
Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. P. C. Weber

**Beeinflussung des LXR α -abhängigen Cholesterintransporters
ABCA1 durch Stigmasterol und seine Oxyderivate**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Natalie Hrusovar

aus

München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. L. Lorenz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Anja. C. Muntau
Prof. Dr. med. K. Parhofer
Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. C. Johannes
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.2009

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst
werden will.

(Galileo Galilei)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG.....	9
1.1 ATHEROSKLEROSE.....	9
1.1.1 DEFINITION UND RELEVANZ.....	9
1.1.2 PATHOGENESE.....	10
1.1.3 REVERSER CHOLESTERINTRANSPORT.....	12
1.1.4 CHOLESTERINEXPORTER ABCA1 (ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTER A1).....	15
1.1.5 NUKLEÄRE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN LXR (LIVER X RECEPTORS).....	19
1.2 STEROLE.....	24
1.2.1 OXYCHOLESTEROLE	24
1.2.2 PHYTOSTEROLE	26
1.2.3 OXYPHYTOSTEROLE	30
1.2.4 CHEMISCHE OXYPHYTOSTEROLE	33
2 FRAGESTELLUNGEN.....	35
3 MATERIAL UND METHODEN.....	37
3.1 MATERIAL.....	37
3.1.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	37
3.1.2 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	39
3.1.3 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDPRIMER	40
3.1.4 GERÄTE.....	41
3.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	42
3.2.1 KULTIVIERUNG VON CACO-2-ZELLEN	42
3.2.2 KRYOKONSERVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN.....	43

3.3	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	43
3.3.1	ANZUCHT VON <i>E. COLI</i> -BAKTERIEN.....	43
3.3.2	LAGERUNG VON <i>E. COLI</i> -BAKTERIEN	43
3.3.3	HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -BAKTERIEN.....	43
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	44
3.4.1	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	44
3.4.2	RESTRIKTIONSANALYSEN	44
3.4.3	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> (DH5 α) MITTELS HITZESCHOCK	44
3.4.4	KLONIERUNG	45
3.4.5	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	45
3.4.6	PLASMIDSEQUENZIERUNG (ZUR KONTROLLE)	46
3.5	REPORTERGENASSAY UND SPEZIFISCHE mRNA-QUANTIFIZIERUNG	46
3.5.1	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON CACO-2-ZELLEN.....	46
3.5.2	LXRE-TRANSAKTIVIERUNGS-LUCIFERASEASSAY	48
3.5.3	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS CACO-2-ZELLEN	49
3.5.4	QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR.....	50
3.5.4.1	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	50
3.5.4.2	Real-time RT-PCR	53
3.5.4.3	Absolute und relative Quantifizierung	54
3.6	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	55
3.6.1	GESAMTPROTEINEXTRAKTION AUS CACO-2-ZELLEN	55
3.6.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION.....	56
3.6.3	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	56
3.6.4	IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT)	57
3.7	CHEMISCH-ANALYTISCHE METHODEN	58
3.7.1	GC/MS	58
3.7.2	HERSTELLUNG VON OXYPHYTOSTEROLEN ²¹²	60
3.7.2.1	Dünnschichtchromatographie (thin-layer chromatography).....	60
3.7.2.2	Festphasenextraktion (solid-phase extraction)	60
3.7.2.3	Derivatisierung	60
3.7.2.4	Oxidation von Stigmasterol	61
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	62
4	ERGEBNISSE	63
4.1	ETABLIERUNG VON LXRα AN CACO-2-ZELLEN IN DER REAL-TIME RT-PCR	63
4.2	EFFEKTE VON HYDROXYCHOLESTEROLEN AUF DIE TRANSKRIPTION IN CACO-2-ZELLEN	65
4.2.1	EXPRESSION ABCA1-SPEZIFISCHER mRNA	65
4.2.2	EXPRESSION LXR α -SPEZIFISCHER mRNA.....	66

4.3	EFFEKTE VON NATIVEN PHYTOSTEROLEN UND DESMOSTEROL AUF DIE TRANSKRIPTION IN CaCo-2-ZELLEN.....	67
4.3.1	EXPRESSION ABCA1-SPEZIFISCHER MRNA.....	67
4.3.2	EXPRESSION LXR α -SPEZIFISCHER MRNA	68
4.4	EFFEKTE VON OXYSTIGMASTEROLEN AUF DIE TRANSKRIPTION IN CaCo-2-ZELLEN.....	69
4.4.1	EINTEILUNG DER OXYSTIGMASTEROLE	69
4.4.2	EXPRESSION ABCA1-SPEZIFISCHER MRNA BEI POLAREREN OXYSTIGMASTEROLEN	73
4.4.3	EXPRESSION ABCA1-SPEZIFISCHER MRNA BEI WENIGER POLAREN OXYSTIGMASTEROLEN	74
4.4.4	EXPRESSION LXR α -SPEZIFISCHER MRNA BEI POLAREREN OXYSTIGMASTEROLEN	76
4.4.5	EXPRESSION LXR α -SPEZIFISCHER MRNA BEI WENIGER POLAREN OXYSTIGMASTEROLEN.....	77
4.5	EFFEKTE VON NATIVEN PHYTOSTEROLEN UND DESMOSTEROL AUF DIE AKTIVIERUNG VON LXRE IN CaCo-2-ZELLEN	79
4.6	EFFEKTE POLARERER OXYSTIGMASTEROLE AUF DIE AKTIVIERUNG VON LXRE IN CaCo-2-ZELLEN.....	80
4.7	EFFEKTE WENIGER POLARER OXYSTIGMASTEROLE AUF DIE AKTIVIERUNG VON LXRE IN CaCo-2-ZELLEN.....	81
4.8	PROTEINEXPRESSION VON ABCA1 IN CaCo-2-ZELLEN	82
4.8.1	BESTIMMUNG DER KINETIK DER PROTEINEXPRESSION VON ABCA1 NACH INKUBATION MIT 22(R)-OHC UND 9-CIS RA.....	82
4.8.2	BESTIMMUNG DER KINETIK DER PROTEINEXPRESSION VON ABCA1 NACH INKUBATION MIT NATIVEN PHYTOSTEROLEN UND DESMOSTEROL.....	83
4.8.3	EFFEKTE POLARERER OXYSTIGMASTEROLE AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON ABCA1	87
5	DISKUSSION.....	89
5.1	WIRKUNG VON HYDROXYCHOLESTEROLEN AUF DIE TRANSKRIPTION IN CaCo-2-ZELLEN ..	89
5.1.1	HYDROXYCHOLESTEROLE INDUZIEREN DIE EXPRESSION VON ABCA1-SPEZIFISCHER MRNA	89
5.1.2	HYDROXYCHOLESTEROLE INDUZIEREN KEINE VERMEHRTE EXPRESSION VON LXR α -SPEZIFISCHER MRNA.....	91
5.2	WIRKUNG NATIVER STEROLE AUF DIE GENEXPRESSION IN CaCo-2-ZELLEN	92
5.2.1	NATIVE PHYTOSTEROLE INDUZIEREN DIE EXPRESSION VON ABCA1 IN CaCo-2-ZELLEN NICHT	92
5.2.2	NATIVE PHYTOSTEROLE INDUZIEREN DIE TRANSKRIPTION UND AKTIVIERUNG VON LXR α IN CaCo-2-ZELLEN NICHT.....	94
5.2.3	DESMOSTEROL INDUZIERT DIE TRANSKRIPTION VON ABCA1 IN CaCo-2-ZELLEN NICHT	99
5.2.4	DESMOSTEROL INDUZIERT DIE TRANSKRIPTION UND AKTIVIERUNG VON LXR α IN CaCo-2-ZELLEN NICHT	101
5.3	WIRKUNG CHEMISCH DARGESTELLTER OXYSTIGMASTEROLE AUF DIE GENEXPRESSION IN CaCo-2-ZELLEN.....	102

5.3.1	HERSTELLUNG UND EINSATZ VON OXYSTIGMASTEROLEN.....	102
5.3.2	POLARERE OXYSTIGMASTEROLE INDUZIEREN DIE EXPRESSION VON ABCA1 IN CACO-2-ZELLEN STÄRKER ALS WENIGER POLARE OXYSTIGMASTEROLE	103
5.3.3	OXYSTIGMASTEROLE INDUZIEREN KEINE VERMEHRTE TRANSKRIPTION VON LXR α IN CACO-2- ZELLEN	108
5.4	POTENTIELLE MEDIZINISCHE RELEVANZ VON OXYPHYTOSTEROLEN	109
6	ZUSAMMENFASSUNG	111
7	LITERATUR.....	115
A	ANHANG	131
	RETENTIONSZEITEN UND MASSENSPEKTREN VON OXYSTIGMASTEROLEN (NACH JOHANNES AND LORENZ 2004 ²¹²).....	131
B	DANKSAGUNG	147
C	ERKLÄRUNG.....	149
D	CURRICULUM VITAE.....	151

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG5/G8	ATP-binding cassette transporter G5/G8
Ak	Antikörper
Apo A-I	Apolipoprotein A-I
Apo E	Apolipoprotein E
Apo E ^{-/-}	Apolipoprotein E-Knock-Out
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Area-units, Flächeneinheiten
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSTFA	Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C	Konzentration
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
C _t -Wert	threshold cycle
CYP7A1	7A1- cholesterol 7 α -hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph/Gaschromatographie
GFP	green fluorescent protein
HDL	high density lipoprotein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
hLXR α	human liver X receptor alpha
hLXR β	human liver X receptor beta
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

H ₂ O _{dd}	Reinstwasser
22(R)-OHC	22(R)-Hydroxycholesterol
24(S)-OHC	24(S)-Hydroxycholesterol
25-OHC	25-Hydroxycholesterol
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LDLR ^{-/-}	low density lipoprotein-knock-out
LXR α	liver X receptor alpha
LXR α ^{-/-}	liver X receptor alpha-knock-out
LXR β	liver X receptor beta
LXR β ^{-/-}	liver X receptor beta-knock-out
LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}	liver X receptor alpha, beta-knock-out
LXRE	LXR α response element
M	Molarität
MC	Massenspektrometer/Massenspektrographie
MEM	minimal essential medium
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
OSBP	oxysterol binding protein
oxLDL	oxidativ modifiziertes Low Density Lipoprotein
p.A.	Reinheitsgrad: zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ^{+/+}	PBS mit Calcium und Magnesium
PBS ^{-/-}	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RH	random hexamer (pd(N) ₆)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur, reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RXR	retinoid X receptor
9-cis RA (RA)	9-cis retinoic acid

SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	solid-phase extraction
SR-BI	scavenger receptor class-B type I
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein 1c
SREBP-2	sterol regulatory element-binding protein 2
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS/Tween	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1 % Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
THAM	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)
TLC	thin-layer chromatography
TMCS	Trimethylchlorsilan
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VLDL	very low density lipoprotein

Nukleinbasen

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

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

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Definition und Relevanz

Der Begriff Atherosklerose umschreibt eine fortschreitende Erkrankung der größeren und mittleren muskulösen sowie elastischen Arterien des Körpers durch Lipidansammlungen und bindegewebige Veränderungen der Intima bzw. inneren Schichten der Media in der Arterienwand. Dies kann im Verlauf der Erkrankung infolge einer Lumeneinengung zur Mangel durchblutung vor allem des Herzens, Gehirns oder der Extremitäten und letztendlich auch zum Infarkt dieser Organe durch den Verschluss der entsprechenden Gefäße führen^{1,2}. Prädilektionsorte für atherosklerotische Veränderungen sind primär Stellen, die beispielsweise stark wechselnden Scherspannungen sowie Fließgeschwindigkeiten des Blutes, aber auch Turbulenzen ausgesetzt sind. Dies kann sich negativ auf die Endothelfunktion und proatherogen auswirken³. In den letzten Jahrzehnten konnten durch epidemiologische Studien zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose gefunden werden. Ihre Einteilung erfolgt in die Gruppe der Risikofaktoren mit signifikanter genetischer Komponente und die Gruppe der weitgehend umweltbedingten Faktoren (Tabelle 1).

Aufgrund demographischer Veränderungen und Änderungen des Lebensstils in den westlichen Industrienationen erlangen laut World Health Report aus dem Jahr 2002 chronische Erkrankungen in diesen Ländern eine immer wichtigere Bedeutung. Zu den rangführenden Krankheiten zählen die kardiovaskulären Erkrankungen. Die 2001 veröffentlichte Burden of Disease Studie, die auf einer von der World Health Organisation entwickelten Methodologie basiert, ergaben die Berechnungen der Krankheitslast eine führende Position von atherosklerotisch bedingten Krankheiten, wie der koronaren Herzkrankheit und zerebrovaskulären Erkrankungen, auch in Ländern mit niedriger bis hoher Einkommensklasse. Insgesamt waren diese Erkrankungen als Ursache für ein Fünftel aller Todesfälle weltweit verantwortlich⁴. Prognosen bis zum Jahr 2030 deuten darauf hin, dass diese vaskulären Erkrankungen auch weiterhin die häufigste Todesursache weltweit darstellen werden⁵.

Tabelle 1: Risikofaktoren der Atherosklerose (modifiziert nach Lusis et al. 2004 ⁶ und Glass and Witztum 2001 ⁷)

RISIKOFAKTOREN	
ÜBERWIEGEND GENETISCH	EXOGEN
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hypercholesterinämie ➤ Hypertriglyceridämie ➤ HDL-Spiegel ↓ ➤ Lipoprotein (a) ↑ ➤ Arterielle Hypertonie ➤ Diabetes mellitus Typ II ➤ Metabolisches Syndrom ➤ Hyperhomocysteinämie ➤ Akute-Phase-Proteine ↑ ➤ Übergewicht ➤ Geschlecht ➤ Alter 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Rauchen ➤ Ernährung ➤ Bewegungsmangel ➤ Infektionen

1.1.2 Pathogenese

Die Wissenschaft fasste die Befunde der letzten Jahrzehnte bezüglich der Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose in zwei zentralen Hypothesen zusammen:

1973 formulierte und postulierte Russel Ross gemeinsam mit John Glomset erstmals die „Response to injury“-Hypothese ⁸. Diese, inzwischen mehrmals modifizierte Hypothese, sieht die Atherosklerose als inflammatorische Erkrankung der Gefäßwände, an deren Anfang die endotheliale Dysfunktion infolge einer Endothelschädigung steht. Ursächliche Noxen können beispielsweise mechanische, immunologische und biochemische Faktoren, aber auch Toxine oder Viren sein. Ein weiterer Faktor, den auch Ross später in seine Hypothese aufnahm und der 1986 erstmalig vom amerikanischen Nobelpreisträger Joseph Leonard Goldstein im Rahmen der „Lipoprotein induced atherosclerosis“-Hypothese ^{9,10} beschrieben wurde, ist oxidativ modifiziertes Low Density Lipoprotein (oxLDL),

dem inzwischen eine wichtige Bedeutung zugeschrieben wird. Wie in Abbildung 1 dargestellt, wird durch die Verletzung des Endothels eine inflammatorische Reaktion mit erhöhter Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten hervorgerufen. Es folgt eine subendotheliale Migration dieser Zellen mit anschließender Rekrutierung von weiteren Monozyten aus der Blutbahn unter regulierendem Einfluss von leukozytären Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und nachfolgend zur Ausbildung von Schaumzellen durch die Aufnahme von in der Intima abgelagertem oxLDL über bestimmte Rezeptoren, wie z.B. Scavenger Rezeptoren. Neben den aktivierten Makrophagen spielen auch andere Leukozyten, wie beispielsweise T-Lymphozyten, eine zentrale Rolle im weiteren Prozess der Atheroskleroseentstehung. Letztere sind unter anderem für die Sekretion verschiedener Zytokine (z.B. Interferon γ oder Tumornekrosefaktor α) und Wachstumsfaktoren verantwortlich, die zu einer Zellmigration und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima führen können und darüber hinaus auch die inflammatorischen Vorgänge aufrecht erhalten. Unter dem Zusammenspiel von aktivierten Makrophagen bzw. Schaumzellen, T-Zellen und glatten Muskelzellen kommt es zur Entwicklung von sogenannten Fettstreifen (fatty streaks) in der Intima, die sich als früheste makroskopisch erkennbare Läsion häufig bereits bei Kindern nachweisen lassen und aus denen sich später im Rahmen des Fortschreitens der Läsion fibröse Plaques ausbilden können. Aufgrund einer inflammatorischen Aktivierung eines Plaques kann es schließlich zur reaktiven Produktion von Proteasen, Zytokinen und prothrombotischen Faktoren durch Makrophagen und T-Zellen kommen. Dies hat zur Folge, dass die fibröse Kappe, die den lipidreichen Kern des Plaques bedeckt und eine Abgrenzung zur Blutbahn darstellt, durch Zerstörung des Kollagens und gleichzeitiger Hemmung des Wachstums von glatten Muskelzellen, in ihrer Stabilität reduziert wird und somit den hämodynamischen Kräften nur erschwert standhalten kann. Bei einer Ruptur des Plaques und der daraus resultierenden Exposition von thrombogenem Material kommt es unter Mitwirkung von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren zur Bildung eines okkludierenden Thrombus, der nachfolgend letztlich akute Komplikationen, wie beispielsweise einen Herzinfarkt oder Schlaganfall, durch den Verschluss eines Gefäßes auslösen kann ¹¹⁻¹³.

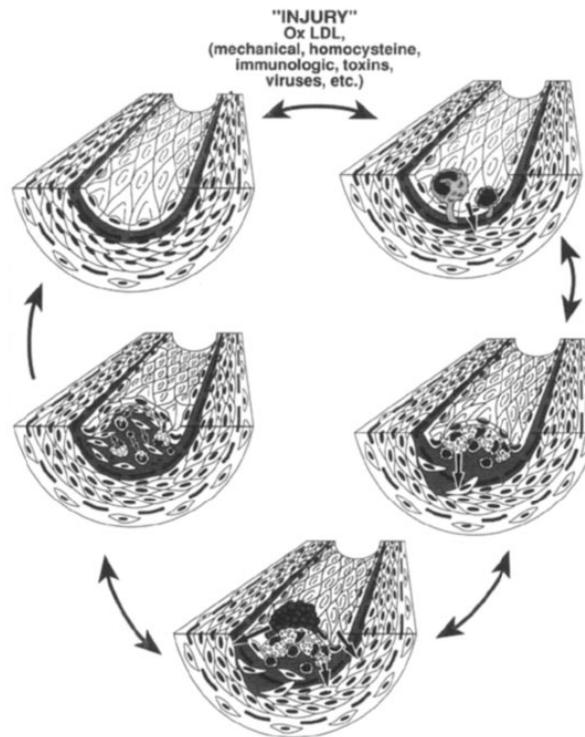


Abbildung 1: „Response to injury“-Hypothese der Atherosklerose (aus Ross 1995 ¹¹). Endothelverletzungen unterschiedlichen Ursprungs können zu einer endothelialen Dysfunktion führen, in deren Verlauf es unter Einfluss von oxidativ modifiziertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) zu einer subendothelialen Migration von Monozyten und T-Lymphozyten aufgrund veränderter Adhäsionseigenschaften kommt. Die zu Makrophagen differenzierten Monozyten werden nach Aufnahme von oxLDL über Scavenger Rezeptoren schließlich zu Schaumzellen. Diese bilden zusammen mit T-Lymphozyten und glatten Muskelzellen die sog. Fatty Streaks, die sich progressiv zu fibrösen Plaques entwickeln können. Unter einer leukozytär vermittelten Schwächung der fibrösen Kappe eines Plaques wird bei einer Ruptur thrombogenes Material aus dem lipidreichen Plaquelkern exponiert und die Bildung eines Thrombus initiiert, der letztlich über einen Gefäßverschluss zu einem Organinfarkt führen kann. Die einzelnen Stufen der Läsionen sind potentiell reversibel.

1.1.3 Reverser Cholesterintransport

Beim reversen Cholesterintransport handelt es sich um einen von John Glomset 1968 erstmalig postulierten Stoffwechselweg des Körpers, der zur Beseitigung überschüssigen extrahepatischen Cholesterins dient ¹⁴. Dadurch wird Cholesterin aus peripherem Gewebe zur Leber transportiert, um dort entweder direkt oder nach einer Umwandlung zu Gallensäuren in die Galle und schließlich in den Fäzes ausgeschieden zu werden. Dieser Mechanismus ist für die Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase äußerst relevant ¹⁵, denn obwohl das Cholesterin einerseits eine wesentliche Komponente der Zellmembranen in Säugetieren darstellt, wirkt es im Überschuss toxisch auf periphere Zellen, da nur Leberzellen zu dessen Katabolismus befähigt sind ¹⁶.

Der Cholesterintransport aus den peripheren extrahepatischen Zellen erfolgt über High Density Lipoprotein (HDL)-Partikel, die im Plasma als Transportmittel zur Leber und als Träger von ungefähr einem Drittel des humanen Plasmacholesterins fungieren^{17,18}. Zu den peripheren Zellen werden auch Makrophagen gerechnet, deren Anteil am gesamten Cholesterinefflux zwar recht gering, jedoch in der Gefäßwand hinsichtlich atherosklerotischer Erkrankungen von großer Relevanz ist¹⁹. Eine Verbindung zwischen reversem Cholesterintransport und Atherosklerose wurde erstmals in der von Ross und Glomset aufgestellten Hypothese geschaffen, in der die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen durch eine Störung der arteriellen Cholesterinhomöostase nach Endothelschädigung beschrieben wurde⁸. Später erfolgte eine Erweiterung dieses Konzepts durch Miller und Miller, die das Modell der Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen über eine Erhöhung von HDL, mit dem Ziel, eine Verminderung des Cholesterins in den Arterienwänden zu erreichen, vorstellten. Diese heute durch zahlreiche Studien unterstützte Annahme basiert dabei auf einer inversen Beziehung zwischen der Konzentration von HDL-Cholesterin im Plasma und kardiovaskulären Erkrankungen beim Menschen^{20,21}.

Periphere Zellen verfügen über mehrere Mechanismen des Cholesterineffluxes. So kann das freie unveresterte Cholesterin beispielsweise entlang eines Konzentrationsgefälles von der Plasmamembran durch die wässrige Phase zu HDL diffundieren²², wobei dies aber relativ ineffizient zu sein scheint²³. Eine andere Möglichkeit stellt der Efflux über SR-BI-Rezeptoren (scavenger receptor class-B type I) dar. Bei Mäusen hat dieser Rezeptor außerdem die Aufgabe, Cholesterinester selektiv aus HDL in Hepatozyten oder auch Zellen von steroidbildendem Gewebe aufzunehmen²⁴. Bei humanem SR-BI wird eine vergleichbare Funktion vermutet²⁵. Im Gegensatz zum SR-BI-Rezeptor, der einen bidirektionalen Cholesterinaustausch zwischen Zelle und extrazellulären Akzeptoren vermittelt, fördert der Cholesterinexporter ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) einen unidirektionalen Efflux des Cholesterins aus der Zelle und stellt den wohl bedeutendsten Mechanismus bezüglich seiner möglichen antiatherogenen Funktion dar²⁶.

Am reversen Cholesterintransport ist eine Vielzahl an Zell- und Plasmaproteinen beteiligt²⁷. Ein wichtiges Protein stellt in diesem Zusammenhang das lipidfreie bzw. -arme Apo A-I (Apolipoprotein A-I) dar, das mit ca. 70 % den Hauptbestandteil des HDLs ausmacht¹⁸. Wie in Abbildung 2 dargestellt, kann dieses auch als Prä-β HDL bekannte Protein von Leber- und Darmzellen sezerniert sowie aus Oberflächenmaterial von Chylomikronen oder HDL₂ zurückgewonnen werden²⁸⁻³⁰.

was diese zu sphärischen Partikeln konvertiert. Die anhaltende Aktivität von LCAT führt zu einer Vergrößerung der Kern- und Partikelgröße und schließlich zur Ausbildung des an Apo E reichen HDL₃ ^{33,34}. Der weitere Transfer der Cholesterinester folgt nun über den SR-BI-Rezeptor in die Leber oder auf andere Lipoproteine mittels des Cholesterinester-Transferproteins (CETP). Auf LDL übertragene Cholesterinester können nachfolgend durch Endozytose der LDL-Partikel über LDL-Rezeptoren in Hepatozyten aufgenommen werden. Dort werden die Cholesterinester zu Cholesterin und freien Fettsäuren hydrolysiert. Nachfolgend wird das Cholesterin entweder direkt in die Galle sezerniert, zu Gallensäuren umgewandelt oder gelangt z.B. mit VLDL erneut in den Kreislauf ³². Eine Regeneration von Apo A-I findet dabei über die Delipidierung von reifen HDL-Partikeln durch das Cholesterinester-Transferprotein (CETP), Phospholipid-Transferprotein (PLTP) und die hepatische Lipase (HL) statt ³⁵⁻³⁷.

1.1.4 Cholesterinexporter ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)

Die ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporter) stellen die größte Proteinfamilie von Membrantransportern in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen dar. Im humanen Genom wurden bisher 48 verschiedene ABC-Gene beschrieben, deren Einteilung nochmals in 7 Subfamilien von ABCA bis ABCG erfolgt ^{38,39}. Zur Aufrechterhaltung des vektorialen Transports ihrer unterschiedlichsten Substrate sowohl über die Plasmamembran als auch über intrazelluläre Membranen von Zellorganellen, beziehen die meisten ABC-Proteine die dafür erforderliche Energie über die Bindung und Hydrolyse von ATP ^{39,40}. Strukturell besteht die Mehrheit der ABC-Membranproteine aus zwei Transmembrandomänen und zwei ATP-Untereinheiten, die entweder als Volltransporter in einem einzigen Molekül oder als Halbtransporter in zwei dimerisierten Proteinuntereinheiten vorliegen ⁴¹. Mutationen der ABC-Gene verursachen vielfältige Erkrankungen des Menschen, wie beispielsweise die zystische Fibrose, Adrenoleukodystrophie oder Störungen des Lipidstoffwechsels ^{18,42}.

Über die Erforschung des Morbus Tangier und der Entdeckung einer Genmutation des ABCA1-Transporters als Ursache für diese Erkrankung, konnte dessen wichtige Bedeutung für den Cholesterinmetabolismus als geschwindigkeitsbestimmender Transporter des Cholesterineffluxes aus peripheren Zellen nachgewiesen werden ⁴³⁻⁴⁵. Beim Morbus Tangier handelt es sich um eine seltene Erkrankung, die durch sehr niedrige HDL-Plasmakonzentrationen und die Akkumulation von Cholesterin bzw. Cholesterinestern in Makrophagen

zahlreicher Gewebe des Körpers gekennzeichnet ist ⁴⁶. Der Cholesterin- und Phospholipidefflux auf Apo A-I ist bei Fibroblasten und Makrophagen von Patienten mit dieser Krankheit deutlich reduziert ^{46,47}. Ähnliche Befunde aufgrund einer Mutation des ABCA1-Gens konnten am Tiermodell der sogenannten Wisconsin Hypoalpha Mutant (WHAM)-Hühner beobachtet werden ⁴⁸. Da zwischen der Plasmakonzentration des HDL-Cholesterins und der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen eine umgekehrte Korrelation besteht ^{49,50}, liegt Schätzungen zufolge die Prävalenz für solche Krankheiten bei homozygoten Tangier-Patienten um ein Sechsfaches höher als bei Gesunden ⁵¹. Selbst bei Vorliegen einer Heterozygotie lässt sich eine Intima-Mediaverdickung als Ersatzmarker für die Atherosklerose feststellen ⁵². Obwohl die Identifikation des ABCA1-Proteins erst 1994 erfolgte ⁵³, wurde schon 20 Jahre zuvor der HDL-vermittelte Cholesterinefflux aus Zellen über einen durch Cholesterin induzierbaren Transporter vermutet ⁵⁴. Der ABCA1-Transporter ist ein aus 2261 Aminosäuren bestehendes integrales Membranprotein, das, entsprechend den übrigen ABC-Proteinen, ATP als Energiequelle für den Transport von Lipiden durch die Membran nutzt ^{39,40,55}. Als Volltransporter setzt sich ABCA1 aus zwei Tandemwiederholungen der gleichen Proteinsequenz zusammen ⁵⁵. Wie in Abbildung 3 dargestellt, umfasst jede Hälfte sechs transmembrane Helices, eine intrazelluläre Nukleotidbindungsdomäne (NBD), die zwei, als Walker A und B bekannte, Peptidmotive zur Verwertung von ATP enthält bzw. ein Walker C-Motiv als weitere, für ABC-Transporter spezifische, Domäne ⁴¹. Außerdem besteht die Vermutung, dass ABCA1 einen in Richtung des Zytosols ausgerichteten NH₂-Terminus und zwei große, stark glykosylierte, extrazelluläre Peptidschleifen besitzt, die durch mindestens eine Disulfidbrücke verbunden sind ^{55,56}.

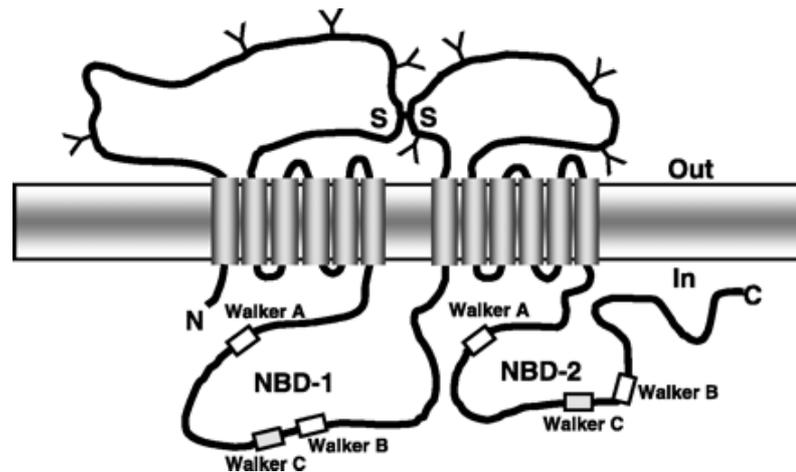


Abbildung 3: Topologisches Modell von ABCA1 (aus Oram and Heinecke 2005³²). Die Struktur des Volltransporters ABCA1 setzt sich aus zwei Polypeptidhälften zusammen, die wiederum jeweils aus sechs transmembranösen Helices, einer Nukleotidbindungsdomäne (NBD-1/2) mit den stark konservierten Peptidmotiven Walker A/B und der für ABC-Transporter spezifischen Walker C-Domäne aufgebaut sind. Durch Y sind vermutliche Glykosylierungsstellen und durch S-S eine Disulfidbrückenbindung dargestellt.

ABCA1 wird praktisch ubiquitär in den verschiedensten Geweben des Körpers, wie z.B. Leber, Lunge, Plazenta, Dünndarm oder Magen, exprimiert. Die höchste Expression konnte jedoch in mit Cholesterin beladenen Makrophagen nachgewiesen werden⁵⁷. Verschiedene Studien konnten die Funktion dieses Transporters als Vermittler des zellulären Cholesterin- und Phospholipideffluxes auf Akzeptoren, wie beispielsweise Apo A-I und E bis hin zur Bildung von naszierendem HDL bzw. Prä- β -HDL, belegen⁵⁸⁻⁶⁰. Die Genexpression von ABCA1 kann unter anderem durch modifiziertes LDL⁶¹, cAMP^{62,63} oder Oxysterole⁶⁴ induziert werden. Dazu ist die Aktivierung von LXR/RXR-Heterodimeren (1.1.5) und deren Bindung an das entsprechende LXR Response Element (1.1.5) im Promotorbereich von ABCA1 erforderlich^{65,66}. Mögliche Faktoren mit inhibierender Wirkung auf ABCA1 sind noch spärlich erforscht, es konnte jedoch eine Herunterregulation des Transporters und auch eine Reduktion des über Apolipoprotein A-I vermittelten Cholesterin- und Phospholipideffluxes nach Aktivierung von peritonealen Makrophagen aus Mäusen durch Interferon γ gezeigt werden⁶⁷. Der bisher postulierte Mechanismus des zellulären Lipideffluxes sieht für ABCA1 eine Translokaseaktivität vor¹⁸. Danach kommt es, wie in Abbildung 4 gezeigt, zunächst zur passiven Akkumulation überschüssigen Cholesterins und auch von Phospholipiden im Bereich der inneren Plasmamembran, wo das Cholesterin für Apolipoproteine nicht direkt erreichbar ist. Es muss deshalb auf das äußere Blatt der Plasmamembran transloziert werden. Die beiden

vorhandenen Transmembrandomänen bilden zwei Halbzyylinder, die wiederum einen Raum aufspannen, in den der laterale innere Lipidstrom erfolgt. Aufgrund der Bindung von ATP wird nun eine Dimerisation der beiden Nukleotidbindungsdomänen und eine Konformationsänderung der Kammer bewirkt, wodurch die dort eingeschlossenen Lipide mittels einer ruckartigen Flip-Bewegung zur äußeren Membran befördert werden. Die Lipide werden nun aus dem Transmembranraum in cholesterinreiche Domänen auf der Zelloberfläche ausgestoßen. Apolipoproteine nehmen nachfolgend die Lipide unter Bildung von naszierendem HDL auf. Schließlich findet eine Dissoziation zwischen ADP und den Nukleotidbindungsdomänen statt, woraufhin die Struktur des Transmembranraums von ABCA1 wieder seine ursprüngliche Konformation annimmt und dadurch zur erneuten Aufnahme von Substraten befähigt ist ^{32,68}.

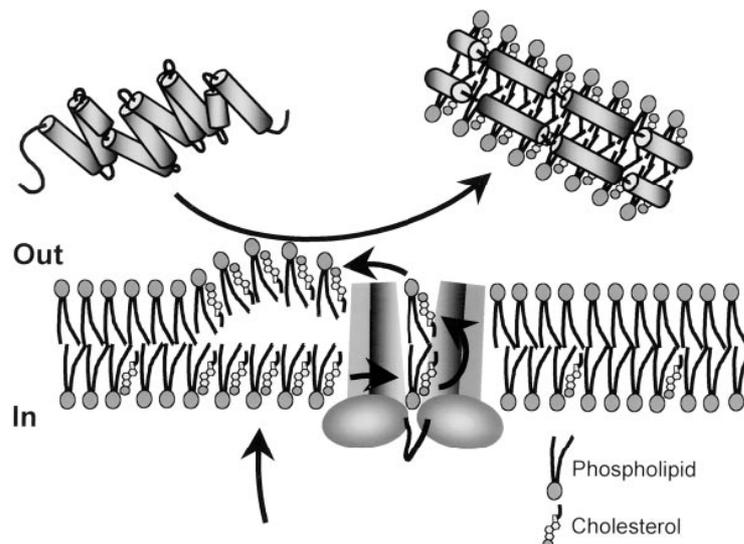


Abbildung 4: Modell für die Vermittlung des Lipidtransports über ABCA1 und Apolipoproteine (aus Oram 2003 ⁶⁸). Überschüssiges Cholesterin befindet sich innerhalb von Phospholipiddomänen der inneren Plasmamembran. Anschließend erfolgt der Transport von Cholesterin und Phospholipiden durch ABCA1 in dessen Transmembranraum. Über eine hochschnellende Bewegung werden die Lipide von dort aus in den äußeren Bereich der Plasmamembran befördert und ausgestoßen. Schließlich solubilisiert lipidarmes Apo A-I diese an der Zelloberfläche befindlichen Lipidomänen unter Bildung von diskoidalen naszierenden HDL-Partikeln.

Außer in der Plasmamembran von Zellen ist ABCA1 auch in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Dies könnte eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung des intrazellulären Cholesterintransports an die Zelloberfläche und dem Efflux aus der Zelle spielen ⁶⁹. Die wichtige Bedeutung des ABCA1-Transporters für den reversen Cholesterintransport und die Atherosklerose konnte inzwischen durch

eine Vielzahl an Modellen mit genetisch manipulierten Mäusen belegt werden. So weisen ABCA1-Knock-Out-Mäuse, ähnlich wie an Morbus Tangier erkrankte Patienten, reduzierte HDL-Konzentrationen im Plasma auf und zeigen außerdem aufgrund des verminderten zellulären Cholesterineffluxes signifikante Akkumulationen von lipidbeladenen Makrophagen in den verschiedensten Körpergeweben^{70,71}. Weitere Versuche an Mäusen lassen darauf schließen, dass für die Produktion von HDL vor allem die hepatische ABCA1-Expression eine übergeordnete Rolle spielt, während Makrophagen nur einen geringen Einfluss auf die HDL-Konzentrationen zu haben scheinen. So führt beispielsweise die systemische oder hepatische Überexpression von ABCA1 zu erhöhten HDL-Plasmaspiegeln^{72,73}, während aus einer selektiven hepatischen Defizienz von ABCA1 deutlich reduzierte HDL-Konzentrationen resultieren⁷⁴. Im Gegensatz dazu wird das HDL durch eine selektive Expression oder Inaktivierung von ABCA1 in Makrophagen nur gering oder gar nicht beeinflusst⁷⁵. Hinsichtlich der Atherosklerose scheinen die Makrophagen jedoch dennoch eine entscheidende Rolle zu spielen. Experimente an Apo E- oder LDLR-defizienten Mäusen (Apo E^{-/-} bzw. LDLR^{-/-}), deren ABCA1-Expression in Makrophagen selektiv inaktiviert wurde, zeigten eine fortschreitende atherosklerotische Entwicklung⁷⁶.

1.1.5 Nukleäre Transkriptionsfaktoren LXR (liver X receptors)

Bei den seit nunmehr über einem Jahrzehnt bekannten Liver X-Rezeptoren (LXRs) handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die der übergeordneten Familie der nukleären Hormonrezeptoren zuzuordnen sind und deren Aktivierung durch Bindung bestimmter Liganden erfolgt⁷⁷. Bisher konnten LXR α und LXR β als Isoformen der Liver X-Rezeptorfamilie identifiziert werden, wobei LXR β ubiquitär exprimiert wird, während sich die höhere Expression von LXR α vor allem auf Organe, wie Leber, Darm, Nieren, aber auch das Fettgewebe und Makrophagen, beschränkt⁷⁸. Trotz der Kodierung durch unterschiedliche Gene besteht zwischen diesen beiden Transkriptionsfaktoren ein hoher Grad an Homologie innerhalb der für die Ligandenbindung zuständigen Domänen ebenso wie bezüglich der endogenen Liganden, die zu einer Aktivierung führen. Als solche putativen Liganden gelten bislang in physiologischen Konzentrationen natürlich vorkommende oxidierte Cholesterinderivate, wie beispielsweise 22(R)-, 24(S)- und 27-Hydroxycholesterol oder 24(S)-, 25-Epoxycholesterol⁷⁹⁻⁸¹. Inzwischen wurden aber auch einige synthetische nichtsteroidale LXR-Agonisten entwickelt⁸². Liver X-Rezeptoren sind zur Bildung obligatorischer Heterodimere mit einer weiteren Art von nukleären Rezeptoren, den sogenannten Retinoid X-Rezeptoren (RXRs), befähigt^{78,83}. Auch für diese Rezeptoren existieren mehrere Isoformen (RXR α ,

RXR β , RXR γ), wobei jedoch nur RXR α und RXR β in Geweben, die mit dem enterohepatischen Kreislauf in Verbindung stehen, nachgewiesen wurden⁸⁴. Als Agonist fungiert hierbei 9-cis RA (9-cis retinoic acid)⁸⁵. Die Bindung der entsprechenden Liganden an einen der Partner bzw. Rezeptor des Heterodimers kann zwar zu einer gewissen Aktivierung der Transkription führen, jedoch wird eine maximale Aktivierung erst durch die Bindung der jeweiligen Agonisten an beide Rezeptoren erreicht⁸⁶. Wie in Abbildung 5 dargestellt, erkennen die LXR/RXR-Heterodimere im Nukleus das LXR Response Element (LXRE), eine spezifische Sequenz in der Promotorregion der Zielgene, und binden daran⁷⁸. Durch die Anwesenheit der Liganden kommt es zu einer Komplexbildung zwischen dem Heterodimer und einem Koaktivatorprotein, das eine Aktivierung der Transkription des jeweiligen Zielgens bewirkt. Ohne Liganden komplexieren die Heterodimere mit Korepressoren, die umgekehrt zu einer transkriptionellen Repression der Zielgene führen⁸⁷.

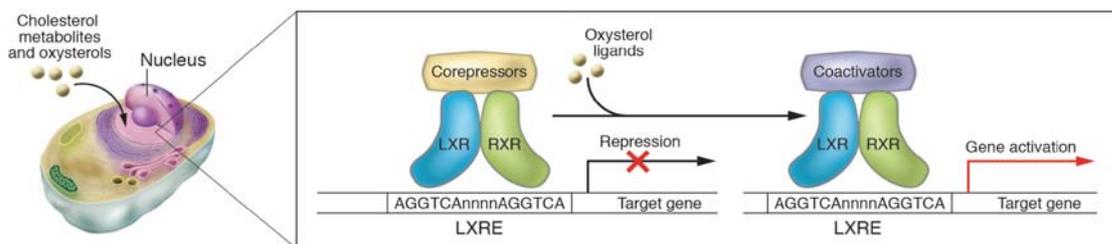


Abbildung 5: Darstellung der LXR-Rezeptoraktivierung durch Oxysterole und Induktion der Zielgenexpression (aus Zelcer and Tontonoz 2006⁸⁸). Im Nucleus binden LXR/RXR-Heterodimere an LXREs in der Promotorregion der Zielgene und befinden sich in Komplexen mit Korepressorproteinen. Nach Bindung entsprechender Liganden für LXR erfolgt die Zielgenaktivierung durch eine Komplexbildung mit Koaktivatorproteinen.

Bei bestimmten Genen (z.B. proinflammatorische Zytokine), deren Promotoren kein LXRE enthalten, führt die Aktivierung der LXR-Rezeptoren durch Liganden zu einer Inhibition der Transkription der Promotoren. Diese noch wenig verstandene Erscheinung wird auch als Transrepression bezeichnet⁸⁸. Über die Regulation der entsprechenden Gene greifen Liver X-Rezeptoren als Schlüsselregulatoren in den Lipidstoffwechsel, einschließlich des Steroltransports und der Fettsäurebiosynthese, ein⁸⁹ (Abbildung 6). Zahlreiche Ergebnisse deuten darauf hin, dass diesen Rezeptoren auch eine Funktion als Cholesterinsensoren zukommt⁹⁰. Die Studien der letzten Jahre weisen den Liver X-Rezeptoren außerdem eine zentrale Rolle im Bereich der Inflammation, der angeborenen Immunantwort⁹¹ und im Glucosestoffwechsel⁸⁹ zu. Über eine Autoregulationsschleife ist LXR α

überdies zur Induktion der eigenen Expression in der Lage, wie Versuche mit humanen Makrophagen zeigten^{92,93}.

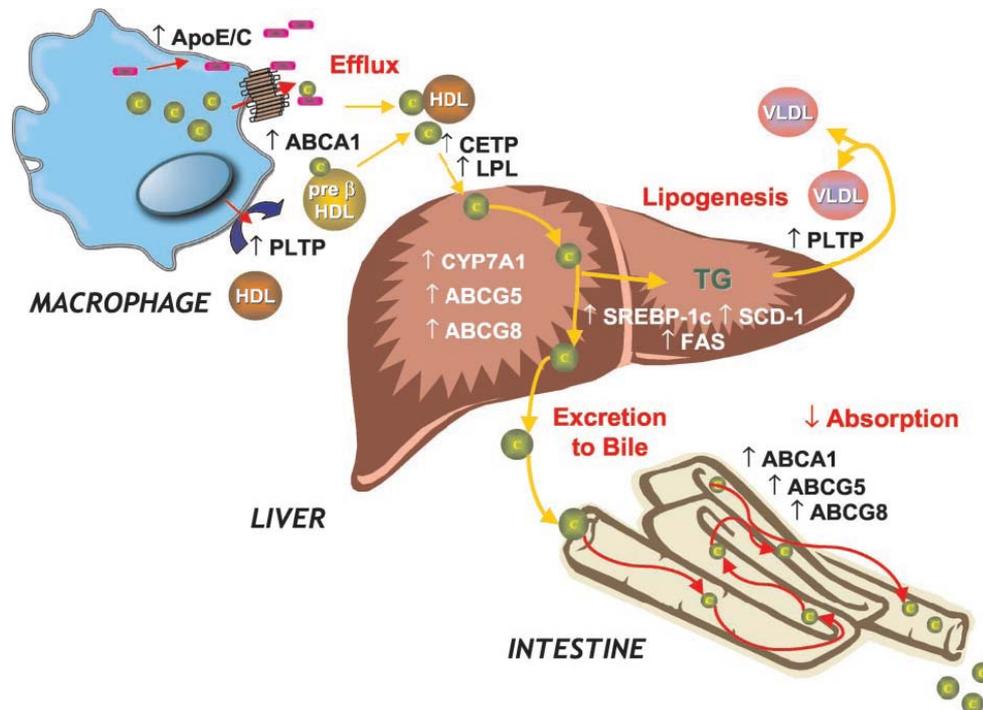


Abbildung 6: Zielgene der Liver X-Rezeptoren und ihre Funktion in der Cholesterinhomöostase und der Lipogenese (aus Tontonoz and Mangelsdorf 2003⁹⁰)

C: cholesterol, TG: triglyceride, ABC: ATP binding cassette transporter (Isoformen A1, G1, G5, G8), Apo E/C: apolipoprotein A/C, CETP: cholesterol ester transfer protein, CYP7A1: cytochrome P450 (Isoform 7A1- cholesterol 7 α -hydroxylase), FAS: fatty acid synthase, HDL: high density lipoprotein, LPL: lipoprotein lipase, PLTP: phospholipid transfer protein, SCD-1: steroyl coenzyme A desaturase, SREBP-1c: sterol regulatory element binding protein 1c, VLDL: very low density lipoprotein

Versuche an Mäusen legen die Vermutung nahe, dass von den beiden Isoformen des Liver X-Rezeptors vorwiegend das LXR α im hepatischen Lipidstoffwechsel eine zentrale Rolle spielt. Trotz funktioneller Überschneidungen existieren wahrscheinlich somit für LXR α und LXR β eine Reihe unterschiedlicher Zielgene und daraus resultierende separate Funktionen⁸⁶. Diese Annahmen basieren unter anderem auf Experimenten mit LXR α -defizienten Mäusen (LXR α ^{-/-}), die bei Fütterung mit stark cholesterinhaltiger Nahrung reaktiv zur Induktion der Gentranskription der Cholesterin-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) nicht fähig waren. Bei CYP7A1 handelt es sich um ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym, das an der Synthese von Gallensäuren beteiligt ist. Aufgrund dieses Defekts entwickelten die LXR α ^{-/-}-Mäuse eine rasche, massive Leberverfettung mit einer Funktionsstörung

der Leber und Verlust der Fähigkeit, das überschüssige Cholesterin aus der Nahrung zu Gallensäuren zu verstoffwechseln und auszuscheiden. Ferner konnte eine veränderte Regulation von weiteren wichtigen Genen des Lipidstoffwechsels beobachtet werden ⁹⁴. Mittels Kotransfektionsversuchen konnte für das LXRE von CYP7A1 außerdem eine stärkere Funktion als Response Element auf LXR α im Vergleich zu LXR β nachgewiesen werden ⁸⁰. Die Vermutung separater Funktionen der beiden LXR-Isoformen konnte auch durch weitere Studien untermauert werden: Versuche an LXR α ^{-/-}-Mäusen zeigten unter Fütterung mit cholesterinreicher Nahrung schwere phänotypische Veränderungen der Leber, während bei LXR β ^{-/-}-Mäusen keinerlei Auswirkungen beobachtet werden konnten ⁹⁵. Die Studien der vergangenen Jahre lieferten nicht nur zahlreiche Hinweise auf die Beteiligung von LXR-Rezeptoren an der Regulation des Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels in multiplen Geweben und Makrophagen, sondern stellten auch ihre mögliche Bedeutung für die Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen, wie z.B. der Hyperlipidämie oder Atherosklerose, über Signalkaskaden heraus ⁹⁰.

In Experimenten an Mäusen mit nichtsteroidalen LXR-Agonisten konnte eine wirkungsvolle Hemmung der Cholesterinresorption erreicht und der reverse Cholesterintransport aus peripheren Geweben gefördert werden. In Übereinstimmung mit diesem Effekt wurde auch die Expression von ABCA1 als wichtigem Cholesterinexporter und LXR-Zielgen in Darm und Makrophagen induziert. Über die Aktivierung des permissiven LXR/RXR-Heterodimers durch den Einsatz eines RXR-Liganden erfolgte außerdem eine Erhöhung des HDL-Plasmaspiegels ⁶⁶. Die Fähigkeit von LXR-Agonisten zur Steigerung der HDL-Konzentration im Plasma beruht vermutlich auf dem durch ABCA1 initiierten reversen Cholesterintransport ⁶⁵. Die Entfernung des Cholesterins über diesen Mechanismus könnte hinsichtlich der Reversion der Atherogenese wichtig sein, da es bei einer Hypercholesterinämie zu einer Anhäufung großer Mengen von Cholesterinestern in Monozyten der Arterienwand kommt ¹. Die Cholesterinester leiten sich hierbei vor allem von oxidiertem LDL ab, das von den Monozyten aufgenommen wird ⁷. Beim Einsatz von LXR-Agonisten musste andererseits auch eine Erhöhung der Triglycerid-Konzentration im Plasma durch die wahrscheinliche Aktivierung des für die Lipogenese relevanten SREBP-1-Proteins (sterol regulatory element-binding protein 1) durch LXR verzeichnet werden ⁹⁶. Weitere Hinweise auf die Relevanz der Liver X-Rezeptoren lieferten auch Versuche an zur Atherosklerose neigenden Apo E- und LDL-Rezeptor-defizienten (Apo E^{-/-}, LDLR^{-/-}) Mäusen, bei denen ebenfalls eine Behandlung mit LXR-Liganden durchgeführt wurde. Bei diesen Tieren konnte die Ausdehnung der atherosklerotischen Läsionen um annähernd 50 % reduziert werden ⁹⁷. Im Gegensatz dazu ergab sich bei Apo E^{-/-}

- bzw. LDLR^{-/-}-Mäusen nach der Durchführung einer Knochenmarktransplantation mit LXRαβ^{-/-}-Mäusen als Spender eine deutliche Zunahme der Läsionen im Rahmen der Atherosklerose. Die Transplantation des Knochenmarks diente bei dieser Versuchsdurchführung der spezifischen Entfernung von LXR in Makrophagen⁹⁸. Das Apolipoprotein E (Apo E) spielt eine wichtige Rolle in Verbindung mit dem Cholesterinefflux aus Makrophagen. So konnte an Mäusen mit überexprimiertem Apo E in Makrophagen eine signifikante Verminderung der Ausbildung von atherosklerotischen Läsionen festgestellt werden, während sich die Anfälligkeit für diese bei Mäusen mit fehlendem Apo E steigern ließ⁹⁹. Zusammenfassend kommt den Makrophagen aufgrund ihrer Funktion innerhalb des Lipidstoffwechsels und inflammatorischer Prozesse bezüglich der Atherogenese eine erhebliche Relevanz zu, besonders unter dem Aspekt der möglichen Beeinflussung dieser Faktoren durch LXR-Agonisten⁹¹.

In diesem Zusammenhang ist auch PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) als weiterer nukleärer Rezeptor¹⁰⁰ von Bedeutung. Auch dieser in mehreren Isoformen existierende Rezeptor (PPARα, PPARβ/δ, PPARγ) kann, wie LXR, obligate Heterodimere mit RXR bilden¹⁰¹. Als physiologische Liganden werden für PPAR Fettsäuren oder deren Derivate vermutet, da in Versuchen gezeigt werden konnte, dass eine Reihe gesättigter oder ungesättigter langkettiger Fettsäuren und lipidähnlicher Verbindungen eine PPAR-Aktivierung bewirken¹⁰². Die Aktivierung von PPARγ führt über eine Bindungsstelle für PPAR in der LXRα-Promotorregion zu einer direkten Expressionssteigerung von humanem sowie auch murinem LXRα. Aus dieser Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren resultieren additive Effekte hinsichtlich der Expression von ABCA1 und des reversen Cholesterintransports in Makrophagen¹⁰³. Auch für PPARα wurden stimulierende Wirkungen bezüglich der Expression von LXRα und dem nachfolgenden, durch die Induktion von ABCA1 bedingten, Cholesterinefflux beschrieben¹⁰⁴. Bei an Atherosklerose erkrankten Apo E^{-/-}- bzw. LDLR^{-/-}-Mäusen konnte unter der Behandlung mit RXR- oder PPARγ-Agonisten eine deutlicher Rückgang der atherosklerotischen Läsionen erreicht werden^{105,106}. Auch bezüglich der Regulation des Fettsäuremetabolismus spielen LXR- und PPAR-Rezeptoren eine entscheidende Rolle, da LXR-Rezeptoren die Expression des für die Fettsäuresynthese relevanten SREBP-1c aktivieren¹⁰⁷ und speziell PPARα die Expression von Genen fördert, die für die β-Oxidation von Fettsäuren und somit die Fettsäuredegradation zuständig sind¹⁰⁸. Neuere Ergebnisse zeigen des Weiteren eine Suppression der Promotoraktivität von SREBP-1c über LXREs in der SREBP-1c-Promotorregion durch PPAR-Rezeptoren, wobei diese Wirkung wahrscheinlich

auf eine Konkurrenz von PPAR α um RXR bei der Heterodimerbildung zurückgeführt werden kann ¹⁰⁹.

1.2 Sterole

1.2.1 Oxysterole

Außer Steroidhormonen haben sich weitere Derivate und Analoga des Cholesterins als biologisch relevant herausgestellt. Als Oxysterole wurden historisch oxidierte Derivate des Cholesterins bezeichnet, die an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt sind ¹¹⁰. Diese Derivate werden heute zur Abgrenzung von den später zu diskutierenden Oxyphytosterolen besser als Oxysterole bezeichnet. Sie beeinflussen beispielsweise inflammatorische Vorgänge im Rahmen der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen ¹¹¹ und die zelluläre Regulation der Cholesterinhomöostase ¹¹², sind aber auch wichtig für den Cholesterinexport aus dem ZNS ^{113,114}. Die wichtigste und bisher am genauesten beschriebene Rolle kommt ihnen aber in ihrer Funktion als Zwischen- oder Endprodukte der zellulären Cholesterinexkretion zu ¹¹⁵.

Oxysterole können teilweise exogen über die Nahrung aufgenommen werden oder aber endogen im Körper selbst entstehen ¹¹⁶. Exogene Quellen für Oxysterole sind cholesterinreiche Lebensmittel, wie beispielsweise Eier, Fleisch ¹¹⁷ oder Milchprodukte ¹¹⁸, in denen es während der Verarbeitung oder Lagerung (Hitze, Licht, Kühlung) zu Autoxidationsprozessen des Cholesterins kommt ¹¹⁶. Im Gegensatz zur chemischen Autoxidation können bestimmte endogene Oxysterole auch durch spezifische Enzyme gebildet werden (Abbildung 7). Quantitativ stellen 4 β -, 7 α -, 24(S)- und 27-Hydroxycholesterol die wichtigsten mittels Cholesterin-Hydroxylasen generierten Oxysterole im menschlichen Organismus dar ^{115,119}. 7 α -Hydroxycholesterol kann neben der enzymatischen Oxidation auch als Razemat bei der Autoxidation entstehen. Dagegen konnte beim autoxidativ entstehenden 7 β -Hydroxycholesterolanteil eine enzymatische Bildung bisher noch nicht definitiv geklärt werden ^{119,120}. 7 α -Hydroxycholesterol ist ein zentrales Zwischenprodukt im klassischen Stoffwechselweg der Gallensäurebiosynthese, während es sich beim 27-Hydroxycholesterol um ein Zwischenprodukt des alternativen Biosynthesewegs der Gallensäuren handelt ^{121,122}. Letzterer macht vermutlich einen Anteil von ungefähr 5-10 % der gesamten Gallensäureproduktion aus ^{123,124}.

24(S)-Hydroxycholesterol wird fast ausschließlich im zentralen Nervensystem gebildet. Erhöhte Plasmaspiegel dieses Oxycholesterols konnten bereits mit neuronalen Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Alzheimer, in Verbindung gebracht werden ¹²⁵. 25-Hydroxycholesterol ist nur in geringen Mengen im Plasma vorhanden und kann entweder über Autoxidation oder über die Cholesterol-25-Hydroxylase entstehen ¹¹⁹. Dieses Oxycholesterol inhibiert die Cholesterinbiosynthese ¹²⁶ und die LDL-Rezeptorexpression ¹²⁰. Die Herstellung von 7-Ketocholesterol ist außer über Autoxidation ebenfalls aus 7 α -Hydroxycholesterol mittels enzymatischer Dehydrogenierung möglich. 7-Ketocholesterol hat sich für Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen als toxisch erwiesen ¹²⁰. Die Bildung der isomeren 5 α ,6 α - und 5 β ,6 β -Epoxycholesterole erfolgt durch viele, inzwischen genau definierte Oxidationsmittel (inklusive der Luftoxidation), Lipoxygenasen aus Sojabohnen und mikrosomale Lipidperoxidationssysteme der Leber *in vitro* ¹²⁷. Beide Isomere wurden in humanen Geweben und Nahrungsmitteln nachgewiesen ^{115,128} und *in vitro* durchgeführte Bioassays gaben Hinweise auf deren zytotoxische Wirkung ¹¹⁵.

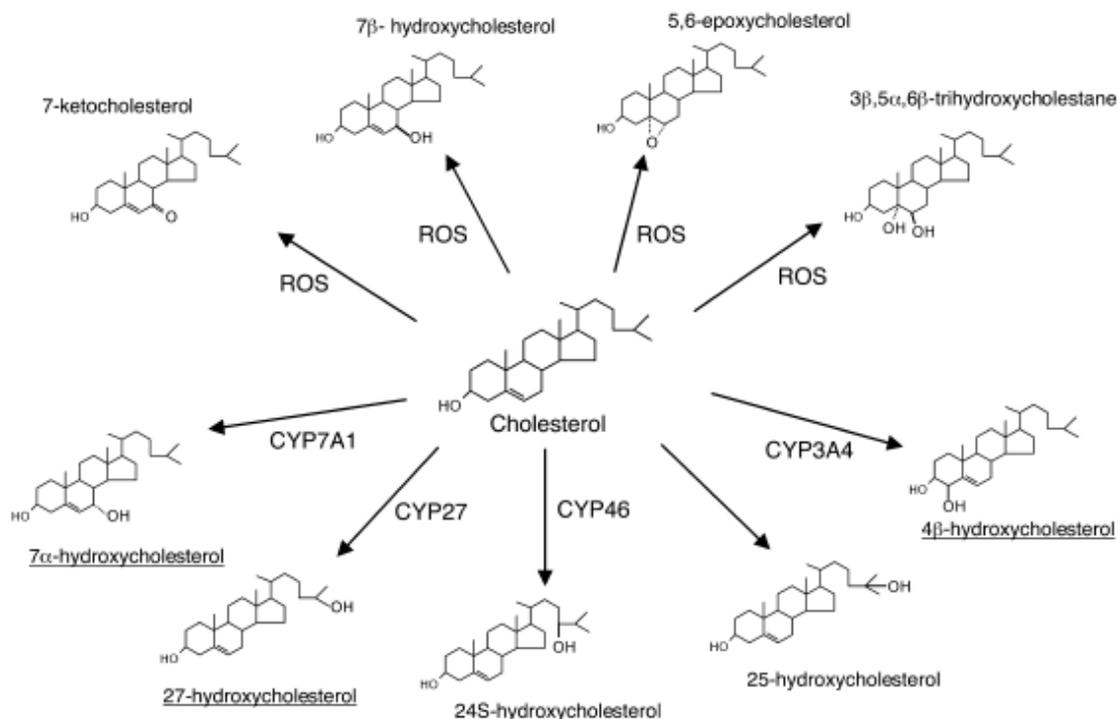


Abbildung 7: Schema der wichtigsten Oxidationsmöglichkeiten des Cholesterins (aus Bjorkhem 2002 ¹²⁹). Außer beim 25-Hydroxycholesterol, dessen Oxidation durch die Cholesterol-25-Hydroxylase, ein sogenanntes Non-heme Iron Protein (Nicht-Häm-Eisen-Protein), katalysiert wird, erfolgt die Vermittlung der übrigen Reaktionen entweder durch verschiedene Arten von Cytochrom P450 oder nichtenzymatisch in Anwesenheit von ROS (reactive oxygen species). Die quantitativ bedeutendsten Oxycholesterole im menschlichen Körper sind unterstrichen dargestellt.

Oxycholesterole im Allgemeinen, besonders jedoch diejenigen mit zusätzlichen sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen in der steroidalen Seitenkette, können leicht aus Zellen transportiert werden. Da es ihnen möglich ist, die Zellmembran im Vergleich zum Cholesterin viel schneller zu passieren, stellt die Bildung von Oxycholesterolen einen Mechanismus zur erleichterten Ausschleusung von überschüssigem Cholesterin extrahepatischen Ursprungs dar. Für diesen Vorgang sind vor allem an Position 24 oder 27 der Seitenkette oxidierte Oxycholesterole von Bedeutung. Nach ihrem Eintritt in den Blutkreislauf erfolgt die schnelle Aufnahme in die Leber und die weitere Oxidation zu Gallensäuren oder wasserlöslichen Metaboliten^{123,129}. Dieser Mechanismus kann als alternative Möglichkeit zum klassischen reversen Cholesterintransport, der über ABC-Transporter und HDL vermittelt wird, angesehen werden¹³⁰. Gleichzeitig konnte anhand einer Kristallstrukturanalyse des LXR α /RXR-Heterodimers gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer Hydroxylgruppe an Position 22, 24 oder 27 der Cholesterinseitenkette wichtig für die Bindung an LXR ist¹³¹. Demzufolge wurde vermutet, dass es sich bei natürlich vorkommenden Oxycholesterolen, wie 20(S)-, 22(R)-, 24(S), 25- und 27-Hydroxycholesterol oder 24(S)-, 25-Epoxycholesterol, um endogene LXR-Liganden handelt^{80,81,132-134}.

Andererseits werden für Oxycholesterole auch proatherogene Effekte diskutiert¹¹⁶. So stellen Oxycholesterole Bestandteile von oxidiertem LDL dar^{135,136}. Sie konnten auch *in vivo* in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden¹³⁷⁻¹³⁹. 27-Hydroxycholesterol, 7-Ketocholesterol, 7 β - und 7 α -Hydroxycholesterol stellen die in atherosklerotischen Plaques hauptsächlich enthaltenen Oxycholesterole dar^{140,141}. Für oxLDL wurde ein proatherogener Effekt durch dessen unkontrollierte Aufnahme in Makrophagen über Scavenger Rezeptoren postuliert^{10,142}. Speziell das 27-Hydroxycholesterol könnte jedoch wiederum an einem Mechanismus zur Suppression der Cholesterinakkumulation beteiligt sein, da das angeblich antiatherogene Cytochrom P27 in Atheromen sehr aktiv zu sein scheint¹²⁹.

1.2.2 Phytosterole

Unter dem Begriff der Phytosterole werden nur in Pflanzen gebildete Sterole zusammengefasst, die dort als Analoga des Cholesterins der Säugetierzellen dienen¹⁴³. Trotz großer funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten weisen Phytosterole in ihrer Struktur charakteristische Unterschiede zum Cholesterin auf. So besitzen pflanzliche Sterole entweder eine zusätzliche Methyl- oder Ethylgruppe am Kohlenstoffatom C24. Außerdem kann sich noch eine Doppelbindung in der Seitenkette befinden (Abbildung 8). Bei den Phytostanolen

handelt es sich um ring- bzw. seitenkettengesättigte Analoga der jeweiligen Phytosterole ^{144,145}.

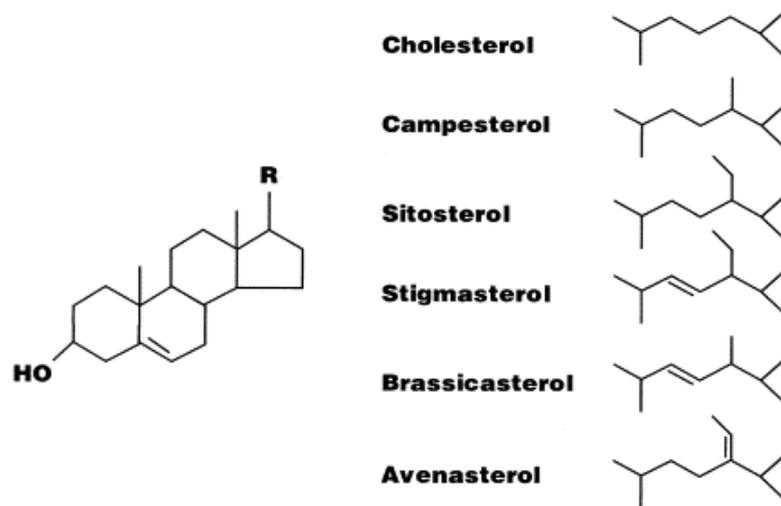


Abbildung 8: Chemische Struktur von Cholesterin und verschiedenen Phytosterolen (aus von Bergmann et al. 2005 ¹⁴⁵)

Die häufigsten in der Ernährung westlicher Länder vorkommenden Phytosterole sind β -Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol ¹⁴⁶. Bezüglich des Gesamtsterolgehalts können sie einen Anteil von weniger als 50 % einnehmen, der restliche Anteil wird von Cholesterin gebildet. Die wichtigsten Vertreter der Phytostanole stellen Sitostanol und Campestanol dar ¹⁴⁶. Phytosterole sind vor allem in Lebensmitteln, wie Gemüseölen, Getreide und Getreideölen, Nüssen, Samen oder Bohnen enthalten, während deren Gehalt in Früchten und Gemüse verhältnismäßig gering ist ^{147,148}. Bei „westeuropäischer“ Ernährungsweise beträgt die tägliche Phytosterolaufnahme ungefähr 100-300 mg. Davon werden jedoch nur in etwa 0,4-3,5 % im Darm absorbiert. Die tägliche Phytostanolaufnahme von 20-50 mg mit einer Absorptionsrate von 0,02-0,3 % fällt vergleichsweise noch niedriger aus ^{149,150}. Im Gegensatz dazu schwankt die intestinale Absorptionsrate von Cholesterin individuell zwischen 29–80 % bei durchschnittlich ca. 56 % ¹⁵¹.

Bezüglich der Absorptionshöhe und -rate von Phytosterolen oder -stanolen wurde eine Abhängigkeit zwischen diesen Größen und der Seitenkettenlänge postuliert, da mit steigender Anzahl der Kohlestoffatome an Position C24 der Seitenkette, die Absorption aufgrund zunehmender Hydrophobizität vermindert wird ¹⁵². Als weiterer einflussnehmender Faktor wurde auch die Doppelbindung im Sterolring vermutet, deren Sättigung durch Hydrogenisation in einer verringerten Absorption resultiert ¹⁵³. Außerdem bestand die Annahme, dass eine inadäquate Veresterung ein Grund für die geringe Absorption im Intestinaltrakt sein könnte ¹⁵⁴.

Bereits in den 50er Jahren wurde der cholesterinsenkende Effekt von Phytosterolen erkannt. 1951 wurde eine Reduktion des Serumcholesterins bei Hühnern durch β -Sitosterol gezeigt¹⁵⁵. Beim Menschen wurde diese Wirkung erstmals 1953 beschrieben¹⁵⁶ und seitdem vielfach bestätigt¹⁵⁷⁻¹⁶¹. Zum molekularen Verständnis der intestinalen Sterolabsorption trugen einige kürzlich neu identifizierte Steroltransporter wesentlich bei (Abbildung 9). So führte die Suche der Zielstruktur von Ezetimib, einem selektiven Inhibitor der Sterolabsorption, zur Identifizierung des Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1)-Proteins. Dieses enterozytäre Protein scheint sowohl für die Aufnahme von Cholesterin als auch von Phytosterolen aus dem Darmlumen essentiell zu sein^{162,163}. Durch zwei heterodimere Halbtransporter aus der Familie der ABC-Transporter, nämlich ABCG5 und ABCG8, deren Induktion über eine LXR-Aktivierung erfolgt¹⁶⁴, wird der Rücktransport eines Großteils der Phytosterole und auch von Cholesterin aus der Zelle ins Darmlumen vermittelt^{165,166}. Dies verhindert eine zelluläre Akkumulation der Sterole^{82,167}. Mutationen dieser beiden Steroltransporter verursachen die sogenannte Sitosterolämie, eine autosomal rezessive Erkrankung, die durch eine Erhöhung des Phytosterolspiegels bzw. -gehalts in Plasma und Gewebe um den Faktor 30 bis 200 gekennzeichnet ist^{168,169}. Der enterozytär verbleibende Sterolanteil wird über die Acyl-Coenzym A-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) verestert, anschließend in Chylomikronen verpackt und über Exozytose aus der Zelle in den Kreislauf gebracht¹⁶⁶. Nachfolgend findet die Konversion dieser Lipoproteine in Chylomikronremnants mittels der Lipoproteinlipase (LPL) statt, die von der Leber aufgenommen und zur Bildung von Very Low Density Lipoprotein (VLDL) verwendet werden. Aus VLDL entsteht nun über das Intermediate Density Lipoprotein (IDL) LDL, das durch LDL-Rezeptoren aus dem Kreislauf beseitigt werden kann^{168,170}.

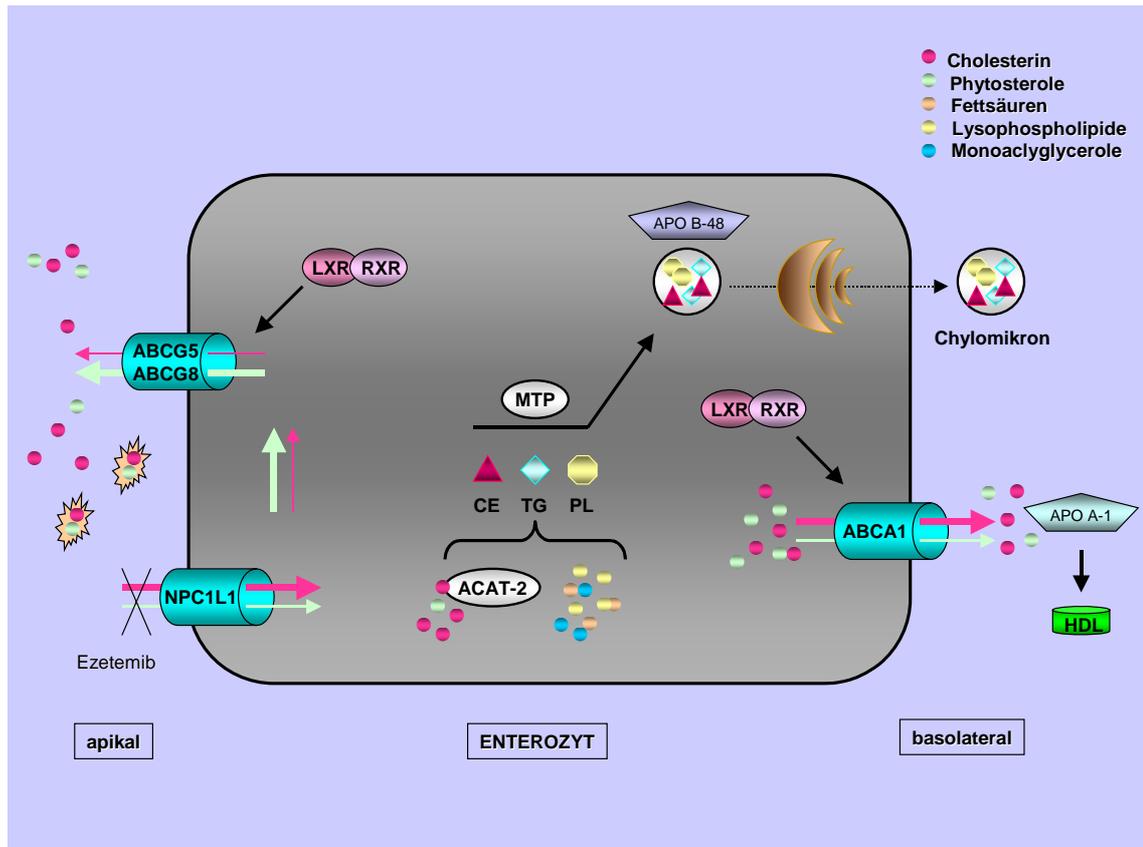


Abbildung 9: Darstellung des intestinalen Steroltransports (modifiziert nach Levy et al. 2007¹⁷¹ und Sudhop et al. 2005¹⁶⁶). Gallensalze, freies Cholesterin, Phytosterole, Monoacylglycerole, Lysophospholipide und Fettsäuren bilden gemischte Mizellen und passieren die apikale Bürstensaummembran im jejunalen Lumen. Den wichtigsten Transporter für die Beförderung von Cholesterin und Phytosterolen in die Zelle stellt hierbei das NPC1L1-Protein dar. Über das ABCG5/G8-Heterodimer erfolgt der Rücktransport von überschüssigen Sterolen. Ebenso fördert ABCA1 an der basolateralen Membran den Cholesterin- und Phytosterolefflux zum plasmatischen Apo A-I, das die Formation von naszierendem HDL steigert. Der enterozytär verbleibende Sterolanteil wird mittels ACAT-2 verestert und bildet mit neu synthetisierten Triglyceriden, Phospholipiden und Apo B-48 unter Vermittlung von MTP Chylomikronen. Diese Lipoproteinpartikel werden in speziellen Vesikeln vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat befördert und verlassen nach einer Fusion von Golgi-Vesikeln und basolateraler Membran die Zelle durch Exozytose.

ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1; ABCG5/8: ATP-binding cassette transporter G5/G8; ACAT-2: acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2; Apo A-I: apolipoprotein A-I; Apo B-48: apolipoprotein B-48; CE: cholesterylester; HDL: high density lipoprotein; LXR: liver X receptor; MTP: microsomal triglyceride transfer protein; NPC1L1 protein: Niemann-Pick C1 Like 1 protein; PL: phospholipide; RXR: retinoid X receptor; TG: triglycerides

Phytosterole können ebenso wie Cholesterin über die Galle ausgeschieden werden, wobei die fraktionelle biliäre Eliminationsrate bei Phytosterolen sogar höher zu sein scheint^{14,165,172}. Nach neueren Erkenntnissen erfolgt im Gegensatz zum Cholesterin allerdings keine nennenswerte hepatische Metabolisierung von

Phytosterolen zu analogen Gallensäuren¹⁷³, wie aufgrund entsprechender Studien zunächst vermutet¹⁷⁴. Für enterozytäres unverestertes Cholesterin und Phytosterole besteht außerdem die Möglichkeit zur systemischen Absorption über den basolateral sitzenden LXR-abhängigen ABCA1-Transporter (1.1.4)^{66,175}. Es gibt Hinweise darauf, dass Phytosterole direkt oder indirekt die Expression von ABCA1 induzieren könnten¹⁷⁶.

Der cholesterinsenkende Effekt von Phytosterolen wurde lange alleinig durch eine Verdrängung von Cholesterin aus der mizellaren Bindung aufgrund einer höheren Affinität erklärt¹⁷⁷. Phytosterole scheinen die Cholesterinlöslichkeit in der Ölphase und mizellaren Phase zu verringern, wodurch es nachfolgend zu einer Verdrängung des Cholesterins aus den Mizellen und Interferenzen mit dessen Absorption kommt¹⁷⁸. In den 80er Jahren fand die Möglichkeit der Zugabe von Phytosterolen und -stanolen zu Nahrungsmitteln neues Interesse. Margarine ist dafür besonders gut geeignet, da für die Solubilisierung von Sterolen Fette notwendig sind. Eine Veresterung der Phytosterole bzw. -stanole mit langkettigen Fettsäuren erhöht ihre Fettlöslichkeit und erleichtert die Inkorporation in die entsprechenden Lebensmittel¹⁷⁹. Die tägliche Aufnahme von 2-2,5 g Phytosterol-/Phytostanolestern in angereicherten Lebensmitteln, sogenannten Functional Foods, bewirkte eine Reduktion des LDL-Spiegels im Plasma um etwa 10-14 % ohne nennenswerte erkennbare Nebenwirkungen¹⁸⁰. Bei der Aufnahme von 2,5 g Phytosterol- oder Phytostanolestern entsprechend einer Menge von 1,5 g freier pflanzlicher Sterole pro Tag konnte die Cholesterinabsorption um ca. 13-17 % gesenkt werden¹⁸¹. Noch höhere Aufnahmemengen scheinen dabei keinen größeren Effekt auf den LDL-Spiegel¹⁸² oder die Cholesterinabsorption^{159,183} zu haben.

Eine potentielle und mit dem Cholesterin vergleichbare Atherogenität pflanzlicher Sterole kann zwar nicht a priori ausgeschlossen werden¹⁸⁴, verschiedene Studien an transgenen Tiermodellen zeigten jedoch eine Abnahme atherosklerotischer Plaques unter Fütterung mit pflanzlichen Sterolen bzw. Stanolen¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Metaanalytische Berechnungen prognostizieren eine längerfristige Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen bei phytosterolhaltiger Ernährung um bis zu 20 %¹⁸⁸.

1.2.3 Oxyphytosterole

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Cholesterin könnten Phytosterole zu analogen Produkten, den Oxyphytosterolen, metabolisiert werden. Ihre Terminologie entspricht den Oxycholesterolen (1.2.1)¹⁸⁹ (Abbildung 10).

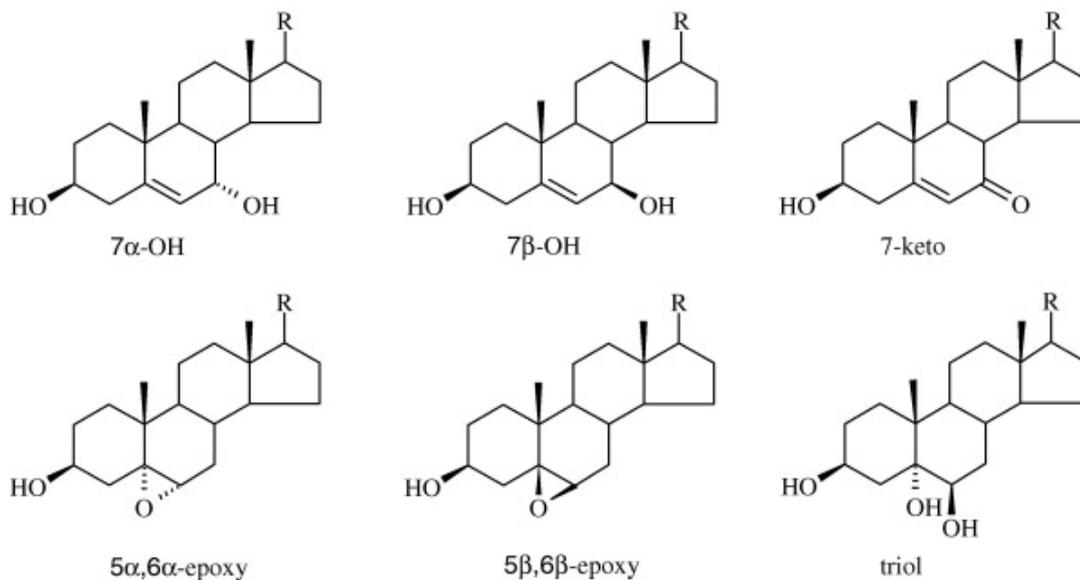


Abbildung 10: Chemische Struktur der häufigsten Oxyphytosterole (aus Hovenkamp et al. 2008¹⁹⁰). Die Alkylseitenkette (R) des jeweiligen Oxyphytosterols kann Abbildung 8 entnommen werden.

Während die Oxycholesterole inzwischen gut erforscht sind, existieren über Oxyphytosterole jedoch nur vergleichsweise wenige Daten. Es wird vermutet, dass Oxyphytosterole, ähnlich wie Oxycholesterole, durch Autoxidation, aber eventuell auch enzymatisch entstehen¹⁹⁰. Bisher wurden geringe Mengen an Oxyphytosterolen in bestimmten Lebensmitteln, wie z.B. Kaffee, Bratkartoffeln, Weizenmehl oder Gemüseölen nachgewiesen¹⁸⁹. Der Oxyphytosterolgehalt in Lebensmitteln variiert abhängig von den jeweiligen Verarbeitungs- und Lagerungsbedingungen, wie beispielsweise Temperatur und Nahrungsmittelmatrix¹⁹¹. Eine weitere Quelle für Oxyphytosterole könnten besonders mit Phytosterolen angereicherte Lebensmittel (functional foods) darstellen. In entsprechenden handelsüblichen Brotaufstrichen wurden maximal 0,1 % Oxyphytosterole gefunden¹⁹². Zusätzlich wäre auch eine Herkunft dieser Verbindungen durch von der Haut absorbierte phytosterolhaltige Kosmetikprodukte und deren anschließende Oxidation im UV-Licht denkbar¹⁹³.

Man nimmt an, dass Oxyphytosterole ebenso wie Oxycholesterole¹⁹⁴ aus dem intestinalen Lumen absorbiert werden können¹⁹⁰. Die Fähigkeit einiger dieser Verbindungen, die intestinale Barriere zu überwinden, konnte an Ratten bereits gezeigt werden¹⁹⁵. Oxyphytosterole scheinen dabei sogar noch besser absorbiert zu werden als native Phytosterole¹⁹⁶. Experimente an Hamstern demonstrierten ferner nach oraler Gabe eine dosisabhängige Aufnahme von Oxyphytosterolen in verschiedene Gewebe¹⁹⁷. Bei der Interpretation der Resultate von Experimenten,

die zur Untersuchung der Oxyphytosterolabsorption an Tiermodellen erfolgten, sollte dennoch berücksichtigt werden, dass dabei bislang keine isolierten Messungen der Absorption durchgeführt wurden und die Ergebnisse somit sowohl durch Absorption als auch durch Reexkretionsraten beeinflusst sein können ¹⁹⁰.

In humanen Geweben fanden sich nur bei Patienten mit einer Phytosterolämieerkrankung (Sitosterolämie) deutlich erhöhte Oxyphytosterolspiegel im Serum ¹⁸⁹. Ferner gelang der Nachweis erhöhter Oxyphytosterole im Serum von an Morbus Waldenström erkrankten Patienten. Später wurden auch Oxyphytosterole im Serum gesunder Probanden identifiziert ¹⁹⁸.

Im Gegensatz zum Cholesterin (1.2.1) fehlen zur Oxidation von Oxycholesterolen immer noch detaillierte Daten. Es wird vermutet, dass sich die Oxidationsmechanismen von Cholesterin und Phytosterolen nur geringfügig voneinander unterscheiden und folglich wahrscheinlich beide über reaktive Sauerstoffspezies, freie Radikale, physikalische Einwirkungen und wohl auch durch verschiedene Cytochrome P450 entstehen könnten.

Die Exkretion der meisten Oxyphytosterole erfolgt, wie bei nichtoxidierten Phytosterolen, wahrscheinlich über die Galle, wobei die Exkretionsrate unter den verschiedenen Verbindungen differieren könnte. Es wäre auch möglich, dass die Sekretion von Oxyphytosterolen durch ABCG5/G8-Transporter zur Elimination aus Zellen führen könnte ¹⁹⁰.

In Bezug auf potentielle biologische Effekte von Oxyphytosterolen existieren zahlreiche Hypothesen. So wird z.B. eine mögliche Wirkung einiger dieser Verbindungen auf die Modulation des Cholesterinmetabolismus über die Aktivierung von LXR diskutiert ¹⁴³. Des Weiteren bestehen Spekulationen über lipidsenkende und antidiabetische Eigenschaften ¹⁹⁹⁻²⁰¹ ebenso wie über die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen und des Immunsystems ²⁰². Auch wird eine Interferenz von Oxyphytosterolen mit Steroidhormonrezeptoren ²⁰³ oder der Kapazität von Cytochrom P450 ²⁰⁴ in Betracht gezogen.

Bei Oxycholesterolen ist eine toxische Wirkung auf Zellen bereits erwiesen ²⁰⁵. Oxyphytosterole in höheren Konzentrationen sind ebenfalls toxisch. Es wurde gezeigt, dass Oxyphytosterole und Oxycholesterole vergleichbare Toxizitätsmuster aufweisen ²⁰⁶. Zudem wird eine proatherogene Wirkung der Oxycholesterole vermutet ²⁰⁷, die möglicherweise auch auf Oxyphytosterole zutreffen könnte ¹⁸⁹. Diese Annahme wurde durch eine erste Studie am Tiermodell jedoch nicht bekräftigt ¹⁹⁶.

1.2.4 Chemische Oxyphytosterole

Zahlreiche Studien der letzten Jahre zeigten die Effektivität von Phytosterolen und -stanolen im Hinblick auf die positive Beeinflussung des LDL-Spiegels im Plasma. Diese Ergebnisse führten zu einer vermehrten Verfügbarkeit von mit Phytosterolen angereicherten Lebensmitteln. Der Konsum solcher Nahrungsmittel hat einen Anstieg von Phytosterolen im humanen Körperkreislauf zur Folge und könnte dadurch potentiell auch eine Erhöhung systemischer Oxyphytosterolkonzentrationen aufgrund einer gesteigerten Aufnahme über die Nahrung oder durch endogene Bildung aus nichtoxidierten Phytosterolen bewirken^{190,198}. Da die Anwesenheit von Oxyphytosterolen in der Zirkulation die Gesundheit beeinflussen könnte¹⁸⁹, ist die Herstellung synthetischer Oxyphytosterole zur Erforschung potentieller positiver oder negativer Effekte von großer Bedeutung.

Die Bemühungen der letzten Jahrzehnte, solche Verbindungen *in vitro* darzustellen, erbrachten verschiedene oxidierte Phytosterolderivate, deren Oxidation entweder am Sterangerüst und/oder an der Seitenkette erfolgte^{143,208-213}.

In der vorliegenden Arbeit wurden chemisch oxidierte Derivate von Stigmasterol als Ausgangsphytosterol hergestellt. Die jeweiligen Benennungen, chemischen Strukturen, Gaschromatogramme und Massenspektren der Oxystigmasterole können Kapitel 4.4.1 und dem Anhang entnommen werden.

2 Fragestellungen

Der nukleäre Transkriptionsfaktor LXR α reguliert eine Reihe wichtiger Schlüsselrezeptoren der systemischen und lokalen Cholesterinhomöostase in Entero- und Hepatozyten, aber auch Makrophagen der Gefäßwand, die hinsichtlich der Atherogenese besonders relevant sind. Als aktivierende LXR α -Liganden wurden mehrere Oxymetaboliten von Cholesterin erkannt. Phytosterole haben eine systemische lipidsenkende Wirkung, als deren Mechanismus bisher meist nur eine mizellare Verdrängung von Cholesterin vermutet wurde. Inzwischen wird jedoch auch ein potentieller Mechanismus über eine LXR α -Aktivierung durch native Phytosterole oder ihre analogen Oxymetaboliten in Erwägung gezogen. Diese könnten so die Expression von Sterolexportern, wie ABCA1, regulieren.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Wirkung nativer Phytosterole, vor allem aber oxidierter Phytosterolderivate auf LXR α und ABCA1, den Initiator des reversen Cholesterintransports, in Enterozyten zu untersuchen. Als Ausgangsphytosterol für potentiell biologisch relevante Oxyphytosterole wurde Stigmasterol ausgewählt, da die Doppelbindung in seiner Seitenkette eine Prädilektionsstelle für chemische Oxidation darstellen könnte.

Als Enterozytenmodell wurde die humane differenzierte Karzinomzelllinie CaCo-2 verwendet. Die Effekte einer Inkubation von Enterozyten mit nativen Phytosterolen und verschiedenen Oxystigmasterolen auf LXR α und seinem Zielgen ABCA1 sollte auf Transkriptions-, Aktivierungs- und Translationsebene überprüft werden.

Insbesondere wurden folgende Fragestellungen analysiert:

1. Stimulieren natives Stigmasterol und Oxystigmasterole wie Seitenkettenhydroxycholesterole die Transkription vom Sterolexporter ABCA1?
2. Wird dies über eine LXR α -agonistische Wirkung vermittelt?
3. Lässt sich eine Beziehung zwischen Struktur und Wirkung von nativem Stigmasterol sowie der eingesetzten Oxystigmasterole erkennen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Sigma, Deisendorf
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Bovine	Sigma, Deisendorf
APS	Bio-Rad, München
Antikörper:	
- ABCA1	Novus Biologicals (USA)
- β -Aktin	Sigma, Steinheim
- Anti-mouse HRP	Amersham Bio-Sciences, Uppsala (S)
- Anti-rabbit HRP	Cell Signaling, Frankfurt
Biorad External Well Factor Solution	Bio-Rad, München
Blei(IV)-oxid	Aldrich, Steinheim
Borsäure	Sigma, Deisendorf
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Cholesterolstandards:	
- 7α -Hydroxycholesterol	Sigma, Deisenhofen
- 7β -Hydroxycholesterol	Sigma, Deisenhofen
- $5\alpha,6\alpha$ -Epoxycholesterol	Sigma, Deisenhofen
- $5\beta,6\beta$ -Epoxycholesterol	Sigma, Deisenhofen
- 7-Ketocholesterol	Sigma, Deisenhofen
- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -Trihydroxycholesterol	Sigma, Deisenhofen
- 7-Dehydrocholesterol	Sigma, Deisenhofen
DEPC	Sigma, Deisendorf
Desmosterol	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisendorf
DMEM Medium	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
DNA-Standards	Boehringer, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisendorf
Endofree Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid	Sigma, Deisendorf
FCS	Sigma, Deisendorf
Glycerol	Sigma, Deisendorf
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES Buffer (1 M)	Sigma, Deisendorf
22(R)-, 24(S)-, 25-Hydroxycholesterol	Sigma, Deisendorf
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala (S)
LB-Medium	Sigma, Deisendorf
Luciferase Assaysystem	Promega, Mannheim
MA Lipofection Enhancer	IBA, Göttingen
Magermilchpulver	Reformhaus
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisendorf
MEM-Non-essential Amino Acid Solution (100 x)	Sigma, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisendorf
Metafectene Pro	Biontex, München
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala (S)
NucleoBond Kit	Macherey-Nagel, Düren
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried
Organische Lösungsmittel	Merck, Darmstadt
PBS ^{+/-} Mg ²⁺ /Ca ²⁺	PAN Biotech, Aidenbach
Penicillin	Sigma, Deisendorf
Ponceau S	Sigma, Steinheim
2-Propanol p.A.	Merck, Darmstadt
Proteaseinhibitoren	Roche, Penzberg
Proteinstandards	Bio-Rad, München
Pyridin	Fluka, Neu-Ulm
Random Hexamerprimer (pd(N) ₆)	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala (S)
Ready-To-Go PCR Beads	GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala (S)
Reagenzien zur Oxyphytosterolherstellung	Sigma, Deisenhofen
Restriktionsenzyme:	
- Ava AI	New England Biolabs, Frankfurt
- Bam HI	New England Biolabs, Frankfurt
- Cla I	New England Biolabs, Frankfurt
9-cis Retinoic Acid	Sigma, Deisendorf
Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt
SDS	Bio-Rad, München

Sitosterol	Sigma, Deisenhofen
Stigmasterol	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma, Deisendorf
Stripping-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Pico Substrate	Pierce, Rockford (USA)
SYBR Green I (10 000 x)	Invitrogen, Eugene (USA)
TEMED	Bio-Rad, München
THAM	Sigma, Deisendorf
Triton-X-100	Sigma, Deisendorf
Trypsin-EDTA Solution (1 x)	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Deisendorf

3.1.2 Lösungen und Puffer

➤ DEPC-Wasser

2 ml DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat) auf 1 L bidestilliertes Wasser (H_2O_{dd}) geben, gut schütteln, anschließend nach ca. 2-stündiger Inkubation zur Zerstörung des DEPCs autoklavieren.

➤ TBE-Puffer

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

➤ 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}

➤ Sammelgele (3 %)

3,25 ml H_2O_{dd} ; 1,25 ml Upper Tris Puffer; 500 μ l Acrylamid; 30 μ l APS (10 %); 5 μ l TEMED

➤ Laufgele (7,5 %)

4,93 ml H_2O_{dd} ; 2,5 ml Lower Tris-Puffer; 2,5 ml Acrylamid; 62,5 μ l APS (10 %); 3,75 μ l TEMED

Für die SDS-PAGE wurde das Minigelsystem der Firma Bio-Rad verwendet. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf zwei kleine Gele.

➤ Lower Tris-Puffer (4-fach)

90,9 g THAM (Tris base); 10 ml 20 % SDS ad 10 ml H_2O_{dd}
pH 8,8

➤ **Upper Tris-Puffer (4-fach)**

6,06 g THAM (Tris base); 2 ml 20 % SDS ad 100 ml H₂O_{dd}
pH 6,8

➤ **Laufpuffer**

10-fach: 60 g THAM (Tris base); 288 g Glycin; 100 ml 20 % SDS ad 2 l H₂O_{dd}
80 ml Laufpuffer (10-fach) ad 800 ml H₂O_{dd}

➤ **Transferpuffer**

3,03 g Tris; 14,4 g Glycin ad 800 ml H₂O_{dd}; 200 ml Methanol (kühl stellen)

➤ **TBS/Tween-Puffer**

10 ml 1 M Tris (pH 10,88) ; 33 ml 5 M NaCl ad 1000 ml H₂O_{dd}; 0,1 % Tween

➤ **Blockierungspuffer**

5 % Milchpulver, 100 ml TBS/Tween

➤ **Probenpuffer**

55 mM Tris/HCl (pH 6,8); 4 % SDS; 40 % Glycerin; 4,3 % β-Mercaptoethanol; 0,2 % Bromphenolblau

3.1.3 Verwendete Oligonukleotidprimer

Tabelle 2: Primersequenzen

PRIMER	SEQUENZ	REFERENZEN
β-Aktin	Forward: 5'-CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG-C-3' Reverse: 5'-CAG AGG CGT ACA GGG ATA GC-3'	Krump-Konvalinkova et al. 2005 ²¹⁴
ABCA1	Forward: 5'-TGA CAA GTC TGT GCA ATG GAT CAA-3' Reverse: 5'-GAT ACG AGA CAC AGC CTG GTA GAT-3'	Plat and Mensink 2002 ¹⁷⁶
LXRα	Forward: 5'-AGA GGA GGA ACA GGC TCA TGC-3' Reverse: 5'-AAA GGA GCG CCG GTT ACA CT-3'	Fu et al. 2001 ⁸¹

3.1.4 Geräte

Alugram Sil G (0,2 mm, 20 x 20 cm)	Macherey-Nagel, Düren
Autoklav	Systemec GmbH, Wetterndorf
GC – Varian 3400	Varian, Palo Alto (USA)
Gelelektrophoresen:	
Gelkammer Sub Cell	Bio-Rad, München
Stromversorgung	Amersham Biotech, Uppsala (S)
Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Amersham Biotech, Cambridge (UK)
iCycler	Bio-Rad, München
Injektionssystem CIS3	Gerstel, Mühlheim
Kapillarsäule DB5MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke)	Macherey-Nagel
6-, 12-, 24-, 48- und 96-Lochrundplatten	Sarstedt, Nürnberg
Magnetplatte	IBA, Göttingen
Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
MS - Finnigan MAT 700	Finnigan MAT, Bremen
PCR-Tubes (0,2 ml; Ultra Thin Wall Tubes)	Bioplastics, Landgraf
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostics, Oldendorf
pH-Meter 765 Calimatic SE 103	Knick, Berlin
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	Bio-Rad, München
Reinstwasser (H ₂ O _{dd}) Anlage	Milli Pore, Eschborn
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank GELAIRE BSB 4 A	Flow Laboratories, Michigan (USA)
Sterilfilter (0,2 µM)	Sartorius, Nürnberg
Stickstoffbehälter	L`air liquide, Champigny (F)
Strata SI-1 Silica (50 µm, 70 Å, 1000 mg)	Phenomenex, Aschaffenburg
T75 und T25 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
TECAN Reader	GENios
Vortexer Heidolph Reax 2000	Heidolph
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, München
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

Zentrifugen:

Hereaus Multifuge 3-C R	Kendro, Osterode
Jonan MR 1822	Jonan GmbH, Unterhaching
Mikro 200	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Neo Lab 16/18	Hermle Labortechnik, Wehingen

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von CaCo-2-Zellen

Die humane Karzinomzelllinie CaCo-2 wurde aus einem primären Adenokarzinom des Kolons kultiviert, das man 1974 einem 72-jährigen kaukasischen Patienten entnommen hatte. Diese adhärenenten Epithelialzellen differenzieren vollständig zu polarisierten Enterozytenmonolayern aus. Sie weisen hierbei eine sehr große morphologische Ähnlichkeit zu Dünndarmenterozyten mit charakteristischen Strukturen, wie beispielsweise Bürstensaummikrovilli an der apikalen Membran, auf. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen apikalem und basolateralem Membranbereich. CaCo-2-Zellen sind in der Lage, verschiedene Transporter, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und einige wichtige Enzyme des Medikamentenmetabolismus zu exprimieren. Dabei erfolgt auch die Expression von Lipidtransportern und Enzymmustern spezifisch an den jeweiligen Membranarealen ²¹⁵.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 wurde von der Firma ATCC (UK) geliefert.

Für die Kultivierung der CaCo-2-Zellen wurde eine Anreicherung in T75 Zellkulturflaschen durchgeführt. Die Temperatur für die Inkubation der Zellen im Brutschrank betrug 37°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und 5 % CO₂. Das Zellkulturmedium (DMEM-Medium; 10 % FCS; 1 % Penicillin/Streptomycin; 1 % MEM) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach 5-7 Tagen erreichten die Zellen in Abhängigkeit der Dichte der Aussaat eine Konfluenz von 80 % und wurden passagiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS/- gewaschen und mit vorgewärmten Trypsin-EDTA inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde der Beginn der Zellablösung überprüft, anschließend erfolgte die vollständige Ablösung der Zellen von der Flaschenwand durch leichtes Klopfen und die Suspension in frischem Medium. Nach Einstellung der Zelldichte auf 2×10^5 Zellen/ml wurden die CaCo-2-Zellen in die entsprechenden Lochrundplatten ausgesät bzw. die Kultivierung in den Zellkulturflaschen fortgesetzt.

3.2.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Zur Konservierung durch Einfrieren wurden adhärente CaCo-2-Zellen mit PBS/-gewaschen, trypsiniert, abzentrifugiert und anschließend 4×10^6 Zellen in 1,5 ml Einfriermedium (80 % Kulturmedium; 10 % FCS; 10 % DMSO) aufgenommen. Zum schonenden Einfrieren wurden die Zellen über Nacht bei -80°C in einer Styroporbox aufbewahrt und am nächsten Tag in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt. Diese Methode ermöglicht es, eukaryotische Zellen über einen langen Zeitraum zu lagern.

Die Rekultivierung wurde durch kurzes Antauen im Wasserbad bei 37°C und möglichst schnelles Überführen in Vollmedium durchgeführt, da DMSO auf die Zellen etwas toxisch wirkt. Nachdem die Zellen abzentrifugiert und in frischem Vollmedium aufgenommen wurden, erfolgte eine Verteilung auf die Zellkulturflaschen. Zur Entfernung abgestorbener CaCo-2-Zellen wurde nach 24 h das Kulturmedium nochmals gewechselt.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Anzucht von *E.coli*-Bakterien

Die Bakterien wurden unter aeroben Bedingungen bei 37°C und unter Schütteln bei ca. 160 upm kultiviert. Dafür erfolgte die Befüllung von Erlenmeyer-Kolben mit einem Zehntel ihres Nennvolumens. Bei kleineren Volumina (3-5 ml) wurde die Anzucht in 15 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

3.3.2 Lagerung von *E.coli*-Bakterien

Um Gefrierkulturen von *E.coli* herzustellen, wurden 1500 µl einer frischen, in LB-Medium kultivierten Übernachtskultur unter Zugabe von 500 µl Glycerol bei -80°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurden kleinere Mengen von Bakterien mittels einer sterilen Pipettenspitze in 4 ml LB-Medium übertragen bei 37°C angezüchtet.

3.3.3 Herstellung kompetenter *E.coli*-Bakterien

Die Anwendung dieser Methode dient dem Ziel, die Bakterienzelle kompetent für die Transformation durch Hitzeschock (3.4.3) zu machen. Dafür erfolgte die Anzucht von *E.coli* unter aeroben Bedingungen in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,6. Nachfolgend wurden die gewonnenen Zellen mehrere Male mit eiskaltem Glycerol (10 %) unter kontinuierlicher Reduktion des Volumens

gewaschen. Schließlich wurde die Resuspension der Keime mit 50 µl Glycerol (10 %) durchgeführt und die hergestellten Aliquots in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Lagerung fand bei -80°C statt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Agarosegelelektrophorese

Diese Methode dient der Größentrennung von DNA-Fragmenten und deren Längenabschätzung durch Vergleich mit Nukleinsäuresträngen bekannter Größe. Abhängig von der Fragmentgröße wurden in der vorliegenden Arbeit Agarosekonzentrationen von 0,8-1,5 % verwendet. Zur Herstellung der Agarosegele wurde die Agarose zunächst in TBE-Puffer (3.1.2) durch Erhitzen gelöst, nach einer Abkühlung auf ca. 55°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel erhärtet war, erfolgte die Zugabe des TBE-Puffers in die Kammer. Anschließend wurde den Proben ein Fünftel ihres Volumens an DNA-Probenpuffer (3.1.2) zugegeben und diese in die Geltaschen aufgetragen. Parallel wurde zur Größenbestimmung ein DNA-Molekulargewichtsmarker verwendet. Zuletzt wurde eine Gelelektrophorese zur Auftrennung bei 100 V für ca. 45 min durchgeführt.

3.4.2 Restriktionsanalysen

Die Überprüfung der Richtigkeit des eingesetzten Konstrukts erfolgte durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen und Gelelektrophoresen der aus der sequenzselektiven, enzymatischen DNA-Spaltung resultierenden DNA-Fragmente. Dazu wurden vom Hersteller bereitgestellte enzymespezifische Puffer verwendet und die damit hergestellten Ansätze (in der Regel 20 µl) mit BSA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml versetzt. Die eingesetzte Enzymmenge wird in Units (U) angegeben, wobei bezüglich der Enzymaktivität zur DNA 1 U Enzym 1 µg DNA pro Stunde und Schnittstelle schneidet. Die Bestimmung des Temperaturoptimums der verwendeten Enzyme richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers.

3.4.3 Transformation von *E.coli* (DH5α) mittels Hitzeschock

Unter Transformation versteht man die genetische Veränderung von Bakterien durch die Aufnahme oder das Einschleusen fremder freier DNA. Zur Durchführung dieses Vorgangs wurden auf -80°C gelagerte kompetente *E.coli*-Bakterien (3.3.3)

zunächst langsam auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der gereinigten Plasmid-DNA für 30 min weiter inkubiert. Anschließend wurden die Keime für 90 s bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Es folgte eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Um eine Regeneration der Keime zu erwirken, wurde der Ansatz mit 500 µl 2-fach konzentriertem und vorgewärmtem LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Entnahme von jeweils 100 µl des Transformationsansatzes zum Ausplattieren auf LB-Agarplatten und eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Die Agarplatten enthielten das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml, wobei es aufgrund des im Plasmid enthaltenen Resistenzgens gegen dieses Antibiotikum zu einer Selektion erfolgreich transformierter Bakterien kam.

3.4.4 Klonierung

Mit dem Begriff Klonierung werden molekularbiologische Methoden der Integration eines DNA-Fragments oder Gens in einen Vektor (beispielsweise ein Plasmid) zum Zweck nachfolgender massenhafter Vermehrung der rekombinanten DNA in einer geeigneten Wirtszelle beschrieben. Als passender Wirt für ein solches Einbringen eines Konstrukts durch Transformation diente der Stamm DH5α des Bakteriums *Escherichia coli*.

Im Falle eines Wachstums von *E.coli*-Kolonien im Selektionsmedium nach durchgeführter Transformation mit dem Konstrukt erfolgte ein Picken einzelner Kolonien und das Animpfen in 5 ml LB_{amp}-Medium (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C. Diese Übernachtskultur wurde in einen Erlenmeyer-Kolben (250 ml, Befüllung mit einem Zehntel seines Nennvolumens) überführt und für 16 h bei 160 upm geschüttelt.

3.4.5 Präparation von Plasmid-DNA

Die Vermehrung des Plasmids erfolgte durch Übernachtskulturen des Bakteriums *E.coli* nach erfolgreich durchgeführter Transformation. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde die jeweilige Kultur bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA konnte daraufhin aus dem verbleibenden Bakteriensediment isoliert werden.

Für die Purifikation kleinerer DNA-Mengen, wie beispielsweise bei der Sequenzierung oder beim Restriktionsverdau, wurde der Nucleo Bond Kit der Firma Macherey-Nagel anhand von Midi-Präparationen eingesetzt. Bei größeren DNA-Mengen mit einem hohen Anspruch bezüglich des Reinheitsgrades (z.B. bei

Transfektionen in eukaryotischen Zellen) wurde das Endofree Maxi-Präparationskit der Firma Macherey-Nagel verwendet, wodurch die Endotoxinfreiheit gewährleistet werden konnte. Das Maxi-Präparationskit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse ²¹⁶, wobei die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers erfolgte. Die Reinigung der DNA wurde mittels Anionenaustauschersäulchen und nachfolgender Fällung durch Isopropanol erreicht. Anschließend wurde das Pellet nach einem Waschschrift mit 70 %-igem Ethanol in einer entsprechenden Menge des im Kit enthaltenen TE-Puffers gelöst und die Konzentration und Reinheit durch eine photometrische Analyse bestimmt (Konzentration: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g dsDNA/ml Lösungsmittel}$; Reinheit: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8 \text{ bis } 2,0$).

Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert werden.

3.4.6 Plasmidsequenzierung (zur Kontrolle)

Zur Durchführung der Sequenzierung wurde $1 \text{ } \mu\text{g}$ Plasmid-DNA pCMV-LXRE-luc in destilliertem Wasser gelöst und in sterile $1,5 \text{ } \mu\text{l}$ Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden im Anschluss daran an die Sequenzierfirma Agowa verschickt. Die Analyse und Vergleich der Sequenzen erfolgte mit der Datenbank und Software BLAST ²¹⁷.

3.5 Reportergenassay und spezifische mRNA-Quantifizierung

3.5.1 Transiente Transfektion von CaCo-2-Zellen

Es existieren zahlreiche Möglichkeiten genetisches Material, z.B. in Form von Plasmiden, in eukaryotische Zellen einzubringen, sie also zu transfizieren. Hierbei wird zwischen der transienten Transfektion, wobei die Fremd-DNA aufgrund von Ausschleusungs- und Abbauprozessen nur zeitweilig in der Zelle verbleibt, und der stabilen Transfektion unterschieden, was gleichbedeutend mit einem dauerhaften Einbau in das Wirtsgenom ist. Die Transfektion kann beispielsweise durch Mikroinjektion, Elektroporation, Lipofektion oder auch über virale Systeme erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde als Transfektionsmethode die Magnetofektion eingesetzt, wobei eine Assoziation der endotoxinfreien Plasmid-DNA mit den mit kationisch-lipophilen Molekülen beschichteten Eisenoxidpartikeln ausgenutzt wird. Ein magnetisches Feld, das von einer Magnetplatte erzeugt wird, führt zu einem schnellen Kontakt zwischen der Zelloberfläche und dem

partikelgebundenen DNA-Komplex. Nachfolgend findet schließlich eine endozytotische Aufnahme in die Zelle statt.

Zur Durchführung dieser für adhärenzte Zellen geeigneten Methode wurde als Transfektionsreagenz Metafectene Pro der Firma Biontex und als Verbindung zu den magnetischen Nanopartikeln ein Lipofection Enhancer (IBA) verwendet. Nach Testung der Transfektionseffizienz mit einem GFP-Vektor der Firma AMAXA mittels Durchflusszytometrie wurden CaCo-2-Zellen für die Versuche auf 48-Lochrundplatten ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von 60 % wurde mit den gut proliferierenden und vitalen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase eine Transfektion für 48 h nach einem leicht modifizierten Protokoll der Firma Biontex durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Protokoll zur Transfektion mittels Magnetofektion

Zellline	pCMV-LXRE-luc	Metafectene	Enhancer
CaCo-2	0,5 µg	1 : 6	1µl/µg Plasmid-DNA

1. Komplexbildung Plasmid-DNA und Metafectene Pro	⇒ Inkubation : 15 min, RT
2. Zugabe Lipofection Enhancer	⇒ Inkubation : 15 min, RT
3. Zugabe der Suspension auf CaCo-2-Zellen	⇒ Inkubation auf Magnetplatte: 15 min, RT
4. Sofortiger Mediumwechsel aufgrund der hohen Toxizität der Substanzen	

Das in der vorliegenden Arbeit zur Transfektion verwendete Konstrukt pCMV-LXRE-luc wurde freundlicherweise von Herrn Prof. David J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, Dallas) zur Verfügung gestellt.

3.5.2 LXRE-Transaktivierungs-Luciferaseassay



Abbildung 11: *Photinus pyralis*
(aus: www.biosynth.com)

Bei den Luciferasen handelt es sich um Enzyme unterschiedlicher Struktur, in deren Anwesenheit es zur Oxidation von Luciferinen und nachfolgend zur Entstehung von Biolumineszenz kommt. Sie finden oft Verwendung als Indikatorenzyme in Transaktivierungs-Assays. Meist werden zu diesem Zweck Firefly-Luciferasen aus Leuchtkäfern, wie *Photinus pyralis*, und Renilla-Luciferasen, wie z.B. der Seequalle *Renilla reniformis*, eingesetzt. Während die Leuchtkäfer-Luciferase für die Umsetzung ihres Substrats D-Luciferin in Oxyluciferin einige Kofaktoren benötigt (Gleichung 1), findet die Reaktion zur Erzeugung von Lumineszenz bei der Renilla-Luciferase jedoch nur mittels Beteiligung von Luciferin unter Anwesenheit von Sauerstoff statt. Als Substrat für *Renilla* fungiert dabei Coelenterazin, wobei es *in vitro* zur Emission von blauem Licht der Wellenlänge 460-490 nm kommt ²¹⁸. Bei der Leuchtkäfer-Luciferase hingegen erfolgt die Lichtemission im Bereich von ca. 538-582 nm ²¹⁹.



Abbildung 12: *Renilla reniformis*
(aus: www.biosynth.com)



Gleichung 1: Biolumineszenzreaktion durch Katalyse der Firefly-Luciferase

Im Rahmen dieser Reaktion entstehen Photonen, deren Zählung über einen Photomultiplier erfolgen kann. Aus den direkt gezählten Impulsen resultieren nun Rohdaten, die sogenannten relativen Lichteinheiten (RLU = relative light units). Die auf diese Weise gemessene Luciferaseaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Proteingehalt der Proben normiert (3.6.2), wobei eine Korrelation zur Transaktivierung des LXREs (1.1.5) im Promotor des Reporterkonstrukts (LXRE-luc) besteht.

Der LXRE-Luciferasetest wurde mit dem Luciferaseassay von Promega und die nachfolgende Messung der Lichtemission im Luminometer Mithras der Firma Berthold durchgeführt. Dazu wurden CaCo-2-Zellen ($0,2 \times 10^6$) auf 48-Lochrund-Kulturplatten ausgesät, mit dem Konstrukt pCMV-LXRE-luc transfiziert (3.5.1), danach mit den zu testenden Substanzen bzw. potentiellen Agonisten inkubiert

und anschließend mit PBS⁻ gewaschen. Nachdem die Kulturplatten gut getrocknet waren, wurden die Zellen in 50-60 µl passivem Lysepuffer (im Reagenzienansatz enthalten) für ca. 15 min lysiert und zur Entfernung der unlöslichen Zellbestandteile zentrifugiert (14.000 U/min, 2-3 min, 4°C). Im Messprotokoll wurde eine Verzögerung von 0,1 s nach Injektion des Substratmixes (50 µl) festgelegt und die Luciferaseaktivität in den Lysaten (10 µl) für 20 s im Luminometer gemessen.

3.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus CaCo-2-Zellen

RNA dient der Umsetzung genetischer Information in entsprechende Proteine, wobei bezüglich der Sequenz Komplementarität zur DNA als Träger der genetischen Information besteht. Im Gegensatz zur DNA liegt die RNA jedoch in der Regel als Einzelstrang vor. Ein weiterer, insbesondere für die Isolierung von RNA bedeutsamer Unterschied zeigt sich jedoch in der Hydroxylgruppe am Pentosering, wodurch eine basische Hydrolyse ermöglicht wird. Die daraus resultierende geringere Stabilität der RNA bewirkt auch eine größere Neigung zur Degradierung durch RNasen im Vergleich zur DNA. RNA besteht aus verschiedensten RNA-Typen, die Wichtigsten sind jedoch die rRNA (ribosomal RNA, ca. 80 %), die tRNA (transfer RNA, ca. 15 %) und die mRNA (messenger RNA, ca. 5 %).

Um eine durch RNasen bedingte Degradierung der RNA zu vermeiden, sollten alle praktischen Tätigkeiten in diesem Zusammenhang unter dem Anspruch höchster Sauberkeit stattfinden. Dies beinhaltet auch das Autoklavieren von Materialien und das Verwenden von DEPC-Wasser. Letzteres bewirkt durch eine kovalente Bindung an primäre und sekundäre Amine (Alkylierung), wie z.B. auch an die Histidinseitenketten in den aktiven Zentren vieler RNasen, eine irreversible Inhibition. Das nicht verbrauchte DEPC zerfällt beim Autoklavieren schließlich in die beiden flüchtigen Produkte CO₂ und Ethanol.

Für die Durchführung der RNA-Isolierung wurden auf 6-Lochrund-Kulturplatten ausgesäte und zu 80 % konfluente CaCo-2-Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und zentrifugiert (200 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Schritte zur Isolierung der RNA fanden streng nach dem Protokoll für das Nucleospin RNA II-Kit der Firma Macherey-Nagel statt. Zunächst erfolgte die Lyse mit chaotropischen Salzen zur wirkungsvollen Denaturierung und Inaktivierung von Proteinen, wie beispielsweise den RNasen. Gleichzeitig wurden damit auch gute Bedingungen für die Bindung der im Lysat vorhandenen RNA an

die Silikamembran geschaffen. Anschließend wurde das Lysat filtriert, homogenisiert und mittels DNase I kontaminierende DNA verdaut. In mehreren nachfolgenden Waschschrritten wurde die noch gebundene RNA von Salzen und größeren Zellanteilen befreit, zuletzt die gereinigte Gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades erfolgte photometrisch (Konzentration: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g sRNA/ml Lösungsmittel}$; Reinheit: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1,8 \text{ bis } 2,0$).

3.5.4 Quantitative Real-time RT-PCR

3.5.4.1 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Verbindung von zwei molekularbiologischen Methoden mit dem Ziel, die Expression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben oder auch Blutserum nachzuweisen. Da für die PCR spezifische DNA-Polymerasen verwendet werden, die durch ihre Abhängigkeit von DNA nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren, ist zunächst die Umschreibung der RNA in spezifische cDNA mittels einer reversen Transkriptase (RT) nötig²²⁰. Dabei handelt es sich um RNA-abhängige DNA-Polymerasen, welche die Transkription von mRNA in cDNA katalysieren. Ihre erstmalige Beschreibung in Retroviren erfolgte 1970 unabhängig von H. Temin²²¹ und D. Baltimore²²². Bei den heute verwendeten reversen Transkriptasen handelt es sich meist um modifizierte Enzymvarianten aus verschiedenen Retroviren, wie beispielsweise dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV RT) oder „Avian Myeloblastosis Virus“ (AMV RT). In dieser Arbeit wurde jedoch eine reverse Transkriptase anderer biologischer Herkunft eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein rekombinantes heterodimeres Enzym, das in *E. coli* exprimiert wird. Das Temperaturoptimum liegt zwischen 37 und 42°C. Die Inkubation mit den Ansätzen wurde in der vorliegenden Arbeit für 60 min bei 37°C durchgeführt; als Primer für die reverse Transkription wurden Random Hexamerprimer eingesetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Firma Qiagen mittels des Omniscript Reverse Transcription-Kits (Tabelle 4).

Tabelle 4: Protokoll zur reversen Transkription

KOMPONENTEN	ENDKONZENTRATION
RT-Puffer	1 x
dNTPs	0,5 mM pro dNTP
Random Hexamerprimer	20 µM
Reverse Transkriptase	4 U
Gesamt-RNA	200-1000 ng
RNase-freies Wasser	variabel (Endvolumen: 20 µl)

Zur Amplifikation spezifischer Sequenzen eines DNA-Strangs schließt sich als zweiter Schritt der RT-PCR die Polymerasekettenreaktion (PCR) an, die 1983 vom amerikanischen Biochemiker Kary Banks Mullis²²³ entwickelt wurde. Nach einem Initialisierungsschritt zum Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA (5 min, 95°C) in Einzelstränge folgt der eigentliche PCR-Prozess, bestehend aus einer Anzahl von 20 bis 40 Zyklen eines entsprechenden Thermoprotokolls. Dieser Vorgang, der zu einer exponentiellen Vermehrung der Ziel-DNA führt, wurde in einem Thermocycler ausgeführt, wobei sich jeder Zyklus aus drei Schritten zusammensetzt:

1. DENATURIERUNG (MELTING):

Nochmaliges Erhitzen für 30 s auf 95°C zur Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen

2. PRIMERHYBRIDISIERUNG (ANNEALING):

Temperatursenkung zur Anlagerung der spezifischen Primer an die DNA-Einzelstränge (meist 55-65°C, 20-60 s)

3. ELONGATION (EXTENSION):

Synthese des komplementären Strangs durch die thermophile Taq-Polymerase (72°C, 20-60 s) bei fortbestehender Primerbindung zur Bildung des Einzelstranganfangs

Die Verwendung der für die Durchführung der PCR erforderlichen Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare) fand in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers statt. Die Beads enthalten neben der Taq DNA-Polymerase sowohl dNTPs als auch einen geringen Anteil an Magnesiumchlorid in lyophilisierter Form. Für die Herstellung eines Ansatzes wurden die Beads in DEPC-Wasser gelöst und als weitere Komponenten das SYBR Green I, Magnesiumchlorid, die entsprechenden Primer und die cDNA hinzugefügt (Tabelle 5). Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit das in Tabelle 6 beschriebene Thermoprotokoll eingesetzt.

Die entstandenen Produkte der RT-PCR können anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente im UV-Licht überprüft werden. Die Lagerung der Produkte fand bei 4 bis 8°C statt.

Tabelle 5: Protokoll zum optimierten PCR-Raktionsansatz

KOMPONENTEN	SYBRGreen I		ENDKONZENTRATION	0,1 x
	Primer	ABCA1		100 nM
		LXR α		100 nM
		β -Aktin		100 nM
	MgCl ₂	ABCA1		3,5 mM
		LXR α		1,5 mM
		β -Aktin		3,5 mM
	PCR-Beads			1
	cDNA			3 μ l
	DEPC-Wasser			variabel (Endvolumen: 25 μ l)

Tabelle 6: Protokoll zur quantitativen Real-time PCR

Real time PCR	Zeit	Temperatur
Zyklenzahl: 35-40		
Denaturierung	30 s	95°C
Annealing	20 s	60°C
Elongation	20 s	72°C

3.5.4.2 Real-time RT-PCR

Die quantitative Real-time RT-PCR²²⁴ stellt eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren dar. Sie beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR), darüber hinaus bietet diese Methode aber auch die Möglichkeit zur Quantifizierung der mRNA. Diese erfolgt mittels Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen, wohingegen die Messung der gebildeten Produktmenge bei der herkömmlichen PCR erst am Ende durch Detektion ermittelt werden kann. Die einfachste Option zur Quantifizierung bietet der Einsatz von DNA-Farbstoffen, wie z.B. das SYBR Green I (Molecular Probes), das auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Solche Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft, mit der DNA zu interkalieren, wobei das resultierende Fluoreszenzsignal proportional zur Menge der gebildeten PCR-Produkte ansteigt. Um die Enzyme im log-linearen Bereich der Kinetik optimal zu nutzen, sollte die Amplifikatlänge 500 bp dabei nicht überschreiten. Für die Durchführung der Real-time RT-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit ein iCycler der Firma Bio-Rad verwendet, dessen Ausstattung eine UV-Lampe und eine CCD-Kamera umfasst, wodurch eine Anregung des fluoreszierenden Farbstoffs und dessen Messung ermöglicht wird.

Die Fragmentlänge und Spezifität des Produkts wird am Ende der PCR durch die Analyse der Schmelzkurve qualitativ überprüft. Bei diesem Vorgang kommt es durch kontinuierliche Temperaturerhöhung (50 bis 95°C) zur Aufschmelzung der DNA in Einzelstrangmoleküle und zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs. Durch den höheren Schmelzpunkt von Doppelstrang-DNA der spezifischen PCR-Produkte im Vergleich zu unspezifisch entstehenden Primerdimeren kann hier eine Unterscheidung getroffen werden. Außerdem gibt die Schmelzkurve eine ungefähre Auskunft über die Menge und Reinheit des entstandenen Fragments. Neben der hier beschriebenen Methode gibt es aber noch einige weitere Möglichkeiten der Quantifizierung von Amplifikationen, wie beispielsweise

Molecular Beacons ²²⁵, FRET-Sonden (z.B. LightCycler-Sonden ²²⁶), Taqman-Sonden ²²⁷ oder Lux-Primer ²²⁸.

Die Bestimmung der Amplifikationseffizienz der PCR kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Die einfachste und auch am häufigsten verwendete Methode ist die Amplifikation der RNA in 10-fachen Verdünnungsstufen. Aus der Steigung m der Standardkurve kann dann die Effizienz E berechnet werden:

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

Eine Steigung m von $-3,322$ wäre somit gleichbedeutend mit einer Effizienz von 100 % und einer Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus.

3.5.4.3 Absolute und relative Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung stellt eine recht aufwändige und auf einer Kalibrierungskurve einer synthetischen RNA mit gleichen Primern als inneren Standard basierende Strategie dar. Aus diesem Grund wird meist die relative Quantifizierung herangezogen. Dabei wird die Genexpression des Zielgens auf eine endogene Kontrolle (housekeeping gene) bezogen. Dieses Referenzgen sollte die Eigenschaft einer möglichst konstanten Expression aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür β -Aktin verwendet, es können aber auch andere Gene, wie z.B. GAPDH oder Tubulin, zu diesem Zweck eingesetzt werden. In Hinblick darauf, dass die Gesamtanalyse auf diesem Signal beruht, sollte bei der Wahl der internen Kontrolle auf eine leichte Detektierbarkeit und möglichst wenig Varianz bezüglich der Expression während des Zellzyklus, zwischen den Zelltypen oder als Reaktion auf die experimentelle Behandlung bestehen ²²⁰.

Die erste Phase der Amplifikation zeichnet sich durch eine begrenzte Templatemenge (d.h. alle anderen Reagenzien sind im hohen Überschuss vorhanden) mit einem weit unter der Detektionsgrenze liegenden Signal aus. Dagegen kommt es in der dritten Phase zu einem Plateau im Anstieg des Amplifikats durch Verbrauch der dNTPs oder begrenzende Aktivität bzw. Hemmung der Enzyme und somit zu einer nicht mehr vollständigen Verdopplung des Signals pro Zyklus.

Ein der Detektion zugänglicher, noch exakt exponentieller und aus diesem Grund auch quantifizierbarer Anstieg besteht nur in der dazwischen liegenden log-linearen Phase. Zur zuverlässigen Erfassung des Beginns der exponentiellen Phase wird vielfach der C_t -Wert (threshold cycle) verwendet, wodurch der Zyklus

beschrieben wird, an dem die Fluoreszenz erstmals hochsignifikant das Rauschen der Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Die relative Quantifizierung erfolgt dann nach der Delta-delta-C_t-Methode: Zuerst wird die Differenz im C_t-Wert des zu quantifizierenden Zielgens im Vergleich zum C_t-Wert des Housekeeping Genes in derselben Probe gebildet. Danach wird von dieser Differenz der behandelten Probe die Differenz in der Kontrollprobe abgezogen. Dabei ist die gleiche Effizienz der beiden beteiligten Reaktionen von großer Wichtigkeit, was aber als Steigung des log-linearen Teils der Absorptionskurve abgelesen werden kann.

$$\Delta C_t = C_t \text{ (Zielgen)} - C_t \text{ (Housekeeping Gene)}$$

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

Die Resultate können nun in folgende Formel zur Berechnung des Fold Changes (n-fache Expression) eingesetzt werden:

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

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Gesamtproteinextraktion aus CaCo-2-Zellen

Aufgrund der ubiquitär vorkommenden Proteasen erfordert die Durchführung von Tätigkeiten in Verbindung mit Proteinen ein hohes Maß an Sauberkeit. Um eine Degradierung der Proteine zu verhindern, sollte deshalb beispielsweise stets auf das Tragen von Handschuhen und die Verwendung von sterilen Materialien geachtet werden. Die Gesamtproteinextraktion erfolgte nach einer durch Dr. W. Erl modifizierten Methode von DiDonato et al. ²²⁹.

Zur Durchführung dieser Methode wurden die auf 6-Lochrundplatten kultivierten und zu 80 % konfluenten CaCo-2-Zellen auf Eis gelagert, mit einem Zellschaber abgekratzt und anschließend in vorgekühlte 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das durch Zenrifugation (200 g, 5 min, 4°C) gewonnene Zellpellet wurde mit 1 ml eiskaltem PBS^{+/+} resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend nochmals abzentrifugiert (2000 g, 1 min, 4°C). Zur Zellyse erfolgte eine kräftige Resuspension des Zellsediments mit dem Lysepuffer (WCEB), der mit

der entsprechenden Menge Proteaseinhibitor-Mix versetzt war. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Proteine durch Zentrifugieren (7000 g, 10 min, 4°C) von Membranresten gereinigt und in 500 µl Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge wurde mit dem DC Protein Assay der Firma Biorad nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dazu erfolgte die Herstellung einer Eichgeraden unter Verwendung des jeweiligen Lysepuffers aus einer BSA-Stammlösung (Konzentration: 50 mg/ml). Sowohl für die Proben als auch für die Erstellung der Eichgeraden wurden Doppelwerte unter Verwendung von je 5 ml Probe bzw. Standard in einer Mikrotiterplatte bestimmt. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 690 nm im Photometer gemessen. Die Ermittlung der Proteinkonzentration fand über die Eichgerade statt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Page handelt es sich um eine Methode zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von Proteingemischen, wobei ein Gel auf Polyacrylamidbasis als Trennmedium fungiert. Zusätzlich wird das Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) verwendet, wodurch es zu einer Überdeckung der Proteineigenladung durch Bildung von negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen und damit zu einer konstanten Ladungsverteilung kommt. Denaturierende Eigenschaften von SDS bezüglich der Proteine verhindern außerdem Interaktionen zwischen den Proteinen. Daraus resultiert eine Wanderung der SDS-Proteinkomplexe zur Anode im elektrischen Feld und eine alleinige Unterscheidung der Proteine durch ihr Molekulargewicht.

Für die Anwendung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Vertikalelektrophoresesystem für Minigele Mini-PROTEAN 3, modifiziert nach Laemmli et al. ²³⁰, eingesetzt. Zur Auftrennung der Proteingemische wurden 7,5 % Trenngele verwendet, die eine gute Auftrennung von Proteinen im Bereich von 30-250 kDa ermöglichen. Die Proteinextrakte wurden mit Probenpuffer (3.1.2) im Verhältnis 1 : 5 versetzt. Ein Kochen der Proben wurde nicht durchgeführt, da es bei großen Proteinen zu Aggregationen und damit zu einem erschwerten Eintreten in das Laufgel kommen kann. Die Proteingröße wurde mittels eines vorgefärbten Proteinmolekulargewichtsmarkers bestimmt, der parallel zu den Proben

aufgetragen wurde. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 200 V für 45 bis 60 min im Laufpuffer (3.1.2) und RT.

3.6.4 Immunoblot (Western Blot)

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine (3.6.3) wurden diese in einer Mini-Nassblotkammer der Firma Bio-Rad für 60 min bei 100 V (0,14-0,20 mA) und 4°C auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Anwendung der Ponceau S-Färbelösung (Inkubation ca. 1 min, zur Entfärbung mehrmaliges Waschen mit TBS-Puffer) ermöglichte eine Kontrolle der Transfereffizienz.

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT mit Blockierungspuffer (3.1.2) und nachfolgend optional entweder für 1 h oder über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit dem HRP-markierten Sekundärantikörper für 1 h wurde die Membran 3 x für 5 min mit TBS/Tween-Puffer (3.1.2) gewaschen. Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem SuperSignal West Pico Chemilumineszenzsubstrat der Firma Pierce für ca. 1 min. Die Membran wurde nach Entfernung überschüssigen Substrats durch Filterpapier in eine Filmkassette gelegt. Die resultierende Chemilumineszenz wurde über die Exposition eines Films gemessen, wodurch die spezifisch gefärbten Proteine nachgewiesen werden konnten.

Falls auf derselben Membran erneut Proteine mit anderen Antikörpern nachgewiesen werden sollten, wurde die Membran zur Ablösung der vorhandenen Antikörper für 30 min bei 50°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS/Tween-Puffer (3.1.2) wurde anschließend eine weitere Immunodetektion durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 7 und Tabelle 8 beschriebenen primären und sekundären Antikörper verwendet.

Tabelle 7: Primärantikörper zur Immundetektion

ANTIKÖRPER	GRÖÖE	VERDÜNNUNG
ABCA1 (rabbit)	220 kDa	1 : 1000, 1 h bei RT oder 1 : 2000, über Nacht im Kühlschrank 3 % Magermilch (Lösung in TBS-Puffer)
ß-Aktin (mouse)	42 kDa	1 : 2000, 1 h bei RT 5 % Magermilch

Tabelle 8: Sekundärantikörper zur Immunodetektion

ANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG
Anti-rabbit	1 : 2000, über Nacht im Kühlschrank 3 % Magermilch
Anti-mouse	1 : 2000, 1 h bei RT 5 % Magermilch

3.7 Chemisch-analytische Methoden

3.7.1 GC/MS

Der Begriff GC/MS beschreibt eine Methode aus der analytischen Chemie, die zur massenanalytischen Bestimmung einzelner Bestandteile von Produktgemischen dient und auch zur Strukturaufklärung beiträgt. Dazu erfolgt die Kopplung eines Gaschromatographiegerätes (GC) mit einem Massenspektrometer (MS). Die Gaschromatographie stellt dabei eine effiziente Methode zur Auftrennung des zu untersuchenden gelösten Substanzgemisches in Einzelkomponenten dar, indem dieses mittels eines Gasstromes über eine stationäre Phase geleitet wird. Als mobile Phase wird ein inertes Trägergas (z.B. Stickstoff, Wasserstoff, meist jedoch

Helium) verwendet, das eine mit Trennmaterial beschichtete Quarzsäule definierten Innendurchmessers und Länge durchströmt. Zur Auftrennung des ebenfalls gasförmigen Substanzgemisches erfolgt eine Injektion des Gemisches über den Injektor in den Gasstrom. Anschließend erfolgt die Analyse der Einzelkomponenten durch einen Detektor. Die Methode der Gaschromatographie erlaubt jedoch nur die Untersuchung von flüchtigen Substanzen mit relativ geringer Molekülmasse.

Dem GC ist ein Massenspektrometer nachgeschaltet, das sich aus einer Ionenquelle zur Ionisierung der gasförmigen Moleküle, einem Massenanalysator zur Auftrennung der Ionen bezüglich ihres Masse/Ladungsverhältnisses (m/z) und einem Detektor zur Intensitätsmessung der erzeugten Ionen zusammensetzt. Die Ionisierung geht hierbei in der Regel mit einer stark methodenabhängigen Fragmentierung der Verbindungen einher. Nach dem Durchlaufen der Chromatographiesäule stehen zur nachfolgenden Ionisierung der getrennten Stoffe unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Meist werden als Ionisierungstechniken zur Ionisierung der Substanzen in einer Ionenquelle die Elektronenstoßionisation (electron impact-EI) oder aber die chemische Ionisation (CI) und die Feldionisation (FI) eingesetzt. Für die Aufnahme von Massenspektren werden bei einfachen Geräten Ion-Trap- oder Quadrupol-Analysatoren verwendet. Geräte zur Bestimmung hoher Molekülmassen sind häufig mit Time-of-Flight-(TOF) oder hochauflösenden Sektorfeldanalysatoren ausgestattet. Bei Substanzgemischen, die sich nicht erfolgreich über die GC analysieren lassen, kann stattdessen die Flüssigchromatographie (liquid chromatography) mit MS-Kopplung (LC/MS) herangezogen werden, da hier die Substanzgemische nicht verdampft werden müssen.

Zur Identifizierung und Quantifizierung von Phytosterolprodukten wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine DB5MS Kapillarsäule verwendet. Nach Durchführung der Derivatisierung (3.7.2.3) der zu quantifizierenden Proben erfolgte das Einspritzen von 1 bis 5 μl Aliquots in das Injektionssystem, wobei Helium als Trägergas fungierte. Es wurde für 6 s eine Temperatur von 60°C gehalten, anschließend auf 280°C (10°C/s) erhöht und diese Temperatur für 1 min beibehalten. Die initiale Säulentemperatur von 265°C wurde für 2 min gehalten, auf 310°C (4,5°C/min) erhöht und dann für 25 min aufrechterhalten. Der verwendete Gaschromatograph war mit einem Quadrupol-Massenspektrometer gekoppelt, das im Elektronenstoßionisationsmodus (electron impact-EI) betrieben wurde. Die Ionenquelle wurde bei 150°C mit einer Elektronenenergie von 70 eV betrieben und die Temperatur der Transferleitung während des Durchlaufs bei

280°C gehalten. Für die Identifizierung der in dieser Arbeit gesuchten oxidierten Phytosterole erfolgte der Vergleich sowohl der relativen Retentionszeiten als auch der analogen Massenspektren von authentischen, oxidierten Cholesterolstandards und den Spektren synthetisierter Oxyphytosterole. Hierbei wurden Gesamtionenspektren über den Massenbereich m/z 90-600 bei einer Scanrate von 0,5 scans/s aufgenommen²¹².

3.7.2 Herstellung von Oxyphytosterolen²¹²

3.7.2.1 Dünnschichtchromatographie (thin-layer chromatography)

Jeder Schritt zur Oxidierung und Aufreinigung der oxidierten Phytosterole wurde über die Methode der Dünnschichtchromatographie (TLC) überprüft. Dazu erfolgte die Applikation von 1 bis 10 µg der Proben auf eine vorbeschichtete Silikagelplatte (Alugram Sil G; 0,2 mm, 20 x 20 cm; Macherey-Nagel). Die Platten wurden in Diethylether entwickelt, getrocknet und mit 80 %-iger Schwefelsäure besprüht, um die Produkte sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Platten erhitzt. Für die weitere Verarbeitung der Produkte wurden Bezirke von parallelen Spuren, die zuvor nicht zur Visualisierung besprüht und erhitzt worden waren, von der Dünnschichtplatte abgekratzt, mit Diethylether eluiert und wie nachfolgend beschrieben behandelt.

3.7.2.2 Festphasenextraktion (solid-phase extraction)

Die Konditionierung der Silikakartuschen erfolgte durch Hexan. Alle Proben wurden in 200 µl Chloroform appliziert und die Kartuschen mit 4 ml Hexan gewaschen. Nachfolgend wurden die Oxidationsprodukte mit steigenden Diethyletherkonzentrationen in Hexan eluiert, in separaten Gefäßen gesammelt und zuletzt die Kartuschen mit reinem Diethylether gewaschen.

3.7.2.3 Derivatisierung

Die Derivatisierung der Proben dient der Verbesserung der Probentrennung im GC, da die Flüchtigkeit der Substanzen steigt. Dazu wurden alle Proben vor der Analyse unter Stickstoff abgedampft und deren Trimethylsilylether- oder Acetatderivate generiert. Die Derivatisierung der Trimethylsilylether (TMS) erfolgte in 50 µl Silyl 911 (99 % BSTFA + 1 % TMCS)²³¹ für 1 h bei 45°C. Die Acetatderivate wurden in 50 µl Acetanhydrid (5 %), das mit wasserfreiem Pyridin versetzt war, für 2 h bei 60°C erzeugt.

3.7.2.4 Oxidation von Stigmasterol

Die chemische Oxidation von Stigmasterol wurde mittels Blei(IV)-oxid (PbO_2) und Hydroxybenzotriazol (HBT) durchgeführt (Abbildung 13). Dazu wurde ein dem Laccase-Mediatorsystem ²³² analoges System angewendet, das für die Oxidation von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch eine Phenoloxidase beschrieben worden war. Hierfür wurden 100 bis 500 mg des Phytosterols in 5 ml wasser- und ethanolfreiem Chloroform (Molekularsieb; 3 Å) gelöst, mit HBT (ca. 1,5 mM) gesättigt und die Reaktion durch den Zusatz einer kleinen Menge des Blei(IV)-oxids gestartet. Es erfolgte die wiederholte Zugabe von HBT und PbO_2 nach 1 und 5 h, während die Lösung bei Raumtemperatur gerührt wurde. Die Umsetzung wurde mittels TLC (3.7.2.1) überprüft. Nach 8 h wurde das PbO_2 herunterzentrifugiert, der Überstand durch eine Silikakartusche geleitet und die Oxyphytosterole mit Diethylether eluiert. Der Eluent wurde unter Stickstoff abgedampft, der Rückstand in Methanol/Ethylacetat (1 : 1) gelöst und potentielle Hydroperoxide durch den Zusatz von NaBH_4 im Überschuss reduziert. Im Anschluss an das erneute Abdampfen der Lösung wurde eine weitere Aufreinigung der Oxyphytosterole mittels SPE (3.7.2.2) durchgeführt.

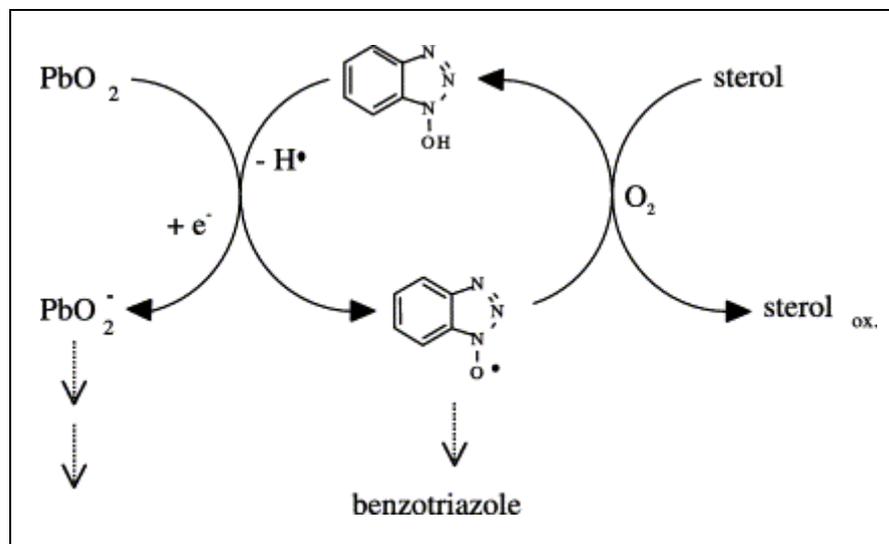


Abbildung 13: Oxidation von Sterolen mittels des HBT/ PbO_2 -Systems (Johannes and Lorenz 2004 ²¹²)

3.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in den Abbildungen als Mittelwert \pm SEM (standard error of the mean) von mindestens vier bis neun Versuchen angegeben. Zur Auswertung wurde das Statistikprogramm SigmaStat verwendet. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten bei verschiedenen experimentellen Bedingungen wurden zuerst durch Varianzanalyse, bei möglicher Abweichung von der Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen durch Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis getestet. Bei signifikantem Ergebnis der globalen Varianz- bzw. Rangvarianzanalyse (p angegeben in den Legenden) wurden die Paardifferenzen zur Kontrolle mit dem Post-hoc-Test nach Holm-Sidak bzw. Dunn auf Signifikanz getestet. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) für den Paarvergleich zur Kontrolle in den Abbildungen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung von LXR α an CaCo-2-Zellen in der Real-time RT-PCR

Bei ABCA1 konnte auf eine etablierte Real-time RT-PCR zurückgegriffen werden. Zur Untersuchung von LXR α in CaCo-2-Zellen war zuerst die Etablierung der quantitativen Real-time RT-PCR dieses Rezeptors notwendig. Die Schaffung optimaler Bedingungen für den Vergleich und die Quantifizierung unterschiedlicher Amplifikate ist hierbei von wesentlicher Bedeutung. Dazu wurde die Gesamt-RNA (3.5.3) von CaCo-2-Zellen aus einer Zellpassage isoliert. Es wurden 3-4 verschiedene auf diese Weise hergestellte RNA-Pools zur Etablierung verwendet. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration (3.5.3) wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten angelegt und der LXR α -Rezeptor mittels Real-time RT-PCR (3.5.4) bei verschiedenen Konditionen amplifiziert. Die Effizienz war von der optimalen Kombination der etablierten Parameter abhängig (Tabelle 9).

Tabelle 9: Optimierte Parameter zur Etablierung der Real-time RT-PCR für den LXR α -Rezeptor in CaCo-2-Zellen

ANNEALING		ELONGATION		ENDKONZENTRATION	
Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur	MgCl ₂	Primer
20 s	60°C	20 s	72°C	1,5 mM	100 nM

Aus der Steigung der gemessenen Standardgerade (Abbildung 14) kann die Amplifikationseffizienz der PCR ermittelt werden. Mit den optimierten Konditionen wurde eine Effizienz (3.5.4.2) von nahe 100 % bei einem Korrelationskoeffizienten von 1,000 und einer Steigung von $-3,326$ ($\approx -\log_2(10)$) erreicht.

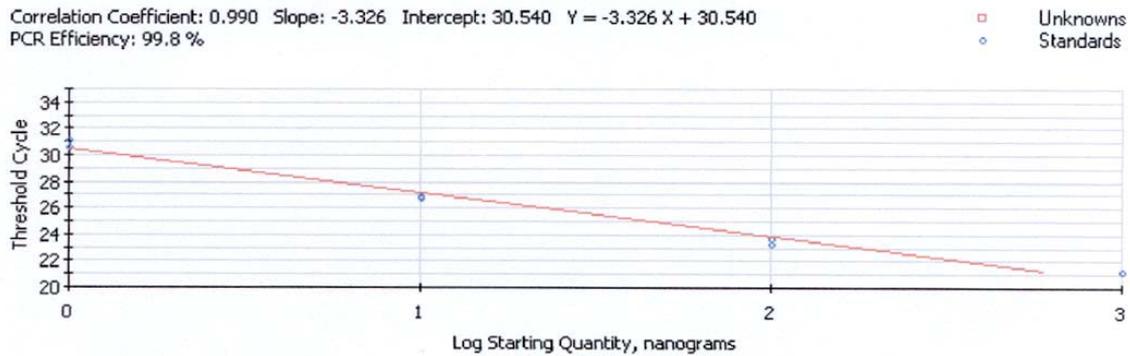


Abbildung 14: Standardgerade mit Doppelwerten einer RNA-Verdünnungsreihe mittels quantitativer Real-time RT-PCR von LXR α . Gesamt-RNA von CaCo-2-Zellen wurde in 10-er Verdünnungsschritten eingesetzt (von rechts nach links): 1000 ng RNA (pur), 100 ng RNA (1:10), 10 ng RNA (1:100), 1 ng RNA (1:1000)

Zur Kontrolle von Größe und Reinheit der bereits validierten RT-PCR-Produkte⁸¹ wurden diese außerdem in einem 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Länge der erhaltenen LXR α -Amplifikate entsprach dabei der erwarteten Länge von 142 bp (Abbildung 15).

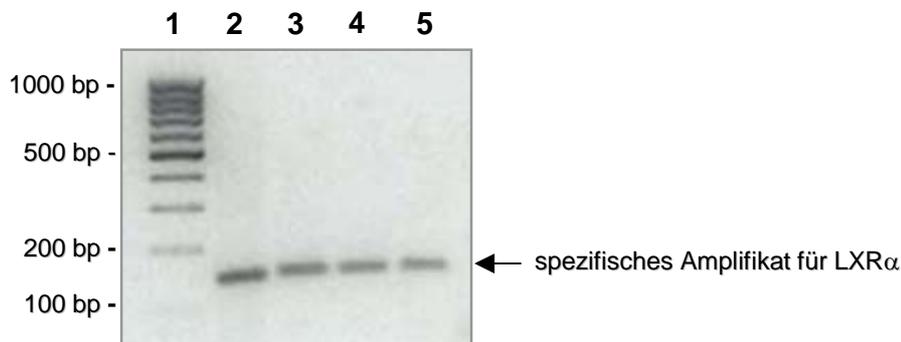


Abbildung 15: Größen- und Reinheitskontrolle spezifischer LXR α -Amplifikate im 1,5 %-igen Agarosegel. Gesamt-RNA von CaCo-2-Zellen wurde in 10-er Verdünnungsschritten eingesetzt (von links nach rechts): 1 = DNA-Standard (100-1000 bp), 2 = 1000 ng RNA (pur), 3 = 100 ng RNA (1:10), 4 = 10 ng RNA (1:100), 5 = 1 ng RNA (1:1000)

Die entstandenen Produkte wurde nach Beendigung jedes PCR-Laufs auch durch eine Analyse der Schmelzkurve (3.5.4.2) überprüft (Abbildung 16). Als interne Kontrolle (housekeeping gene) diente β -Aktin, da es in CaCo-2-Zellen auch unter experimenteller Behandlung eine konstante Expression aufwies (3.5.4.3).

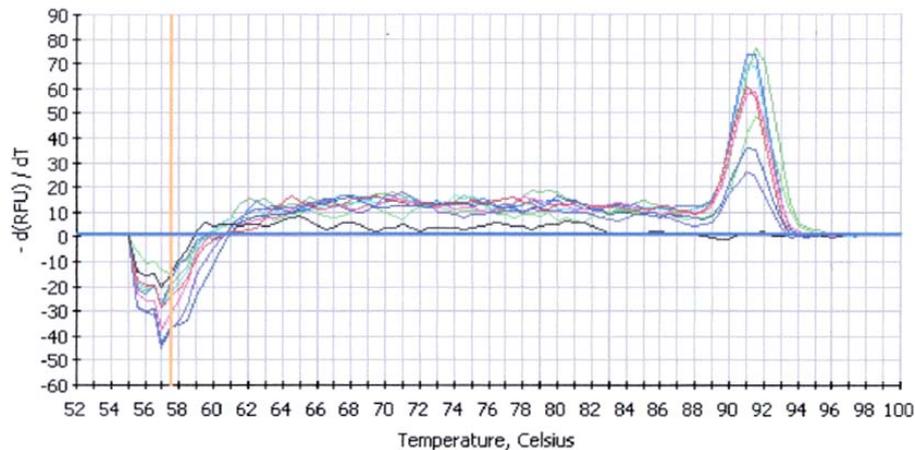


Abbildung 16: Schmelzkurvenanalyse spezifischer Amplifikate von CaCo-2-Zellen mittels quantitativer Real-time RT-PCR unter Verwendung von SYBR Green I. Die Abbildung zeigt die Negativkontrolle als Einfachwert (schwarz) und Doppelwerte für LXR α -Amplifikate

4.2 Effekte von Hydroxysterolen auf die Transkription in CaCo-2-Zellen

4.2.1 Expression ABCA1-spezifischer mRNA

Die Wirkung synthetischer Oxystigmasterole auf den Cholesterinexporter ABCA1 wurde zunächst auf Transkriptionsebene überprüft. Vor Einsatz der eigentlichen Testsubstanzen wurden im Vorfeld Versuche mit weiteren Sterolen, von denen agonistische Effekte publiziert waren, durchgeführt.

Die Zellen wurden für 3 und 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle, dem RXR-Liganden 9-cis RA (1 μ M) oder den putativen physiologischen LXR α -Liganden 22(R)-OHC (10 μ M), 24(S)-OHC (10 μ M) bzw. 25-OHC (10 μ M) jeweils in Kombination mit 9-cis RA inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und ABCA1 mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

Sowohl nach 3 als auch nach 24 h zeigte sich eine signifikante und mit 22(R)-OHC vergleichbare Induktion der mRNA-Transkription von ABCA1 durch eine Koinkubation der Zellen mit 24(S)-OHC und 9-cis-RA, während 25-OHC mit 9-cis-RA ABCA1 etwas geringer stimulierte (Abbildung 17).

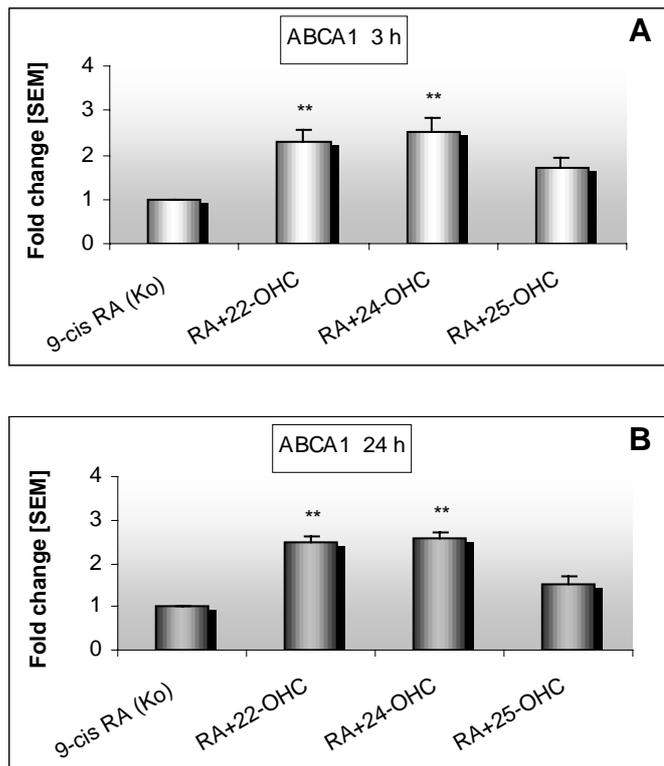


Abbildung 17: Expression ABCA1-spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 1 μ M 9-cis RA (Kontrolle) oder 10 μ M 22(R)-OHC (Positivkontrolle), 24(S)-OHC bzw. 25-OHC jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-6 \pm$ SEM; Rangvarianzanalyse (A bzw. B): $p \leq 0,01$; Paarvergleich zur Kontrolle: ** : $p \leq 0,01$).

4.2.2 Expression LXR α -spezifischer mRNA

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse (4.2.1), die eine deutliche Induktion der Transkription des LXR-abhängigen Cholesterinexporters ABCA1 durch eine Stimulation mit Seitenkettenhydroxycholesterolen zeigten, wurde nachfolgend der Transkriptionsfaktor LXR α selbst auf eine Induktion der mRNA-Expression hin untersucht.

Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben. Nach Etablierung des Transkriptionsfaktors LXR α (4.1) wurde zur Durchführung der Amplifikation und Quantifizierung von LXR α mittels Real-time RT-PCR identische Gesamt-RNA aus den Versuchen zur mRNA-Expression von ABCA1 verwendet (4.2.1).

Wie in Abbildung 18 dargestellt, ist für die Stimulation der ABCA1-Transkription zumindest bis 24 h keine vermehrte Transkription von LXR α nötig. Die Inkubation mit Seitenkettenhydroxycholesterolen ergab weder bei 3 noch bei 24 h eine signifikante Induktion von LXR α .

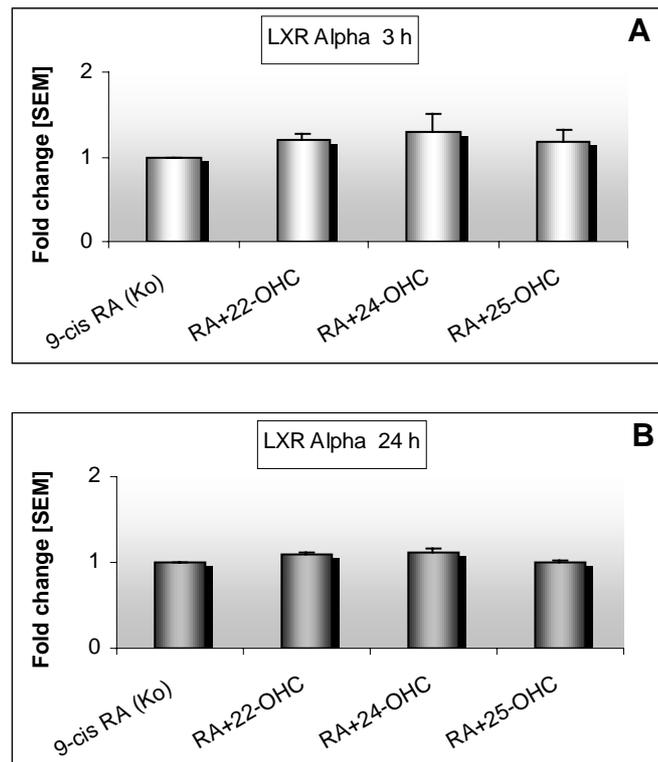


Abbildung 18: Expression LXR α -spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 1 μ M 9-cis RA (Kontrolle) oder 10 μ M 22(R)-OHC (Positivkontrolle), 24(S)-OHC bzw. 25-OHC jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-6 \pm SEM$).

4.3 Effekte von nativen Phytosterolen und Desmosterol auf die Transkription in CaCo-2-Zellen

4.3.1 Expression ABCA1-spezifischer mRNA

Im Folgenden wurden die nativen Phytosterole Stigmasterol und β -Sitosterol bezüglich der Expression ABCA1-spezifischer mRNA untersucht. Außerdem wurde auch Desmosterol getestet, das in der Literatur jüngst als potentiell LXR α -agonistisches Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese beschrieben wurde. Es handelt sich hierbei um einen an Position C-24 der Seitenkette noch ungesättigten Vorläufer des Cholesterins⁸⁹.

Dazu erfolgte analog dem in Kapitel 4.2.1 bereits erläuterten Versuchsaufbau die Stimulation für 3 und 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M, Kontrolle) oder nativem Stigmasterol (10 μ M), β -Sitosterol (10 μ M) bzw. Desmosterol (10 μ M) jeweils in Kombination mit 9-cis RA. Auch hier wurde 22(R)-

OHC (10 μM) zusammen mit 9-cis RA als Positivkontrolle eingesetzt und alle Proben auf 9-cis RA als Kontrolle bezogen.

Es konnte zu keiner der beiden Inkubationszeiten eine wesentliche Stimulation der Transkription von ABCA1 durch natives Stigmasterol, β -Sitosterol oder Desmosterol festgestellt werden (Abbildung 19).

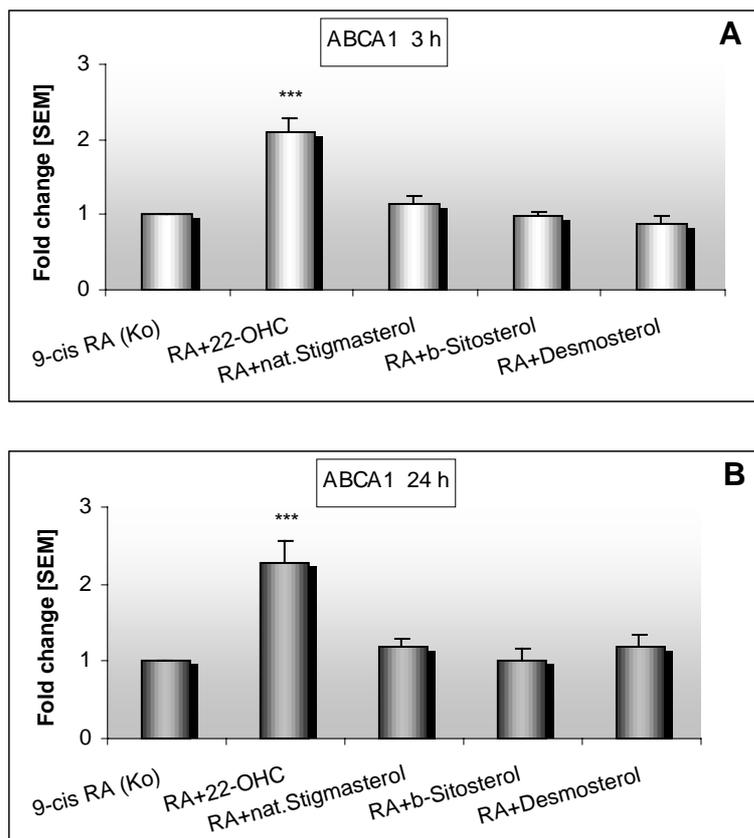


Abbildung 19: Expression ABCA1-spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 1 μM 9-cis RA (Kontrolle) oder 10 μM 22(R)-OHC (Positivkontrolle), nativem Stigmasterol, β -Sitosterol bzw. Desmosterol jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-9 \pm \text{SEM}$; Rangvarianzanalyse (A bzw. B): $p \leq 0,001$; Paarvergleich zur Kontrolle: *** : $p \leq 0,001$).

4.3.2 Expression LXR α -spezifischer mRNA

Obwohl eine Induktion der Expression ABCA1-spezifischer mRNA durch native Sterole nicht nachgewiesen werden konnte, wurde auch die Transkription von LXR α untersucht.

Die Amplifikation und Quantifizierung des Transkriptionsfaktors LXR α wurde ebenfalls (vgl. Kapitel 4.2.2) unter Verwendung der entsprechenden Gesamt-RNA

mittels Real-time RT-PCR durchgeführt; der Versuchsaufbau erfolgte wie bereits beschrieben (vgl. Kapitel 4.3.1).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Stimulation der CaCo-2-Zellen mit 22(R)-OHC, nativem Stigmasterol, β -Sitosterol oder Desmosterol für 3 und 24 h keine Induktion der Expression von LXR α auf mRNA-Ebene bewirkte (Abbildung 20).

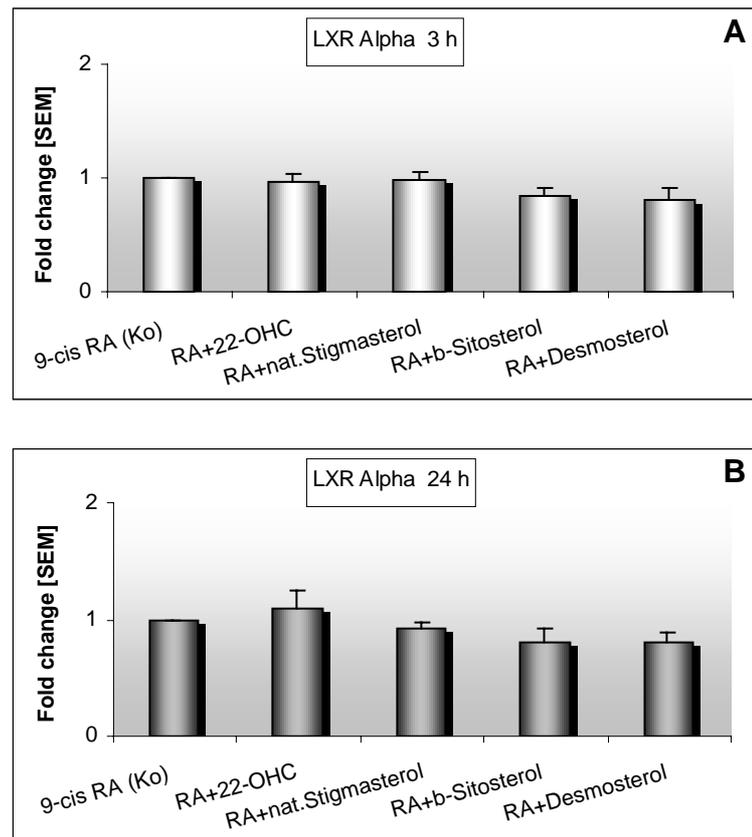


Abbildung 20: Expression LXR α -spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 1 μ M 9-cis RA (Kontrolle) oder 10 μ M 22(R)-OHC (Positivkontrolle), nativem Stigmasterol, β -Sitosterol bzw. Desmosterol jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-9 \pm SEM$).

4.4 Effekte von Oxystigmasterolen auf die Transkription in CaCo-2-Zellen

4.4.1 Einteilung der Oxystigmasterole

Die durch chemische Oxidation von nativem Stigmasterol hergestellten Oxystigmasterole (3.7.2.4) wurden im selben System getestet. Abbildung 21 zeigt

eine Silikadünnschichtchromatographie (3.7.2.1) der wichtigsten Oxidationsprodukte und deren Auftrennung aufgrund ihrer Polarität.

Aus dem Laufverhalten ergab sich die Aufteilung in eine Gruppe der polareren und eine Gruppe der weniger polaren Oxystigmasterole. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die beiden Gruppen von Oxystigmasterolen in Tabelle 10 dargestellt. Da auch bei 5,6 β -Epoxytigmasterol aufgrund des nicht mehr planaren Sterolringgerüsts die 3 β -OH-Gruppe und die Epoxygruppe nur schwer gleichzeitig zugänglich sind, wurden die 5,6-Epoxytigmasterole bei der weniger polaren Gruppe eingeordnet.

Bei den meisten chemisch synthetisierten Oxystigmasterolen konnte auch präparativ eine hohe Reinheit erreicht werden. Einige Produkte konnten aber durch Festphasenextraktion mit Gradientenelution nicht vollständig getrennt werden. Betrug ein Nebenanteil noch 10 % der Hauptkomponente wurden diese bei der Benennung an zweiter Stelle genannt. Um potentielle stark bioaktive, aber quantitativ geringe Metaboliten nicht durch die Aufreinigung zu verlieren, wurden auch 2 Oxidationsgemische nur nach einfacher Aufreinigung getestet. Die identifizierten Komponenten der Gemische sind in Tabelle 11 dargestellt.

Im Rahmen der Oxidation von Stigmasterol entstand auch ein Produkt, das bisher als einziges Stigmasterolderivat nicht sicher identifiziert werden konnte. Dieser Metabolit wurde als „unbekannte Verbindung“ bezeichnet. In der TLC zeigte er ein für an der Seitenkette hydroxylierte Sterole typisches Laufverhalten. Dies konnte durch GC/MS aber ausgeschlossen werden.

In Abbildung 22 sind die chemischen Strukturen der jeweiligen Oxystigmasterole zusammengefasst. Die Gaschromatogramme und Massenspektren der getesteten Oxystigmasterole bzw. ihrer Gemische können dem Anhang entnommen werden.

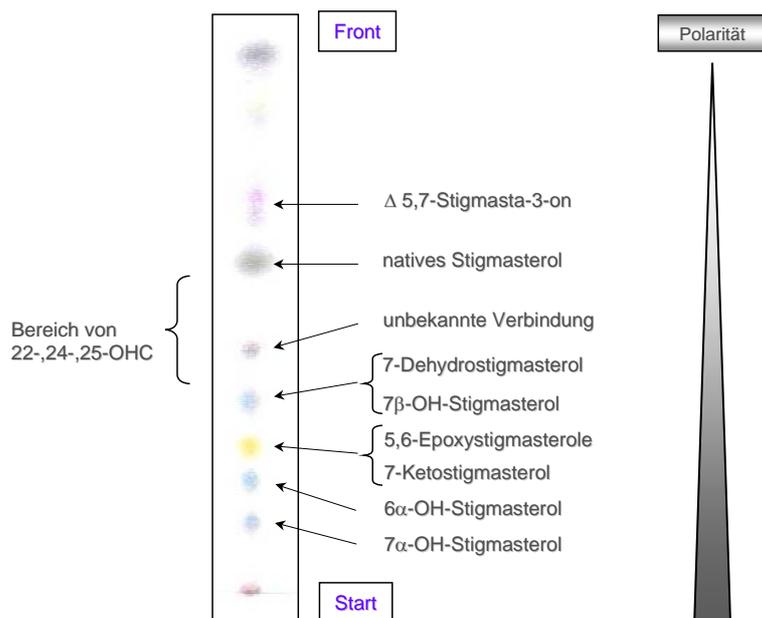


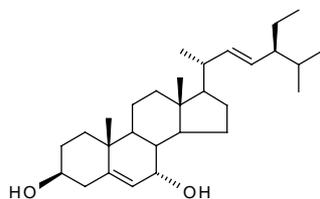
Abbildung 21: Dünnschichtchromatographie (TLC) der wichtigsten durch chemische Oxidation von nativem Stigmasterol synthetisierten Oxystigmasterole und deren Aufreihung nach ihrer Polarität

Tabelle 10: Klassifizierung der synthetisch hergestellten Oxystigmasterole in zwei Gruppen

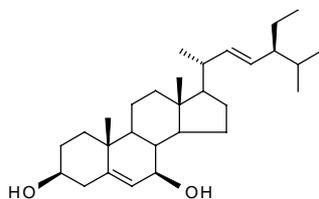
I. POLARERE OXYSTIGMASTEROLE	II. WENIGER POLARE OXYSTIGMASTEROLE
1) 7 α -Hydroxystigmasterol	1) 7-Dehydrostigmasterol + 7 β -Hydroxystigmasterol
2) 7 β -Hydroxystigmasterol	2) 5 α ,6 α -Epoxystigmasterol + 5 β ,6 β -Epoxystigmasterol
3) 7-Ketostigmasterol	3) oxidiertes Stigmasterol-Gemisch 2
4) 6 α -Hydroxystigmasterol + 7-Ketostigmasterol	4) unbekannte Verbindung
5) oxidiertes Stigmasterol-Gemisch 1	5) $\Delta^{5,7}$ -Stigmasta-3-on

Tabelle 11: Zusammensetzung der Oxystigmasterol-Gemische

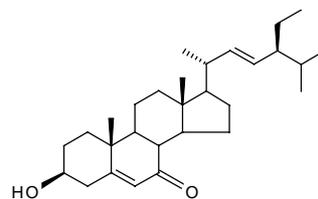
OXIDIERTES STIGMASTEROL-GEMISCH 1	OXIDIERTES STIGMASTEROL-GEMISCH 2
▶ 6 α -Hydroxystigmasterol	▶ natives Stigmasterol
▶ 7 α -Hydroxystigmasterol	▶ 7-Dehydrostigmasterol
▶ 7-Dehydrostigmasterol	▶ 7 β -Hydroxystigmasterol
▶ 7 β -Hydroxystigmasterol	
▶ 7-Ketostigmasterol	
▶ 5 β ,6 β -Epoxystigmasterol	



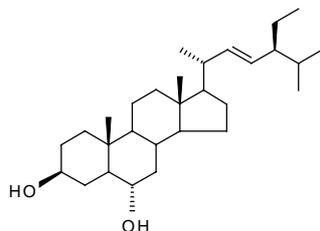
7 α -Hydroxystigmasterol
(24S)-Ethylcholest-5,22-dien-3 β ,7 α -diol



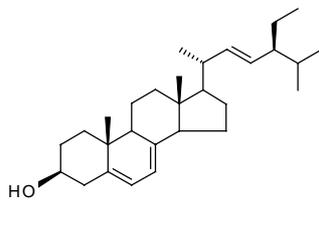
7 β -Hydroxystigmasterol
(24S)-Ethylcholest-5,22-dien-3 β ,7 β -diol



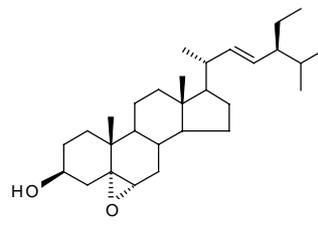
7-Ketostigmasterol
(24S)-Ethylcholest-5,22-dien-3 β -ol-7-on



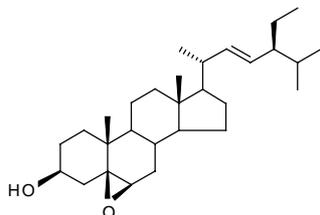
6 α -Hydroxystigmasterol
(24S)-Ethylcholest-22-en-3 β ,6 α -diol



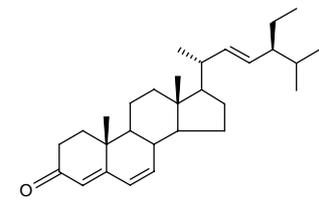
7-Dehydrostigmasterol
(24S)-Ethylcholest-5,7,22-trien-3 β -ol



5 α ,6 α -Epoxystigmasterol
(24S)-5 α ,6 α -Epoxy-24-ethylcholest-22-en-3 β -ol



5 β ,6 β -Epoxystigmasterol
(24S)-5 β ,6 β -Epoxy-24-ethylcholest-22-en-3 β -ol



Δ 5,7-Stigmasta-3-on
(24S)-Ethylcholest-4,6,22-trien-3-on

Abbildung 22: Chemische Struktur der synthetischen Oxystigmasterole

4.4.2 Expression ABCA1-spezifischer mRNA bei polareren Oxystigmasterolen

Analog zu den vorangegangenen Versuchen wurden CaCo-2-Zellen für 3 und 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M) als Kontrolle oder 22(R)-OHC (10 μ M) in Kombination mit 9-cis RA als Positivkontrolle bzw. mit den oben genannten Oxystigmasterolen kombiniert mit 9-cis RA inkubiert. Die Oxystigmasterole wurden meist in 2 verschiedenen Konzentrationen (10 und 20 μ M) eingesetzt, um geringere Aktivitäten nicht zu übersehen und toxische Effekte zu vermeiden. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde ABCA1-spezifische mRNA mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Nach den chemischen Eigenschaften bzw. der Struktur der synthetischen Oxystigmasterole wurden diese, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, in zwei Gruppen eingeteilt.

Innerhalb der Gruppe der polareren Oxystigmasterole (Abbildung 23) zeigte sich bei 3-stündiger Inkubation hinsichtlich der Induktion der Expression ABCA1-spezifischer mRNA noch eine relativ große Varianz. So induzierten z.B. 7 α -Hydroxystigmasterol bzw. 7 β -Hydroxystigmasterol in der niedrigeren Konzentration die Transkription von ABCA1 nicht bzw. nur tendenziell. 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol sowie das oxidierte Stigmasterol-Gemisch 1 induzierten nur gering und 7-Ketostigmasterol mäßig stark. Bei einer Behandlung für 24 h ergab sich mit Ausnahme von 7 β -Hydroxystigmasterol, das am geringsten stimulierte, bei allen Substanzen eine geringe bis mäßige Induktion. Meist zeigte sich mit der höher eingesetzten Konzentration keine weitere Steigerung der Stimulation.

Parallel zu den Oxystigmasterolen wurden auch Inkubationen der CaCo-2-Zellen mit einem Oxidationsblank durchgeführt. Dieser wurde exakt nach dem Protokoll, das auch für die chemische Oxidation von Stigmasterol verwendet wurde, hergestellt. Dabei erfolgte die Durchführung der Prozedur jedoch alleinig mit den notwendigen Chemikalien ohne die Zugabe von Stigmasterol. Die Testung des Oxidationsblanks sollte sicherstellen, dass nicht eventuell vorhandene Rückstände der verwendeten Chemikalien selbst eine Induktion der mRNA-Transkription bewirkten und damit einen agonistischen Effekt bestimmter Oxystigmasterole vortäuschen könnten.

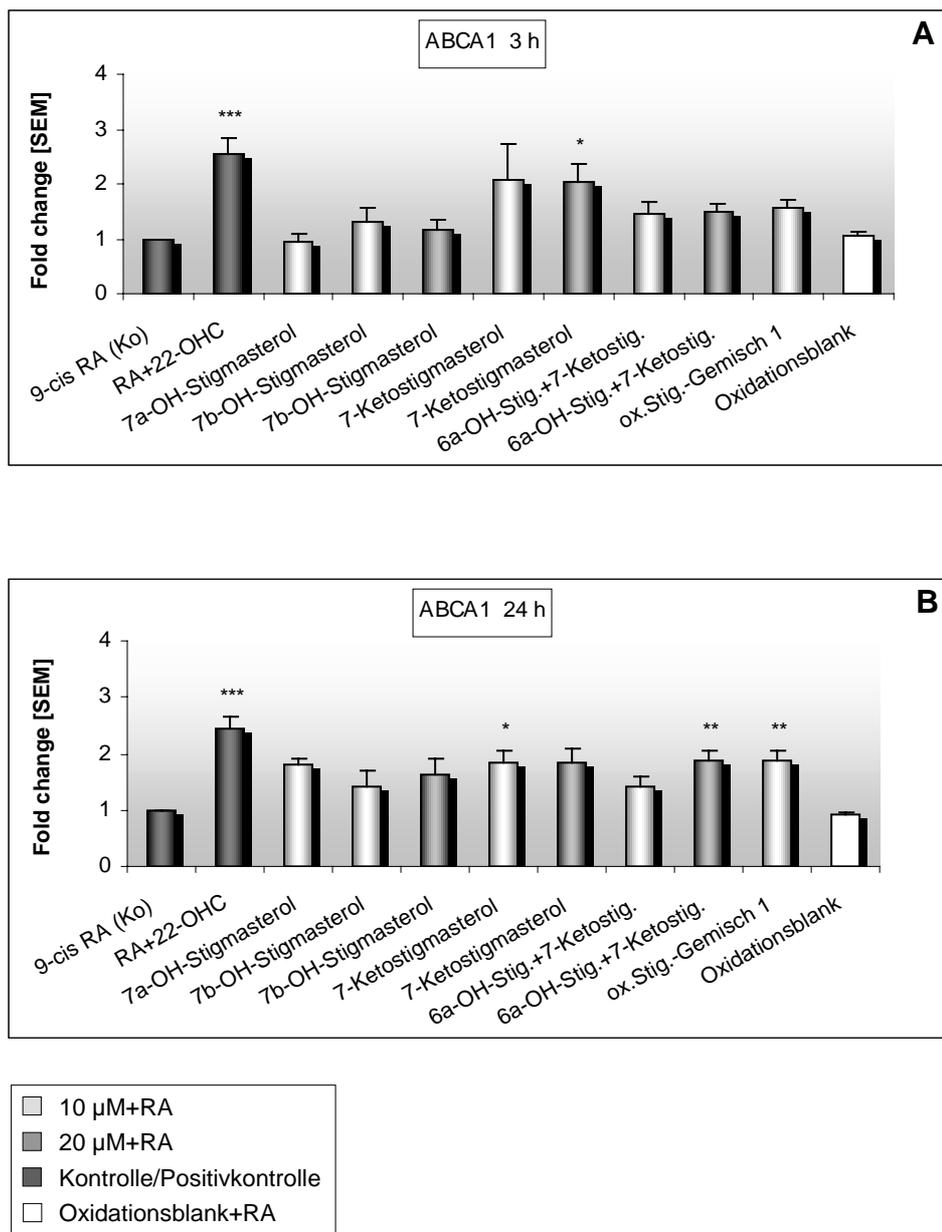


Abbildung 23: Expression ABCA1-spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 µM, Kontrolle) oder 22(R)-OHC (10 µM, Positivkontrolle), polaren Oxystigmasterolen (10 µM bzw. 10 und 20 µM) bzw. dem Oxidationsblank jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-5 \pm SEM$; Rangvarianzanalyse (A bzw. B): $p \leq 0,001$; Paarvergleich zur Kontrolle: * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$).

4.4.3 Expression ABCA1-spezifischer mRNA bei weniger polaren Oxystigmasterolen

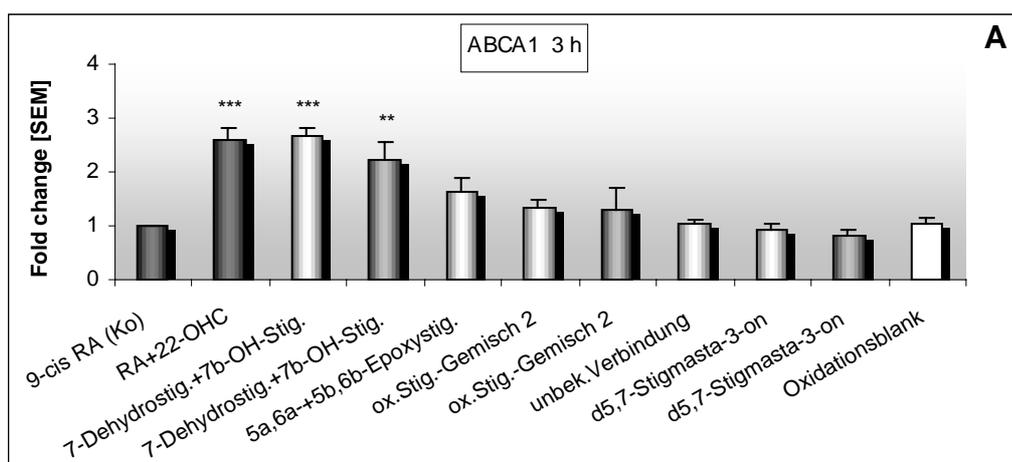
Die Inkubationen mit der Gruppe der weniger polaren Oxystigmasterole erfolgten nach der in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Versuchsanordnung. Wie bei den polaren Oxystigmasterolen fand auch hier eine Exposition der CaCo-2-Zellen für

jeweils 3 und 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M) als Kontrolle bzw. 22(R)-OHC (10 μ M) in Kombination mit 9-cis RA als Positivkontrolle oder den weniger polaren Oxystigmasterolen (10 bzw. 10 und 20 μ M) bzw. dem Oxidationsblank jeweils kombiniert mit 9-cis RA statt.

Die Amplifikation und Quantifizierung ABCA1-spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR zeigte bei einer Inkubationsdauer von 3 h bei 7-Dehydrostigmasterol/7 β -Hydroxystigmasterol eine deutliche und bei den 5,6-Epoxytigmasterolen eine geringe Induktion der Transkription von ABCA1 (Abbildung 24). Die übrigen, weniger polaren Stigmasterolderivate zeigten keine bzw. bestenfalls eine tendenzielle Induktion. Bei einer Behandlung der CaCo-2-Zellen für 24 h konnte durch keine der Testsubstanzen mehr eine relevante Stimulation der Expression von ABCA1 bewirkt werden.

Zusammenfassend ergibt sich eine weitgehend uniforme, aber verzögerte Stimulation der ABCA1-spezifischen mRNA-Transkription durch die polarerer Oxystigmasterole. Von den weniger polaren Oxystigmasterolen stimulierten die 7-Dehydrostigmasterol/7 β -Hydroxystigmasterol-Gemische den mRNA-Spiegel von ABCA1 stärker und rascher, aber nicht anhaltend. Da 7 β -Hydroxystigmasterol allein eher eine späte Induktion gezeigt hatte, könnte die frühere Induktion durch das Gemisch vor allem auf 7-Dehydrostigmasterol beruhen.

Die parallel durchgeführten Inkubationen mit dem Oxidationsblank ergaben insgesamt keine Induktion der mRNA-Transkription von ABCA1 (Abbildung 23, Abbildung 24).



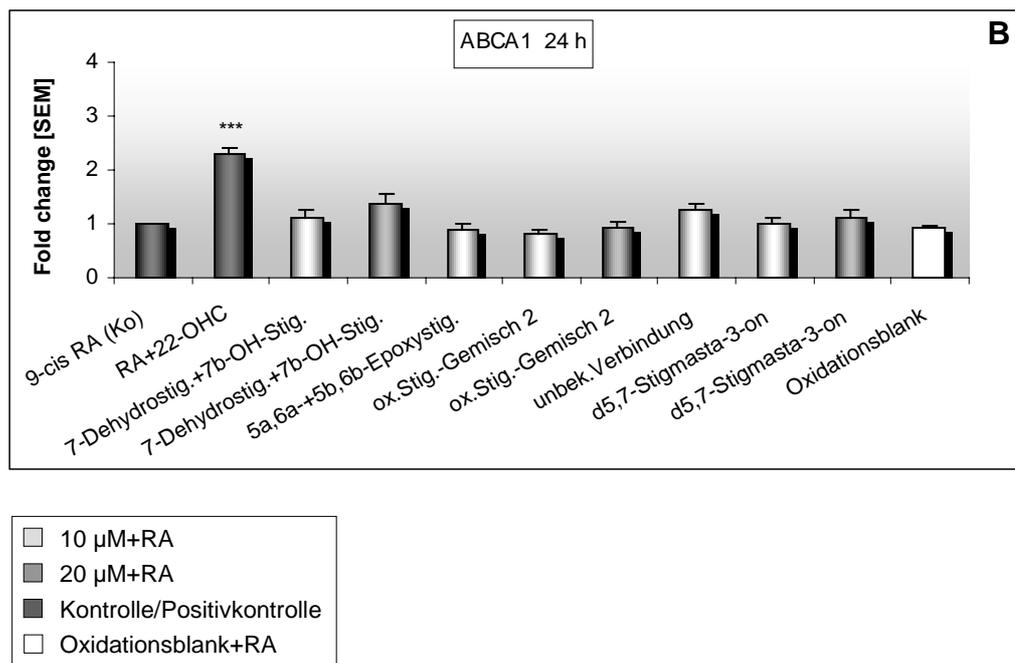


Abbildung 24: Expression ABCA1-spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 µM, Kontrolle) oder 22(R)-OHC (10 µM, Positivkontrolle), weniger polaren Oxystigmasterolen (10 µM bzw. 10 und 20 µM) bzw. dem Oxidationsblank jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-5 \pm SEM$; Rangvarianzanalyse (A bzw. B): $p \leq 0,001$; Paarvergleich zur Kontrolle: ** : $p \leq 0,01$, *** : $p \leq 0,001$).

4.4.4 Expression LXR α -spezifischer mRNA bei polarerer Oxystigmasterolen

Aus denselben Proben wurde auch LXR α -mRNA quantifiziert.

Die Stimulation der CaCo-2-Zellen führte dabei weder bei 3 noch bei 24 h zu einer relevanten Induktion der Transkriptionsfaktors LXR α (Abbildung 25). Im Hinblick auf die in Kapitel 4.4.2 dargestellten Resultate, die den Nachweis einer unterschiedlich starken Induktion der mRNA-Expression von ABCA1 insbesondere bei 24 h lieferten, ist offensichtlich auch bei den polarerer Oxystigmasterolen hierfür keine vermehrte Transkription von LXR α zumindest bis 24 h nötig (vgl. Kapitel 4.2.2 und 4.3.2).

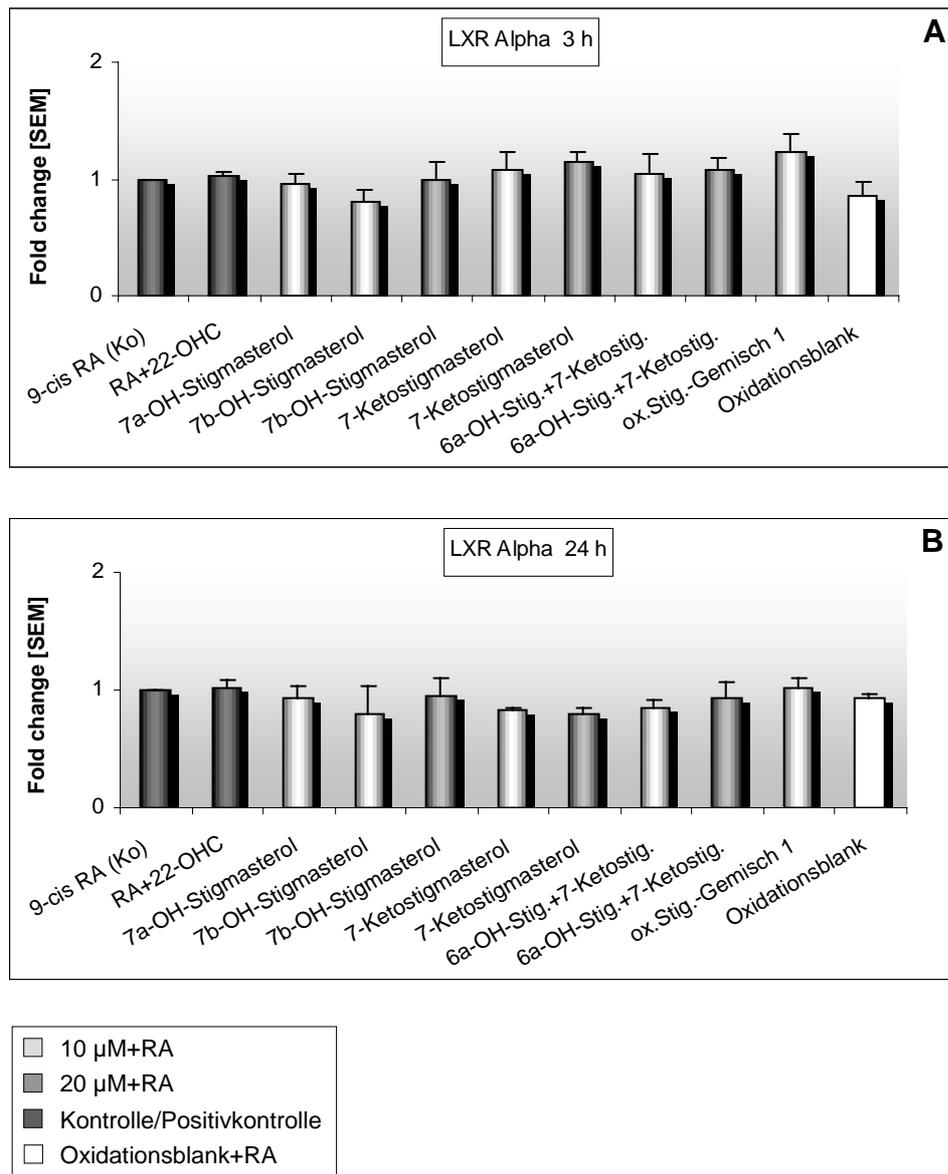


Abbildung 25: Expression LXR α -spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M, Kontrolle) oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle), polaren Oxystigmasterolen (10 μ M bzw. 10 und 20 μ M) bzw. dem Oxidationsblank jeweils in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-5 \pm SEM$; Rangvarianzanalyse (A): $p \leq 0,05$).

4.4.5 Expression LXR α -spezifischer mRNA bei weniger polaren Oxystigmasterolen

Zur Durchführung der Amplifikation und Quantifizierung LXR α -spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR wurde identische Gesamt-RNA aus den in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Versuchen eingesetzt.

Ähnlich wie bei den polareren Oxystigmasterolen (vgl Kapitel 4.4.4) bewirkte auch die Stimulation der CaCo-2-Zellen mit der Gruppe der weniger polaren Oxystigmasterole für 3 und 24 h keine signifikant vermehrte Transkription von LXR α (Abbildung 26).

Die Exposition der Zellen mit der Blankkontrolle blieb, wie zuvor bei ABCA1 (4.4.3), ohne Effekt (Abbildung 25, Abbildung 26).

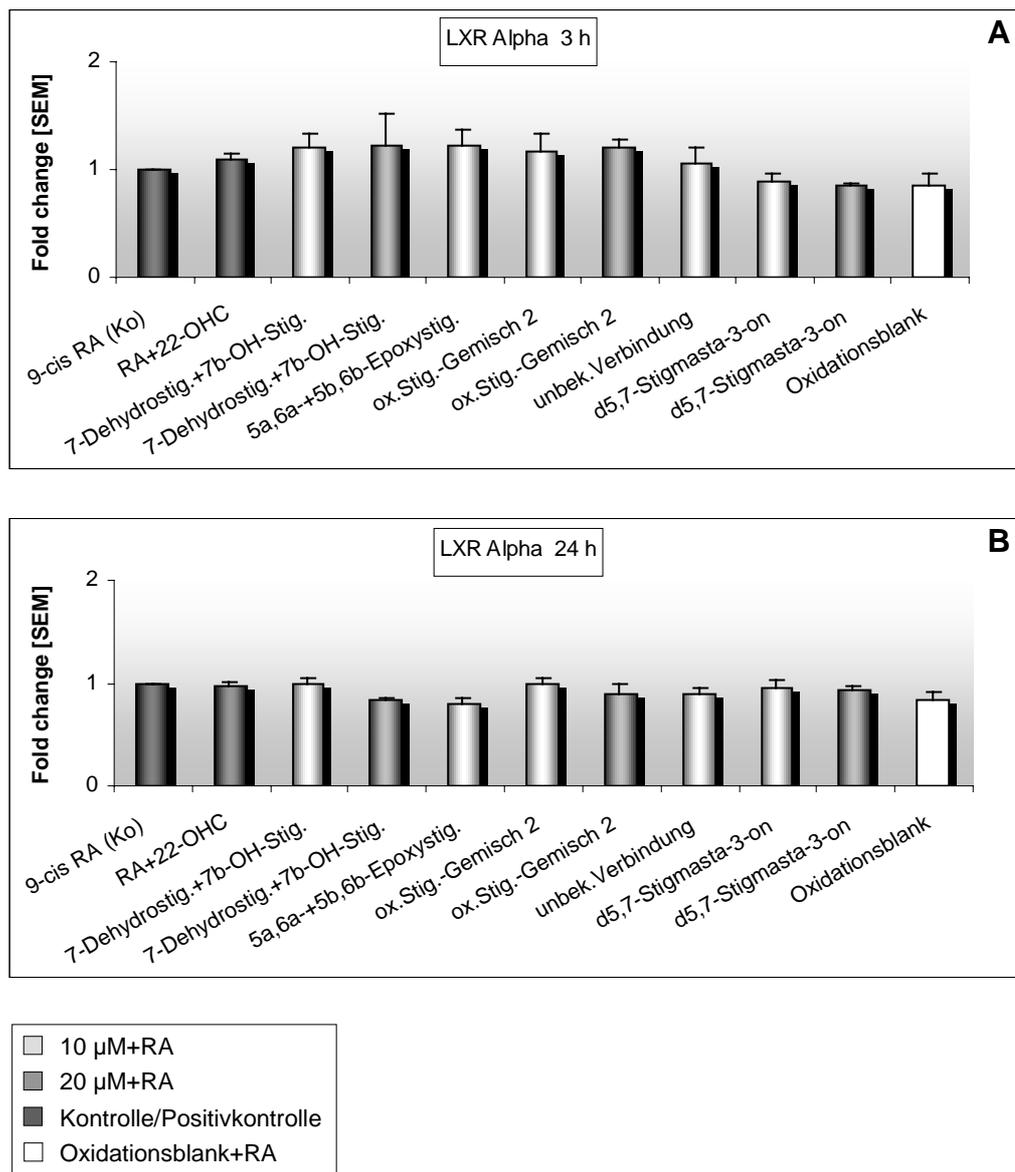


Abbildung 26: Expression LXR α -spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M, Kontrolle) oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle), weniger polareren Oxystigmasterolen (10 μ M bzw. 10 und 20 μ M) bzw. dem Oxidationsblank in Kombination mit 9-cis RA behandelt ($n = 4-5 \pm SEM$; Rangvarianzanalyse (A): $p \leq 0,05$).

4.5 Effekte von nativen Phytosterolen und Desmosterol auf die Aktivierung von LXRE in CaCo-2-Zellen

Um die Wirkung nativer Phytosterole bzw. Desmosterol als potentielle Liganden von LXR α auf Aktivierungsebene zu überprüfen, wurden CaCo-2-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt pCMV-LXRE-luc transient transfiziert und die Luciferaseaktivität bzw. folglich auch die LXR α -Aktivität unter Inkubation mit nativen Phytosterolen sowie Desmosterol gemessen.

Vor Durchführung des Reportergenassays mit Oxystigmasterolen wurde nochmals die Höhe und damit Erfordernis des synergistischen Effekts durch 9-cis RA überprüft. Dazu wurden CaCo-2-Zellen für 3 und 24 h mit den nativen Sterolen Stigmasterol, β -Sitosterol oder Desmosterol in einer Konzentration von 10 μ M jeweils ohne und mit 9-cis-RA inkubiert. Als Kontrolle für die nativen Sterole dienten jeweils das Lösungsmittel Ethanol bzw. 9-cis RA (1 μ M), auf welche die Sterolproben jeweils bezogen wurden, und als Positivkontrolle 22(R)-OHC (10 μ M) ohne und mit 9-cis RA.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigte die Inkubation der CaCo-2-Zellen im Vergleich zu 3 h bei 24 h in der LXRE-Aktivität einen deutlichen synergistischen Effekt bei Kombination von 22(R)-OHC mit 9-cis RA. Die 3-stündige Stimulation war nicht ausreichend für eine messbare Steigerung der hohen basalen Luciferaseaktivität. Deshalb wurde für die weiteren Versuche mit Oxystigmasterolen eine Inkubationsdauer von 24 h gewählt. Aufgrund des relativ geringen additiven Effekts der nativen Sterole mit 9-cis RA erfolgte die Behandlung der Zellen mit Oxystigmasterolen ohne 9-cis RA.

Von den nativen Sterolen selbst zeigte nur β -Sitosterol eine Tendenz zur LXR α -Stimulation, nicht aber Stigmasterol oder Desmosterol.

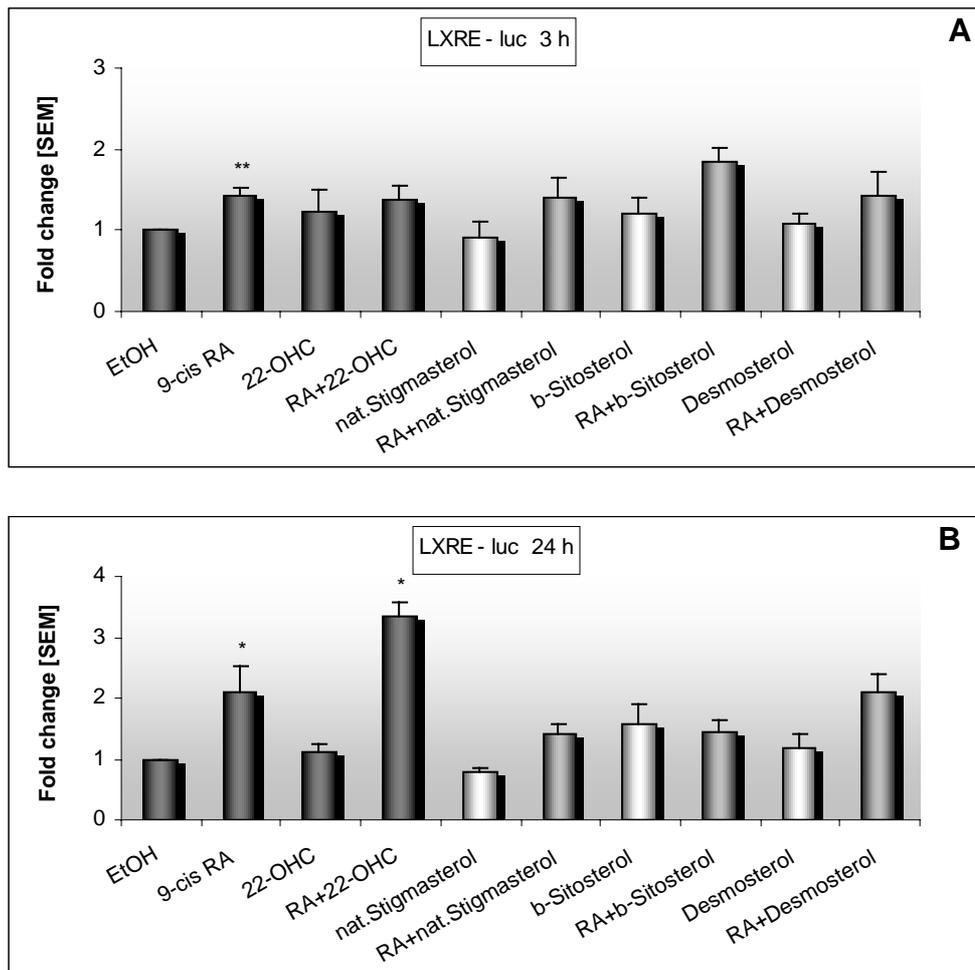


Abbildung 27: Aktivierung von LXRE mittels des Konstrukts pCMV-LXRE-luc im Reportergenassay. Transient transfizierte CaCo-2-Zellen wurden für 3 (A) und 24 h (B) mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M, Kontrolle) oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle) bzw. 22(R)-OHC (10 μ M) kombiniert mit 9-cis RA (1 μ M) als weitere Positivkontrolle oder 10 μ M nativem Stigmasterol, β -Sitosterol bzw. Desmosterol allein oder zusammen mit 9-cis RA inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der LXRE-abhängigen Luciferaseaktivität ($n = 5-8 \pm$ SEM; Rangvarianzanalyse (B, mit 9-cis RA): $p \leq 0,001$; Paarvergleich zur Kontrolle: * : $p \leq 0,05$, ** : $p \leq 0,01$).

4.6 Effekte polarerer Oxystigmasterole auf die Aktivierung von LXRE in CaCo-2-Zellen

Analog wurden transient transfizierte CaCo-2-Zellen für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle), polareren Oxystigmasterolen (10 μ M bzw. 10 und 20 μ M) bzw. dem Oxidationsblank behandelt.

Eine tendenzielle Induktion der LXRE-Luciferaseaktivität konnte nur bei 7 α -Hydroxystigmasterol, 7 β -Hydroxystigmasterol (20 μ M) und 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol festgestellt werden (Abbildung 28).

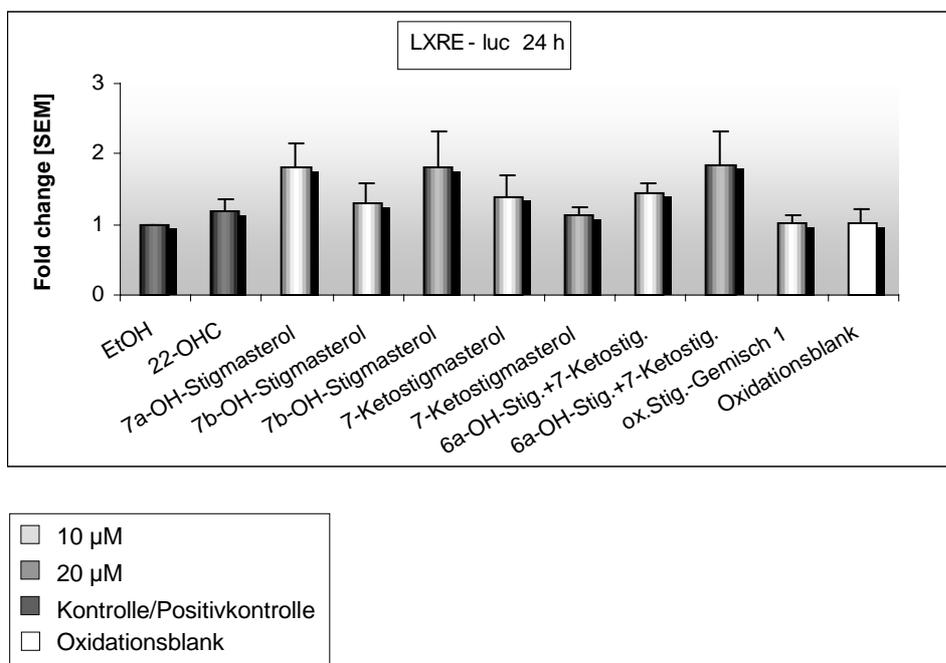


Abbildung 28: Aktivierung von LXRE mittels des Konstrukts pCMV-LXRE-luc im Reporterassay. Transient transfizierte CaCo-2-Zellen wurden für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle), polaren Oxystigmasterolen bzw. dem Oxidationsblank inkubiert und nachfolgend die LXRE-abhängige Luciferaseaktivität gemessen ($n = 6 \pm$ SEM).

4.7 Effekte weniger polarer Oxystigmasterole auf die Aktivierung von LXRE in CaCo-2-Zellen

Zur Testung der Gruppe der weniger polaren Oxystigmasterole hinsichtlich ihrer Effektivität auf die Aktivierung von LXRE wurden auch hier (vgl. Kapitel 4.6) transient transfizierte Zellen für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle), weniger polaren Oxystigmasterolen (10 μ M bzw. 10 und 20 μ M) bzw. dem Oxidationsblank inkubiert.

Allenfalls die weniger polaren Oxystigmasterolkombinationen, die nicht vollständig von 7 β -Hydroxystigmasterol gereinigt werden konnten, steigerten die Aktivierung von LXRE minimal (Abbildung 29).

Zusammenfassend konnte eine tendenzielle Aktivierung von LXR α durch 7 α -, 7 β -Hydroxystigmasterol, 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol und auch β -Sitosterol gefunden werden.

Die Exposition der Zellen mit dem Oxidationsblank hatte, wie erwartet, keine induzierende Wirkung auf die LXRE-Aktivierung (Abbildung 28, Abbildung 29).

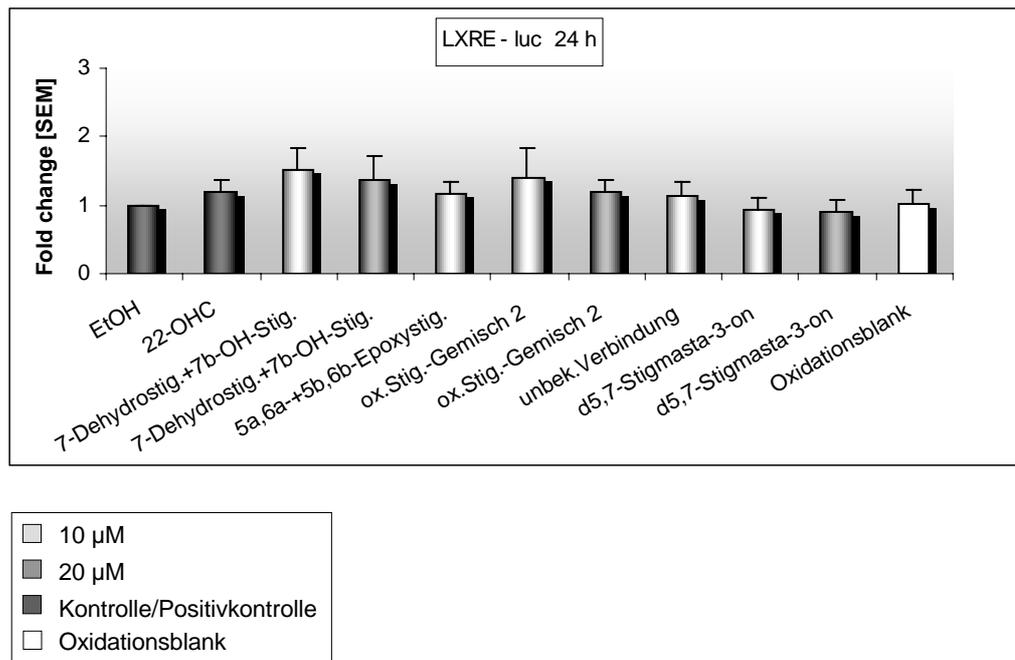


Abbildung 29: Aktivierung von LXRE mittels des Konstrukts pCMV-LXRE-luc im Reportergenassay. Transient transfizierte CaCo-2-Zellen wurden für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle), weniger polaren Oxystigmasterolen bzw. dem Oxidationsblank inkubiert und nachfolgend die LXRE-abhängige Luciferaseaktivität gemessen ($n = 6 \pm SEM$).

4.8 Proteinexpression von ABCA1 in CaCo-2-Zellen

Die Effekte auf ABCA1 sollten auch auf Proteinebene überprüft werden.

Vor Beginn der Experimente mit Oxystigmasterolen wurden auch hier die Inkubationsbedingungen ausgetestet.

4.8.1 Bestimmung der Kinetik der Proteinexpression von ABCA1 nach Inkubation mit 22(R)-OHC und 9-cis RA

Die Inkubationszeit, die für die Versuche mit Oxystigmasterolen eingesetzt werden sollte, wurde in einer Zeitreihe ermittelt. CaCo-2-Zellen wurden für 0, 3, 24 und 48

h mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol, 9-cis RA (1 μ M) oder 22(R)-OHC (10 μ M) bzw. 22(R)-OHC plus 9-cis RA inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression des Cholesterinexporters ABCA1 mittels Western Blot bestimmt.

Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurde das Housekeeping Gene β -Aktin eingesetzt. Dazu wurden die zuvor schon für ABCA1 verwendeten Membranen nochmals mit Anti- β -Aktin inkubiert. Nach einer Stimulation der Zellen für 24 h fand sich die stärkste Ausprägung der ABCA1-Proteinexpression. Dabei erwies sich 22(R)-OHC auch ohne Koinkubation mit 9-cis RA als stark stimulierende Positivkontrolle (Abbildung 30).

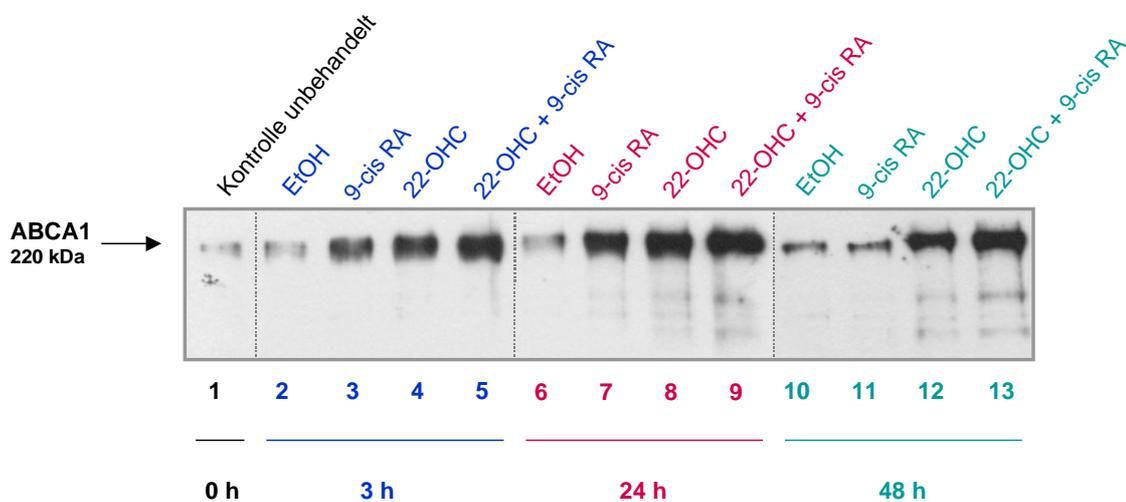


Abbildung 30: Proteinexpression von ABCA1 aus Gesamtproteinextrakten mittels Western Blot. CaCo-2-Zellen wurden für 0, 3, 24 und 48 h jeweils mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M) oder 22(R)-OHC (10 μ M) bzw. 22(R)-OHC kombiniert mit 9-cis RA inkubiert (Spur 2-13). Außerdem wurde parallel Gesamtproteinextrakt aus nativen (unbehandelten) Zellen (Spur 1) aufgetragen. Auftrag: 25 μ g Protein/Lane

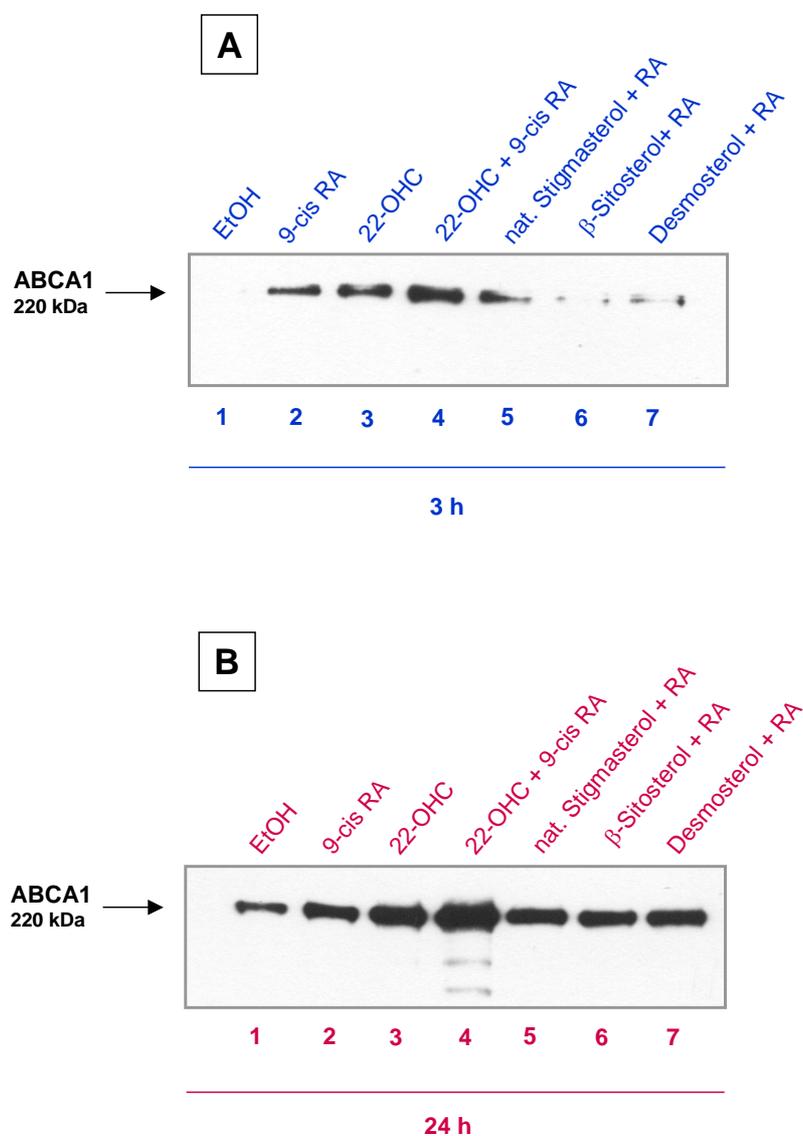
4.8.2 Bestimmung der Kinetik der Proteinexpression von ABCA1 nach Inkubation mit nativen Phytosterolen und Desmosterol

Des Weiteren sollte das Verhalten der Proteinexpression von ABCA1 unter nativen Phytosterolen oder Desmosterol allein und unter Koinkubation mit 9-cis RA überprüft werden.

CaCo-2-Zellen wurden für 3, 24 und 48 h mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol, 9-cis RA (1 μ M) oder 22(R)-OHC (10 μ M) bzw. 22(R)-OHC, 10 μ M nativem Stigmasterol, β -Sitosterol oder Desmosterol jeweils zusammen mit 9-cis RA

behandelt. Nach Extraktion des Gesamtproteins wurde die Proteinexpression von ABCA1 mittels Western Blot ermittelt.

Die Signalstärke der ABCA1-Bande stieg von 3 h bis 24 h generell deutlich an. 22(R)-OHC erwies sich erneut auch ohne 9-cis RA als effiziente Positivkontrolle. Die Stimulation durch native Sterole lag bei einer Inkubation für 3 h nur für Stigmasterol geringfügig über der Lösungsmittelkontrolle. ABCA1 fiel aber im Unterschied zur RA-Kontrolle bis 48 h unter Stigmasterol, β -Sitosterol und Desmosterol nicht wieder ab, sondern zeigte eher steigende Tendenz (Abbildung 31).



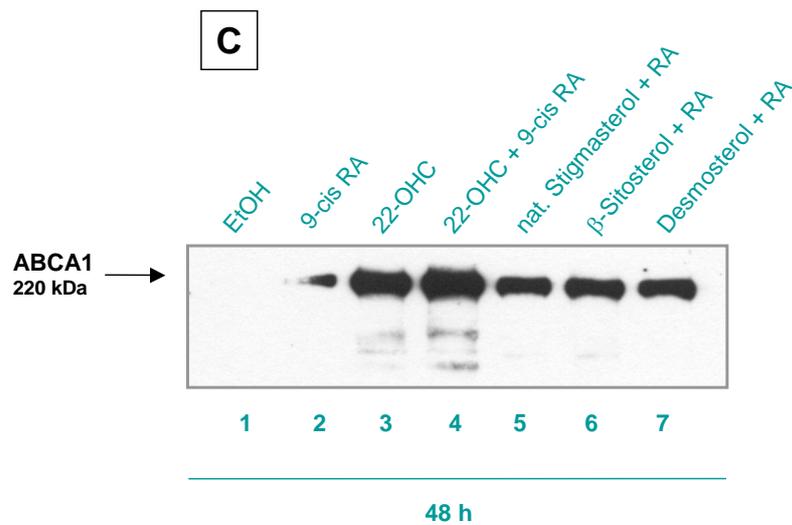


Abbildung 31: Proteinexpression von ABCA1 aus Gesamtproteinextrakten mittels Western Blot. CaCo-2-Zellen wurden für, 3, 24 und 48 h jeweils mit der Lösungsmittelkontrolle, 9-cis RA (1 μ M, Kontrolle) oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle) bzw. 22(R)-OHC kombiniert mit 9-cis RA inkubiert (A-C, Spur 1-4). Außerdem wurden die Zellen parallel mit je 10 μ M nativem Stigmasterol, β -Sitosterol oder Desmosterol zusammen mit 9-cis RA behandelt (A-C, Spur 5-7). Auftrag: 25 μ g Protein/Lane

Ohne Zugabe von 9-cis RA als zusätzlichem Agonisten zeigte sich, ähnlich wie in der zuvor beschriebenen Zeitreihe, ebenfalls eine Zunahme der Proteinexpression von ABCA1 von 3 h auf 24 h hin. Die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen 24 und 48 h waren gering. Deshalb wurde unter dem Aspekt der Vergleichbarkeit der bisherigen Ergebnisse für die nachfolgenden Ansätze mit Oxystigmasterolen eine Inkubationsdauer von 24 h gewählt. Aufgrund des geringen additiven Effekts von 9-cis RA (vgl. auch Kapitel 4.5) und der ausreichenden Stimulation der Proteinexpression durch die nativen Sterole allein, wurden die weiteren Experimente ohne 9-cis RA durchgeführt. 22(R)-OHC allein erwies sich wiederum auf Proteinebene als effektiver Positivstimulus. Native Phytosterole selbst zeigten nach Abgleich mit der Ladekontrolle keinen relevanten Effekt auf die Proteinexpression von ABCA1, während Desmosterol bei 24 h mäßig stimulierte (Abbildung 32).

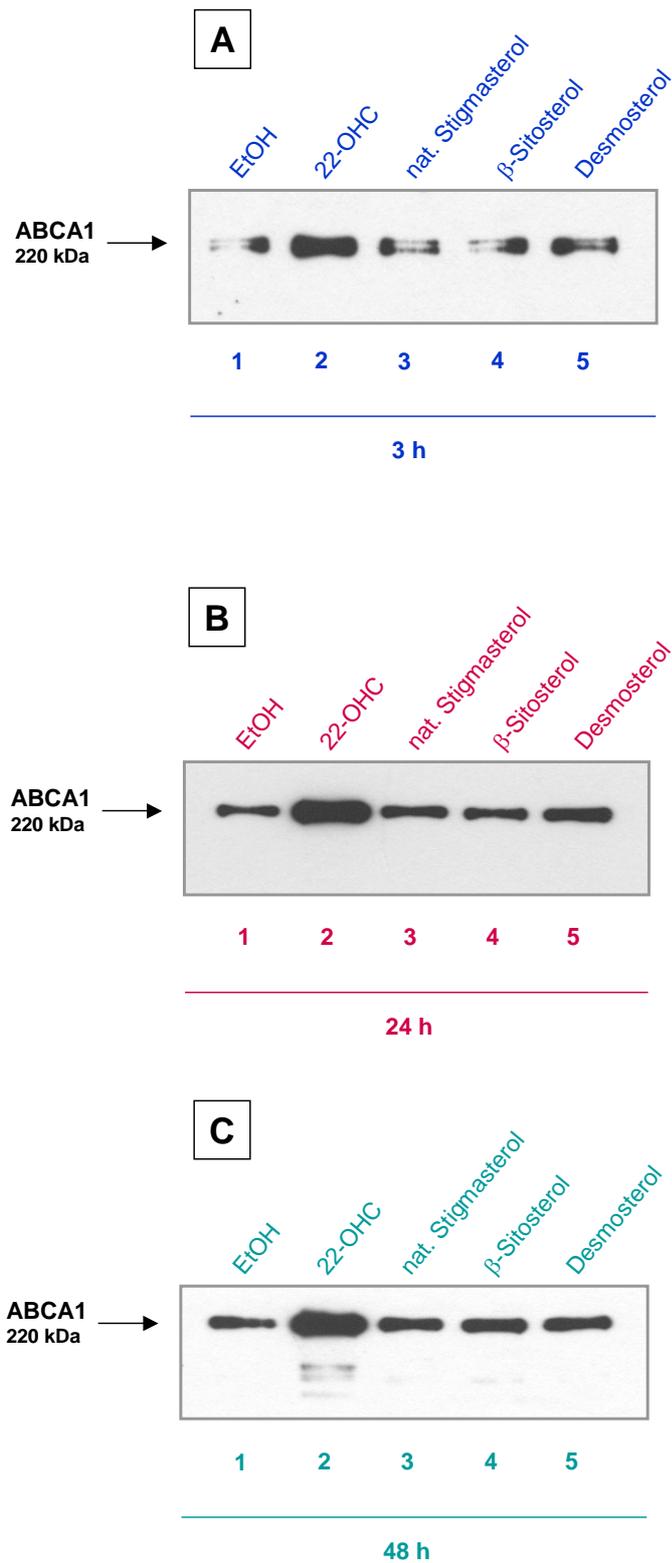


Abbildung 32.: Proteinexpression von ABCA1 aus Gesamtproteinextrakten mittels Western Blot. CaCo-2-Zellen wurden für 3, 24 und 48 h jeweils mit der Lösungsmittelkontrolle oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle) (A-C, Spur 1-2) bzw. mit je 10 μ M nativem Stigmasterol, β -Sitosterol oder Desmosterol (A-C, Spur 3-5) inkubiert. Auftrag: 25 mg Protein /Lane

4.8.3 Effekte polarerer Oxystigmasterole auf die Proteinexpression von ABCA1

Mit den fünf nach der RNA-Expression von ABCA1 effektivsten Oxystigmasterole aus der Gruppe der polareren Oxystigmasterole wurde auch der Effekt auf die ABCA1-Proteinexpression untersucht.

Für die Versuche wurden CaCo-2-Zellen für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle Ethanol oder der Positivkontrolle 22(R)-OHC (10 μ M) oder mit 7 β -Hydroxystigmasterol (20 μ M), 7-Ketostigmasterol (10 μ M), 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol (10 μ M), dem oxidierten Stigmasterol-Gemisch 1 (10 μ M) bzw. 7 α -Hydroxystigmasterol (10 μ M) behandelt (Abbildung 33).

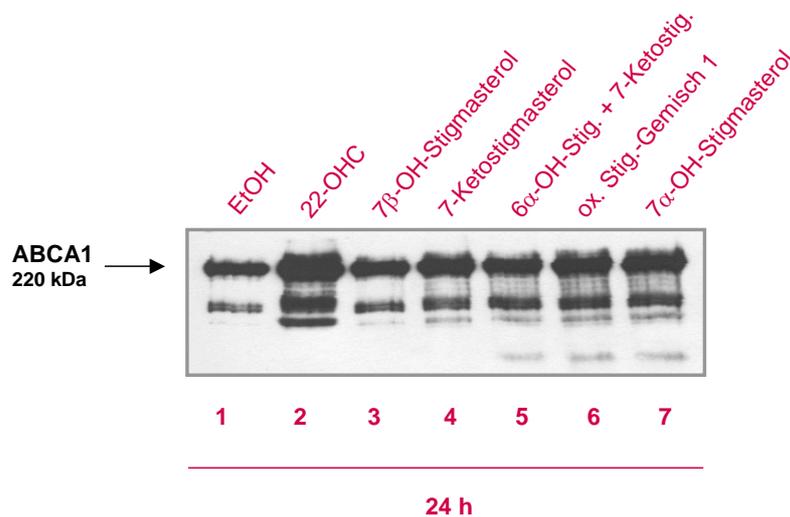


Abbildung 33: Proteinexpression von ABCA1 aus Gesamtproteinextrakten mittels Western Blot. CaCo-2-Zellen wurden für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle oder 22(R)-OHC (10 μ M, Positivkontrolle) oder 7 β -OH-Stigmasterol (20 μ M), 7-Ketostigmasterol (10 μ M), 6 α -OH-Stigmasterol/7-Ketostigmasterol (10 μ M), dem oxidierten Stigmasterol-Gemisch 1 bzw. 7 α -OH-Stigmasterol (10 μ M) inkubiert (Auftrag: 25 μ g Protein/Lane). In der Abbildung ist ein repräsentativer Blot aus vier Versuchen dargestellt.

Die quantitative densitometrische Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels des Auswertungsprogramms Image J für visualisierte Daten. Im Vergleich zur Ethanolkontrolle als Referenzkondition (=100 %) zeigte sich mit Ausnahme von 7 β -Hydroxystigmasterol und 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol eine signifikante Steigerung der Expression des ABCA1-Proteins durch die eingesetzten Oxystigmasterole (Abbildung 34). Dieser durch Oxystigmasterole induzierte Effekt war jedoch schwächer als durch 22(R)-OHC. Native Phytosterole hingegen hatten

keine induzierende Wirkung auf die Proteinexpression von ABCA1 gezeigt (Abbildung 32).

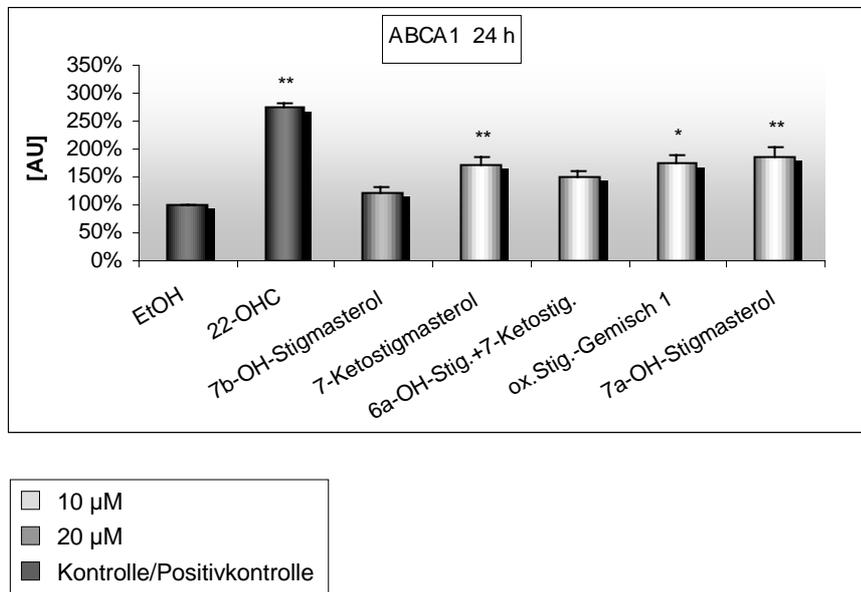


Abbildung 34: Densitometrische Immunoblotanalyse zur quantitativen Bestimmung der Effekte polarerer Oxystigmasterole auf die Proteinexpression von ABCA1. CaCo-2-Zellen wurden für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle oder 22(R)-OHC (10 µM, Positivkontrolle) oder 7β-OH-Stigmasterol (20 µM), 7-Ketostigmasterol (10 µM), 6α-OH-Stigmasterol/7-Ketostigmasterol (10 µM), dem oxidierten Stigmasterol-Gemisch 1 bzw. 7α-OH-Stigmasterol (10 µM) inkubiert (n = 4 ± SEM; Varianzanalyse: p ≤ 0,001; Paarvergleich zur Kontrolle: * : p ≤ 0,05, ** : p ≤ 0,01).

5 Diskussion

Oxyphytosterole wurden im Plasma gesunder Menschen erst vor wenigen Jahren nachgewiesen ¹⁹⁸. Dementsprechend existiert derzeit nur wenig detailliertes Wissen über die möglichen biologischen Effekte dieser Verbindungen beim Menschen. Angesichts der strukturellen Analogie zu Oxysterolen ¹⁸⁹, deren Funktion als aktivierende LXR-Liganden bereits bekannt ist ^{80,81,131,132}, sowie der potentiellen Bildung von Oxyphytosterolen als Metaboliten von Phytosterolen, wird nun auch über ähnliche Effekte von Oxyphytosterolen ¹⁹⁹⁻²⁰¹ spekuliert. Diese könnten über eine LXR α -Aktivierung und nachfolgende Regulation von Sterolexportern, wie ABCA1, einen günstigen Einfluss auf die lokale und systemische Cholesterinhomöostase und damit die Atherogenese nehmen ¹⁴³. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb potentielle Einflüsse nativer Phytosterole, vorrangig aber verschiedener oxidierter Derivate von Stigmasterol auf LXR α und ABCA1 analysiert werden. An der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 als Enterozytenmodell zeigte sich, dass die Inkubation der Zellen mit einigen Oxystigmasterolen die Genexpression von ABCA1 induziert, während native Phytosterole keine wesentliche Wirkung diesbezüglich zeigten. Dabei wurde LXR α vermehrt aktiviert, LXR α selbst aber nicht vermehrt exprimiert.

5.1 Wirkung von Hydroxycholesterolen auf die Transkription in CaCo-2-Zellen

5.1.1 Hydroxycholesterole induzieren die Expression von ABCA1-spezifischer mRNA

Um einen Vergleich der Effektivität der chemisch hergestellten Oxystigmasterole und nativen Phytosterole als potentielle Stimuli der mRNA-Transkription von ABCA1 und LXR α zu ermöglichen, wurde zunächst auch der Effekt von Seitenkettenhydroxycholesterolen untersucht. Die agonistische Wirkung bestimmter Hydroxycholesterole als natürliche endogene LXR-Liganden konnte durch verschiedene Studien an unterschiedlichen Zellarten bereits untermauert werden ^{80,81,131,132}.

Da Oxycholesterole zytotoxisch wirken können ²⁰⁵, wurden in der vorliegenden Arbeit möglichst niedrige Konzentrationen verwendet und in entsprechenden Vorversuchen toxische Wirkungen ausgeschlossen. Auch die Wahl der Inkubationsdauer beruht auf bereits im Vorfeld dieser Arbeit ermittelten Versuchsergebnissen.

Ferner erfolgte eine Koinkubation der Zellen mit exogenem 9-cis RA als zusätzlichem RXR-Agonisten. Auch hier hatten Vorversuche ergeben, dass meist eine deutlichere Stimulation der Transkription durch Koinkubation erreicht werden kann. Dies bestätigte auch eine Studie mit CaCo-2-Zellen, in der eine Induktion der Transkription ABCA1-spezifischer mRNA erst durch Koinkubation mit 9-cis RA und 22(R)-Hydroxycholesterol erreicht werden konnte ²³³. Wie in einer neueren Studie beschrieben, handelt es sich bei 22(R)-Hydroxycholesterol um einen partiellen Agonisten, der die Affinität von LXR sowohl bezüglich Koaktivatoren als auch Korepressoren der Transkription steigert. Im Gegensatz dazu induzieren volle Agonisten, wie beispielsweise bestimmte synthetische Agonisten, auch die Dissoziation von Korepressoren und die Bindung von Koaktivatoren ²³⁴.

CaCo-2-Zellen, die für 3 und 24 h mit 24(S)-, 25- oder 22(R)-Hydroxycholesterol (Positivkontrolle) stimuliert wurden, zeigten erwartungsgemäß nach beiden Inkubationszeiten eine Induktion der Transkription ABCA1-spezifischer mRNA. Hierbei war der Effekt von 25-Hydroxycholesterol im Vergleich zu den anderen beiden Oxycholesterolen etwas geringer. Dies passt zu Analysen der Kristallstruktur des LXR α /RXR-Heterodimers, aus denen hervorgeht, dass die Hydroxylierung der Seitenkette, besonders in Position 22, 24 oder 27, für die Ligandenbindung wichtig ist ¹³¹. Es konnte auch durch weitere Studien belegt werden, dass 22(R)-, 20(S)- und 24(S)-Hydroxycholesterol die höchste LXR-agonistische Potenz aufweisen, während diese bei 25- und 27-Hydroxycholesterol schwächer ausgeprägt ist ^{132,235}.

24(S)-Hydroxycholesterol entsteht als quantitativ wichtigstes Hydroxycholesterol im Gehirn ²³⁶ und spielt dort vermutlich eine Rolle in der Cholesterinhomöostase: Da Cholesterin und Lipoproteine die Blut-Hirnschranke nicht passieren und somit Cholesterin nicht über den lipoproteinvermittelten reversen Cholesterintransport entfernt werden kann, stellt die neuronale Konversion von Cholesterin zu 24(S)-Hydroxycholesterol mittels des Cytochroms P450 CYP46 die bedeutendste Möglichkeit des Cholesterineffluxes aus dem Gehirn dar ^{113,114}. Extrazelluläres Cholesterin könnte von Neuronen aufgenommen und zu 24(S)-Hydroxycholesterol konvertiert werden. Es wird spekuliert, dass nach der Diffusion von neuronal

synthetisiertem 24(S)-Hydroxycholesterol durch die Blut-Hirnschranke eine Stimulation des Cholesterineffluxes aus Gliazellen auf extrazelluläres, lipidfreies Apo E über ABCA1 nachfolgen könnte. Somit kommt dem 24(S)-Hydroxycholesterol möglicherweise auch als LXR-Aktivator im Gehirn eine doppelte Bedeutung zu ²³⁷.

Bei 25-Hydroxycholesterol wird eine inhibierende Wirkung auf die Cholesterinbiosynthese ¹²⁶ und die LDL-Rezeptorexpression ¹²⁰ vermutet. Dieses Oxycholesterol entsteht, im Gegensatz zu vielen anderen Oxycholesterolen, offenbar vorrangig durch die Cholesterin-25-Hydroxylase, ein spezifisches mikrosomales Enzym, das zwei Nicht-Häm-Eisen-Atome enthält und nicht der Cytochrom P450-Familie angehört ²³⁸.

5.1.2 Hydroxycholesterole induzieren keine vermehrte Expression von LXR α -spezifischer mRNA

Nachdem die Inkubation von CaCo-2-Zellen mit 24(S)- und 22(R)-Hydroxycholesterol für 3 und 24 h eine signifikante Induktion der mRNA-Transkription von ABCA1 aufwies, wurde auch die Wirkung dieser Hydroxycholesterole auf die Expression von LXR α selbst auf Transkriptionsebene überprüft. Eine wesentliche Transkriptionsinduktion LXR α -spezifischer mRNA konnte allerdings zu keiner der Inkubationszeiten beobachtet werden. Somit ist für die Stimulation der ABCA1-Transkription zumindest bis 24 h offensichtlich keine vermehrte Transkription von LXR α nötig. Der LXR α -Promotor trägt selbst LXRE-Bindungsstellen und in anderen Zellsystemen wurde eine Autoinduktion beschrieben ^{92,93,239}.

Über die Regulation zahlreicher Zielgene ⁹⁰ haben die Liver X-Rezeptoren α und β einen weitreichenden Einfluss auf den Metabolismus. So stellen sie beispielsweise Schlüsselregulatoren des Lipidstoffwechsels ⁸⁹ dar, fungieren als Cholesterinsensoren ⁸⁸ und greifen wahrscheinlich auch in die Entzündungsreaktion und angeborene Immunantwort ⁹¹ sowie in den Glucosestoffwechsel ⁸⁹ ein. Eine zentrale Rolle im hepatischen Lipidstoffwechsel kommt vorwiegend LXR α zu ⁸⁶.

Bezüglich der Funktion von LXR α bei der Induktion der Genexpression des ABCA1-Transporters könnten außer dieses Transkriptionsfaktors selbst auch noch andere Faktoren Einfluss nehmen. PPAR α und PPAR γ als Isoformen des nukleären Rezeptors PPAR können z.B. über eine Expressionssteigerung von LXR α additive Effekte hinsichtlich der Expression von ABCA1 bewirken ^{103,104}. Nach neueren

Erkenntnissen könnten ferner auch SREBP-Proteine, wie SREBP-2, eine positive Wirkung auf die Transkription von ABCA1 haben, indem sie auch die zelluläre Bildung von Oxysterolen als LXR-Liganden erhöhen. Der Transkriptionsfaktor SREBP-2 beeinflusst neben der Regulation von Zielgenen, die für die Cholesterinbiosynthese benötigt werden, auch die zelluläre Cholesterinaufnahme über die Transkription des LDL-Rezeptors²⁴⁰. Hinsichtlich der Regulation des LDL-Rezeptors bestehen an Hepatoblastomzellen inzwischen Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung dieses Rezeptors auch durch LXR α ²⁴¹. Eine aktuelle Studie zeigte, dass andererseits auch eine negative Regulation von ABCA1 durch andere potentielle Regulatoren, wie z.B. das Oxysterol Binding Protein (OSBP), erfolgen kann. Dem OSBP-Protein wurden bisher Funktionen als Sterolsensor und im Rahmen der Sphingomyelinsynthese als Regulator des Ceramidtransports vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat zugeschrieben^{242,243}. OSBP könnte auch die Wirkung von Oxystigmasterolen limitieren.

5.2 Wirkung nativer Sterole auf die Genexpression in CaCo-2-Zellen

5.2.1 Native Phytosterole induzieren die Expression von ABCA1 in CaCo-2-Zellen nicht

Als Nächstes wurden die Effekte der beiden Phytosterole Stigmasterol und β -Sitosterol auf die Transkription ABCA1-spezifischer mRNA in CaCo-2-Zellen näher untersucht. Die 3- und 24-stündige Stimulation der Zellen zeigte bei keinem der beiden nativen Phytosterole eine relevante Induktion der mRNA-Expression von ABCA1.

Nach Bestimmung der Inkubationsdauer für eine optimale ABCA1-Proteinexpression wurden die auf Transkriptionsebene ermittelten Resultate auch auf Proteinebene überprüft. Die Stimulation der Zellen für 3 bis 48 h ergab erwartungsgemäß keine relevante Induktion der Proteinexpression von ABCA1. Interessanterweise war für die Stimulation mit 22(R)-OHC eine Koinkubation mit 9-cis RA für eine deutliche Zunahme der ABCA1-Proteinexpression nicht nötig. Im Gegensatz dazu konnte, wie bereits beschrieben, eine suffiziente Stimulation der mRNA-Transkription von ABCA1 erst durch die Zugabe von 9-cis RA als zusätzlichem Agonisten erreicht werden. Die ABCA1-Expression wird in anderen Modellen teilweise auch über die Proteinstabilität reguliert²⁴⁴.

Der lipidsenkende Effekt von Phytosterolen ist schon seit einigen Jahrzehnten bekannt, seit in den 50er Jahren erstmals eine Reduktion des Serumcholesterins am Hühnermodell durch β -Sitosterol gezeigt werden konnte¹⁵⁵. Wenig später wurde diese Wirkung auch beim Menschen beschrieben¹⁵⁶ und weiterhin vielfach untersucht¹⁵⁷⁻¹⁶¹. Inzwischen werden die cholesterinsenkenden Eigenschaften von Phytosterolen auch für Functional Foods genutzt. Der genaue Mechanismus der lipidsenkenden Wirkung ist jedoch noch nicht geklärt. Während der Effekt bisher meist auf eine mizellare Verdrängung des Cholesterins zurückgeführt wurde¹⁷⁷, wurde mittlerweile die Hypothese einer Induktion der Expression des ABCA1-Transporters über eine LXR α -Aktivierung durch Phytosterole vorgeschlagen¹⁷⁶.

Die bisher verfügbaren Daten aus zahlreichen Studien bezüglich der Effekte von Phytosterolen auf die ABCA1-Expression sind uneinheitlich. So wurde einerseits beispielsweise über eine expressionssteigernde Wirkung auf die intestinale Transkription von ABCA1 in C57BL/6J-Mäusen nach Fütterung von phytosterolhaltiger (0,5-2 %) Nahrung über 4 Wochen berichtet, wobei sich das Phytosterolprodukt aus 41 % β -Sitosterol, 22 % Stigmasterol und 20 % Campesterol zusammensetzte. Andererseits führte dieselbe Versuchsanordnung bei Apo E^{-/-} und LDLR^{-/-}-Mäusen zu einer leichten Reduktion der intestinalen ABCA1-Transkription²⁴⁵. Darüber hinaus lieferten auch *in vitro* durchgeführte Experimente an CaCo-2-Zellen inkonsistente Resultate. Beispielsweise konnte in einer diesbezüglichen Studie nachgewiesen werden, dass ein β -Sitosterolinflux die Genexpression von ABCA1 nicht beeinflusst¹⁷⁵, während eine andere Studie eine Induktion der ABCA1-Expression durch β -Sitosterol und verschiedene andere Phytosterole und -stanole ergab²⁴⁶.

Prinzipiell könnten im Falle eines Effekts von Phytosterolgemischen auf die Genexpression von ABCA1 Unterschiede in der Wirksamkeit einzelner Komponenten bestehen. Das für Versuche am häufigsten eingesetzte Phytosterol als Einzelsubstanz oder in Substanzgemischen stellt wohl β -Sitosterol dar^{155,156,158,160,175,246}. Daher existieren vor allem über dieses Phytosterol Daten, während andere Vertreter, insbesondere Stigmasterol, noch nicht so gut erforscht sind. Ein Grund hierfür ist das natürliche Vorkommen der einzelnen Phytosterole in der Nahrung. β -Sitosterol ist mit 45-95 % das quantitativ wichtigste Phytosterol in Pflanzen bzw. Samenölen, gefolgt von Campesterol mit 30 % und Stigmasterol mit 25 %²⁴⁷. Dennoch weisen einige Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung auf die ABCA1-Genexpression auf eine größere Potenz von Stigmasterol im Vergleich zu β -Sitosterol hin. So konnte in Experimenten mit einer kultivierten adrenalen Zelllinie (Y1-BS1) die Expression von ABCA1 durch reines Stigmasterol stimuliert werden,

während dies mit β -Sitosterol nicht gelang²⁴⁸. Eine weitere Studie an CHO-7-Zellen zeigte ähnliche Ergebnisse. Auch hier bewirkte die Behandlung der Zellen mit Stigmasterol eine Induktion der ABCA1-Expression, wohingegen dieser Effekt bei β -Sitosterol ausblieb⁸⁹.

Als bestimmender Faktor der unterschiedlichen biologischen Potenz von Phytosterolen auf die Induktion der Genexpression von ABCA1 könnte bereits deren Absorption eine Rolle spielen. Bei normaler westeuropäischer Ernährung beträgt die tägliche orale Phytosterolzufuhr 100-300 mg. Davon werden jedoch nur etwa 0,4-3,5 % systemisch absorbiert. Die tägliche Phytostanolaufnahme von 20-50 mg mit einer Absorptionsrate von 0,02-0,3 % fällt dabei noch niedriger aus^{149,150}. Bezüglich der Absorptionsrate von Phytosterolen oder -stanolen wurde eine Abhängigkeit von der Seitenkettenlänge postuliert, da mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome an Position 24 der Seitenkette, die Absorption offenbar aufgrund zunehmender Hydrophobizität vermindert wird¹⁵². Als weiterer Faktor wurde auch die Δ 5,6-Doppelbindung im Sterolring erkannt, deren Sättigung durch Hydrogenisation in einer verringerten Absorption resultiert¹⁵³.

Diese Zusammenhänge können aber eine unterschiedliche Wirksamkeit von Stigmasterol und β -Sitosterol auf die Genexpression von ABCA1 infolge einer differierenden Absorption aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit kaum erklären. So besteht zwischen diesen beiden Phytosterolen kein wesentlicher Unterschied in der Seitenkettenlänge oder den Doppelbindungen im Sterangerüst. Der einzige strukturelle Unterschied liegt in der Doppelbindung der Seitenkette von Stigmasterol zwischen C22 und C23. Die Seitenkette von β -Sitosterol ist im Gegensatz dazu saturiert. Auch Yang et al. postulierten, dass genau diese ungesättigte Seitenkettenbindung von Stigmasterol direkt oder indirekt für die bereits beschriebenen Effekte auf die LXR-abhängige Expression von ABCA1 verantwortlich sein könnte²⁴⁸.

Eine höhere Effektivität von Stigmasterol im Vergleich zu β -Sitosterol konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest an CaCo-2-Zellen aber nicht bestätigt werden, da beide Phytosterole die Expression von ABCA1 nicht relevant induzierten. Bestenfalls war eine geringe Tendenz dahingehend zu vermuten.

5.2.2 Native Phytosterole induzieren die Transkription und Aktivierung von LXR α in CaCo-2-Zellen nicht

Die Stimulation der CaCo-2-Zellen mit Stigmasterol oder β -Sitosterol beeinflusste die Expression von LXR α auf Transkriptionsebene weder bei einer Inkubation für 3

noch für 24 h wesentlich, wie aufgrund der entsprechenden Resultate zu ABCA1 erwartet.

Zusätzlich wurde auch der Effekt der beiden Phytosterole auf die LXR α -Aktivierung untersucht.

Die Zellen wurden dabei für 24 h stimuliert, da sich bei der Ermittlung des Zeitverlaufs bei 24 h im Vergleich zu 3 h ein deutlicher synergistischer Effekt bei der Positivkontrolle, bestehend aus 22(R)-OHC und 9-cis RA, zeigte. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine 3-stündige Stimulation für die Aktivierung des LXRE-Luciferasesystems nicht ausreichend ist. Die Wahl von 24 h als Inkubationsdauer für die LXR-Aktivierung stimmt auch mit anderen Studien weitgehend überein: Für verschiedene Zellarten wurde über Inkubationszeiträume von 16-24 h berichtet^{89,131}. Da die Koinkubation der Zellen mit nativen Phytosterolen und 9-cis RA aber allenfalls einen geringen additiven Effekt zeigte, wurden die weiteren Transaktivierungsversuche ohne 9-cis RA als Kostimulus durchgeführt.

Das Fehlen eines deutlichen synergistischen Effekts bei Inkubation der Zellen für 24 h weist darauf hin, dass zumindest die getesteten Phytosterole in CaCo-2-Zellen keine mit den spezifischen Hydroxycholesterolen vergleichbaren LXR-Agonisten darstellen. Induktive Effekte auf die Genexpression von ABCA1 könnten auch durch andere Mechanismen bedingt sein. Tatsächlich konnten Phytosterole bisher nicht sicher als LXR-Liganden identifiziert¹⁴³ und ihre seit Jahrzehnten bekannten lipidsenkenden Effekte mechanistisch bisher nicht genau erklärt werden²⁴⁹.

Wie bereits beschrieben, kann die Bindung der einzelnen Liganden an einen der Partner bzw. Rezeptoren des LXR/RXR-Heterodimers zwar zu einer gewissen Aktivierung der Transkription führen, eine maximale Aktivierung wird jedoch erst durch die Bindung der jeweiligen Agonisten an beide Rezeptoren erreicht⁸⁶. Dies konnte auch eine Studie an CaCo-2-Zellen mit 22(R)-OHC bezüglich der ABCA1-Transkription belegen²³³. Eine Koinkubation mit 22(R)-OHC und 9-cis RA zeigte im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation mit 22(R)-OHC auch auf LXR α -Aktivierungsebene einen starken additiven Effekt. Im Unterschied dazu bewirkte die Inkubation mit Stigmasterol ohne oder mit Zusatz von 9-cis RA entsprechend der Ergebnisse auf Transkriptionsebene auch keine LXR α -Aktivierung im Luciferaseassay. Bei β -Sitosterol zeigte die alleinige Inkubation nur einen geringen Effekt und auch bei Koinkubation mit 9-cis RA konnte keine Aktivierung von LXR α bzw. sogar eine Reduktion der LXR α -Aktivierung im Vergleich zu 9-cis RA beobachtet werden. Es könnte also sogar ein partiell antagonistischer Effekt von Phytosterolen bei Koinkubation mit 9-cis RA vorliegen, etwa durch Konkurrenz mit potenteren endogenen Liganden von LXR α .

Beispielsweise blieb die ABCA1-Expression bei β -Sitosterolinflux in Experimenten mit CaCo-2-Zellen unbeeinflusst, was vermuten ließ, dass Phytosterole keine Wirkung auf intestinales LXR haben¹⁷⁵. Andererseits wurde aber auch am selben Zellmodell über induktive Effekte von β -Sitosterol und anderen Phytosterolen und -stanolen auf die LXR-Aktivierung berichtet²⁴⁶.

In Zusammenschau der Ergebnisse mit Stigmasterol und β -Sitosterol auf die Genexpression und Aktivierung von LXR α und ABCA1 konnten an CaCo-2-Zellen keine konsistenten Effekte der nativen Phytosterole nachgewiesen werden, welche die lipidsenkende Wirkung von Phytosterolen durch eine LXR-abhängige enterozytäre Induktion der Expression von ABCA1 erklären könnten. Somit konnten die Ergebnisse von Field et al. bestätigt werden¹⁷⁵.

Die Koinkubation von 22(R)-OHC mit 9-cis RA als Positivkontrolle zeigte auf LXR α -Aktivierungsebene und auf die ABCA1-Transkription einen starken induktiven Effekt, nicht aber auf die Transkription von LXR α . Ähnliche Resultate ergaben sich ebenfalls, wie bereits diskutiert, bei Stimulationen mit verschiedenen Hydroxycholesterolen auf LXR α - und ABCA1-Transkriptionsebene.

Ein potentieller Mechanismus, der die LXR α -Expression auf Transkriptionsebene beeinflussen könnte, ist die Fähigkeit von LXR α zur Induktion der eigenen Expression über eine Autoregulationsschleife. Dieser Mechanismus konnte unter Verwendung synthetischer sowie teilweise natürlicher Liganden, wie 22(R)-Hydroxycholesterol oder 24(S),25-Epoxycholesterol, bereits bei mehreren anderen humanen Zelltypen, wie beispielsweise dermalen Fibroblasten, einer Leberzelllinie (Huh-7), vor allem aber bei primären Makrophagen und THP-1-Zellen, gezeigt werden^{92,93,239}. Das Potential des humanen LXR α (hLXR α), sich selbst zu induzieren, basiert auf drei im humanen LXR α -Promotor identifizierte LXR-Bindestellen. Die singuläre LXRE Typ I-Stelle besitzt eine starke Affinität sowohl zu LXR α als auch zu LXR β , während die anderen beiden identischen LXREs vom Typ II bevorzugt LXR α , jedoch mit schwächerer Affinität binden. Für LXR β selbst bestehen im Übrigen gegenwärtig keine Hinweise darauf, dass diese Isoform des nukleären Transkriptionsfaktors LXR eine Autoregulationsschleife besitzen könnte. Außerdem konnte der potente synthetische LXR-Ligand T0901317 keine Induktion von hLXR β bewirken. Im Vergleich zu LXRE Typ I, das wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Induktion des hLXR α -Gens spielt, scheinen die LXREs von Typ II diesbezüglich von geringerer Bedeutung zu sein. Dennoch könnten Letztere durch ihre offensichtliche Präferenz für LXR α eine

murinen monozytoiden Makrophagenzelllinie (RAW 264.7) und in murinen peritonealen Makrophagen. Nur bei humanen Makrophagen bzw. THP-1-Zellen konnte dagegen eine deutliche Stimulation der transkriptionellen LXR α -Expression gezeigt werden. Aufgrund dieser Daten wurde vermutet, dass die LXR α -Autoregulationsschleife ein für humane Makrophagen spezifischer Mechanismus sein könnte.⁹³ Eine andere Studie bestätigte diese Ergebnisse zwar hinsichtlich der THP-1-Zellen, konnte den Effekt der positiven Feedbackschleife aber zudem auch in humanen dermalen Fibroblasten, einer humanen Leberzelllinie (Huh-7) sowie HepG2-Zellen nachweisen²³⁹.

Die fehlende Induktion der LXR α -Genexpression in murinen Makrophagen kann sogar molekular erklärt werden: Im Unterschied zum humanen Promotor konnten keine der LXRE-Typen innerhalb des murinen LXR α -Promotors identifiziert werden²³⁹. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit verwendeten CaCo-2-Zellen ergibt sich somit die Vermutung, dass diese intestinale humane Zelllinie, ähnlich wie die fetale humane Intestinalzelllinie FHs74⁹³, keinen solchen Autoregulationsmechanismus nutzt. Die Transkriptionsinduktion von ABCA1-mRNA bei gleichzeitig unveränderter LXR α -Transkription nach LXR α -Aktivierung durch Oxysterole, wie 22(R)-OHC, spricht gegen eine Autoinduktion von LXR α in CaCo-2-Zellen. Auch die Induktion von ABCA1 in murinen Zellen (z.B. RAW 264.7) ohne Induktion der LXR α -Expression passt zu diesen Befunden⁹³.

Theoretisch vorstellbar wäre auch eine bereits unter Basalbedingungen in CaCo-2-Zellen maximal aktivierte Autoinduktion von LXR α , die deshalb nicht weiter steigerbar ist. Dazu könnten die Transfektionsversuche mit Huh-7-Zellen aufschlussreich sein. In diesen Zellen reichten die endogenen LXR-Rezeptoren alleinig unter Zusatz des LXR-Liganden T0901317 aus, um eine Induktion bei LXRE vom Typ I im Promotor zu bewirken. Die Transfektion mit entweder LXR α -luc oder LXR β -luc führte sogar ohne exogene Liganden zu einer starken Induktion der Reportergenaktivität. Die Zugabe von exogenen Liganden konnte die Aktivität nur noch minimal steigern. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich durch die hohe basale Aktivierung durch putative endogene Liganden bei alleiniger Transfektion des LXRE-Rezeptorkonstrukts bedingt, die bereits in einer Sättigung der Reaktion resultiert.

Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung des LXREs vom Typ II gänzlich von der Stimulation durch Rezeptoren und Liganden abhängig, wobei hier eine deutliche Präferenz für LXR α im Vergleich zu LXR β besteht. Da aber vor allem LXRE Typ I ein stärkerer Mediator der Aktivierung von LXR α und auch LXR β im Vergleich zu

LXRE Typ II zu sein scheint, ist Letzteres trotz seiner Selektivität für LXR α hinsichtlich der basalen Rezeptoraktivität vermutlich zu vernachlässigen²³⁹.

Ein weiterer Faktor könnte die Wahl der Inkubationsdauer für die transkriptionelle LXR α -Genexpression darstellen. Die Inkubationsdauer von 3 und 24 h in der vorliegenden Arbeit stimmt mit einer Studie weitgehend überein, in der an THP-1-Zellen bei Inkubation mit T0901317 gezeigt werden konnte, dass die LXR α -Genexpression erstmals nach 2 h ansteigt, sich bis 12 h weiter erhöht und dieses Niveau mindestens bis 24 h aufrechterhalten wird²³⁹.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an CaCo-2-Zellen weitgehend konsistent mit diesen Arbeiten und können die ABCA1-Induktion trotz zumindest bis 24 h fehlender transkriptioneller Induktion von LXR α erklären.

5.2.3 Desmosterol induziert die Transkription von ABCA1 in CaCo-2-Zellen nicht

Als weiteres natives Sterol, außer den beiden Phytosterolen Stigmasterol und β -Sitosterol, wurde auch die Wirkung von Desmosterol auf die Transkription ABCA1-spezifischer mRNA in CaCo-2-Zellen untersucht, da dies auf Proteinebene an CHO-7-Zellen in einer neueren Studie beschrieben wurde⁸⁹.

Bei Desmosterol handelt es sich um ein spätes Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese⁸⁹, das im Stoffwechselweg nach Bloch das unmittelbare Vorläufermolekül des Cholesterins darstellt²⁵⁰. Darüber hinaus kann Cholesterin jedoch auch über den Kandutsch-Russel-Stoffwechselweg synthetisiert werden, wobei hier 7-Dehydrocholesterol als direkter Cholesterinvorläufer fungiert²⁵¹. Diese gelten bislang als die beiden Hauptsynthesewege des Cholesterins²⁵². Nachdem sie bei Acetat beginnend über zahlreiche Kondensationschritte über Squalen und 2,3-Oxidosqualen gemeinsam verlaufen⁸⁹, erfolgt die Trennung der beiden Stoffwechselwege ab Lanosterol. Ausgehend von Lanosterol kann der weitere Syntheseprozess nun über einen der beiden Stoffwechselwege erfolgen. Hierbei spielt der Zeitpunkt, zu dem die Reduktion der Doppelbindung in Position C24 der Seitenkette stattfindet, eine entscheidende Rolle. Bleibt die Doppelbindung bis zuletzt erhalten, nimmt die Cholesterinsynthese ihren Weg über Desmosterol (Bloch-Stoffwechselweg). Wird die Doppelbindung hingegen schon zu einem früheren Zeitpunkt reduziert, dann führt dies letztlich zur Bildung von 7-Dehydrocholesterol (Kandutsch-Russel-Stoffwechselweg). Bislang ist die biologische Bedeutung der Existenz alternativer Wege der Cholesterinsynthese nicht bekannt^{89,253,254} (Abbildung 36).

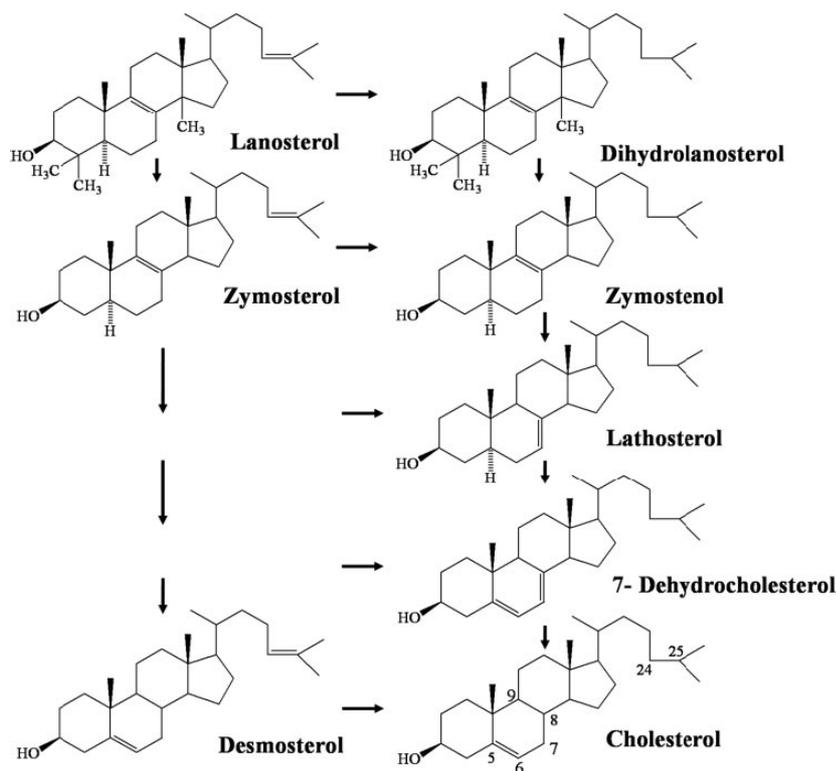


Abbildung 36: Schematische Illustration des Cholesterinbiosynthesewegs über Desmosterol (Bloch-Stoffwechselweg) oder 7-Dehydrocholesterol (Kandutsch-Russel-Stoffwechselweg) (aus Megha et al. 2006²⁵²). Die Reduktion der Doppelbindung zwischen C24 und C25 kann hierbei zu verschiedenen früheren Zeitpunkten stattfinden.

Desmosterol stellt neben Cholesterin auch eine relativ häufige strukturelle Komponente in der Membran von Säugetierzellen, wie z.B. Spermien oder Astrozyten dar^{255,256}. Es gibt Hinweise, dass Desmosterol in Säugetierzellen die Funktion von Cholesterin in der Lipidmembran sogar ersetzen kann²⁵⁷. Im Gegensatz zum Cholesterin ist die Desorption von Desmosterol aus der Plasmamembran und der dadurch bedingte zelluläre Efflux jedoch viel effektiver²⁵⁸.

Darüber hinaus wird auch spekuliert, dass Desmosterol nicht nur ein regulatorisch inertes Vorläufermolekül von Cholesterin sein könnte. Eine Studie, in der die Generierung von 25-Hydroxycholesterol aus Desmosterol überprüft werden sollte, konnte dies zwar nicht nachweisen, dafür erfolgte aber unerwartet eine Bildung von 24(S),25-Epoxycholesterol, das gewöhnlich über 2,3-Oxidosqualen synthetisiert wird²⁵⁹.

In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Stimulation von CaCo-2-Zellen mit Desmosterol weder nach 3 noch nach 24 h eine wesentliche Induktion der

Genexpression von ABCA1 auf Transkriptionsebene. Auf Proteinebene konnte ebenfalls nach 3 und 48 h keine, jedoch nach einer 24-stündigen Stimulation eine offensichtlich passagere, mäßige ABCA1-Proteinexpression beobachtet werden. Hier könnte, ähnlich wie im Zusammenhang mit der Proteinexpression von ABCA1 bei 22(R)-OHC bereits erwähnt (5.2.1), die ABCA1-Expression teilweise über die ABCA1-Proteinstabilität beeinflusst sein und somit die Abbaukinetik des ABCA1-Proteins eine Rolle spielen ²⁴⁴.

Eine kürzliche Studie beobachtete in CHO-7-Zellen, dass Desmosterol auch die Cholesterinhomöostase über ABCA1 beeinflussen kann. In diesen Zellen bewirkte Desmosterol eine LXR-abhängige Induktion von ABCA1. Es wurde vermutet, dass dies direkt durch die Doppelbindung zwischen C24 und C25 vermittelt werden könnte, da ähnliche Effekte an CHO-7-Zellen auch bei einem anderen Cholesterinvorläufer, dem Zymosterol, beobachtet werden konnten ⁸⁹.

5.2.4 Desmosterol induziert die Transkription und Aktivierung von LXR α in CaCo-2-Zellen nicht

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ABCA1-Expression zumindest auf Transkriptionsebene zeigte Desmosterol nach einer 3- und 24-stündigen Stimulation der Zellen auch keine Induktion der mRNA-Transkription von LXR α . Ebenso bewirkte eine Inkubation mit Desmosterol für 24 h keine Induktion der LXR α -Aktivierung.

Es muss unklar bleiben, warum offensichtlich Unterschiede zwischen CaCo-2- und CHO-7-Zellen in der Beeinflussung der ABCA1- und LXR α -Genexpression durch Desmosterol bestehen.

Eine naheliegende Erklärung wäre eine unterschiedliche Metabolisierung von Desmosterol zu bioaktiven Metaboliten in CHO-7-Zellen und CaCo-2-Zellen. Durch eine Trippel-Knock-Out-Variante von murinen embryonalen Fibroblasten, die keine 24-, 25- und 27-Hydroxylase mehr besitzt, wurde allerdings belegt, dass Desmosterol zumindest in diesen artifiziellen Zellen als direkter LXR-Ligand fungieren kann. In LXR α/β -defizienten murinen Fibroblasten führte Desmosterol zu keiner Induktion der LXR-abhängigen ABCA1-Genexpression ⁸⁹.

5.3 Wirkung chemisch dargestellter Oxystigmasterole auf die Genexpression in CaCo-2-Zellen

5.3.1 Herstellung und Einsatz von Oxystigmasterolen

Wahrscheinlich werden Oxyphytosterole, ähnlich wie Oxycholesterole, sowohl enzymatisch als auch über Autoxidation generiert¹⁹⁰. Oxyphytosterole könnten aufgrund ihrer Entstehung aus Phytosterolen, die bekanntermaßen lipidsenkende Eigenschaften besitzen¹⁵⁵⁻¹⁶¹, ähnlich wie Oxycholesterole¹⁸⁹, die Cholesterinhomöostase potentiell über den LXR-abhängigen Cholesterinexporter ABCA1 beeinflussen. Das Vorkommen von Oxyphytosterolen im Serum gesunder Menschen wurde erst kürzlich belegt. Zuerst wurden bei pathologischen Zuständen, wie der Phytosterolämie¹⁸⁹ oder dem Morbus Waldenström¹⁹⁸, bestimmte Oxyphytosterole im Serum nachgewiesen. Später gelang es Grandgirard et al. Oxyphytosterole auch im Serum gesunder Probanden nachzuweisen¹⁹⁸.

Es lag die Vermutung nahe, dass dies im Wesentlichen exogene Oxyphytosterole widerspiegelt, die ähnlich wie Oxycholesterole¹⁹⁴, aus der Nahrung intestinal absorbiert werden¹⁹⁰. So zeigten Grandgirard et al. zunächst die gute Resorbierbarkeit einiger Oxyphytosterole an Ratten¹⁹⁵. Später gelang auch der Nachweis einer Oxyphytosterolanreicherung in verschiedenen Geweben bei Hamstern nach oraler Gabe¹⁹⁷. Eine weitere Studie konnte direkt belegen, dass Oxyphytosterole besser als Phytosterole in die intestinale Lymphe von Ratten absorbiert werden¹⁹⁶. Allerdings muss hinsichtlich dieser Daten auch eingeräumt werden, dass diese bisher auf Nettoresorptionsmessungen beruhen und deshalb vorsichtig zu interpretieren sind, da möglicherweise simultan Absorptions- und Reexkretionsvorgänge ablaufen könnten¹⁹⁰.

Da Oxyphytosterole aus der Nahrung offensichtlich absorbiert werden können und die cholesterinsenkenden Eigenschaften von Phytosterolen zur breiten Verwendung in Functional Food-Produkten führten, könnte dies erhöhte Oxyphytosterolkonzentrationen bedingen^{190,198}. Aufgrund potentieller gesundheitlicher Effekte von Oxyphytosterolen in der Zirkulation¹⁸⁹, erscheint die experimentelle Abschätzung möglicher Pathomechanismen von Bedeutung.

In vitro wurden verschiedene am Sterangerüst und/oder an der Seitenkette oxidierte Phytosterolderivate generiert^{143,208-213}.

In der vorliegenden Arbeit wurde Stigmasterol als natives Ausgangsphytosterol verwendet. Die Wahl erfolgte aufgrund der zwischen C22 und C23 vorhandenen

Doppelbindung in der Seitenkette des Stigmasterols. Diese könnte eine Prädilektionsstelle für chemische Reaktionen, wie beispielsweise Oxidationen, darstellen. Außerdem ist Stigmasterol, neben β -Sitosterol und Campesterol, das in der westlichen Ernährung am häufigsten vorkommende Phytosterol¹⁴⁶. Yang et al. konnten mittlerweile demonstrieren, dass Stigmasterol die Cholesterinhomöostase in CHO-7-Zellen durch die Induktion von ABCA1 über eine LXR-Aktivierung beeinflusst. Die Stimulation derselben Zellen mit β -Sitosterol hatte keinen Effekt. Infolge dieser und ähnlicher Resultate anderer getesteter desaturierter Verbindungen wurde postuliert, dass der LXR-Agonismus durch die Doppelbindung in der Seitenkette bedingt sein könnte^{89,248}.

Mittels eines Phenoloxidasystems konnten in der vorliegenden Arbeit durch chemische Oxidation von Stigmasterol zahlreiche Oxymetaboliten entweder als Reinsubstanzen oder teilgereinigte Gemische hergestellt werden. Überraschenderweise wiesen dabei alle erhaltenen Oxystigmasterole eine unveränderte Seitenkette und ausschließlich eine Oxidation am Sterangerüst in Form von Hydroxy-, Epoxy- und Ketoderivaten auf. Ein bisher nicht genau identifiziertes Derivat mit dünnschichtchromatographischem Verhalten wie 22-OHC trägt nach GC/MS-Daten ebenfalls keine Seitenkettenhydroxylgruppe. Die Doppelbindung in der Seitenkette des Stigmasterols erwies sich also gegen chemische Oxidation als recht stabil. Andere Studien mit Stigmasterol führten zwar ebenfalls zu keiner Hydroxylierung der Seitenkette trotz Einsatz verschiedener Oxidationssysteme, es gelang aber zumindest eine Hydrogenierung der Doppelbindung^{143,208-213}. Dies unterstützt die Vermutung, dass Seitenkettenoxidationen bei Oxyphytosterolen hauptsächlich infolge enzymatischer Reaktionen stattfinden, während oxidative Prozesse am Steroidringgerüst der Autoxidation zugeschrieben werden¹⁹⁰.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Oxystigmasterole können durch Autoxidation auch in der Nahrung entstehen¹⁹⁰. Die Oxidierung des Sterangerüsts scheint die gastrointestinale Resorption von Phytosterolen zu erhöhen¹⁹⁶. Allerdings könnten Seitenkettenderivate wiederum vergleichsweise wahrscheinlicher als potente LXR-Liganden fungieren^{132,180}.

5.3.2 Polarere Oxystigmasterole induzieren die Expression von ABCA1 in CaCo-2-Zellen stärker als weniger polare Oxystigmasterole

Die Effekte der einzelnen Oxystigmasterole auf die Transkription ABCA1-spezifischer mRNA in CaCo-2-Zellen zeigten bei einer Inkubation für 3 h bzw. 24 h eine relativ große Bandbreite. Aus praktischen Gründen waren die zu testenden

Oxystigmasterole bei den Inkubationen in zwei Gruppen stets parallel geführt worden. Bei den polareren Oxystigmasterolen induzierten 7α -Hydroxystigmasterol und 7β -Hydroxystigmasterol die Expression der mRNA-Transkription von ABCA1 nicht wesentlich bzw. nur tendenziell. 7-Ketostigmasterol und 6α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol sowie das oxidierte Stigmasterol-Gemisch 1 stimulierten ABCA1 signifikant.

Der Zeitverlauf stimmt in etwa mit den Ergebnissen einer bereits erwähnten Studie überein, in deren Rahmen die Kinetik der Genexpression von ABCA1 unter Stimulation mit dem LXR-Liganden T0901317 untersucht wurde. Hier zeigte sich, dass die Induktion der ABCA1-mRNA zumindest bei THP-1-Zellen nach einer Inkubation von ungefähr 2 h initiiert und bis etwa 24 h aufrechterhalten wird ²³⁹.

Im Gegensatz zur Gruppe der polareren Oxystigmasterole bewirkten weniger polare Oxystigmasterole, bis auf zwei Ausnahmen, nur eine schwächere bzw. keine relevante Stimulation der Transkription ABCA1-spezifischer mRNA.

Nach einer 3-stündigen Inkubation zeigten nur 7-Dehydrostigmasterol/ 7β -Hydroxystigmasterol eine signifikante und $5,6\alpha$ -/ $5,6\beta$ -Epoxytigmasterol eine tendenzielle Induktion, während die übrigen, weniger polaren Stigmasterolderivate keine Induktion der ABCA1-Genexpression auf Transkriptionsebene bewirkten. Auch das Produkt der Oxidationsreaktion, das als „unbekannte Verbindung“ bezeichnet wurde, bewirkte keine Induktion. Dieser Metabolit konnte als einziges der im Rahmen der Oxidation von Stigmasterol entstandenen Derivate bisher strukturell nicht eindeutig identifiziert werden. Dennoch ist in Anlehnung an die Analogie bei der Fragmentierung von Cholesterinverbindungen zumindest der Ausschluss bereits bekannter Verbindungen möglich. Am wahrscheinlichsten ist eine Verbindung, die, wie 7-Dehydrostigmasterol, eine zusätzliche Doppelbindung in einem Ring des Sterangerüsts besitzt und ferner auch über eine weitere Hydroxyl- oder Ketogruppe verfügt. Interessanterweise entsteht ein unbekanntes Produkt mit analogem Spektrum auch bei der Oxidation von Cholesterin oder Sitosterol. In der Literatur wurde auch dieses Cholesterinprodukt jedoch bislang noch nicht beschrieben.

Die Stimulation der CaCo-2-Zellen mit weniger polaren Oxystigmasterolen für 24 h zeigte durchgehend bei allen Oxystigmasterolen keine relevante Induktion der mRNA-Transkription von ABCA1. Insgesamt sind somit die Effekte der weniger polaren Oxystigmasterole auf die ABCA1-Expression geringer. Nur 7-Dehydrostigmasterol/ 7β -Hydroxystigmasterol scheint eine, allerdings passagere, Induktion von ABCA1 zu vermitteln.

Die Überprüfung der fünf effektivsten Oxystigmasterole aus der Gruppe der polareren Oxystigmasterole auch hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Proteinexpression von ABCA1 ergab nach einer Inkubationsdauer von 24 h weitgehend analoge Ergebnisse zur RNA-Ebene mit auch auf Proteinebene geringster Aktivität von 7 β -Hydroxystigmasterol (Abbildung 34). Der Effekt der fünf Oxystigmasterole war aber dabei im Vergleich zur Positivkontrolle 22(R)-OHC auf Transkriptions- und auch Proteinebene schwächer ausgeprägt.

Des Weiteren sollte sichergestellt werden, dass die induktiven Effekte der Oxystigmasterole auf die Genexpression von ABCA1 nicht durch mitgeschleppte Rückstände aus dem verwendeten Oxidationssystem verursacht wurden. Dies kann jedoch eindeutig ausgeschlossen werden: Die Testung des mitgeführten Oxidationsblanks, ein analog aufgearbeiteter Oxidationsansatz, in dem kein Stigmasterol eingesetzt worden war, bewirkte durchgehend keine Induktion der mRNA-Transkription von ABCA1.

Auch für die Zytotoxizität, die im Zusammenhang mit potentiellen schädlichen Auswirkungen von Oxyphytosterolen postuliert wurde ¹⁹⁰, gab es im Rahmen der verwendeten Konzentrationen keine Anzeichen.

Somit können chemische Oxystigmasterole, die ausschließlich am Sterangerüst oxidiert sind, von CaCo-2-Zellen als humanes Enterozytenmodell *in vitro* aufgenommen werden. Dies stimmt mit tierexperimentellen Ergebnissen von Tomoyori et al. ¹⁹⁶ und Grandgirard et al. ¹⁹⁷ überein, welche die Absorption von Oxyphytosterolen bzw. Oxystigmasterolen *in vivo* an Hamstern und Ratten demonstriert hatten. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Oxyphytosterole mit desaturierten Seitenketten, wie beispielsweise Stigmasterol, im humanen Intestinum schlechter als solche mit saturierten Seitenketten absorbiert werden ¹⁹⁸. In Anbetracht der noch weitgehend ungeklärten humanen *in vivo* Situation könnte dies zur meist mäßigen Stimulation von ABCA1 in CaCo-2-Zellen durch Oxystigmasterole in der vorliegenden Arbeit beitragen.

Die meisten der hier untersuchten Oxystigmasterole wiesen analoge Strukturen auf, wie sie bei den häufigsten Oxycholesterolen und seitenkettengesättigten Oxyphytosterolen, die infolge autoxidativer Prozesse am Steroidringgerüst entstehen, bereits *in vivo* gefunden wurden ^{129,190}. Somit sollten die entsprechenden chemischen Oxystigmasterole die *in vivo* Bedingungen widerspiegeln.

Ferner scheinen vor allem die polareren Oxystigmasterole als Einzelverbindungen oder in Gemischen eine größere Aktivität zu besitzen. Die Unterschiede in der Aktivität der chemischen Oxystigmasterole könnten durch Unterschiede in der

Absorption bedingt sein. Die Absorption könnte sowohl durch die Struktur der Seitenkette des Ausgangsphytosterols, in diesem Fall also Stigmasterol, als andererseits auch durch die Stellung der funktionellen Gruppe beeinflusst werden. Hydroxyderivate von Phytosterolen werden offensichtlich bevorzugt im Vergleich zu anderen oxidierten Derivaten absorbiert. Ferner scheinen Epoxyderivate besser absorbiert zu werden als 7-Ketoderivate¹⁹⁰.

Dies ist mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit weitgehend vereinbar. So erwiesen sich auch in der vorliegenden Arbeit letztlich unter anderem Hydroxyderivate von Stigmasterol sowie 7-Ketostigmasterol und 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol als die Verbindungen mit der größten Potenz hinsichtlich der ABCA1-Genexpression. Eine höhere Aktivität von Epoxyderivaten im Vergleich zu 7-Ketoderivaten lässt sich zumindest für 5,6 α -/5,6 β -Epoxystigmasterol in der vorliegenden Arbeit nicht belegen.

Um auch eventuelle quantitativ geringe, aber besonders potente Oxystigmasterole nicht zu übersehen, die bei der Aufreinigung verloren gehen könnten, wurden auch nicht vollständig gereinigte Gemische der Oxidationsprodukte von Stigmasterol untersucht. Interessanterweise gehörte auch das oxidierte Stigmasterol-Gemisch 1 zu den potentesten Stimuli, obwohl es neben einem kleineren Anteil von 5,6 β -Epoxystigmasterol vor allem größere Mengen von 7-Dehydrostigmasterol enthielt. Der Effekt des Gemischs ist wahrscheinlich durch die übrigen, teilweise größeren 6 α -, 7 α - und 7 β -Hydroxyderivatanteile sowie 7-Ketoderivatanteile erklärbar.

Die passagere Induktion durch 7-Dehydrostigmasterol/7 β -Hydroxystigmasterol nach einer Inkubationsdauer von 3 h ist vermutlich vor allem auf eine frühe induktive Potenz von 7-Dehydrostigmasterol zurückzuführen, da 7 β -Hydroxystigmasterol allein nur eine späte tendenzielle Induktion gezeigt hatte.

Das weniger oxidierte Stigmasterol-Gemisch 2 stimulierte ebenfalls kaum. Dies ist wahrscheinlich vor allem durch den hohen Anteil an nativem Stigmasterol erklärbar.

Die potenteren Oxystigmasterole bzw. Oxystigmasterolgemische besitzen weitgehend eine einzelne Doppelbindung in ihrem Sterangerüst. Verbindungen, die keine Doppelbindung im Sterangerüst besitzen, könnten potentiell auch schlechter absorbiert werden. Zumindest Letzteres konnte bereits durch eine Studie am Beispiel von Sitosterol bzw. Sitostanol gezeigt werden, die belegte, dass die Saturation der Doppelbindung durch Hydrogenierung in einer verringerten Absorption resultiert. Somit bestehen Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Absorption durch die Anwesenheit einer Doppelbindung im Sterangerüst¹⁵³.

Die Frage, ob die synthetisierten Oxystigmasterole absorbiert werden, konnte durch bereits erwähnte Studien an Ratten und Mäusen bejaht werden¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Bei den in diesen Studien verwendeten Oxyphytosterolen handelte es sich ausschließlich um Derivate von β -Sitosterol, Campesterol oder Stigmasterol, die ebenfalls nur am Sterangerüst und nicht an der Seitenkette oxidiert waren. Ob dies auch auf die Absorption im humanen Intestinum zutrifft, konnte bisher noch nicht direkt untersucht werden. Im Rahmen einer Studie, bei der das Plasma von gesunden Probanden auf die Präsenz von Oxyphytosterolen hin analysiert wurde, konnten mehrere Derivate von β -Sitosterol und ein Campesterolderivat in sehr geringer Konzentration, aber interessanterweise keine Oxyphytosterole mit desaturierten Seitenketten, wie beispielsweise Oxystigmasterole, nachgewiesen werden¹⁹⁸. Dies könnte einerseits bedeuten, dass in Position C22-C23 ungesättigte Oxyphytosterole schlechter absorbiert oder *in vivo* rascher metabolisiert werden können. Andererseits könnten β -Sitosterol und Campesterol besser absorbiert oder leichter oxidiert werden. Es ist durchaus plausibel, dass, wie bei nativen Phytosterolen, die Struktur der Seitenkette den Grad der Absorption von Oxyphytosterolen beeinflusst¹⁹⁰. Hinweise darauf geben auch Studien an Ratten, die konsistente Daten über eine bessere Absorption oxidierter Metaboliten von Campesterol im Vergleich zu Oxymetaboliten von β -Sitosterol lieferten^{195,196}. Der bisher fehlende Nachweis von Oxyphytosterolen mit desaturierter Seitenkette in Position C22-C23 im humanen Plasma könnte aber zumindest teilweise dadurch bedingt sein, dass auch die Phytosterole, von denen diese Oxyphytosterole abstammen, in geringeren Mengen in der Nahrung vorhanden sind. Wie schon erwähnt, ist β -Sitosterol mit 45-95 % das am häufigsten in Pflanzen bzw. Samenölen vorkommende Phytosterol, gefolgt von Campesterol mit 30 % und Stigmasterol mit 25 %²⁴⁷. Dies dürfte zur Folge haben, dass auch unterschiedliche Mengen der verschiedenen Oxyphytosterole etwa infolge von Autoxidationsprozessen in der Nahrung vorkommen oder auch die enzymatische Oxidation von Phytosterolen im Körper ihr Vorkommen in der Nahrung reflektiert. Speziell Stigmasterol wird im Vergleich zu β -Sitosterol und Campesterol aber möglicherweise bevorzugt biliär sezerniert: ABCG5/G8-defiziente Mäuse wiesen jedenfalls eine überproportionale Akkumulation von Stigmasterol vor allem in Plasma und Leber auf²⁶⁰.

5.3.3 Oxystigmasterole induzieren keine vermehrte Transkription von LXR α in CaCo-2-Zellen

Die Inkubation der CaCo-2-Zellen mit der Gruppe der polareren Oxystigmasterole zeigte weder nach 3 noch nach 24 h eine relevante Induktion LXR α -spezifischer mRNA. Dagegen zeigte sich bei der LXR α -Aktivierung mit den polareren Oxystigmasterolen zumindest eine tendenzielle Induktion. So aktivierte 7 α -Hydroxystigmasterol bzw. 6 α -Hydroxystigmasterol/7-Ketostigmasterol in steigender Konzentration, ähnlich wie die ABCA1-Transkription, nach 24-stündiger Stimulation LXR α mäßig und 7 β -Hydroxystigmasterol geringer. Allerdings bewirkte 7-Ketostigmasterol im LXRE-Aktivierungsassay nach 24 h nur eine geringe LXR α -Aktivierung. Auch das oxidierte Stigmasterol-Gemisch 1 zeigte keine Stimulation der Aktivität von LXR α trotz der mäßigen Induktion der Genexpression von ABCA1.

Die Stimulation der Zellen mit den weniger polaren Oxystigmasterolen für 3 und 24 h zeigte keine relevante Induktion LXR α -spezifischer mRNA und außerdem in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ABCA1-Genexpression keine signifikante LXR α -Aktivierung nach 24-stündiger Inkubation auf. Lediglich 7-Dehydrostigmasterol/7 β -Hydroxystigmasterol bzw. das oxidierte Stigmasterol-Gemisch 2 in der niedrigeren Konzentration bewirkten eine tendenzielle LXR α -Aktivierung passend zur ABCA1-Transkriptionsebene.

Wie erwartet und auf ABCA1- sowie LXR α -Transkriptionsebene bereits nachgewiesen, stimulierte der bei den Proben mitgeführte Oxidationsblank auch die Aktivierung von LXR α nicht. Demzufolge konnten unspezifische Effekte von eventuell mitgeschleppten Oxidationsreagenzien auch hier ausgeschlossen werden.

Somit erfordert die Stimulation von ABCA1 durch Oxystigmasterole keine vermehrte Expression von LXR α . Wie auch schon im Zusammenhang mit Hydroxycholesterolen diskutiert, könnte eine bereits maximale, autoregulatorisch bedingte Basalexpression von LXR α in der eingesetzten Zelllinie vorliegen.

Dagegen fand sich bei der Aktivierung von LXR α weitgehend parallel zu den Resultaten auf ABCA1-Transkriptionsebene eine stärkere LXR α -Aktivierung durch die Gruppe der polareren im Vergleich zu den unpolaren Oxystigmasterolen.

Für die Aktivierung von LXR α scheint eine Seitenkettenoxidation von Sterolen nicht zwingend notwendig zu sein und bereits der Doppelbindung in der Seitenkette könnte eine intrinsische Aktivität zukommen. Dies wurde kürzlich von Yang et al. auch für Stigmasterol und Desmosterol postuliert ⁸⁹. Die Art der

Oxidation am Sterangerüst der synthetischen Oxystigmasterole könnte die intrazelluläre Verfügbarkeit durch Verbesserung der Absorption beeinflussen¹⁹⁰. Neben der intrinsischen Aktivität von am Sterangerüst oxidierten, seitenkettenungesättigten Oxyphytosterolen könnte schließlich noch eine Konkurrenz mit endogenen Oxycholesterolen um Oxysterol Binding Protein²⁴² oder Abbauwege²⁶¹ von Bedeutung sein.

5.4 Potentielle medizinische Relevanz von Oxyphytosterolen

Wie schon erwähnt, existieren bereits Hinweise auf biologische Wirkungen von Oxyphytosterolen. So wurden lipidsenkende und antidiabetische Effekte¹⁹⁹⁻²⁰¹ ebenso wie die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen und des Immunsystems vermutet²⁰². Darüber hinaus bestehen Hinweise auf eine Interferenz von Oxyphytosterolen mit Steroidhormonrezeptoren²⁰³ und der Kapazität von Cytochrom P450²⁰⁴.

Der wohl interessanteste postulierte Effekt ist die Modulation des Cholesterinmetabolismus über die Aktivierung von LXR¹⁴³. In der vorliegenden Arbeit fanden sich geringe bis mäßige Effekte vor allem polarerer Oxyphytosterole auf die ABCA1-Genexpression über eine LXR α -Aktivierung. Für die Aktivierung von LXR α ist ein Seitenkettenprodukt offenbar nicht zwingend notwendig, wie kürzlich auch von Yang et al. gezeigt⁸⁹. Ob der *in vivo* Oxidation von Phytosterolen, insbesondere auch am Sterangerüst, physiologische Bedeutung zukommt, ist noch unklar. Jedenfalls ist der Effekt exogener, am Ringsystem oxidierter Oxyphytosterole auf die LXR-abhängige ABCA1-Genexpression schwächer als der von Seitenkettenhydroxycholesterolen, aber stärker als der nativer Phytosterole. Ob dies nur durch Einfluss auf die zelluläre Aufnahme und die verfügbaren Konzentrationen oder auch durch höhere intrinsische Aktivität bedingt ist, ist derzeit noch unklar.

Bezüglich möglicher Nebenwirkungen von Oxyphytosterolen wurden aufgrund der vorliegenden strukturellen Ähnlichkeit zu Oxycholesterolen im Wesentlichen eine potentielle Zytotoxizität²⁰⁶ und eine potentielle proatherogene Wirkung¹⁸⁹ vermutet. Letztere konnte allerdings in einer ersten Studie mit hochdosierten Oxyphytosterolen am Tiermodell nicht bestätigt werden¹⁹⁶. Da direkte Phytosterolanaloge zu Seitenkettenhydroxycholesterolen bisher nicht verfügbar sind und vollsynthetische, nichtsteroidale LXR-Agonisten mit unerwünschten Nebewirkungen, wie z.B. Hypertriglyceridämie, massiver hepatischer Steatosis oder LDL-Erhöhung behaftet sind^{96,262-264}, könnte die mäßige und teilweise

enterozytär selektive Wirkung der auch natürlich in der Nahrung vorkommenden Oxystigmasterole eine auf natürlichen Regulationsmechanismen beruhende Modulation des Cholesterinmetabolismus erlauben.

6 Zusammenfassung

Phytosterole sind die C24-alkylsubstituierten und teilweise sterolseitenkettendesaturierten Cholesterinanaloga des Pflanzenreichs. Trotz vergleichbarer Zufuhr mit der Nahrung (100-300 mg/d) werden sie wesentlich schlechter systemisch absorbiert (0,4-3,5 %) als Cholesterin (ca. 50 %). Aufgrund der cholesterinsenkenden Wirkung in hoher Dosis (2-2,5 g/d) werden Phytosterole zunehmend „funktionellen Lebensmitteln“ beigemischt, obwohl der lange behauptete Wirkungsmechanismus einer rein intraluminalen Interferenz mit der mizellaren Solubilisierung von Cholesterin nicht mehr haltbar ist.

Die molekulare Aufklärung der genetischen Phytosterolspeicherkrankheit als dysfunktionelle Mutation des enterozytär und biliär exprimierten zellulären Phytosterolreexporters ABCG5/G8 unterstützt einen intrazellulären enterozytären oder sogar hepatisch-biliären Angriffspunkt von Phytosterolen auf den Cholesterinmetabolismus. Die zelluläre Cholesterinhomeostase wird wesentlich über Oxysterole gesteuert, die den nukleären Transkriptionsfaktor LXR α aktivieren, der seinerseits die Expression von Schlüsselproteinen, wie des zellulären Cholesterinexporters ABCA1, stimuliert. Die Effekte von Phytosterolen auf den Cholesterinstoffwechsel könnte also über Oxysterole und LXR α vermittelt werden. Stigmasterol als häufigstes Phytosterol mit einer C22,23-Doppelbindung als Prädilektionsstelle für Oxidation schien besonders als Präkursor für LXR-agonistische Oxyphytosterole prädestiniert.

Deshalb wurde Stigmasterol chemisch oxidiert, die dargestellten Oxymetaboliten aufgereinigt, identifiziert und an der humanen, enterozytär differenzierten Zelllinie CaCo-2 auf ihre biologische Aktivität untersucht. Dazu wurde mittels quantitativer Real-time RT-PCR die mRNA-Expression von ABCA1 und LXR α , mittels Reporterassay die Aktivierung der LXR α -abhängigen Transkription und mittels Western-Blot die Proteinexpression von ABCA1 gemessen.

Die chemische Oxidation von Stigmasterol generierte mehrere Hydroxy-, Epoxy- und Ketoderivate, deren Oxidation aber ausschließlich am Sterangerüst erfolgte. Somit erwies sich die C22,23-Doppelbindung als unerwartet stabil gegen chemische Oxidation. ABCA1 konnte in CaCo-2 Zellen mit 22(R)-Hydroxycholesterin als Standardstimulus induziert werden. Natives Stigmasterol und β -Sitosterol stimulierten die Expression von ABCA1 nicht. Auch der C24,25-ungesättigte Cholesterinpräkursor Desmosterol stimulierte ABCA1 nur passager

auf Proteinebene. Von den am Sterolgerüst modifizierten Stigmasterolderivaten induzierten mehrere, vor allem polarere Produkte signifikant die mRNA- und Proteinexpression von ABCA1, so 7-Ketostigmasterol und 6 α -Hydroxystigmasterol sowie tendenziell 7 β -Hydroxystigmasterol. Von den weniger polaren Derivaten stimulierte allenfalls 7-Dehydrostigmasterol passager die Expression von ABCA1. Diese Stigmasterolderivate steigerten auch tendenziell die Transkription eines Konstrukts aus einem LXR α -responsiblen Element und einem Luciferase-Reportergen. Die mRNA-Expression von LXR α selbst wurde durch keines der Stigmasterolderivate stimuliert.

Trotz der Seitenkettendoppelbindung konnten durch chemische Oxidation keine an der Seitenkette oxidierten Derivate von Stigmasterol dargestellt werden. Polarere, am Sterolgerüst oxidierte Derivate stimulierten die ABCA1-Expression am Enterozytenmodell offensichtlich über die Aktivierung von LXR α . Für diese Effekte könnte sowohl eine bessere intrazelluläre Verfügbarkeit, Verdrängung endogener Oxycholesterole von Oxysterol Binding Proteinen als auch eine höhere intrinsische Aktivität für LXR α -Stimulation von am Sterolkern modifizierten Oxyderivaten im Vergleich zu nativem Stigmasterol verantwortlich sein. LXR α -agonistische Oxyderivate könnten durch das besondere Verteilungsmuster von Phytosterolen Vorteile gegenüber synthetischen LXR α -Agonisten bieten.

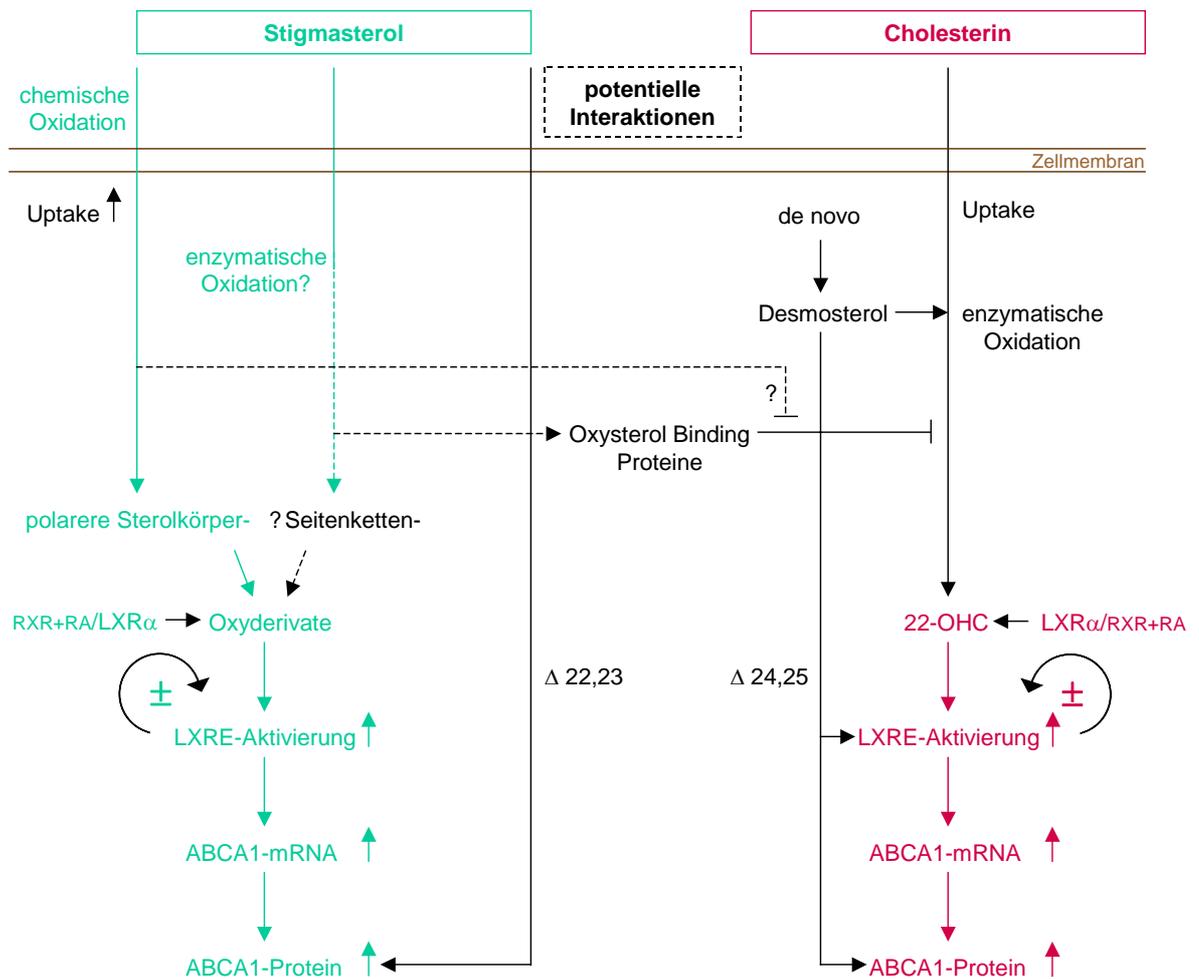


Abbildung 37: Schema der eigenen Resultate mit Stigmasterol/Stigmasteroxyderivaten (grün) bzw. Cholesterinoxyderivaten (rot) und aus der Literatur bekannter (schwarz) oder potentieller (gestrichelt) Interaktionsmechanismen

7 Literatur

1. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-41.
2. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-20.
3. Feldman CL, Ilegbusi OJ, Hu Z, Nesto R, Waxman S, Stone PH. Determination of in vivo velocity and endothelial shear stress patterns with phasic flow in human coronary arteries: a methodology to predict progression of coronary atherosclerosis. *Am Heart J*. 2002;143:931-9.
4. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006;367:1747-57.
5. Lopez AD, Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100:481-99.
6. Lusis AJ, Mar R, Pajukanta P. Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:189-218.
7. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-16.
8. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-9.
9. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232:34-47.
10. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915-24.
11. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
12. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr*. 2006;83:456S-460S.
13. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297-329.
14. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155-67.
15. Tall AR, Jiang X, Luo Y, Silver D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1185-8.
16. Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest*. 2006;116:1226-9.
17. Curtiss LK, Valenta DT, Hime NJ, Rye KA. What is so special about apolipoprotein AI in reverse cholesterol transport? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:12-9.
18. Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2006;99:1031-43.
19. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005;96:1221-32.
20. Miller GJ, Miller NE. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet*. 1975;1:16-9.

21. Boden WE. High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. *Am J Cardiol.* 2000;86:19L-22L.
22. Rothblat GH, Phillips MC. Mechanism of cholesterol efflux from cells. Effects of acceptor structure and concentration. *J Biol Chem.* 1982;257:4775-82.
23. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res.* 1999;40:781-96.
24. 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;271:518-20.
25. Mingpeng S, Zongli W. The protective role of high-density lipoproteins in atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999;34:539-48.
26. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:712-9.
27. Fielding CJ, Fielding PE. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 1995;36:211-28.
28. Hamilton RL, Williams MC, Fielding CJ, Havel RJ. Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J Clin Invest.* 1976;58:667-80.
29. Green PH, Tall AR, Glickman RM. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1978;61:528-34.
30. Barrans A, Collet X, Barbaras R, Jaspard B, Manent J, Vieu C, Chap H, Perret B. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem.* 1994;269:11572-7.
31. Yokoyama S. Assembly of high density lipoprotein by the ABCA1/apolipoprotein pathway. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16:269-79.
32. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 2005;85:1343-72.
33. Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Qjm.* 2005;98:845-56.
34. Weisgraber KH, Mahley RW. Subfractionation of human high density lipoproteins by heparin-Sepharose affinity chromatography. *J Lipid Res.* 1980;21:316-25.
35. Francone OL, Royer L, Haghpassand M. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J Lipid Res.* 1996;37:1268-77.
36. von Eckardstein A, Jauhiainen M, Huang Y, Metso J, Langer C, Pussinen P, Wu S, Ehnholm C, Assmann G. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1301:255-62.
37. Guendouzi K, Jaspard B, Barbaras R, Motta C, Vieu C, Marcel Y, Chap H, Perret B, Collet X. Biochemical and physical properties of remnant-HDL2 and of pre beta 1-HDL produced by hepatic lipase. *Biochemistry.* 1999;38:2762-8.

38. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 2001;42:1007-17.
39. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:67-113.
40. Dean M, Allikmets R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5:779-85.
41. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 1990;346:362-5.
42. Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res.* 2004;53:235-43.
43. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Bottcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Buchler C, Porsch-Ozcurumez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22:347-51.
44. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J, Jr., Hayden MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 1999;22:336-45.
45. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 1999;22:352-5.
46. Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* 1995;96:78-87.
47. Remaley AT, Schumacher UK, Stonik JA, Farsi BD, Nazih H, Brewer HB, Jr. Decreased reverse cholesterol transport from Tangier disease fibroblasts. Acceptor specificity and effect of brefeldin on lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1813-21.
48. Attie AD, Hamon Y, Brooks-Wilson AR, Gray-Keller MP, MacDonald ML, Rigot V, Tebon A, Zhang LH, Mulligan JD, Singaraja RR, Bitgood JJ, Cook ME, Kastelein JJ, Chimini G, Hayden MR. Identification and functional analysis of a naturally occurring E89K mutation in the ABCA1 gene of the WHAM chicken. *J Lipid Res.* 2002;43:1610-7.
49. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Jr., Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79:8-15.
50. Miller NE. Associations of high-density lipoprotein subclasses and apolipoproteins with ischemic heart disease and coronary atherosclerosis. *Am Heart J.* 1987;113:589-97.
51. Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP, Jr., Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 1994;107:85-98.
52. van Dam MJ, de Groot E, Clee SM, Hovingh GK, Roelants R, Brooks-Wilson A, Zwinderman AH, Smit AJ, Smelt AH, Groen AK, Hayden MR, Kastelein JJ. Association between increased arterial-wall thickness and impairment in ABCA1-driven cholesterol efflux: an observational study. *Lancet.* 2002;359:37-42.

53. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics*. 1994;21:150-9.
54. Oram JF, Brinton EA, Bierman EL. Regulation of high density lipoprotein receptor activity in cultured human skin fibroblasts and human arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1983;72:1611-21.
55. Fitzgerald ML, Mendez AJ, Moore KJ, Andersson LP, Panjeton HA, Freeman MW. ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH₂-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J Biol Chem*. 2001;276:15137-45.
56. Bungert S, Molday LL, Molday RS. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. *J Biol Chem*. 2001;276:23539-46.
57. 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;47:2089-97.
58. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest*. 1999;104:R25-31.
59. Bortnick AE, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, Francone OL. The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem*. 2000;275:28634-40.
60. Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem*. 2001;276:23742-7.
61. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257:29-33.
62. Abe-Dohmae S, Suzuki S, Wada Y, Aburatani H, Vance DE, Yokoyama S. Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation induced by cAMP in a murine macrophage cell line. *Biochemistry*. 2000;39:11092-9.
63. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem*. 2000;275:34508-11.
64. 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;97:12097-102.
65. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem*. 2000;275:28240-5.
66. 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;289:1524-9.
67. Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1565-71.
68. Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:720-7.

69. Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem.* 2001;276:27584-90.
70. Orso E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G. Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat Genet.* 2000;24:192-6.
71. 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;97:4245-50.
72. Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2001;108:303-9.
73. Singaraja RR, Fievet C, Castro G, James ER, Hennuyer N, Clee SM, Bissada N, Choy JC, Fruchart JC, McManus BM, Staels B, Hayden MR. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2002;110:35-42.
74. Timmins JM, Lee JY, Boudyguina E, Kluckman KD, Brunham LR, Mulya A, Gebre AK, Coutinho JM, Colvin PL, Smith TL, Hayden MR, Maeda N, Parks JS. Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest.* 2005;115:1333-42.
75. Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest.* 2001;108:1315-20.
76. Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:630-7.
77. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med.* 2002;8:1243-8.
78. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. In: *Genes Dev*; 1995:1033-45.
79. Alberti S, Steffensen KR, Gustafsson JA. Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene.* 2000;243:93-103.
80. 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;272:3137-40.
81. 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;276:38378-87.
82. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science.* 2000;290:1771-5.

83. Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev.* 2006;58:760-72.
84. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 1992;6:329-44.
85. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 1995;83:841-50.
86. Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:571-5.
87. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000;14:121-41.
88. Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest.* 2006;116:607-14.
89. 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;281:27816-26.
90. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol.* 2003;17:985-93.
91. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003;9:213-9.
92. Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, Tontonoz P. Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol.* 2001;21:7558-68.
93. Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM, Wilson JG, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRalpha gene in human macrophages. *J Biol Chem.* 2001;276:43509-15.
94. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell.* 1998;93:693-704.
95. Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U, Rudling M, Angelin B, Bjorkhem I, Pettersson S, Gustafsson JA. Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001;107:565-73.
96. 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;14:2831-8.
97. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusic AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7604-9.
98. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, Daige CL, Thomas D, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Wang X, Lusic AJ, Tontonoz P, Schulman IG. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11896-901.
99. Curtiss LK. ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1852-3.
100. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347:645-50.

101. Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2004;45:2161-73.
102. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4312-7.
103. 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;7:161-71.
104. 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;7:53-8.
105. Claudel T, Leibowitz MD, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ, Torpier G, Lobaccaro JM, Paterniti JR, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Auwerx J. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:2610-5.
106. 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;106:523-31.
107. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRBeta. *Genes Dev.* 2000;14:2819-30.
108. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1302:93-109.
109. Yoshikawa T, Ide T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Yatoh S, Kitamine T, Okazaki H, Tamura Y, Sekiya M, Takahashi A, Hasty AH, Sato R, Sone H, Osuga J, Ishibashi S, Yamada N. Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling. *Mol Endocrinol.* 2003;17:1240-54.
110. Smith LL, Johnson BH. Biological activities of oxysterols. *Free Radic Biol Med.* 1989;7:285-332.
111. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1999;142:1-28.
112. Axelson M, Larsson O, Zhang J, Shoda J, Sjoval J. Structural specificity in the suppression of HMG-CoA reductase in human fibroblasts by intermediates in bile acid biosynthesis. *J Lipid Res.* 1995;36:290-8.
113. Lutjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalusy U, Bjorkhem I. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:9799-804.
114. Bjorkhem I, Lutjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O2 techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 1997;272:30178-84.

115. Bjorkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:734-42.
116. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem.* 2002;13:700-710.
117. van de Bovenkamp P, Kosmeijer-Schuil TG, Katan MB. Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids.* 1988;23:1079-85.
118. Nielsen JH, Olsen CE, Duedahl C, Skibsted LH. Isolation and quantification of cholesterol oxides in dairy products by selected ion monitoring mass spectrometry. *J Dairy Res.* 1995;62:101-13.
119. Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:126-35.
120. Schroepfer GJ, Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* 2000;80:361-554.
121. Javitt NB. 25R,26-Hydroxycholesterol revisited: synthesis, metabolism, and biologic roles. *J Lipid Res.* 2002;43:665-70.
122. Javitt NB. Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:1147-53.
123. Bjorkhem I, Diczfalusy U, Lutjohann D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:161-5.
124. Duane WC, Javitt NB. 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J Lipid Res.* 1999;40:1194-9.
125. Lutjohann D, Papassotiropoulos A, Bjorkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res.* 2000;41:195-8.
126. Nishimura T, Inoue T, Shibata N, Sekine A, Takabe W, Noguchi N, Arai H. Inhibition of cholesterol biosynthesis by 25-hydroxycholesterol is independent of OSBP. *Genes Cells.* 2005;10:793-801.
127. Ansari GA, Smith LL. Cholesterol epoxides: formation and measurement. *Methods Enzymol.* 1990;186:438-43.
128. Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee JH. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids.* 1989;24:645-51.
129. Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest.* 2002;110:725-30.
130. Tall AR, Costet P, Wang N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest.* 2002;110:899-904.
131. Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, Norstrom C, Stefansson K, Hallen D, Johansson IC, Zachrisson K, Ogg D, Jendeborg L. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRA α and RXR β ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *Embo J.* 2003;22:4625-33.
132. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature.* 1996;383:728-31.
133. Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroepfer GJ, Jr., Evans RM. The orphan nuclear receptor LXRA α is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10588-93.

134. Spencer TA, Li D, Russel JS, Collins JL, Bledsoe RK, Consler TG, Moore LB, Galardi CM, McKee DD, Moore JT, Watson MA, Parks DJ, Lambert MH, Willson TM. Pharmacophore analysis of the nuclear oxysterol receptor LXRalpha. *J Med Chem.* 2001;44:886-97.
135. Sevanian A, Hodis HN, Hwang J, McLeod LL, Peterson H. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *J Lipid Res.* 1995;36:1971-86.
136. Chang YH, Abdalla DS, Sevanian A. Characterization of cholesterol oxidation products formed by oxidative modification of low density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 1997;23:202-14.
137. Hodis HN, Crawford DW, Sevanian A. Cholesterol feeding increases plasma and aortic tissue cholesterol oxide levels in parallel: further evidence for the role of cholesterol oxidation in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1991;89:117-26.
138. Hodis HN, Krams DM, Avogaro P, Bittolo-Bon G, Cazzolato G, Hwang J, Peterson H, Sevanian A. Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL-). *J Lipid Res.* 1994;35:669-77.
139. Carpenter KL, Taylor SE, Ballantine JA, Fussell B, Halliwell B, Mitchinson MJ. Lipids and oxidised lipids in human atheroma and normal aorta. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1167:121-30.
140. Bjorkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu RJ, Duan C, Lund E. Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8592-6.
141. Crisby M, Nilsson J, Kostulas V, Bjorkhem I, Diczfalusy U. Localization of sterol 27-hydroxylase immuno-reactivity in human atherosclerotic plaques. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1344:278-85.
142. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223-61.
143. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem.* 2003;278:36091-8.
144. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res.* 2002;41:457-500.
145. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol.* 2005;96:10D-14D.
146. Kochhar SP. Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Prog Lipid Res.* 1983;22:161-88.
147. Normen L, Johnsson M, Andersson H, van Gameren Y, Dutta P. Plant sterols in vegetables and fruits commonly consumed in Sweden. *Eur J Nutr.* 1999;38:84-9.
148. Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:533-49.
149. Czubyko F, Beumers B, Lammsfuss S, Lutjohann D, von Bergmann K. A simplified micro-method for quantification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. *J Lipid Res.* 1991;32:1861-7.
150. Ostlund RE, Jr., McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF, Spilburg CA. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta(5)-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282:E911-6.

151. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE, Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res.* 1999;40:302-8.
152. Child P, Kuksis A. Uptake of 7-dehydro derivatives of cholesterol, campesterol, and beta-sitosterol by rat erythrocytes, jejunal villus cells, and brush border membranes. *J Lipid Res.* 1983;24:552-65.
153. Heinemann T, Leiss O, von Bergmann K. Effect of low-dose sitostanol on serum cholesterol in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 1986;61:219-23.
154. Field FJ, Mathur SN. beta-sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J Lipid Res.* 1983;24:409-17.
155. Peterson DW. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;78:143-7.
156. Pollak OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation.* 1953;7:702-6.
157. Best MM, Duncan CH, Van Loon EJ, Wathen JD. Lowering of serum cholesterol by the administration of a plant sterol. *Circulation.* 1954;10:201-6.
158. Beveridge JM, Haust HL, Connell WF. Magnitude of the Hypocholesterolemic Effect of Dietary Sitosterol in Man. *J Nutr.* 1964;83:119-22.
159. Lees AM, Mok HY, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis.* 1977;28:325-38.
160. Becker M, Staab D, Von Bergmann K. Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. *J Pediatr.* 1993;122:292-6.
161. Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel D, Mordret F, Perrin JL, Pages X, Debry G. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Ann Nutr Metab.* 1995;39:291-5.
162. Davis HR, Jr., Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, Yao X, Iyer SP, Lam MH, Lund EG, Detmers PA, Graziano MP, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 2004;279:33586-92.
163. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;303:1201-4.
164. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002;277:18793-800.
165. Sudhop T, Sahin Y, Lindenthal B, Hahn C, Luers C, Berthold HK, von Bergmann K. Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion. *Gut.* 2002;51:860-3.
166. Sudhop T, Lutjohann D, von Bergmann K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacol Ther.* 2005;105:333-41.

167. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, Allikmets R, Sakuma N, Pegoraro R, Srivastava AK, Salen G, Dean M, Patel SB. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet.* 2001;27:79-83.
168. Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest.* 1974;53:1033-43.
169. Salen G, Shore V, Tint GS, Forte T, Shefer S, Horak I, Horak E, Dayal B, Nguyen L, Batta AK, et al. Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *J Lipid Res.* 1989;30:1319-30.
170. Kwiterovich PO, Jr. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* 2000;86:5L-10L.
171. Levy E, Spahis S, Sinnott D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E, Lambert M, Lavoie MA. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:310-8.
172. Lin DS, Connor WE, Phillipson BE. Sterol composition of normal human bile. Effects of feeding shellfish (marine) sterols. *Gastroenterology.* 1984;86:611-7.
173. Boberg KM, Einarsson K, Bjorkhem I. Apparent lack of conversion of sitosterol into C24-bile acids in humans. *J Lipid Res.* 1990;31:1083-8.
174. Salen G, Ahrens EH, Jr., Grundy SM. Metabolism of beta-sitosterol in man. *J Clin Invest.* 1970;49:952-67.
175. Field FJ, Born E, Mathur SN. LXR/RXR ligand activation enhances basolateral efflux of beta-sitosterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* 2004;45:905-13.
176. Plat J, Mensink RP. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *Faseb J.* 2002;16:1248-53.
177. Armstrong MJ, Carey MC. Thermodynamic and molecular determinants of sterol solubilities in bile salt micelles. *J Lipid Res.* 1987;28:1144-55.
178. Ikeda I, Sugano M. Inhibition of cholesterol absorption by plant sterols for mass intervention. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:527-31.
179. Law MR. Plant sterol and stanol margarines and health. *West J Med.* 2000;173:43-7.
180. Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol.* 2005;96:15D-22D.
181. Normen L, Dutta P, Lia A, Andersson H. Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:908-13.
182. Pollak OJ. Effect of plant sterols on serum lipids and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 1985;31:177-208.
183. Ostlund RE, Jr., Spilburg CA, Stenson WF. Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1999;70:826-31.
184. Glueck CJ, Speirs J, Tracy T, Streicher P, Illig E, Vandegrift J. Relationships of serum plant sterols (phytosterols) and cholesterol in 595 hypercholesterolemic subjects, and familial aggregation of phytosterols, cholesterol, and premature coronary heart disease in hyperphytosterolemic probands and their first-degree relatives. *Metabolism.* 1991;40:842-8.

185. Moghadasian MH, McManus BM, Pritchard PH, Frohlich JJ. "Tall oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:119-26.
186. Ntanios FY, Jones PJ, Frohlich JJ. Dietary sitostanol reduces plaque formation but not lecithin cholesterol acyl transferase activity in rabbits. *Atherosclerosis.* 1998;138:101-10.
187. Moghadasian MH, McManus BM, Godin DV, Rodrigues B, Frohlich JJ. Proatherogenic and antiatherogenic effects of probucol and phytosterols in apolipoprotein E-deficient mice: possible mechanisms of action. *Circulation.* 1999;99:1733-9.
188. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R. Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc.* 2003;78:965-78.
189. Plat J, Brzezinka H, Lutjohann D, Mensink RP, von Bergmann K. Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2001;42:2030-8.
190. Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP, Trautwein EA. Biological effects of oxidized phytosterols: a review of the current knowledge. *Prog Lipid Res.* 2008;47:37-49.
191. Soupas L, Juntunen L, Lampi AM, Piironen V. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J Agric Food Chem.* 2004;52:6485-91.
192. Grandgirard A, Martine L, Joffre C, Juaneda P, Berdeaux O. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives application to a phytosterol-enriched food. *J Chromatogr A.* 2004;1040:239-50.
193. Tonello A, Poli G. Serum phytosterols not only from dietary intake. *Br J Nutr.* 2006;96:791-2.
194. Linseisen J, Wolfram G. Absorption of cholesterol oxidation products from ordinary foodstuff in humans. *Ann Nutr Metab.* 1998;42:221-30.
195. Grandgirard A, Sergiel JP, Nour M, Demaison-Meloche J, Ginies C. Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats. *Lipids.* 1999;34:563-70.
196. Tomoyori H, Kawata Y, Higuchi T, Ichi I, Sato H, Sato M, Ikeda I, Imaizumi K. Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2004;134:1690-6.
197. Grandgirard A, Demaison-Meloche J, Cordelet C, Demaison L. Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reprod Nutr Dev.* 2004;44:599-608.
198. Grandgirard A, Martine L, Demaison L, Cordelet C, Joffre C, Berdeaux O, Semon E. Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br J Nutr.* 2004;91:101-6.
199. Suzuki K, Tanaka M, Konno R, Kaneko Y. Effects of 5-campestenone (24-methylcholest-5-en-3-one) on the type 2 diabetes mellitus model animal C57BL/KsJ-db/db mice. *Horm Metab Res.* 2002;34:121-6.
200. Konno R, Kaneko Y, Suzuki K, Matsui Y. Effect of 5-Campestenone (24-methylcholest-5-en-3-one) on Zucker diabetic fatty rats as a type 2 diabetes mellitus model. *Horm Metab Res.* 2005;37:79-83.
201. Ikeda I, Konno R, Shimizu T, Ide T, Takahashi N, Kawada T, Nagao K, Inoue N, Yanagita T, Hamada T, Morinaga Y, Tomoyori H, Imaizumi K, Suzuki K. Campest-5-en-3-one, an oxidized derivative of campesterol, activates PPARalpha, promotes energy consumption and reduces visceral fat deposition in rats. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760:800-7.

202. Kimura Y, Yasukawa K, Takido M, Akihisa T, Tamura T. Inhibitory effect of some oxygenated stigmastane-type sterols on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biol Pharm Bull.* 1995;18:1617-9.
203. Sato H, Nishida S, Tomoyori H, Sato M, Ikeda I, Imaizumi K. Oxysterol regulation of estrogen receptor alpha-mediated gene expression in a transcriptional activation assay system using HeLa cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68:1790-3.
204. Marshall WJ, McLean AE. A requirement for dietary lipids for induction of cytochrome P-450 by phenobarbitone in rat liver microsomal fraction. *Biochem J.* 1971;122:569-73.
205. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol.* 1996;34:193-211.
206. Adcox C, Boyd L, Oehrl L, Allen J, Fenner G. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric Food Chem.* 2001;49:2090-5.
207. Carpenter KL. Good COP, bad COP: an unsolved murder. Are dietary cholesterol oxidation products guilty of atherogenicity? *Br J Nutr.* 2002;88:335-8.
208. Aringer L, Eneroth P. Studies on the formation of C7-oxygenated cholesterol and beta-sitosterol metabolites in cell-free preparations of rat liver. *J Lipid Res.* 1973;14:563-72.
209. Aringer L, Eneroth P, Nordstrom L. Side chain hydroxylation of cholesterol, campesterol and beta-sitosterol in rat liver mitochondria. *J Lipid Res.* 1976;17:263-72.
210. Mahato SB, Banerjee S, Mukherjee A, Kumar R. Metabolism of sitosterol by a *Pseudomonas* species. *Biochem J.* 1981;196:629-31.
211. Ambrus G, Ilkoy E, Jekkel A, Horvath G, Bocskei Z. Microbial transformation of beta-sitosterol and stigmasterol into 26-oxygenated derivatives. *Steroids.* 1995;60:621-5.
212. Johannes C, Lorenz RL. Preparation and mass spectrometry of 14 pure and 18O(2)-labeled oxidation products from the phytosterols beta-sitosterol and stigmasterol. *Anal Biochem.* 2004;325:107-16.
213. Geoffroy P, Julien-David D, Marchioni E, Raul F, Aoude-Werner D, Miesch M. Synthesis of highly pure oxyphytosterols and (oxy)phytosterol esters Part I. Regioselective hydrogenation of stigmasterol: An easy access to oxyphytosterols. *Steroids.* 2008.
214. Krump-Konvalinkova V, Yasuda S, Rubic T, Makarova N, Mages J, Erl W, Vosseler C, Kirkpatrick CJ, Tigyi G, Siess W. Stable knock-down of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 influences multiple functions of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:546-52.
215. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989;96:736-49.
216. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-23.
217. Tatusova TA, Madden TL. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;174:247-50.
218. Anderson JM, Cormier MJ. Lumisomes, the cellular site of bioluminescence in coelenterates. *J Biol Chem.* 1973;248:2937-43.
219. Viviani VR. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1833-50.

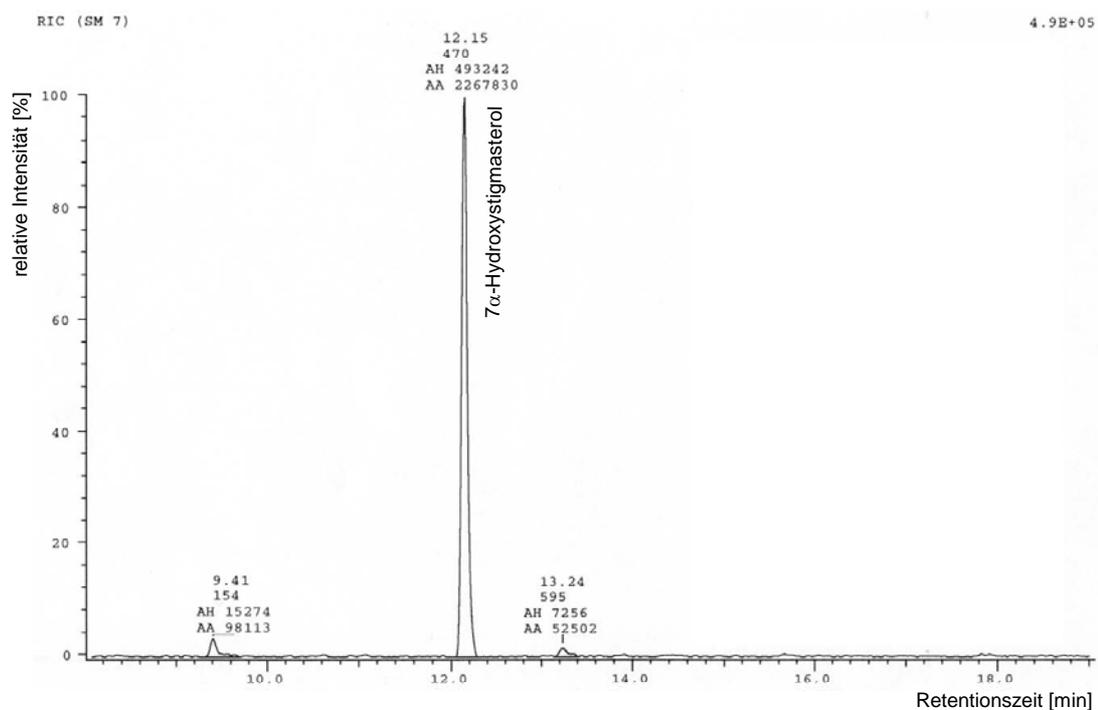
220. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000;25:169-93.
221. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature.* 1970;226:1211-3.
222. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature.* 1970;226:1209-11.
223. 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;79:5966-70.
224. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998;24:954-8, 960, 962.
225. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996;14:303-8.
226. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 1997;22:130-1, 134-8.
227. 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.
228. Kusser W. Use of self-quenched, fluorogenic LUX primers for gene expression profiling. *Methods Mol Biol.* 2006;335:115-33.
229. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature.* 1997;388:548-54.
230. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
231. Wubert J, Reder E, Kaser A, Weber PC, Lorenz RL. Simultaneous solid phase extraction, derivatization, and gas chromatographic mass spectrometric quantification of thromboxane and prostacyclin metabolites, prostaglandins, and isoprostanes in urine. *Anal Chem.* 1997;69:2143-6.
232. Johannes C, Majcherczyk A, Huttermann A. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46:313-7.
233. Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ. LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* 2002;43:1054-64.
234. Albers M, Blume B, Schlueter T, Wright MB, Kober I, Kremoser C, Deuschle U, Koegl M. A novel principle for partial agonism of liver X receptor ligands. Competitive recruitment of activators and repressors. *J Biol Chem.* 2006;281:4920-30.
235. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:266-71.
236. Lin YY, Smith LL. Sterol metabolism. 28. Biosynthesis and accumulation of cholest-5-ene-3beta, 24-diol (cerebrosterol) in developing rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 1974;348:189-96.
237. Bjorkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med.* 2006;260:493-508.

238. Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP, Russell DW. cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *J Biol Chem.* 1998;273:34316-27.
239. Li Y, Bolten C, Bhat BG, Woodring-Dietz J, Li S, Prayaga SK, Xia C, Lala DS. Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol Endocrinol.* 2002;16:506-14.
240. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J.* 2006;400:485-91.
241. Ishimoto K, Tachibana K, Sumitomo M, Omote S, Hanano I, Yamasaki D, Watanabe Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. Identification of human low-density lipoprotein receptor as a novel target gene regulated by liver X receptor alpha. *FEBS Lett.* 2006;580:4929-33.
242. Bowden K, Ridgway ND. OSBP Negatively Regulates ABCA1 Protein Stability. *J Biol Chem.* 2008;283:18210-7.
243. Yan D, Lehto M, Rasilainen L, Metso J, Ehnholm C, Yla-Herttuala S, Jauhiainen M, Olkkonen VM. Oxysterol binding protein induces upregulation of SREBP-1c and enhances hepatic lipogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1108-14.
244. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1735:1-19.
245. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Ribas V, Navarro-Sastre A, Garces-Garces J, Blanco-Vaca F. Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis.* 2005;181:75-85.
246. Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res.* 2005;46:2468-76.
247. Lutjohann D. Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols. *Br J Nutr.* 2004;91:3-4.
248. Yang C, Yu L, Li W, Xu F, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J Clin Invest.* 2004;114:813-22.
249. Jones PJ. Cholesterol-lowering action of plant sterols. *Curr Atheroscler Rep.* 1999;1:230-5.
250. Bloch KE. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem.* 1983;14:47-92.
251. Kandutsch AA, Russell AE. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem.* 1960;235:2256-61.
252. Megha, Bakht O, London E. Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders. *J Biol Chem.* 2006;281:21903-13.
253. Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science.* 1965;150:19-28.
254. Vainio S, Jansen M, Koivusalo M, Rog T, Karttunen M, Vattulainen I, Ikonen E. Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts. *J Biol Chem.* 2006;281:348-55.
255. Lin DS, Connor WE, Wolf DP, Neuringer M, Hachey DL. Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res.* 1993;34:491-9.
256. Mutka AL, Lusa S, Linder MD, Jokitalo E, Kopra O, Jauhiainen M, Ikonen E. Secretion of sterols and the NPC2 protein from primary astrocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:48654-62.

257. Huster D, Scheidt HA, Arnold K, Herrmann A, Muller P. Desmosterol may replace cholesterol in lipid membranes. *Biophys J*. 2005;88:1838-44.
258. Phillips JE, Rodriguez WV, Johnson WJ. Basis for rapid efflux of biosynthetic desmosterol from cells. *J Lipid Res*. 1998;39:2459-70.
259. Saucier SE, Kandutsch AA, Gayen AK, Nelson JA, Spencer TA. Oxygenation of desmosterol and cholesterol in cell cultures. *J Lipid Res*. 1990;31:2179-85.
260. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J Lipid Res*. 2004;45:301-7.
261. Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab*. 2007;5:73-9.
262. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, Kuipers F. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2002;277:34182-90.
263. Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Groot PH, Reijngoud DJ, Kuipers F. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289:E829-38.
264. Groot PH, Pearce NJ, Yates JW, Stocker C, Sauermelch C, Doe CP, Willette RN, Olzinski A, Peters T, d'Epagnier D, Morasco KO, Krawiec JA, Webb CL, Aravindhan K, Jucker B, Burgert M, Ma C, Marino JP, Collins JL, Macphee CH, Thompson SK, Jaye M. Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *J Lipid Res*. 2005;46:2182-91.

A Anhang

Retentionszeiten und Massenspektren von Oxystigmasterolen (nach Johannes and Lorenz 2004 ²¹²)

A

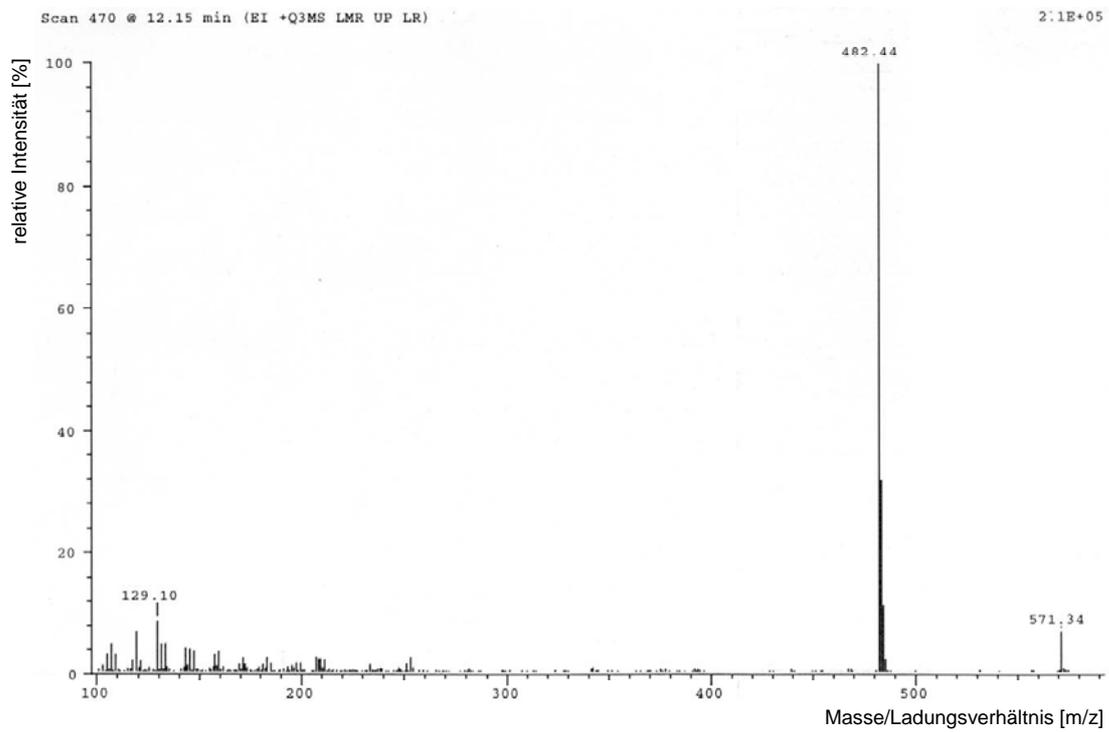
B

Abbildung 38: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum (B) von 7 α -Hydroxystigmasterol

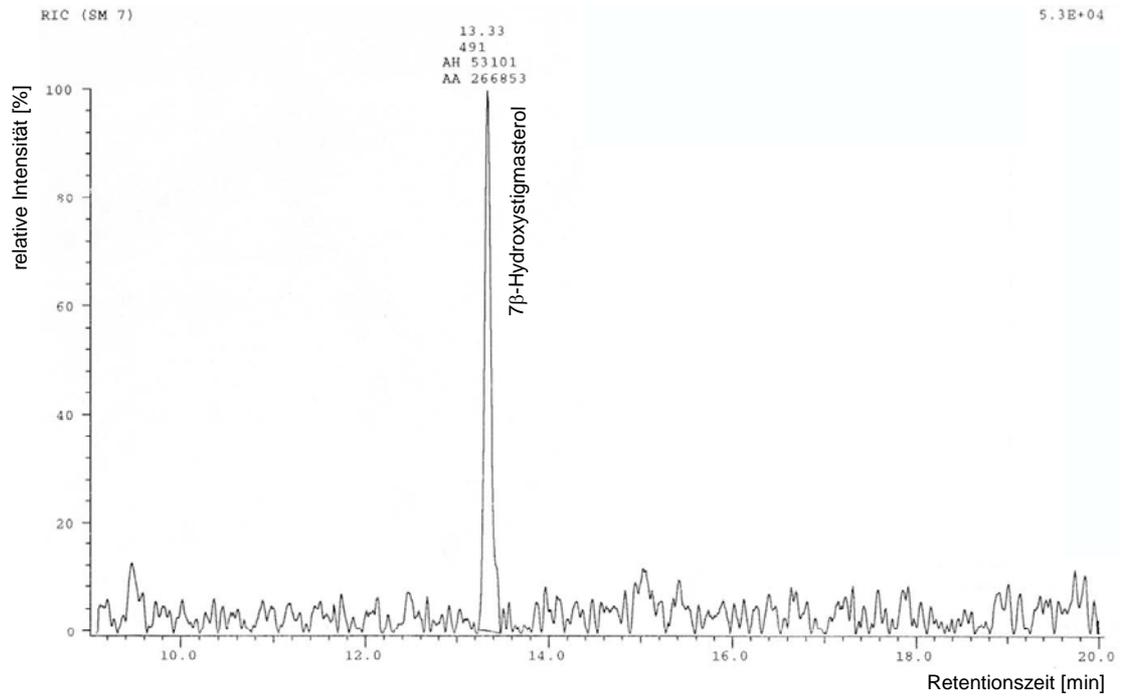
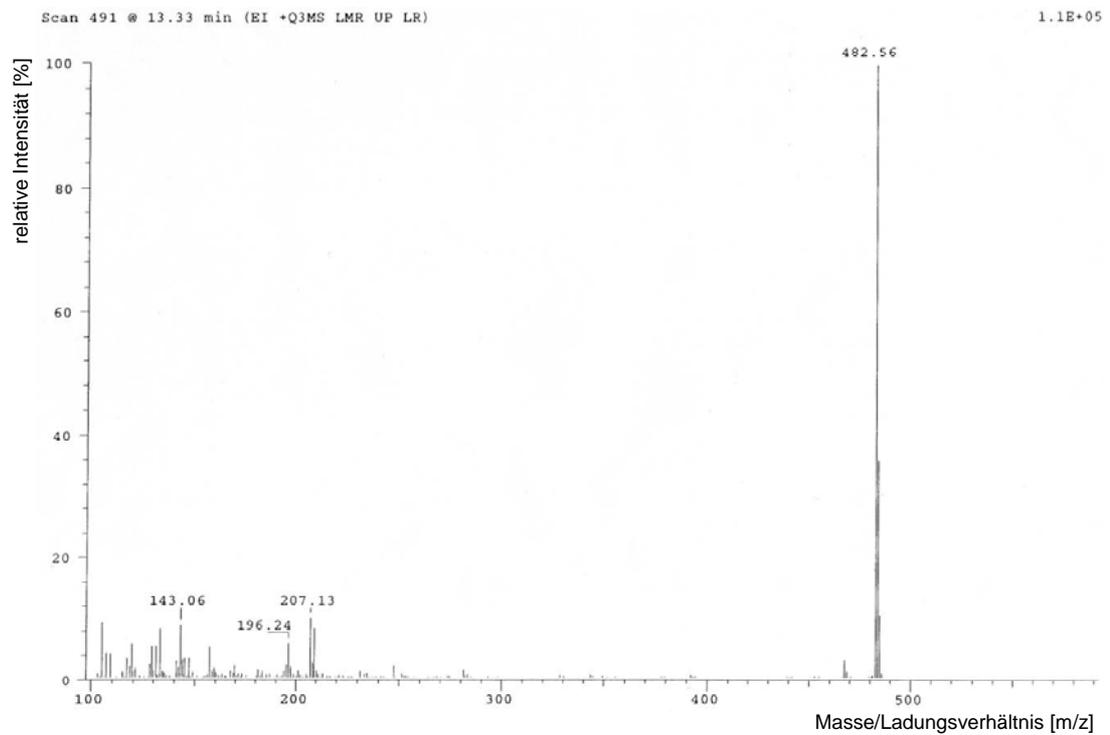
A**B**

Abbildung 39: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum (B) von 7β-Hydroxystigmasterol

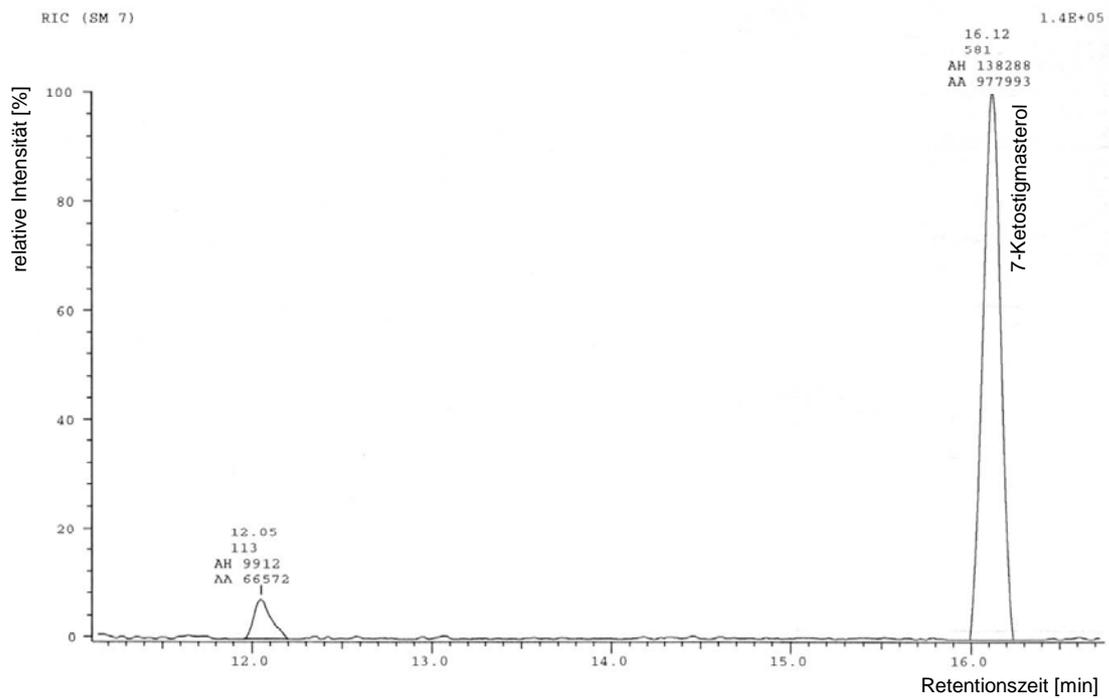
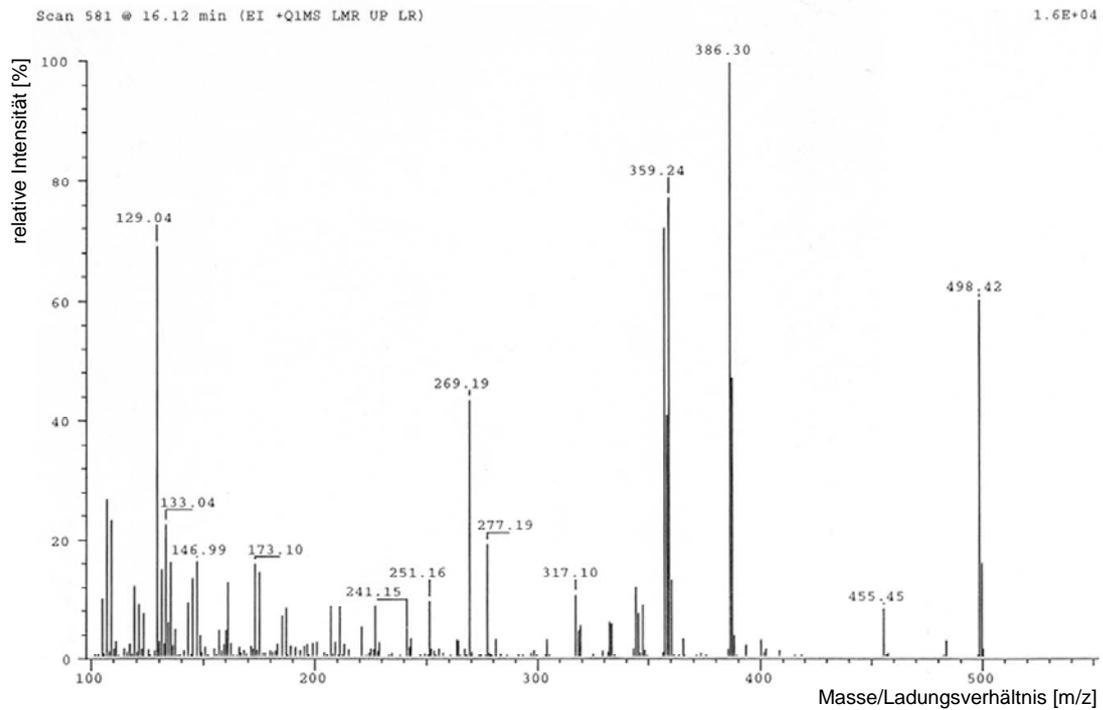
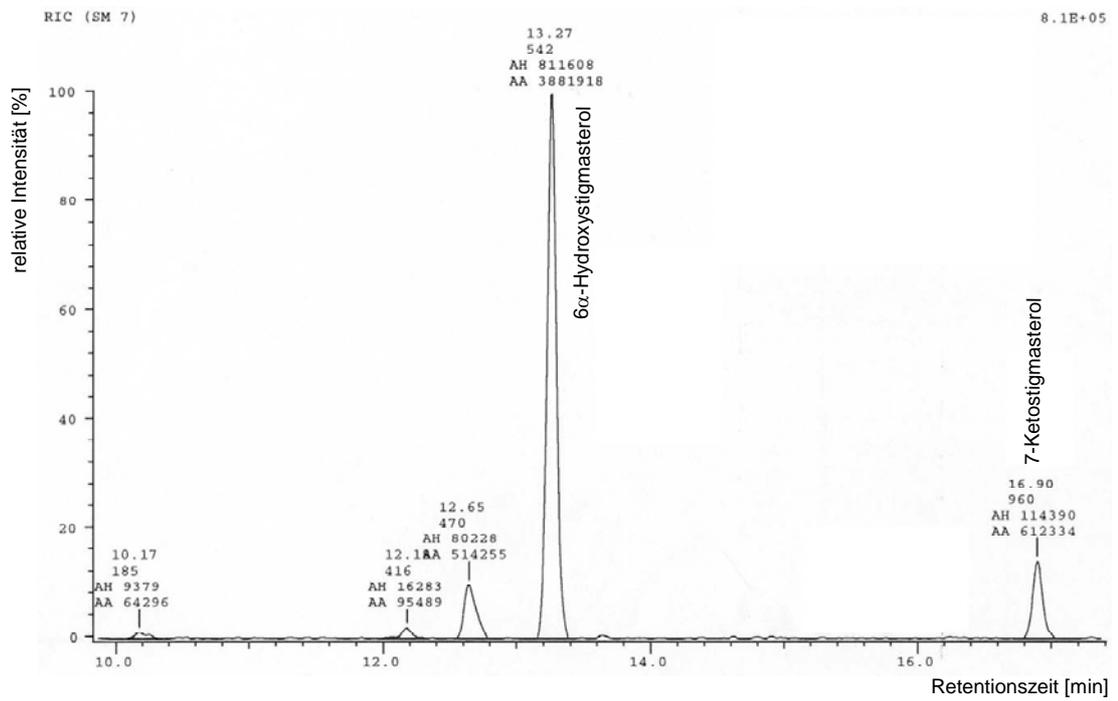
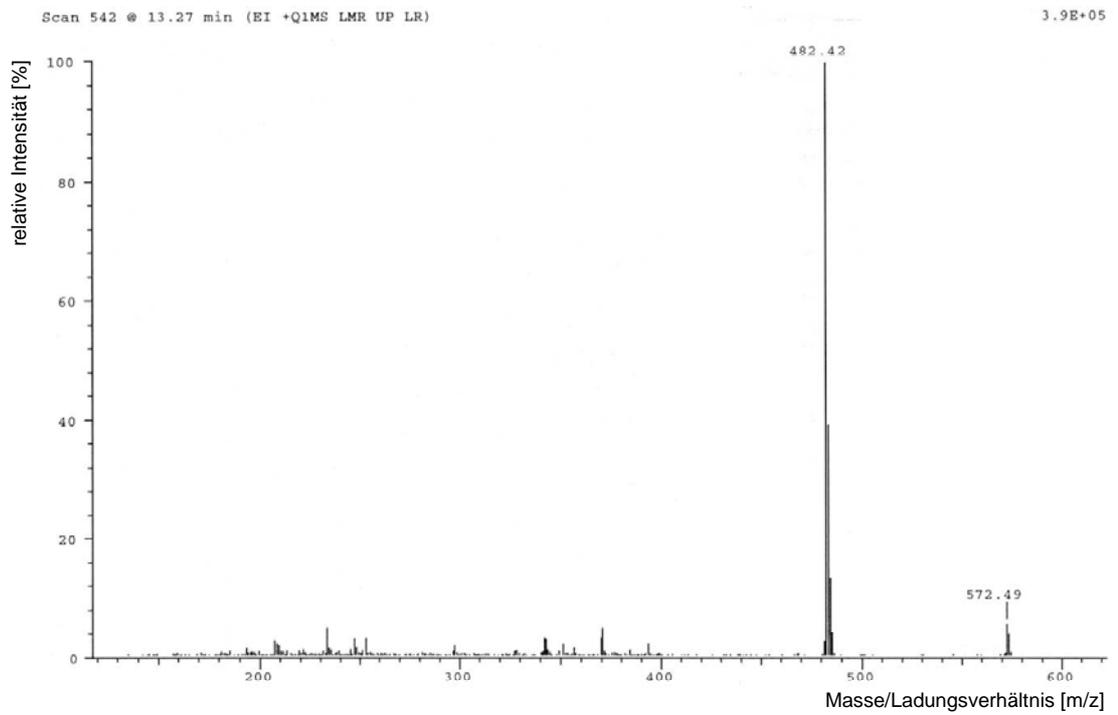
A**B**

Abbildung 40: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum (B) von 7-Ketostigmasterol

A**B**

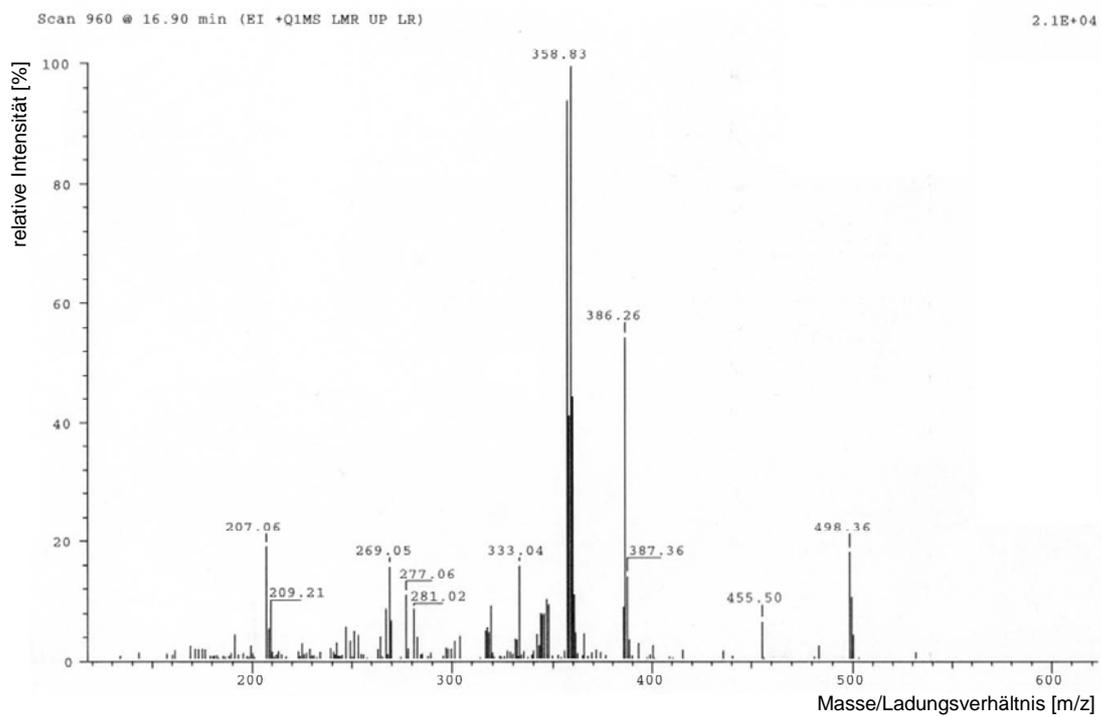
C

Abbildung 41: Gaschromatogramm von 6 α -Hydroxystigmasterol+7-Ketostigmasterol (A) und Massenspektren von 6 α -Hydroxystigmasterol (B) sowie 7-Ketostigmasterol (C)

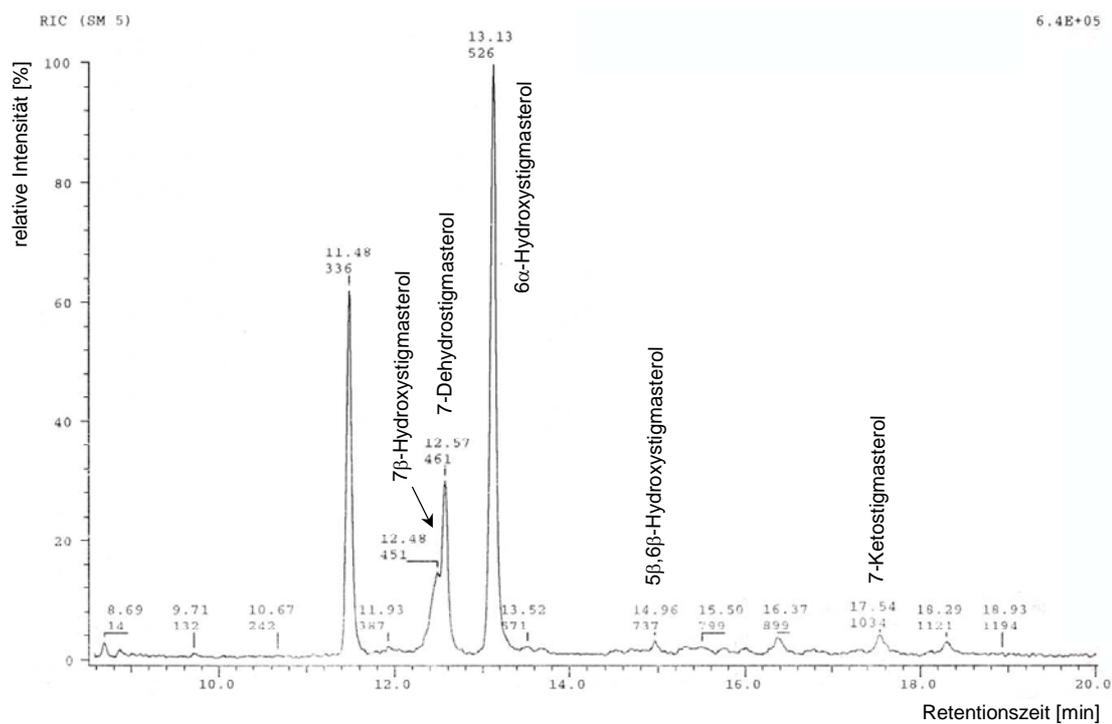
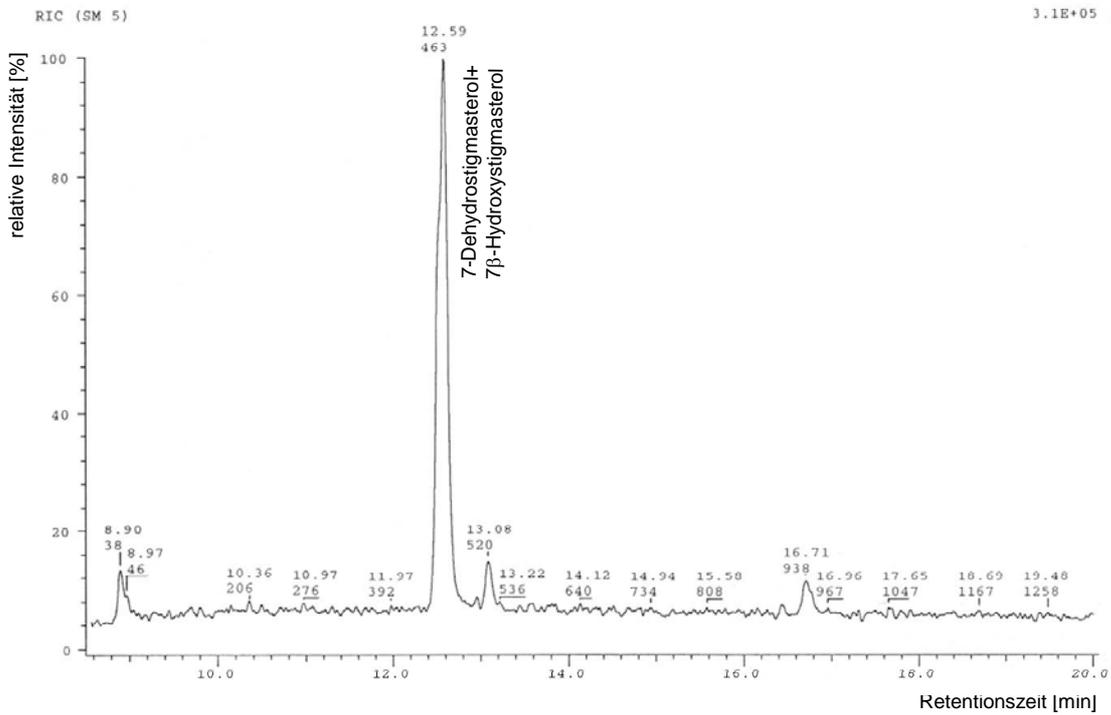
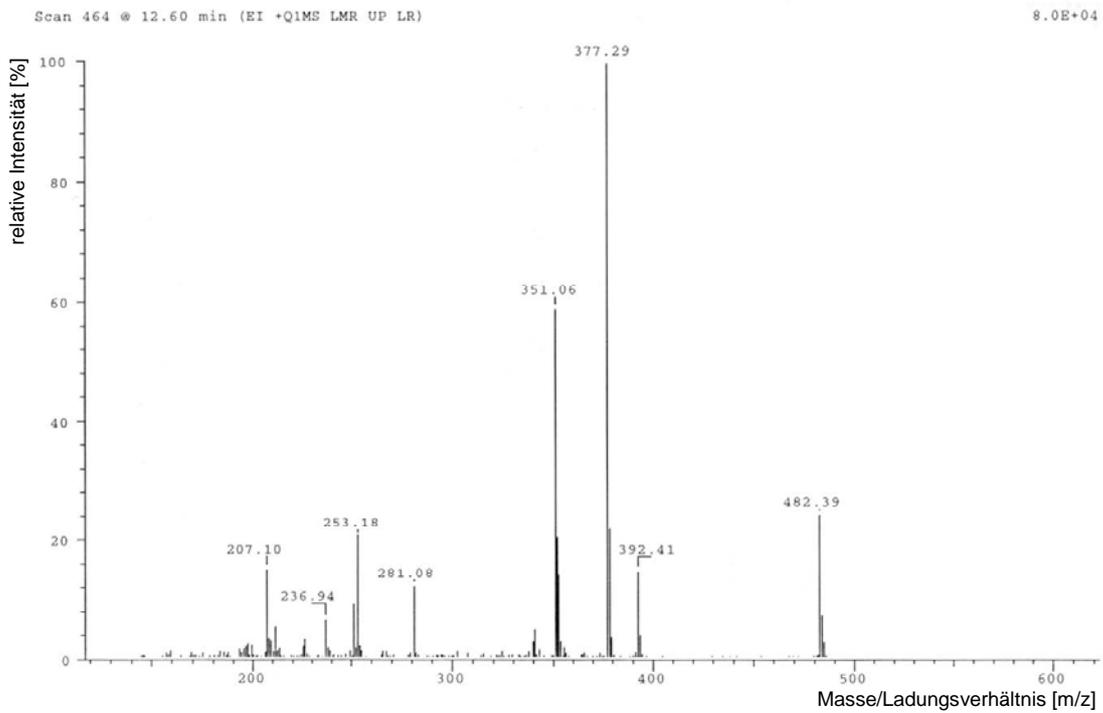


Abbildung 42: Gaschromatogramm vom oxidierten Stigmasterol-Gemisch 1

A



B



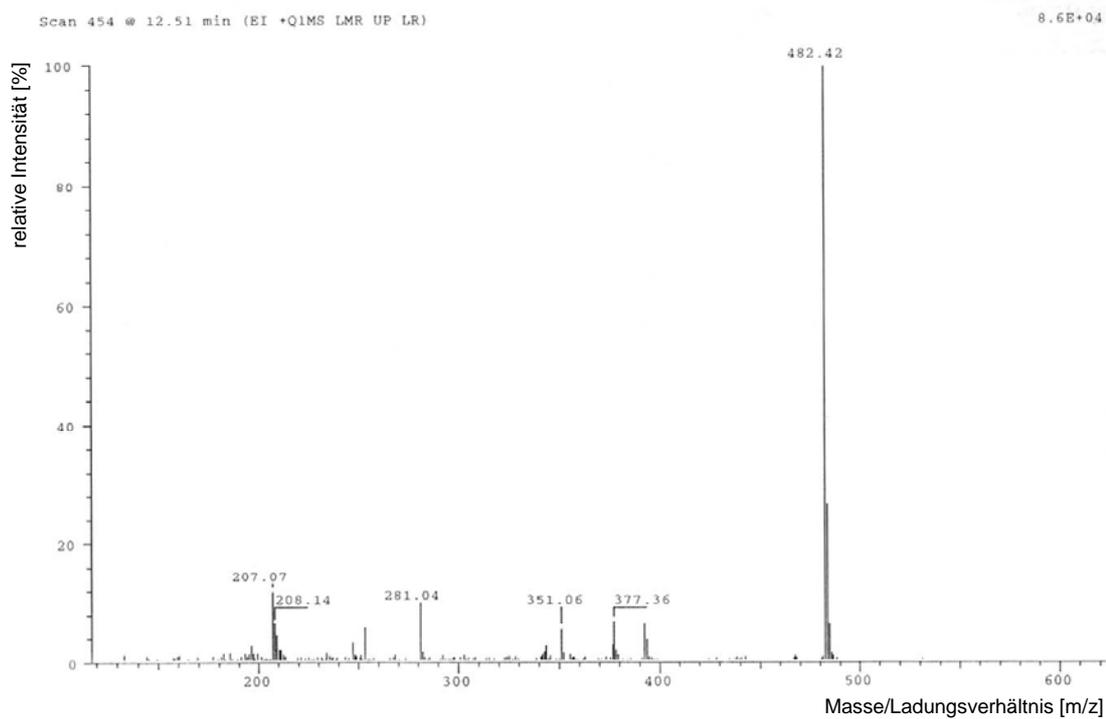
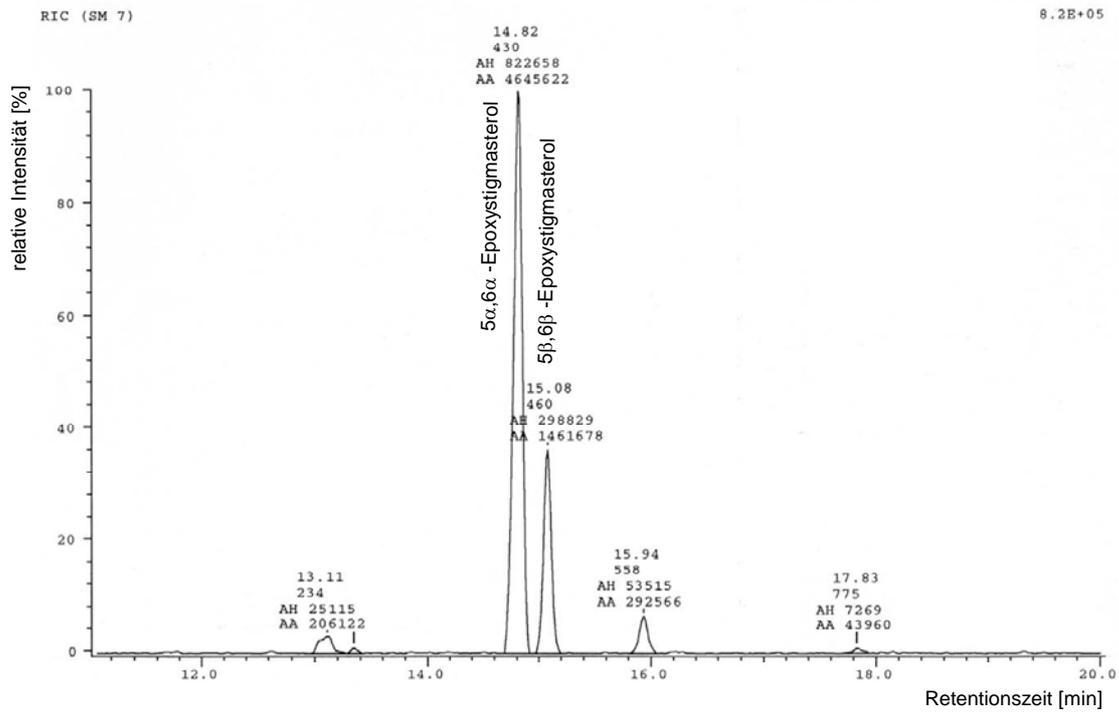
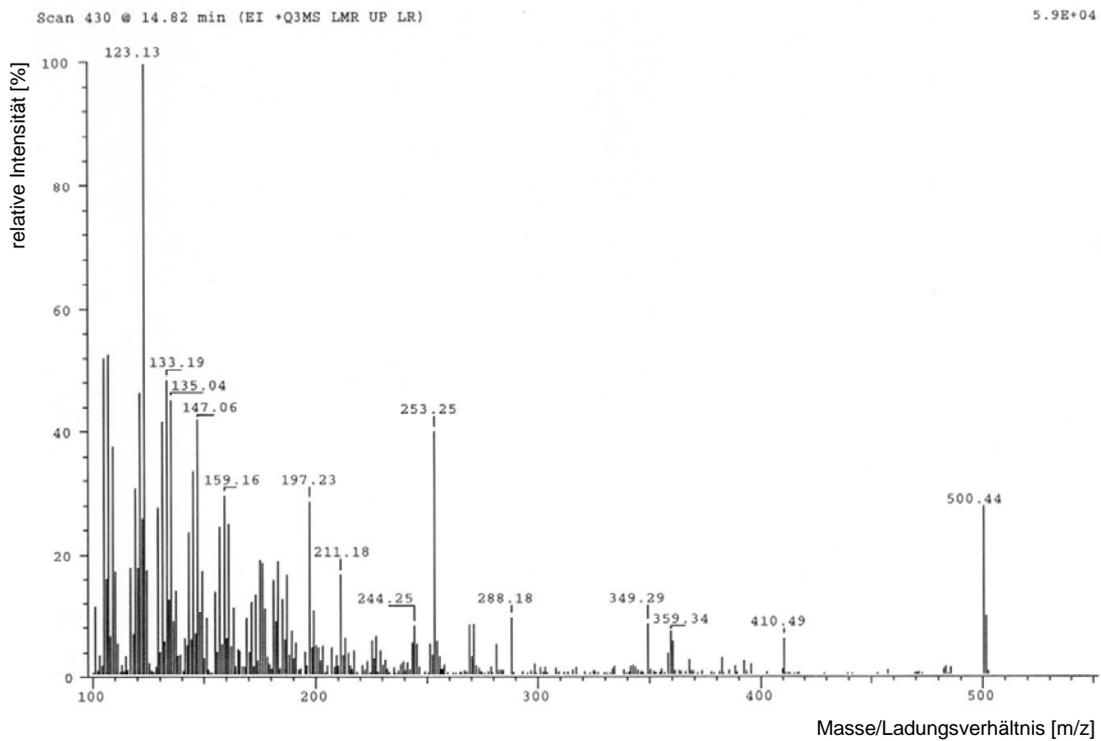
C

Abbildung 43: Gaschromatogramm von 7-Dehydrostigmasterol+7 β -Hydroxystigmasterol (A) und Massenspektren von 7-Dehydrostigmasterol (B) sowie 7 β -Hydroxystigmasterol (C)

A



B



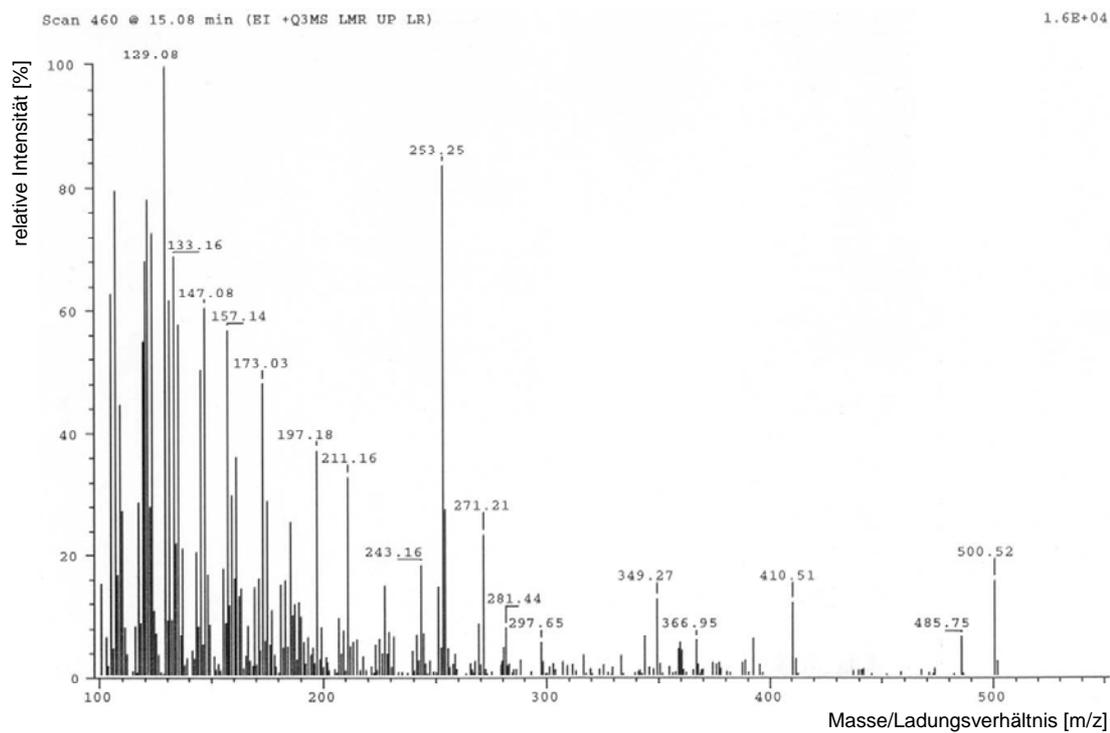
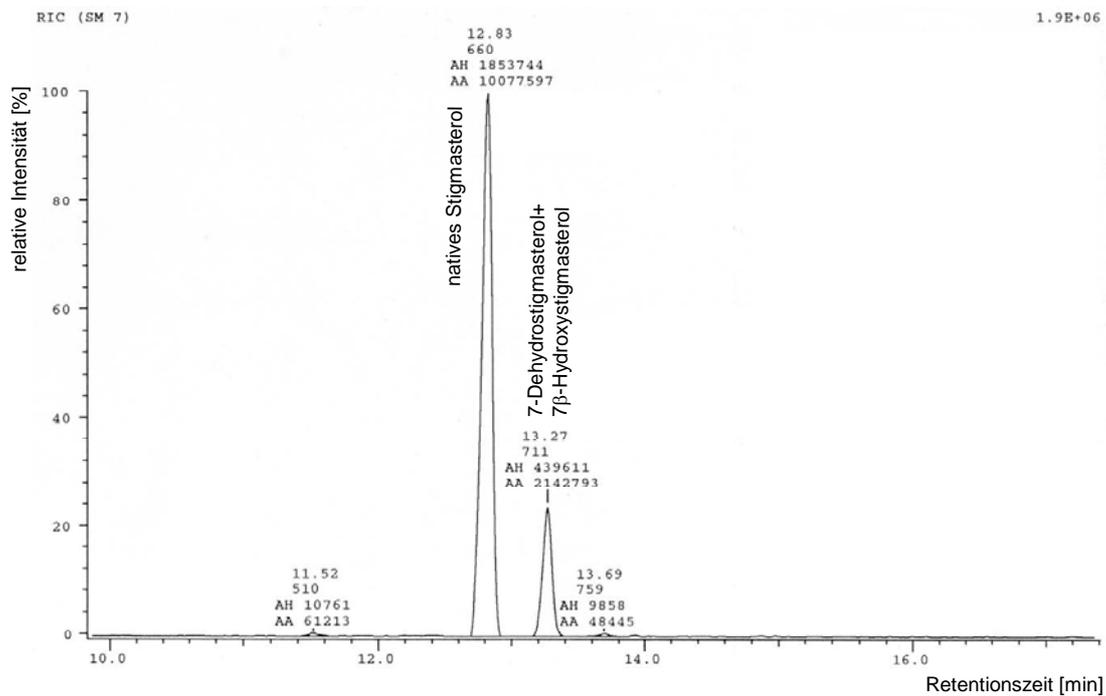
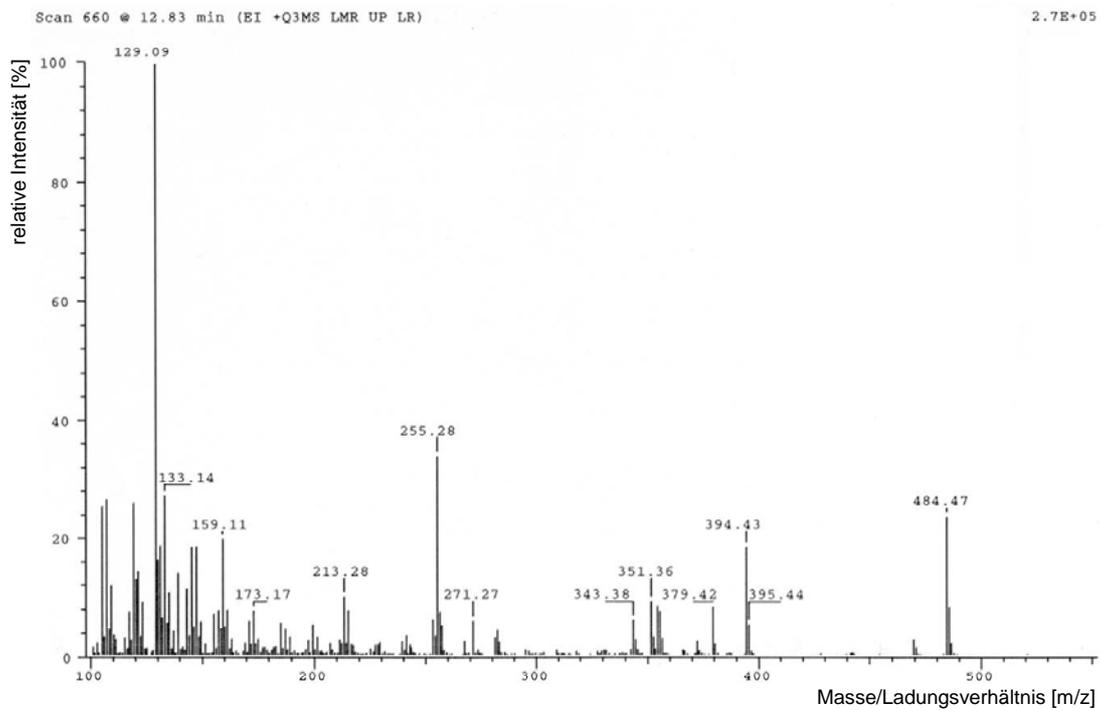
C

Abbildung 44: Gaschromatogramm von 5,6 α -+5,6 β -Epoxytigmasterol (A) und Massenspektren von 5,6 α -Epoxytigmasterol (B) sowie 5,6 β -Epoxytigmasterol (C)

A



B



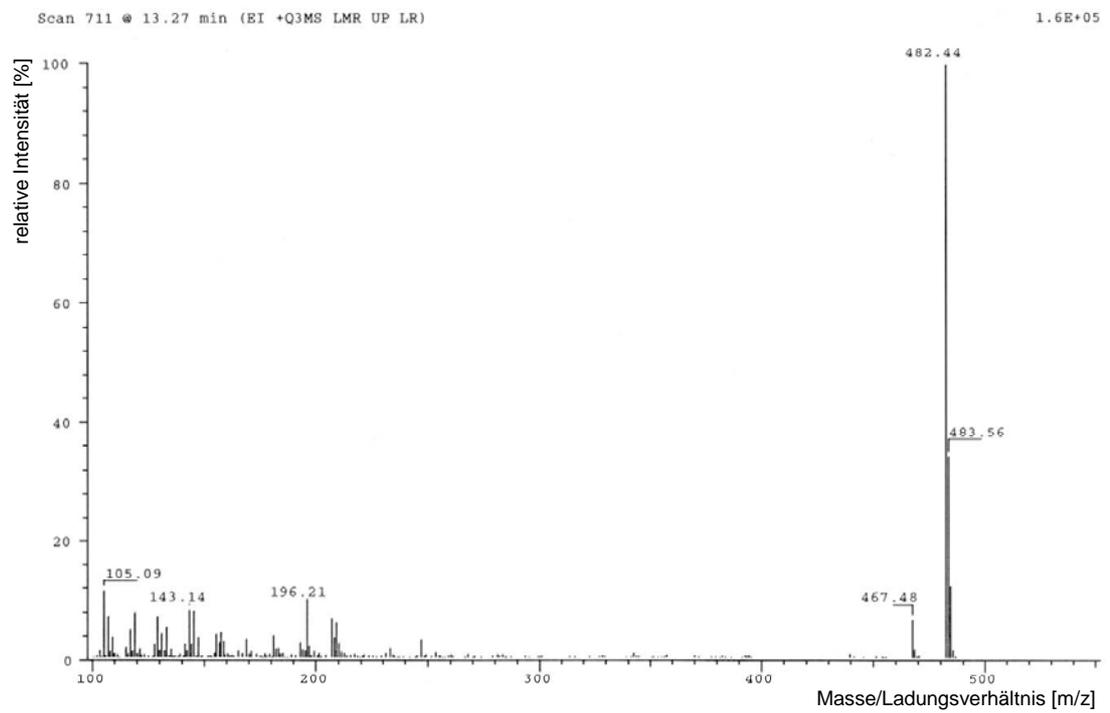
C

Abbildung 45: Gaschromatogramm vom oxidierten Stigmasterol-Gemisch 2 (A) und Massenspektren von nativem Stigmasterol (B) sowie 7-Dehydrostigmasterol+7 β -Hydroxystigmasterol (C)

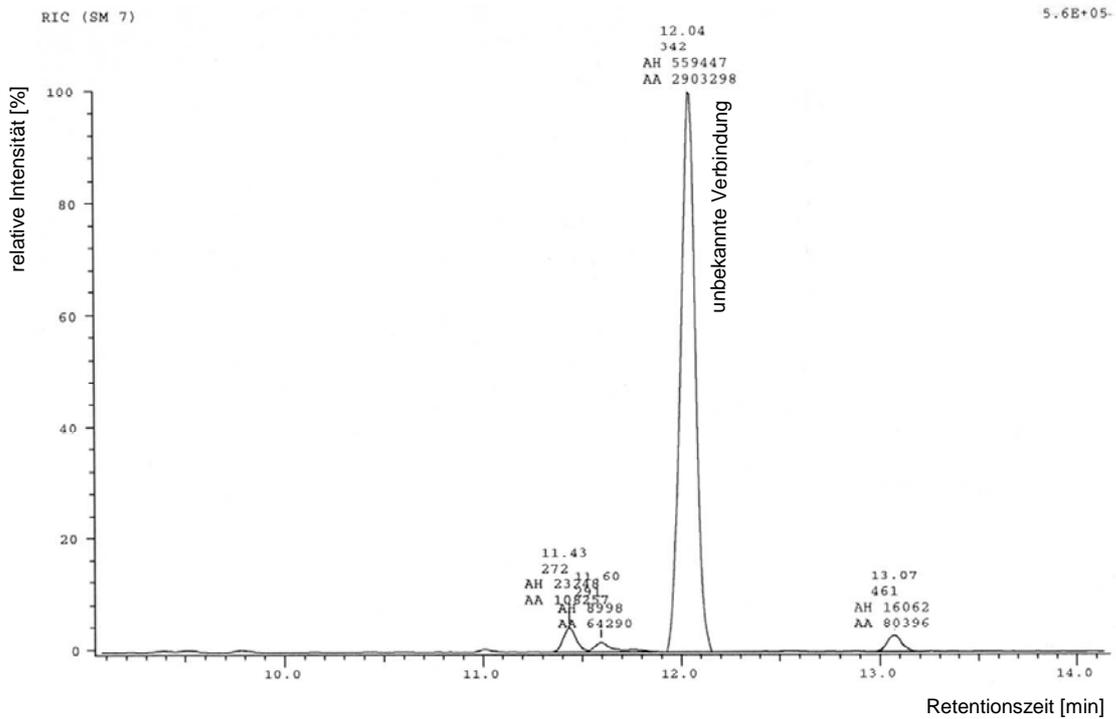
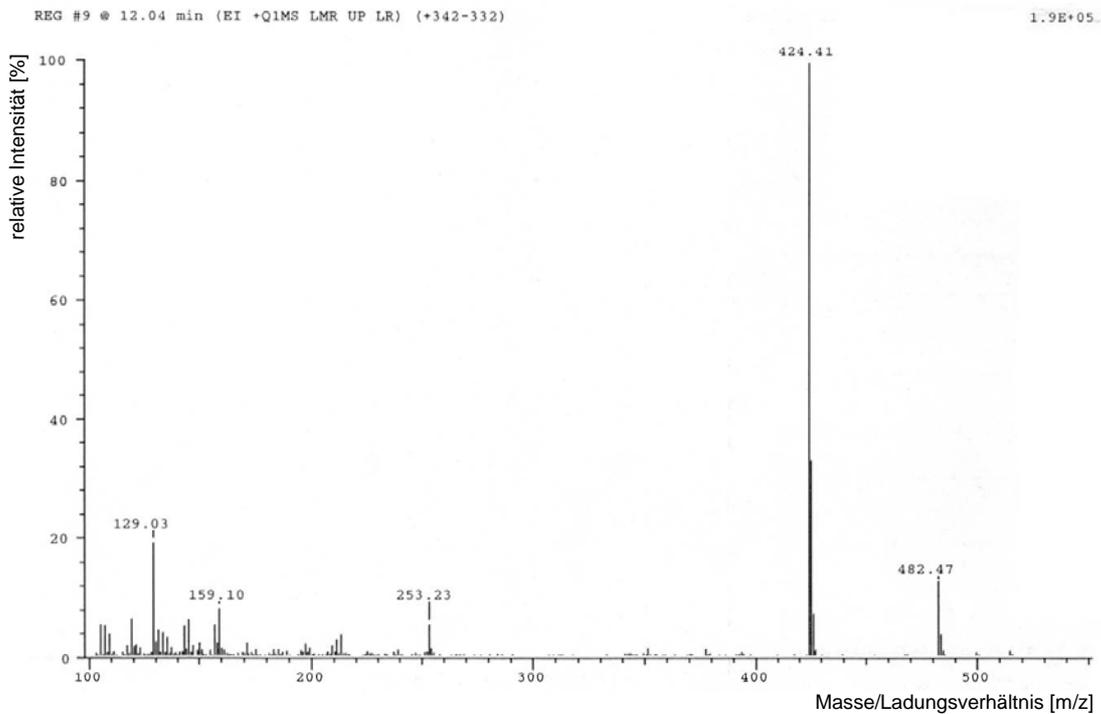
A**B**

Abbildung 46: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum (B) von der unbekanntem Verbindung

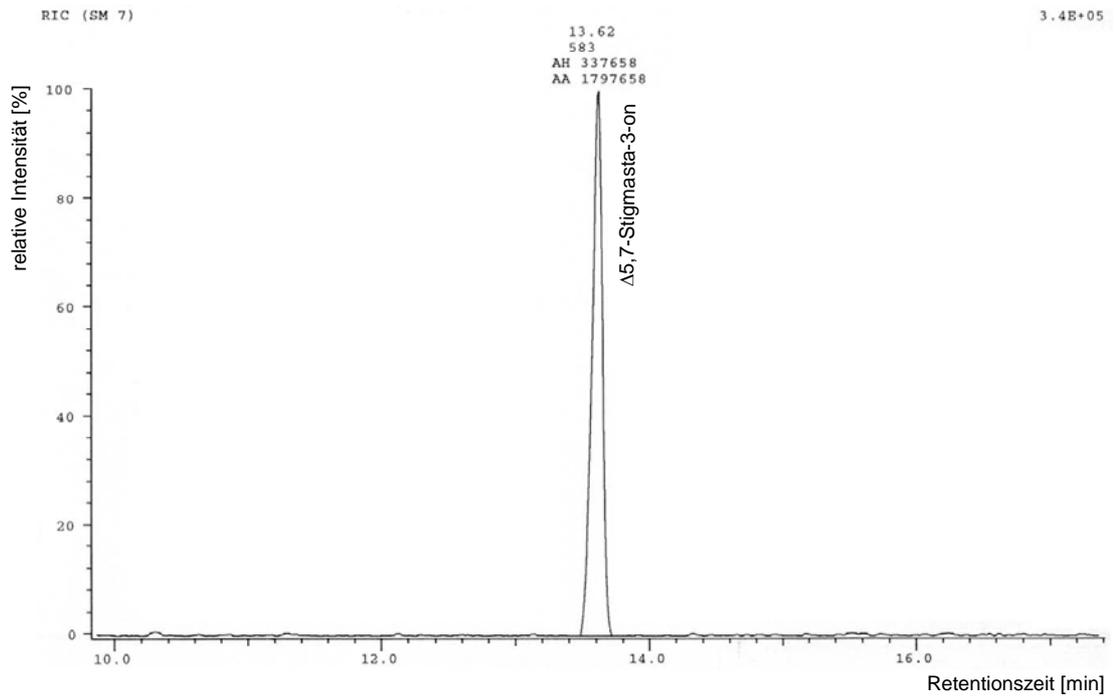
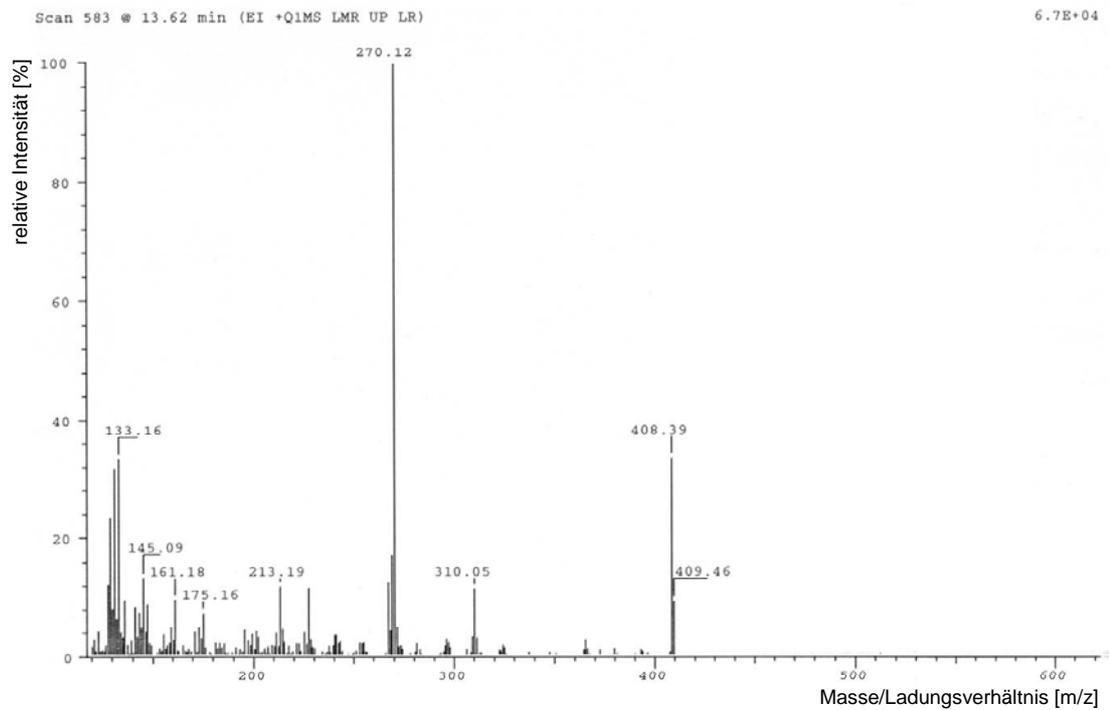
A**B**

Abbildung 47: Gaschromatogramm (A) und Massenspektrum (B) von $\Delta 5,7$ -Stigmasta-3-on

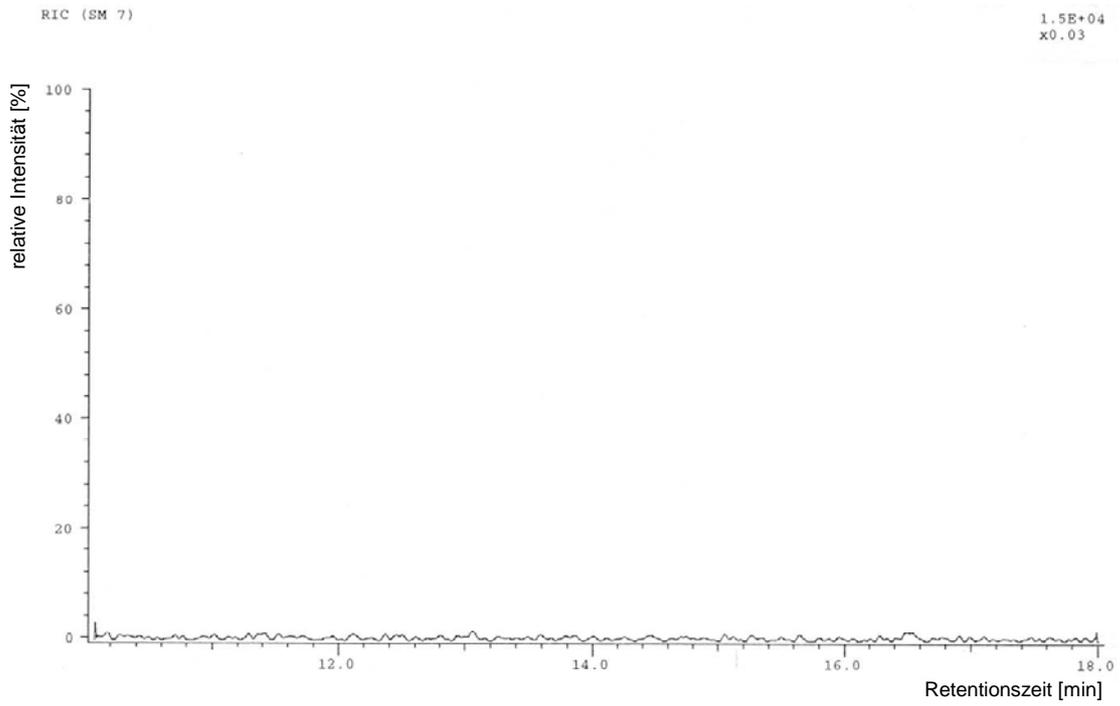


Abbildung 48: Gaschromatogramm vom Oxidationsblank

B Danksagung

Mein persönlicher Dank gilt allen Personen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Reinhard L. Lorenz für die Bereitstellung des Themas. Darüber hinaus möchte ich ihm aber vor allem für seine Offenheit in fachlichen Diskussionen und stetige Bereitschaft zu Hilfe und Rat in jeglichen Aspekten der Dissertation danken.

Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber danke ich für die Aufnahme in sein Institut, wodurch die Durchführung meiner Arbeit erst ermöglicht wurde.

Für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg (GRK 438) „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und die Gewährung eines Promotionsstipendiums möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess bedanken.

Christian Johannes und Gabriele Berberich danke ich für die aufwendige Produktion der für diese Arbeit essentiellen Testsubstanzen und ihre fachliche Unterstützung auf diesem Gebiet.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Brigitte Zimmer und Diana Wagner für Rat und Tat in allen methodischen Belangen.

Mein Dank richtet sich natürlich auch an alle anderen Institutsmitglieder für so manch konstruktives fachliches Gespräch.

Sabine Rode, die mir tagtäglich zur Seite stand, gebührt mein spezieller Dank. Durch ihre Professionalität und enge Zusammenarbeit blieb kaum jemals eine theoretische oder praktische Frage offen.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Ana und Adolf Hrusovar, denen ich diese Arbeit auch widme. Ihrer uneingeschränkten Unterstützung in allen Lebenslagen, besonders aber während der Dissertation, und ihrem stetigen Vertrauen und Glauben an mich verdanke ich das Erreichen meiner Ziele und das zu sein, was ich heute bin.

C Erklärung

Erklärung

nach § 2 der Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 1. Juni 1983 in der Fassung der siebten Änderungssatzung vom 1. Juni 2005

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

Bisher habe ich noch an keiner Promotionsprüfung 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, den 25.11.2008

Natalie Hrusovar

D Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Natalie Hrusovar
Geburtsdatum/-ort: 19.09.1974 in München
Staatsangehörigkeit: slowenisch
Konfession: rk

Schulbildung

09/1981 – 07/1985 Grundsule an der Hanselmannstraße, München
09/1985 – 07/1994 Willi-Graf-Gymnasium, München
07/1994 Abitur mit Allgemeiner Hochschulreife

Berufsausbildung

04/1995 – 04/1998 Berufsfachschule für Krankenpflege der
Schwesternschaft München vom BRK
03/1998 Staatsexamen als Krankenschwester

Hochschulausbildung

04/1998 – 06/2006 Studiengang Humanmedizin an der LMU München
03/2001 Ärztliche Vorprüfung
03/2002 Erstes Staatsexamen
03/2005 Zweites Staatsexamen
06/2006 Drittes Staatsexamen

Krankenpflegepraktika

04/1995 – 03/1998 Rotkreuz-Krankenhaus, München: Innere Medizin,
Intensivmedizin
Medizinische Poliklinik der LMU München: Innere
Medizin, Orthopädie, Chirurgie
Psychiatrische Klinik und Poliklinik der LMU München
BRK-Sozialstation Lehel, München
Frauenklinik vom Roten Kreuz, München: Kreissaal,
Neugeborene, Wöchnerinnen, Onkologie

Famulaturen

08/09/2002	Pathologisches Institut der LMU München
02/03/2003	Dermatologische Klinik und Poliklinik der LMU München
08/09/2003	Deutsches Herzzentrum der TU München
09/10/2003	Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin (Dr. med. Pohl), München

Praktisches Jahr

04 – 06/2005	Chirurgie: Krankenhaus Dritter Orden, München
06 – 08/2005	Chirurgie: Royal Lancaster Infirmary, UK
08 – 11/2005	Innere Medizin: Krankenhaus München Neuperlach
11 – 03/2006	Radiologie: Klinikum Großhadern der LMU München

Promotion

Seit 02/2004	Experimentelle Dissertation am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der LMU München unter Leitung von Prof. Dr. med. R. L. Lorenz
--------------	---

Förderung der experimentellen Arbeit

04 – 09/2004	Stipendium der August-Lenz-Stiftung
09 – 12/2004	Stipendium des DFG-Graduiertiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ (GRK 438)