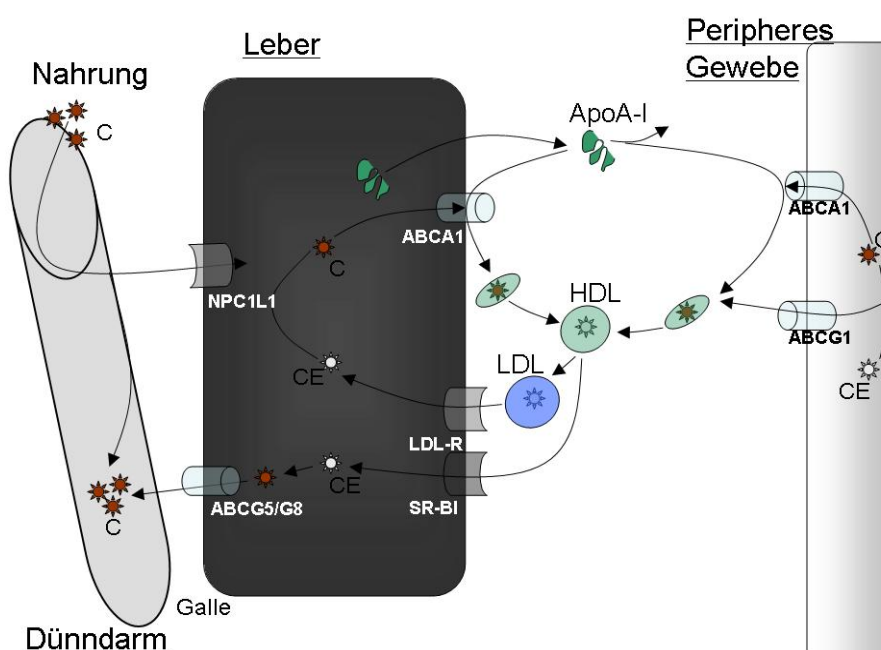


Abbildung 6: Aufnahme von oxLDL durch Scavenger Rezeptoren wie CD36 und SR-A, die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$  bzw. LXR $\alpha$  durch Fettsäuren bzw. Oxysterole und die Aktivierung der Effluxtransporter ABCA1 und ABCG1 durch LXR $\alpha$ .

### 1.3.4 Reverser Cholesterintransport

Periphere extrahepatische Zellen können sich mit Cholesterin sowohl durch eine Kombination aus *de novo*-Synthese als auch durch die Aufnahme von Sterolen aus LDL und VLDL versorgen. Der Transport von Cholesterin aus dem peripheren Gewebe über das Plasma zur Leber und die Exkretion über die Galle wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet. Dort wird das Cholesterin teilweise in neusynthetisierten VLDL Partikeln wieder sezerniert oder taucht in der Galle als freies Cholesterin oder katabolisiert zu Gallensäuren auf <sup>71</sup>. Der reverse Cholesterintransport wird über HDL vermittelt, das primär von Hepatozyten und Enterozyten sezerniert wird. Dessen strukturelle Hauptkomponente stellt Apo-Lipoprotein A-I dar, das bis zu einem Drittel des Cholesterins im menschlichen Plasma trägt <sup>72</sup>. Der zelluläre Cholesterin-Exporter ABCA1 (siehe 1.3.5) transloziert Phospholipide und freies Cholesterin auf Apo A-I, was dessen Lipidierung zu kleinen diskoidalen prebeta-HDL Partikeln – sogenanntem naszierendem HDL bewirkt <sup>73</sup>. Im Plasma wird es durch Cholesterinester, die über die LCAT synthetisiert werden <sup>74</sup>, weiter mit Lipiden angereichert (HDL<sub>3</sub> und HDL<sub>2</sub>).

Zwei Lipidtransfer-Proteine sind am weiteren Umbau von HDL beteiligt. PLTP versorgt HDL mit Lecithin, während CETP Cholesterinester auf LDL überträgt<sup>75, 76</sup>. HDL Triglyzeride werden durch die extrazellulär hepatische Triglyzerid-Lipase abgebaut<sup>77</sup>. SR-BI vermittelt als HDL Rezeptor die selektive Aufnahme von HDL-gereiften Cholesterinestern in der Leber und führt sie der Exkretion in der Galle zu<sup>78, 79</sup>. *In vivo* wird der reverse Cholesterintransport in Makrophagen vor allem durch ABCA1 und ABCG1 initiiert und nicht durch SR-BI<sup>80</sup>. Wahrscheinlich wird Apo A-I regeneriert, indem es von den HDL Partikeln dissoziiert<sup>81</sup> (Abbildung 7).



*Abbildung 7: Reverser Cholesterin Transport: Ein Prozess, in den diverse Zell- und Plasmaproteine involviert sind. Eine der Hauptfunktionen von HDL ist der Cholesterintransport von peripherem Gewebe zur Leber. Obwohl HDL verschiedene Proteine enthält, besteht es zu 70% aus Apo A-I. In Leber und Darm synthetisiert und sezerniert, wird es als ursprünglich lipid-armes Protein schnell mit Phospholipiden und Cholesterin angereichert. Diese nativen diskoidalen HDL Partikel reichern sich im Kontakt mit Effluxtransportern der Zelle weiter mit Phospholipiden und unverestertem Cholesterin, welches von der LCAT anschließend verestert wird und sich im Kern der HDL-Partikel sammelt, an. Die reifen HDL-Partikel werden über Plasmaproteine, die ihre Lipide an andere Lipoproteine abgegeben haben, remodelliert oder geben ihre Cholesterinester selektiv an Zellen z. B. über Sr-BI ab. Die Regeneration und das Recycling im Reversen Cholesterin Transport von lipid-armem Apo A-I scheint der Grund für die HDL-Remodelling Prozesse zu sein.<sup>82</sup>*

### 1.3.5 ABC-Transporter – ABCA1 und ABCG1

Membran-assoziierte Pumpen wie die ABC-Transporter gehören zu den Transportproteinen, die unerwünschte Moleküle aus der Zelle entfernen<sup>83</sup>. Gemeinsames Strukturelement ist eine ATP-Bindungskassette (**ATP Binding Cassette**). Die freiwerdende Energie aus der exergonisch verlaufenden ATP-Hydrolyse (-30,5 kJ/mol) wird mit der endergonischen Translokation diverser Substrate durch Membranen gekoppelt. ABC-Proteine fungieren unter anderem als Ionenkanäle und ATP-sensitive Kanalmodulatoren. Ihre Mutationen besitzen klinische Relevanz bei genetisch bedingten Erkrankungen wie Mukoviszidose, Degeneration der Retina, Dyslipidämien oder veränderte Medikamenten-Suszeptibilität. ABC-Transporter sind aus zwei verschiedenen Domänen aufgebaut, den hydrophoben Membrandomänen und den hydrophilen Nukleotidbindungsdomänen, den ATP-Bindungskassetten<sup>84, 85</sup>. Während ATP-Bindungskassetten mittels ATP-Hydrolyse die Funktion eines Transportmotors übernehmen, stellen die Membrandomänen das Transportvehikel dar. Ein funktionell aktives ABC-Protein benötigt zwei Nukleotidbindungsregionen und zwei Membrandomänen, die in verschiedenen Anordnungen vorkommen können<sup>86</sup>. Die meist unidirektionalen ABC-Transporter erfüllen je nach Organismus spezialisierte Aufgaben. In Eukaryoten sind ABC-Transporter vor allem am Efflux von meist hydrophoben Molekülen aus dem Zytoplasma in den extrazellulären Raum oder in intrazelluläre Kompartimente (Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien, Peroxisomen) beteiligt.

Im Folgenden werden zwei Cholesterin-Efflux Transporter, ABCA1 und ABCG1, genauer vorgestellt. In der ABCA-Subfamilie sind bisher 12 Gene charakterisiert. Für einige Vertreter wird eine Rolle in der Lipidhomöostase verschiedener Zellsysteme diskutiert, die bisher aber nur für ABCA1 nachgewiesen werden konnte<sup>87</sup>. Das ABCA1-Gen, ubiquitär exprimiert in der Zytoplasmamembran humaner Zellen, wurde bereits 1994 von Luciani et al.<sup>88</sup> identifiziert und stellt einen kritischen Faktor für den komplexen Effluxmechanismus der Zelle dar, ohne selbst ein direkter Cholesterintransporter zu sein. Bindungsstudien in ABCA1-überexprimierenden Zellen konnten zeigen, dass ABCA1 an freies Apo A-I

bindet und als direkte Folge ein gesteigerter zellulärer Phospholipidefflux und Cholesterinexport zu beobachten sind<sup>89</sup>. Als integrales Membranprotein bildet ABCA1 ein Homodimer, bestehend aus einer 6 Helix-Transmembrandomäne und einer Nukleotidbindungsdomäne (NBD), die zwei konservierte Peptidmotive enthält (Abbildung 8). Für ABCA1 wird eine Flippase-Funktion postuliert. Eine Zellmembran besteht aus zwei Lipiddoppelschichten mit den hydrophoben Köpfen nach innen. Ein Wechsel von einer Lipiddoppelschicht zur anderen ist extrem unwahrscheinlich und passiert spontan nur etwa einmal in der Minute. Dieser Vorgang wird durch Flippasen katalysiert<sup>90, 91</sup>. Flippasen vermitteln den Transport von Phospholipiden bzw. Cholesterin von der inneren zur äußeren Membran, wobei Lipide mit ihrer polaren Kopfgruppe das hydrophobe Membraninnere durchwandern, in diesem Fall bis zum auf der Zelloberfläche gebundenen lipid-defizienten Apo A-I Partikel (Abbildung 9). Dieser Vorgang wird mit Flipflop bezeichnet.

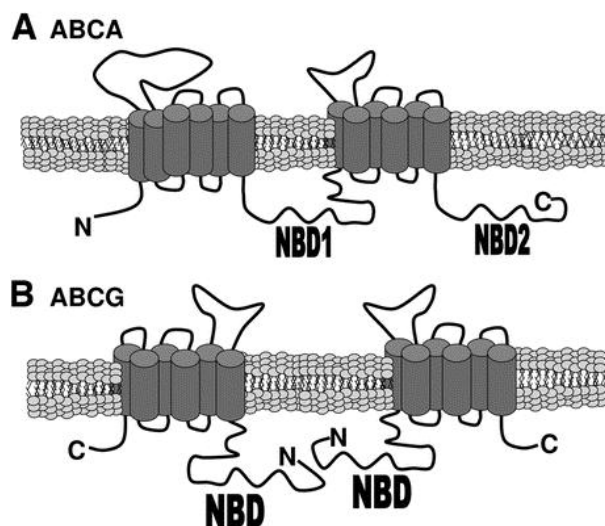


Abbildung 8: Modell der topologischen Organisation von ABCA1 Volltransportern (A) oder ABCG1 Halbtransportern in Dimerisierung<sup>82</sup>

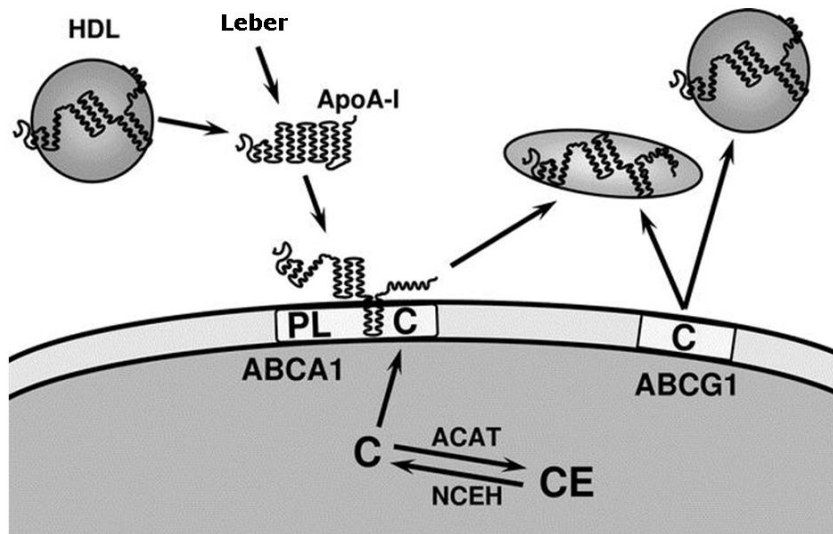


Abbildung 9: Modell für ABCA1- und ABCG1-vermittelten Lipidtransport von Makrophagen. Für beide wird eine Flippase-Funktion postuliert. Bei ABCA1 vermittelt die Flippase den Transport von Phospholipiden von der inneren zur äußeren Membran und damit zum auf der Zelloberfläche gebundenen lipiddefizienten Apo A-I Partikel, das anschließend Beladung mit Cholesterin beladen wird. Bei ABCG1 scheint kein direkter Lipoproteinkontakt vonnöten zu sein.<sup>82</sup>

Die ABCG-Subfamilie besteht aus fünf Vertretern, die meist reverse Halbtransporter sind, erst Dimere werden aktive Transporter mit zwei Transmembran- und zwei Nukleotidbindungsdomänen z. B. ABCG5/G8. Das humane ABCG1-Protein zeigt eine dominante Expression in Makrophagen und ist über einen über LXR $\alpha$ -regulierten Mechanismus am Cholesterin-Efflux beteiligt<sup>92, 93</sup>. Wie für ABCA1 wird auch für ABCG1 eine Flippase-Funktion postuliert, in diesem Fall scheint der direkte Kontakt zu Lipoproteinen jedoch nicht nötig zu sein<sup>93</sup>. ABCA1 und ABCG1 könnten sequentiell und synergistisch wirken: ABCA1 konvertiert lipidarmes Apo A-I zu nativen Lipoproteinen, die effektive Akzeptoren für den Cholesterin-Export von ABCG1 sind. Möglicherweise koordinieren ABCA1 und ABCG1 den Efflux von Cholesterin in Makrophagen, indem sie unterschiedliche Lipidakzeptoren verwenden (Abbildung 9)<sup>94</sup>. Diese ABC Transporter, die in atherosklerotischen Läsionen in Makrophagen bereits nachgewiesen wurden

---

und bei Lipidüberladung induziert werden, spielen eine demnach entscheidende Rolle bei der Prävention und Regression der Atherosklerose<sup>95</sup>.

Die Regulation und Aktivierung von ABCA1 und ABCG1 erfolgt über z. B. Oxysterole, 9cRA oder auch PPAR-Agonisten durch Bindung der aktivierten Heterodimere z. B. LXR/RXR an charakteristische DNA-Sequenzen (response elements) im Promotor ihrer Zielgene (siehe 1.3.2; Abbildung 5)<sup>92, 96, 97</sup>. In Makrophagen konnte für ABCA1 sowohl durch PPAR $\alpha$  als auch PPAR $\gamma$ -Agonisten eine Stimulation der mRNA Expression und des Apo A-I vermittelten Cholesterin-Efflux gezeigt werden<sup>98</sup>. Diese ligandenaktivierte Induktion von PPAR $\gamma$  erfolgt über die Stimulation von LXR $\alpha$  und hat letztendlich die Expression von ABCA1 und somit einen erhöhten Efflux von Cholesterin zur Folge<sup>99</sup>. Ebenso in Makrophagen stimulieren LXR-Agonisten den Weg von ABCG1 vom intrazellulären Kompartiment zur Plasmamembran, was den Efflux von Cholesterin auf HDL verbessert. Somit hat das LXR System eine duale Funktion bei ABCG1, es steigert die Expression aber auch die Translokation von ABCG1 zur Plasmamembran<sup>100</sup>. Die Entdeckung zahlreicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die mit dem Lipidmetabolismus assoziiert sind, in der ABCA1-Promotorregion, bestätigte die Hypothese einer zentralen Rolle dieses ABCA1-Proteins in der zellulären Lipidhomöostase und ermöglichte neue Strategien zur Therapie von Lipidstoffwechselerkrankungen<sup>101</sup>. Im Fall einer mutationsbedingten Inaktivierung des ABCA1-Gens tritt die als Tangier-Krankheit bekannte rezessive Störung der Lipidhomöostase auf. Bei den betroffenen Patienten kommt es zu ungewöhnlich niedrigen HDL-Plasmaspiegeln, andererseits aber zu einer verstärkten Akkumulation von Cholesterinestern in Makrophagen und Gefäßen<sup>89</sup>. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine genetischen Variationen in humanem ABCG1 festgestellt werden, die einen pro-atherogenen Effekt hätten.

### 1.3.6 Die Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol auf die Atherosklerose

Die Oxidations-Hypothese der Atherogenese, nämlich, dass oxidative Modifikationen von Lipoproteinen die Atherosklerosentstehung fördern, wurde vor etwa fünfzehn Jahren postuliert<sup>29, 102, 103</sup>. OxLDL werden eine Reihe proatherogener Eigenschaften zugeschrieben und es ist ein potentes Chemoattraktans für zirkulierende Monozyten<sup>104</sup>, T-Zellen<sup>105</sup>, hemmt die Mobilisierung residenter Makrophagen<sup>104</sup> und fördert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen<sup>106</sup>. Stark oxidiertes LDL weist außerdem zytotoxische Eigenschaften auf<sup>107</sup>. Es gilt daher als pathogenetischer Faktor in der Atherosklerosentstehung und beeinflusst durch Förderung von Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation und Zytokinfreisetzung, das Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen (Abbildung 4). Deshalb versuchte man durch die Inhibition der Oxidation von LDL z. B. durch fettlösliche Antioxidantien eine Verlangsamung der Atherogenese zu erreichen<sup>103</sup>. Vitamin E wurde aufgrund seiner antioxidativen Wirkung auf oxLDL ein kardioprotektiver Effekt zugeschrieben. Als weiteren Mechanismus hemmt Vitamin E auch die Proteinkinase C, die für diverse Signaltransduktionskaskaden eine wichtige Rolle spielt. Die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, die Monozytenadhäsion, die Zytokinfreisetzung aus Endothelzellen und die Thrombozytenaggregation werden von Vitamin E vorzugsweise über die Proteinkinase C gehemmt (1.2.2).

Vielversprechende Resultate zur Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose zeigten diverse Tiermodelle, bei denen hochdosiertes  $\alpha$ -Tocopherol verabreicht wurde. 1978 konnten beispielsweise Wilson *et al.* an Kaninchen zeigen, dass proatherogenes Futter supplementiert mit 1% Vitamin E die Entstehung der Atherosklerose durch Senkung des Cholesterinspiegels verhindern kann<sup>108</sup>.  $\alpha$ -Tocopherol (2500 IU/kg Futter) konnte in einer weiteren Studie an weißen Neuseeland-Kaninchen Atherosklerose verhindern, bevorzugt zusammen mit mehrfachgesättigten Fettsäuren<sup>109</sup>. Es wurden aber auch antioxidative Effekte und die Reduktion der Atherogenese einer  $\alpha$ -Tocopherol-Substitution an apo e defizienten Mäusen in Bezug auf die Atherosklerose-Entstehung getestet<sup>110</sup>, die zur



spontanen Bildung von atherosklerotischen Läsionen bei artgerechter Fütterung neigen und deshalb ein beliebtes Atherosklerosemodell darstellen<sup>111</sup>. Es zeigte sich jedoch, dass  $\alpha$ -Tocopherol in verschiedenen Tiermodellen nicht einheitlich von Vorteil war und somit erstmals ambivalente Effekte in Bezug auf die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen festgestellt wurden<sup>112</sup>.

In den letzten Jahren wurden einige große placebo-kontrollierte prospektive Studien durchgeführt, deren Ergebnisse aber keinen klaren Benefit durch Vitamin E zeigten. Die  $\alpha$ -Tocopherol  $\beta$ -Carotin (ATBC) Studie, in der 50 mg  $\alpha$ -Tocopherol und 20 mg  $\beta$ -Carotin täglich über fünf bis acht Jahre verabreicht wurden, konnten Lungenkarzinome nicht verhindern<sup>113</sup>. Die Supplementierung von täglich 400 IU bzw. 800 IU  $\alpha$ -Tocopherol in der „Cambridge Heart Antioxidant Study“ (CHAOS)<sup>114</sup> bzw. 300 mg  $\alpha$ -Tocopherol in der Gruppo Italiano per lo Studio della Supervivenza nell'Infarto miocardio (GISSI) Studie<sup>115</sup> zeigten einen nicht signifikanten Anstieg der Mortalität bezogen auf kardiovaskuläre Ereignisse. Auch in der kürzlich veröffentlichten Women's Health Study<sup>116</sup> wird eine Vitamin E-Substitution (600 IU) aus natürlichem Vorkommen für gesunde Menschen nicht empfohlen, da sich kein Benefit für kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs oder die Gesamtmortalität nachweisen ließ. Einzig in der MIVIT-Studie (multicenter pilot myocardial infarction and vitamins trial) scheint die antioxidante Substitution mit Vitamin C+E einen positiven Effekt für Patienten mit akutem Myokardinfarkt zu haben<sup>117, 118</sup>. Die kardioprotektive Wirkung des Vitamin E bleibt weiterhin heftig umstritten<sup>20, 103, 119</sup>.

## 2 Fragestellungen

Die Regulation von Schlüsselrezeptoren der Cholesterin-Homöostase erfolgt z. B. in Makrophagen, die in der Atherogenese eine wichtige Rolle spielen, über nukleäre Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$ . Diese werden durch oxidierte Fettsäuren bzw. durch oxidierte Sterole aktiviert. Wenn  $\alpha$ -Tocopherol mit der Bildung dieser LXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  aktivierenden Oxylipiden interferiert, könnte eine Störung der Lipidhomöostase den mangelnden klinischen Nutzen von  $\alpha$ -Tocopherol erklären. Ziel der Arbeit war es deshalb, die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol auf Oxylipid-regulierte Mechanismen der Cholesterin-Homöostase in Makrophagen näher zu untersuchen.

Als Makrophagen-Modelle wurden die humane, monozytäre Zelllinie THP-1, die mittels PMA zu reifen Makrophagen ausdifferenziert werden kann, und aus humanem Blut präparierte primäre Makrophagen verwendet. Eine mögliche Modulation der oxylipid-abhängigen Signalwege und der darüber regulierten Rezeptoren durch  $\alpha$ -Tocopherol sollte auf transkriptioneller, translationaler und funktioneller Ebene analysiert werden.

Insbesondere wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

Welche Wirkung hat  $\alpha$ -Tocopherol

1. auf Mechanismen, die die zelluläre Lipidaufnahme beeinflussen, wie
  - a. die Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$ ,
  - b. die Expression des Scavenger Rezeptors CD36 und des LDL-R,
2. auf Mechanismen, die die zelluläre Sterolabgabe steuern, wie
  - a. die Expression und Aktivierung des Transkriptionsfaktors LXR $\alpha$ ,
  - b. die Expression der Effluxtransporter ABCA1 und ABCG1
3. auf die zelluläre Cholesterin Akkumulation aus oxLDL und die Abgabe an dHDL.

---

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

|                                      |                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 15-ddPGJ2                            | Biomol, Hamburg                     |
| Acrylamid                            | Sigma, Deisendorf                   |
| Agarose                              | Roth, Karlsruhe                     |
| Albumin Bovine                       | Sigma, Deisendorf                   |
| Ammoniumpersulfat (APS)              | Biorad, München                     |
| Antikörper gegen:                    |                                     |
| - ABCA1                              | Novus Biologicals - USA             |
| - CD36 (FA6)                         | Serotec – USA                       |
| - $\beta$ -Actin                     | Sigma, Deisendorf                   |
| - Isotyp (MOPC21)                    | Sigma, Deisendorf                   |
| - Anti-mouse FITC                    | Dako – Dänemark                     |
| - Anti-mouse HRP                     | Amersham Biosciences, Upsala        |
| - Anti-rabbit HRP                    | Cell Signaling, Frankfurt           |
| Biocoll Separating Solution (Ficoll) | Biochrom AG, Berlin                 |
| Biorad External Well Factor Solution | Biorad, München                     |
| Blasticidine S Hydrochlorid          | Invitrogen, Eugene                  |
| Calciumchlorid                       | Sigma, Deisendorf                   |
| CD 14 Microbeads                     | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| Chloroform p.A.                      | Merck, Darmstadt                    |
| Cholesterin Liquicolor               | Rolf Greiner Biochemica, Flacht     |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)           | Sigma, Deisendorf                   |
| Dioxan                               | Merck, Darmstadt                    |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)              | Sigma, Deisendorf                   |
| DNA-Standards                        | Boehringer Mannheim                 |
| Endofree Kit                         | Qiagen, Hilden                      |
| Ergosterol                           | Sigma, Deisendorf                   |
| Ethanol p.A.                         | Merck, Darmstadt                    |
| Ethidiumbromid                       | Sigma, Deisendorf                   |

---

|                                     |                                  |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma, Deisendorf                |
| FACS Flow                           | Becton Dickinson, Heidelberg     |
| Foetal Calf Serum (FCS)             | Sigma, Deisendorf                |
| Glycerol                            | Sigma, Deisendorf                |
| Glycin                              | Roth, Karlsruhe                  |
| Hank`s Balanced Salt Solution (10x) | Sigma, Deisendorf                |
| Hepes Buffer 1 M                    | Sigma, Deisendorf                |
| Hyperfilm ECL                       | GE Healthcare (Amersham), Upsala |
| 22-(R)-Hydroxycholesterol (22-OHC)  | Sigma, Deisendorf                |
| 22-(S)-Hydroxycholesterol           | Sigma, Deisendorf                |
| Indomethacin                        | Sigma, Deisendorf                |
| Kaliumbromid                        | Sigma, Deisendorf                |
| Kaliumchlorid                       | Sigma, Deisendorf                |
| Kupfersulfat                        | Sigma, Deisendorf                |
| LB-Medium (Luria Broth)             | Sigma, Deisendorf                |
| Luciferase Assay-System             | Promega, Mannheim                |
| MA Lipofection Enhancer             | IBA, Göttingen                   |
| Magnesiumchlorid                    | Sigma, Deisendorf                |
| Methanol p.A.                       | Merck, Darmstadt                 |
| Metafectene                         | Biontex, München                 |
| $\beta$ -Mercaptoethanol            | Sigma, Deisendorf                |
| Natriumacetat                       | Sigma, Deisendorf                |
| Natriumazid                         | Sigma, Deisendorf                |
| Natriumcarbonat                     | Sigma, Deisendorf                |
| Natriumchlorid                      | Merck, Darmstadt                 |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)          | Biorad, München                  |
| Natrium-EDTA                        | Sigma, Deisendorf                |
| Nitrocellulosemembran               | Amersham Biosciences, Upsala     |
| NucleoBond Kit                      | Macherey-Nagel, Düren            |
| Oil Red O Pulver                    | Sigma, Deisendorf                |
| Oligonukleotid-Synthese             | Metabion, Martinsried            |
| Paraformaldehyd (PFA)               | Sigma, Deisendorf                |
| PBS +/- $Mg^{2+}/Ca^{2+}$           | PAN Biotech, Aidenbach           |

---

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Penicillin  | Sigma, Deisendorf              |
| Phorbolmyristatacetat (PMA)                           | Sigma, Deisendorf              |
| 2-Propanol p.A.                                       | Merck, Darmstadt               |
| Protease-Inhibitoren                                  | Roche, Penzberg                |
| Protein Standards                                     | Biorad, München                |
| Ready-To-Go PCR Beads                                 | Amersham Biosciences, Upsala   |
| Restriktionsenzyme                                    |                                |
| - Ava AI  | New England Biolabs, Frankfurt |
| - Cla I   | New England Biolabs, Frankfurt |
| - Bam HI  | New England Biolabs, Frankfurt |
| 9-cis Retinoic Acid (9cRA)                            | Sigma, Deisendorf              |
| Rosiglitazon  | Sigma, Deisendorf              |
| Rotiszint eco plus                                    | Roth, Karlsruhe                |
| RPMI 1640 Medium                                      | PAA Lab., Pasching - Austria   |
| SOCS Medium   | Invitrogen, Karlsruhe          |
| Streptomycin  | Sigma, Deisendorf              |
| SybrGreen I (10 000-fach)                             | Invitrogen, Eugene             |
| 1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -[ <sup>3</sup> H]-Cholesterol | Sigma, Deisendorf              |
| TEMED   | Biorad, München                |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan                        | Sigma, Deisendorf              |
| Triton-X-100  | Sigma, Deisendorf              |
| Trypsin   | Sigma, Deisendorf              |
| Tween 20  | Sigma, Deisendorf              |
| YIC-C8-434  | Sigma, Deisendorf              |

## 3.2 Lösungen und Puffer

DEPC Wasser

2 ml DEPC auf einen Liter bidestilliertes Wasser ( $H_2O_{dd}$ ), 2 h inkubieren und autoklavieren, damit das DEPC zerstört wird

---

HHMC-Lösung

0,25 g BSA; 5 ml Hank`s Lösung (10x); 500  $\mu$ l HEPES; je 50  $\mu$ l  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  add 50 ml  $H_2O_{dd}$

---

TBE-Puffer

0,5 M Tris; 0,415 M Borsäure; 10 mM EDTA;  $H_2O_{dd}$

pH 8.0

---

WCEB-Puffer

25 mM HEPES; 0,3 M NaCl; 1,5 mM  $MgCl_2$ ; 0,2 mM EDTA; 0,5 % Triton-X-100; 10 % Glycerin;  $H_2O_{dd}$

---

Polyacrylamidgel nach Standard-Protokoll

Lower Tris Puffer

90,9 g THAM (Tris base); 10 ml 20 % SDS add 10 ml  $H_2O_{dd}$

pH 8,8

---

Upper Tris Puffer

6,06 g THAM (Tris base); 2 ml 20 % SDS add 100 ml  $H_2O_{dd}$

pH 6,8

---

Laufpuffer

10-fach: 60 g THAM (Tris base); 288 g Glycin; 100 ml 20 % SDS add 2 L  $H_2O_{dd}$

---

---

### Transferpuffer

3,03 g Tris; 14,4 g Glycin add 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>; 200 ml Methanol (kühl stellen)

---

### TBS-(T)

10 ml 1 M Tris (pH 10,88); 33 ml 5 M NaCl add 1 000 mL H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

(T) steht für 0,1 % Tween

---

### Blockieren unspezifischer Reaktionen

5 % Milchpulver, 100 ml TBS

---

### Auftragspuffer

55 mM Tris/HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 40 % Glycerin; 4,3 % β-Mercaptoethanol; 0,1 % Bromphenolblau

---

### Dichtegradientenlösungen:

D1 (1,080 g/ml): 30 g NaCl; 0,25 g Na-EDTA add 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
pH 7,4

D2 (1,050 g/ml): 18,5 g NaCl; 0,25 g Na-EDTA add 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
pH 7,4

D3 (1,000 g/ml): 0,25 g Na-EDTA add 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
pH 7,4

---

### PBS

0,524 g Natriumdihydrogenphosphat; 2,883 g Dinatriumhydrogenphosphat;  
17,532 g NaCl add 2 L H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
pH 7,4

---

### Resolubisierungslösung

0,01 M Tris; 0,1 M NaCl; 0,001 M Na-Azid; 2 M Guanidin HCl  
pH 7,4

---

### Oil Red O Färbelösung

Auf 100 ml Isopropanol werden 500 mg Oil Red O Pulver gemischt (0,5 %).

Lichtgeschützt ist die Lösung bis zu 10 Monaten haltbar.

## 3.3 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 3: Primersequenzen

| PRIMER        | SEQUENZ  | REFERENZEN                                    |
|---------------|--|---|
| GAPDH         | Forward: 5`-TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA-3`<br>Reverse: 5`-TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3`             | Kielar <i>et al.</i> 2001<br>120              |
| CD36          | Forward: 5`-GAG AAC TGT TAT GGG GCT AT-3`<br>Reverse: 5`-TTC AAC TGG AGA GGC AAA GG-3`                 | Pietsch <i>et al.</i><br>1996 <sup>121</sup>  |
| ABCA1         | Forward: 5`-TGA CAA GTC TGT GCA ATG GAT CAA-3`<br>Reverse: 5`-GAT ACG AGA CAC AGC CTG GTA GAT-3`       | Kielar <i>et al.</i> 2001<br>120              |
| ABCG1         | Forward: 5`-CAG TCG CTC CTT AGC ACC A-3`<br>Reverse: 5`-TCC ATG CTC GGA CTC TCT G-3`                   | Rubic <i>et al.</i> 2006<br>122               |
| LXR $\alpha$  | Forward: 5`-AGA GGA GGA ACA GGC TCA TGC-3`<br>Reverse: 5`-AAA GGA GCG CCG GTT ACA CT-3`                | Fu <i>et al.</i> 2001 <sup>123</sup>          |
| LDL-R         | Forward: 5`-CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG-3`<br>Reverse: 5`-TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG-3`                 | Scheithe <i>et al.</i><br>1997 <sup>124</sup> |
| PPAR $\gamma$ | Forward: 5`-AAG TTC AAT GCA CTG GAA TTA GAT GA-3`<br>Reverse: 5`-TGT AGC AGG TTG TCT TGA ATG TCT TC-3` | Avis <i>et al.</i> 2005<br>125                |



### 3.4 Verwendete Geräte

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Autoklav  | Systemec GmbH, Wetterberg     |
| Centriflo Cones (CF 25, Amicon)                       | Biorad, München               |
| Coulter Counter                                       | Beckman                       |
| Durchflußzytometer (FACScan)                          | Becton Dickinson, Heidelberg  |
| Einmalküvetten Plastibrand®                           | Brand GmbH, Werkheim          |
| FACS-Röhrchen   | Becton Dickinson, Heidelberg  |
| Finnigan MAT 700                                      | Finnigan MAT, Bremen          |
| Gelelektrophoresen                                    |                               |
| Gelkammer Sub Cell                                    | Biorad, München               |
| Stromversorgung                                       | Amersham Biotech, Upsala      |
| Gene Quant II RNA/DNA Calculator                      | Amersham Biotech, Cambridge   |
| Injektionssystem CIS3                                 | Gerstel, Mühlheim             |
| 6-, 12-, 24-, 48- und 96-                             | Sarstedt, Nürnberg            |
| Lochrundplatten                                       |                               |
| Magnetplatte  | IBA, Göttingen                |
| MITRAS LB 940   | Berthold Techn.,              |
| PCR-Tubes 0,2 mL (Ultra Thin Wall Tubes)              | Bioplastics, Landgraf         |
| PCR-Tubes 0,5 mL                                      | Biozym Diagnostics, Oldendorf |
| PD-10 Säulchen  | Amersham Biotech, Upsala      |
| Petrischalen  | Sarstedt, Nümbrecht           |
| pH-Meter 765 Calimatic SE 103                         | Knick, Berlin                 |
| Photometer Uvikon 922                                 | Kontron Instruments, Neufahrn |
| Pipetten  | Gilson Abimed, Langenfeld     |
| Pipettenspitzen 10 µl Diamond D 10                    | Gilson, Langenfeld            |
| Pipettenspitzen 20 – 1000 µl                          | Sarstedt, Nümbrecht           |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)                     | Eppendorf, Hamburg            |
| Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)                     | Falcon, Heidelberg            |
| Realtime PCR iCycler iQ                               | Biorad, München               |
| Reinstwasser (H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ) Anlage | Milli Pore, Eschborn          |
| Spritzen  | Becton Dickinson, Heidelberg  |

---

|                                 |                                       |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| Sterilbank GELAIRE BSB 4 A      | Flow Laboratories, Michigan           |
| Sterilfilter 0,2 µM             | Sartorius, Nürnberg                   |
| Stickstoffbehälter              | L` air liquide, Champigny             |
| T75 und T25 Zellkulturflaschen  | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| TECAN Reader                    | GENios                                |
| Thermal-Cycler Perkin Elmer 480 | PE Applied Biosystems,<br>Weiterstadt |
| GC – Varian 3400                | Varian, Palo Alto, USA                |
| Vortexer Heidolph Reax 2000     | Heidolph                              |
| Waagen                          | Sartorius, Göttingen                  |
| Wasserbad                       | Köttermann Labortechnik,<br>München   |
| Zellschaber                     | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Zentrifugen:                    |                                       |
| Beckmann LZ Ultrazentrifuge     | Beckmann Instruments,<br>München      |
| Hereaus Multifuge 3-C R         | Kendro, Osterode                      |
| Jonan MR 1822                   | Jonan GmbH, Unterhaching              |
| Mikro 200                       | Hettich Zentrifugen,                  |
| Neo Lab 16/18                   | Hermle Labortechnik, Wehingen         |

## **3.5 Zellbiologische Methoden**

### **3.5.1 Kultivierung von THP-1 Zellen**

Kulturmedium T: RPMI 1640-Medium; 1 % Pen/Strep; 10 % FCS

Die leukämische Zelllinie THP-1 wächst in Suspension. Die Kultivierung erfolgte in T75 Zellkulturflaschen bei einer Aussaatdichte von  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Mediumwechsel beziehungsweise Passage der Zellen erfolgte alle 72 h. Um Monozyten zu Makrophagen zu differenzieren, wurde für 72 h 160 nM PMA zugegeben, danach das Medium gewechselt. Im Anschluß konnten die Zellen für Versuche verwendet werden.

### **3.5.2 Kultivierung von HepG2-und HepG2 LXRE-luc Zellen**

Kulturmedium H: DMEM-Medium; 1 % Pen/Strep; 1 % Gln; 1 % MEM;  
10 % FCS

Die Kultivierung von adhärenenten Zellen wie HepG2 erfolgte in T75 Zellkulturflaschen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). Zum Umsetzen oder für Versuche wurden die Zellen mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit vorgewärmten Trypsin-EDTA inkubiert, durch leichtes Klopfen abgelöst und für die Weiterkultivierung mit frischem Medium auf  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

Für stabil transfizierte HepG2 LXRE-luc Zellen wurde das Kulturmedium H zusätzlich mit 5 µg/ml Blastidine S als Selektionsmarker versetzt.

### **3.5.3 Präparation von PBMCs**

Kulturmedium P: RPMI 1640-Medium; 1 % Pen/Strep; 10 % Humanserum

Aus 200 ml Vollblut wurden mittels Ficoll-Dichtegradient periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) isoliert. Bei der Blutabnahme wurden 50 ml Spritzen mit 2 ml 4%-igem EDTA (in 0,9 % NaCl) befüllt, um die Gerinnung zu vermeiden. Wenn simultan Bedarf für eine

Lipoproteinpräparation bestand, wurde das Vollblut zentrifugiert (2500 g; 30 min; 4 °C) und anschließend das Plasma abgenommen. Der Flüssigkeitsverlust wurde mit vorgekühltem nicht supplementiertem RPMI 1640-Medium ausgeglichen. In 50 ml Rörchen wurde anschließend Vollblut über die bereits vorgelegte Ficoll-Lösung geschichtet im Verhältnis 2 : 1. Im Anschluß erfolgte ein Zentrifugationsschritt ohne Bremse (600 g; 20 min; 4 °C). Die mittlere Schicht mit den PBMCs wurde gesammelt, gewaschen und einer positiven Selektion mittels humanen CD 14 MicroBeads von Miltenyi Biotech unterzogen. Nach Komplexbildung der Zellen mit den magnetischen CD 14 Partikeln wurde die Suspension auf magnetische Säulchen überführt, selektiv angereichert, danach ohne Magnetwirkung wieder aus den Säulchen gewaschen und gezählt. Die auf CD 14 selektionierten Monozyten wurden in 6-Lochrund Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen) ausgesät und angereicht zu Makrophagen zu differenzieren, indem sie eine Stunde mit humanserumfreien Kulturmedium P inkubiert wurden. Mittels Durchflußzytometrie wurde die Effizienz der Präparation überprüft.

#### **3.5.4 Lagerung eukaryotischer Zellen**

Einfriermedium: 70 % Kulturmedium; 20 % FCS; 10 % DMSO

Zum Einfrieren wurden  $4 \times 10^6$  Zellen gesammelt und mit 1,5 ml Einfriermedium versetzt. Wichtig ist das langsame Abkühlen im Anschluß auf -80 °C! Danach sollten die Zellen sofort in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen kurz im Wasserbad angetaut und zügig in vorbereitetes Vollmedium überführt, da DMSO toxisch für die Zellen ist. Nach ungefähr 24 h sollte man die Zellen nochmals waschen und neues Kulturmedium zugeben, um die apoptotischen und nekrotischen Bestandteile zu entfernen.

### 3.5.5 Aufnahme- und Efflux Assay

Für die „kalten“ Lipid-Versuche wurde der in Tabelle 2 vorliegende Versuchsaufbau verwendet. Mithilfe dieses Versuchsaufbaus wurde die Wirkung von  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol auf funktioneller Ebene analysiert. Die Zellen wurden immer präinkubiert mit  $\alpha$ -Tocopherol für 24 h und im Anschluß mit oxLDL für 24 bzw. 48 h stimuliert um eine Aufnahme der Lipide zu erreichen oder für 24 h mit dHDL um den zellulären Efflux zu fördern.

*Tabelle 4: Schematischer Versuchsaufbau für die Aufnahme und den Efflux von Lipiden bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen*

|  | <b>Zeitskala</b> | <b>PMA-diff THP-1</b>                |
|--|------------------|--------------------------------------|
| Aussaat  |                  | 6 x 10 <sup>6</sup> Zellen           |
| Präinkubtion $\alpha$ - / $\gamma$ -Tocopherol           | 24 h             | 20 / 40 $\mu$ g/ml                   |
| Aufnahme durch oxLDL + $\alpha$ - / $\gamma$ -Tocopherol | 24 - 48 h        | 100 $\mu$ g/ml<br>20 / 40 $\mu$ g/ml |
| Efflux durch dHDL + $\alpha$ - / $\gamma$ -Tocopherol    | 24 h             | 20 $\mu$ g/ml<br>20 / 40 $\mu$ g/ml  |



Lipidextraktion



Cholesterin-Oxidase-Assay oder GC-MS Aufbereitung

### 3.5.6 Transfektion von PMA-differenzierten THP-1 und HepG2

Es gibt die verschiedensten Methoden um genetisches Material z. B. zur Überexpression von Genen in eukaryotische Zellen zu bringen z. B. Elektroporation, Mikroinjektion, über den Transfer mithilfe von Lipidkomplexen oder über virale Systeme. Hier wurde zur Magnetofektion gegriffen. Es handelt sich um Komplexbildung der endotoxinfreien Plasmid-DNA mit lipophilen und magnetischen Komponenten, welcher über einen magnetischen Sog in die Zelle gelangt. Diese Methode funktioniert jedoch nur mit adhärennten Zellen. Verwendet wurde Metafectene der Firma Biontex und ein Lipofections Enhancer (IBA). Im Vorfeld wurden die Transfektionseffizienzen mit einem GFP-Vektor der Firma AMAXA mittels Durchflußzytometrie ausgetestet.

Die PMA-differenzierten THP-1 Makrophagen besitzen den Nachteil, dass sie nicht mehr proliferieren und müssen deshalb in größerer Menge ausgesät werden (12-Lochrund:  $0,6 \times 10^6$  Zellen). Die Hep G2 Zellen wurden auf 60 % Konfluenz im 48-Lochrund-Format ausgesät und in der exponentiellen Wachstumsphase transfiziert. Nicht alle Zellen lassen sich stabil transfizieren, weil sie z. B. schwer kultivierbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde nach leicht abgewandeltem Protokoll der Firma Biontex gearbeitet.

Unter transienter Transfektion versteht man die Transfektion mit fremder DNA, die die Zellen jedoch meist nach kurzer Zeit wieder ausschleusen oder degradieren.

*Tabelle 5: Protokoll zur Magnetofektion*

| Zellline | pCMV-LXRE-luc<br>pGL3-PPRE(Aco)luc | Metafectene | Enhancer            |
|----------|------------------------------------|-------------|---------------------|
| THP-1    | 1,5 µg                             | 1 : 6       | 1 µl/µg Plasmid-DNA |
| Hep G2   | 0,5 µg                             | 1 : 6       | 1 µl/µg Plasmid-DNA |

---

Transfektion mit einer Magnetplatte:

- a) Komplexbildung der Plasmid-DNA mit dem Metafectene, indem beide Substanzen für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert werden.
- b) Im Anschluß wird der Enhancer zugegeben, der die magnetischen Partikel enthält und nochmals für 15 min Raumtemperatur inkubiert.
- c) Die Suspension wird auf die vorbereiteten Zellen gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur auf der Magnetplatte inkubiert und damit internalisiert. Dann muß sofort der Mediumwechsel erfolgen, da diese Substanzen eine hohe Toxizität aufweisen.

### **3.5.7 Selektion von stabil-transfizierten Zellen**

Zur Selektion der transfizierten Hep G2 Zellen wurde als Antibiotikum Blastidine S in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Die Zellen wurden mit einem Selektionsplasmid pCMV/Bsd von Invitrogen und dem Reporterplasmid pCMV-LXRE-luc bzw. pGL3-PPRE(Aco)luc ko-transfiziert, kultiviert, jeden zweiten Tag mit neuem Medium versetzt und umgesetzt bevor sie konfluentes Wachstum erreichten. Die Selektion war nach 7 bis 10 Tagen beendet. Danach wurde aus einer einzelnen Zelle eine Einzelzellkolonie hochgezogen.

### **3.5.8 Durchflußzytometrie / FACS**

Die Durchflußzytometrie (FACS steht für fluorescence activated cell sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln z. B. Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mithilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörpern detektiert wird.

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenzahl, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/ Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Bei FITC ist das Absorptionsmaximum bei 495 nm und das Emissionsmaximum bei 519 nm. Man kann aber auch Farbstoffe detektieren, die von den Zellen selbst produziert werden, wie z. B. GFP, was in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle zur Transfektionseffizienz verwendet wurde.

#### a) Oberflächenproteine – CD36 Färbung

Der Oberflächenrezeptor CD36 ist quantitativ der wichtigste Scavenger Rezeptor zur Aufnahme von modifiziertem LDL. Die Messung wurde mit PMA-differenzierten THP-1 durchgeführt, die dieselbe experimentelle Inkubationszeit (3.6.5) durchlaufen hatten. Die Zellen wurden gesammelt, gewaschen und in HHMC-Lösung resuspendiert und in eine 96-Lochrundplatte überführt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Präinkubation für 30 min mit 5 % Humanserum abgesättigt. Darauf erfolgte die Inkubation mit einer Isotyp-Kontrolle (1:100) bzw. mit Anit-CD36 (FA6, 1:40) für 45 min auf Eis. Als nächstes erfolgte die Bindung mit dem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper (1:100) für 45 min auf Eis. Nach jedem



Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal gewaschen und zentrifugiert (200 g; 5 min; 10 °C).

Mittels PFA (3,7 %) wurden die Zellen fixiert und danach in FACS-Röhrchen überführt. Nach der Messung im Durchflusszytometer erfolgte die Auswertung mittels CELLQuest™ der Firma Becton Dickinson.

## **3.6 Molekularbiologische Methoden**

### **3.6.1 Agarosegelelektrophorese**

Diese Methode dient der Trennung von DNA-Fragmenten. Je nach Größe der Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 1 bis 2 Prozent verwendet. Die Agarose wurde durch Erhitzen in TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 55 °C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach Gießen und Erhärten des Gels wurde die Kammer mit TBE-Puffer versetzt. Die Proben, versetzt mit einem Fünftel ihres Volumens an DNA-Probenpuffer, wurden in die Gelvertiefungen aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde parallel ein DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp oder 1 kb) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V über ungefähr 45 min.

### **3.6.2 Restriktionsverdau**

DNA-Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen zur Überprüfung der Richtigkeit von Konstrukten erfolgten in der Regel in 20 µl Ansätzen in vom Hersteller mitgelieferten, enzymespezifischen Puffern, denen stets BSA (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt wurde. Die eingesetzte Enzymmenge wird in Units angegeben, wobei 1 U Enzym 1 µg DNA pro Stunde schneidet. Pro µg DNA wurde 1 U Enzym je Schnittstelle verwendet, wobei das Temperaturoptimum dem Herstellerprotokoll entnommen wurde.

### 3.6.3 Transformation von *E.coli* (DH5 $\alpha$ ) durch Hitzeschock

Der Begriff Transformation beschreibt die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien. Kompetente *E.coli* Bakterien (3.7.3), gelagert auf -80 °C, wurden langsam auf Eis aufgetaut, anschließend die gereinigte Plasmid-DNA zugegeben und für 30 min weiter auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) erfolgte erneut eine Inkubation für 5 min auf Eis. Der Ansatz wurde mit 500  $\mu$ l vorgewärmten LB-Medium (2-fach konzentriert) versetzt und unter Schütteln inkubiert (1 h, 37 °C), bevor 100  $\mu$ l des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

Zur Selektion transformierter Bakterien enthielten die Agarplatten das Antibiotikum, dessen Resistenzgen im Plasmid integriert war. In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um Ampicillin (100  $\mu$ g/ml).

### 3.6.4 Klonierung

Unter dem Begriff Klonierung versteht man eine Methode, bei der man ein Gen, in einen Vektor z. B. ein Plasmid integriert um möglichst große Mengen eines DNA-Fragments herzustellen. Eine Wirtszelle wird anschließend mit dem Konstrukt transformiert, welches dann untersucht werden kann. Der typische Wirt ist ein Stamm des Bakteriums *Escherichia coli*, in diesem Fall der Stamm DH5 $\alpha$ .

Waren auf der Agarplatte nach der Transformation *E. coli* Kolonien gewachsen, so wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml Ampicillin-haltigem (100  $\mu$ g/ml) LB-Medium als Übernachtskultur bei 37 °C angeimpft. Um später eine Plasmidpräparation durchzuführen, wurde die Übernachtskultur in einen Erlenmyerkolben (250 ml) überführt, befüllt mit einem Zehntel seines Nennvolumens, und bei 160 upm für 16 h geschüttelt.

### 3.6.5 Präparation von Plasmid-DNA

Nach Transformation der *E.coli* mit einem Vektor wurde das eingebrachte Plasmid durch Übernachtskulturen der Bakterien vermehrt. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation der jeweiligen Kultur bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Bakteriensediment die Plasmid-DNA isoliert.

Für die Aufreinigung kleiner DNA-Mengen zur Sequenzierung bzw. zum Restriktionsverdau wurden Midi-Präparationen mit dem Nucleo Bond Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Transfektionen in eukaryotische Zellen erforderten größere DNA-Mengen mit hohem Reinheitsgrad, das heißt endotoxinfrei. Dafür verwendete man den Endofree Maxi-Präparationskit von Macherey-Nagel, wobei das Prinzip der alkalischen Lyse<sup>126</sup> eingesetzt wird. Die Vorgehensweise folgte dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde mittels Anionenaustauschersäulchen mit anschließender Isopropanolfällung gereinigt. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge TE-Puffer gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch eine photometrische Analyse.

Konzentration: 1 OD<sub>260</sub> = 50 µg dsDNA/ml Lösungsmittel

Reinheit: OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> = 1,8 bis 2,0

Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei -20 °C.

### 3.6.6 Plasmidsequenzierung

1 µg Plasmid-DNA pGL3-PPRE(Aco)luc, gelöst in destilliertem Wasser wurde in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und an die Firma Agova zur Sequenzierung geschickt. Die Analyse und Bestätigung der Sequenzen erfolgte mit der Software BLAST<sup>127</sup>.

### 3.6.7 Präparation von Gesamt-RNA

RNA besteht im Wesentlichen aus einem Gemisch von rRNA (ribosomaler RNA), tRNA (Transfer-RNA) und mRNA (messenger RNA), wobei die mRNA nur 2 % ausmacht. In der Regel liegt RNA im Gegensatz zur DNA einzelsträngig vor. Aufgrund einer fehlenden Hydroxyl-Gruppe am Pentosering degradiert RNA wesentlich leichter als DNA. Die dafür verantwortlichen Enzyme sind RNasen.

Bei Arbeiten mit RNA ist auf peinliche Sauberkeit zu achten, um eine Degradierung durch RNasen zu vermeiden. Verwendet werden autoklavierte Materialien sowie DEPC-Wasser, das dazu dient RNase-frei zu arbeiten. Das DEPC zerfällt beim Autoklavieren in die beiden flüchtigen Produkte CO<sub>2</sub> und Ethanol. Die Wirkung beruht darauf, dass das Molekül kovalent an primäre und sekundäre Amine bindet (Alkylierung), u.a. auch an für die katalytische Funktion vieler RNasen wichtigen Histidin-Seitenketten in den aktiven Zentren, welche dadurch irreversibel inhibiert werden.

3 x 10<sup>6</sup> PMA-differenzierte THP-1 Zellen sowie 5 x 10<sup>6</sup> PBMCs wurden in 15 ml Röhrchen gesammelt und zentrifugiert (200 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 1 ml PBS gewaschen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluß wurde das Protokoll für den NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel genau befolgt. Um die Degradierung der RNA zu verhindern und genomische DNA zu eliminieren erfolgte zuerst die Lyse mit chaotropischen Salzen. Dadurch werden sofort RNasen inaktiviert und gute Voraussetzungen für die Bindung an die Silikamembran geschaffen. Das Lysat wurde filtriert und homogenisiert und kontaminierende DNA durch DNase I entfernt. Es folgten weitere Waschschrte, in deren Anschluß die Gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser eluiert wurde. Die Konzentration und der Reinheitsgrad wurden photometrisch bestimmt.

Konzentration: 1 OD<sub>260</sub> = 50 µg sRNA/ml Lösungsmittel

Reinheit: OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> = 1,8 bis 2,0

Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 3.6.8 Quantitative Real-time RT-PCR

#### 3.6.8.1 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Kombination aus zwei Methoden, um die Genexpression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben nachzuweisen. Die bei der PCR verwendeten spezifischen DNA-Polymerasen können die RNA nicht direkt amplifizieren. Daher muß die RNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden und diese wird im Anschluß für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Die Produkte der RT-PCR lassen sich anschließend klonieren oder elektrophoretisch im Agarosegel auftrennen. Dadurch können die Fragmente im UV-Licht überprüft werden.

Reverse Transkriptasen, auch RNA-abhängige DNA-Polymerasen genannt, sind Enzyme, die die Umschreibung von mRNA Transkripten in cDNA katalysieren. Erstmals wurden sie von Temin 1970 in Retroviren beschrieben<sup>128</sup>. Heute eingesetzte reverse Transkriptasen sind veränderte Enzymvarianten aus unterschiedlichen Retroviren wie der „Avian Myeloblastosis Virus“ (AMV RT) oder „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV RT). Das Temperaturoptimum der M-MLV RT liegt bei 37 bis 42 °C. Diese wurde auch in dieser Arbeit verwendet und mit den Ansätzen für 60 min bei 37 °C inkubiert. Für die Reverse Transkription werden auch Primer benötigt, wofür hier Random-Hexamerprimer eingesetzt wurden. Die Synthese der cDNA wurde nach dem Herstellerprotokoll von Qiagen mit dem Omniscript Reverse Transcription-Kit durchgeführt.<sup>129</sup>

Kary Banks Mullis<sup>130</sup> entwickelte 1983 das PCR-Verfahren zur Vervielfältigung eines DNA-Strangs der zweite Schritt der RT-PCR. Zuerst erfolgt jedoch ein Initialisierungsschritt für 5 min bei 95 °C um die doppelsträngige DNA aufzuschmelzen. Der PCR-Prozeß besteht aus 20 bis 40 Zyklen eines Temperaturprotokolls und wird in einem Thermocycler durchgeführt:

- A) **DENATURIERUNG**: Erhitzen für 30 s auf 95 °C, um die Doppelstränge der DNA zu trennen, dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen.
- B) Primerhybridisierung (**ANNEALING**): Die Temperatur wird soweit gesenkt, dass sich die Primer anlagern können typischerweise zwischen 55 bis 65 °C für 20 bis 60 s.
- C) **ELONGATION**: Schließlich synthetisiert die thermophile Taq-Polymerase bei 72 °C für 20 bis 60 s den komplementären Strang. Der Primer bleibt gebunden und bildet den Anfang des Einzelstrangs.

Die Produkte werden bei 4 bis 8 °C gelagert.

#### 3.6.8.2 Real time RT-PCR

Die quantitative Real-Time RT-PCR<sup>131</sup> bildet eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit zur Quantifizierung bietet. Dabei werden kontinuierliche Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen durchgeführt. Die Amplifikatlänge für die Real time RT-PCR sollte nicht mehr als 500 bp betragen, um die Enzyme im log-linearen Bereich der Kinetik optimal zu nutzen. In der vorliegenden Arbeit wurde der iCycler der Firma Biorad, ausgestattet mit UV-Lampe und CCD-Kamera, verwendet. Die Fluoreszenz nimmt durch den interkalierenden Farbstoff oder spezifische Sonden proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die einfachste Möglichkeit zur Quantifizierung ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen, wie in dieser Arbeit SYBR Green I (Molecular Probes). Diese Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren mit der DNA. Der Nachteil ist jedoch eine geringere Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann und auch keine Multiplex Messungen durchgeführt werden können. Hilfreich ist eine Schmelzkurvenanalyse, wobei die DNA aufgeschmolzen wird, indem man die Temperatur kontinuierlich erhöht (50 bis 95 °C). Dadurch entstehen wieder Einzelstrangmoleküle und der Fluoreszenzfarbstoff wird wieder

freigesetzt. Da doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt besitzt als unspezifisch entstehende Primerdimere, kann anhand der Schmelzkurve annähernd Auskunft über die Menge und Reinheit des gebildeten Fragments gegeben werden. Weitere Möglichkeiten Amplifikationen zu quantifizieren sind z. B. FRET-Sonden u.a. LightCycler-Sonden<sup>132</sup>, Taqman-Sonden<sup>133</sup>, Molecular Beacons<sup>134</sup> oder Lux-Primer.

Wichtig ist auch die Amplifikationseffizienz der PCR zu überprüfen, indem man die RNA in 10-fachen Verdünnungsschritten amplifiziert. Die Effizienz E kann mithilfe der Steigung m einer gemessenen Standardkurve berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Eine Steigung m von -3.32 würde somit eine Effizienz von 100 % bedeuten, das heißt eine vollständige Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus.

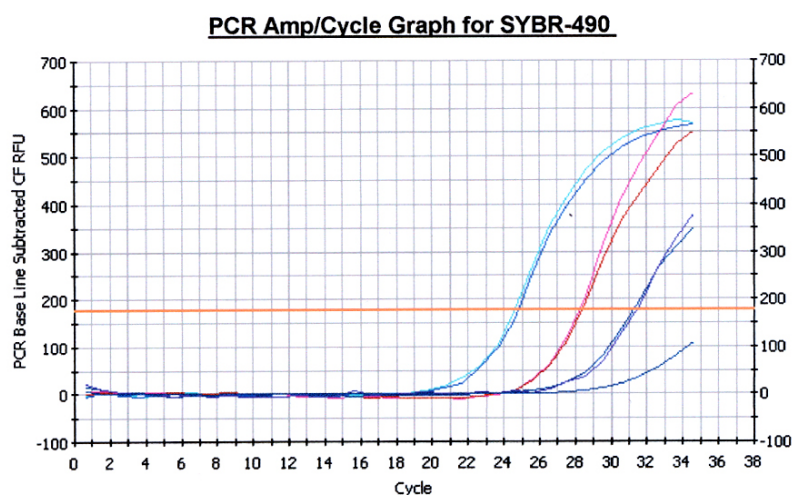


Abbildung 10: Amplifikation einer PPAR $\gamma$ -Verdünnungsreihe mittels quantitativer Realtime RT-PCR unter Verwendung von SYBR Green I. Gesamt-RNA von PMA-differenzierten THP-1 Zellen in Doppelwerten. Von links nach rechts: 1000 ng RNA (Hellblau), 100 ng RNA (Pink), 10 ng RNA (Dunkelblau) und die Negativkontrolle als Einfachwert.

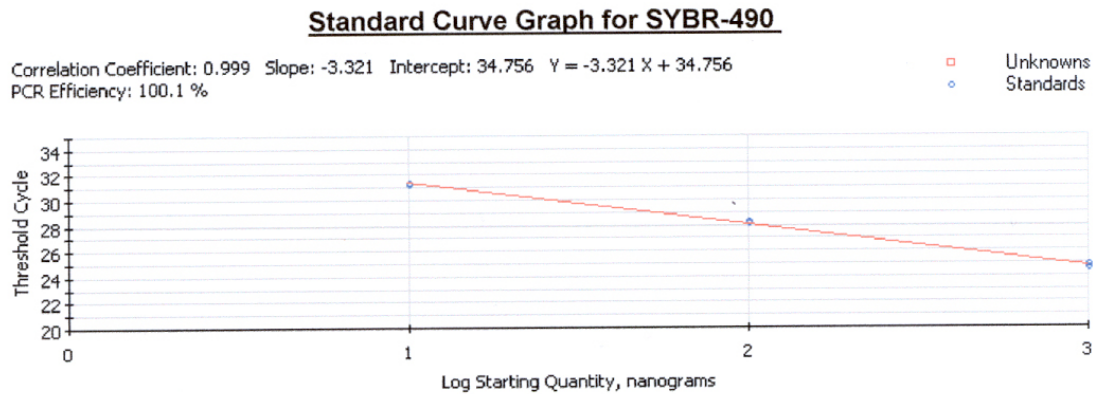


Abbildung 11: Standardgerade einer PPAR $\gamma$ -Verdünnungsreihe mittels quantitativer Realtime RT-PCR unter Verwendung von SYBR Green I. Gesamt-RNA von PMA-differenzierten THP-1 Zellen in Doppelwerten von links nach rechts: 10 ng RNA, 100 ng RNA, 1000 ng RNA.

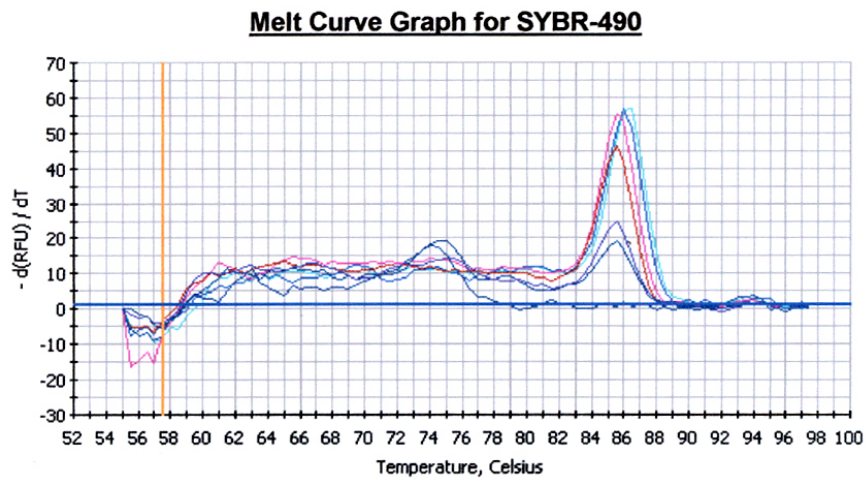


Abbildung 12: Beispiel für eine Schmelzkurvenanalyse von spezifischen Amplifikaten von PMA-differenzierten THP-1 Zellen mittels quantitativer Realtime RT-PCR unter Verwendung von SYBR Green I. Einfachwerte für die Negativkontrolle und Doppelwerte für PPAR $\gamma$ -Amplifikate.



### 3.6.8.3 Quantifizierung und PCR-Parameter

Als ziemlich aufwändiges Rechenmodell wird die absolute Quantifizierung angesehen, bei der die Interaktion der Transkription von Template und internem Standard überprüft werden muß, um Rückschlüsse auf die genaue Anzahl der in der Probe vorhandenen Templates ziehen zu können. Meist wird deshalb das Rechenmodell der relativen Quantifizierung bevorzugt, bei dem ein möglichst konstant exprimiertes Referenzgen wie hier GAPDH, als interne Kontrolle herangezogen wird. Es können aber auch andere Gene wie  $\beta$ -Aktin und Tubulin eingesetzt werden. Da die Gesamtanalyse auf diesem Signal basiert, sollte die interne Kontrolle leicht zu detektieren sein und dessen Expression während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder als Antwort auf die experimentelle Behandlung nicht variieren <sup>129</sup>.

In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und das Signal weit unter der Detektionsgrenze, während in der dritten Phase die Menge der Produkte derart ansteigt, dass es zur Hemmung durch diese kommt. Ein detektierbarer exponentieller und deshalb quantifizierbarer Anstieg findet sich also nur in der Phase dazwischen. Um den Anfang der exponentiellen Phase erfassen zu können, wird häufig der  $C_t$ -Wert („Threshold Cycle“ = Schwellenwert-Zyklus) verwendet, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Berechnung erfolgt nach der delta-delta- $C_t$ -Methode. Die unterschiedliche Expression wird als n-fache Expression mithilfe des fold-changes das heißt der Änderung der RNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle angegeben. Wichtig ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Die  $C_t$ -Werte werden voneinander abgezogen ( $\Delta C_t$ ), die beiden  $\Delta C_t$  der einzelnen Gruppen (stimuliert / unstimuliert) voneinander abgezogen ( $\Delta(\Delta C_t)$ ) und in die Gleichung n-Fache Expression  $2^{-(\Delta(\Delta C_t))}$  eingesetzt.

$$\text{fold-change} = 2^{-(\Delta(\Delta C_t))}$$

$$\Delta C_t = C_t (\text{Rezeptor}) - C_t (\text{interne Kontrolle})$$

$$\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t (\text{Behandlung}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$$

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Umschreibung der Omniscript Reverse Transcription-Kit von Quiagen laut Herstellerprotokoll (siehe Tabelle 4) und für die Durchführung der PCR wurden Ready-To-Go™ PCR Beads der Firma GE Healthcare verwendet ebenfalls laut Herstellerprotokoll (siehe Tabelle 5), die in lyophilisierter Form bereits die Taq DNA-Polymerase, dNTPs sowie etwas Magnesiumchlorid enthalten. Die Beads wurden in DEPC Wasser gelöst, sowie Primer, Magnesiumchlorid und SYBR Green I zugesetzt. Das Protokoll zur quantitativen realtime PCR ist in Tabelle 6 dargestellt.

*Tabelle 6: Protokoll für Reverse Transkription*

| <b>Substanz</b>                             | <b>Konzentration</b> |
|---|----------------------|
| RT – Puffer                                 | 1 x                  |
| dNTPs                                       | 0,5 mM pro NTP       |
| Random Hexamer Primer                       | 20 µM                |
| Reverse Transkriptase                       | 4 U                  |
| Gesamt-RNA                                  | 200 – 1000 ng        |
| ENDVOLUMEN mit DEPC Wasser vervollständigen |                      |

Tabelle 7: Optimierte Zusammensetzung des PCR Reaktionsansatzes

| Substanz          | Konzentration         |        |               |        |
|-------------------|-----------------------|--------|---------------|--------|
| SybrGreen I       | 0,1 x                 |        |               |        |
| Primer            | GAPDH                 | 100 nM | LDL-R         | 150 nM |
|                   | CD36                  | 100 nM | LXR $\alpha$  | 100 nM |
|                   | ABCA1                 | 150 nM | PPAR $\gamma$ | 100 nM |
|                   | ABCG1                 | 100 nM |               |        |
| MgCl <sub>2</sub> | GAPDH                 | 3,5 mM | LDL-R         | 4,0 mM |
|                   | CD36                  | 3,5 mM | LXR $\alpha$  | 1,5 mM |
|                   | ABCA1                 | 4,0 mM | PPAR $\gamma$ | 4,0 mM |
|                   | ABCG1                 | 3,5 mM |               |        |
| PCR Beads         | 1                     |        |               |        |
| cDNA              | 3 $\mu$ L             |        |               |        |
| DEPC Wasser       | Endvolumen 25 $\mu$ L |        |               |        |

Tabelle 8: Protokoll zur quantitativen real time PCR

| Realtime PCR   | Zeit | Temperatur |
|----------------|------|------------|
| Zyklen 35 – 40 |      |            |
| Denaturierung  | 30 s | 95 °C      |
| Annealing      | 20 s | 60 °C      |
| Elongation     | 20 s | 72 °C      |

## 3.7 Mikrobiologische Methoden

### 3.7.1 Anzucht von *E.coli*

Die Anzuchten erfolgten aerob bei 37 °C. Erlenmyerkolben, befüllt mit einem Zehntel ihres Nennvolumens wurden bei ca. 160 upm geschüttelt. Bei kleineren Volumina (3-5 ml) wurden die Zellen in 15 ml Reaktionsgefäßen angezogen.

### 3.7.2 Gefrierkulturen von *E.coli*

Zur Herstellung einer Gefrierkultur wurden 1500 µl einer frischen Übernachtkultur, kultiviert in LB-Medium, mit 500 µl Glycerol versetzt und bei -80 °C eingefroren. Die Rekultivierung erfolgte durch Übertragung kleiner Mengen an Bakterien in 4 ml LB-Medium mittels steriler Pipettenspitze mit nachfolgender Kultivierung bei 37 °C.

### 3.7.3 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Mit dieser Methode macht man die Zellen kompetent für die Transformation mittels Hitzeschock. *E.coli* wurde aerob in LB-Medium bei 37 °C angezogen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6. Nach Ernte der Zellen wurden sie mehrmals mit eiskaltem 10 %-igem Glyzerin gewaschen, wobei ständig das Volumen verringert wurde. Als letzten Schritt resuspendierte man die Zellen schließlich mit 50 µl 10 %-igem Glyzerin. Die entstandenen Aliquots wurden mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 3.8 Proteinbiochemische Methoden

### 3.8.1 Gesamtproteinextraktion

Um Kontamination mit ubiquitär vorhandenen Proteasen zu vermeiden, ist es unbedingt erforderlich sauber zu arbeiten u. a. Handschuhe und steriles Arbeitsmaterial zu verwenden. Die Gesamtproteinextraktion erfolgte nach DiDonato et. al. <sup>135</sup> modifiziert von Dr. Erl .

$3 \times 10^6$  PMA-differenzierte THP-1 Zellen, in Petrischalen, und  $5 \times 10^6$  PBMCs wurden auf Eis mit einem Zellschaber abgekratzt und in 15 ml Röhrchen überführt. Das durch Zentrifugation (200 g, 5 min, 4 °C) gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS<sup>+/+</sup> resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert (2000 g, 1 min, 4 °C). Das Zellsediment wurde für die Zelllyse kräftig mit dem Lysepuffer (WCEB), der die entsprechende Menge Protease-Inhibitor-Mix von Roche enthielt, resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugieren (7000 g, 10 min, 4 °C) von Membranresten getrennt und in 500 µl Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinmenge wurde mit dem D<sub>c</sub> Protein Assay der Firma Biorad nach dem Herstellerprotokoll bestimmt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

### 3.8.2 Proteinbestimmung nach LOWRY <sup>136</sup>

Diese Methode dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen. Sie beruht auf zwei Reaktionen. In der Biuretreaktion wird ein blau-violetter Komplex zwischen Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung gebildet. In einem zweiten Schritt reduziert dieser Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren). Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Eine Alternative wäre auch die Proteinbestimmung nach Bradford, die ähnlich empfindlich ist.

Die Proteinbestimmung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Lösung A: 2 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,16 % Na-Tartart, 1 % SDS,  
add 500 ml NaOH (0,1 N)

Lösung B: 4 %  $\text{CuSO}_4$  (in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ )

Lösung C: 1 mL Lösung B + 100 mL Lösung A (3 ml pro Probe)

Lösung D:  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  + Folin-Ciocalteau Reagenz (1 : 1) (300  $\mu\text{l}$  pro Probe)

1000  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  diene als Nullabgleich. Die Proben wurden sowohl 10  $\mu\text{l}$  auf 990  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  als auch 20  $\mu\text{l}$  auf 980  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  verdünnt. 3 ml Lösung C und 300  $\mu\text{l}$  Lösung D wurden mit den Proben resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluß erfolgte die photometrische Bestimmung bei 560 nm mit Quantifizierung durch eine BSA-Eichgerade.

### 3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode dient der Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Zusätzlich verwendet man als Detergenz SDS, das die Eigenladungen von Proteinen überdeckt. Pro 1 g Protein binden ungefähr 1,4 g SDS, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen.

Alle SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden mit dem Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele Mini-PROTEAN 3 modifiziert nach Laemmli et. al durchgeführt<sup>137</sup>. Für die Auftrennung der Proteingemische wurden 7.5 % (10 %) Trenngele verwendet, die eine gute Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich von 30-120 kDa (10 - 60 kDa) ermöglichen. Die Proteinextrakte wurden durch Zusatz von Probenpuffer im Verhältnis 1:5, sowie bei kleinen Proteinen einem 5-minütigem Kochen bei 95 °C, vorbereitet. Bei großen Proteinen sollte das Kochen vermieden werden, da es zur Aggregation kommen kann. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde zusätzlich zu den Proben ein Proteinmolekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Trennung der

Proteingemische erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V im Laufpuffer (3.2) für 45 bis 60 min.

### 3.8.4 Immunoblot

Wie unter 3.8.3 beschrieben wurden die Proteine aufgetrennt und mithilfe einer Mini-Naß-Blot-Kammer von Biorad für eine Stunde bei 100 V, 0,14 - 0,20 mA und 4 °C auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend konnte die Nitrocellulosemembran für eine Minute mit der Ponceau S-Färbelösung inkubiert und mehrfach mit Wasser gewaschen werden, um die Transfereffizienz zu überprüfen.

Für die spezifische Immunfärbung wurde die Membran mit den fixierten Proteinen 1 h in Blockierlösung (5 % Milch + TBS-T), um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen, 1 h bzw. über Nacht mit dem ersten Antikörper (Tab. 6) und 1 h mit dem HRP konjugiertem Sekundärantikörper (in TBS-T) inkubiert. Nach jeder Antikörperbehandlung wurde die Membran intensiv gewaschen (3 x 10 min) und schließlich für eine Minute mit Chemolumineszenzreagenz inkubiert, kurz mit Filterpapier angetrocknet und in eine Filmkassette gelegt. Auf Röntgenfilmen konnten nun die spezifisch gefärbten Proteine nachgewiesen werden. Falls auf der Membran erneut Proteine mit einer anderen Antikörperkombination nachgewiesen werden sollten, so wurden die vorhandenen Antikörper durch Inkubation mit Stripping-Puffer von der Membran gelöst (50 °C, 30 min) und nach mehrfachem Waschen durch TBS-T einer zweiten Immunodetektion unterzogen.

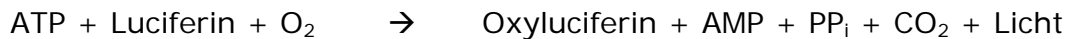
*Tabelle 9: Antikörper zur Immundetektion*

| Antikörper | Größe   | Verdünnung                             |
|------------|---------|--|
| ABCA1      | 220 kDa | 3 % Magermilch<br>1 : 2000, 1 h bei RT |

### 3.8.5 LXRE- / PPRE- Transaktivierungs-Luciferase-Assay

Luciferasen werden oft als Indikatorenzyme in Transaktivierungs-Assays benutzt. Sie sind strukturell unterschiedliche Enzyme, in deren Anwesenheit Luciferine oxidiert werden und es zur Biolumineszenz kommt. Unterschieden werden unter anderem Firefly-Luciferasen aus dem Leuchtkäfer und Renilla-Luciferasen, die nur Luciferol und Sauerstoff zur Reaktion benötigen.

#### Luciferase



Wenn die übrigen Reagenzien im Überschuß vorliegen, ist die Lichtemission proportional zur ATP-Konzentration. In einem Messsystem kann also von der gemessenen Lichtintensität auf den ATP-Gehalt einer Probe geschlossen werden. Die Lichtemission wurde im Luminometer Mithras von Berthold erfaßt. Der LXRE- bzw. PPRE-Luciferasetest wurde mit dem Luciferase-Assay-System von Promega durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen (PMA-differenzierte THP-1, HepG2 und HepG2 LXRE-luc) in 12-Lochrund- bzw. in 48-Lochrund-Kulturplatten ausgesät, mit pGL3-PPRE(Aco)luc transfiziert, mit den zu testenden Agonisten stimuliert, mit PBS gewaschen und gut getrocknet. Anschließend wurden die Zellen in passivem Lysepuffer (im Reagenzienansatz enthalten) für 15 min lysiert und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei >14000 g, 2 min entfernt. Zur Aussaatdichte und Volumen der Reagenzien siehe Tabelle ... Die Messung der Luciferaseaktivität in den Lysaten (10 µl) erfolgte im Luminometer. Nach Injektion des Substratmixes (50 µl) wurde eine Verzögerung von 0,1 s festgelegt und danach die Luciferaseaktivität 20 s gemessen.



Tabelle 10: Protokoll für Luciferase-Assay

| Zelllinie                | Lochrund-Kulturplatte | Aussaatdichte                | Lysepuffer |
|--------------------------|-----------------------|------------------------------|------------|
| PMA-differenzierte THP-1 | 12 Einsätze           | 0,5 x 10 <sup>6</sup> Zellen | 100 µl     |
| HepG2                    | 48 Einsätze           | 0,1 x 10 <sup>6</sup> Zellen | 60 µl      |
| HepG2 LXRE-luc           | 48 Einsätze           | 0,3 x 10 <sup>6</sup> Zellen | 60 µl      |

### 3.9 Analyse von Lipoproteinen und Vitamin E

#### 3.9.1 Isolierung und Nachweis von Lipoproteinen aus Plasma

Humanes Vollblut von freiwilligen gesunden Probanden wurde zur Antikoagulation und zum Schutz vor Autooxidation mit 4 %-igem EDTA versetzt (2 ml pro 50 ml). Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (1500 g; 30 min; 4 °C) zur Trennung von Plasma und zellulären Bestandteilen wurde das Plasma abgenommen und durch sequentielle präparative Ultrazentrifugation (L7 ZU; Beckmann; SW 40 Rotor) bei 4 °C nach der Methode von Schulz et. al 1995<sup>138</sup> über einen vorsichtig aufgeschichteten Kalium-Bromid-Gradienten isoliert (Lösungen D1, D2 und D3). Diese Methode beruht auf unterschiedlichen Sedimentations- und Fluktuationseigenschaften der verschiedenen Plasmabestandteile. Die Ultrazentrifugationszeit betrug 36 000 upm, 20 h, 4 °C. Anschließend konnte die LDL- sowie die HDL-Schicht abpipettiert, über Kartuschen entsalzt (3.9.2) und die Proteinmenge nach LOWRY (3.8.2) bestimmt werden.

#### 3.9.2 Herstellen von nativem und oxidiertem LDL

Um oxidiertes LDL herzustellen, muss das native LDL zuvor entsalzt werden, da die vorhandenen Salze toxisch für die Zellen sind und EDTA die Oxidation stören würde. 2 mL natives LDL wurde auf Econo-Pac 10 DG Säulchen

aufgebracht, die zuvor mit PBS äquilibriert und anschließend nachgespült wurden. LDL wird aufgefangen und mit PBS auf eine Konzentration von 0,2 mg eingestellt und anschließend in speziellen Hütchen (Centriflo cones) durch Zentrifugation aufkonzentriert. Lichtgeschützt war das LDL für 2 Wochen in Kühlschrank haltbar. Um oxidiertes LDL (oxLDL) herzustellen<sup>138</sup>, wurde Kupferchlorid (10 µM) zusammen mit nativem, entsalztem LDL für 24 h unter Anwesenheit von Sauerstoff im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung von Kupferchlorid-Resten und zum Schutz vor Weiteroxidation wurde die Reaktion am nächsten Tag mit EDTA (0,24 mM) gestoppt. Nach Aufkonzentrierung durch Zentrifugation und erneuter Proteinbestimmung wurde das oxLDL für Experimente in einer Konzentration von 50 bzw. 100 µg/mL eingesetzt. Die Charakterisierung des Oxidationsgrades erfolgte über folgende Methoden.

a) Relative Mobilität von LDL in der Lipoprotein-Elektrophorese (3.9.4)

Oxidation von LDL bedingt eine Erhöhung der negativen Ladungen. Je stärker die Oxidation, desto weiter wandern die oxidierten LDLs bei der Elektrophorese im Gel.

b) Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 234 nm

Je stärker das LDL oxidiert ist, desto mehr konjugierte Diene finden sich in Fettsäuren, die bei einer Wellenlänge von 234 nm eine Absorption zeigen. Diese zerfallen aber nach 4 h weiter.

### 3.9.3 Delipidieren von HDL (dHDL)

HDL wurde delipidiert<sup>139</sup>, indem 1 ml HDL tröpfchenweise in 12 ml kaltes, vortexendes Methanol pipettiert wurde. Anschließend wurde die Lösung mit 28 ml Diethylether sehr gut gemischt und 10 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (200 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde erneut mit 40 ml Diethylether versetzt, gut gemixt, abermals auf Eis inkubiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml Resolubisierungslösung (3.2) aufgenommen, steril filtriert und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

### 3.9.4 Lipoprotein-Elektrophorese

Aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität der nativen und oxidierten Lipoproteine werden diese in einem alkalischen Barbitalpuffer (pH 8,6) im Titan-Lipoprotein-Agarosegel aufgetrennt und die entstehenden Fragmente mit Fettrot 7B-Lösung gefärbt, wodurch sie qualitativ ausgewertet werden können. Die Lipoprotein-Elektrophorese wurde im HELENA TITAN GEL System von Rolf Greiner Biochemica nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

### 3.9.5 Extraktion zellulärer Lipide und Cholesterin-Oxidase Assay

Die Lipidextraktion wurde nach dem Protokoll von Folch *et. al* modifiziert <sup>140</sup>.  $6 \times 10^6$  PMA-differenzierte THP-1 Zellen (3.5.5) wurden in 15 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen, um das eventuell noch vorhandene FCS aus dem Medium zu entfernen. Das Sediment wurde mit 1000 µl PBS<sup>+/+</sup> resuspendiert, ein Zehntel zur Proteinbestimmung nach LOWRY <sup>136</sup> entnommen und unter Vortexen dreimal 200 µl Methanol zugegeben. Die Zugabe von 1,2 ml Chloroform erfolgte, um die Lipide zu lösen. Damit eine bessere Phasentrennung erreicht werden konnte, ergänzte man den Zellextrakt mit 450 µl KCl und zentrifugierte (1200 g, 2 min, 4 °C) im Anschluss. Die wässrige Phase wurde verworfen und nochmals 163 µl Methanol und KCl hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation überführte man die untere lipidhaltige Phase in ein 2 ml Reaktionsgefäß und verdampfte das Lösungsmittel über eine Vakuumzentrifuge bei 4 °C. Mit einem frisch hergestellten peroxidfreien Dioxan-2-Propanol-Gemisch 1:1 <sup>141</sup> wurden die getrockneten Lipide in 25 µl gelöst und davon je 10 µl mit dem Cholesterin-Oxidase Kit von Rolf Greiner Biochemica in 1 ml Plastikkuvetten photometrisch bei 546 nm gemessen.

### 3.9.6 Extraktion sekretierter Lipide aus RPMI -Kulturmedium

Um Rückschlüsse auf sekretierte Lipide ziehen zu können, wurde die Extraktion nach Folch *et al* modifiziert <sup>140</sup>. 200 bzw. 1000 µl Überstand, das aus dem experimentellen Aufbau (3.5.5) von PMA-differenzierten THP-1 stammte, wurde wie in 3.9.5 extrahiert. Die variierenden Volumenangaben

können in Tabelle 8 nachgelesen werden. Die Lipidphase wurde nicht in einer Vakuumzentrifuge, sondern mithilfe von Stickstoff eingedampft bzw. im Falle von radioaktiv-markierten Proben sofort ohne Eindampfen mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint) versetzt und im Szintillationszähler gemessen.

*Tabelle 11: Protokoll zur Lipidextraktion aus Überständen*

| SUBSTANZ                    | ÜBERSTAND 200 µl | ÜBERSTAND 1ml   |
|-----------------------------|------------------|-----------------|
| Methanol                    | 3 x 100 µl       | 3x 600 µl       |
| Chloroform                  | 600 µl           | 3600 µl         |
| Kaliumchlorid               | 250 µl           | 1400 µl         |
| Methanol +<br>Kaliumchlorid | 120 µl + 120 µl  | 500 µl + 500 µl |

### 3.9.7 OIL RED O-Färbung

PMA-differenzierte THP-1 wurden nach Beendigung des Experiments (3.6.5) mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen, 30 min mit 3,7 %-igem PFA fixiert und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gespült. Bei 6-Lochrund-Kulturplatten wurde 1 ml Oil Red O Färbelösung pro Vertiefung 30 min inkubiert. Die Kulturschalen wurden nach mehrmaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf einem Zellstofftuch abgetropft und möglichst schnell fotografiert, da die Färbung nicht stabil ist <sup>142</sup>.

### 3.9.8 Bestimmung des Vit E-Gehalts mittels HPLC

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist eine Methode zur Trennung von Substanzen, aber auch über Standards zur Identifizierung und Quantifizierung. Bei diesem chromatographischen Trennverfahren wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel (mobile Phase) durch eine Trennsäule (stationäre Phase) gepumpt. Besteht eine starke Wechselwirkung der Substanz mit der stationären Phase, so verbleibt sie relativ lange auf der Säule. Je nach Wechselwirkung erscheinen die Bestandteile der Substanz zu verschiedenen Retentionszeiten am Ende der Trennsäule, wo sie mit einem geeigneten Detektor zum Beispiel UV

nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde das Herstellerprotokoll zur Bestimmung von Vitamin A und E aus Serum oder Plasma von Chromsystems verwendet und leicht modifiziert, da der Vitamin E-Gehalt in PMA-differenzierten THP-1 Zellen und im Überstand bestimmt werden sollte. Zur Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes in  $3 \times 10^6$  Zellen wurden diese in 200  $\mu\text{l}$  PBS<sup>+/+</sup> gesammelt und zur verbesserten Lyse mehrmals langsam durch eine Kanüle (23 G) gezogen. Im Anschluß wurde der Ansatz mit 20  $\mu\text{l}$  internem Standard und 25  $\mu\text{l}$  Präzipitationsreagenz I in einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß versetzt, 30 s geschüttelt, 400  $\mu\text{l}$  Präzipitationsreagenz II zugegeben, erneut geschüttelt (Vortex), zentrifugiert (9000 g; 10 min) und 50  $\mu\text{l}$  des Überstands in das HPLC-System injiziert.

### 3.10 Radiochemische Methoden

#### 3.10.1 Aufnahme-/Efflux-Assay mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxLDL

Radioaktives Tritium ist neben Protium und Deuterium ein natürliches Isotop des Wasserstoffes, dessen Atomkern instabil ist und mit einer Halbwertszeit von 12,32 Jahren durch Emission eines Elektrons in <sup>3</sup>He (Betazerfall) zerfällt.

Um eine direkte Aussage über die Aufnahme und den Efflux von Lipiden treffen zu können, wurde oxidiertes LDL (3.9.2) mithilfe eines Tracers nämlich [<sup>3</sup>H]-Cholesterin bei 37 °C für 30 min äquilibriert. Die Zellen (PMA-differenzierte THP-1 und PBMCs) waren 24 Stunden vorher mit RPMI-Kulturmedium (1 % FCS oder HS; 1 % Pen/Strep) und  $\alpha$ -Tocopherol vorinkubiert worden. Ab diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls ein ACAT-Inhibitor zugesetzt, um die Cholesterinesterbildung zu vermindern. Danach wurden die Zellen für 24 bzw. 48 Stunden mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxidiertem LDL +/-  $\alpha$ -Tocopherol versetzt. Anschließend erfolgte eine Äquilibrierungsphase +/-  $\alpha$ -Tocopherol für 24 Stunden oder es wurde ein

Efflux mittels dHDL +/-  $\alpha$ -Tocopherol induziert (Tabelle 12). Die Medienüberstände bzw. das extrahierte Zellsediment (3.9.5), ebenso wie die Wasserphasen der Lipidextraktion, wurden nach jedem Schritt in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

Tabelle 12: Protokoll für radioaktiv-markierten Aufnahme-/Efflux-Assay

| ZELLEN             | AUSSAAT<br>12-<br>Lochrundplatte | AUFNAHME<br>[ <sup>3</sup> H]-oxLDL<br>in µg/mL | ÄQUILI-<br>BRIERUNG     | EFFLUX<br>dHDL<br>in µg/mL |
|--------------------|----------------------------------|---|-------------------------|----------------------------|
| PMA-diff.<br>THP-1 | 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen       | 100<br>24 h / 48 h                              | +/- 10 %<br>FCS<br>24 h | +/- 20<br>24 h             |
| PBMCs              | 1 x 10 <sup>6</sup> Zellen       | 60<br>24 h / 48 h                               | +/- 10 %<br>HS<br>24 h  | +/- 15<br>24 h             |

### 3.11 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- *standard error of the mean* (+/- SEM) von mindestens drei ([<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markierte Lipidaufnahme- und Lipideffluxassays), sonst im Regelfall sechs unabhängigen Versuchsansätzen dargestellt. Abweichungen sind in Bildunterschriften angegeben. Der Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol wurde durch Varianzanalyse getestet und dabei die SigmaStat 3.5 Software verwendet (Systat Inc. Point Richmond, USA). Bei signifikanter ANOVA wurden dann einzelne Gruppenvergleiche von  $\alpha$ -Toc (20 und 40 µg/ml) zur Kontrolle nach Holm-Sidak getestet. Falls eine Abweichung von der Normalverteilung oder eine Misparität der Varianzen festgestellt wurde, kam die nicht-parametrische Varianzanalyse nach Friedman und bei Signifikanz der Gruppenvergleich nach Tukey zum Einsatz. Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

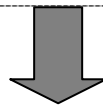
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Allgemeiner Experimentaufbau

Für alle Versuche wurde der in Tabelle 2 beschriebene Versuchsaufbau verwendet. Mithilfe dieses Versuchsaufbaus wurde die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol in einigen Versuchen auch von  $\gamma$ -Tocopherol auf transkriptioneller, translationeller und funktioneller Ebene analysiert. Die Zellen wurden mit  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol präinkubiert (24 h). Anschließend wurde oxLDL (50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1) als Lipidquelle für 48 h angeboten. In analogen Versuchen wurde dem Medium für 24 h dHDL (10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1) als Lipidakzeptor zugegeben. Zur Analyse der Cholesterin-Aufnahme wurden die Makrophagen 24 h oder 48 h mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin markiertem oxLDL beladen und das zelluläre [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin bestimmt. Für den Cholesterin-Efflux wurden die Zellen nach erfolgreicher Beladung mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin markiertem oxLDL für 24 h mit dHDL inkubiert und im Anschluß das sezernierte [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin gemessen. Während der Versuche war zu jedem Zeitpunkt die entsprechende Menge  $\alpha$ - bzw.  $\gamma$ -Tocopherol (0, 20 und 40  $\mu\text{g/ml}$ ) vorhanden. Die verwendeten Methoden wie Realtime RT-PCR, Reporteragen-Assays, Immunoblot usw. sind im Material- und Methodenteil näher beschrieben.

Tabelle 13: Schematischer Versuchsaufbau für die Aufnahme und den Efflux von Lipiden bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen und PBMCs

|  | Zeitskala | PMA-diff THP-1                           | PBMCs                                   |
|--|-----------|--|---|
| Aussaat  |           | 3 – 6 x 10 <sup>6</sup> Zellen           | 3 – 6 x 10 <sup>6</sup> Zellen          |
| Präinkubtion $\alpha$ - / $\gamma$ -Tocopherol           | 24 h      | 0 / 20 / 40 $\mu$ g/ml                   | 0 / 20 / 40 $\mu$ g/ml                  |
| Aufnahme von oxLDL ( $\alpha$ - / $\gamma$ - Tocopherol) | 24 - 48 h | 100 $\mu$ g/ml<br>0 / 20 / 40 $\mu$ g/ml | 60 $\mu$ g/ml<br>0 / 20 / 40 $\mu$ g/ml |
| Efflux zu dHDL ( $\alpha$ - / $\gamma$ - Tocopherol)     | 24 h      | 20 $\mu$ g/ml<br>0 / 20 / 40 $\mu$ g/ml  | 10 $\mu$ g/ml<br>0 / 20 / 40 $\mu$ g/ml |



$\alpha$ -Tocopherol-Gehalt im Zellsediment und Mediumüberstand

Realtime RT-PCR, Reporteragen-Assay,

Immunoblot, FACS

Lipidaufnahme- bzw. Lipidefflux-Assays

Färbung der Lipidtröpfchen in Makrophagen mittels Oil Red O

## 4.2 $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt von Makrophagen

Wieviel  $\alpha$ -Tocopherol von Makrophagen aufgenommen wird, wurde am Gesamtgehalt an Vitamin E im Medienüberstand und im Zellsediment überprüft. Der Versuchsaufbau erfolgte wie unter 4.1 beschrieben. PMA-differenzierte THP-1 waren 24 h mit  $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert und das Medium anschließend mit oxLDL beziehungsweise dHDL angereichert worden, wobei zu jedem Zeitpunkt  $\alpha$ -Tocopherol im Medium vorhanden war. Waren die Zellen mit  $\alpha$ -Tocopherol allein inkubiert, so hatten sie nach 72 h 12  $\mu$ g  $\alpha$ -Tocopherol pro einer Million Zellen aufgenommen (Abbildung 13A), wobei im Medium weiterhin  $\alpha$ -Tocopherol im Überschuss zur Verfügung stand (Abbildung 13B). Dagegen wurde von Makrophagen, durch oxLDL



induziert, ungefähr noch zwei Drittel  $\alpha$ -Tocopherol aufgenommen, während durch dHDL cholesterinverarmte Makrophagen maximal die Hälfte  $\alpha$ -Tocopherol gegenüber Kontrollzellen aus dem Medium übernahmen. Wahrscheinlich konkurrierten hier die Lipoproteine als zusätzliche  $\alpha$ -Tocopherol-Akzeptoren. Eine erste Sättigung des  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalts trat in Makrophagen auch schon bei 20  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol ein.

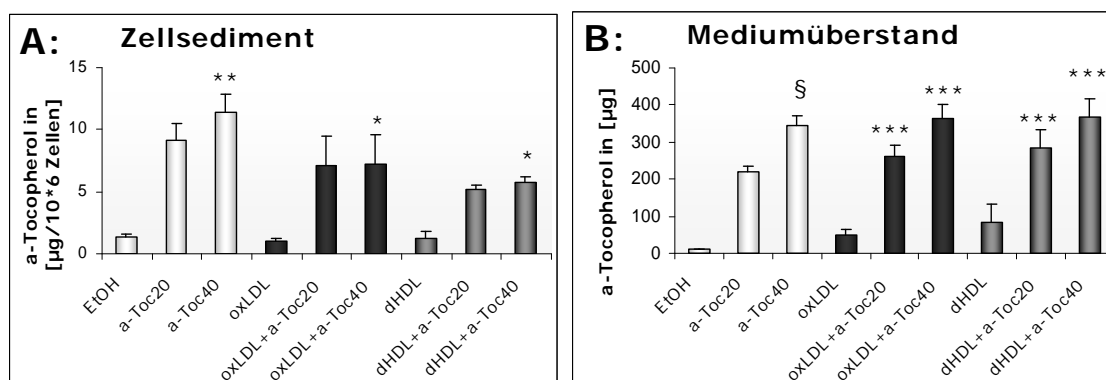


Abbildung 13:  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt im Zellsediment (A) und im Medienüberstand (B) von PMA-differenzierten THP-1, deren Medium mit Trägersubstanz (weiße Säulen), oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 48h, schwarze Säulen) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$ , 24h, graue Säulen) versetzt war, nach 72 h Inkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol (0, 20 und 40  $\mu\text{g/ml}$ ).  $n=4 \pm$  SEM; \*, §:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$

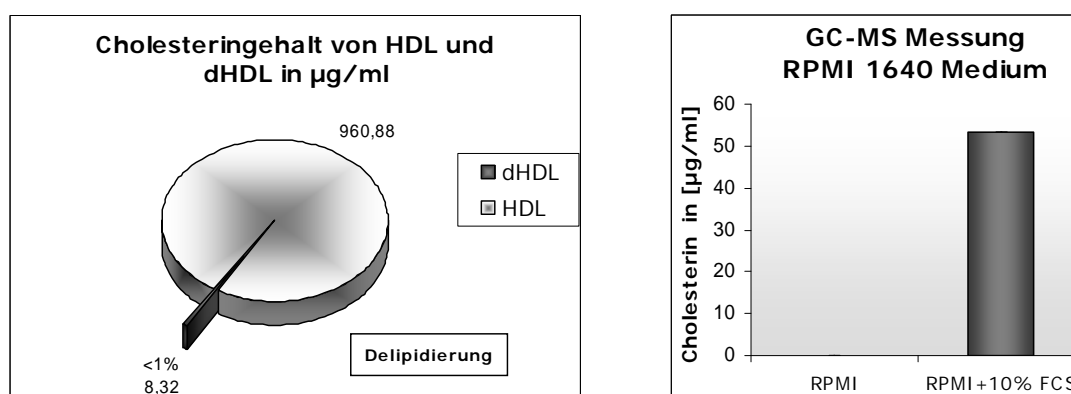


Abbildung 14: Lipidgehalt von HDL und dHDL (links) und von RPMI 1640 Medium ohne FCS und mit 10% FCS (rechts) in Cholesterin in  $\mu\text{g}$

Im Vorfeld wurde auch die Effektivität der Delipidierungsmethode von HDL mittels GC-MS untersucht. Mittels Methanol-Diethylether-Lipidextraktion konnten >99% des Cholesterins der HDL Partikel abstrahiert werden. Beim Medium RPMI 1640 mit 10 % FCS konnte gezeigt werden, dass pro Milliliter Medium ungefähr 50 µg Cholesterin vorhanden sind, wohingegen Medium ohne FCS keinerlei Sterole enthält (Abbildung 14).

### **4.3 Wirkung von $\alpha$ -Tocopherol auf die spezifische mRNA Expression in Makrophagen**

#### **4.3.1 Transkription des Scavenger Rezeptors CD36**

Der Scavenger Rezeptor CD36 zeichnet sich dadurch aus, dass modifizierte LDL-Partikel wie z. B. oxLDL unkontrolliert und ungehemmt aufgenommen werden. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass der Scavenger Rezeptor CD36 nach einer Stimulation durch oxLDL durch  $\alpha$ -Tocopherol negativ beeinflusst wird. Deshalb sollten zuerst anhand der publizierten Befunde das in dieser Arbeit verwendete Zellmodell überprüft werden<sup>143</sup>. PMA-differenzierte THP-1 und primäre Makrophagen wurden, wie unter 4.1 beschrieben, mit  $\alpha$ -Tocopherol behandelt, anschließend die Gesamt-RNA isoliert, die CD36-spezifische mRNA amplifiziert und mittels Realtime RT-PCR quantifiziert. Es zeigte sich, dass die basale Transkription von CD36 durch  $\alpha$ -Tocopherol (20 oder 40 µg/ml) in dosisabhängiger Weise in PMA-differenzierten THP-1 supprimiert wurde. Die normalerweise durch oxLDL hervorgerufene Induktion der Transkription von CD36 konnte in eben diesen Zellen durch  $\alpha$ -Tocopherol dosisabhängig wieder reduziert werden. Wurden die Zellen jedoch dHDL ausgesetzt, um eine Cholesterinverarmung zu erreichen, so erfolgte eine signifikante Supprimierung von CD36, die in Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol dosisabhängig ebenfalls wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 15A). Die Stimulation von CD36 durch oxLDL und die in dem Zusammenhang durch  $\alpha$ -Tocopherol hervorgerufene Repression konnte auch in primären Makrophagen bestätigt werden, aber sowohl bei der basalen Expression als auch bei der Repression der Transkription mittels

dHDL, zeigte die Kombination mit  $\alpha$ -Tocopherol keinerlei Wirkung (Abbildung 15B).

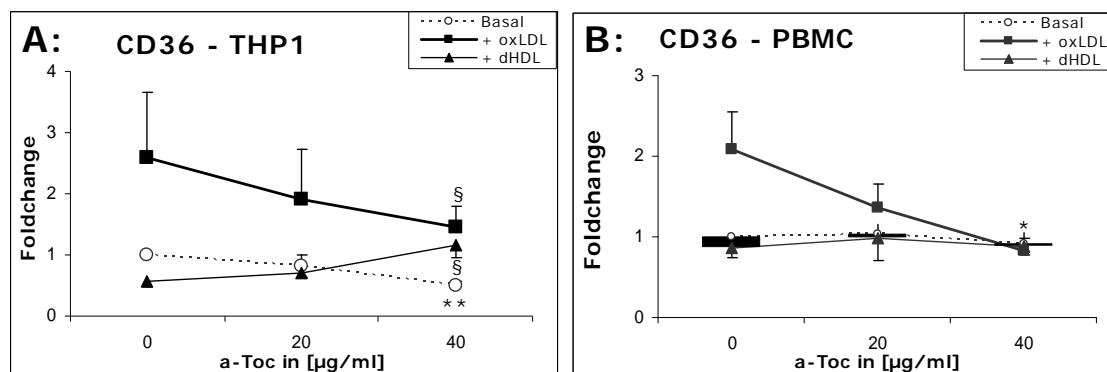


Abbildung 15: CD36-spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM; \*, § :  $p<0.05$   
\*\* :  $p<0.01$

#### 4.3.2 Transkription des LDL-Rezeptors

65% der zellulären Cholesterinaufnahme findet über die Rezeptor-vermittelte Endozytose des LDL-R statt. Aufgrund der bekannten Rolle des LDL-R im Cholesterin-Metabolismus<sup>56</sup>, sollte auch die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Transkription des LDL-R untersucht werden. PMA-differenzierte THP-1 und primäre Makrophagen wurden, wie unter 4.1 beschrieben, mit  $\alpha$ -Tocopherol behandelt, anschließend die Gesamt-RNA isoliert und die LDL-R-spezifische mRNA mittels Realtime RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass sowohl die basale Transkription durch  $\alpha$ -Tocopherol (20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$ ) als auch die Inhibition der Transkription des LDL-R durch oxLDL durch  $\alpha$ -Tocopherol in Makrophagen nicht beeinflusst wurde. Wurden jedoch PMA-differenzierte THP-1, aber auch PBMCs, dHDL ausgesetzt, um eine Cholesterinverarmung zu initiieren, so erfolgte eine Induktion der Transkription des LDL-R, die in

Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol tendenziell dosisabhängig vermindert war (Abbildung 16 A, B).

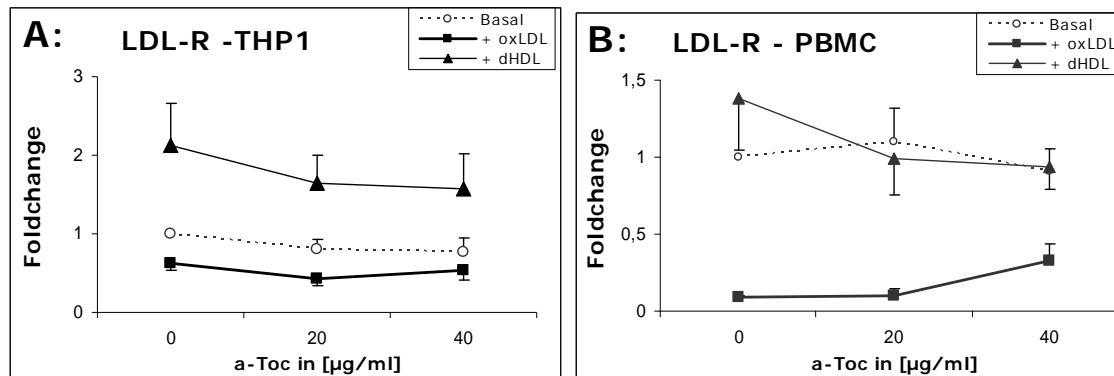


Abbildung 16: LDL-R spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM;

#### 4.3.3 Transkription der Cholesterin-Exporter ABCA1 und ABCG1

Der Ausstrom von Cholesterin und Phospholipiden wird in Makrophagen hauptsächlich durch ABCA1 und ABCG1 vermittelt. Diese Lipide werden von ABCA1 bevorzugt auf Apo A-I und von ABCG1 auf HDL übertragen und auf diese Weise in den reversen Cholesterintransport eingebracht. PMA-differenzierte THP-1 und primäre Makrophagen wurden, wie unter 4.1 beschrieben, mit  $\alpha$ -Tocopherol behandelt, anschließend die Gesamt-RNA isoliert und ABCA1- (Abbildung 17) sowie ABCG1-spezifische mRNA (Abbildung 18) mittels Realtime RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass die basale Transkription durch  $\alpha$ -Tocopherol (20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$ ) in dosisabhängiger Weise in PMA-differenzierten THP-1 signifikant supprimiert wurde. Die durch oxLDL hervorgerufene Induktion der Transkription von ABCA1 konnte durch  $\alpha$ -Tocopherol dosisabhängig um ca. 50% umgekehrt werden. Wurden PMA-differenzierte Makrophagen dHDL ausgesetzt, so erfolgte eine Supprimierung von ABCA1, die in Koinkubation

mit  $\alpha$ -Tocopherol dosisabhängig teilweise wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung 17A). Die Stimulation von ABCA1 durch oxLDL und die durch  $\alpha$ -Tocopherol hervorgerufene Repression konnte in primären Makrophagen nur tendenziell aber uniform beobachtet werden. Auf die basale Expression von ABCA1 zeigte  $\alpha$ -Tocopherol keine Wirkung. Unerwarteterweise führte die dHDL Exposition bei PBMCs zur Stimulation von ABCA1, die von  $\alpha$ -Tocopherol nur tendenziell aber uniform revertiert wurde (Abbildung 17B).

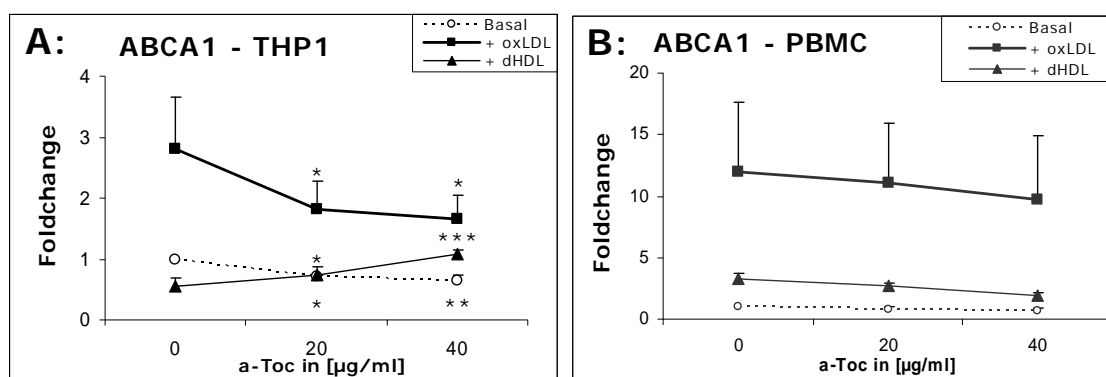


Abbildung 17: ABCA1-spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM; \* :  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

Die basale Expression von ABCG1 wurde in PMA-differenzierten THP-1 durch  $\alpha$ -Tocopherol (20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$ ) in dosisabhängiger Weise vermindert, ebenso die durch oxLDL hervorgerufene massive Induktion von ABCG1. Die dHDL Exposition von PMA-differenzierten THP-1 hatte keinen Effekt auf die basale ABCG1 Expression und die Reduktion durch  $\alpha$ -Tocopherol. In primären Makrophagen hatte die Anreicherung des Mediums mit oxLDL und auch dHDL eine massive Induktion von ABCG1 zur Folge, die von  $\alpha$ -Tocopherol nur tendenziell aber uniform reduziert wurde (Abbildung 18A, B).

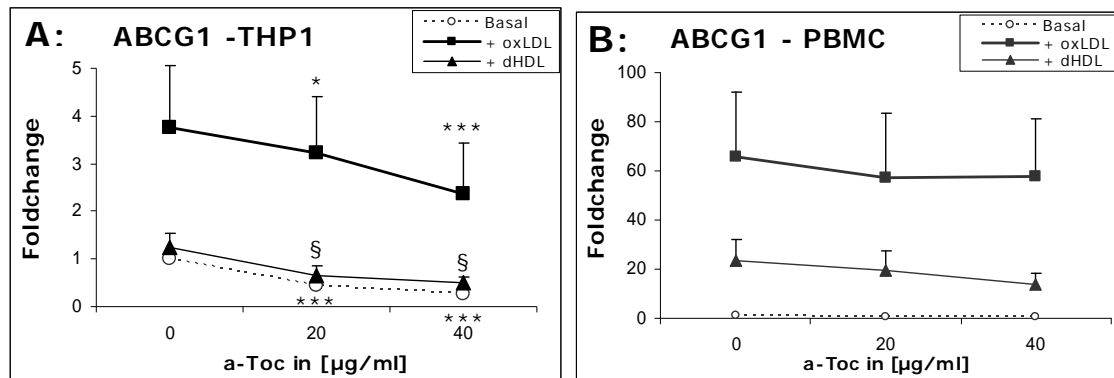


Abbildung 18: ABCG1 spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM; \*, § :  $p < 0.05$  \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$

#### 4.3.4 Transkription der Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$ und LXR $\alpha$

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde als nächstes untersucht, ob  $\alpha$ -Tocopherol die Expression der spezifischen mRNA Transkription von PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  selbst beeinflusst, da PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  als nukleäre Transkriptionsfaktoren die Expression von CD36 sowie ABCA1 und ABCG1 induzieren. PMA-differenzierte THP-1 und primäre Makrophagen wurden, wie unter 4.1 beschrieben, mit  $\alpha$ -Tocopherol behandelt, anschließend die Gesamt-RNA isoliert und PPAR $\gamma$ - (Abbildung 19) sowie LXR $\alpha$ -spezifische mRNA (Abbildung 20) mittels Realtime RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass die basale Expression von PPAR $\gamma$  in PBMCs durch  $\alpha$ -Tocopherol (20, 40  $\mu\text{g/ml}$ ) dosisabhängig tendenziell aktiviert werden konnte. Die Induktion der Transkription, die sowohl durch oxLDL als auch durch dHDL aktiviert wurde, verlangsamte sich in PMA-differenzierten THP-1 aber auch in primären Makrophagen tendenziell dosisabhängig durch  $\alpha$ -Tocopherol (Abbildung 19A, B).

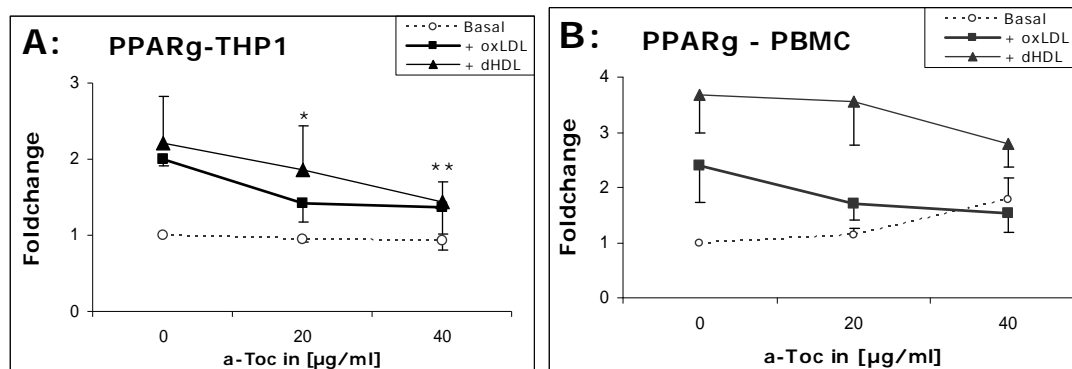


Abbildung 19: PPAR $\gamma$  spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6$  +/- SEM; \* : $p<0,05$   
\*\* : $p<0,01$

Von LXR $\alpha$  wurde die basale aber auch die durch oxLDL stimulierte Transkription in PMA-differenzierten THP-1 durch  $\alpha$ -Tocopherol (20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$ ) nicht beeinflusst (Abbildung 20). Die Stimulation der Transkription durch oxLDL wurde in primären Makrophagen dosisabhängig durch  $\alpha$ -Tocopherol umgekehrt (Abbildung 20B). Reicherte man das Medium dagegen mit dHDL an, um eine Cholesterinverarmung zu erreichen, so erfolgte eine unerwartete Induktion der Transkription von LXR $\alpha$ , die in Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol in PMA-differenzierten THP-1 dosisabhängig revertiert werden konnte, in primären Makrophagen dagegen nur tendenziell (Abbildung 20A, B).

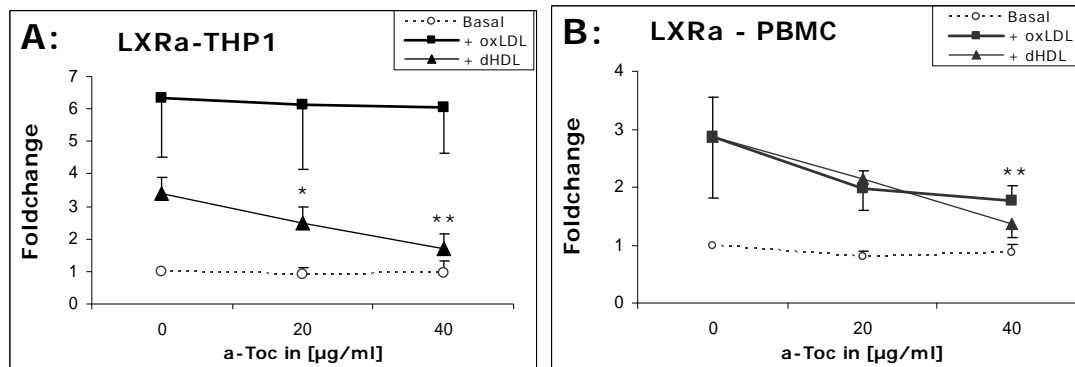


Abbildung 20: LXR $\alpha$  spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 50  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$  bei THP-1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  bei PBMCs, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6$  +/- SEM; \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0.01$

## 4.4 Einfluß von $\alpha$ -Tocopherol auf die Aktivierung von LXRE und PPRE

### 4.4.1 Analyse der Aktivierung von PPRE mithilfe des Reporterengenkonstrukts pGL3-PPRE(Aco)luc

Da die Expression von PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  selbst den Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol nicht allein erklären konnte, wurde auch die Aktivierung von PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  in einem Reportergen-Assay untersucht. PPRE ist dabei mit der Luziferase im Plasmid pGL3-PPRE(Aco)-luc gekoppelt und in transfizierten Zellen kann so die Aktivierung gemessen werden. Um eine geeignete Positivkontrolle zu bestimmen, wurden verschiedene bekannte PPAR $\gamma$ -Stimuli mit und ohne 9cRA, als zusätzlichem Agonisten, an transient transfizierten PMA-differenzierten THP-1 und HepG2 getestet (Abbildung 21). Die Inkubationszeit betrug 24 h, wobei 22-HOC (10  $\mu\text{M}$ ), Indomethacin (33  $\mu\text{M}$ ), Rosiglitazon (1  $\mu\text{M}$ ) und ddPGJ<sub>2</sub> (0,3 und 3  $\mu\text{M}$ ) zum Einsatz kamen. In beiden Zelltypen stellte sich ddPGJ<sub>2</sub> als bester Stimulus heraus und wurde fortan als Positivkontrolle verwendet.



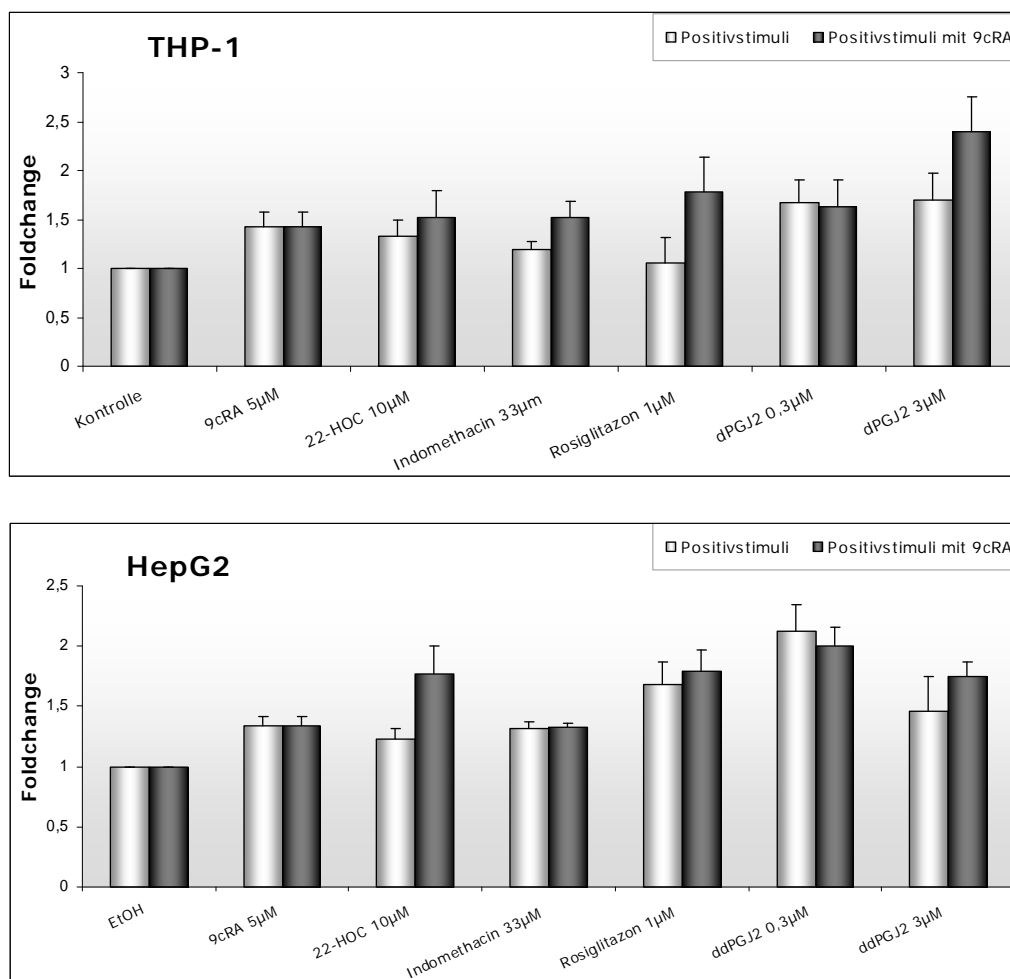


Abbildung 21: Analyse der Aktivierung von PPRE mithilfe des Konstrukts pGL3-PPRE(Aco)luc. Um die beste Positivkontrolle für die PPAR $\gamma$  Aktivierung zu messen, wurden transient transfizierte PMA-differenzierte THP-1 (A) und transient transfizierte HepG2 (B) für 24 h mit der Trägersubstanz oder mit verschiedenen Agonisten - 22-HOC, Indomethacin, Rosiglitazon, ddPGJ<sub>2</sub> (hellgraue Säulen) - oder in Kombination mit 9cRA (dunkelgraue Säulen) versetzt. Dann wurde die PPRE-abhängige Luziferase Aktivität gemessen. n=6 +/- SEM;

In PMA-differenzierten THP-1 Zellen und in HepG2 Zellen, die mit dem PPRE-Luziferase Reporter-genkonstrukt transient transfiziert waren, konnte die PPRE-Luziferase Aktivität durch RXR aber auch durch PPAR $\gamma$  Agonisten, wie 9cRA und ddPGJ<sub>2</sub> induziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol die durch ddPGJ<sub>2</sub> (1  $\mu$ M), oxLDL (100  $\mu$ g/ml) aber auch durch dHDL (20  $\mu$ g/ml) hervorgerufene PPRE-Luziferase Aktivität in PMA-differenzierten THP-1 supprimieren kann. In transient

transfizierten HepG2 war dies nur tendenziell möglich. Die Basalaktivität wurde in beiden Zelllinien durch  $\alpha$ -Tocopherol nicht reduziert (Abbildung 22).

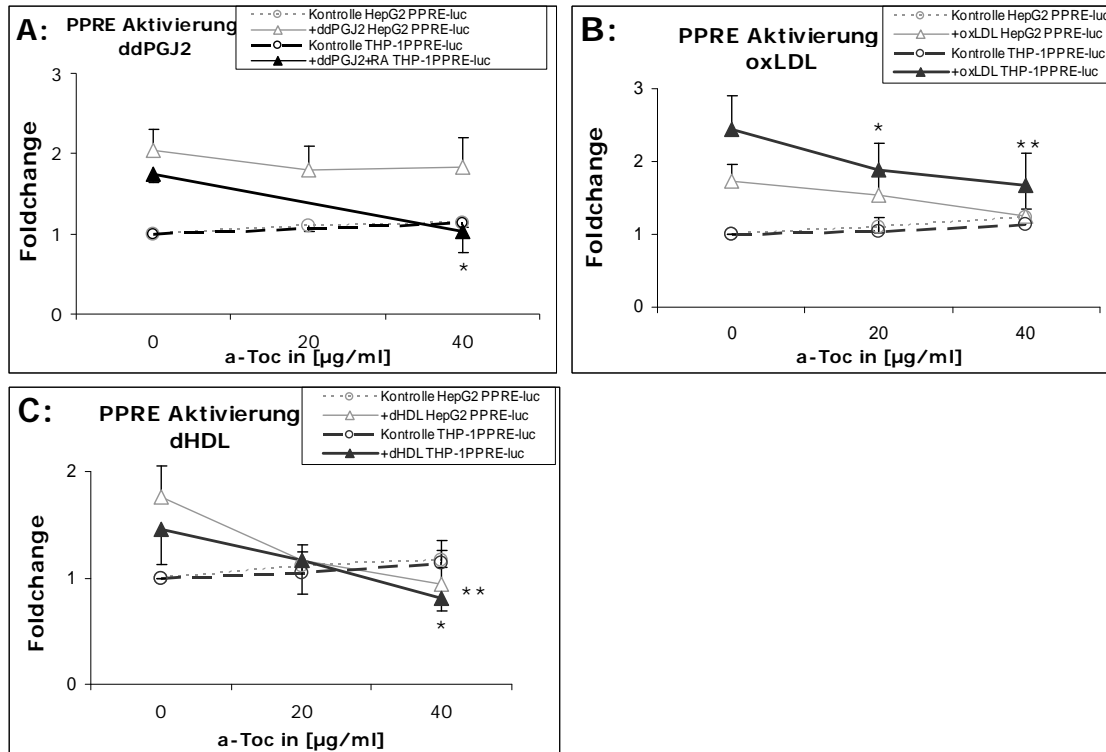


Abbildung 22: Analyse der Aktivierung von PPRE mithilfe des Konstrukts pGL3-PPRE(Aco)luc. Um die PPAR $\gamma$  Aktivierung zu messen wurden transient transfizierte PMA-differenzierte THP-1 (schwarze Linien) und HepG2 (graue Linien) 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linien) oder Medium, das mit ddPGJ2 (1  $\mu\text{M}$ , 24h) (A), oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 48h) (B) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$ , 24h) (C) angereichert war, inkubiert. Dann wurde die PPRE-abhängige Luziferase Aktivität gemessen.  $n=6-8$  +/- SEM; \* :  $p<0.05$  , \*\* :  $p<0.01$

#### 4.4.2 Analyse der Aktivierung von LXRE mithilfe des Reporterengenkonstrukts pCMV-LXRE-luc

LXRE ist mit der Luziferase im Plasmid (pCMV-LXRE-luc) gekoppelt. Mithilfe transfizierter Zellen können deshalb Assays zur Aktivierung von LXRE mit  $\alpha$ -Tocopherol durchgeführt werden. In PMA-differenzierten THP-1 Zellen, die mit dem LXRE-Luziferase Reporterengenkonstrukt transient transfiziert waren,

und in stabil transfizierten HepG2 Zellen, aber nicht in kontroll-transfizierten Zellen, konnte die LXRE-Luziferase Aktivität durch RXR aber auch durch LXR $\alpha$  Agonisten, wie 9cRA und 22-HOC induziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol die, durch 9cRA mit 22-HOC, oxLDL aber auch dHDL, hervorgerufene LXRE-Luziferase Aktivität, signifikant reduzieren kann. Die Basalaktivität blieb dabei von  $\alpha$ -Tocopherol unangetastet. Dies galt sowohl für die transient transfizierten PMA-differenzierten THP-1 als auch für die stabil transfizierten HepG2 (Abbildung 23A, B, C).

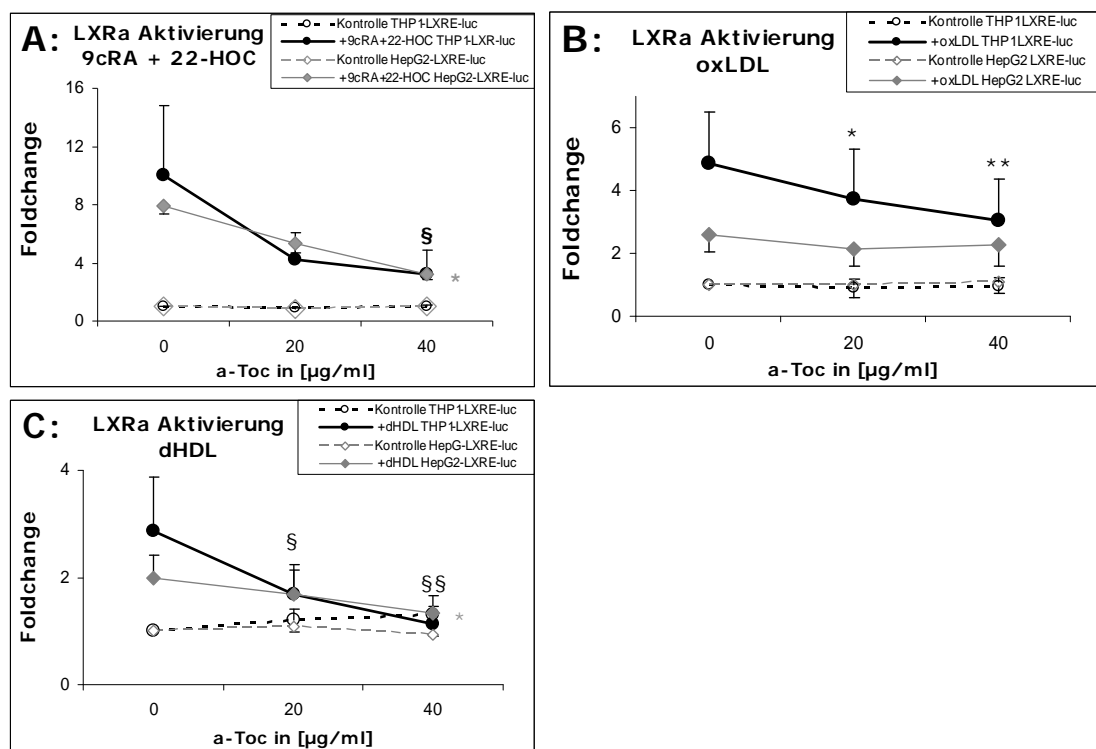


Abbildung 23: Analyse der Aktivierung von LXRE mithilfe des Konstrukts pCMV-LXRE-luc. Um die LXR $\alpha$  Aktivierung zu messen wurden transient transfizierte PMA-differenzierte THP-1 (schwarze Linien) und stabil transfizierte HepG2 (graue Linien) 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -Tocopherol (A-C) präinkubiert (links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linien) oder Medium, das mit 9cRA (5  $\mu$ M) und 22-HOC (10  $\mu$ M, A), oxLDL (100  $\mu$ g/ml, B) oder dHDL (20  $\mu$ g/ml, C) angereichert war, inkubiert. Dann wurde die LXRE-abhängige Luziferase Aktivität gemessen.  $n=6-10 \pm$  SEM; \*, § : $p<0.05$ , \*\*, §§:  $p<0.01$

## 4.5 Mechanistische Untersuchungen mit $\gamma$ -Tocopherol

Zur Erhellung des Mechanismus sollte die Wirkung eines in der stereochemischen Struktur differenten, aber zu  $\alpha$ -Tocopherol fast gleich potenten Antioxidans nämlich  $\gamma$ -Tocopherol in PMA-differenzierten THP-1 näher untersucht werden. Auch hier erfolgte eine Präinkubation von 24 h. Wie unter 4.1 beschrieben, wurden die Makrophagen mit  $\gamma$ -Tocopherol behandelt, anschließend die Gesamt-RNA isoliert, die bereits erwähnten Transkripte amplifiziert und mittels Realtime RT-PCR quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Anreicherung des Mediums mit  $\gamma$ -Tocopherol keinerlei Wirkung auf die basale Transkription des Scavenger Rezeptors CD36 hatte. Die Induktion von CD36 durch oxLDL konnte durch das Antioxidans auf Transkriptionsebene nicht inhibiert werden.  $\gamma$ -Tocopherol hatte auch bei Stimulation mit dHDL keinen Einfluß auf die Transkription des CD36 Rezeptors (Abbildung 24A). Da sich  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Tocopherol in der stereochemischen Struktur unterscheiden, aber in den antioxidativen Eigenschaften sehr ähnlich sind, spricht dies eher für einen direkten transkriptionellen Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol<sup>144</sup>.

Auf die spezifische-LDL-R mRNA Transkription zeigte  $\gamma$ -Tocopherol (Abbildung 24B) ähnlich geringe Effekte wie  $\alpha$ -Tocopherol. Die basale aber auch die durch oxLDL induzierte Transkription des LDL-R waren nicht beeinflusst durch  $\gamma$ -Tocopherol, während in Koinkubation mit dHDL die Stimulation der Transkription des LDL-R durch  $\gamma$ -Tocopherol tendenziell vermindert werden konnte.

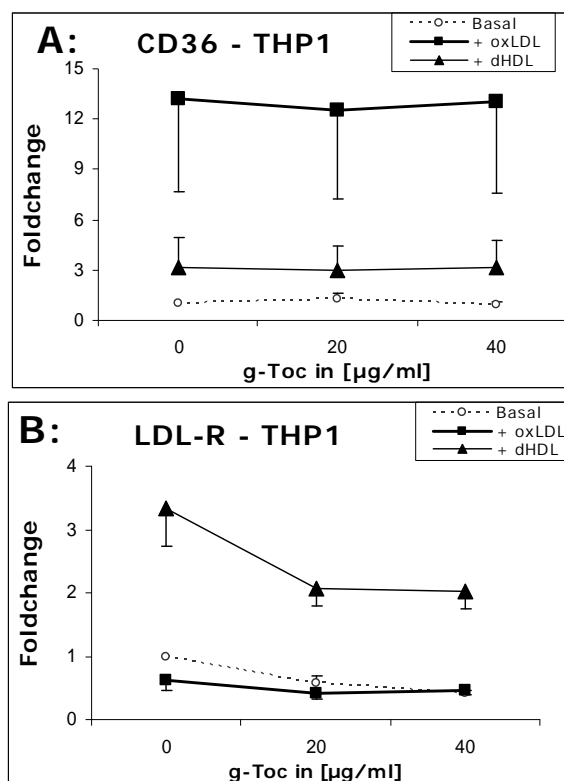


Abbildung 24: CD36- (A) und LDL-R (B) spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -Tocopherol präinkubiert und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$ , 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm \text{SEM}$

Da sich beim Scavenger Rezeptor CD36 kein Effekt von  $\gamma$ -Tocopherol nachweisen ließ, sollten die Effekte von  $\gamma$ -Tocopherol im Vergleich zu  $\alpha$ -Tocopherol auch anhand der Sterol-Exporter ABCA1 und ABCG1 untersucht werden. Die Anreicherung des Mediums mit  $\gamma$ -Tocopherol zeigte nur im Zusammenhang mit dHDL eine signifikante Wirkung auf die mRNA Expression von ABCA1 und ABCG1; die Induktion durch oxLDL wurde durch  $\gamma$ -Tocopherol nur bei ABCG1 dosisabhängig reduziert bei ABCA1 dagegen nur tendenziell (Abbildung 25A, B).

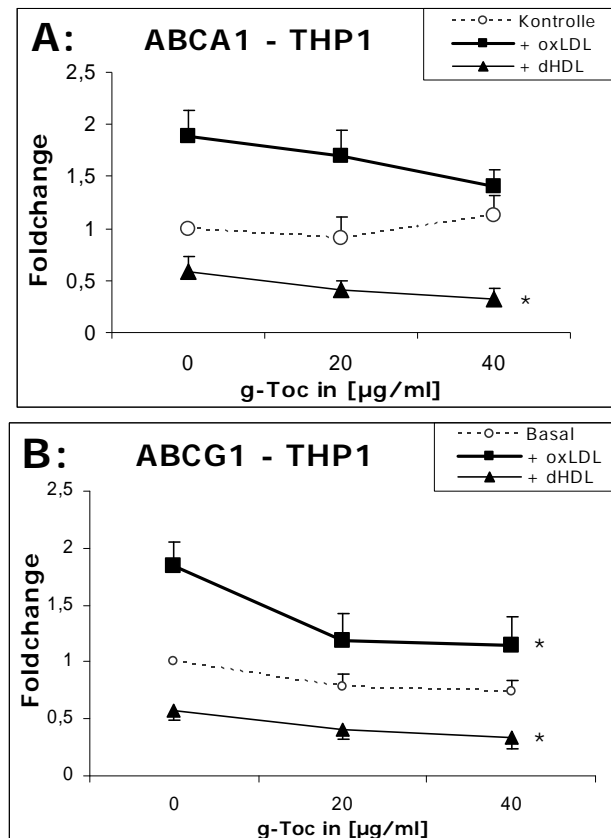


Abbildung 25: ABCA1 (A) und ABCG1 (B) spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40 µg/ml  $\gamma$ -Tocopherol präinkubiert und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100 µg/ml, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20 µg/ml, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM; \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$

Die nukleären Transkriptionsfaktoren LXR $\alpha$  (Abbildung 26 A) und PPAR $\gamma$  (Abbildung 26 B) wurden ebenfalls mittels Realtime RT-PCR quantifiziert. Die basale Transkription von LXR $\alpha$  wurde durch  $\gamma$ -Tocopherol (20 oder 40 µg/ml) in Makrophagen nicht beeinflusst. Die durch oxLDL hervorgerufene Induktion der Transkription von LXR $\alpha$  konnte durch  $\gamma$ -Tocopherol in PMA-differenzierten THP-1 ebenfalls nicht beeinflusst werden. Wurde das Medium mit dHDL angereichert, um eine Cholesterinverarmung der Makrophagen zu erreichen, so ergab sich eine Induktion der Transkription von LXR $\alpha$ , die in Koinkubation mit  $\gamma$ -Tocopherol tendenziell aufgehoben werden konnte (Abbildung 26 A). Basal wurde die mRNA Transkription von PPAR $\gamma$  in PMA-differenzierten THP-1 durch  $\gamma$ -Tocopherol nicht beeinflusst. Dies galt auch,

wenn die Zellen mit oxLDL beladen wurden, beziehungsweise ein Efflux über dHDL initiiert wurde (Abbildung 26 B).

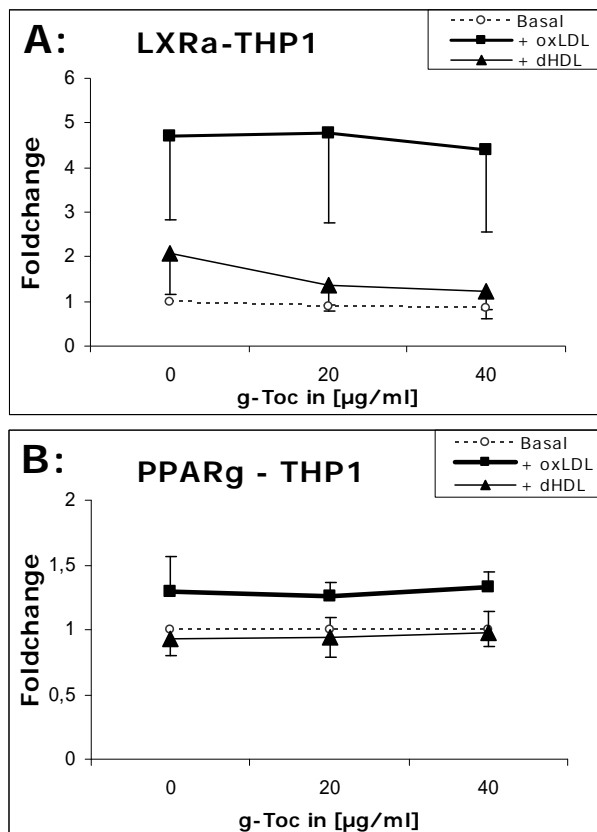


Abbildung 26: LXR $\alpha$  (A) und PPAR $\gamma$  (B) spezifische mRNA Expression mittels Realtime RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40 µg/ml  $\gamma$ -Tocopherol präinkubiert und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit oxLDL (100 µg/ml, 48 h, dicke Linie) oder dHDL (20 µg/ml, 24 h, dünne Linie) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM

Da bei der spezifischen mRNA Transkription der nukleären Transkriptionsfaktoren LXR $\alpha$  und PPAR $\gamma$  kein Beweis auf eine Veränderung der Transkription durch  $\gamma$ -Tocopherol erbracht werden konnte, wurde die Aktivierung des LXR Response Elements mithilfe des Reportergen-Konstrukts pCMV-LXRE-luc (Abbildung 27) in stabil transfizierten HepG2 Zellen und pGL3-PPRE(ACO)-luc (Abbildung 28) in transient transfizierten THP-1 und stabil transfizierten HepG2 Zellen genauer analysiert. Eine Anreicherung des Mediums mit  $\gamma$ -Tocopherol, hatte in beiden Zelllinien

keinen Einfluss auf die basale Aktivität von LXRE. Die Induktion der LXRE Aktivierung durch oxLDL konnte durch  $\gamma$ -Tocopherol in stabil transfizierten HepG2 nur gering beeinflusst werden, während die durch 22-HOC und 9cRA oder dHDL induzierte Stimulation der LXRE Aktivierung durch  $\gamma$ -Tocopherol nicht moduliert wurde (Abbildung 27).

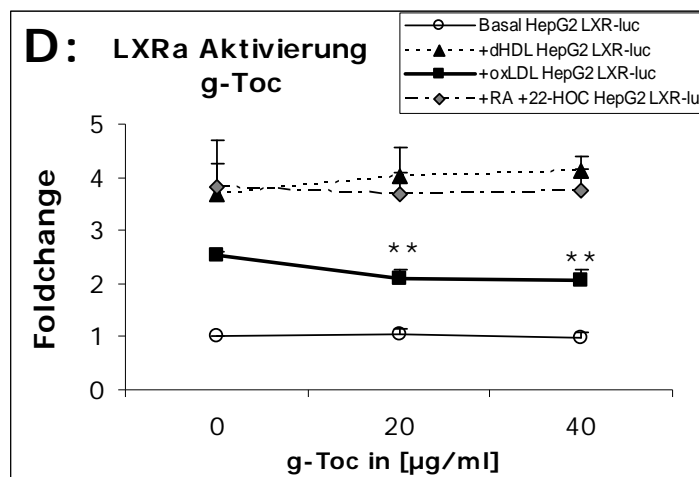


Abbildung 27: Analyse der Aktivierung von LXRE. Dazu wurden stabil transfizierte HepG2 Zellen 24 h mit Trägersubstanz, 20 und 40  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (leere Kreise) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , 48h, gefüllte Quadrate), dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$ , 24h, gefüllte Dreiecke) oder 9cRA/22-HOC (5 $\mu\text{M}$ /10 $\mu\text{M}$ , 24h, gefüllte Rauten) angereichert war, inkubiert. Dann wurde die LXRE-abhängige Luziferase Aktivität gemessen.  $n=6 \pm \text{SEM}$ ; \*\*:  $p<0.01$

Desweiteren wurde die Aktivierung des PPAR Response Elements mithilfe des Reporter-Gen-Konstrukts pGL3-PPRE(ACO)-luc (Abbildung 28) in transient transfizierten THP-1 und stabil transfizierten HepG2 Zellen überprüft. Anreicherung des Mediums mit  $\gamma$ -Tocopherol allein (40  $\mu\text{g/ml}$ ) und in Kombination mit oxLDL, hatte in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Aktivierung von PPRE (Abbildung 28A). dHDL rief dagegen eine Stimulation der PPRE Aktivierung hervor, die durch  $\gamma$ -Tocopherol in HepG2 verringert werden konnte, in PMA-differenzierten THP-1 war nur tendenziell ein Einfluss ersichtlich (Abbildung 28B).



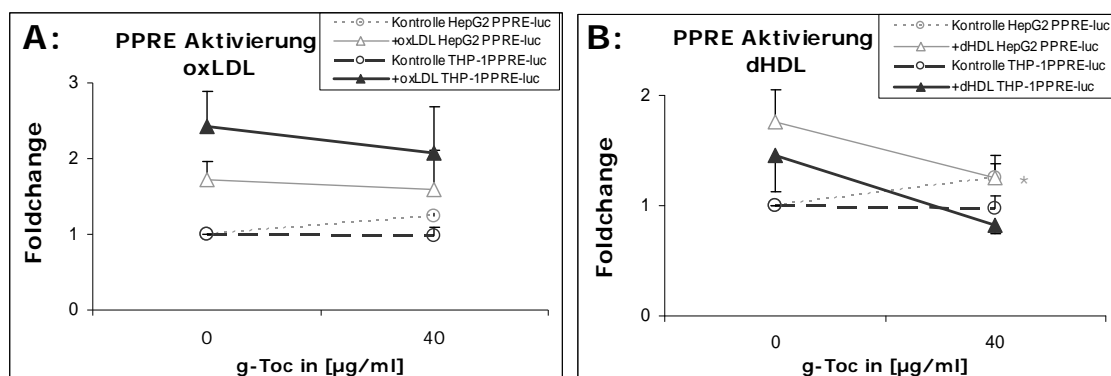


Abbildung 28: Analyse der Aktivierung von PPRE. Dazu wurden transient transfizierte PMA-differenzierte THP-1 (schwarze Linien) und stabil transfizierte HepG2 (graue Linien) 24 h mit Trägersubstanz, 40 µg/ml  $\gamma$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linien) oder Medium, das mit oxLDL (100 µg/ml, 48h, A) oder dHDL (20 µg/ml, 24h, B) angereichert war, inkubiert. Dann wurde die PPRE-abhängige Luciferase Aktivität gemessen.  $n=4-6 \pm$  SEM; \*:  $p < 0.05$

## 4.6 Der Einfluss von $\alpha$ -Tocopherol auf die Proteinexpression analysiert mittels Durchflußzytometrie und Westernblot

### 4.6.1 CD36 Proteinexpression nach $\alpha$ -Tocopherol-Behandlung

Die Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol auf der Transkriptionsebene sollten auch auf der Translationsebene untersucht werden. Deshalb wurde die Oberflächenexpression von CD36 mittels Durchflußzytometrie und Western Blot untersucht. PMA-differenzierte THP-1 wurden 24 h mit  $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert und anschließend in Koinkubation mit oxLDL (100 µg/ml) für 24 h bzw. 48 h beladen. Nach der Färbung mittels Isotyp-Kontrolle und dem Oberflächen-Antikörper von CD36 (FA6) wurde die Oberflächenexpression von CD36 mittels Durchflußzytometrie gemessen (Abbildung 29). Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Tocopherol allein keinen Einfluß auf die CD36-Oberflächenexpression hat, während das Beladen mit oxLDL eine Induktion der Oberflächenrezeptoren CD36 hervorruft. In Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol ist tendenziell eine Verminderung der Proteinexpression von

CD36 erkennbar, die bei einer Inkubation mit oxLDL für 48 h noch deutlicher nämlich ungefähr 10% erscheint.

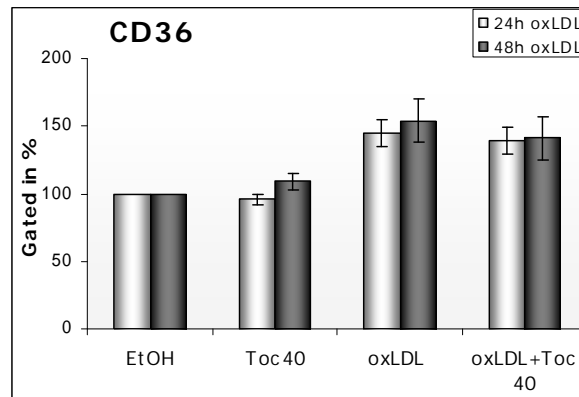


Abbildung 29: CD36 Proteinexpression mittels Durchflußzytometrie. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden 24 h mit Trägersubstanz oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert und in Kontrollmedium oder Medium, das 24 h (hellgraue Säulen) bzw. 48 h (dunkelgraue Säulen) mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) angereichert war, inkubiert.  $n=6 \pm$  SEM;

#### 4.6.2 ABCA1 Proteinexpression nach $\alpha$ -Tocopherol-Behandlung

Auch bei ABCA1 wurde der Effekt einer Behandlung mit  $\alpha$ -Tocopherol auch auf Proteinebene untersucht.  $\beta$ -Aktin wurde als eines der wichtigsten Haushalts-Gene zur Kontrolle des Proteinauftrags verwendet. PMA-differenzierte THP-1 wurden, wie unter 4.1 beschrieben, mit  $\alpha$ -Tocopherol vorbehandelt, und anschließend für 48 h mit oxLDL (100 bzw. 50  $\mu\text{g/ml}$ ) beladen bzw. ein 24-stündiger Lipidefflux durch dHDL (20 bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$ ) initiiert. Danach wurde eine Gesamtproteinextraktion durchgeführt und ABCA1 mittels Immunoblot untersucht. Es zeigte sich, dass die basale ABCA1 spezifische Expression durch  $\alpha$ -Tocopherol (20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$ ) nicht beeinflusst wurde. Die durch oxLDL hervorgerufene Induktion der Expression von ABCA1 konnte durch  $\alpha$ -Tocopherol in PMA-differenzierten THP-1 signifikant supprimiert werden. Setzte man die Zellen dHDL aus, so war die Proteinexpression nur gering supprimiert. Durch Koinkubation mit

$\alpha$ -Tocopherol konnte die ABCA1 Expression dosisabhängig weiter reduziert werden. (Abbildung 30; Abbildung 31).

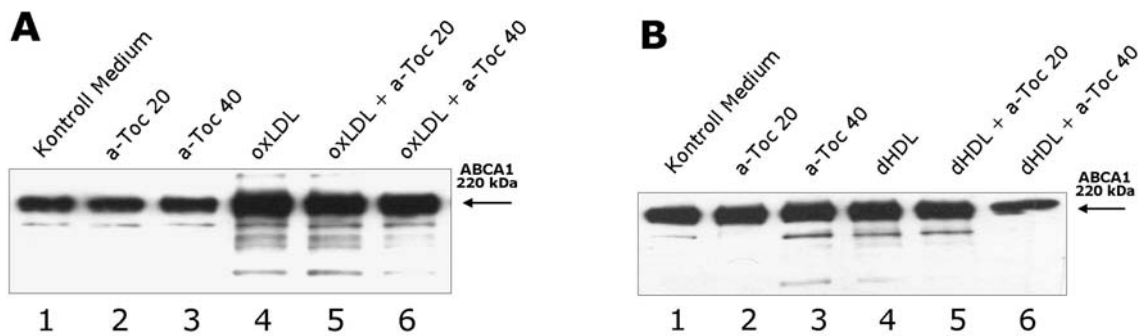


Abbildung 30: Immunoblotanalyse von ABCA1 aus Gesamt-Zelllysateextrakten (20  $\mu$ g Proteinauftrag/Spur). Dazu wurden PMA-differenzierten THP-1 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert und in Kontrollmedium (Spur 1-3) oder Medium, das mit oxLDL (100  $\mu$ g/, 48 h, A, Spur 4-6) oder dHDL (20  $\mu$ g/ml, 24 h, B Spur 4-6) angereichert war, inkubiert.  $n=4$

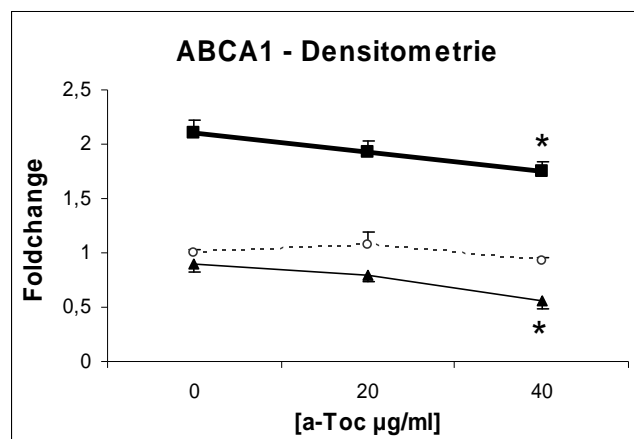


Abbildung 31: Gesamtauswertung der Immunoblotanalysen des ABCA1 Proteins von PMA-differenzierten THP-1 mittels Densitometrie-Analyse-Programm Image J.  $n=4$  +/- SEM; \* :  $p<0.05$

## 4.7 Einfluss von $\alpha$ -Tocopherol auf die zelluläre Cholesterin-Homöostase

### 4.7.1 [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-Aufnahme aus [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-markiertem oxLDL und [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-Efflux auf dHDL

Die Auswirkungen der  $\alpha$ -Tocopherol-Effekte auf CD36 und Cholesterin Exporter wie ABCA1 und ABCG1 sollten auf funktioneller Ebene mithilfe von Lipidaufnahme- und Lipidefflux-Assays untersucht werden. Zuerst wurde die zelluläre Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-markiertem oxLDL und die Abgabe von [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin an dHDL aus vormarkierten Zellen untersucht. PMA-differenzierte THP-1 Zellen bzw. PBMCs wurden für 24 h und 48 h mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-markiertem oxLDL (100 bzw. 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) geladen und im Anschluss die zelluläre [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-Aufnahme gemessen (siehe 4.1). Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin in die Zellen nach 24 h ca. 11 % und nach 48 h ca. 22 % betrug (Abbildung 32).

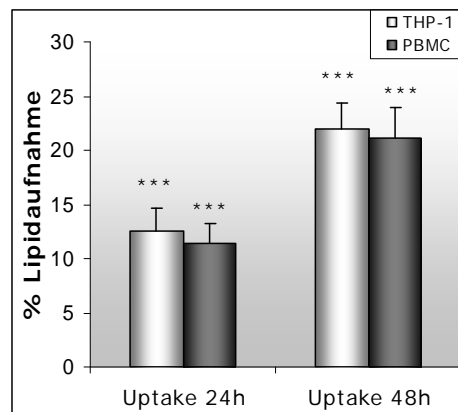


Abbildung 32: Lipidaufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-markiertem oxLDL. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (hellgraue Säulen) oder PBMCs (dunkelgraue Säulen) wurden mit markiertem oxLDL (100 oder 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , A) für 24 h bzw. 48 h geladen.  $n=6$  +/- SEM; \*\*\*:  $p<0.001$

Initiierte man nach der Beladung mit [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin markiertem oxLDL einen 24-stündigen Efflux auf dHDL, so ließ sich ein fraktioneller Efflux der [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-Markierung von 50% des zellulären [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin

ermitteln, unabhängig ob PMA-differenzierte THP-1 beziehungsweise PBMCs für 24 h oder 48 h mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin markiertem oxLDL beladen worden waren (Abbildung 33).

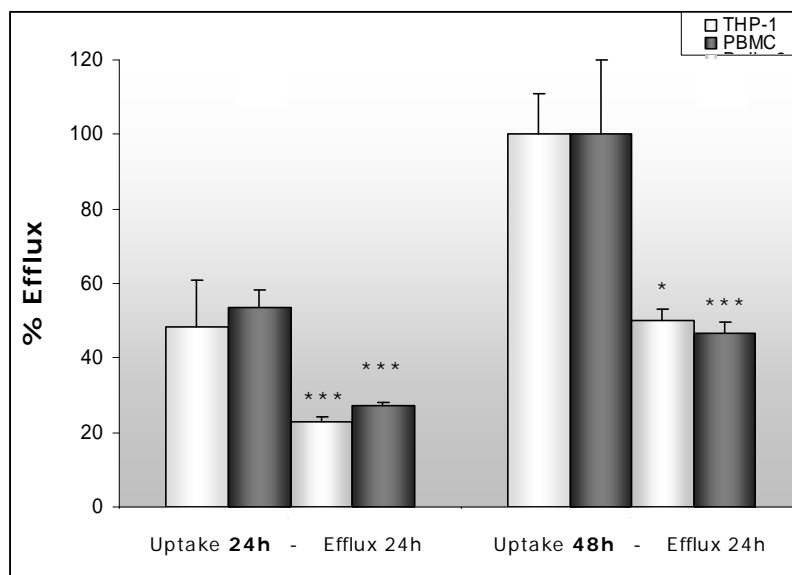


Abbildung 33: Lipidaufnahme und -efflux von [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxLDL. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (hellgraue Säulen) oder PBMCs (dunkelgraue Säulen) wurden mit markiertem oxLDL (100 oder 50 µg/ml) für 24 h bzw. 48 h geladen und/oder für 24 h ein Efflux zu dHDL (20 oder 10 µg/ml) initiiert. n=6 +/- SEM; \*: p<0,05; \*\*\*: p<0.001

Als nächstes wurde der Einfluß von  $\alpha$ -Tocopherol auf die [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-Aufnahme untersucht. PMA-differenzierte THP-1 bzw. PBMCs wurde 24 h und 48 h mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxLDL (100 bzw. 50 µg/ml) inkubiert, wobei zu jedem Zeitpunkt  $\alpha$ -Tocopherol vorhanden war. Die Präinkubation von Makrophagen mit  $\alpha$ -Tocopherol verlangsamte signifikant die Rate der zellulären Cholesterin-Akkumulation. Jedoch war weiterhin die aufgenommene [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-Menge anfangs in etwa linear von der Expositionszeit abhängig (Abbildung 34B).

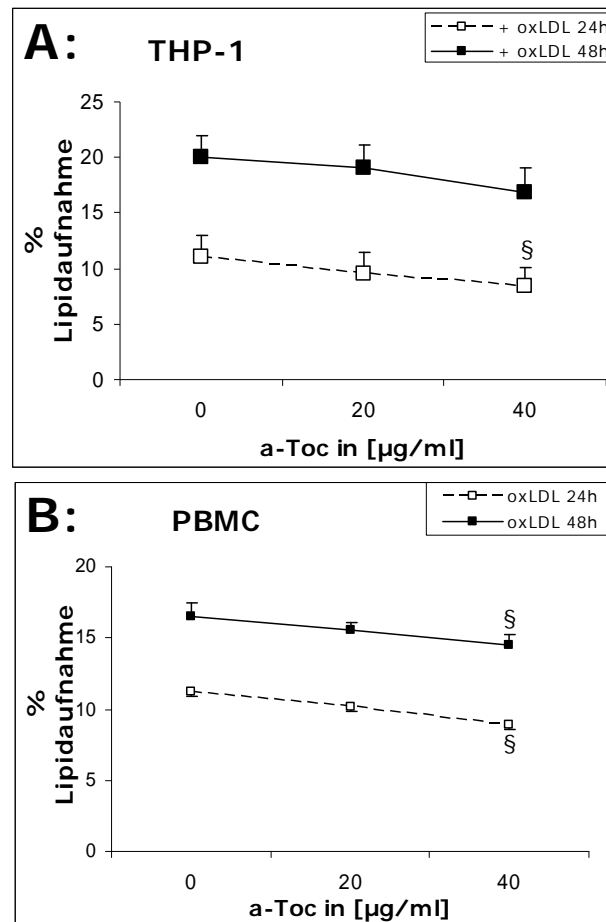


Abbildung 34: Lipidaufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Cholesterin-markiertem oxLDL. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und mit markiertem oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , A – 50  $\mu\text{g/ml}$ , B) für 24 h (gestrichelte Linien) bzw. für 48 h (durchgezogene Linien) beladen.  $n=3-4$  +/- SEM; §:  $p < 0.05$

Danach wurde der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Wiederabgabe von  $[^3\text{H}]$ -Cholesterin aus vormarkierten Makrophagen an dHDL untersucht. PMA-differenzierte THP-1 bzw. PBMCs wurden für 24 oder 48 h mit  $[^3\text{H}]$ -Cholesterin-markiertem oxLDL (100 beziehungsweise 50  $\mu\text{g/ml}$ ) geladen und im Anschluss eine Cholesterinefflux aus den Makrophagen durch dHDL (20 bzw. 10  $\mu\text{g/ml}$ ) induziert. Nach einer Beladung der Zellen von 24 h mit oxLDL reduzierte  $\alpha$ -Tocopherol den zellulären Export von Cholesterin auf dHDL um ca. 20 %. Genau der gleiche Effekt blieb auch nach einer verlängerten Beladungszeit von 48 h erhalten. Die Verminderung des Effluxes konnte gleichermaßen sowohl in PMA-differenzierten THP-1 als auch in PBMCs beobachtet werden (Abbildung 35).

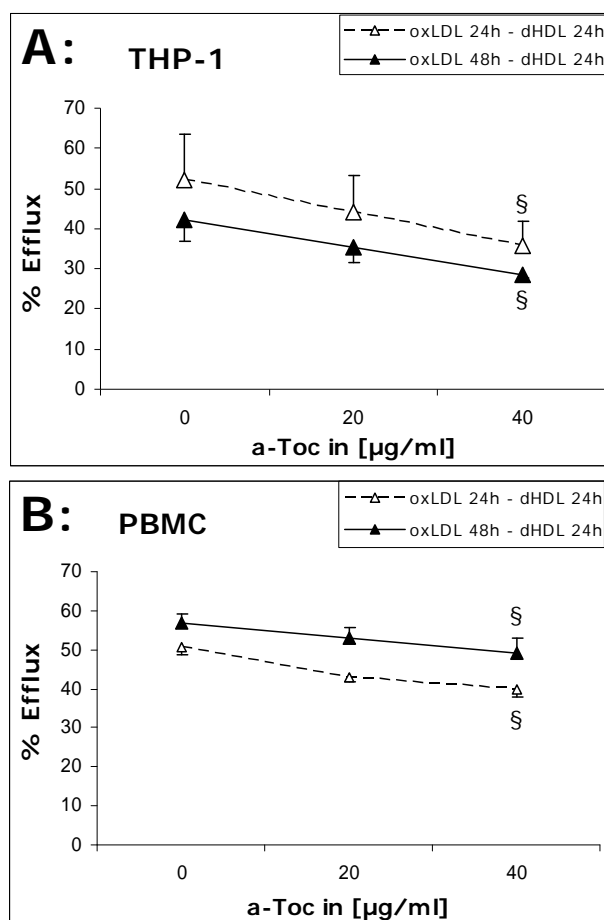


Abbildung 35: Efflux von [<sup>3</sup>H]-Cholesterin aus markiertem oxLDL. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40 µg/ml α-Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin markiertem oxLDL (100 µg/ml, A – 50 mg/ml, B) für 24 h (gestrichelte Linien) bzw. für 48 h (durchgezogene Linien) geladen und ein Efflux zu dHDL (20 µg/ml, A – 10 µg/ml, B) über 24 h initiiert. n=3-4 +/- SEM; § :p<0.05

Getestet wurde auch, ob nach der Beladung der Zellen eine Äquilibrationszeit von 24 h mit cholesterin-freiem RPMI 1640 Medium und 10% FCS einen Einfluss auf den [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-Efflux auf dHDL hatte. Nach der Beladung der Makrophagen mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxLDL wurden die Zellen für 24 h in Medium mit 10% FCS äquilibriert und anschließend der Efflux auf dHDL initiiert in RPMI 1640 Medium mit 1% FCS. α-Tocopherol konnte auch hier dosisabhängig den Efflux um ca. 20 % vermindern unabhängig von der vorangegangenen Beladungszeit mit oxLDL und der Präsenz von 10 % FCS. Dies galt wiederum sowohl für PMA-differenzierte THP-1 als auch für primäre Makrophagen (Abbildung 36).

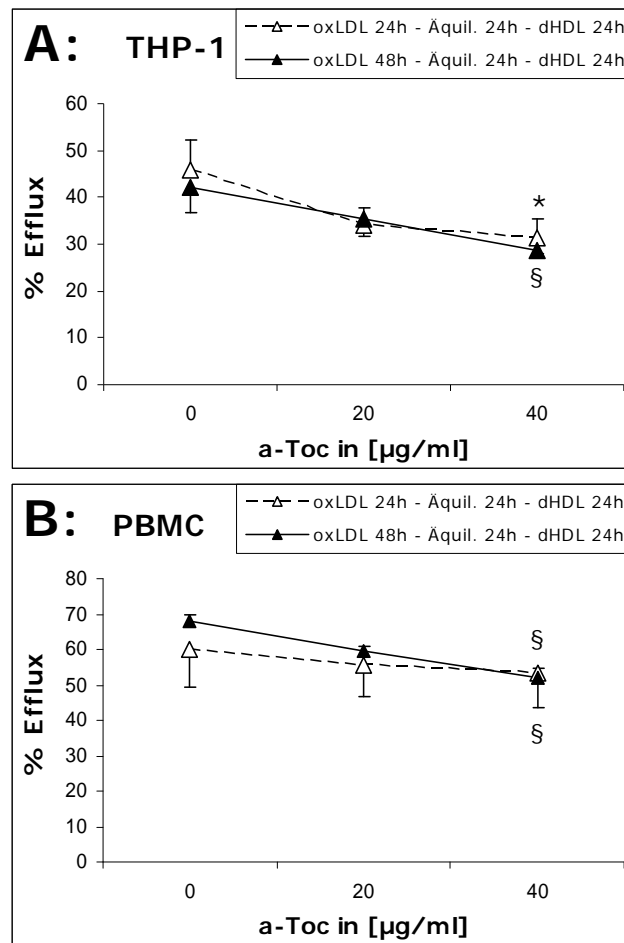


Abbildung 36: Efflux von [ $^3\text{H}$ ]-Cholesterin-markiertem oxLDL. PMA-differenzierte THP-1 Zellen (A) oder PBMCs (B) wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und mit markiertem oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ , A – 50  $\text{mg/ml}$ , B) für 24 h (gestrichelte Linien) bzw. für 48 h (durchgezogene Linien) geladen, 24 h mit RPMI + 10% FCS äquilibriert und ein Efflux zu dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$ , A – 10  $\mu\text{g/ml}$ , B) über 24 h initiiert.  $n=3-4$  +/- SEM; \*, § :  $p<0.05$

#### 4.7.2 Einfluß von $\alpha$ -Tocopherol auf den zellulären Cholesterin-Bestand

Aufgrund des Einflusses von  $\alpha$ -Tocopherol auf die zellulären Cholesterinaufnahme- und Cholesterineffluxmechanismen sollte ebenfalls der Effekt auf den zellulären Cholesterinbestand untersucht werden. Hierzu stand ein modifizierter enzymatischer Cholesterin-Assay, der normalerweise



in der Analyse des Serumcholesterins beim Menschen Anwendung findet und der bereits mit anderen Stimuli validiert war, zur Verfügung<sup>145</sup>. Bei den Experimenten mit  $\alpha$ -Tocopherol ergibt sich jedoch das Problem, dass  $\alpha$ -Tocopherol teilweise in den Assay eingeschleppt wird und den Cholesterin-Oxidase basierenden Test beeinflussen könnte. Deshalb wurden eigene Eichkurven mit Cholesterin Standards in Gegenwart von steigenden Konzentrationen  $\alpha$ -Tocopherol aufgenommen. Da  $\alpha$ -Tocopherol ein Antioxidans ist, kann es leicht oxidiert werden und so möglicherweise mit dem Cholesterin-Oxidase-Assay interferieren. Die photometrische Bestimmung wäre dann ungenau. Deshalb wurden Tests mit festgelegten Cholesterin-Konzentrationen (5, 10 und 20  $\mu\text{g}$ ) und steigenden  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen durchgeführt. Es zeigte sich, dass  $\alpha$ -Tocopherol in der höchsten Konzentration (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), die im Zellsediment vorkommen konnte, negativ mit dem enzymatischen Test korrelierte. Der maximale Abfall von zugegebenem zu gemessenem Cholesterin betrug 20% (Abbildung 37).

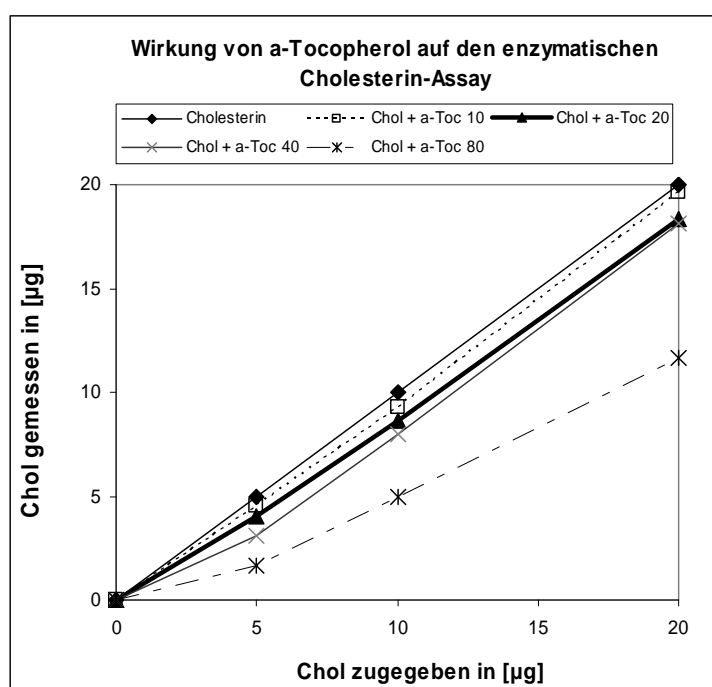


Abbildung 37: Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol auf den Cholesterin-Peroxidase Assay. Cholesterin-Konzentrationen (5, 10 und 20  $\mu\text{g}$ ) wurden mit steigenden  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen (10, 20, 40 und 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gemessen.

Deshalb wurden die vorangegangenen Cholesterin Assays nochmals mit der richtigen Eichkurve neu berechnet (Abbildung 38). Es zeigte sich, dass der zelluläre Cholesterinbestand nach Beladung mit oxLDL um bis zu 20% anstieg,  $\alpha$ -Tocopherol aber keine Wirkung hatte. Die Lipidverarmung durch dHDL allein entzog den Zellen ungefähr 15% des Gesamtcholesterin-Bestandes, was durch Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol dosisabhängig wieder aufgehoben wurde (Abbildung 38B).

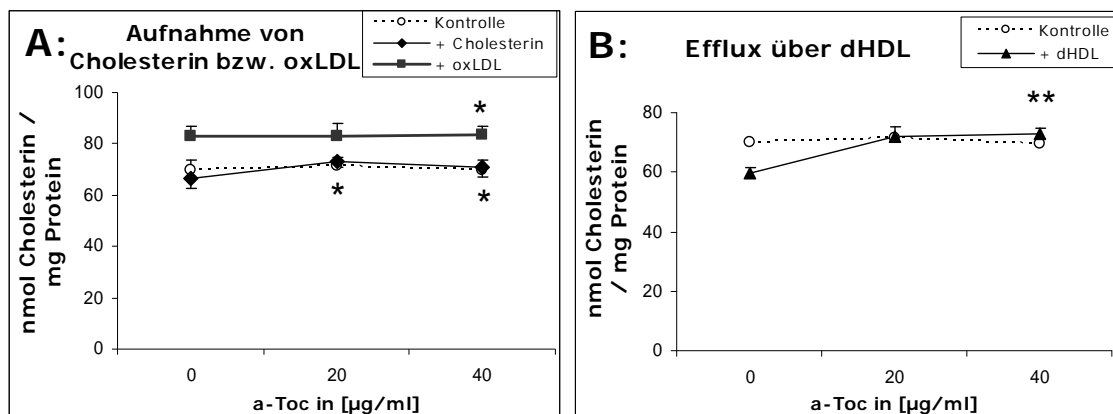


Abbildung 38: Auswertung des Cholesterin-Oxidase-Assays. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden 24 h mit Trägersubstanz, 20 oder 40 µg/ml  $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (von links nach rechts) und in Kontrollmedium (gepunktete Linie) oder Medium, das mit Cholesterin (10 µM, dünne Linie A) oder oxLDL (100 µg/ml, dicke Linie, A) oder dHDL (20 µg/ml, dünne Linie, B) angereichert war, inkubiert. Nach Lipidextraktion wurde das Cholesterin enzymatisch nachgewiesen.  $n=6 \pm$  SEM; \* : $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$

#### 4.7.3 Einfluß von $\alpha$ -Tocopherol auf die mikroskopische Akkumulation von Fetttropfen

Lipidakkumulation und Lipidefflux wurden auch mikroskopisch mittels Oil Red O Färbung der Zellen visualisiert. Zuerst wurde eine Kontrollkinetik der Lipidaufnahme angefertigt. PMA-differenzierte THP-1 wurden für 24 h und für 48 h mit oxLDL (100 µg/ml) beladen, anschließend mit Oil Red O gefärbt und das Ergebnis fotografisch festgehalten. Wie man in Abbildung 39

erkennt, werden Lipide zeitabhängig aufgenommen. Die höchste Lipidakkumulation bestand in dieser Kinetik bei 48 h.

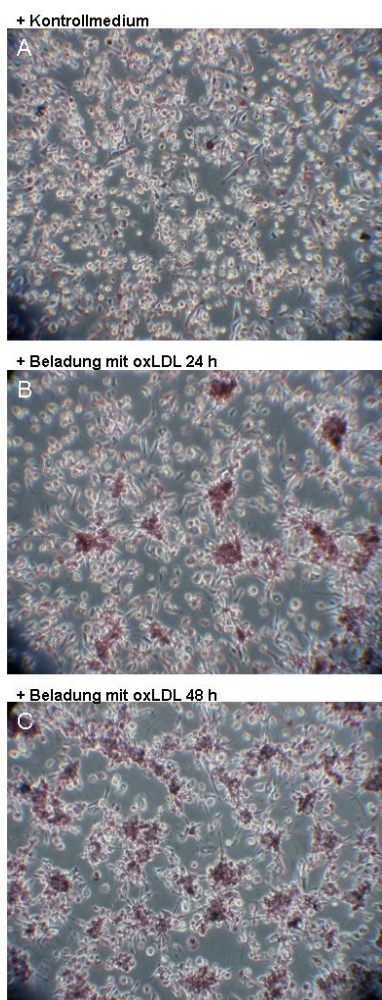


Abbildung 39: Darstellung der zellulären Lipidakkumulation mittels Oil Red O Färbung.

Danach wurde der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol auf die mikroskopische Lipidakkumulation getestet. PMA-differenzierte THP-1 wurden 24 h mit  $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert und dann 48 h mit oxLDL (100  $\mu$ g/ml) beladen. Im anderen Fall sollte dHDL (20  $\mu$ g/ml) nach Beladung eine Cholesterinverarmung initiieren. Nach Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol zeigten Makrophagen gegenüber den Kontrollzellen keine sichtbare Lipidfärbung mehr (Abbildung 40 A, B; Abbildung 41 A, B). Die Lipidakkumulation nach Beladung mit oxLDL durch  $\alpha$ -Tocopherol wurde

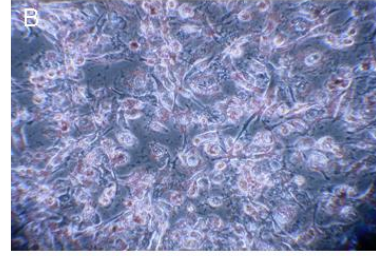
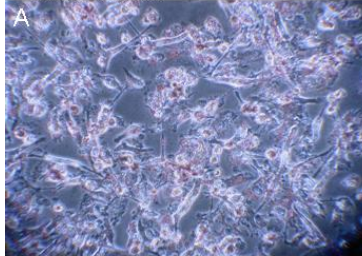


## $\alpha$ -Tocopherol

-

+

+ Kontrollmedium



+ Beladung mit oxLDL

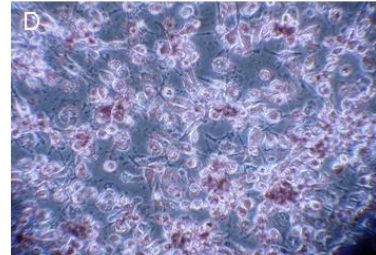
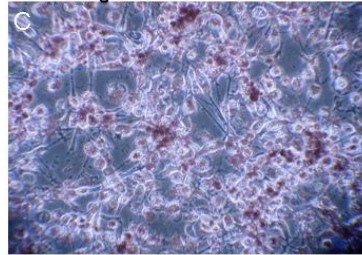
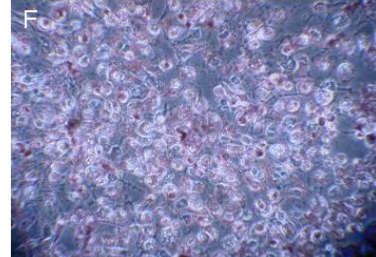
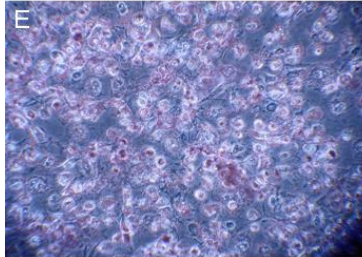
+ Beladung mit oxLDL  
+ Efflux zu dHDL

Abbildung 41: Bildliche Dokumentation der Lipidakkumulation mittels Oil Red O-Färbung (Mikroskop-Vergrößerung 20fach). PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden 24 h mit Trägersubstanz (links) oder 40  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -Tocopherol präinkubiert (rechts), in Kontrollmedium (A, B) und in Medium das mit oxLDL (100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 48 h (C, D) versetzt war beziehungsweise dHDL (20  $\mu\text{g/ml}$ ) für 24 h (E, F).



## 5 Diskussion

Die ermutigenden Befunde zur Oxidationshypothese der Atherosklerose und antiatherosklerotischer Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol in manchen Tiermodellen, konnten am Menschen nicht bestätigt werden. In klinischen Studien, in denen pharmakologische Dosen von  $\alpha$ -Tocopherol, weit über der täglichen Nahrungszufuhr, verabreicht wurden, kamen meist enttäuschende Resultate an kardiovaskulären Endpunkten zustande. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass der Scavenger Rezeptor CD36 durch  $\alpha$ -Tocopherol supprimiert wird<sup>21, 143</sup>. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit Effekte analysiert werden, die das Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol auf weitere Schlüssel-Effektoren der Cholesterin-Homöostase ausübt, die für die Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques und somit für die Entstehung der Atherosklerose entscheidend sind. Hierfür wurden durch Oxy-Lipide aktivierte Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$ , sowie Lipoprotein-Rezeptoren wie der LDL-Rezeptor und CD36 und die Lipid-Efflux-Transporter ABCA1 und ABCG1 an einem Makrophagen-Modell unter  $\alpha$ -Tocopherol näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Zellen mit  $\alpha$ -Tocopherol, in Konzentrationen, die auch im Plasma durch hohe orale Dosen erreicht werden können<sup>7-9</sup>, die Expression und Funktion der Cholesterin-Exporter ABCA1 und ABCG1 vermindert und die Cholesterin-Homöostase von Makrophagen negativ beeinflusst.

## 5.1 Zelluläre $\alpha$ -Tocopherol-Akkumulation in Makrophagen

Durch Anreicherung des Mediums mit  $\alpha$ -Tocopherol erhöhte sich der  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt in der Zelle rasch, was wohl nicht allein durch die lipophile Membranaffinität der Substanz erklärt werden kann. Nachdem Makrophagen 24 h  $\alpha$ -Tocopherol ausgesetzt waren, hatte sich der zelluläre  $\alpha$ -Tocopherol-Gehalt fast verdreifacht, nach 72 h sogar versechsfacht. Die zelluläre Anreicherung wurde durch die Anwesenheit von Lipoproteinen wie oxLDL oder dHDL als alternative  $\alpha$ -Tocopherol-Akzeptoren etwas beeinträchtigt. Von Makrophagen, deren Medium mit oxLDL angereichert war, wurden ungefähr noch zwei Drittel des  $\alpha$ -Tocopherols im Vergleich zu Kontrollzellen aufgenommen, während durch dHDL cholesterinverarmte Makrophagen maximal noch die Hälfte  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Medium aufnahmen. Im Medium stand zu jedem Zeitpunkt genug  $\alpha$ -Tocopherol zur Verfügung. Die Zellen besitzen offenbar die Möglichkeit die passive Akkumulation von  $\alpha$ -Tocopherol aus dem Medium zu limitieren. Eine passive Grunddiffusion ist jedoch immer anzunehmen.

Eine aktive intestinale Aufnahme von  $\alpha$ - aber auch  $\gamma$ -Tocopherol am Enterozyten-Modell konnte durch den Scavenger-Rezeptor BI gezeigt werden, wobei offenbar nicht zwischen den einzelnen Isomeren unterschieden wird<sup>146</sup>. Auch andere Rezeptoren wie der LDL-R dienen der zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Aufnahme<sup>10</sup>, während ABCA1 als aktiver  $\alpha$ -Tocopherol Efflux-Effektor agiert<sup>147</sup>. In primären Enterozyten war vor kurzem auch beobachtet worden, dass  $\alpha$ -Tocopherol über zwei voneinander unabhängige Stoffwechselwege systemisch absorbiert wird. Die Hauptabsorption erfolgt über Chylomikronen-Assemblierung; ist dieser Weg gestört, so kann die HDL-Sekretion unabhängig von einer vorhandenen Lipidquelle dessen Funktion übernehmen.<sup>11</sup>

## 5.2 $\alpha$ -Tocopherol vermindert die zelluläre Lipidaufnahme

### 5.2.1 $\alpha$ -Tocopherol reduziert die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  weist in einigen Geweben und Zellen eine besonders hohe Expression auf, unter anderem im Fettgewebe<sup>41, 148</sup>, ist aber ubiquitär im Organismus vertreten. Zu den Zellen, die besonders viel PPAR $\gamma$  exprimieren, gehören auch Monozyten, sowie Makrophagen, glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, die in der Entwicklung der Atherosklerose eine große Rolle spielen<sup>42</sup>. *In vivo* lässt sich insbesondere in atherosklerotischen Läsionen und dort in Schaumzellen eine hohe Expression von PPAR $\gamma$  nachweisen. Durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR $\gamma$  wird unter anderem CD36 vermehrt exprimiert und damit die Lipidakkumulation und die Entwicklung der Makrophagen zu Schaumzellen weiter begünstigt<sup>70, 149</sup>.

Sowohl die basale mRNA-Expression von PPAR $\gamma$  als auch die basale Aktivität von PPRE im Luziferase-Assay blieben in Makrophagen durch  $\alpha$ -Tocopherol weitgehend unbeeinflusst. Die durch oxLDL stimulierte Transkription von PPAR $\gamma$  wurde unter  $\alpha$ -Tocopherol Einfluss tendenziell reduziert, ebenso die unerwartete Induktion der Transkription durch dHDL. Die induzierte Aktivierung von PPRE im Luziferase-Assay durch Stimuli wie ddPGJ<sub>2</sub> und 9cRA, oxLDL, aber auch dHDL wurde in PMA-differenzierten Makrophagen mithilfe von  $\alpha$ -Tocopherol vermindert.  $\gamma$ -Tocopherol zeigte keine signifikanten Effekte auf die mRNA-Transkription von PPAR $\gamma$  und die Aktivierung von PPRE.

Die Ursache der Modulation von PPAR $\gamma$  durch  $\alpha$ -Tocopherol könnte in Fettsäure-Peroxiden liegen, die in oxLDL enthalten sind und als Stimulantien der CD36 Expression wirken.  $\alpha$ -Tocopherol könnte Peroxide in oxLDL direkt abfangen und darauf Reaktionen dämpfen, die den Peroxidtonus in oxLDL zur Generierung von spezifischen intrazellulären PPAR $\gamma$  Agonisten nutzen. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Tocopherol den Transfer von reaktiven Molekülen wie Radikalen von der wässrigen in die Lipidphase erleichtern



kann. Paradoxe pro-oxidative Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol konnten in LDL Partikeln nachgewiesen werden, die sich unter speziellen Bedingungen eines Radikalfluxes in der umgebenden Wasserphase befanden.<sup>150</sup>

Indem es die Generierung von Peroxiden in Kompartimenten verhindert, die an der Synthese von Signalmolekülen wie Oxylipiden beteiligt sind, könnte  $\alpha$ -Tocopherol oxylipid-abhängige Signalwege aber auch dämpfen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Tocopherol Enzyme wie die Proteinkinase C<sup>21</sup> oder die NADPH-Oxidase in Makrophagen<sup>19</sup> inhibiert. Ebenso wurde postuliert, dass es möglicherweise einen direkten transkriptionellen Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol auf einen noch nicht identifizierten Rezeptor oder Koaktivator von Transkriptionsfaktoren geben könnte, durch den dann eine Transaktivierung erfolgt<sup>144, 151</sup>. Als Argument hierfür wurde der mangelnde Effekt von  $\gamma$ -Tocopherol auf CD36 angeführt, das fast ebenso potent antioxidativ wirkt wie  $\alpha$ -Tocopherol, aber durch seine sterischen Unterschiede an einen solchen noch hypothetischen Faktor deutlich schlechter binden könnte.

Durch die Cholesterin-Verarmung der Zellen mittels dHDL wurde unerwartet sowohl die PPAR $\gamma$  Transkription als auch die Aktivierung von PPRE stimuliert, wobei  $\alpha$ -Tocopherol diesen Effekt umkehren konnte. Der nukleäre Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  gilt als Hauptregulator der CD36 Transkription. Bei Cholesterin-Mangel könnte die Zelle deshalb gegenregulatorisch versuchen vermehrt Lipide etwa über CD36 aufzunehmen.  $\alpha$ -Tocopherol könnte die Basalsynthese von endogenen PPAR $\gamma$  aktivierenden Liganden wie ddPGJ<sub>2</sub> vermindert haben. ddPGJ<sub>2</sub> ist ein physiologischer PPAR $\gamma$ -Agonist und Metabolit von Prostaglandinen, die durch einen Peroxidations-abhängigen Cyclooxygenaseweg entstehen<sup>152, 153</sup>. Die Arbeitsgruppe um Wu beobachtete, dass  $\alpha$ -Tocopherol die Enzymaktivität der Cyclooxygenase 2 (COX) hemmt, aber nicht die Expression von COX 1 und COX 2. Es handelt sich hier wohl um einen antioxidativen oder posttranslationalen Effekt. Es steht mehr Arachidonsäure zur Verfügung, die weiter zu entzündungsfördernden und somit pro-atherogenen Substanzen wie Leukotrienen umgesetzt werden kann<sup>154</sup>. Letztendlich ist aber der Mechanismus der dHDL-induzierten PPAR $\gamma$ -Stimulation noch völlig unklar.

### 5.2.2 $\alpha$ -Tocopherol reduziert die Expression des Scavenger Rezeptors CD36

Die Aufnahme von modifizierten LDL-Partikeln, wie oxLDL, erfolgt in Makrophagen hauptsächlich über den quantitativ bedeutendsten Scavenger Rezeptor, CD36, der über PPAR $\gamma$  einem positiven Feedback-Mechanismus unterliegt. Das befähigt Makrophagen uneingeschränkt modifiziertes LDL aufzunehmen und schließlich zur Schaumzelle zu degenerieren. Diese Kausalkette konnte bereits im Mausmodell anhand von CD36-Knock-Out Mäusen (CD36 $^{-/-}$ ) bestätigt werden <sup>66</sup>.

Eine mögliche weitere Funktion des CD36 ist die Vermittlung von Adhäsion durch Kollagenbindung. Die Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen nach Koinkubation mit oxidativ modifiziertem LDL konnte durch CD36-Antikörper gezeigt werden <sup>155</sup>.

Durch oxLDL induziert steigt die Transkription des CD36 Rezeptors von PMA-differenzierten THP-1 aber auch von PBMCs an. Dies kann durch Koinkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol wieder reduziert werden. Diese Abschwächung, die bereits früher an Monozyten und glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt worden war <sup>143, 151</sup>, unterstützt somit die biologische Relevanz des hier verwendeten Makrophagenmodells. In PMA-differenzierten THP-1 reduzierte  $\alpha$ -Tocopherol die Inhibition von CD36 durch dHDL. Eine Hemmung der CD36 Expression durch  $\alpha$ -Tocopherol nach Induktion durch oxLDL konnte auch auf Proteinebene mittels Durchflußzytometrie gezeigt werden. Diese fiel mit unter 10% weniger deutlich aus als auf RNA-Niveau zu erwarten war. Der Unterschied zur mRNA Transkription könnte dadurch bedingt sein, dass CD36 bekanntermaßen größtenteils als präformierter Protein-Pool in den Zellen vorhanden ist. Fertig translatiert kann das Protein nach adäquater Stimulation direkt zur Zellmembran transloziert werden und nach der Aufnahme von oxLDL wieder rezyklisieren <sup>60</sup>.

Im Gegensatz zu  $\alpha$ -Tocopherol konnte bei Exposition mit  $\gamma$ -Tocopherol kein Unterschied bei der mRNA-Transkription von CD36 in Makrophagen beobachtet werden.  $\gamma$ -Tocopherol wird nicht im gleichen Maß im Plasma und

Gewebe gespeichert wie  $\alpha$ -Tocopherol. Folglich gelangt *in vivo* nur wenig  $\gamma$ -Tocopherol ins Gewebe und besitzt für Makrophagen deshalb wahrscheinlich auch weniger biologische Relevanz<sup>156</sup>. Der fehlende Effekt von  $\gamma$ -Tocopherol auf die CD36 Transkription trotz ähnlich antioxidativer Potenz von  $\gamma$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocopherol wurde aber auch als Indiz für eine direkte transkriptionelle Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol über einen bisher allerdings nicht identifizierten stereospezifischen Transkriptionsfaktor gewertet<sup>144</sup>.

### 5.2.3 Funktionelle Auswirkung der verminderten CD36 Expression

Des Weiteren wurde die funktionelle Bedeutung der durch  $\alpha$ -Tocopherol verursachten Veränderungen für die oxLDL-Aufnahme untersucht. Die Lipidaufnahme-Rate von [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxLDL erfolgt mindestens bis 48 h zeitlinear sowohl bei PMA-differenzierten THP-1 als auch bei PBMCs. Die Präinkubation von humanen Makrophagen mit  $\alpha$ -Tocopherol verlangsamte die Rate der zellulären Cholesterin-Akkumulation von [<sup>3</sup>H]-Cholesterin-markiertem oxLDL. Das zeigte sich gleichermaßen bei einer Beladungszeit von 24 h wie 48 h. Die letztendliche Lipidakkumulation blieb aber linear von der Expositionszeit abhängig. Somit konnte auch die höchste  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration (40  $\mu$ g/ml) die Lipidakkumulation bei verlängerter Exposition nicht dauerhaft verhindern. An der basalen Cholesterin-Homöostase, gemessen als zelluläres Gesamtcholesterin, ließ sich eine quantitative Verminderung des Cholesterin-Bestandes durch  $\alpha$ -Tocopherol nicht bestätigen, ebenso nach Beladung mit oxLDL. Da  $\alpha$ -Tocopherol als leicht oxidierbares Antioxidans mit dem enzymatischen Assay interferieren könnte, wurden photometrische Eichkurven bei der höchsten zu erwartenden  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentration, die den gemessenen zellulären  $\alpha$ -Tocopherol-Spiegeln im Assay entsprachen, aufgenommen und für die Messung validiert. Selbst unter Annahme einer vollständigen Extraktion des zellulären  $\alpha$ -Tocopherol zusammen mit Cholesterin und einer Verschleppung in den Assay war die Eichkurve des Cholesterin-Oxidase basierenden Assays nur gering verschoben. Unter Verwendung der adäquaten Eichkurve war der Assay deshalb auch für Experimente unter Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol verwendbar.

Auch anhand des Verhaltens der Zellgranularität in der Durchflußzytometrie konnte eine Reduktion der intrazellulären Fetttröpfchen auf oxLDL durch  $\alpha$ -Tocopherol erfasst werden. Schließlich konnte der Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Lipidanreicherung aus oxLDL ebenfalls mikroskopisch belegt werden. Deutlich ist die Reduktion der Lipidtröpfchen nach  $\alpha$ -Tocopherol-Exposition mittels der Oil Red O Färbung zu erkennen.

Die durch  $\alpha$ -Tocopherol reduzierte Expression des Scavenger Rezeptors CD36 ist folglich unter oxLDL Exposition der Zellen auch funktionell relevant.  $\alpha$ -Tocopherol verminderte nicht nur die mRNA Transkription und die Expression sondern auch die zelluläre Akkumulation von Cholesterin aus oxLDL durch den quantitativ bedeutenden Scavenger Rezeptor CD36, der die Lipidaufnahme aus oxLDL vermittelt <sup>62</sup>. Lipidlösliche Antioxidantien könnten in oxLDL aber vorhandene Oxylipide insbesondere Peroxide abfangen.  $\alpha$ -Tocopherol könnte so die Bildung von Schaumzellen zwar verlangsamen, aber um den Preis einer verlangsamten Abräumung extrazellulärer Lipiddepots in der Gefäßwand. Die letztendliche Entstehung von Schaumzellen durch oxLDL kann allein durch  $\alpha$ -Tocopherol wahrscheinlich nicht dauerhaft verhindert werden, da durch eine lange Expositionszeit der Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Lipidakkumulation letztendlich aufgehoben wird.

Im Zusammenhang mit  $\alpha$ -Tocopherol wurden bereits diverse Tiermodellen zur Entwicklung der Atherosklerose untersucht. Es gibt Arbeiten, die eine Progression der Läsionen fanden, aber auch Beispiele zur verminderten Entstehung von Läsionen <sup>112</sup>. So bleibt ein antiatherogener Effekt durch Reduktion der Expression von CD36 weiter umstritten.

#### **5.2.4 $\alpha$ -Tocopherol beeinflusst die Transkription des LDL-Rezeptors nicht**

Außer einer tendenziellen Reduktion der vorangegangenen Induktion des LDL-R bei Cholesterinverarmung der Makrophagen durch dHDL, konnte bei unverändertem LDL-R ein unspezifischer transkriptioneller Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol ausgeschlossen werden. Die gegenregulatorische Antwort der LDL-R Expression auf Überladung der Zellen durch oxLDL blieb ebenfalls ungestört.

Die hepatische Aufnahme von LDL Partikeln über den LDL-R reguliert den Spiegel von zirkulierendem LDL-Cholesterin<sup>56</sup>. Die Transkription des LDL-R ist primär durch den SCAP-Insig-SREBP Signalweg reguliert, der aktiviert wird, wenn es zu einer Cholesterin-Verarmung im endoplasmatischen Reticulum kommt<sup>157</sup>. LDL-R defiziente Mäuse<sup>158</sup> sind lebensfähig und fertil. In ihrem Blut findet sich eine erhöhte Menge an Gesamtcholesterin, das auf gesteigerte IDL und LDL-Werte zurückzuführen ist. Defekte des LDL-R verursachen die familiäre Hypercholesterinämie, die sich durch eine reduzierte Lipoproteinaufnahme auszeichnet. Aufgrund seiner zentralen Rolle liegt die Vermutung einer bedeutenden Funktion des LDL-R in der Atherogenese auch bei nicht familiärer Hypercholesterinämie zunächst nahe. Dagegen spricht aber, dass der LDL-R nur in relativ geringem Maße auf Zellen exprimiert wird, denen bei der Entstehung der Atherosklerose eine entscheidende Funktion zukommt, insbesondere auf Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen<sup>159, 160</sup>. Zweitens wirkt das durch den LDL-R aufgenommene Cholesterin negativ auf die Expression dieses Rezeptors und der HMG-CoA-Reduktase. Selbst bei hoher extrazellulärer Cholesterin-Konzentration kommt es wegen der negativen Rückkopplung des LDL-R kaum zu einer Erhöhung des intrazellulären Cholesterinbestandes<sup>159, 161</sup> und nur bei LDL-R-Defekten zu einem Überschuss wegen reduzierter hepatischer Klärung von Cholesterin. Drittens wurde in Versuchen mit LDL-R-defizienten Mäusen eine starke Erhöhung der Serum-LDL-Konzentration sowie die Ausprägung von atherosklerotischen Läsionen vor allem beobachtet, wenn sie mit fetthaltiger Kost gefüttert wurden<sup>162</sup>. All dies spricht gegen eine

entscheidende Bedeutung des LDL-R in der Entstehung der Atherosklerose außer im Sonderfall der familiären Hypercholesterinämie.

### **5.3 $\alpha$ -Tocopherol supprimiert den zellulären Cholesterin-Export**

Ein wichtiger Mechanismus zur Klärung von Cholesterin aus peripherem Gewebe ist der reverse Cholesterintransport. Dadurch kann Cholesterin zur Leber rücktransportiert und letztlich über die Galle ausgeschieden werden. Ein initialer Schritt ist hierbei besonders bedeutend: Prä-HDL wird von Hepatozyten und Enterozyten sezerniert und Cholesterin-Exporter peripherer Zellen wie ABCA1 translozieren Cholesterin auf die strukturelle Hauptkomponente des Prä-HDL nämlich Apo A-I <sup>72</sup>. Diese ABC Transporter, die in atherosklerotischen Läsionen in Makrophagen vermehrt nachgewiesen wurden und bei Lipidüberladung induziert werden, spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Prävention und Regression von Lipidansammlungen in den peripheren Gefäßen <sup>95</sup>. *In vivo* wird der reverse Cholesterintransport in Makrophagen vor allem durch ABCA1 und ABCG1 initiiert. SR-BI fungiert dann als HDL-Rezeptor auf Hepatozyten <sup>80</sup>.

#### **5.3.1 $\alpha$ -Tocopherol beeinflusst die Expression des nukleären Transkriptionsfaktors LXR $\alpha$**

LXR $\alpha$  wird vor allem in der Leber, aber auch im Darm, im Fettgewebe und in Makrophagen exprimiert <sup>50</sup>. Als Schlüsselregulator im Lipidmetabolismus spielt LXR $\alpha$  vor allem beim Katabolismus, aber auch bei der Absorption von Cholesterin und bei der Fettsäuresynthese eine Rolle <sup>51</sup>.

Die basale mRNA-Transkription von LXR $\alpha$  und die basale Aktivität von LXRE wurden in Makrophagen durch  $\alpha$ -Tocopherol nicht beeinflusst. Die massive Induktion der Transkription von LXR $\alpha$  durch oxLDL wurde in PMA-differenzierten THP-1 nicht signifikant beeinträchtigt, während in PBMCs eine Reduktion der LXR $\alpha$  Expression auf oxLDL durch  $\alpha$ -Tocopherol zu beobachten war. Die Aktivierung von LXRE im Luziferase-Assay induziert

durch exogene Stimuli wie 22-OHC, aber auch durch oxLDL oder dHDL wurde mithilfe von  $\alpha$ -Tocopherol in PMA-differenzierten THP-1 vermindert.

Als nukleärer Rezeptor bildet LXR $\alpha$  wie auch PPAR $\gamma$  nach Aktivierung der Ligandenbindung mit RXR ein Heterodimer. Während PPAR $\gamma$  mithilfe von Oxy-Derivaten von Fettsäuren aktiviert wird, wird LXR $\alpha$  durch Oxysterole (z. B. natürlich vorkommende Oxidationsprodukte von Cholesterin) stimuliert und auch selbst induziert<sup>152, 163</sup>. Die Aktivierung von PPAR $\gamma$  führt aber auch indirekt zur vermehrten Transkription von LXR $\alpha$ . LXR $\alpha$  wiederum bindet an LXRE Sequenzen z. B. im ABCA1 Promotor<sup>164</sup> und steigert die Transkription der wichtigsten zellulären Cholesterin-Exporter ABCA1 und ABCG1<sup>98, 165</sup>. Neben LXR $\alpha$  oder über PPAR $\gamma$  und anschließend über LXR $\alpha$  kann auch der Transkriptionsfaktor PPAR $\alpha$  die Expression von ABCA1 induzieren<sup>98</sup>.

Lipidlösliche Antioxidantien könnten in oxLDL vorhandene Oxylipide abfangen und eine reduzierte CD36 Expression vermindert auch, wie bereits gezeigt, die intrazelluläre Aufnahme von oxLDL durch die Makrophagen. Andererseits könnte  $\alpha$ -Tocopherol einen direkten transkriptionellen Effekt im Sinne eines Antagonismus von LXR $\alpha$  ausüben beziehungsweise auf einen noch nicht identifizierten Koaktivator von Transkriptionsfaktoren, an den  $\alpha$ -Tocopherol bindet<sup>144, 151</sup>. Verschiedene direkte Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol konnten bereits gezeigt werden z. B. die Inhibition von Signalverstärkenden Enzymen wie Proteinkinase C<sup>21</sup> oder der NADPH-Oxidase in Makrophagen<sup>19</sup>.

Unerwarteterweise wurde sowohl die LXR $\alpha$  Transkription als auch die Aktivierung von LXRE auch durch Inkubation mit dHDL stimuliert und  $\alpha$ -Tocopherol konnte diesen Effekt ebenfalls reduzieren. dHDL dürfte eine Cholesterinverarmung der Zellen herbeigeführt haben, was noch den SREBP-SCAP-Signalweg der *de novo* Synthese von zellulärem Cholesterin stimuliert. Zwischenprodukte der Cholesterin-Synthese wurden kürzlich als LXR Agonisten identifiziert<sup>166</sup>. Dies könnte einen potenziellen Mechanismus der dHDL induzierten LXR $\alpha$ -Stimulation darstellen.

Koinkubationen mit  $\gamma$ -Tocopherol zeigten weder mit 22-HOC, mit oxLDL noch mit dHDL eine Wirkung auf die LXR $\alpha$ -Expression und die Aktivierung

des LXRE. Da  $\gamma$ -Tocopherol  $\alpha$ -Tocopherol strukturell sehr ähnlich ist, kann es sich bei dem  $\alpha$ -Tocopherol-Effekt wohl nicht um einen rein antioxidativ vermittelten Effekt handeln, es wird ein transkriptioneller Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol vermutet.

Vor kurzem wurde von Leonard *et al.* eine Senkung des HDL Plasma-Spiegels während einer zusätzlich mit  $\alpha$ -Tocopherol supplementierten Statintherapie beobachtet <sup>167</sup>, was einen weiteren Hinweis auf die Interaktion zwischen  $\alpha$ -Tocopherol und dem reversen Cholesterintransport darstellt.

HDL Partikel im Plasma enthalten wenig Antioxidantien, tragen jedoch die meisten Oxylipide <sup>168</sup>. Wenn also polare Oxylipide während der Delipidierung weniger effizient von HDL abstrahiert werden als Cholesterin, könnte dies ebenfalls eine LXR $\alpha$  Aktivierung durch dHDL erklären. Aber auch ein direkter Effekt z. B. durch Apo A-I kann nicht ausgeschlossen werden. Schließlich könnte es sich auch um einen transienten Effekt handeln, da die LXR $\alpha$  mRNA Transkription nur zu einem Zeitpunkt bestimmt wurde: Die LXR $\alpha$  Stimulation durch dHDL schlug sich nicht direkt auf die Expression der Cholesterin-Exporter ABCA1 und ABCG1 nieder, was einen komplexeren Zusammenhang zwischen dHDL und LXR $\alpha$  in diesem Fall vermuten lässt.

### **5.3.2 $\alpha$ -Tocopherol reduziert die Transkription der Efflux-Transporter ABCA1 und ABCG1**

ABCA1 stellt einen initialen Effektor für den aktiven Cholesterin-Efflux der Zelle dar, wahrscheinlich ohne selbst ein direkter Cholesterintransporter zu sein. Bindungsstudien in ABCA1-überexprimierenden Zellen konnten zeigen, dass freies Apo A-I an ABCA1 bindet und als direkte primäre Folge ein gesteigerter zellulärer Phospholipidefflux und möglicherweise erst sekundär der Cholesterinefflux stattfindet <sup>89</sup>. Im Fall einer mutationsbedingten Dysfunktion des ABCA1-Gens tritt bei Menschen die als Tangier-Krankheit bekannte rezessive Störung der Lipidhomöostase auf, die durch sehr niedrige HDL-Plasmaspiegel und vorzeitige Atherosklerose gekennzeichnet ist <sup>89</sup>. ABCA1 defiziente Mäuse zeigten ähnliche Veränderungen wie Tangier



Patienten<sup>169</sup>. ABCG1 zeigt eine dominante Expression in Makrophagen und ist ebenso wie ABCA1 über einen LXR $\alpha$ -regulierten Mechanismus am Cholesterin-Efflux jedoch bevorzugt auf bereits lipid-beladenes HDL beteiligt<sup>92, 93</sup>. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten keine genetischen Variationen in humanem ABCG1 gefunden werden, die einen pro-atherogenen Effekt hätten.

Die Transkription des ABCA1 aber auch des ABCG1 Efflux-Transporters von Makrophagen wurde durch oxLDL induziert.  $\alpha$ -Tocopherol reduzierte die Stimulation der zwei Efflux-Rezeptoren durch oxLDL um 20 - 50% in Makrophagen.  $\alpha$ -Tocopherol konnte auch die Inhibition von ABCA1 durch dHDL in PMA-differenzierten THP-1 teilweise umkehren, ABCG1 blieb aber weiter reduziert. Nur in primären Makrophagen wurde dagegen eine Induktion von ABCA1 und ABCG1 durch dHDL beobachtet, welche durch Zugabe von  $\alpha$ -Tocopherol vermindert wurde. Dabei war aber das basale Expressionsniveau von ABCA1 in primären Makrophagen so gering, dass die Transkription von ABCA1 durch die Anreicherung des Mediums mit dHDL erst das Basalniveau von PMA-differenzierten THP-1 erreichte. Somit ist der letztere Befund mit Vorsicht zu interpretieren. Nachdem eine Cholesterinverarmung durch dHDL initiiert wurde, zeigte sich durch  $\alpha$ -Tocopherol in PMA-differenzierten THP-1 mittels Immunoblot wie ursprünglich erwartet eine weitere Hemmung der ABCA1 Expression auf Proteinebene. In PMA-differenzierten THP-1 konnte  $\alpha$ -Tocopherol sowohl leicht die basale als auch die oxLDL induzierte Expression von ABCA1 senken. Die unerwartete Stimulation der Transkription und der Aktivierung von LXR $\alpha$  durch dHDL wurde durch  $\alpha$ -Tocopherol reduziert. Nichtsdestotrotz überwog in Makrophagen offensichtlich die Suppression von ABCA1 nach zellulärer Cholesterinverarmung durch dHDL den Effekt der LXR $\alpha$  Aktivierung.

Auch bei Koinkubation mit  $\gamma$ -Tocopherol konnte im Unterschied zu CD36 eine tendenzielle Reduktion der durch oxLDL hervorgerufenen Induktion der beiden Efflux-Schlüsselrezeptoren ABCA1 und ABCG1 beobachtet werden. Die durch  $\alpha$ -Tocopherol induzierte Verminderung des Effluxes durch dHDL war in PMA-differenzierten THP-1 mit  $\gamma$ -Tocopherol aber nicht nachweisbar.

### 5.3.3 Funktionelle Auswirkung der verminderten ABCA1 und ABCG1 Expression

Die Überladung von Makrophagen mit Cholesterin führt zu einer verstärkten Transkription der Lipid-Efflux-Transporter ABCA1 und ABCG1 und zu einer Steigerung des Cholesterin-Efflux auf Apo A-I bzw. direkt auf HDL, was zu einer Reduktion der Schaumzellbildung beiträgt<sup>87</sup>.  $\alpha$ -Tocopherol konnte die mRNA Transkription von ABCA1 und ABCG1 bereits ohne zusätzliche Überladung der Zellen mit Cholesterin reduzieren, was die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen begünstigen könnte.

Zuerst wurden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Cholesterin oxLDL vormarkiert und die darauffolgende [<sup>3</sup>H]-Cholesterin Abgabe an dHDL aus PMA-differenzierten THP-1 und PBMCs gemessen. Der fraktionelle Efflux erreichte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Lipidbeladung ungefähr 50%. In Anwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol war der zelluläre [<sup>3</sup>H]-Cholesterin Efflux auf dHDL reduziert. Auch der zelluläre Cholesterin-Bestand deutete in PMA-differenzierten THP-1 auf eine Suppression des Cholesterin-Exports auf dHDL durch  $\alpha$ -Tocopherol hin. Mikroskopisch konnte die Lipidakkumulation durch oxLDL und die Verminderung des Exports auf dHDL durch  $\alpha$ -Tocopherol ebenfalls in Form von gefärbten Lipidgranula visualisiert werden.

Die durch  $\alpha$ -Tocopherol induzierte Reduktion der Transkription der Efflux-Transporter ABCA1 und ABCG1 war folglich auch funktionell relevant.  $\alpha$ -Tocopherol reduzierte den Efflux aus lipidgeladenen Zellen auf dHDL Partikel offensichtlich über die reduzierte Expression der aktiven zellulären ABC-Exporter. Dies beeinträchtigt den ersten Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des reversen Cholesterintransports. Dieser ist unerlässlich für die Verhinderung bzw. die Rückbildung von Cholesterinakkumulationen in der Gefäßwand. Für Probucol, welches eine ähnliche Struktur und Eigenschaften besitzt wie  $\alpha$ -Tocopherol wurde bereits eine Inhibition des ABCA1 vermittelten zellulären Lipid-Efflux gezeigt. SR-BI dagegen wurde durch Probucol nicht beeinflusst<sup>170</sup>. Von Enterozyten wird  $\alpha$ -Tocopherol selbst über den SR-BI aufgenommen und absorbiert<sup>146</sup>.

In Makrophagen stimulieren LXR-Agonisten auch den Transport von ABCG1 vom intrazellulären Kompartiment zur Plasmamembran, was den Efflux von Cholesterin auf HDL verbessert. Somit hat das LXR System eine duale Funktion bei ABCG1, es steigert die Expression aber auch die Translokation von ABCG1 zur Plasmamembran <sup>100</sup>. Dieser  $\alpha$ -Tocopherol-Effekt könnte also an zwei Angriffspunkten vermittelt sein.

## 5.4 Mögliche Relevanz von $\alpha$ -Tocopherol für die zelluläre Cholesterin-Homöostase und Atherogenese

$\alpha$ -Tocopherol greift offensichtlich an mehreren Stellen in die zelluläre Cholesterin-Homöostase ein, die normalerweise mehrfach reguliert wird. Wenn Makrophagen  $\alpha$ -Tocopherol-Konzentrationen ausgesetzt werden, die *in vivo* durch hohe orale Supplementierung erreicht werden können, wird die Regulation von CD36 und ABC-Transportern, wie ABCA1 und ABCG1, in einer Weise verändert, die die Abräumreaktion von modifizierten Lipoproteinen in der Gefäßwand und die Einschleusung des Cholesterins in den reversen Cholesterintransport beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol auf der Ebene der Oxylipid-Liganden vermittelt wird, die für die Aktivierung von PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  in Makrophagen verantwortlich sind. In humanen Endothelzellen konnte schon früher eine Reduktion der oxLDL induzierten Gene durch  $\alpha$ -Tocopherol beobachtet werden <sup>171</sup>. Es scheinen aber noch weitere Mechanismen beteiligt sein. In einer hepatischen Zelllinie wurde über eine direkte Induktion der Expression des LDL-R und der HMG-CoA-Reduktase durch  $\alpha$ -Tocopherol berichtet <sup>172</sup>, was bei Makrophagen hier nicht bestätigt werden konnte.

Diverse Tiermodelle, bei denen hochdosiertes  $\alpha$ -Tocopherol verabreicht wurde, zeigten ursprünglich positive Befunde zur Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose. An weißen Neuseeland-Kaninchen konnten cholesterin-induzierte atherosklerotische Läsionen durch eine Kombination von  $\beta$ -Karotin (25 mg/kg Körpergewicht) und  $\alpha$ -Tocopherol (0,5% der

Nahrung) über mehrere Wochen verhindert werden<sup>173</sup>. Es wurden aber auch Effekte auf die Atherosklerose-Entstehung von  $\alpha$ -Tocopherol-Substitution an apo E defizienten Mäusen getestet, die zur spontanen Bildung von atherosklerotischen Läsionen bei artgerechter Fütterung neigen<sup>110</sup>. Normalerweise zeigen die Tiere erhöhte Isoprostanwerte, die bei der Oxidation von Arachidonsäure entstehen und als Atherogenesemarker gelten. Pro Kilogramm Futter wurden 2000 IU  $\alpha$ -Tocopherol für 16 Wochen zugegeben.  $\alpha$ -Tocopherol, oral verabreicht, konnte die Isoprostanproduktion vermindern, somit den oxidativen Stress und die Atherogenese. Es konnte dabei kein Einfluss auf den Gesamtplasma-Cholesterin-Spiegel beobachtet werden<sup>110</sup>. 1994 konnte die Arbeitsgruppe um Vita mit Cholesterin-gefütterten Neuseeland-Kaninchen zeigen, dass  $\alpha$ -Tocopherol in geringen Dosen (1000 IU/kg Körpergewicht) die endotheliale vasodilatative Funktion verbesserte, während hochdosiertes  $\alpha$ -Tocopherol (10 000 IU/kg Körpergewicht) im Gegensatz dazu einzig die endotheliale Dysfunktion steigern konnte und somit die Progression von Atherosklerose begünstigen könnte.  $\alpha$ -Tocopherol ist also in verschiedenen Tiermodellen nicht einheitlich von Vorteil und übt dosisabhängig ambivalente Effekte auf die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen aus<sup>112</sup>.

Mittlerweile wurden auch zahlreiche Humanstudien durchgeführt, die  $\alpha$ -Tocopherol allein oder in Kombination mit anderen lipidlöslichen Antioxidantien substituierten. Trotz der epidemiologisch inversen Relationen zwischen koronarer arterieller Krankheit und der natürlichen Zufuhr von Antioxidantien mit der Nahrung, konnte in großen Interventionsstudien mit pharmakologischen Dosen  $\alpha$ -Tocopherol kein sicherer klinischer Nutzen gezeigt werden<sup>20, 119</sup>. Die „Cambridge Heart Antioxidant Study“ (CHAOS) Studie berichtete von einer Reduktion im kombinierten primären Endpunkt kardiovaskulärer Todesfälle und nicht tödlicher Myokardinfarkte, aber auch von einem Anstieg in der Gesamtmortalität<sup>114</sup>. Die große „Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico“ (GISSI) Studie konnte keinen günstigen Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol feststellen und ließ in späteren Analysen sogar schädigende Effekte vermuten<sup>115</sup>. Ein konsistenter

---

Nutzen von Vitamin E bei kardiovaskulären Erkrankungen konnte also nicht belegt werden.

Allerdings ist inzwischen auch heftige Kritik am Design mancher Studien geäußert worden: So wurde der Vitamin E-Plasmaspiegel bei Aufnahme der Patienten nicht gemessen, und es fanden keine Kontrollen statt, die einen Anstieg des Plasmaspiegels nach oraler Supplementierung belegt hätten. Die Studien waren größtenteils sekundäre Präventionsstudien, wobei die Patienten zu Beginn der Studie zumeist schon fortgeschrittene atherosklerotische Veränderungen der Koronarien aufwiesen. Vitamin E sollte aber - wenn überhaupt - die Entwicklung der Atherosklerose in frühen Stadien verhindern. Es könnte dann den Endothelschaden durch verminderte LDL-Oxidation und andere Prozesse noch verringern.

Die in dieser Arbeit gefundenen inhibitorischen Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol auf die Expression von Schlüsselrezeptoren der Cholesterin-Homöostase in Makrophagen wie den Scavenger Rezeptor CD36, über den  $\alpha$ -Tocopherol eine Hemmung der zellulären Lipidaufnahme hervorruft, aber gleichzeitig auch auf die Cholesterin-Exporter ABCA1 und ABCG1, wodurch der Cholesterin-Efflux verlangsamt wird, könnten zur Erklärung der enttäuschenden Resultate der Präventionsstudien mit hochdosiertem  $\alpha$ -Tocopherol beitragen.

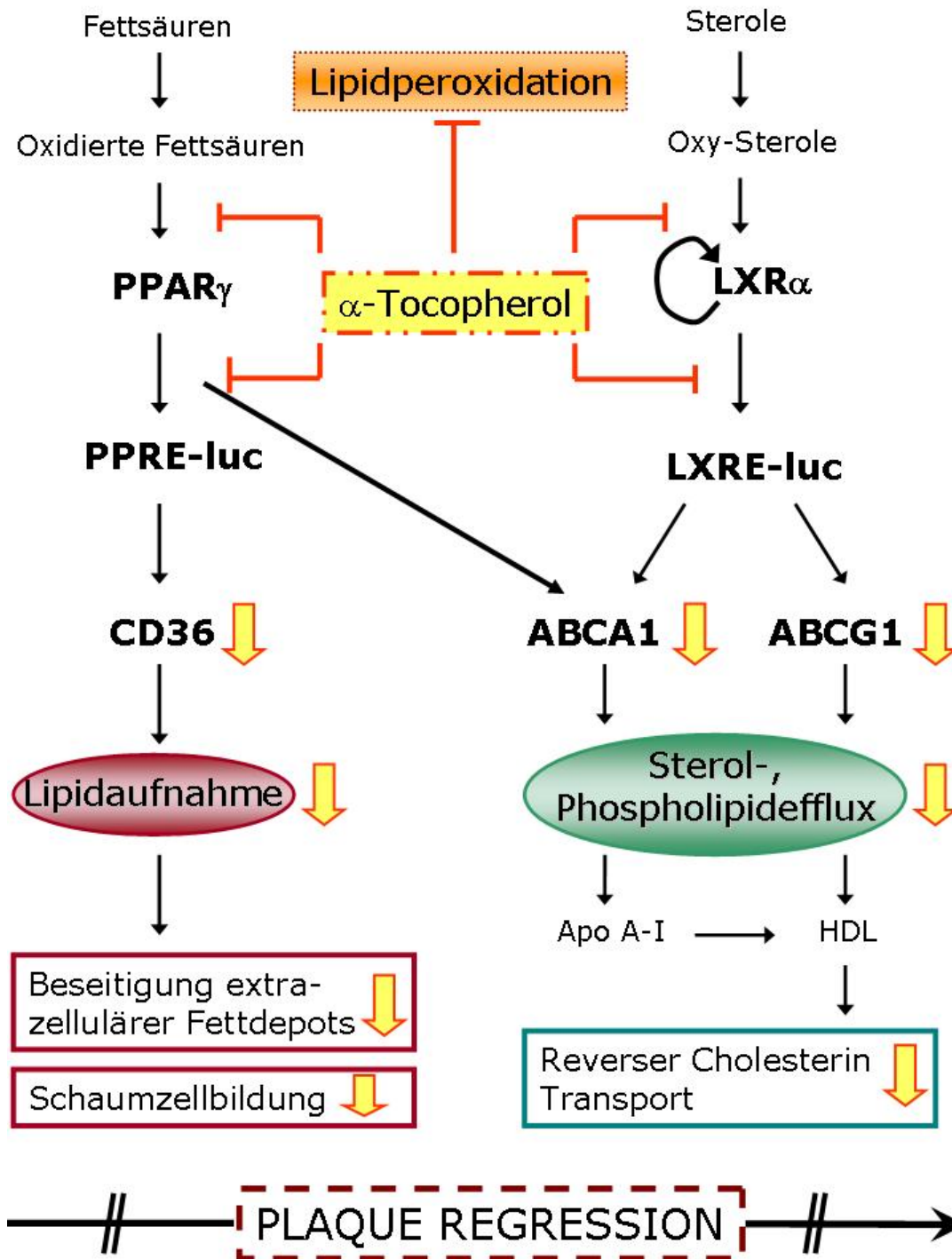


Abbildung 42: Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol auf den Aufnahme- und den Effluxmechanismus von Lipiden

## 6 Zusammenfassung

Ein bedeutender Mechanismus zur Prävention und Regression von atherosklerotischen Läsionen ist die Abräumung von akkumulierten extrazellulären Lipiden in der Gefäßwand und deren Einschleusung in den reversen Cholesterintransport durch Makrophagen. Wichtigste molekulare Effektoren sind dabei Scavenger Rezeptoren wie CD36 und Cholesterin-Exporter wie ABCA1 und ABCG1. Deren Expression wird durch spezifische oxidierte Sterole, die die nukleären Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$  und LXR $\alpha$  aktivieren, induziert. Da hochdosierte lipidlösliche Antioxidantien diese regulatorischen Oxylipide beeinflussen könnten, war es Ziel dieser Arbeit am Makrophagen-Modell die Wirkung von hochdosiertem  $\alpha$ -Tocopherol auf Signalwege und Schlüsselrezeptoren der Cholesterin-Homöostase zu untersuchen.

Der Einfluss von  $\alpha$ -Tocopherol und teilweise auch von  $\gamma$ -Tocopherol wurde auf regulatorischer, transkriptioneller, translationeller und funktioneller Ebene mittels Realtime RT-PCR, Reporteragen-Assays, FACS, Immunoblot und Lipidaufnahme- und Lipidefflux-Assays analysiert.

Der LDL-R wurde durch hochdosiertes  $\alpha$ -Tocopherol nicht beeinflusst, während die Expression des Scavenger Rezeptors CD36, konzentrationsabhängig sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene durch  $\alpha$ -Tocopherol beeinträchtigt wurde. Auf funktioneller Ebene verringerte  $\alpha$ -Tocopherol die Aufnahme von [ $H^3$ ]-Cholesterin markiertem oxLDL durch Makrophagen. Der Effekt konnte ebenso mikroskopisch dargestellt werden.

Die verminderte Expression von CD36 durch  $\alpha$ -Tocopherol konnte zumindest teilweise durch eine dosisabhängige Verminderung der mRNA-Transkription von PPAR $\gamma$  und eine verminderte Aktivierung von PPAR $\gamma$  im PPRE-Luziferase-Assay auch durch exogene Stimuli erklärt werden.  $\gamma$ -Tocopherol hatte keinen vergleichbaren Effekt auf die CD36- und PPAR $\gamma$ -spezifische mRNA,

weswegen bereits auch ein direkter transkriptioneller Effekt von  $\alpha$ -Tocopherol postuliert wurde.

Die vermehrte zelluläre Aufnahme von oxidiertem LDL über Scavenger Rezeptoren wie CD36 induziert normalerweise auch eine vermehrte Einschleusung von Cholesterin in den reversen Cholesterintransport durch ABC-Exporter wie ABCA1 und ABCG1, wodurch die Schaumzellbildung zumindest verzögert werden kann. Diese Induktion der Cholesterin-Exporter wird durch oxidierte Sterole vermittelt, die LXR $\alpha$  aktivieren. Deshalb wurde ebenfalls eine mögliche Interferenz von hochdosiertem  $\alpha$ -Tocopherol mit dem zellulären Cholesterin-Export untersucht. In der Tat wurde der Cholesterin-Efflux von Makrophagen auf delipidiertes HDL durch  $\alpha$ -Tocopherol beeinträchtigt, wodurch der zelluläre Cholesterin-Bestand anstieg. Dieser Effekt zeigte auch mikroskopisch vermehrte Lipidgranula. Die Aktivierung des LXR-Response Elements im Luziferase-Assay durch exogene Stimuli wie 22-OHC oder oxidiertes LDL wurde durch  $\alpha$ -Tocopherol ebenfalls negativ beeinflusst. Dadurch könnte die Reduktion der Expression von ABCA1 und ABCG1 auf mRNA-Ebene und von ABCA1 auf Proteinebene zumindest teilweise erklärt werden.

Mit  $\gamma$ -Tocopherol konnte nur eine geringe Reduktion auf mRNA Ebene, sowohl für ABCA1 als auch LXR $\alpha$  festgestellt werden. Bei der verminderten Expression von ABCA1 und ABCG1 durch hochdosiertes  $\alpha$ -Tocopherol handelt es sich also wahrscheinlich um einen spezifischen, teilweise durch LXR $\alpha$  vermittelten Prozess.

Es scheinen aber weitere Signalwege beteiligt zu sein: Unerwarteterweise wurde die Transkription und die Aktivierung von LXR $\alpha$  auch durch delipidiertes HDL stimuliert, was durch hochdosiertes  $\alpha$ -Tocopherol ebenfalls dosisabhängig reduziert werden konnte. Nichtsdestotrotz war ABCA1 in Makrophagen nach Cholesterinverarmung durch delipidiertes HDL supprimiert. Die gefundenen Effekte von  $\alpha$ -Tocopherol auf Schlüsselrezeptoren der Cholesterin-Homöostase in Makrophagen können zur Erklärung der enttäuschenden Resultate der Präventionsstudien mit hochdosiertem  $\alpha$ -Tocopherol beitragen: Durch Hemmung des Scavenger



Rezeptors CD36 reduziert  $\alpha$ -Tocopherol zwar einerseits den ersten Schritt zur Schaumzellbildung um den Preis einer verzögerten Abräumung extrazellulärer Lipiddepots,  $\alpha$ -Tocopherol verlangsamt aber auch durch Hemmung von ABCA1 und ABCG1, den endgültigen Abtransport von Cholesterin aus der Gefäßwand durch den reversen Cholesterin-Transport.

## 7 Literatur

1. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18:872-879.
2. Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol*. 1999;37:949-962.
3. Evans HaB, KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science*. 1922;56:650-651.
4. Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:703-716.
5. Ohki K, Takamura T, Nozawa Y. Effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation and acyl chain mobility of liver microsomes from vitamin E-difficient rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1984;30:221-234.
6. Li D, Devaraj S, Fuller C, Bucala R, Jialal I. Effect of alpha-tocopherol on LDL oxidation and glycation: in vitro and in vivo studies. *J Lipid Res*. 1996;37:1978-1986
7. Horwitt MK, Elliott WH, Kanjananggulpan P, Fitch CD. Serum concentrations of alpha-tocopherol after ingestion of various vitamin E preparations. *Am J Clin Nutr*. 1984;40:240-245.
8. Baker H, Handelman GJ, Short S, Machlin LJ, Bhagavan HN, Dratz EA, Frank O. Comparison of plasma alpha and gamma tocopherol levels following chronic oral administration of either all-rac-alpha-tocopheryl acetate or RRR-alpha-tocopheryl acetate in normal adult male subjects. *Am J Clin Nutr*. 1986;43:382-387.
9. Dimitrov NV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenoweth W, Malone W. Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:723-729.
10. Traber MG, Burton GW, Hamilton RL. Vitamin E trafficking. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1031:1-12.

11. Anwar K, Iqbal J, Hussain MM. Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *J Lipid Res.* 2007;48:2028-2038.
12. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:314S-321S.
13. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet.* 1982;2:327.
14. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys.* 1983;221:281-290.
15. Sorg O, Tran C, Saurat JH. Cutaneous vitamins A and E in the context of ultraviolet- or chemically-induced oxidative stress. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14:363-372.
16. Diplock AT, Xu GL, Yeow CL, Okikiola M. Relationship of tocopherol structure to biological activity, tissue uptake, and prostaglandin biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;570:72-84.
17. Devaraj S, Jialal I. Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1125-1133.
18. Devaraj S, Li D, Jialal I. The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest.* 1996;98:756-763.
19. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidallo MA, Leger CL. alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem.* 1998;273:32801-32805.
20. Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med.* 2005;142:37-46.
21. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1991;266:6188-6194.

22. Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J.* 1998;334 ( Pt 1):243-249.
23. Azzi A, Aratri E, Boscoboinik D, Clement S, Ozer NK, Ricciarelli R, Spycher S. Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *Biofactors.* 1998;7:3-14.
24. Aratri E, Spycher SE, Breyer I, Azzi A. Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1999;447:91-94.
25. Summerfield FW, Tappel AL. Effects of dietary polyunsaturated fats and vitamin E on aging and peroxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys.* 1984;233:408-416.
26. Azzi A, Boscoboinik D, Fazzio A, Marilley D, Maroni P, Ozer NK, Spycher S, Tasinato A. RRR-alpha-tocopherol regulation of gene transcription in response to the cell oxidant status. *Z Ernahrungswiss.* 1998;37 Suppl 1:21-28.
27. Chojkier M, Houglum K, Lee KS, Buck M. Long- and short-term D-alpha-tocopherol supplementation inhibits liver collagen alpha1(I) gene expression. *Am J Physiol.* 1998;275:G1480-1485.
28. Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *J Cell Mol Med.* 2004;8:59-76.
29. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-809.
30. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
31. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:456S-460S.
32. Pfahl M, Apfel R, Bendik I, Fanjul A, Graupner G, Lee MO, La-Vista N, Lu XP, Piedrafita J, Ortiz MA, et al. Nuclear retinoid receptors and their mechanism of action. *Vitam Horm.* 1994;49:327-382.

33. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:7614-7619.
34. Krieger M, Stern DM. Series introduction: multiligand receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2001;108:645-647.
35. Braissant O, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology*. 1998;139:2748-2754.
36. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347:645-650.
37. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*. 1992;68:879-887.
38. Su JL, Simmons CJ, Wisely B, Ellis B, Winegar DA. Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma*. 1998;17:47-53.
39. Forman BM, Chen J, Evans RM. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;804:266-275.
40. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. 1997;272:18779-18789.
41. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999;4:611-617.
42. Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2000;129:823-834.

43. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res.* 2000;448:121-138.
44. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:455-480.
45. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992;358:771-774.
46. Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J.* 1996;10:940-954.
47. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;106:523-531.
48. Onuta G, Rienstra H, de Boer JF, Boer MW, Roks AJ, Klatter FA, Uges DR, Navis G, Rozing J, Hillebrands JL. Rosiglitazone attenuates transplant arteriosclerosis after allogeneic aorta transplantation in rats. *Transplantation.* 2007;84:517-526.
49. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391:82-86.
50. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:459-481.
51. Joseph SB, Tontonoz P. LXRs: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3:192-197.
52. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:3137-3140.
53. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14:121-141.

- 
54. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:2831-2838.
  55. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, Parks DJ, Wilson JG, Tippin TK, Binz JG, Plunket KD, Morgan DG, Beaudet EJ, Whitney KD, Kliewer SA, Willson TM. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem.* 2002;45:1963-1966.
  56. Brown MS, Goldstein JL. The receptor model for transport of cholesterol in plasma. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;454:178-182.
  57. Goldstein JL, Brown MS. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res.* 1984;25:1450-1461.
  58. Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* 1994;63:601-637.
  59. Han J, Hajjar DP, Tauras JM, Nicholson AC. Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J Lipid Res.* 1999;40:830-838.
  60. Huh HY, Pearce SF, Yesner LM, Schindler JL, Silverstein RL. Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood.* 1996;87:2020-2028.
  61. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001;108:785-791.
  62. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.* 1992;80:1105-1115.
  63. Ibrahimi A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2646-2651.

64. Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1441:4-13.
65. Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:269-275.
66. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1049-1056.
67. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. 1998;39:777-788.
68. Silverstein RL, Febbraio M. CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:483-491.
69. Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1042-1048.
70. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998;93:229-240.
71. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res*. 1995;36:211-228.
72. Marcel YL, Kiss RS. Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:151-157.
73. Chroni A, Liu T, Gorshkova I, Kan HY, Uehara Y, Von Eckardstein A, Zannis VI. The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *J Biol Chem*. 2003;278:6719-6730.
74. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155-167.



- 
75. Tollefson JH, Ravnik S, Albers JJ. Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. *J Lipid Res.* 1988;29:1593-1602.
  76. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1993;34:1255-1274.
  77. Fielding PE, Miida T, Fielding CJ. Metabolism of low-density lipoprotein free cholesterol by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Biochemistry.* 1991;30:8551-8557.
  78. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 1996;271:518-520.
  79. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem.* 2001;276:25287-25293.
  80. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117:2216-2224.
  81. Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:12-19.
  82. Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2006;99:1031-1043.
  83. Moller JV, Sheikh MI. Renal organic anion transport system: pharmacological, physiological, and biochemical aspects. *Pharmacol Rev.* 1982;34:315-358.
  84. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J.* 1982;1:945-951.
  85. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, Holland IB, Gray L, Buckel SD, Bell AW, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature.* 1986;323:448-450.

86. Dassa E, Bouige P. The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol.* 2001;152:211-229.
87. Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res.* 2001;42:1173-1179.
88. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics.* 1994;21:150-159.
89. Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem.* 2000;275:33053-33058.
90. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 2001;42:1007-1017.
91. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 2005;85:1343-1372.
92. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:12097-12102.
93. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:9774-9779.
94. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:534-540.
95. Lawn RM, Wade DP, Couse TL, Wilcox JN. Localization of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:378-385.
96. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000;289:1524-1529.

- 
97. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem.* 2001;276:39438-39447.
  98. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med.* 2001;7:53-58.
  99. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.* 2001;7:161-171.
  100. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1310-1316.
  101. Pullinger CR, Hakamata H, Duchateau PN, Eng C, Aouizerat BE, Cho MH, Fielding CJ, Kane JP. Analysis of hABC1 gene 5' end: additional peptide sequence, promoter region, and four polymorphisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271:451-455.
  102. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994;344:793-795.
  103. Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:93-102.
  104. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:2995-2998.
  105. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1993;92:1004-1008.

106. Heery JM, Kozak M, Stafforini DM, Jones DA, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995;96:2322-2330.
107. Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J Lipid Res.* 1991;32:63-70.
108. Wilson RB, Middleton CC, Sun GY. Vitamin E, antioxidants and lipid peroxidation in experimental atherosclerosis of rabbits. *J Nutr.* 1978;108:1858-1867.
109. Schwenke DC, Rudel LL, Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. Alpha-tocopherol protects against diet induced atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *J Lipid Res.* 2002;43:1927-1938.
110. Pratico D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA. Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med.* 1998;4:1189-1192.
111. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:503-517.
112. Upston JM, Terentis AC, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *Faseb J.* 1999;13:977-994.
113. Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, Rautalahti M, Hartman AM, Palmgren J, Freedman LS, Haapakoski J, Barrett MJ, Pietinen P, Malila N, Tala E, Liippo K, Salomaa ER, Tangrea JA, Teppo L, Askin FB, Taskinen E, Erozan Y, Greenwald P, Huttunen JK. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:1560-1570.
114. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet.* 1996;347:781-786.

- 
115. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. *Lancet*. 1999;354:447-455.
  116. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, Gordon D, Ridker PM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *Jama*. 2005;294:56-65.
  117. Salonen RM, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Rissanen TH, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristonmaa U, Lakka HM, Vanharanta M, Salonen JT, Poulsen HE. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) Study. *Circulation*. 2003;107:947-953.
  118. Jaxa-Chamiec T, Bednarz B, Drozdowska D, Gessek J, Gniot J, Janik K, Kawka-Urbaneck T, Maciejewski P, Ogorek M, Szpajer M. Antioxidant effects of combined vitamins C and E in acute myocardial infarction. The randomized, double-blind, placebo controlled, multicenter pilot Myocardial Infarction and VITamins (MIVIT) trial. *Kardiol Pol*. 2005;62:344-350.
  119. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2007;297:842-857.
  120. Kielar D, Dietmaier W, Langmann T, Aslanidis C, Probst M, Naruszewicz M, Schmitz G. Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Chem*. 2001;47:2089-2097.
  121. Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochem Pharmacol*. 1996;52:433-439.
  122. Rubic T, Lorenz RL. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc Res*. 2006;69:527-535.
  123. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem*. 2001;276:38378-38387.

124. Scheithe R, Heidenthal AK, Danesch U, Mauthner E, Hapfelmeier G, Becker A, Pietsch A, Weber PC, Hrboticky N. Acetylated LDL endocytosis by the human monocytic Mono Mac 6sr cells is not mediated by the macrophage type I and II scavenger receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1024-1031.
125. Avis I, Martinez A, Tauler J, Zudaire E, Mayburd A, Abu-Ghazaleh R, Ondrey F, Mulshine JL. Inhibitors of the arachidonic acid pathway and peroxisome proliferator-activated receptor ligands have superadditive effects on lung cancer growth inhibition. *Cancer Res.* 2005;65:4181-4190.
126. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-1523.
127. Tatusova TA, Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences  
doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb13575.x. *FEMS Microbiology Letters.* 1999;174:247-250.
128. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature.* 1970;226:1211-1213.
129. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25:169-193.
130. Stetler D, Das H, Nunberg JH, Saiki R, Sheng-Dong R, Mullis KB, Weissman SM, Erlich HA. Isolation of a cDNA clone for the human HLA-DR antigen alpha chain by using a synthetic oligonucleotide as a hybridization probe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79:5966-5970.
131. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998;24:954-958, 960, 962.
132. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 1997;22:130-131, 134-138.
133. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods.* 1999;77:37-46.

- 
134. Tyagi S, Kramer FR. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. 1996;14:303-308.
  135. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature*. 1997;388:548-554.
  136. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
  137. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
  138. Schulz T, Schiffli H, Scheithe R, Hrboticky N, Lorenz R. Preserved antioxidative defense of lipoproteins in renal failure and during hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 1995;25:564-571.
  139. Osborne JC, Jr. Delipidation of plasma lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1986;128:213-222.
  140. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.
  141. Cho BH. Improved enzymatic determination of total cholesterol in tissues. *Clin Chem*. 1983;29:166-168.
  142. Moore KJ, Fabunmi RP, Andersson LP, Freeman MW. In vitro-differentiated embryonic stem cell macrophages: a model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1647-1654.
  143. Teupser D, Thiery J, Seidel D. Alpha-tocopherol down-regulates scavenger receptor activity in macrophages. *Atherosclerosis*. 1999;144:109-115.
  144. Azzi A, Gysin R, Kempna P, Munteanu A, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol Chem*. 2004;385:585-591.
  145. Strobach D, Lorenz RL. The bisphosphonate ibandronate stimulates reverse cholesterol transport out of monocytoid cells by enhanced ABCA1 transcription. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;307:23-30.

146. Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, Margotat A, Lagrost L, Collet X, Borel P. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem*. 2006;281:4739-4745.
147. Oram JF, Vaughan AM, Stocker R. ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J Biol Chem*. 2001;276:39898-39902.
148. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999;4:597-609.
149. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93:241-252.
150. Bowry VW, Mohr D, Cleary J, Stocker R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1995;270:5756-5763.
151. Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*. 2000;102:82-87.
152. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*. 1995;83:803-812.
153. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83:813-819.
154. Wu D, Liu L, Meydani M, Meydani SN. Vitamin E increases production of vasodilator prostanoids in human aortic endothelial cells through opposing effects on cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *J Nutr*. 2005;135:1847-1853.



- 
155. Kopprasch S, Pietzsch J, Westendorf T, Kruse HJ, Grassler J. The pivotal role of scavenger receptor CD36 and phagocyte-derived oxidants in oxidized low density lipoprotein-induced adhesion to endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:460-471.
  156. Konger RL. A new wrinkle on topical vitamin E and photo-inflammation: Mechanistic studies of a hydrophilic gamma-tocopherol derivative compared with alpha-tocopherol. *J Invest Dermatol.* 2006;126:1447-1449.
  157. Brown MS, Goldstein JL. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell.* 1975;6:307-316.
  158. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 1993;92:883-893.
  159. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:333-337.
  160. Ho YK, Brown S, Bilheimer DW, Goldstein JL. Regulation of low density lipoprotein receptor activity in freshly isolated human lymphocytes. *J Clin Invest.* 1976;58:1465-1474.
  161. Weinstein DB, Carew TE, Steinberg D. Uptake and degradation of low density lipoprotein by swine arterial smooth muscle cells with inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1976;424:404-421.
  162. Huszar D, Varban ML, Rinninger F, Feeley R, Arai T, Fairchild-Huntress V, Donovan MJ, Tall AR. Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor B1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1068-1073.
  163. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol.* 2003;17:985-993.
  164. Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR, Tan B, Brooks-Wilson A, Kwok A, Bissada N, Yang YZ, Liu G, Tafuri SR, Fievet C, Wellington CL, Staels B, Hayden MR. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal

- promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J Biol Chem.* 2001;276:33969-33979.
165. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761:655-666.
166. Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, Westover EJ, Covey DF, Mangelsdorf DJ, Cohen JC, Hobbs HH. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem.* 2006;281:27816-27826.
167. Leonard SW, Joss JD, Mustacich DJ, Blatt DH, Lee YS, Traber MG. Effects of vitamin E on cholesterol levels of hypercholesterolemic patients receiving statins. *Am J Health Syst Pharm.* 2007;64:2257-2266.
168. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:10316-10320.
169. McNeish J, Aiello RJ, Guyot D, Turi T, Gabel C, Aldinger C, Hoppe KL, Roach ML, Royer LJ, de Wet J, Broccardo C, Chimini G, Francone OL. High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:4245-4250.
170. Favari E, Zanotti I, Zimetti F, Ronda N, Bernini F, Rothblat GH. Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2345-2350.
171. Rimbach G, Minihane AM, Majewicz J, Fischer A, Pallauf J, Virgli F, Weinberg PD. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc Nutr Soc.* 2002;61:415-425.
172. Pal S, Thomson AM, Bottema CD, Roach PD. Alpha-tocopherol modulates the low density lipoprotein receptor of human HepG2 cells. *Nutr J.* 2003;2:3.
173. Sun J, Giraud DW, Moxley RA, Driskell JA. beta-Carotene and alpha-tocopherol inhibit the development of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Int J Vitam Nutr Res.* 1997;67:155-163.

---

## Publikationsliste

### Originalarbeiten

Blokesch M., Rohrmoser M., **Rode S.** und Bock A. - HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *Journal Bacteriol.* 2004 May; 186(9):2603-11.

**Rode S.**, Rubic T. and Lorenz R.L. –  $\alpha$ -Tocopherol disturbs Macrophage LXR $\alpha$  regulation of ABCA1/G1 and Cholesterol Handling, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, akzeptiert Feb. 2008.

### Kongressbeiträge

#### a) Vorträge

**Rode S.** and Lorenz R. L.: „Effects of  $\alpha$ -tocopherol on the regulation of key receptors of cholesterol homeostasis in human macrophages“, Progress-Reports des DFG-Graduiertenkollegs 438 “Vaskuläre Biologie in der Medizin“ München, Deutschland, Oktober 2004, September 2005 und Juni 2007.

**Rode S.** and Lorenz R. L.: „ $\alpha$ -Tocopherol interferes with the regulation of key receptors in macrophages“, Jahrestagung des Arbeitskreises Klinischer Lipidstoffwechsel in Maikammer, Deutschland, 20. – 22. November 2005

**Rode S.** and Lorenz R. L.: „ $\alpha$ -Tocopherol interferes with the regulation of key receptors in macrophages“, 3. Symposium des DFG-Graduiertenkollegs 438 “Vaskuläre Biologie in der Medizin“, Herrsching, Deutschland, 10. / 11. November 2007

## b) Poster

**Rode S.** and Lorenz R. L.: " $\alpha$ -Tocopherol reduces the stimulation of macrophage CD36 and ABCA1 expression by oxidized LDL"; 26<sup>th</sup> European Lipoprotein Club Meeting in Tutzing, Deutschland, 8. – 11. September 2004.

**Rode S.** and Lorenz R. L.: " $\alpha$ -Tocopherol interferes with the regulation of CD36 and ABCA1, key receptors of plaque regression in the vessel wall"; 12<sup>th</sup> Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference in Kopenhagen, Dänemark, 31. Mai – 3. Juni 2006.

**Rode S.** and Lorenz R.L.: „High Dose  $\alpha$ -Tocopherol interferes with the regulation of CD36, ABCA1 and ABCG1, key receptors of plaque regression in the vessel wall"; XIV International Symposium on Atherosclerosis in Rom; Italien. 18. – 23. Juni 2006

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Reinhard L. Lorenz für die interessante Themenstellung, die ständige Diskussionsbereitschaft und den Freiraum für eigene Ideen.

Herrn Prof. Dr. Peter C. Weber für die Aufnahme in das Institut und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Siess für die Unterstützung meiner Arbeit innerhalb des Graduiertenkollegs 438.

Allen Mitgliedern des IPEK für die technische Unterstützung und für ein immer offenes Ohr.

Brigitte Zimmer und Diana Wagner, die mir das Leben im Labor versüßt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Natalie Hrusovar – ohne Worte!

Meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer vorbehaltlos unterstützt hat und ohne die ich nie soweit gekommen wäre, gilt mein größter Dank.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe, ich mich außer der angegebenen Hilfsmittel keiner weiteren bedient habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Bisher habe ich noch an keiner Doktorprüfung teilgenommen.

Die hier vorgelegte Dissertation wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, April 2008

Sabine Rode

# Lebenslauf

Sabine Rode  
Lily-Braun-Weg 15  
80637 München

## Persönliche Angaben

Geburtsort: Garmisch-Partenkirchen

Geburtstag: 04.02.1978

## Ausbildung

Sept. 1984 - Juli 1997    Grundschule Am Gröben und St.-Irmengard-Gymnasium mit allgemeiner Hochschulreife; Garmisch-Partenkirchen

Nov. 1997 - Juli 1998    Studium der Geologie an der TU München

Nov. 1998 - Dez. 2003    **Studium der Biologie** auf Diplom an der Ludwig Maximilian Universität München

Mikrobiologie (Hauptfach), Pharmakologie und Toxikologie, Humangenetik und Biochemie

**Diplomarbeitsthema:** „Die Reifung der [NiFe]-Hydrogenasen in *Escherichia coli*“ bei Prof. Dr. A. Böck am Department Biology 1 - Mikrobiologie der LMU München

seit April 2004

**Dissertation** am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten der LMU München bei Prof. Dr. R.L. Lorenz

Mai 2004 – April 2007

**Kollegiatin im DFG-Graduiertenkolleg 438 –** Vaskuläre Biologie in der Medizin

Mai 2007 – April 2008

wissenschaftliche Mitarbeiterin