

JULIA NIEHAUS

Untersuchungen zur Cholesterin-Homöostase in  
Telomerase-immortalisierten Tangier-Fibroblasten

2006



Aus dem Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Assmann FRCP)  
an der Universität Münster

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Walter

Vorgelegt über das Institut für Tierpathologie  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Wolfgang Schmahl)  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Untersuchungen zur Cholesterin-Homöostase in Telomerase-immortalisierten Tangier-Fibroblasten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
JULIA NIEHAUS  
aus Münster

- Münster 2006 -

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität  
München.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Für Anna-Carrie

In Liebe, Mama



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
---------------------------------	----------

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
------------------------------------	-----------

<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Die Arteriosklerose .....	1
1.1. Ätiologie und Pathogenese der Arteriosklerose.....	1
1.2. Bedeutung und Folgen der Arteriosklerose .....	4
1.3. Lipoproteine.....	5
1.4. Die Bedeutung der Tiermedizin für die Arteriosklerose .....	8
2. Tangierkrankheit .....	9
3. Immortalisierung von humanen Fibroblasten mit der katalytischen Untereinheit humaner Telomerase .....	11
3.1. Immortalisierung von Tangier-Fibroblasten .....	14
<b>II Aufgabenstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>III Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
1. Materialien .....	21
2. Geräte .....	25
3. Zellkultur .....	26
3.1. Kultivierungsbedingungen .....	26
3.2. Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	27
3.3. Bestimmung der Zellzahl .....	28
3.4. Biopsie humaner Fibroblasten .....	28
3.5. Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	28
3.5.1. Auftauen eukaryotischer Zellen .....	29
3.5.2. Subkultivierung von Monolayerkulturen.....	29
3.5.3. Lagerung von eukaryotischen Zellen.....	30
3.6. Inkubationsversuche .....	30
4. Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	31
4.1. Isolierung von Gesamt-RNA.....	31
4.2. Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäure-	

	konzentrationen .....	32
4.3.	Agarosegelelektrophorese .....	33
4.4.	cDNA-Synthese .....	35
4.5.	(RT-)PCR für Standardanwendungen.....	35
4.6.	Quantitative Echtzeit-RT-PCR .....	36
4.7.	DNA-Sequenzanalyse.....	38
5.	Gaschromatographie .....	40
5.1.	Aufbereitung der Zellen für die Gaschromatographie .	40
5.2.	Proteinbestimmung .....	40
5.3.	Quantitative Bestimmung von Gesamtcholesterin in Zellen .....	41
5.4.	Quantitative Bestimmung von freiem Cholesterin in Zellen .....	42
5.5.	Quantitative Bestimmung von Fettsäuren in Zellen ....	43
6.	Messung der endogenen Cholesterinbiosynthese.....	44
6.1.	Beladen der Zellen mit <sup>3</sup> H-Acetat.....	44
6.2.	Lipidextraktion.....	44
6.3.	Dünnschichtchromatographie .....	45
6.4.	Detektion der Cholesterinbanden .....	45
<b>IV</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
1.	Zellkulturversuche .....	47
1.1.	Charakterisierung der Fibroblastensponder .....	47
1.2.	Immortalisierung der Fibroblasten .....	48
2.	RT-PCR-Analyse zum Nachweis der Genexpression in Fibroblasten.....	48
3.	Quantitative Analysen mittels Gaschromatographie .....	59
3.1.	Quantifizierung des intrazellulären Cholesterin- Gehaltes .....	59
3.2.	Quantifizierung der intrazellulären Fettsäuren .....	62
3.3.	Quantifizierung des intrazellulären Gehaltes an den Oxysterolen 24-Hydroxycholesterin, 25-Hydroxy- cholesterin und 27-Hydroxycholesterin .....	64
4.	Messung der endogenen Cholesterin-Biosynthese mittels <sup>3</sup> H-Acetat .....	71
<b>V</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>73</b>
1.	Probleme des verwendeten Zellkulturmodells .....	73

---

2.	Etablierung der Methoden.....	75
2.1.	Echtzeit-RT-PCR für Genexpressionsanalysen.....	75
2.2.	Gaschromatographie .....	75
3.	Die Regulation des zellulären Cholesterin-Stoffwechsels in gesunden Zellen .....	76
4.	Die Regulation des zellulären Lipidstoffwechsels in Tangier- Zellen .....	81
5.	Die Auswirkungen des Serum-Entzugs.....	89
<b>VI</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>97</b>
<b>VII</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>99</b>
<b>Anhang</b>	<b>Danksagung</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP-Bindungskassettentransporter
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
<i>Aqua bidest.</i> <sub>DEPC</sub>	mit DEPC behandeltes, bidestilliertes Wasser
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	<i>base pair(s)</i> ; Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNS
CoA	Coenzym A
CON	<i>control</i> ; Kontrolle
CPM	<i>counts per minute</i> ; radioaktive Zerfälle pro Minute
CYP	Cytochrom p450
d	<i>dies</i> ; Tag
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat; Pyrokohlensäurediethylester)
d.h.	das heißt
DMEM	DULBECCO's <i>modified EAGLE's medium</i> ; DULBECCO's modifiziertes EAGLE's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid(s)</i> ; Desoxyribonukleinsäure(n)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
evtl.	eventuell

FAS	<i>fatty acid synthase</i> ; Fettsäuresynthase
FC	<i>free cholesterol</i> ; freies Cholesterin
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum
× g	Gravitationsgeschwindigkeit
GC	Gaschromatographie
h	<i>hora</i> , Stunde(n)
HDL	<i>high density lipoproteins</i> ; Lipoproteine hoher Dichte
HMG	β-Hydroxy-β-methyl-glutaryl
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> ; Hochleistungsfüssigchromatographie
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i> ; Lipoproteine mittlerer Dichte
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDL	<i>low density lipoproteins</i> ; Lipoproteine geringer Dichte
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	<i>liver X receptor</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Botenribonukleinsäure(n)
n.d.	nicht detektierbar
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ; Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PE	Polyethylen
RNA	<i>ribonucleic acid(s)</i> ; Ribonukleinsäure(n)
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkriptase
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i> ; SREBP-Spaltung aktivierendes Protein
SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase

---

SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SRE	<i>sterol responsive element</i> ; Sterol-sensitives Element
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i> ; Sterol-regulierendes Element bindendes Protein
SRP	<i>signal recognition particle</i> ; Signalerkennungspartikel
Tab.	Tabelle
TAPS	N-tris[hydroxymethyl]methyl-3-aminopropansulfonsäure
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS-Puffer	<i>Tris buffered saline</i> ; Tris-Puffer
TD	<i>Tangier Disease</i> ; Tangierkrankheit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin [1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan]
TRAP	<i>Telomer Repeat Amplification Protocol</i>
TRF	<i>Telomer Restriction Fragment Length</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan [2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol]
U	<i>international unit(s)</i> ; internationale Einheit(en)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
VLDL	<i>very low density lipoproteins</i> ; Lipoproteine sehr geringer Dichte
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

# I. Einleitung

## 1. Die Arteriosklerose

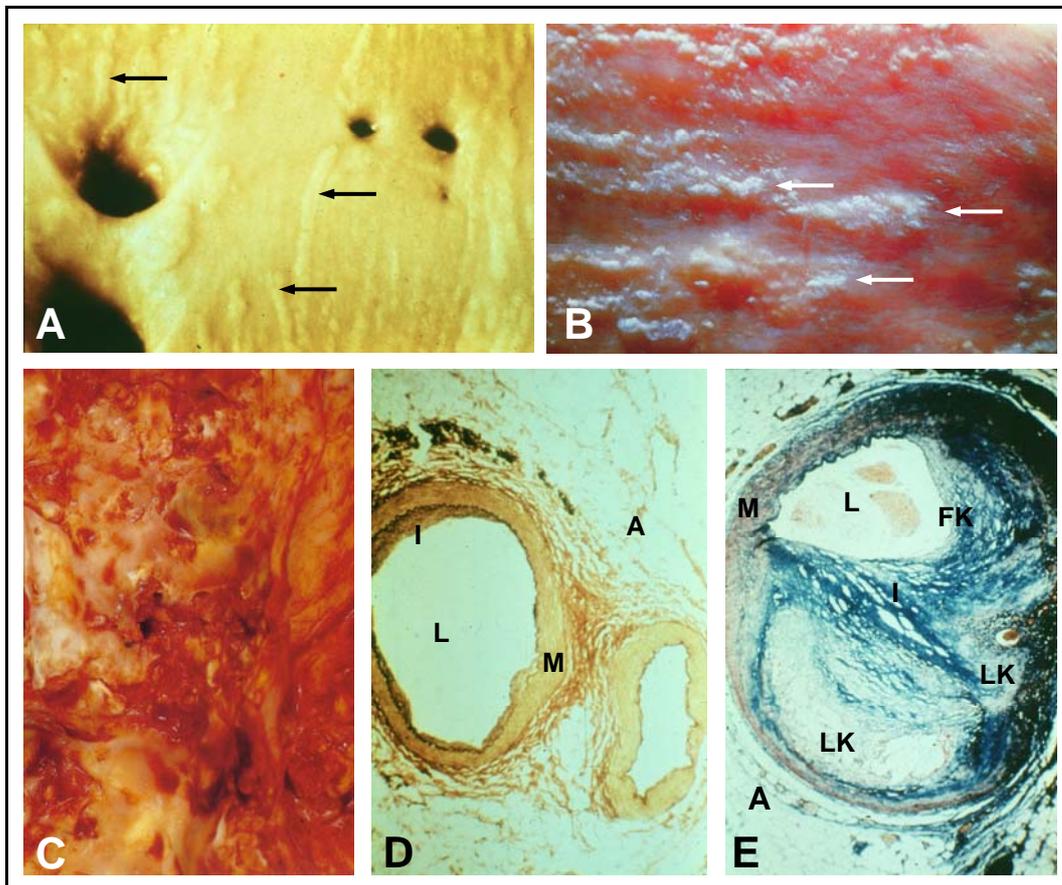
Erstmals 1835 von LOBSTEIN verwendet, leitet sich der Begriff der Arteriosklerose von den griechischen Worten „*athere*“ (Weizenmehlbrei) und „*scleros*“ (hart) ab. Bezeichnet wird damit eine chronische, sich über viele Jahre entwickelnde, entzündlich-proliferative Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien. Charakteristisch für die Arteriosklerose ist eine Verdickung der Gefäßwand, welche aus der Proliferation glatter Muskelzellen und der damit verbundenen Produktion von Molekülen der extrazellulären Matrix, aus der Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten in den Subendothelialraum und aus einer dortigen Ansammlung von Lipiden, hauptsächlich Cholesterin und Cholesterinestern, resultiert. In einigen Fällen werden betroffene Gefäße so stark verengt, dass es zu einer Sauerstoffunterversorgung und somit Schädigung des Gewebes bestimmter Organe kommen kann. Eine weitere Komplikation entsteht durch eine Plaqueruptur oder eine Erosion des Endothels arteriosklerotischer Plaques, welche die Ursachen für Schlaganfall und Herzinfarkt sind.

Die wichtigsten Folgen der Arteriosklerose sind Schlaganfälle, periphere Durchblutungsstörungen und vor allem koronare Herzkrankheiten, auf die etwa 30 % aller Todesfälle in Deutschland zurückzuführen sind. Aufgrund dieser klinischen Konsequenzen stellt die Arteriosklerose die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar (GLASS & WITZTUM, 2001).

### 1.1. Ätiologie und Pathogenese der Arteriosklerose

Die „*response to injury*“-Hypothese wurde 1973 von ROSS und GLOMSET formuliert und basiert auf den Arbeiten von ROKITANSKY (1852) und VIRCHOW (1858). Sie liefert den bislang besten Erklärungsansatz für die Ursache der Arteriosklerose (Ross, 1993). In dieser Hypothese nimmt die

Krankheit ihren Anfang in einer Verletzung bzw. Dysfunktion des Endothels. Die Endothelschicht kleidet das Gefäß zum Gefäßlumen hin lückenlos aus und bildet zusammen mit einer subendothelialen Matrix die Intima, die innerste der drei Zellschichten der Arterienwand (vgl. Abb. 1.D). Zahlreiche exogene und endogene Noxen bzw. Krankheiten werden für die Auslösung der Erkrankung verantwortlich gemacht (z.B. Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Toxine, Nicotin, Hypoxie, Wirbelbildungen, psychischer Stress, Alter und familiäre Belastung). Diese These wird durch zahlreiche tierexperimentelle, klinische und epidemiologische Beobachtungen gestützt.



**Abb. 1:** Verschiedene Stadien arteriosklerotischer Läsionen. **A:** Initialläsionen und Fettstreifen (fatty streaks), letztere sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Fibröse Läsionen, mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **C:** Komplizierte Läsion bzw. fibröse Plaque einer Arterienwand (gelbliche Verfärbungen durch Lipideinlagerungen, deutlich erkennbare Oberflächenrisse). **D:** Querschnitt durch eine Arterie mit nur geringfügiger Verdickung der Intima (links) und eine arteriosklerotisch unveränderte Arterie (rechts). **E:**

Querschnitt durch eine stark arteriosklerotisch veränderte Arterie mit ausgeprägten Lipidkernen (LK) und darüber liegender fibröser Kappe (FK). Das Gefäßlumen ist mit L, die Adventitia mit A, die Media mit M und die Intima mit I gekennzeichnet (AKKERMAN et al., 1987; DAVIES & WOOLF, 1990).

Ein Defekt oder eine Dysfunktion des Endothels führt zur Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle. Diese bewirken, dass sich T-Lymphozyten und Monozyten an die verletzte Oberfläche anhaften und in die subendothelialen Bereiche der Intima einwandern (Initialläsion). Dort differenzieren die Monozyten zu Makrophagen und sezernieren chemotaktisch wirksame Stoffe, die unter anderem die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima und dort die Proliferation dieser Zellen bewirken. Durch die Fähigkeit der Makrophagen und glatten Muskelzellen der Intima, Lipide aufzunehmen und zu speichern (Schaumzellbildung), entwickelt sich die initiale Läsion weiter zu den so genannten Fettstreifen (*fatty streaks*), die bereits mit dem bloßen Auge erkennbar sind (vgl. Abb. 1.A). Die arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand sind bis zur Ausbildung der Fettstreifen wahrscheinlich noch reversibel.

Durch die weitere Proliferation der Muskelzellen im subintimalen Raum, die mit der Synthese von Matrixproteinen wie Kollagenen einhergeht, und die schichtartige Akkumulation von lipidhaltigen Makrophagen, zusätzlich eingelagertem extrazellulären Lipidmaterial, T-Lymphozyten und ebenfalls lipidhaltigen Muskelzellen kommt es zu einer weiteren Verdickung der Arterienwand (fibröse Läsion, vgl. Abb. 1.B). Daraus entsteht letztlich nach Jahren ein kapselartiges, von einer dichten Bindegewebsmatrix umgebenes Gebilde, in dessen Kern die Zellen nekrotisch werden. In diesem Stadium liegt eine fibröse Plaque vor, die sich zu einer komplizierten Läsion weiterentwickeln kann (vgl. Abschnitt 1.2 und Abb. 1.C und 1.E).

Die Stabilität der Plaque ist von vielen Faktoren (vor allem aber von ihrem Lipid- und Kollagengehalt) abhängig und hat entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Erkrankung (vgl. Kapitel 1.2). Je mehr Lipide sich im Kern befinden, desto weicher und instabiler ist die Plaque, so dass ein Aufreißen der Plaque – besonders im Bereich vieler Schaumzellen – begünstigt ist (FALK, 1992). Die so genannte Plaqueruptur führt zum Auslösen der Gerinnungskaskade, die zur Bildung eines Thrombus führt. Ein solcher Thrombus bringt die Gefahr des Verschlusses des betroffenen Gefäßes oder eines kleineren stromabwärts liegenden Gefäßes mit sich.

## **1.2. Bedeutung und Folgen der Arteriosklerose**

Kardiovaskuläre Erkrankungen als direkte Folgeerscheinung der Arteriosklerose stellten mit 16,6 Millionen Todesfällen im Jahre 2001 (das entspricht ca. einem Drittel aller Todesfälle) weltweit die häufigste Todesursache dar (WHO, 2003).

Die klinisch bedeutendste und am häufigsten letal verlaufende Manifestation der Arteriosklerose betrifft das arterielle Gefäßsystem des Herzens. Die koronare Herzkrankheit ist die häufigste Form der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland und war in Form von Herzinfarkten und ischämischen Herzerkrankungen für 25,6 % aller Todesfälle im Jahr 2002 verantwortlich (STATISTISCHES BUNDESAMT 2004). Die Manifestation von arteriosklerotischen Veränderungen in gehirnversorgenden Arterien resultiert vor allem in Schlaganfällen, welche für rund 4,7 % der im Jahre 2002 verzeichneten Todesfällen in Deutschland verantwortlich (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2004) waren.

Die Arteriosklerose kann weitere physische und psychische Beeinträchtigungen hervorrufen. Wichtig zu nennen ist die umgangssprachlich als „Schaufensterkrankheit“ bezeichnete periphere Durchblutungsstörung an den unteren Extremitäten. Symptomatisch sind belastungsabhängige Schmerzen, welche Betroffene beim Gehen zu

regelmäßigen Pausen zwingen. Bei einer Infektion kann es zur Gangränbildung mit anschließender Nekrose kommen.

### 1.3. Lipoproteine

Störungen des Lipoproteinstoffwechsels sind eng mit der Arteriosklerose verbunden. Daher wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die verschiedenen Lipoproteine und den Lipoproteinstoffwechsel gegeben.

Die Funktion der Lipoproteine ist der Transport der in Wasser unlöslichen Fette im wässrigen Milieu des Blutes. Sie stellen hochmolekulare, wasserlösliche Aggregate von Lipiden (Cholesterin, Cholesterinester, Triglyzeride, Phospholipide und freie Fettsäuren) und Proteinen (den sogenannten Apolipoproteinen) dar. Im Plasma befinden sich fünf Dichteklassen von Lipoproteinen, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden und für den Transport unterschiedlicher Lipide verantwortlich sind (HAVEL *et al.*, 1955; ASSMANN, 1982):

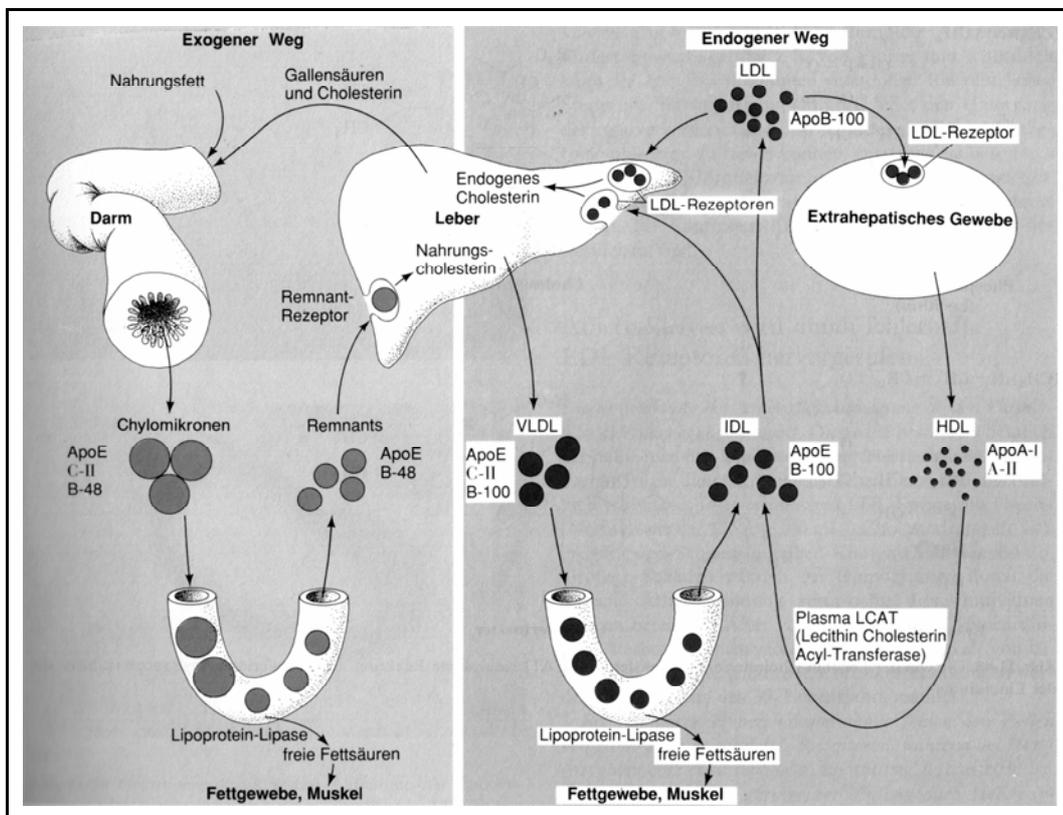
- Chylomikronen ( $d < 0,95$  g/ml)
- VLDL = *very low density lipoproteins* = Lipoproteine sehr geringer Dichte ( $d = 0,95 - 1,006$  mg/ml)
- IDL = *intermediate density lipoproteins* = Lipoproteine mittlerer Dichte ( $d = 1,006 - 1,019$  mg/ml)
- LDL = *low density lipoproteins* = Lipoproteine geringer Dichte ( $d = 1,019 - 1,063$  mg/ml)
- HDL = *high density lipoproteins* = Lipoproteine hoher Dichte ( $d = 1,063 - 1,21$  mg/ml)

Der Lipoproteinstoffwechsel ist schematisch in Abb. 2 wiedergegeben. Die Chylomikronen entstehen bei der Fettresorption aus der Nahrung in der Darmwand und sind folglich triglyzeridreich. Sie geben Fettsäuren, die aus der Spaltung der Triglyzeride durch die Lipoproteinlipase hervorgehen, vornehmlich an das Fettgewebe und die Muskulatur ab. Die Überreste der

Chylomikronen (Chylomikronen-Remnants), die einen hohen Gehalt an Cholesterinestern aufweisen, werden von der Leber über Remnant-Rezeptoren aufgenommen. Ein Teil der Chylomikronen-Remnants wird durch Aufnahme verschiedener Lipide und Proteine zu HDL-Partikeln umgewandelt. In der Leber wird das Cholesterin zum Teil in Gallensäuren umgewandelt und zum Teil zusammen mit Apolipoproteinen, Phospholipiden und Triglyzeriden in Form von Lipoproteinen sehr geringer Dichte (VLDL) wieder ins Plasma abgegeben. Durch Abspaltung von Fettsäuren aus den Triglyzeriden entstehen aus den VLDL Lipoproteine mittlerer Dichte (IDL). Ein Teil der IDL wird über LDL-Rezeptoren wieder von der Leber aufgenommen, ein anderer Teil geht durch Spaltung von Triglyzeriden in Lipoproteine geringer Dichte (LDL) über, die ebenfalls über LDL-Rezeptoren von der Leber und anderen Geweben aufgenommen werden können (MUTSCHLER *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den LDL, die für den Transport von Cholesterin zum Gewebe sorgen, transportieren die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) Cholesterin aus der Peripherie zur Leber zurück. Neben der Synthese von HDL in der Leber (CASTLE *et al.*, 1991) und in der Darmwand (DANIELSEN *et al.*, 1993) werden zusätzlich naszierende HDL-Partikel im Plasma durch Interaktion von Remnant-Partikeln mit anderen Lipoproteinen gebildet (BARRANS *et al.*, 1994; LIANG *et al.*, 1994). Das Cholesterin der HDL wird entweder nach Veresterung auf IDL übertragen, oder die reifen HDL werden als ganze Partikel von der Leber aufgenommen.

Patienten mit hohen LDL-Cholesterinspiegeln weisen ein erhöhtes Risiko auf, an Arteriosklerose zu erkranken (proatherogene Wirkung der LDL). Dies beruht auf der Funktion der LDL, Cholesterin zu extrahepatischen Geweben zu transportieren, wo es teilweise in den Arterienwänden abgelagert wird und dadurch zu Gefäßwandverdickungen beiträgt. Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass sich ein hoher HDL-Cholesterinspiegel antiatherogen auswirkt (ASSMANN *et al.*, 2002). Eine Erniedrigung der HDL-Cholesterin-Konzentration im Blutplasma ist einer der prädiktivsten koronaren Risikofaktoren (ASSMANN, 2002). Eine seit über 20 Jahren bekannte Erklärung für die protektive Wirkung von HDL ist die Fähigkeit der HDL bzw. seiner Apolipoproteine, überschüssiges

zelluläres Cholesterin in peripheren Geweben zu mobilisieren und zur Leber zu transportieren. Dieser Stoffwechselweg wird als „reverser Cholesterin-Transport“ bezeichnet (GLOMSET, 1968). Darüber hinaus weist HDL weitere anti-atherogene und vasoprotektive Effekte auf, da diese Partikel anti-inflammatorisch wirken, die Proliferation glatter Muskelzellen stimulieren (dies stabilisiert vermutlich die arteriosklerotische Plaque, da es zu einer gesteigerten Synthese extrazellulärer Matrixproteine kommt), die Endothelfunktion verbessern (u.a. durch eine Stimulation der Proliferation von Endothelzellen), die Adhäsion von Monozyten an das Endothel inhibieren und die Oxidation pro-atherogener Lipoproteine hemmen (PAULWEBER, 2004; NOFER *et al.*, 2002). Aufgrund der alternativen Erklärungsmöglichkeiten für die protektiven Effekte der HDL (ASSMANN, 2003), ist die klinische und physiologische Bedeutung der HDL-vermittelten Cholesterinsekretion nur unzureichend geklärt.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Lipoprotein-Stoffwechsels (modifiziert nach VOET & VOET, 1994). Die über die Nahrung aufgenommenen Lipide werden zum Teil nach der Resorption im Darm in Chylomikronen verpackt und an Fettgewebe und

Muskulatur abgegeben und zum Teil von der Leber in Form von Chylomikronen-Remnants aufgenommen. In der Leber wird ein Teil des Cholesterins in Gallensäuren umgewandelt und ein Teil wird mit Triglyzeriden, Phospholipiden und Apolipoproteinen in Form von VLDL ans Plasma abgegeben. Aus den VLDL gehen durch Abspaltung von Fettsäuren IDL und letztlich LDL hervor, die über LDL-Rezeptoren von der Leber und anderen Geweben aufgenommen werden. HDL hingegen können Cholesterin aus dem Gewebe aufnehmen und zurück zur Leber transportieren.

#### **1.4. Die Bedeutung der Tiermedizin für die Arterioskleroseforschung**

Die Arteriosklerose hat für die klinische Tiermedizin nur eine geringe Bedeutung. Allerdings werden Labortiere, allen voran die Maus, dringend für die weitere Erforschung der komplexen Pathogenese und den Folgen dieser Erkrankung als Tiermodelle benötigt. Diese Tiere sind die einzige Möglichkeit, *in-vivo*-Modelle für die Genese der Arteriosklerose aufzustellen. Hier spielt vor allem die Technik des Gen-„knock out“ eine Rolle. Mit Hilfe dieser Technik können gezielt spezifische Sequenzen der DNA aus dem Genom entfernt werden. Für die Erforschung der Arteriosklerose haben sich vor allem LDL-Rezeptor- und Apolipoprotein-E-Defektmäuse etabliert.

Der LDL-Rezeptor-Defekt ist die Ursache der familiären Hypercholesterinämie, dessen Entdeckung GOLDSTEIN und BROWN 1985 den Nobelpreis für Medizin einbrachte. Bei Patienten mit LDL-Rezeptor-Defekt ist infolge der Unfähigkeit, LDL aus dem Blutkreislauf zu entfernen, der Serum-Cholesterin-Spiegel um das Zwei- bis Dreifache erhöht.

Apolipoprotein E (ApoE) ist Bestandteil der VLDL und HDL und ist direkt mit den Chylomikronen assoziiert. ApoE ist regulatorisch am Stoffwechsel der Plasmalipide beteiligt. Ein ApoE-Defizienz verursacht hohe Serum-Cholesterin- und Triglyzerid-Werte und ist an der Entstehung von Hyperlipoproteinämien, Lipoprotein-Glomerulopathie und Hypertonie ursächlich beteiligt. Auf diesem Wege ist eine ApoE-Defizienz ein hoher Risikofaktor für das Entstehen von Arteriosklerose.

Bei Cholesterin-reicher Fütterung, kann man bei der LDL-Rezeptor- und der ApoE- Defekt-Maus eine Plaquebildung induzieren. Dies ermöglicht es, einerseits die Pathogenese der Arteriosklerose und andererseits die Wirkung möglicher Therapeutika zu erforschen. Trotzdem sind diese Modelle nur bedingt nutzbar, da die Mechanismen der Plaquebildung und -zusammensetzung nicht völlig mit dem des Menschen übereinstimmen. Weiterhin sind die fortgeschrittenen Stadien der Arteriosklerose, wie beispielsweise die Plaqueruptur, nicht ohne Probleme im Mausmodell darzustellen. Es bedarf einer sehr aufwendigen transgenen Modifikation der Tiere (z.B. einer zusätzlichen Überexpression der Matrix-Metalloproteinase-9 in der ApoE-Defektmaus), um eine Ruptur zu induzieren. Es kommt ferner hinzu, dass die Art der Ruptur arteriosklerotischer Plaques von diesen Mäusen sich morphologisch von denen des Menschen deutlich unterscheiden. Daher sind die derzeit vorhandenen Mausmodelle der Plaqueruptur nur bedingt für funktionelle Untersuchungen geeignet (CULLEN *et al.*, 2003).

Andere erprobte Tiermodelle (z.B. weiße Brieftauben, Schweine oder spezielle Affenarten) weisen meist größere pathophysiologische Ähnlichkeiten zum menschlichen Erkrankungsbild auf. Hier ist aber der Einsatz für Forschungsarbeiten durch sehr hohe Kosten, aufwendige Haltungsbedingungen, relativ lange Reproduktionszyklen und Tierschutzbestimmungen limitiert.

## 2. Die Tangierkrankheit (syn. Analphalipoproteinämie)

Diese 1961 erstmals bei einem fünfjährigen Jungen auf der Insel Tangier an der Ostküste Amerikas entdeckte Defektproteinämie mit Störungen des Cholesterin- und Lipoproteinhaushaltes wird phänotypisch autosomal rezessiv und biochemisch autosomal kodominant vererbt. Charakteristisch für diese Erkrankung sind eine erhebliche Reduktion oder gar eine Defizienz der HDL im Plasma (Fehlen der  $\alpha$ - u. Prä- $\beta$ -Bande in der Lipoprotein-Elektrophorese). Die Konzentration von Apolipoprotein A-I im Plasma beträgt bei Erkrankten in der Regel weniger als 5 % des

Normalwertes, wobei meist eine Hypertriglyzeridämie mit Chylomikronenvermehrung vorliegt (ASSMANN *et al.*, 1997). Weiterhin sieht man eine Verminderung des Serum-Cholesterins, bei unverändertem Anteil an verestertem Cholesterin.

Die Patienten haben Ablagerungen von Cholesterinestern in den Gewebemakrophagen und vor allem in Tonsillen, Milz, Leber, Haut und Lymphknoten, aber auch in Schwannschen Zellen, Neuronen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Das klinische Bild zeigt sich bei homozygoten Patienten in einer Hyperplasie der Tonsillen, welche eine orangegelbe Färbung aufweisen, sowie durch Hepato- und Splenomegalie, eine periphere Neuropathie und eine anormale Darmschleimhaut. Oft erkranken Betroffene an vorzeitiger Arteriosklerose mit einhergehender koronarer Herzkrankheit (SERFATY-LACROSNIERE *et al.*, 1994).

Die Akkumulation von Cholesterinestern ist auf einen durch den reduzierten HDL-Spiegel gestörten reversen Cholesterintransport zurückzuführen (ROGLER, 1995). Von ASSMANN *et al.* wurde schon 1994 gezeigt, dass Fibroblasten von Tangier-Patienten einen Defekt in der Apolipoprotein-induzierbaren Cholesterin-Sekretion aufweisen.

Eine Kopplungsanalyse, durch die die chromosomale Kartierung des defekten Gens ermöglicht wurde, ergab, dass sich der Tangier-Locus auf dem Chromosom 9 im Abschnitt q31 befindet (RUST *et al.*, 1998). Die vollständige Sequenzierung dieser Region erbrachte wenig später den eindeutigen Beweis dafür, dass Mutationen im *ABCA1* (ATP-Bindungskassetten-Transporter A1)-Gen die molekulare Ursache für die Tangierkrankheit sind (RUST *et al.*, 1999). Es wurden mehrere Mutationen charakterisiert, die zu einem partiellen oder gar vollständigen Funktionsverlustes des ABCA1-Proteins, das durch das *ABCA1*-Gen kodiert wird, führen.

ABCA1 ist ein Transmembranprotein, das an der Translokation des zellulären Cholesterins durch die Plasmamembran beteiligt ist. So führt der Funktionsverlust des ABCA1-Transporters zu einer Störung des an den HDL-Metabolismus gekoppelten Lipidtransports, da der ABCA1-

Transporter am Export von Cholesterin aus Zellen heraus beteiligt ist. Hierdurch wird die Bildung von HDL gehemmt bzw. verhindert und daraus resultiert die Akkumulation von Cholesterinestern in den verschiedenen Geweben und die damit verbundene verstärkte Bildung von Schaumzellen (YOUNG und FIELDING, 1999).

Mit der Pathogenese der Tangier-Krankheit lagen erstmals plausible *in-vivo*-Befunde vor, die einen Zusammenhang zwischen verminderter Cholesterin-Sekretion und koronarer Herzkrankheit zeigten. Andererseits ist bis heute unklar, warum sich die Arteriosklerose bei vielen Tangier-Patienten trotz kompletter HDL-Defizienz erst in einem relativ fortgeschrittenen Alter manifestiert (SINGARAJA *et al.*, 2003), und bei einigen Patienten vollständig fehlt (WALTER *et al.*, 1994). Erklärungsmöglichkeiten hierfür sind die multifaktorielle Genese der Arteriosklerose, die Existenz unbekannter antiatherosklerotischer Eigenschaften des ABCA1, die je nach Mutation variieren können, und das Vorhandensein unbekannter kompensatorischer Mechanismen, die eine frühzeitige Arteriosklerose verhindern.

### 3. Immortalisierung von humanen Fibroblasten mit der katalytischen Untereinheit humaner Telomerase

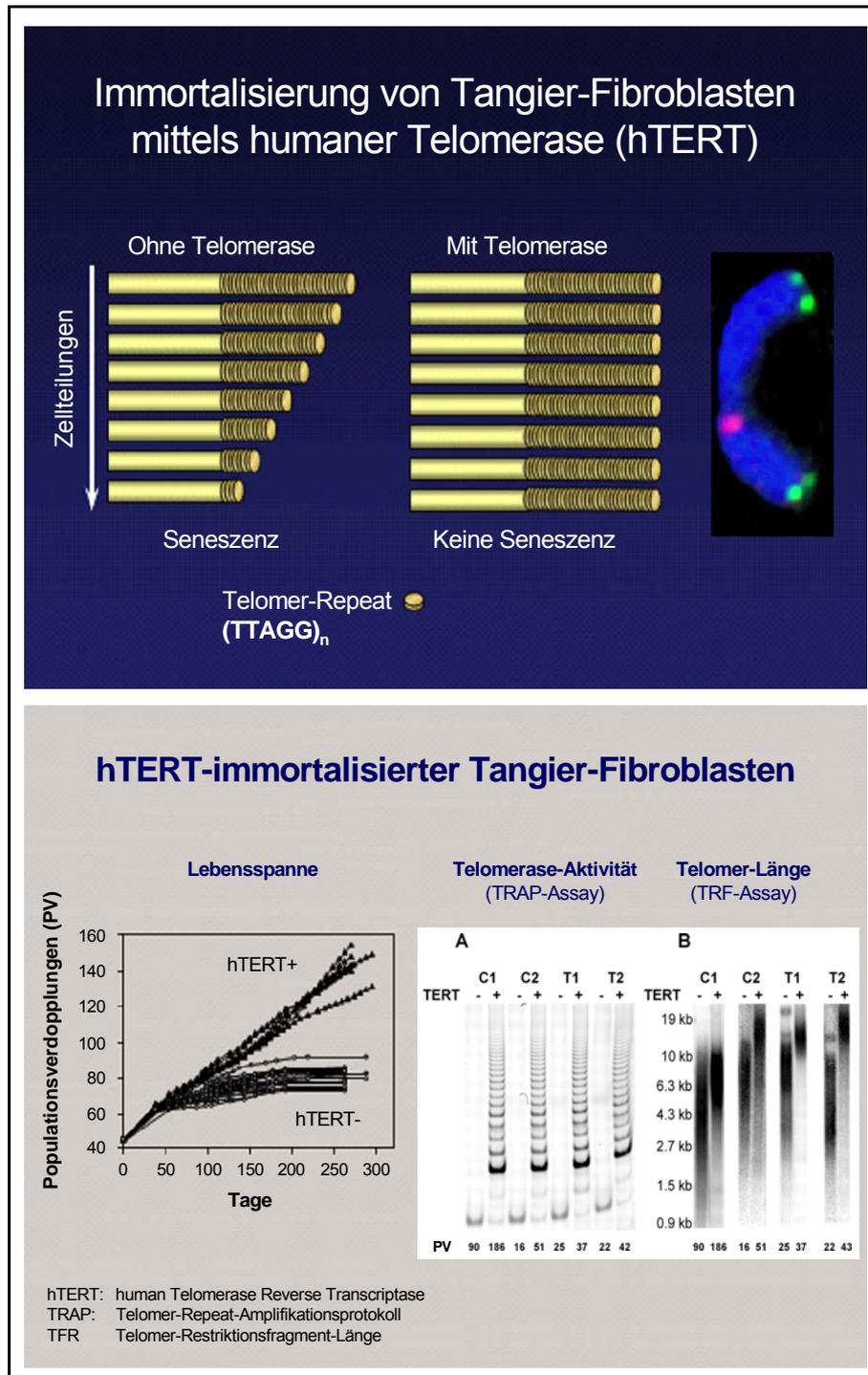
Somatische Zellen von Säugetieren haben eine limitierte Lebensspanne und werden nach einer begrenzten Zahl an Zellteilungen seneszent (HAYFLICK, 1965). Im Stadium der Seneszenz sind die Zellen lebensfähig, teilen sich aber nicht mehr. Dieser Prozess wird als replikative Zellalterung bezeichnet und schränkt die Durchführung von Experimenten an kultivierten Fibroblasten, insbesondere von Patienten mit seltenen genetischen Defekten, stark ein. Beispielsweise können Fibroblasten des Menschen ungefähr 60 Zellteilungen in Kultur durchlaufen, bis sie replikativ altern (ALBERTS *et al.*, 2004). Folglich sind Studien mit Primärfibroblasten nur eingeschränkt interpretierbar, da nicht unterschieden werden kann, welche Veränderungen durch den Defekt selbst und welche durch die oftmals nahezu seneszenten Kulturen bedingt

sind. Eine etablierte Methode, diesen daraus resultierenden Mangel an Zellmaterial zu umgehen, ist die *in-vitro*-Transformation mit Onkogenen oder Karzinogenen, durch welche permanente Zelllinien erzeugt werden können. Jedoch weisen die so transformierten Zellen deutliche Veränderungen in ihren physiologischen und biochemischen Eigenschaften auf. Insbesondere können sich Aneuploidie, spontane Hypermutabilität, Verlust der Kontaktinhibition und Veränderungen der Zellzykluskontrolle negativ auswirken. Eine Analyse zellulärer Funktionen, besonders bei schon vorhandenen Gendefekten, ist daher nur eingeschränkt möglich.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist die Immortalisierung der Zellen durch die Überexpression einer katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase. Durch fortlaufende Verkürzung der Telomeren bei jeder Zellteilung, werden die Alterungsprozesse beeinflusst. Durch die Unfähigkeit der DNA-Polymerase das Ende eines Chromosoms zu replizieren, kommt es bei jeder Zellteilung zu einem Verlust von endständiger DNA. Seneszenz wird induziert, wenn die Telomere nicht mehr durch Telomer-Bindungsproteine geschützt sind und daher als DNA-Doppelstrangbruch erkannt werden.

Die Telomerase ist eine reverse Transkriptase, welche die Telomererosion kompensieren kann. Sie verlängert die Telomer-DNA, indem sie eine RNA-Matrize (TR, "telomer repeats") verwendet, die ein integraler Bestandteil des Enzyms ist. Weiter besteht sie aus einem Protein (TERT) mit reverser Transkriptase-Aktivität. Die RNA-Komponente TR ist im Gegensatz zu TERT in allen menschlichen Zellen vorhanden. Von BODNAR *et al.* (1998) wurde gezeigt, dass die alleinige Expression exogener TERT in menschlichen Fibroblasten die Telomererosion verhindern und somit die Induktion von Seneszenz umgehen kann (vgl. Abb. 3).

Bei der Immortalisierung von Fibroblasten mit TERT sind Eigenschaften wie Kontaktinhibition, Zelladhäsion und die Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren ebenso erhalten, wie ein normaler Karyotyp (JIANG *et al.*, 1999).



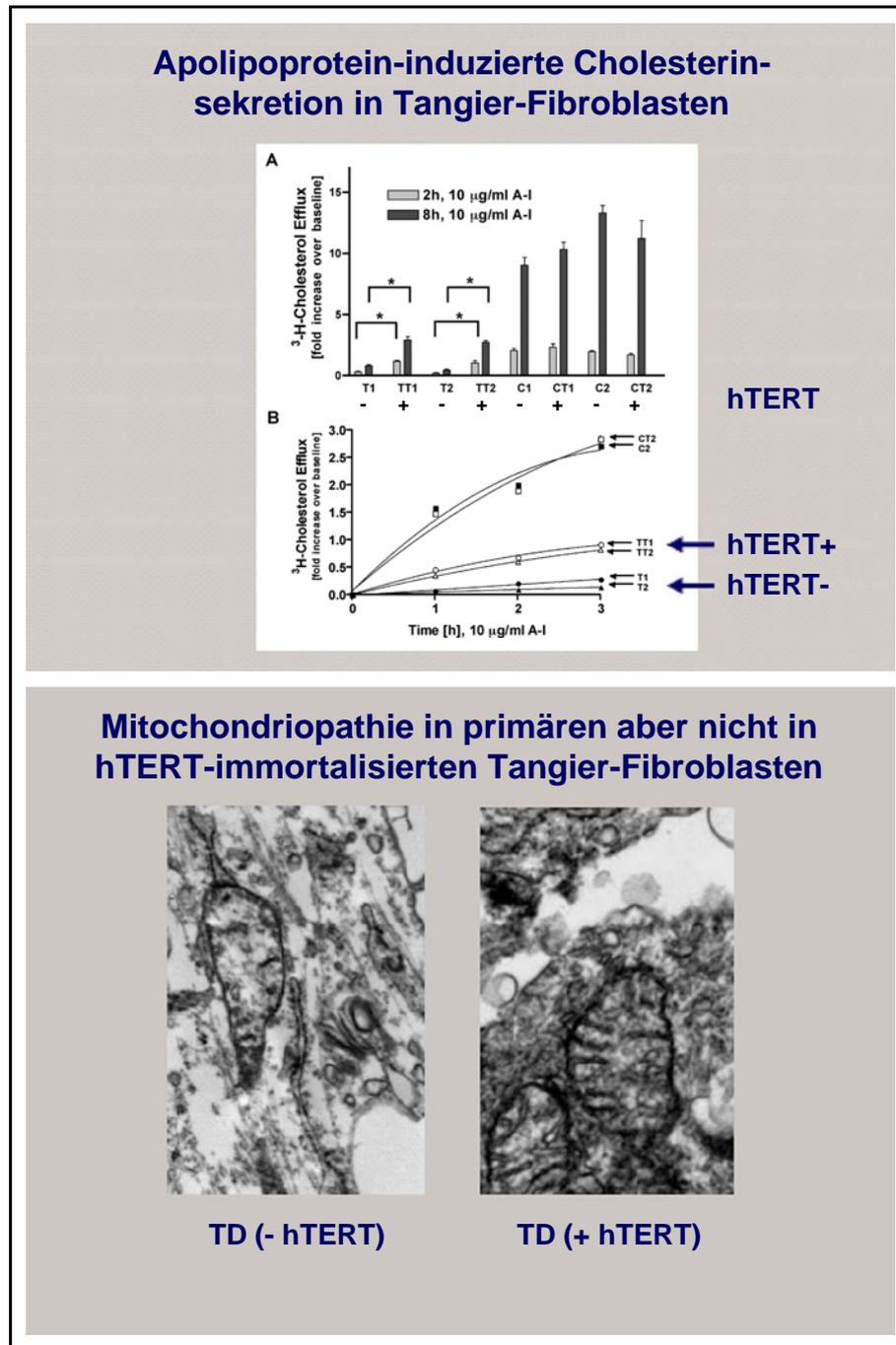
**Abb. 3: Oben:** Prinzip der Immortalisierung mit der katalytischen Untereinheit humaner Telomerase (TERT). **Unten:** Lebensspanne der TERT-immortalisierten Fibroblasten (TERT+) verglichen mit der Lebensspanne nicht immortalisierter Fibroblasten (TERT-) sowie Darstellung der Telomerase-Aktivität im TRAP-Assay (A) und der Telomerlänge im TRF-Assay (B) in zwei Kontroll-Zelllinien (C1, C2) und zwei TERT-infizierten Tangier-Zelllinien (T1, T2). Sichtbar ist die typische breite Verteilung der Telomerlängen. Erkennbar ist auch, dass die Telomere in den mit TERT-Vektoren infizierten Zellen länger sind.

### 3.1. Immortalisierung von Tangier-Fibroblasten mit humaner Telomerase

Klassische Immortalisierungsverfahren mit Onkogenen oder Karzinogenen führen zu einer starken Inhibition der Cholesterinsekretion in den immortalisierten Fibroblasten (ORAM, 1999), vermutlich bedingt durch mangelnde Kontaktinhibition, da die Zell-Zell-Interaktion den Grad der Cholesterin-Sekretion beeinflusst. Diese Methoden eignen sich folglich nicht zur Immortalisierung von Fibroblasten, an denen der Cholesterin-Stoffwechsel untersucht werden soll. Von WALTER *et al.* wurde 2004 gezeigt, dass durch die Immortalisierung mit TERT diese Probleme vermieden werden können. Sowohl der ApoA-I-induzierte als auch der HDL-induzierte Cholesterin-Efflux werden bei Fibroblasten gesunder Zellspender nicht beeinflusst. Auch die Fähigkeit, den Cholesterin-Efflux durch Wachstumsarretierung oder Cholesterin-Beladung zu steigern, sind gleichermaßen in den primären und den mit TERT immortalisierten Zellen vorhanden.

Die erfolgreiche Immortalisierung von Fibroblasten zweier Tangier-Patienten (Abb. 3) wurde durch ein „*Telomeric Repeat Amplification Protocol*“ (TRAP-Assay) und einen „*Telomeric Restriction Fragment Length Assay*“ (TRF-Assay), welche die Telomerase-Aktivität und die Telomer-Länge messen, nachgewiesen (WALTER *et al.*, 2004).

Es zeigt sich, dass die Hauptcharakteristika der Zellen auch nach der Immortalisierung noch sichtbar sind. Dazu gehören die reduzierte Cholesterin-Sekretion und die vermehrte Cholesterinester-Speicherung. Der Tangier-typische Phänotyp ist jedoch abgemildert. Insbesondere die Mitochondropathie, die an der Rarefizierung der Mitochondrien-Cristae erkennbar ist und als typisches Charakteristikum der Tangierkrankheit gilt (ORSO *et al.*, 2000), ist nach der Immortalisierung nicht mehr nachweisbar (Abb. 4). Ein weiterer Unterschied zu den primären Tangier-Fibroblasten liegt in einer gesteigerten Restaktivität der Apolipoprotein-vermittelten Cholesterin-Sekretion um bis zu 50 % des Normalwertes (Abb. 4; WALTER *et al.*, 2004).



**Abb. 4:** **Oben:** Cholesterin-Sekretion aus primären (TERT-) und TERT-infizierten (TERT+) humanen Hautfibroblasten, die von demselben Tangier-Patienten stammen. Die Zellen wurden radioaktiv mit [<sup>3</sup>H]Cholesterin markiert und wie angegeben unterschiedlich lange mit 10 µg/ml ApoA-I inkubiert. Die c.p.m.<sup>1</sup>-Werte wurden gemessen als prozentualer Anteil der gesamten [<sup>3</sup>H]Cholesterin-Aktivität (Zellen plus Medium) im Medium, und werden als relativer Anstieg verglichen mit dem Basalwert (Cholesterinefflux in Abwesenheit von ApoA-I) ausgedrückt. **Unten:**

<sup>1</sup> Counts per minute.

*Elektronenmikroskopische Darstellung der Mitochondrien von Fibroblasten eines Tangier-Patienten vor (TERT-) und nach Immortalisierung (TERT+) derselben Zelllinie. Die Mitochondriopathie, erkennbar an der Rarefizierung der Mitochondrien-Cristae, wurde bereits in der Literatur als Tangier-typisches Charakteristikum beschrieben (ORSO et al., 2000), ist jedoch nach Immortalisierung nicht mehr nachweisbar. Es ist daher möglich, dass auch diese Veränderung eher sekundär altersbedingt erfolgt.*

## II. Aufgabenstellung

Eine erniedrigte HDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma ist einer der prädiktivsten koronaren Risikofaktoren (Gordon *et al.*, 1989). Eine seit über 20 Jahren bekannte Erklärung für die protektive Wirkung der HDL – bzw. der darin enthaltenen Apolipoproteine – ist ihre Fähigkeit, überschüssiges zelluläres Cholesterin zu mobilisieren und zur Leber zu transportieren (ASSMANN *et al.*, 2003). Die Mechanismen der HDL-vermittelten Cholesterin-Sekretion sind jedoch auch heute nur unzureichend bekannt. Ein wesentlicher Fortschritt hinsichtlich des Mechanismus der Cholesterin-Sekretion entwickelte sich aus der Untersuchung eines seltenen HDL-Defizienz-Syndroms, der so genannten Tangier-Krankheit, bei der die Apolipoprotein-induzierte Cholesterin-Sekretion aufgrund des defekten ATP-Bindungskassettentransporters A1 (ABCA1) gestört ist.

Es ist bis heute unklar, warum sich die Arteriosklerose bei vielen Tangier-Patienten erst in einem relativ fortgeschrittenen Lebensalter manifestiert (SINGARAJA *et al.*, 2003) und bei einigen Tangier-Patienten trotz des ABCA1-Defektes nahezu vollständig fehlt (WALTER *et al.*, 1994). Erklärungsmöglichkeiten hierfür sind die multifaktorielle Genese der Arteriosklerose, die Existenz unbekannter atheroprotektiver Eigenschaften von ABCA1 (die je nach Mutation variieren können) und die Existenz unbekannter kompensatorischer Mechanismen, die eine frühzeitige Arteriosklerose bei diesen Patienten verhindern.

Die nähere Charakterisierung solcher potentiell kompensatorischer Mechanismen am Modell der Tangier-Krankheit steht im Mittelpunkt dieser Promotionsarbeit. Übergeordnetes Ziel der Arbeit ist es, neue potentielle Kandidatengene für eine pharmakologische antiatherosklerotische Beeinflussung der Arteriosklerose zu identifizieren.

Im ersten Teil der Arbeit sollte durch Expressionsanalysen von Schlüsselproteinen mit Hilfe der Echtzeit-RT-PCR untersucht werden, ob potentiell antiatherogene Stoffwechselwege in Telomerase-immortalisierten Tangier-Fibroblasten verstärkt oder vermindert aktiviert

sind. Konkret sollte die Expression der nachfolgend aufgeführten Gene untersucht werden.

1. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Cholesterin-abhängige Hochregulation des Transkriptionsfaktors SREBP1c<sup>2</sup>, die mit einer verstärkten Fettsäure-Synthese und Cholesterin-Veresterung einhergeht, Cholesterin verstärkt zellulär in einer nicht toxischen Form gespeichert wird (REPA *et al.*, 2000). Es sollte daher die Expression von SREBP1c und die Expression von Genen, die durch SREBP1c reguliert werden (Fettsäure-Synthase (FAS), Stearyl-CoA Desaturase-1 (SCD1), gemessen werden.

2. Es sollten die klassischen Regulationswege der Cholesterin-Biosynthese untersucht werden: HMG-CoA-Reduktase, LDL-Rezeptor und der die Expression dieser Gene regulierende Transkriptionsfaktor SREBP2. Es sollte ferner untersucht werden, ob die Cholesterin-Biosynthese und die Expression des LDL-Rezeptors sowie die Expression des an der Regulation dieser Gene beteiligten Transkriptionsfaktors (SREBP2) supprimiert ist.

3. Da Tangier-Fibroblasten über eine sehr geringe Rest-Cholesterin-Sekretionsfähigkeit verfügen (WALTER *et al.*, 2004), sollte die Expression des zu ABCA1 homologen ATP-Bindungskassettentransporter ABCG1 untersucht werden. Hinter dieser Aufgabe steht die Fragestellung, ob ABCG1 den ABCA1-Defekt partiell kompensieren kann.

4. In den meisten Körperzellen wird durch die enzymatische Hydroxylierung des Cholesterins an Position 27 und der nachfolgenden Oxidation des entstandenen 27-Hydroxycholesterins zur Cholestensäure ein weitgehend wasserlösliches Stoffwechselprodukt des Cholesterins gebildet, welches in der Leber zu Gallensäuren umgewandelt werden kann. Die Hydroxylierung an Position 27 wird durch das mitochondriale Enzym Cholesterin-27-Hydroxylase (CYP27) katalysiert (BJÖRKHEM *et al.*,

---

<sup>2</sup> *Sterol regulatory element-binding protein.*

1994). CYP27-Defekte führen zu der hereditären Erkrankung „Cerebrotendinöse Xanthomatose“, die mit einer massiven vorzeitigen Arteriosklerose sowie koronarer Herzkrankheit assoziiert ist (CALI *et al.*, 1991). Es wurde daher vermutet, dass die Hydroxylierung von Cholesterin durch dieses Enzym auch in peripheren Zellen zu einer verstärkten zellulären Ausschleusung von Cholesterin führt. Es soll daher im Hinblick auf einen alternativen Cholesterin-Sekretionsweg untersucht werden, ob die CYP27-Expression in Tangier-Zellen im Vergleich zu Zellen gesunder Spender verstärkt ist.

In einem weiteren Schritt sollen die erhobenen Befunde durch protein- und biochemische Untersuchungen ergänzt werden. Hier kommt zum Beispiel die Messung der endogenen Cholesterin-Biosynthese in Tangier- und Kontroll-Fibroblasten in Frage. Der intrazelluläre Gehalt und die Zusammensetzung von Sterolen und Fettsäuren der Tangier-Fibroblasten sollte mittels Gaschromatographie mit denen der Kontroll-Fibroblasten verglichen werden; auch die SCD1-Aktivität sollte mittels gaschromatographischer Quantifizierung der einzelnen zellulären Fettsäuren abgeschätzt werden.

Zusätzliche Zellkultur-Untersuchungen (zum Beispiel eine Kultivierung der Zellen unter Serumentzug und/oder Cholesterin-Beladung) sollten helfen, den Stellenwert näher aufzuzeigen, den die vermuteten Proteine/Stoffwechselwege für die Regulation der Cholesterin-Homöostase im Fibroblastenmodell einnehmen.



### III. Material und Methoden

#### 1. Materialien

##### **Chemikalien:**

Aceton	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Acetylchlorid	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Agarose für DNA/RNA-Elektrophorese	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
<i>Aqua ad injectabilia</i>	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen und Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien</i>
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
BSA-Stocklösung für Proteinbestimmungen	<i>Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA</i>
Cholesterol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Dextranblau	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Diethylether	<i>Merck, Darmstadt</i>
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
EDTA (Titriplex)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Epikoprostanol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Essigsäure (Eisessig)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Ethanol	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Ethidiumbromidlösung, 1 % (w/v)	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Flüssigstickstoff	<i>Westfalen AG, Münster</i>
Formamid	<i>Merck, Darmstadt</i>
Harnstoff	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Helium	<i>Westfalen AG, Münster</i>

---

Hexamethyldisilazan	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Hexan	<i>Mallinckrodt Baker D.V., Deventer, Niederlande</i>
HPLC-Wasser	<i>Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande</i>
Isopropanol	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Magnesiumchlorid	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg</i>
Methanol	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumchlorid	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Natriumcarbonat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Nusieve-Agarose	<i>FMC Bioproducts, Rockland, USA</i>
Pyridin	<i>Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande</i>
Synthetische Luft	<i>Westfalen AG, Münster</i>
TAPS (N-tris[hydroxymethyl]methyl- 3-aminopropansulfonsäure)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Tetrachlorethylen	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Toluol	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Trimethylchlorsilan (TMS)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe</i>
Xylencyanol FF	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>

**Zellkultur:**

Bovines, Fettsäure-freies Serum- albumin (FAFA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Deckgläschen (rund, 12 mm)	<i>Brenziger Laborbedarf, Walldorf</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Einwegkanülen	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen und Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien</i>
Einwegspritzen	<i>B. Braun Melsungen AG, Melsungen und Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien</i>
Fötales Kälberserum(FCS)	<i>Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Kryoröhrchen	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
Penicillin-Streptomycin-Glutamin- (PSG)-Lösung	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Schraubdeckelgefäße (15 ml, 50 ml)	<i>Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland</i>
Serologische Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	<i>TPP, Schweiz</i>
10xTrypsin/EDTA-Lösung	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf</i>
Zählkammer, Neubauer	<i>Merck, Darmstadt</i>
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> )	<i>Biochrom KG, Berlin</i>

**Weitere Materialien:**

BCA Protein Assay Kit	<i>Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA</i>
DC-Alufolien	<i>Merck, Darmstadt</i>

DNA-Größenstandard 50 bp Plus DNA Ladder™	<i>MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
Einweghandschuhe SafeSkin® Satin Plus®	<i>Safeskin GmbH, Neufahrn</i>
Einweghandschuhe SafeGrip® Nitril	<i>Südlaborbedarf, Gauting</i>
Filtertips ART® (10 Reach, 20E, 100E, 200, 1000E)	<i>Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA</i>
Hamilton-Spritzen	<i>Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz</i>
Hypercassette™	<i>Amersham Biosciences GmbH, Freiburg</i>
Objektträger	<i>Engelbracht GmbH, Eder- münde</i>
Oligonukleotide	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> -Primer	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Phosphor Imaging Plate BAS-IIS	<i>Fuji Photo Film Co., Tokio, Japan</i>
Pipettenspitzen (Biopur; 200 µl, 1000 µl)	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Probengeberflaschen	<i>CS, Langerwehe</i>
QuantiTect SYBR®-Green PCR Kit	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
Quarzglasküvette Suprasil 105.210-QS	<i>Hellma GmbH, Mülheim</i>
Reagenzgläser mit Gewinde	<i>Jürgens, Münster</i>
Reaktionsgefäße (500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
RNAasin®	<i>Promega GmbH, Mannheim</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
Standardpipettenspitzen	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Sterile Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml)	<i>Becton Dickinson, Fraga, Spanien</i>
SuperScript™ II	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Supra® Einmal-Kanülen mit Lanzettenschliff	<i>Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen</i>

Teflondichtungen	CS, Langerwehe
Uvette®	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Whatman-Papiere (GB004)	<i>Schleicher &amp; Schuell GmbH, Dassel</i>
Zentrifugenröhrchen	<i>Beckman GmbH, Krefeld</i>

## 2. Geräte

ABI Prism 7900 HT Cycler	<i>Applied Biosystems GmbH, Darmstadt</i>
LiquidScintillation Counter1219 Rackbeta LKB	<i>Fa.Wallac, Turku, Finnland</i>
BioPhotometer	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Brutschrank (Heraeus HeraCell)	<i>Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf</i>
Brutschrank (Heraeus Model BB6220)	<i>Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf</i>
Bio-imaging Analyzer BAS-1500	<i>Fuji Photo Film Co., Tokio, Japan</i>
Gaschromatograph Dani 8521a	<i>Dani, Mainz</i>
Gaschromatograph Trace GC	<i>Thermo-Finnigan, Bremen</i>
Horizontale Gelelektrophoresekammern:	
Mini Sub® Cell GT Electrophoresis System	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>
Mini Sub® DNA Cell Electrophoresis System	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>
Heraeus Labofuge 400e	<i>Heraeus Instruments GmbH</i>
Optimax Typ TR	<i>MS Laborgeräte, Wiesloch</i>
Peltier Thermal Cycler	<i>Biozym, Oldendorf</i>

Photometer Pharmacia Ultrospec III	<i>Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH</i>
Pipetten Reference (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>
Pipetten E-line 1-Kanal (10 µl, 120 µl, 300 µl, 1000 µl)	<i>Biohit GmbH, Helsinki, Finnland</i>
Pipetten E-line 8-Kanal (10 µl, 120 µl, 300 µl, 1000 µl)	<i>Biohit GmbH, Helsinki, Finnland</i>
Soniprep 150 Sonikator (UW 70)	<i>Bandelin electronics, Berlin</i>
Spannungsgeber Bio-Rad PowerPac 300	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir® HB 2448	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>
Stickstofftank L'Air Liquide Modell GT 140	<i>L'Air Liquide, Champigny sur Marne, Frankreich</i>
Spektrophotometer Uvikon 922	<i>Bio-Tek Kontron GmbH, Bad Friedrichshall</i>
Ultraschallbad Sonorex RK 100H	<i>Bandelin electronics, Berlin</i>
Vortexer „Genie 2“	<i>Bender &amp; Hobein, Zürich, Schweiz</i>
Wasserbad	<i>GFL, Hannover</i>
Zentrifuge Labofuge GL	<i>Heraeus, Düsseldorf</i>
Mini Spin Zentrifuge	<i>Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg</i>

### 3. Zellkultur

#### 3.1. Kultivierungsbedingungen

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter Sterilwerkbanken durchgeführt. Die eukaryotischen Zellen wurden in Brutschränken unter sterilen Bedingungen bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (v/v) in Kultur gehalten. Alle Medien für die Zellkultur wurden vor dem Gebrauch auf 37°C erwärmt. Die Verfahren zur Isolierung von humanen

Hautfibroblasten wurden von der Ethikkommission der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster genehmigt.

### 3.2. Zusammensetzung des verwendeten Mediums

**Tab. 1:** Zusammensetzung von *DULBECCO's Modification of EAGLE's Minimum Essential Medium (DMEM)*<sup>3</sup> (*DULBECCO & FREEMAN, 1959; SMITH et al., 1960*).

Komponente	Gehalt [mg/l]	Komponente	Gehalt [mg/l]
<b>Aminosäuren</b>			
L-Arginin · HCl	84,00	L-Methionin	30,00
L-Cystin · HCl	62,57	L-Phenylalanin	66,00
L-Glutamin	584,00	L-Serin	42,00
Glycin	30,00	L-Threonin	95,20
L-Histidin · HCl · H <sub>2</sub> O	42,00	L-Tryptophan	16,00
L-Isoleucin	104,80	L-Tyrosin · 2 H <sub>2</sub> O	103,80
L-Leucin	104,80	L-Valin	94,00
L-Lysin · HCl	146,20		
<b>Anorganische Salze</b>			
CaCl <sub>2</sub>	200,00	MgSO <sub>4</sub>	97,70
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	0,10	NaCl	6400,00
KCl	400,00	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125,00
<b>Vitamine</b>			
Cholinchlorid	4,00	D-Calcium-Pantothenat	4,00
Folsäure	4,00	Pyridoxal · HCl	4,00
i-Inositol	7,20	Riboflavin	0,40
Nikotinamid	4,00	Thiamin · HCl	4,00
<b>Weitere Komponenten</b>			
D-Glukose	4500,00	Natriumpyruvat	110,00
Phenolrot Natriumsalz	15,00		

<sup>3</sup> Zusammensetzung laut Firmenkatalog *Invitrogen GmbH*, 2004.

### 3.3. Bestimmung der Zellzahl

Zum Passagieren von Zellen wurde die Zelldichte mit Hilfe einer NEUBAUER-Kammer bestimmt.

### 3.4. Biopsie humaner Fibroblasten

Freiwilligen Spendern wurde nach einer Kategorie-II-Hautdesinfektion mit einer 0,1 %igen (w/v) Lidocainlösung zur Lokalanästhesie eine subkutane Quaddel über einer *Crista illiaca* gesetzt. Mit einer Hautstanze (3-5 mm Durchmesser) und einer Schere wurde ein Hautareal mit möglichst geringem Anteil Subkutanfett entnommen und in ein steriles Gefäß mit vorgewärmtem, CO<sub>2</sub>-begastem und komplettiertem DMEM überführt. Unter sterilen Bedingungen wurde das Biopsiematerial mit einem Skalpell zerkleinert, in eine 25-cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gegeben und für drei bis sechs Wochen bei 37°C im Brutschrank in komplettiertem DMEM inkubiert. Eine Subkultivierung der Fibroblasten erfolgte, wenn die aus den Biopsiestücken emigrierten Fibroblasten die Oberfläche der Kulturflasche bedeckten.

Die für die Zellkulturversuche verwendeten Vorhautfibroblasten wurden Säuglingen im Rahmen einer Circumcision entnommen.

### 3.5. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Für die Kultivierung teilungsfähiger eukaryotischer Zellen wurde das nachfolgende Medium verwendet:

#### **Komplettiertes DMEM:**

DMEM	500 ml
Fötale Kälberserum	10 % (v/v)
Penicillin	100 Units/ml
Streptomycin	100 µg/ml

### 3.5.1. Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die in Flüssigstickstoff eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Zellkulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm<sup>2</sup>, welche vorher mit 15 ml komplettiertem DMEM befüllt wurden, überführt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu entfernen.

### 3.5.2. Subkultivierung von Monolayerkulturen

#### **10x PBS:**

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	43 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14 mM
	pH 7,4

#### **1x Trypsin/EDTA-Lösung:**

10x Trypsin/EDTA-Lösung
1:10 in 1x PBS mit 0,1 % (w/v)
EDTA verdünnen

Da adhärente, proliferierende Zellen im konfluenten Zustand in ihrem Wachstum eingeschränkt sind, wurden sie spätestens bei Erreichen der Konfluenz trypsinisiert und passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS mit 0,1 % (w/v) EDTA gewaschen. Das EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die die Wirkung von Trypsin beeinträchtigen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung pro 75-cm<sup>2</sup>-Kulturgefäß versetzt und etwa 5 min lang bei 37°C inkubiert. Im Lichtmikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen nach dieser Zeit komplett vom Boden des Kulturgefäßes gelöst hatten. War dies nicht der Fall, wurden sie durch Klopfen gegen den Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in 5 ml komplettiertem Medium aufgenommen, für 5 min mit 1200 × g bei 20°C zentrifugiert und das Pellet mit 10 ml komplettiertem Medium resuspendiert. Nachdem die Zellzahl mittels der NEUBAUER-Kammer bestimmt worden war, wurden die Zellen in neue Kulturgefäße überführt, mit komplettiertem Medium versetzt und bei 37°C

im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis vier Tage erneuert.

### 3.5.3. Lagerung von eukaryotischen Zellen

#### **Einfriermedium:**

DMEM	500 ml
Fötale Kälberserum	10 % (v/v)
Penicillin	100 Units/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
Dimethylsulfoxid	10 % (v/v)

Etwa zu 90 % konfluente Zellen wurden zweimal mit 1x PBS/0,1 % (w/v) EDTA gewaschen und mit 1 ml/75 cm<sup>2</sup> Kulturgefäß 1x Trypsin/0,1 % (w/v) EDTA versetzt. Sie wurden so lange bei 37°C inkubiert, bis sie sich nach leichtem Klopfen abgelöst hatten. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml Medium aufgenommen und 5 min bei 20°C mit 1200 × g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert, ein definiertes Aliquot zur Zellzahlbestimmung abgenommen, nochmals zentrifugiert und in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und in vorbereitete Gewebekulturröhrchen pipettiert. Um ein langsames Abkühlen der Proben zu ermöglichen, kamen diese zuerst in ein Isopropanol-Bad, wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

### 3.6. Inkubationsversuche

Jeweils vier 75 -cm<sup>2</sup> Kulturgefäße mit 90 % konfluenten Zellen eines Spenders wurden einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen. Die verschiedenen Medien wurden folgendermaßen angesetzt :

1. DMEM + 10 % FCS + 1 % PSG + 1mg/ml FAFA
2. DMEM + 1 % PSG + 1mg/ml FAFA
3. DMEM + 1 % PSG + 1mg/ml FAFA + 20 µg/ml freies Cholesterin
4. DMEM + 10 % FCS + 1 % PSG + 1mg/ml FAFA + 20 µg/ml freies Cholesterin

Die Flaschen wurden mit jeweils 15 ml eines Mediums 30 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach dem Schema von Kapitel 3.4.1 lysiert und die RNA wurde isoliert.

## 4. Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 4.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach einem leicht modifizierten Herstellerprotokoll. Das verwendete System nutzt die Eigenschaft von Silikamembranen, Nukleinsäuren mit mehr als 200 bp unter geeigneten Pufferbedingungen (hohen Salzgehalten) selektiv zu binden und diese in Puffern mit niedrigen Salzgehalten wieder eluieren zu können.

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden Zellen bei Raumtemperatur (RT) zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe der entsprechenden Menge Lysepuffer (Puffer RLT plus 10 µl β-Mercaptoethanol pro ml Puffer) wurden die Zellen lysiert (vgl. Tab. 2). Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde das visköse Lysat aufgenommen und direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

**Tab. 2:** Verwendete Puffermengen für die Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit.

Größe der Kulturflasche [cm <sup>2</sup> ]	Menge 1x PBS [ml]	Menge Puffer RLT [ml]
75	10	2
150	15	4

Eingefrorene Proben wurden nach dem Auftauen 10 min bei 37°C inkubiert, um ein vollständiges Lösen aller Pufferbestandteile zu gewährleisten. Zum Homogenisieren und Scheren genomischer DNA wurde das Lysat mittels einer Spritze zehnmal durch eine 20G-Nadel aufgezogen. Anschließend wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 70 %igen (v/v) Ethanol bei RT gut gemischt. Die Zugabe von Ethanol erhöht die Neigung der RNA-Moleküle an die Silikamembran der Isolierungssäulen zu binden.

700- $\mu$ l-Aliquots der Probenlösung wurden sukzessive auf die Isolierungssäulen des Kits geben und 15 s mit 10 000  $\times$  g bei RT zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis das entsprechende Probenvolumen durch die Säule zentrifugiert worden ist. Jede Säule wurde maximal mit 100  $\mu$ g RNA beladen. Der Durchfluss wurde verworfen.

Zum Entfernen von Verunreinigungen wurden die Säulen mit 700  $\mu$ l Puffer RW1 gewaschen (Zentrifugation wie oben). Nach der Zugabe von 500  $\mu$ l Puffer RPE (mit dem vierfachen Volumen Ethanol laut Hersteller verdünnt) wurden die Säulen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und ein zweites Mal mit 500  $\mu$ l Puffer RPE gewaschen. Zum Entfernen aller Ethanolreste erfolgte abschließend eine Zentrifugation der Säulen für 2 min mit 10 000  $\times$  g bei RT.

Die Säulen wurden abschließend in ein RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Elution der RNA erfolgte mit dreimal jeweils 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser (1 min Inkubation bei RT und anschließende Zentrifugation bei RT mit 10 000  $\times$  g für 1 min).

#### **4.2. Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen**

Die Konzentration von Nukleinsäureproben wurde fotometrisch in wässriger Lösung mit einer Quarzglasküvette in einem Biofotometer bestimmt. Als Berechnungsgrundlage diente folgende Formel:

$$\text{RNA - Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{A_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{XNA - Faktor}}{1000}$$

mit dem XNA-Faktor für:	ssDNA	37,0
	dsDNA	50,0
	RNA	40,0

Die Reinheit der Nukleinsäuren ergab sich aus dem Quotienten  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  und lag bei allen verwendeten Proben zwischen 1,8 und 2,0. Nach WILFINGER *et al.* (1997) senkt der leicht saure pH-Wert der in *Aqua bidest.*DEPC gelösten RNA den Quotienten  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ . Daher wurden für genauere Bestimmungen des Reinheitsquotienten die Proben in 10 mM Tris (pH 8,0) vermessen, damit die Messung bei pH > 7,5 durchgeführt werden konnten.

### 4.3. Agarosegelelektrophorese

Die Qualität von Nukleinsäureproben wurde mittels TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft (VOYTAS, 1988, OGDEN *et al.*, 1987). Da es eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der elektrophoretischen Mobilität der DNA und der Gelkonzentration gibt, werden kleinere DNA-Fragmente in einem höherkonzentrierten Gel besser aufgetrennt als große Nukleinsäuremoleküle (vgl. Tab. 3). Gesamt-RNA wurde in einem 0,8 %igen (w/v) Agarosegel überprüft.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät geschmolzen und mit 2  $\mu\text{l}$  einer 1 %igen (w/v) Ethidiumbromidlösung vermischt (LUNN und SANSONE, 1987). Zum Aushärten wurde die heiße Agaroselösung in einen Gelschlitten mit geeignetem Probenkamm gegossen.

**Tab. 3:** Konzentrationsangaben für Agarosegele für bestimmte Trennbereiche (MANIATIS et al. 1989).

Größe der zu separierenden Nucleinsäuren	Menge der verwendeten Agarose
5 - 60 kp	0,3 % (w/v)
1 - 20 kp	0,6 % (w/v)
0,8 - 10 kp	0,7 % (w/v)
0,5 - 7 kp	0,9 % (w/v)
0,4 - 6 kp	1,2 % (w/v)
0,2 - 3 kp	1,5 % (w/v)
0,1 - 2 kp	2,0 % (w/v)

Zum Auftragen auf das Agarosegel wurden Proben mit einem Nucleinsäuregehalt von ca. 0,5 µg verwendet. Die Proben wurden mit *Aqua bidest.*<sub>DEPC</sub> verdünnt, mit einem Fünftel Volumen 5x Nucleinsäure-Dye versetzt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Gelelektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer mit ca. 10 V/cm in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei RT durchgeführt. Die Qualität der Nucleinsäuren wurde nach der Elektrophorese im UV-Licht bei 312 nm kontrolliert.

**50x TAE-Puffer:**

Tris/HCl	2 M
Eisessig	5,71 % (v/v)
EDTA	50 mM
DEPC	0,05 % (v/v)
	pH 8,3

**5x Nucleinsäure-Dye:**

Glyzerin	50 % (v/v)
SDS	0,2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,05 % (w/v)
Aqua bidest.	<sub>DEPC</sub>

#### 4.4. cDNA-Synthese

In einem 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß wurden 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer und 5 µg DNase-behandelte Gesamt-RNA vorgelegt. Diese Proben wurden mit *Aqua dest.*(DEPC) auf 11 µl aufgefüllt, 10 min bei 70°C in einem PCR-Gerät denaturiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von vorgekühlten 4 µl 5x First Strand-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl RNAsin<sup>®</sup> Ribonukleaseinhibitor wurden die Proben vorsichtig durchmischt und 2 min bei 42°C im PCR-Gerät inkubiert. In die derart vorgewärmten Proben wurde jeweils 1 µl SuperScript™ II pipettiert. Die Reverse Transkription wurde nach dem vorsichtigen Durchmischen bei 42°C für 50 min in einem PCR-Gerät durchgeführt. Nach der Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C für 15 min wurden die cDNA-Proben auf 200 µl verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### 4.5. (RT)-PCR für Standardanwendungen

Für die Amplifikation von DNA-Proben (MULLIS *et al.*, 1986; SAIKI *et al.*, 1985, 1986 und 1989) wurde der nachfolgende PCR-Mix mit dem unten aufgeführten PCR-Programm verwendet. Zwischen den einzelnen Stufen der PCR wurden die maximalen Aufheiz- bzw. Abkühlraten der Geräte benutzt. Das Design der Primer erfolgte mit der Primer Express<sup>®</sup>-Software Version 2.0. Eine Zusammenstellung der Primer zeigt Tab. 4.

##### **PCR-Mix:**

10x PCR-Puffer	2 µl
2,5 mM dNTP-Mix	2 µl
5 µM Primer forward	0,8 µl
5 µM Primer reverse	0,8 µl
Hotstar <sup>®</sup> Taq-Polymerase	0,25 µl
cDNA	1 µl (aus 20 µl cDNA-Ansatz mit 5 µg RNA)
<i>Aqua ad injectabilia</i>	ad. 20 µl

### Bedingungen für die RT-PCR-Amplifikation

Vorabdenaturierung	95°C	15 min
40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 s
Annealing	56°C	60 s
Extension	72°C	60 s/kb
Finale Extension	72°C	10 min

Tab. 4: Primer für die RT-PCR-Assays.

Gen	GenBank-Nummer	Forward-Primer	Reverse-Primer
SRP14	NM_003134	AGC ACT GTG GTG AGC TCC AAG	TCA GCC CAT CCA TGT TAG CTC TA
SREBP1c	NM_004176	GGC GGG CGC AGA TC	TTG TTG ATA AGC TGA AGC ATG TCT
SREBP 2	NM_004599	GAG GCA GGC TTT GAA GAC GAA	GAA CAG GCG GAT CCT GCA G
HMGCoA-Red	NM_000859	TTG GCA GCA GGA CAT CTT GTC	TCT TGG TGC AAG CTC CTT GG
LDL-Rez	NM_000527	ATG AGG TCC ACA TTT GCC ACA	ATG TTC ACG CCA CGT CAT CC
FAS	NM_063242	GCA AAT TCG ACC TTT CTC AGA A	GTA GGA CCC CGT GGA ATG TC
SCD 1	NM_005063	GCC CAC CTC TTC GGA TAT CG	TGA TGT GCC AGC GGT ACT CA
CYP 27	NM_000784	TGC TCA TGG CTG GAG TGG A	CCA CTT CCT CGT GCA AGG C
ABCA1	NM_005502	GTT CAG CCT GAT CGT GCC AC	GGT TCC CGT GTC CTC AGG AG
ABCG1	NM_207630	CCA CGT ACC TAC AGT GGA TGT CCT A	GGA GAG GAT GAC CCC TTC GA

#### 4.6. Quantitative Echtzeit-RT-PCR

Die quantitative Echtzeit-RT-PCR stellt eine Möglichkeit dar, PCR-Produkte während ihrer Bildung in den Reaktionsgefäßen quantitativ zu erfassen. Die Echtzeit-Quantifizierung von PCR-Produkten kann zum einen als 5'-Nukleaseassay erfolgen (HEID *et al.*, 1996; HOLLAND *et al.*, 1991; LIVAK *et al.*, 1995). Hierbei wird die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase zur Generierung eines messbaren Signals während der PCR ausgenutzt. Andererseits kann die quantitative Echtzeit-RT-PCR auch mit Farbstoffen durchgeführt werden, die an DNA-Doppelstränge binden (HIGUCHI *et al.*, 1992 und 1993; LORENZ, 1998; LORKOWSKI & CULLEN, 2002). Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität für Doppelstrang-DNA (dsDNA) ist der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I für diese Anwendung besser geeignet als beispielsweise Ethidiumbromid. Der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I bindet ohne Sequenzspezifität an die kleine

Furche einer Doppelstrang-DNA. Diese Bindung führt zu einer erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zum Fluoreszenzsignal des ungebundenen SYBR<sup>®</sup> Green I. Da die Kinetik der PCR durch Bindung von SYBR<sup>®</sup> Green I an DNA nicht beeinflusst wird, kann das Fluoreszenzsignal des gebundenen SYBR<sup>®</sup> Green I zur Quantifizierung der in der PCR gebildeten DNA verwendet werden.

Die cDNA-Synthese erfolgte wie unter Kapitel 3.4.5 beschrieben mit 5 µg Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial und 500 ng Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer. Die quantitative Echtzeit-RT-PCR wurde auf einem ABI Prism 7900 HT Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Jede Probe wurde zweimal für das gewünschte Target und zweimal für den internen Standard (SRP14) angesetzt und gemessen. Zusätzlich wurden während jeder PCR Negativkontrollen ohne cDNA mitgeführt. Nach der PCR wurden die Proben im 3 %igen (w/v) Agarosegel (vgl. Kapitel 4.5.5) und anhand der Schmelzkurven auf Nebenprodukte kontrolliert. Die Auswertung und Quantifizierung der Messungen erfolgte mit der Sequence Detection System-Software Version 2.1. Die für die zu untersuchenden RNAs ermittelten Messwerte wurden mit Hilfe des internen Standards (ROX) normiert und dann miteinander verglichen.

#### **SYBR<sup>®</sup>-Green-RT-PCR-Mix:**

2x SYBR <sup>®</sup> -Green-PCR-Mastermix	5 µl
Primer-Mix (je 5µM)	0,4 µl
Template	2,5 µl
Aqua ad injectabilia	ad 10 µl

#### **SYBR<sup>®</sup>-Green-RT-PCR-Profil:**

Vorabinkubation	50°C	2 min
Vorabdenaturierung	95°C	15 min
40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 s
Annealing/Extension	60°C	60 s

#### 4.7. DNA-Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung der PCR-Produkte und der ABCA1-Mutation bei den Tangier-Patienten wurde eine auf dem Prinzip der zyklischen Sequenzierung basierende Methode verwendet (SANGER *et al.*, 1977 und 1980; SANGER & COULSON, 1978). Beim zyklischen Sequenzieren wird die Amplifikation des zu sequenzierenden Templates mit nur einem Primer durchgeführt. Daher kommt es während der Vervielfältigung der Template-DNA nicht zu einer exponentiellen Amplifikation wie bei der PCR sondern nur zu einer linearen Vermehrung. Wie auch bei der konventionellen Sanger-Sequenzierung (SANGER *et al.*, 1977 und 1980) wird beim zyklischen Sequenzieren mit der Kettenabbruchmethode mit Didesoxynukleotiden gearbeitet. Im Gegensatz zum Sanger-Verfahren werden die vier notwendigen Reaktionen in einem Ansatz unter Verwendung von vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotide angesetzt.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit den unten stehenden Ansätzen und dem Big Dye v3.2 Sequencing Kit angesetzt. PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mit dem MinElute Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt.

##### **Prämix:**

Bestandteil des Big Dye v3.1 Sequencing Kit

##### **Sequenziermix Plasmid-DNA:**

DNA-Template	0,1 ng/bp
Primer	2,4 pmol
HPLC-Wasser	ad 12 µl
Denaturierung für 5 min bei 94°C	
Abkühlen auf Eis	
Prämix	4,0 µl

Die Sequenzierreaktionen wurden mit den nachfolgenden Parametern durchgeführt.

**Standardsequenzierungsprofil:**

Vorabdenaturierung	96°C	4 min
25 Zyklen:		
Denaturierung	96°C	20 s
Annealing	50°C	10 s
Extension	60°C	2 min

Die Sequenzierproben wurden anschließend zur Aufreinigung nach Anleitung des Herstellers über Sephadex™ G50 Superfine in einer MultiScreen® HV-Platte durch eine Zentrifugation mit 2500 × g bei RT eluiert.

**4,25 % (w/v) Sequenziergel:**

40 % (w/v) Page Plus	5,3 ml
Harnstoff	18 g
10x TTE	6,0 ml
HPLC-Wasser	21,5 ml
TEMED	20 µl
10 % (w/v) APS	300 µl

**10x TTE-Puffer:**

Tris-HCl	0,5 M
EDTA	12,5 mM
TAPS	2 M

**Ladepuffer:**

EDTA	25 mM, pH 8,0
8 %ige (w/v) Dextranblau	100 µl
Formamid	900 µl

Nach der Elution wurden die Proben im Vakuum eingeengt, in 4,0 µl Ladepuffer aufgenommen und nach dem Lösen 2 min bei 90°C denaturiert. 0,5 µl der Proben wurden auf einem 4,25 % (w/v) Sequenziergel nach dem Wasserladeprotokoll der Firma *Applied Biosystems* aufgetragen. Dazu wurden die Proben sukzessive auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und mit 2x TTE-Puffer im oberen und 1x TTE-Puffer im unteren Reservoir elektrophoretisch getrennt. Die Trennung erfolgte bei 50 W, 3 000 V und 30 mA bei 45°C über 18 h. Zur Detektion diente ein in dem Gerät integrierter Fluoreszenzdetektor. Die Sequenzierreaktionen wurden mit der folgenden Software: 377-96 DNA Sequencer Data Collection V2.5, Auto Assembler V2.1 und Sequencing Analyser V3.2 ausgewertet.

## 5. Gaschromatographie

### 5.1. Aufbereitung von Zellen für die Gaschromatographie

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 1x PBS/0,1 % (w/v) EDTA gewaschen und mit 2 ml/150 cm<sup>2</sup> Kulturgefäß 1x Trypsin/0,1 % (w/v) EDTA versetzt. Nach dem Ablösen wurden sie in 10 ml HPLC-Wasser aufgenommen und 5 min bei 20°C mit 2 000 × g zentrifugiert. Nach Aufnahme des Zellpellets in 1 ml HPLC-Wasser wurde die Probe mit dem Ultraschall-Stab homogenisiert.

### 5.2. Proteinbestimmung

Sämtliche Proteinbestimmungen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Dieses Kit basiert auf der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> in einer alkalischen Lösung (Biuretreaktion). Für die Reduktion der Cu(II)-Ionen sind Cystein, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindungen verantwortlich. Das entstandene Cu<sup>2+</sup> komplexiert mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure ( **b**icinchoninic **a**cid; BCA). Der violette Komplex kann bei 562 nm quantitativ erfasst werden. Die Intensität der Farbstoffbildung

ist u.a. von der Temperatur abhängig. Daher kann die Sensitivität des Assays über die Temperatur variiert werden (LOTTSPREICH und ZORBAS, 1998).

**Reagenzlösung:**

BCA Protein Assay Lösung A 25 ml

BCA Protein Assay Lösung B 0,5 ml

Zur Herstellung eines Kalibrationsstandards wurde eine 2 mg/ml BSA-Stocklösung verwendet. Als Verdünnungsreihe zur Kalibration wurden BSA-Verdünnungen von 1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml und 0,25 mg/ml und 0 mg/ml in 100 µl HPLC-Wasser frisch angesetzt. Die zu quantifizierenden Proteinproben wurden 1:5 und 1:10 mit HPLC-Wasser verdünnt. Die Röhrchen wurden mit einem Schliffstopfen verschlossen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT für 10 min wurden die Extinktion der Proben im Doppelansatz fotometrisch bei 562 nm gegen den Blindwert vermessen.

**5.3. Quantitative Bestimmung von Gesamtcholesterin in Zellen**

Zur Bestimmung des Gesamtcholesterins werden die Cholesterinester aus einer Suspension homogenisierter Zellen nach Zugabe eines internen Standards alkalisch hydrolysiert. Das Cholesterin wird dann mit Tetrachlorethylen extrahiert und zu Trimethylsilyl-Cholesterin für die GC-Analyse derivatisiert. Hierzu wurden 200-400 µl des Zellhomogenisates mit 800 µl 20 % Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH)/Isopropanol (w/v) und 100 µl Epikoprostanol (100 ng/µl Methanol) versetzt und 30 min bei 80 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurden 1400 µl HPLC-Wasser und 400 µl Tetrachlorethylen zugegeben und die Probe 10 min bei 2000g zentrifugiert. Anschließend wurde die untere Phase in ein neues silanisiertes Glas überführt und im Stickstoffstrom bei 60°C abgedampft. Der Rückstand wurde mit „Tri-Sil“ (Pyridin:Hexamethyldisilazan:

Trimethylchlorsilan 9:3:1 v/v/v) versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Dann wurde erneut das Reagenz im Stickstoffstrom bei 60°C abgedampft. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Rückstand in 100µl Hexan/Pyridin (99:1 v/v) aufgenommen, 3 min mit Ultraschall behandelt und 10 min bei 1500 × g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben zur Messung in Autosampler-Fläschchen überführt.

#### **5.4. Quantitative Bestimmung von freiem Cholesterin in Zellen**

Bei dieser Methode wird freies (unverestertes) Cholesterin aus einer Suspension homogenisierter Zellen nach Zugabe eines internen Standards mit Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) extrahiert und zu TMS-Cholesterin für die GC-Analyse derivatisiert. Hierzu wurden je nach Proteingehalt unter Schütteln 2 000 µl Hexan:Isopropanol (3:2 v/v), 100 µl Epikoprostanol (100ng/µl Methanol) und 100 µl HPLC-Wasser zu 200-400 µl Zellsuspension zugegeben und 10 min bei 2 000 × g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase, „Extrakt 1“, in ein neues silanisiertes Glas überführt und die untere Phase mit 2 000 µl Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) und 400 µl HPLC-Wasser versetzt und wieder 10 min bei 2 000 × g zentrifugiert. Die obere Phase wurde dann zu „Extrakt 1“ hinzugegeben und bei 60°C im Stickstoffstrom abgedampft. Der Rückstand wurde nach Zugabe von 100 µl „Tri-Sil“ (Pyridin:Hexamethyldisilazan: Tri-methylchlorsilan 9:3:1 v/v/v) 30 min bei 60 °C inkubiert und erneut im Stickstoffstrom bei 60°C abgedampft. Nach Abkühlung auf RT wurde dem Rückstand 100µl Hexan/Pyridin (99:1 v/v) zugegeben, 3 min im Ultraschallbad behandelt und 10 min mit 1500 × g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben zur Messung in Autosampler- Fläschchen überführt.

Tab. 5: Geräteparameter-Einstellungen (Dani 8521a) für die Analyse der Sterole in Fibroblasten.

Geräteteil	Parameter	Einstellung
Injektor (PTV)	Anfangs-Säulenvordruck	70 kPa (bei geöffnetem Splitventil, 60°C)
	Injektor-Temperaturprogramm	isotherm 0,5 min bei 60°C; Gradient 500°C/min bis 300°C isotherm 4 min
	Septumspülung	7,5 ml/min
Splitventil	Splitfluss (60°C)	80 ml/min (Solvent-Split)
	Auf/Zu-Phasen	bei 0 min auf (Solvent-Split) bei 0,5 min zu (Probentransfer) bei 2 min auf (Aufheizen des Injektors) bei 5 min zu
Kapillarsäule	Säulentyp	HT5 25 m ID × 0,22 mm ID × 0,1 µm DF
	Trärgas	Helium 6.0
	Trärgasgeschwindigkeit	0,7 ml/min (unter Anfangsbedingungen)
	Säulenofen-Temperaturprogramm	isotherm 2 min bei 165°C Gradient 25°C/min bis 280°C isotherm 5 min bei 280°C Gradient 5°C/min bis 300°C isotherm 5 min bei 300°C
Detektor (FID)	Temperatur	300°C
	Detektorgasflüsse	Wasserstoff 5.0: 29 ml/min (60 kPa) synthetische Luft: 264 ml/min (60 kPa) Helium 6.0 (make up): 9 ml/min (60 kPa)

### 5.5. Quantitative Bestimmung von Fettsäuren in Zellen

In ein Reagenzglas mit Schraubverschluß und Teflondichtung wurden 100 µl aus einer Suspension homogener Zellen pipettiert und mit 1 ml Lösungsgemisch Methanol/Toluol (4:1), das 20 ng/µl Heneicosäure (C21:0) als internen Standard enthielt, versetzt. Zu dieser Lösung wurden unter Schütteln am Vortex 100 µl Acetylchlorid gegeben, das Reagenzglas fest verschlossen und 60 min bei 100°C im Heizblock erhitzt. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde die Reaktionsmischung mit 3 ml 6 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und 10 min bei 2000 × g zentrifugiert. 1 µl der oberen organischen Phase wurde zur Analyse in den Gaschromatographen injiziert.

**Tab. 6:** Geräteparameter-Einstellungen (Trace GC) für die Analyse der Fettsäuren in Fibroblasten.

Geräteteil	Parameter	Einstellung
Injektor (PTV)	Anfangs-Säulenvordruck	92 kPa (bei geöffnetem Splitventil, 80°C)
	Injektor-Temperaturprogramm	isotherm 0,2 min bei 60°C; Gradient 14,5°C/min bis 240°C isotherm 5 min
	Septumspülung	7,5 ml/min
Splitventil	Splitfluss (45°C)	20ml/min (Solvent-Split)
	Auf/Zu-Phasen	bei 0 min auf (Solvent-Split) bei 1 min zu (Probentransfer) bei 2 min auf (Aufheizen des Injektors) bei 4 min zu
Kapillarsäule	Säulentyp	CP-Sil 88 (Varian) 50 m × 0,32 mm ID × 0,2 µm DF
	Trärgas	Helium 6.0
	Trärgas-Fluss	1,8 ml/min
	Säulenofen-Temperaturprogramm	isotherm 2 min bei 80°C Gradient 6°C/min bis 140°C isotherm 4 min bei 140°C Gradient 3°C/min bis 225°C isotherm 6 min bei 225°C
Detektor (FID)	Temperatur	240 °C
	Detektorgasflüsse	Wasserstoff 5.0: 26 ml/min (60 kPa) synthetische Luft: 260 ml/min (60 kPa) Helium 6.0 (make up): 14 ml/min (60 kPa)

## 6. Messung der endogenen Cholesterinbiosynthese

### 6.1. Beladen der Zellen mit <sup>3</sup>H-Acetat

Zu 90 % konfluente Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturgefäßen wurden einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen und anschließend 48 h mit 20 µCi/ml <sup>3</sup>H-Acetat inkubiert.

### 6.2. Lipidextraktion

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber in 5 ml 1x PBS abgekratzt, in ein

silanisiertes Glas gegeben, unter Schütteln mit 2 000 µl Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) versetzt und 15 min bei 2 000 × g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase, „Extrakt 1“, in ein neues silanisiertes Glas überführt. Zu der unteren Phase wurden 2 000 µl Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) hinzugegeben. Das Gemisch wurde erneut 15 min bei 2 000 × g zentrifugiert. Die obere Phase wurde dann zu „Extrakt 1“ hinzugegeben. Die Lösungsmittelphase wurde dann bei 60°C im Stickstoffstrom abgedampft. Anschließend wurde die Probe mit 50 µl Hexan:Isopropanol (3:2 v/v) versetzt.

### 6.3. Dünnschichtchromatographie

Zum Auftrennen der Lipide wurde die Probe, zusammen mit radioaktivem und nicht-radioaktivem Cholesterin als Standard, auf eine Dünnschichtchromatographie (DC)-Alufolie aufgetragen. In eine Glaskammer wurden zwei Whatman-Papiere eingelegt, mit Hexan:Diethylether:Essigsäure (130:30:1,5 v/v/v) benetzt und bei fest verschlossenem Deckel 30 min äquilibriert. Die DC-Alufolie wurde eingelegt und solange in der Kammer belassen, bis das Laufmittel (Hexan:Diethylether:Essigsäure) fast den oberen Rand der Folie erreicht hatte. Anschließend wurde die DC-Folie 24 h getrocknet.

### 6.4. Detektion der Cholesterinbanden

Das nicht-radioaktive Cholesterin wurde in einer Jod-Kammer angefärbt und die restlichen Proben für 24 h auf eine „Phosphor-Imaging-Plate“ aufgelegt und dann im Bio-imaging Analyzer BAS 1500 eingescannt.

Anschließend wurde der Abschnitt mit der Cholesterin-Bande ausgeschnitten und in ein Szintillations-Gefäß mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Nach 2 h bei RT wurden die Counts pro Minute (CPM) im Beta-Counter (*Fa. Wallac*, Turku, Finnland) gemessen.

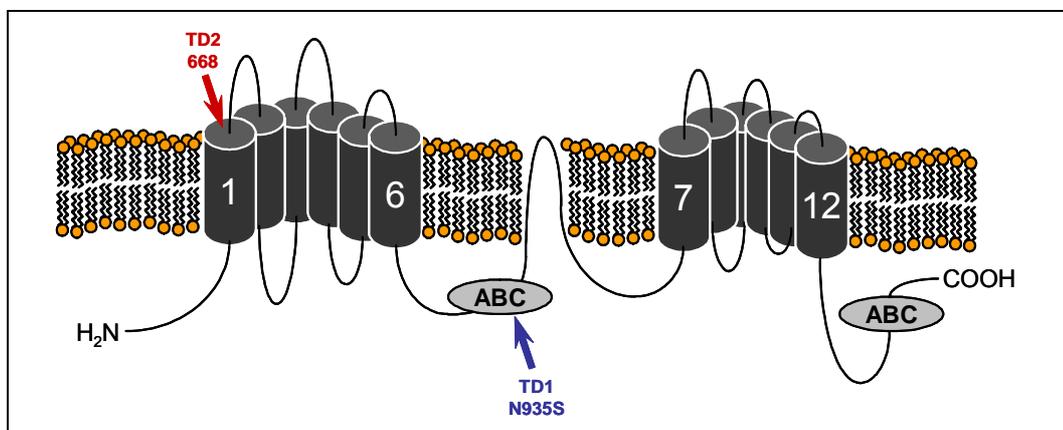


## IV. Ergebnisse

### 1. Zellkulturversuche

#### 1.1. Charakterisierung der Fibroblastenspender

Die Spender der Fibroblasten mit Tangier-Krankheit besaßen in beiden Fällen einen homozygoten Genotyp. Die Tangier-Krankheit wird durch Mutationen im ABCA1-Gen, das für die ABCA1-mRNA kodiert, hervorgerufen. Der erste Tangier-Patient (TD1) besitzt ein vollständiges ABCA1-Protein, dessen erste ATP-Bindungskassette aufgrund eines Aminosäureaustausches an der Position 935 des primären Translationsproduktes (N → S), der durch eine Punktmutation in Exon 19 (AAT → AGT) hervorgerufen wird, funktionsuntüchtig ist. Bei dem zweiten Patienten (TD2) führt die Deletion einer Base im Codon 608 (CTG=Leu) in Exon 14 zu einer Verschiebung des Leserasters (CTGacg... → ...Ctacg). Diese Leserasterverschiebung resultiert in einem Stopcodon im Codon 635, so dass nur der erste zytosolische Teil des ABCA1-Proteins ohne Transmembrandomäne gebildet wird und kein funktionstüchtiges Protein in den Zellen vorliegt (RUST *et al.*, 1999; BODZIOCH *et al.*, 1999). In Abb. 5 ist der ATP-Bindungskassettentransporter A1 mit der Lokalisation der beiden Mutationen schematisch dargestellt. Als Nachweis der Mutation wurde eine Sequenzierung der betroffenen Region durchgeführt.



**Abb. 5:** Der ATP-Bindungskassettentransporter A1 besteht aus zwei symmetrischen Hälften. Diese besitzen jeweils sechs Membran-umspannende Domänen und sind

**durch ein hydrophobes Segment miteinander verbunden. Der blaue Pfeil zeigt die Lokalisation der Aminosäure-Substitution von TD1, der rote Pfeil weist auf die Stelle der Basenpaar- Deletion von TD2.**

Die Patienten TD1 und TD2 haben nicht nur unterschiedliche Mutationen im ABCA1-Gen, sondern unterscheiden sich auch im klinischen Phänotyp. TD1 zeigt, trotz des genetischen Defektes einen klinisch milden Phänotyp, wohingegen TD2 an starker Arteriosklerose leidet (WALTER *et al.*, 1994). Beide Patienten waren zum Zeitpunkt der Fibroblasten-Zellspende im Alter von ca. 65 Jahren. Die Kontrollfibroblasten (BJ) wurden aus dem Präputium gesunder Säuglinge gewonnen.

## **1.2. Immortalisierung der Fibroblasten**

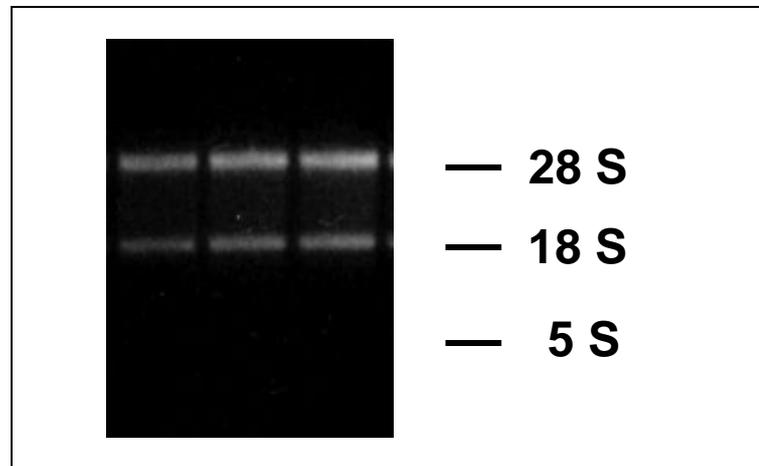
Die in dieser Arbeit verwendeten immortalisierten Zelllinien wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. med. Michael Walter zur Verfügung gestellt. Alle drei Zelllinien wurden im Dezember 2003 im biochemischen Department des Medical Centers an der Universität Southwestern in Dallas, USA, immortalisiert und charakterisiert. Als Nachweis der erfolgreichen Immortalisierung wurden, wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben und in Abb. 3 gezeigt, der TRAP- und der TRF-Assay durchgeführt.

Die Hauptcharakteristika der Zellen, u.a. ein reduzierter Cholesterin-Efflux und eine vermehrte Cholesterinester-Speicherung sind auch nach der Immortalisierung noch vorhanden. Von WALTER *et al.* konnte 2004 allerdings gezeigt werden, dass die immortalisierten Tangier-Fibroblasten eine gesteigerte Restaktivität der Apolipoprotein-vermittelten Cholesterin-Sekretion um bis zu 50 % des Normalwertes haben.

## **2. Echtzeit-RT-PCR-Analysen zum Nachweis der Genexpression in Fibroblasten**

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde, wie exemplarisch in Abb. 6

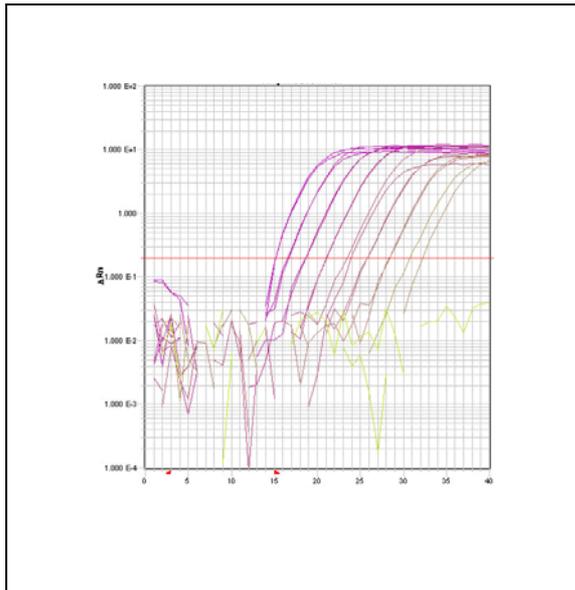
dargestellt, vor der reversen Transkription in 0,8 %igen (w/v) Agarosegelen überprüft.



**Abb. 6: Gelelektrophoretische Analyse DNase-behandelter Gesamt-RNA.** Die RNA wurde in einem 0,8 %igem (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch zugesetztes Ethidiumbromid angefärbt. Die Lage der 5S-, 18S- und 28S-RNA-Spezies sind gekennzeichnet. Die 5S-RNA-Spezies und andere vergleichbar kleine RNA-Spezies sind nicht sichtbar, da Nukleinsäuren mit weniger als 200 Basenpaaren mit der verwendeten Methode nicht isoliert werden. Im Bereich oberhalb der 28S-RNA-Spezies ist keine DNA-Kontamination erkennbar.

Um die Expression der Zielgene in Fibroblasten nachzuweisen, wurden RT-PCR-Assays etabliert, mit deren Hilfe ausgesuchte Transkripte spezifisch analysiert werden konnten. Die hierzu verwendeten PCR-Primer eines Primerpaares wurden mittels der Primer Express<sup>®</sup>-Software Version 2.0 in verschiedenen Exonen lokalisiert, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern. Um die optimalen Konzentrationen der Primer zu ermitteln, wurden alle Kombinationen folgender Primerkonzentrationen miteinander getestet: 100 nM, 200 nM, 300 nM. Die optimale Konzentration aller Primer betrug 200 nM. Um eine möglichst hohe PCR-Effizienz für die einzelnen Assays zu erreichen, wurde für jeden Primer die einzusetzende optimale Menge an cDNA mittels einer Verdünnungsreihe ermittelt (vgl. Tab. 7). Hier wurden von den den folgenden RNA-Konzentrationen entsprechenden cDNA-Verdünnungen

die Durchbruchzyklen ermittelt: 62,5 ng, 12,5 ng, 2,5 ng, 0,5 ng, 0,1 ng, 0,02 ng, 0,004 ng und 0,0008 ng (vgl. Abb. 7). Durch das Auftragen der Durchbruchzyklen gegen die Konzentration ergab sich eine Gerade, aus deren Steigung sich rechnerisch die PCR-Effizienz ermitteln ließ. Diese lag bei allen verwendeten Primern zwischen 90 % und 100 %.



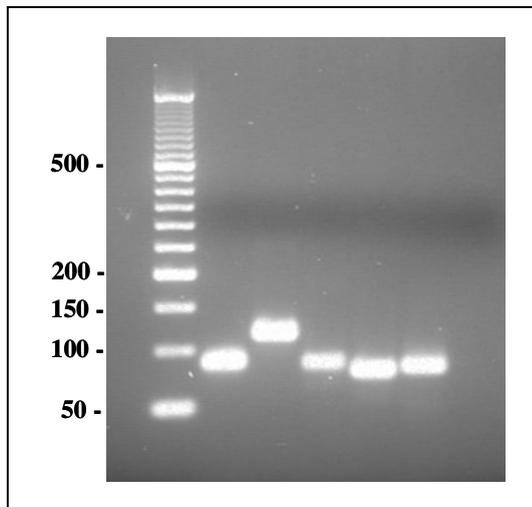
**Abb. 7: Amplifikationskurven am Beispiel einer SRP14-cDNA Verdünnungsreihe.** Dargestellt sind die Amplifikationskurven einer fünffachen Verdünnungsreihe der SRP14-cDNA ausgehend von einer cDNA-Menge, die einer theoretisch eingesetzten Menge von 62,5 ng Gesamt-RNA entspricht. Die für die Synthese der cDNA eingesetzte Gesamt-RNA wurde aus den Kontroll- und den Tangier-Fibroblasten isoliert.

**Tab. 7: Verwendete Menge an cDNA, die den angegebenen Mengen an Gesamt-RNA entsprechen.**

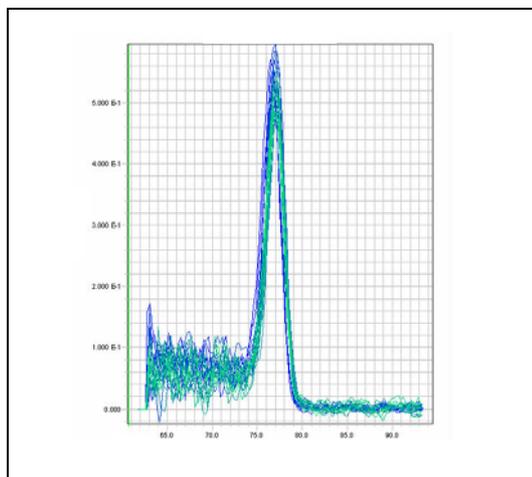
Nachzuweisende RNA/cDNA	GenBank-Nummer	Menge der verwendeten cDNA/RNA
SREBP2	NM_004599	1,25 ng
LDL-Rezeptor	NM_00527	1,25 ng
FAS	BC_063242	1,25 ng
HMGCoARed	NM_000859	2,5 ng
SCD1	NM_005063	2,5 ng
SREBP1c	NM_004176	2,5 ng
CYP 27	NM_000784	2,5 ng
SRP14	NM_003134	5 ng
ABCA1	NM_005502	100 ng
hABCG1	NM_004915	100 ng

Die einzusetzende Menge an cDNA wurde so gewählt, dass die Analyse der Gene im linearen Messbereich des verwendeten Echtzeit-PCR-Assays lag. Tab. 8 gibt eine Übersicht über die verwendeten Mengen an cDNA, die den angegebenen Mengen an Gesamt-RNA entsprechen.

Die Identität der PCR-Fragmente wurde durch Sequenzierungen mit Vorwärts- und Rückwärts-Primern und Vergleichen der ermittelten Sequenz mit Sequenzdatenbanken verifiziert. Es wurden nur Primerpaare verwendet, bei denen die Identität mit dem Zielgen zu 100 % übereinstimmte. Um die Spezifität der PCR zu zeigen, wurden die PCR-Produkte auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen (vgl. Abb. 8). Es ist zu erkennen, dass die PCR hochspezifisch ist und keinerlei Nebenprodukte liefert, die das Ergebnis der Assays verfälschen würden. Weiterhin ist in Abb. 9 exemplarisch eine spezifische Schmelzkurve für ein PCR-Produkt dargestellt, welche ebenfalls im Anschluß an jeden Assay überprüft wurden.



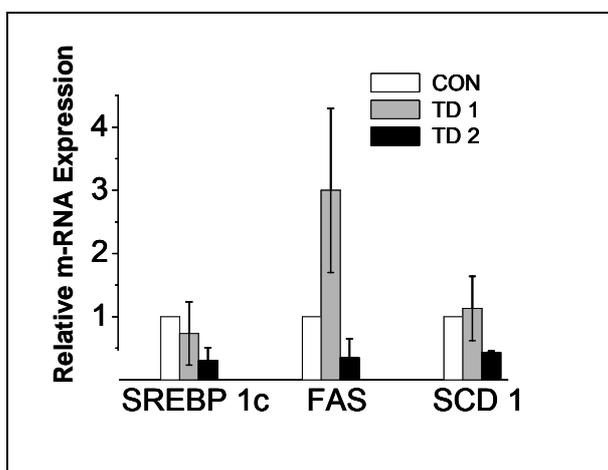
**Abb. 8: Repräsentatives 3 %iges (w/v) Agarosegel einer Sybr®Green-RT-PCR.** Aufgetragen sind von links nach rechts folgende Proben: 50 Basenpaare (bp) DNA-Größenstandard, HMGCoA-Reduktase (Größe: 88 bp), SREBP2 (Größe: 113 bp), LDL-Rezeptor (Größe: 87 bp), FAS (Größe: 78 bp) und SRP14 (Größe: 82 bp). Es sind keine Nebenprodukte oder Primer-Dimere zu erkennen, die das Ergebnis verfälschen.



**Abb. 9: Spezifische Schmelzkurve von SRP14-cDNA.** Die Abb. zeigt spezifische Schmelzkurven der in Abb. 8 dargestellten Verdünnungsreihe von SRP14. Es ist zu sehen, dass die Schmelzkurven sehr einheitlich sind und keine Nebenprodukte aufgrund einer Kontamination, unspezifischer Amplifikation oder Primer-Dimeren aufweisen.

Um die Cholesterin-Biosynthese zu untersuchen, wurde der mRNA-Gehalt der HMGCoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der endogenen Synthese von Cholesterin, und des LDL-Rezeptors, der für die Aufnahme von exogenem Cholesterin in die Zelle verantwortlich ist, mittels Echtzeit-RT-PCR gemessen. Zur Untersuchung des Fettstoffwechsels wurde die Expression von FAS, einem Enzym, das den Aufbau von Fettsäuren katalysiert, und die Expression von SCD1, einer Desaturase, die die Reaktion von Stearinsäure zu Ölsäure und von Palmitsäure zu Palmitölsäure katalysiert, gemessen. Zusätzlich wurde einer der Transkriptionsfaktoren der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors, SREBP2, und einer der Transkriptionsfaktoren von FAS und SCD1, SREBP1c, untersucht. Desweiteren wurde die Cholesterin-Sekretion anhand der ABC-Transporter A1 und G1, welche Cholesterin aus der Zelle ausschleusen, und anhand von CYP27, einer Cytochrom p450-Hydroxylase, welche das Cholesterin hydroxyliert und es so wasserlöslich macht, untersucht.

Abb. 10 zeigt die Expressionsunterschiede für SREBP1c, FAS und SCD1 bei den Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen die Expression des Transkriptionsfaktors SREBP1c bei TD1 nicht signifikant verändert ist, bei TD2 aber erniedrigt ist. Bei den von SREBP1c regulierten Genen FAS und SCD1 ist in den TD1-Zellen bei FAS eine Tendenz zur Hochregulation zu sehen, allerdings keine Veränderung der SCD1-Expression. Bei den TD2-Zellen sind beide Gene herunterreguliert.



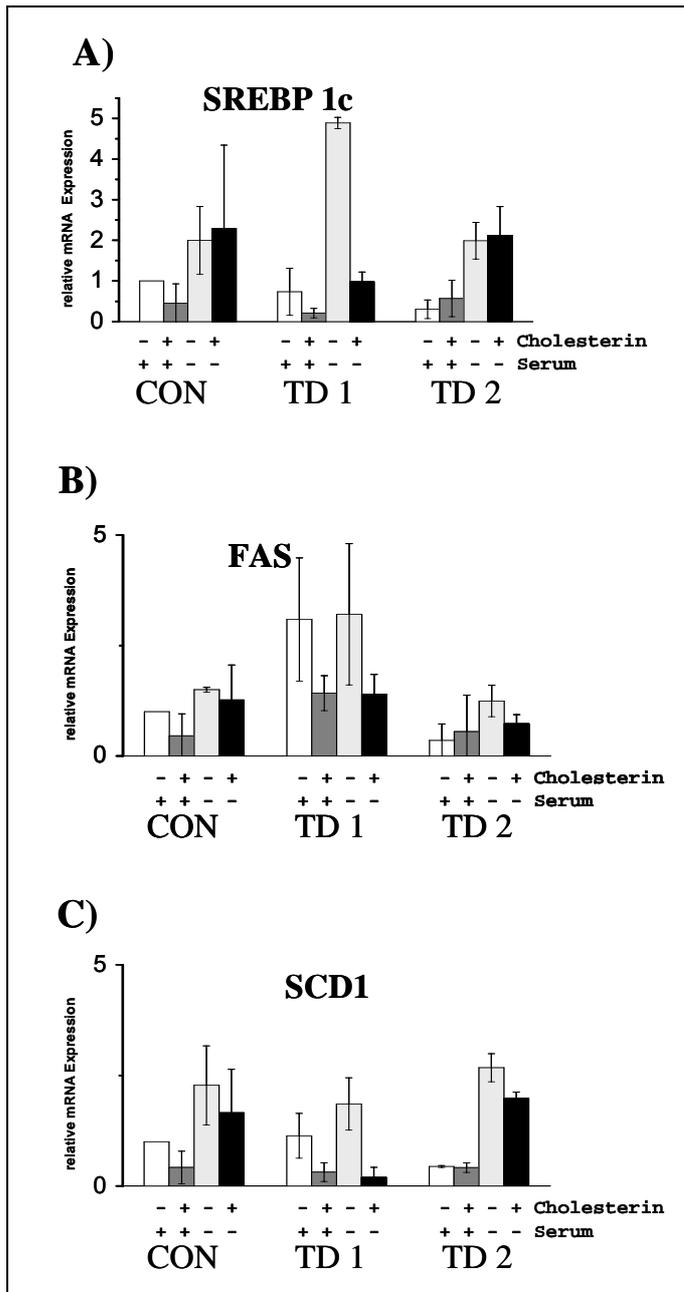
**Abb. 10: Relative Expressionsunterschiede der mRNA von SREBP1c, FAS und SCD1 bei den Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei Inkubation mit Serum-supplementiertem Vollmedium.**

Durch Beladung der Zellen mit freiem Cholesterin (FC) (20 µg/ml Medium) für 30 Stunden konnte bei der Kontrolle und bei TD1 im Vergleich zu der Inkubation ohne Cholesterin eine Herunterregulation des SREBP1c-Stoffwechselweges induziert werden (Tab. 8, Abb. 11), bei TD2 war die Expression der Gene unverändert.

**Tab. 8:** *Relative Expressionsunterschiede bei den Zellen der Tangier-Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (CON) für SREBP1c, FAS und SCD1*

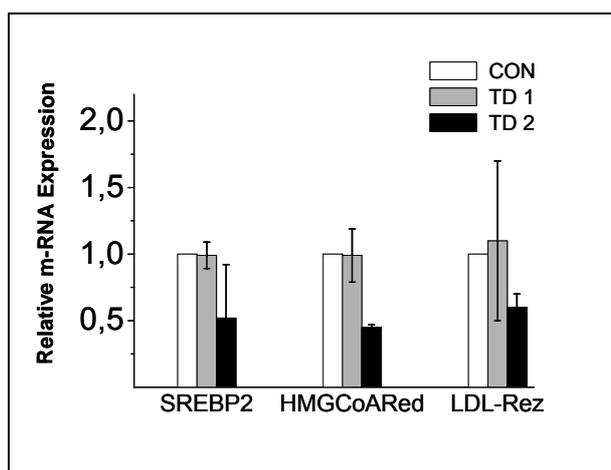
GEN	SPENDER	DMEM+FCS	DMEM+FCS+FC	DMEM	DMEM+FC
SREBP1c	CON	1	0,45 ± 0,4	2 ± 0,8	2,3 ± 2
	TD1	0,73 ± 0,5	0,2 ± 0,1	4,9 ± 0,1	0,98 ± 0,2
	TD2	0,3 ± 0,2	0,56 ± 0,4	1,99 ± 0,4	2,1 ± 0,7
FAS	CON	1	0,45 ± 0,4	1,5 ± 0,05	1,26 ± 0,8
	TD1	3 ± 1,3	1,42 ± 0,4	3,2 ± 1,6	1,4 ± 0,4
	TD2	0,35 ± 0,3	0,55 ± 0,8	1,24 ± 0,3	0,73 ± 0,2
SCD1	CON	1	0,42 ± 0,3	2,27 ± 0,8	0,42 ± 0,3
	TD1	1,13 ± 0,5	0,31 ± 0,2	1,85 ± 0,5	0,2 ± 0,1
	TD2	0,44 ± 0,02	0,41 ± 0,1	2,67 ± 0,3	1,98 ± 0,1

Wird den Zellen das Serum (fötales Kälberserum, FCS) entzogen, so werden alle untersuchten Gene im Vergleich zu der Inkubation mit Serumhaltigem Medium hochreguliert (vgl. Tab. 8, Abb. 11). Wenn diese Zellen zusätzlich mit freiem Cholesterin beladen wurden, konnte bei TD1, analog zu den Zellen mit Vollmedium, eine deutliche Herunterregulation von SREBP1c, FAS und SCD1 induziert werden. Bei den Kontroll- und den TD2-Zellen war dies weniger stark ausgeprägt als bei TD1. Bei SREBP1c war dieser Effekt jedoch nicht zu sehen.



**Abb. 11: Relative Unterschiede in der Expression der mRNAs von A) SREBP1c, B) FAS und C) SCD1 in Kontrollfibroblasten und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.**

Die Analyse der Expression des Transkriptionsfaktors SREBP2 in den TD1- und TD2-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium zeigte, dass diese Expression von SREBP2 in TD1-Zellen eine gleichstarke Expression wie in den Kontrollzellen aufwies, bei TD2 allerdings um 50 % herunterreguliert war (Abb. 12). Die gleiche Regulation zeigten die Zielgene von SREBP2, HMGCoA-Reduktase und LDL-Rezeptor.



**Abb. 12:** Relative Expressionsunterschiede der mRNA von SREBP2, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor bei den Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen bei Inkubation mit Serum-supplementiertem Vollmedium.

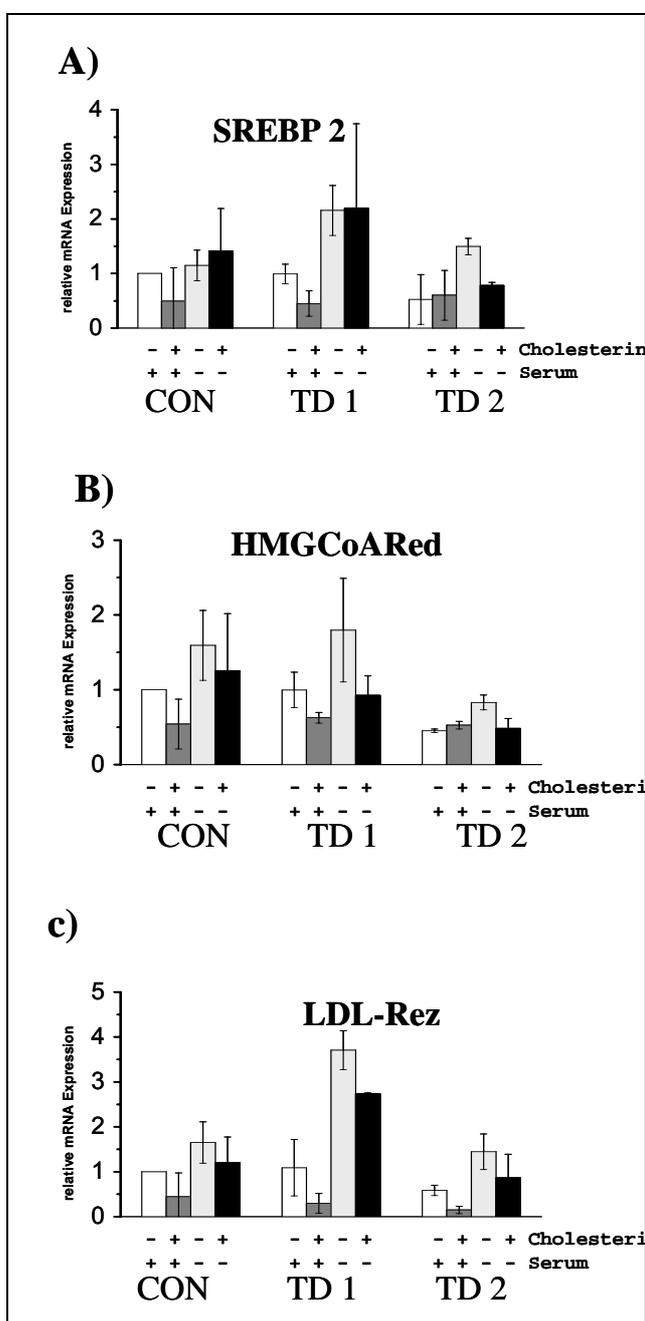
Bei Cholesterin-Beladung konnte in den Kontroll- und den TD1- Zellen im Vergleich zu der Inkubation ohne Cholesterin eine um 50 % reduzierte Genexpression induziert werden, bei TD2-Zellen war dies nicht zu sehen (Tab. 9, Abb. 13).

**Tab. 9:** Relative Expressionsunterschiede bei den Zellen der Tangier-Patienten im Vergleich zur Kontrolle (CON) für SREBP2, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor.

GEN	SPENDER	DMEM+FCS	DMEM+FCS+FC	DMEM	DMEM+FC
SREBP2	CON	1	0,49 ± 0,6	1,15 ± 0,2	1,41 ± 0,7
	TD1	0,99 ± 0,1	0,45 ± 0,2	2,16 ± 0,4	2,2 ± 1,5
	TD2	0,52 ± 0,4	0,6 ± 0,4	1,5 ± 0,1	0,78 ± 0,05
HMGCoA-Red	CON	1	0,54 ± 0,3	1,59 ± 0,4	1,25 ± 0,7
	TD1	0,99 ± 0,2	0,62 ± 0,07	1,8 ± 0,7	0,92 ± 0,2
	TD2	0,45 ± 0,02	0,52 ± 0,05	0,83 ± 0,09	0,48 ± 0,1
LDL-Rez	CON	1	0,5 ± 0,4	1,7 ± 0,4	1,2 ± 0,5
	TD1	1,1 ± 0,6	0,3 ± 0,2	3,7 ± 0,4	2,7 ± 0,02
	TD2	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,07	1,5 ± 0,4	0,9 ± 0,07

Durch den Serum-Entzug konnte im Vergleich zu der Inkubation mit Serum-haltigem Medium eine Hochregulierung der drei Gene SREBP2,

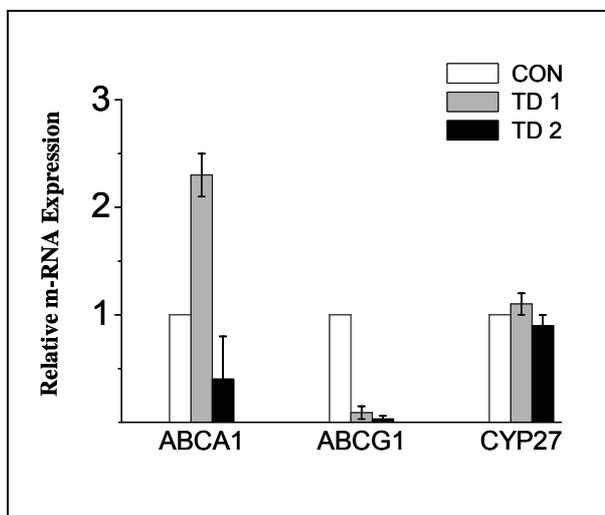
HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor induziert werden, die bei TD1 am deutlichsten war. Die zusätzliche Cholesterin-Beladung nach Serumentzug zeigte hier bei den Kontrollzellen keinen deutlichen Effekt. Bei TD1 blieb die Expression von SREBP2 nach zusätzlicher Cholesterin-Beladung und Serumentzug konstant, wohingegen die Expression der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors herunterreguliert wurden. Dieser Effekt war bei TD2 ebenso zu sehen. Allerdings war hier die SREBP2-Expression ebenfalls um 50 % reduziert.



**Abb. 13: Relative Unterschiede in der Expression der mRNA von A) SREBP2, B) HMG-CoA-Reduktase und C) LDL-Rezeptor in Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.**

Die Expression von ABCA1 war in den mit Serum-supplementierem Medium kultivierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei TD1 2-fach hochreguliert, bei TD2 hingegen 0,5-fach erniedrigt. Verglichen mit den Kontrollzellen, zeigten die Zellen beider Tangier-Patienten eine deutlich geringere Expression von ABCG1 (vgl. Abb. 14).

Die Expression von CYP27 blieb bei den Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Fibroblasten konstant.



**Abb. 14: Relative Expressionsunterschiede der mRNAs von A) ABCA1, B) ABCG1 und C) CYP27 bei den Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bei Inkubation mit Serum-supplementiertem Vollmedium.**

Die Expression von ABCA1 zeigte nach der Beladung mit freiem Cholesterin eine Hochregulation (vgl. Abb. 15). Dies ließ sich auch durch den Serumentzug bei allen drei Zellspendern induzieren. Durch eine Beladung mit Cholesterin unter Serumentzug stieg die Expression von ABCA1 in allen drei Zelllinien am stärksten (Tab. 10, Abb. 15).

Im Vergleich zur Expression in Zellen, die in Serum-haltigem Medium kultiviert wurden, stieg die Expression von ABCG1 unter Cholesterinbeladung bei den Kontrollzellen 3-fach, bei TD1 2-fach und bei TD2 10-fach an. Diese Hochregulation von ABCG1 ließ sich bei den Kontrollzellen und TD1 durch einen Serumentzug allerdings noch stärker induzieren. So stieg im Vergleich zu der Expression in den in Serum-

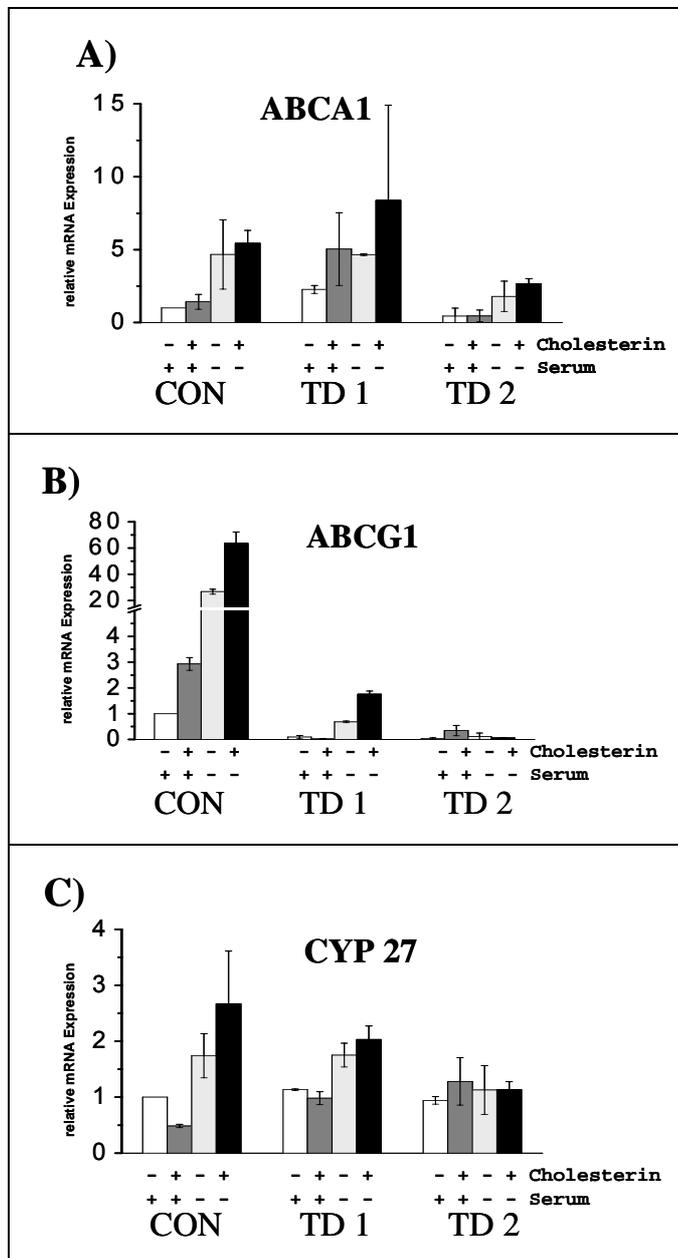
haltigem Medium kultivierten Zellen die Expression bei den Kontrollzellen 26-fach und bei TD1 8-fach. Bei TD2 zeigte sich nach Serumentzug nur ein 3-facher Anstieg im Vergleich zur Expression in den in Serum-haltigem Medium kultivierten Zellen. Durch ein zusätzliches Angebot von Cholesterin unter Serumentzug konnte in den Kontrollzellen und TD1 ein noch höherer Expressionsanstieg gezeigt werden. In den Kontrollzellen war die Expression von ABCG1 im Vergleich zur Expression in den in Serum-haltigem Medium kultivierten Zellen 63-fach und bei TD1 20-fach erhöht. Bei TD2 wurde jedoch nur ein 1,5-facher Anstieg beobachtet.

**Tab. 10:** Relative Expressionsunterschiede bei den Zellen der Tangierpatienten im Vergleich zu den Kontrollzellen (CON) bei ABCA1, ABCG1 und CYP27.

GEN	SPENDER	DMEM+FCS	DMEM+FCS+FC	DMEM	DMEM+FC
ABCA1	CON	1	1,4 ± 0,5	4,7 ± 2,3	5,4 ± 0,8
	TD1	2,3 ± 0,2	5 ± 2,4	4,6 ± 0,6	8,4 ± 6,5
	TD2	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4	1,8 ± 1	2,7 ± 0,3
ABCG1	CON	1	2,9 ± 0,2	26,6 ± 1,9	63,6 ± 8,7
	TD1	0,09 ± 0,06	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,02	1,8 ± 0,1
	TD2	0,03 ± 0,03	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,05 ± 0
CYP27	CON	1	0,5 ± 0,03	1,7 ± 0,3	2,7 ± 0,9
	TD1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2 ± 0,2
	TD2	0,9 ± 0,06	1,3 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4

Die Expression von CYP27 nach Cholesterin-Beladung war in den Kontrollzellen im Vergleich zu der Expression in Zellen, die in Serum-haltigem Medium ohne Cholesterin kultiviert wurden, 0,5-fach reduziert. In den Tangier-Zellen wurde bei Cholesterinbeladung kein Expressionsunterschied gesehen. CYP27 war in den Kontrollzellen und in den TD1-Zellen durch den Serumentzug und die zusätzliche Cholesteringabe im Vergleich zu der Expression in den Zellen, die mit

Serum-haltigem Medium inkubiert waren, leicht hochreguliert. In den TD2-Zellen war dieser Effekt jedoch nicht zu sehen.



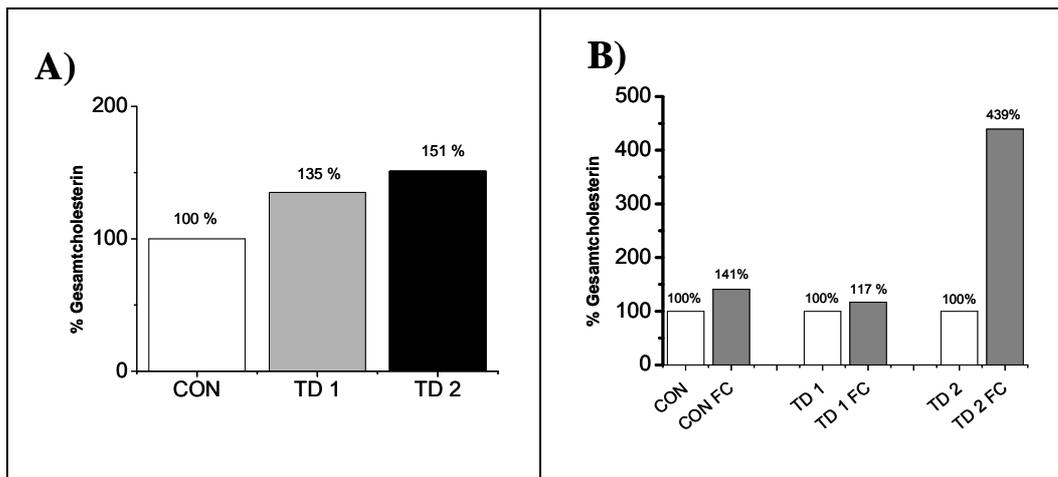
**Abb. 15: Relative Unterschiede in der Expression der mRNAs von A) ABCA1, B) ABCG1 und C) CYP27 in Kontrollfibroblasten und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.**

### 3. Quantitative Analysen mittels Gaschromatographie

#### 3.1. Quantifizierung des intrazellulären Cholesteringehalts

Aufgrund der Tatsache, dass Tangier-Patienten eine vermehrte Akkumulation von Cholesterinestern in verschiedenen Geweben aufweisen, wurde der Gehalt an Gesamt-Cholesterin und freiem Cholesterin

unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen mittels Gaschromatographie quantitativ analysiert (vgl. Kapitel 3.6.3 und 3.6.4). Wie Abb. 16A zeigt, ist unter Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium, im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, der Cholesteringehalt in den TD1-Zellen um 35 % und in den TD2-Zellen um 51 % erhöht.



**Abb. 16:** A) Prozentualer Anstieg des intrazellulären Gesamtcholesterins unter Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium bei den Tangier-Patienten im Vergleich zur Kontrolle. B) Anstieg des intrazellulären Gesamtcholesterins unter Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium bei allen drei Zellspendern nach 30-stündiger Beladung mit freiem Cholesterin (20 µg/ml Medium).

Durch die Inkubation mit freiem Cholesterin war der Gehalt an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin in den Fibroblasten aller drei Spender erhöht. Der prozentuale Anstieg bei den einzelnen Spendern variierte jedoch stark. So stieg der Gehalt an Gesamtcholesterin bei TD1 nach 30-stündiger Inkubation mit freiem Cholesterin nur um 17 %, bei den Kontrollzellen jedoch um 41 % und bei TD2 um 340 % (vgl. Abb. 16B).

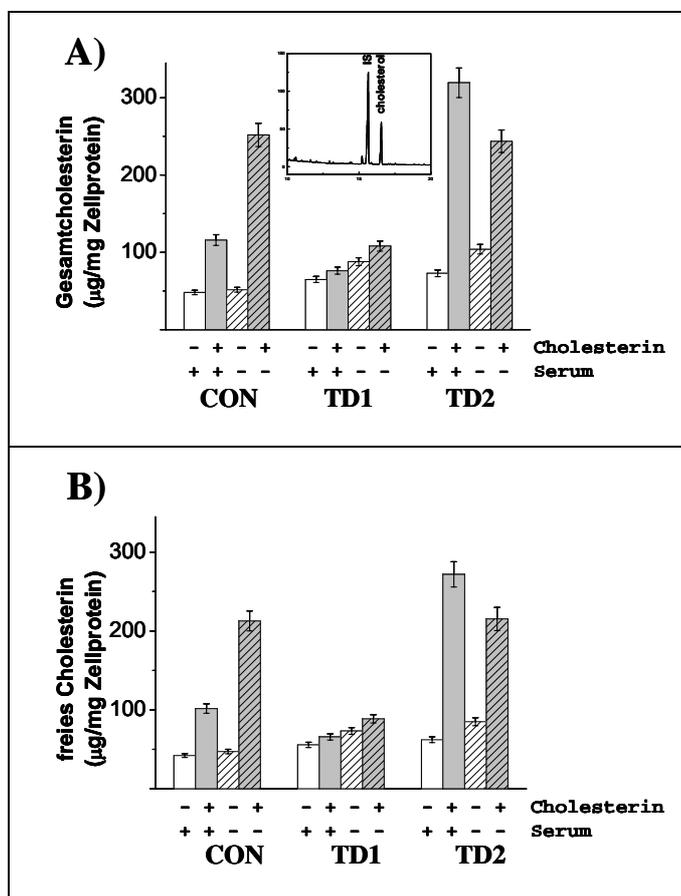
Bei Zellen, denen das Serum entzogen wurde, war im Vergleich zu den mit komplettiertem Medium kultivierten Zellen ein höherer Cholesteringehalt zu sehen, der sich durch Beladung mit freiem Cholesterin noch weiter steigern ließ (siehe Abb. 17). Die absoluten Werte von Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin sind in Tab. 11 und 12 aufgelistet.

**Tab. 11:** Gehalt an Gesamtcholesterin in den Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Zellprotein.

Spender	CON	TD 1	TD 2
DMEM+FCS	48,1 $\pm$ 2,9	64,9 $\pm$ 3,8	72,8 $\pm$ 4,3
DMEM+FCS+FC	115,8 $\pm$ 6,9	76,2 $\pm$ 4,5	319,3 $\pm$ 19,1
DMEM	51,6 $\pm$ 3	87,9 $\pm$ 5,2	103,9 $\pm$ 6,1
DMEM+FC	251,8 $\pm$ 15	108 $\pm$ 6,2	243,6 $\pm$ 14,5

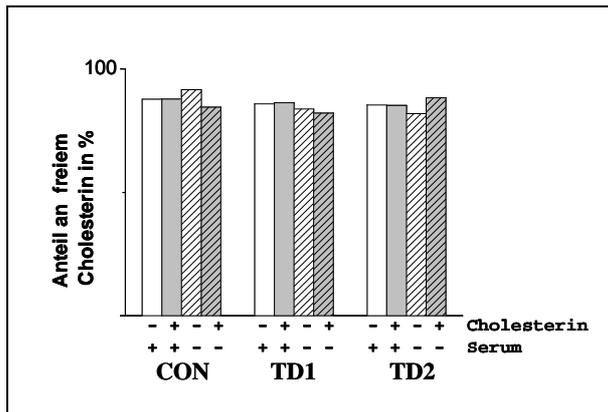
**Tab. 12:** Gehalt an freiem Cholesterin in den Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Zellprotein.

Spender	CON	TD 1	TD 2
DMEM+FCS	48,1 $\pm$ 2,9	64,9 $\pm$ 3,8	72,8 $\pm$ 4,3
DMEM+FCS+FC	115,8 $\pm$ 6,9	76,2 $\pm$ 4,5	319,3 $\pm$ 19,1
DMEM	51,6 $\pm$ 3	87,9 $\pm$ 5,2	103,9 $\pm$ 6,1
DMEM+FC	251,8 $\pm$ 15	108 $\pm$ 6,2	243,6 $\pm$ 14,5



**Abb. 17:** Gehalt an A) Gesamtcholesterin und B) freiem Cholesterin in den drei untersuchten Zelltypen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.

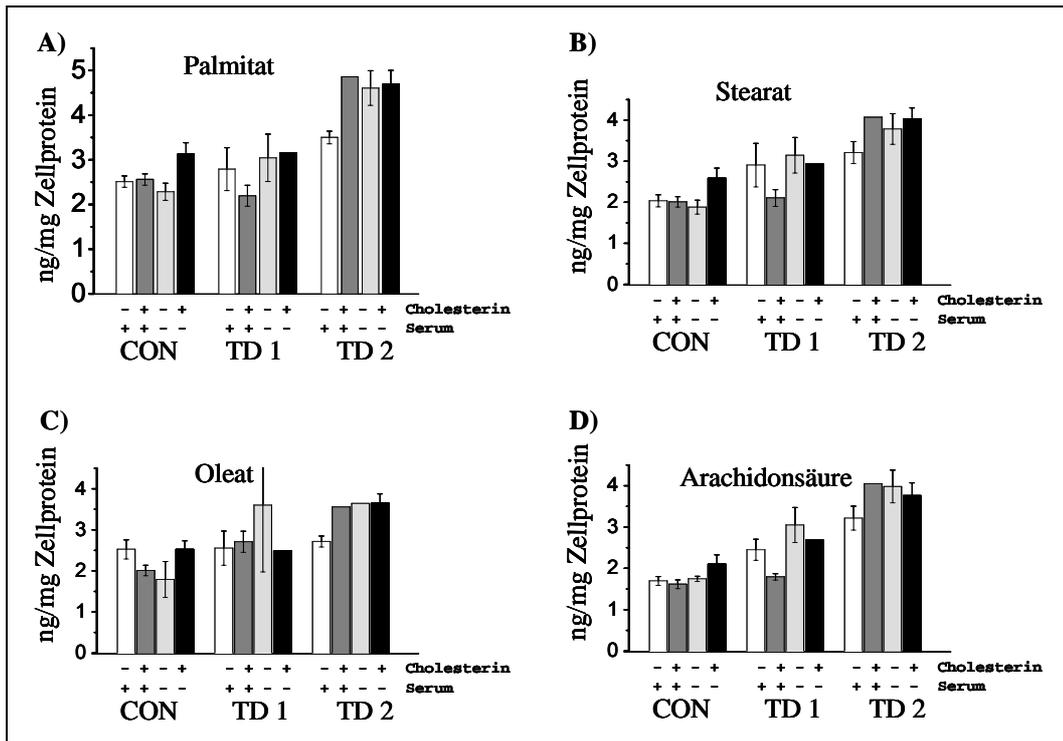
Der prozentuale Gehalt an Cholesterinestern, errechnet durch das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu freiem Cholesterin, wies keine signifikanten Unterschiede bei den verschiedenen Spendern auf und lag zwischen 80 % und 90 % (vgl. Abb. 18). Auch durch den Serumentzug und die Beladung mit freiem Cholesterin änderte sich das Verhältnis nicht.



**Abb. 18: Prozentualer Anteil des freien Cholesterins am Gesamtcholesterin unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.** Sowohl bei dem Vergleich der Zellspender, als auch unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen ändert sich der prozentuale Anteil vom freien Cholesterin am Gesamtcholesterin nicht. Er lag zwischen 80 % und 90 %.

### 3.2. Quantitative Analyse der intrazellulären Fettsäuren

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Tangier-Patienten aufgrund einer höheren intrazellulären Cholesterin-Belastung vermehrt Cholesterin verestern, um es in nicht-toxischer Form intrazellulär zu speichern. Cholesterin wird in Abhängigkeit vom Zelltyp größtenteils mit Oleat und Linoleat, aber auch mit Arachidonat und in geringerem Umfang auch mit Palmitat verestert. Um zu untersuchen, ob die Tangier-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollzellen einen höheren Gehalt an diesen Fettsäuren haben, wurden die intrazellulären Fettsäuren quantitativ mittels Gaschromatographie gemessen. Detektierbare nicht-essentielle Fettsäuren waren Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1) und Arachidonsäure (20:4).

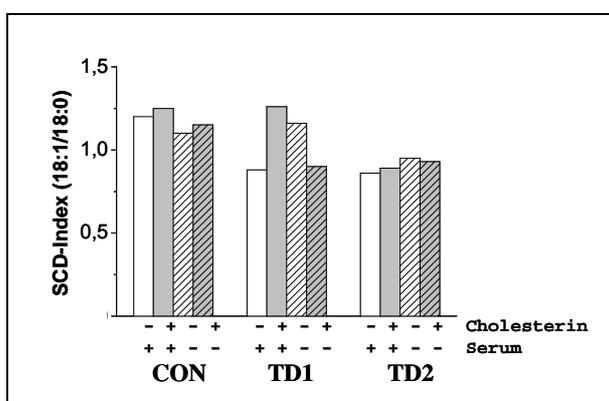


**Abb. 19: Gehalt an den detektierten nicht-essentiellen Fettsäuren in den Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen. A) Palmitinsäure (16:0), B) Stearinsäure (18:0), C) Ölsäure (18:1) und D) Arachidonsäure (20:4).**

Wie die Abb. 19 zeigt, sind keine großen Unterschiede zwischen den Kontroll- und Tangier-Zellen zu erkennen. Auch der Serum-Entzug und die Cholesterin-Beladung haben kaum Einfluss auf den Gehalt dieser vier Fettsäuren in den Zellen.

Der Stearoyl-CoA-Desaturase(SCD)-Index ist ein Wert, der sich aus dem Verhältnis von Ölsäure (18:1) zu Stearinsäure (18:0) bzw. Palmitölsäure (16:1) und Palmitinsäure (16:0) errechnet. Mittels dieses Index kann die relative SCD-Aktivität bestimmt werden (KANG *et al.*, 2004). Da bei diesen Messungen Palmitölsäure nicht detektiert werden konnte, wurde der SCD-Index nur durch den Quotienten von Ölsäure zu Stearinsäure berechnet. Der Index liegt bei den Kontrollzellen nach Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium über 1 und ist im Vergleich zu den Tangier-Zellen erhöht (vgl. Abb. 20).

Bei Betrachtung der verschiedenen Inkubationsbedingungen fällt auf, dass der SCD-Index nicht unter allen Kulturbedingungen mit der SCD1-Expression korreliert. Bei allen drei Zellspendern ist zum Beispiel eine Hochregulation des SCD1-Gens nach Serumentzug zu sehen, während ein Anstieg des SCD-Index nach Serumentzug nur bei TD1 zu sehen ist. Weiterhin wird SCD1 unter Beladung mit freiem Cholesterin herunterreguliert (vgl. Abb. 11). Hier verändert sich allerdings der SCD-Index bei den Kontrollzellen und TD2 nicht. Bei TD1 wird er sogar größer.



**Abb. 20:** Darstellung des SCD-Index, errechnet aus dem Verhältnis von Ölsäure (18:1) zu Stearinsäure (18:0), bei Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen.

### 3.3. Quantifizierung des intrazellulären Gehaltes an den Oxysterolen 24-Hydroxycholesterin, 25-Hydroxycholesterin und 27-Hydroxycholesterin

Oxysterole sind Stoffwechselmetaboliten des intrazellulären Cholesterins. Die im Rahmen dieser Arbeit mittels Gaschromatographie untersuchten Oxysterole sind 24-, 25- und 27-Hydroxycholesterin. 27-Hydroxycholesterin ist das Produkt der Reaktion, welche von dem Enzym CYP27 katalysiert wird. 24-, 25- und 27-Hydroxycholesterin sind neben weiteren, in dieser Arbeit nicht untersuchten Oxysterolen mehr oder weniger starke Liganden der LXR-Transkriptionsfaktoren LXR $\alpha$ <sup>4</sup> und LXR $\beta$  (LUND *et al.*, 1998; BJÖRKHEM, 2002; ORY *et al.*, 2004), welche unter anderem die Expression von ABCA1 (COSTET *et al.*, 2000; SCHWARTZ *et al.*, 2000), ABCG1 (LORKOWSKI *et al.*, 2001; KENNEDY *et al.*, 2001) sowie

<sup>4</sup> Engl., *liver X receptor*

den Transkriptionsfaktor SREBP1c (SCHULTZ *et al.*, 2000) aktivieren. 25-Hydroxycholesterin inhibiert den Prozess der Spaltung von SREBP1c und SREBP 2 (ADAMS *et al.*, 2004). Durch diese Spaltung vom Vorläuferprotein zum aktiven Spaltprodukt ist das Protein in der Lage, den Zellkern zu passieren und durch Bindung an spezifische Stellen im Promoter der Zielgene diese zu aktivieren (vgl. Kapitel 4.5). Umgekehrt findet bei einer Inhibition der SREBP-Spaltung durch 25-Hydroxycholesterin keine Aktivierung der Zielgene durch das aktive Protein mehr statt. Über die Bedeutung von 27-Hydroxycholesterin lieferten Studien widersprüchliche Ergebnisse. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass 27-Hydroxycholesterin in der Cholesterin-Homöostase nur eine geringe Rolle spielt und als schwacher LXR-Rezeptor-Aktivator fungiert (MEIR *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2001; BJORKHEM, 2002). Um zu untersuchen, ob a) der intrazelluläre Gehalt an 24-, 25- und 27-Hydroxycholesterin in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich ist, ob b) die Unterschiede, die beim Gehalt an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen bei den drei untersuchten Zelllinien gesehen wurden mit potentiellen Unterschieden im Gehalt an Oxysterolen korrelieren, ob c) durch einen erhöhten Gehalt an 24-Hydroxycholesterin bei den LXR-abhängigen ABCA1, ABCG1, SREBP1c, SREBP2 und CYP27 eine Hochregulation der Expression zu beobachten ist und ob d) ein erhöhter Gehalt an 25-Hydroxycholesterin mit einer erniedrigten Expression von FAS und SCD1 bzw. der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors einhergeht, wurden diese Oxysterole mittels Gaschromatographie quantifiziert.

Da dies eine bisher nicht publizierte Methode ist, wurde die Aufarbeitung der Zellen in Kapitel 3 nicht aufgeführt. Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Frank Kannenberg (Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung, Münster) aufgearbeitet, der mir auch die daraus resultierenden Daten zur Verfügung gestellt hat.

In den Kontrollzellen sind alle drei Oxysterole nach Inkubation mit Serumhaltigem Medium, bei 25- und 27-Hydroxycholesterin auch unter Serum-Entzug, nicht detektierbar (Abb. 21). Unter Cholesterin-Beladung stieg der

Gehalt aller drei Oxysterole an und konnte quantifiziert werden. Die absoluten Werte sind in Tab. 13-15 aufgelistet. Es ist zu sehen, dass der Gehalt nach Cholesterin-Beladung mit Serum-Entzug bei allen Oxysterolen höher war, als nach Cholesterin-Beladung bei Inkubation der Zellen mit Serum-supplementiertem Medium.

Bei den TD1-Zellen konnte nach Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium ein sehr geringer Gehalt an 24- und 27-Hydroxycholesterin quantifiziert werden, 25-Hydroxycholesterin war jedoch nicht nachzuweisen. Nach Serum-Entzug war in den TD1-Zellen nur 27-Hydroxycholesterin detektierbar. Wie bei den Kontrollzellen wurden nach Cholesterin-Beladung bei den TD1-Zellen alle drei Oxysterole gemessen. Der Gehalt war auch hier bei den ohne Serum kultivierten Zellen höher. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war der Gehalt an 27-Hydroxycholesterin etwa gleich, bei 24- und 25- Hydroxycholesterin war er nach Cholesterin-Beladung um 50 % erniedrigt.

24-Hydroxycholesterin konnte in den TD2-Zellen sowohl nach Inkubation mit Serum, als auch in den ohne Serum kultivierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Nach Cholesterin-Beladung konnte 24-Hydroxycholesterin jedoch quantifiziert werden. Der Gehalt war in den TD2-Zellen, die ohne Serum aber mit Cholesterin beladen waren nicht viel höher, als in den TD2-Zellen, die mit Serum-haltigem Medium mit Cholesterin kultiviert worden waren. Im Vergleich zu den Kontrollzellen war der Gehalt an 24-Hydroxycholesterin in den TD2-Zellen ähnlich hoch. 25- und 27-Hydroxycholesterin konnten in den TD2-Zellen mit allen vier Inkubationsbedingungen gemessen werden. Der Gehalt an 25- und 27-Hydroxycholesterin war in den TD2-Zellen nach Cholesterin-Beladung, sowohl bei den Zellen, die mit Serum kultiviert wurden, als auch bei den TD2-Zellen, die ohne Serum mit Cholesterin inkubiert wurden, um ein zehnfaches höher, als in den Kontroll- und den TD1-Zellen. Mit Cholesterin-Beladung bei Inkubation mit Serum-supplementiertem Medium stieg der Gehalt an 25- und 27-Hydroxycholesterin an. Wurde den TD2-Zellen jedoch das Serum entzogen, stieg der Gehalt an 25-Hydroxycholesterin um etwa das 3,5-fache und der Gehalt an 27-Hydroxycholesterin um zirka das 10-fache

an. Bei einer zusätzlichen Beladung mit Cholesterin und einer Kultivierung der Zellen mit Serum-Entzug konnte der Gehalt an 25-Hydroxycholesterin im Vergleich zu mit Serum-Entzug ohne Cholesterin-Beladung kultivierten Zellen etwa verdoppelt werden. Bei 27-Hydroxycholesterin wurde nur ein leichter Anstieg beobachtet.

Der Gehalt an Oxysterolen in Fibroblasten ist ungefähr um das Tausendfache niedriger, als der Gehalt an Cholesterin. Es war zu beobachten, dass der Anstieg des Gehaltes an Gesamt-Cholesterin bzw. freiem Cholesterin nach Cholesterin-Beladung bei den verschiedenen Zellspendern gut mit dem Anstieg der drei Oxysterole korrelierte. Weiterhin wurde beobachtet, dass die TD2-Zellen, die von den untersuchten drei Zelltypen den höchsten Gehalt an Gesamtcholesterin und freiem Cholesterin hatten, ebenso den höchsten Gehalt an 25- und 27-Hydroxycholesterin hatten. Dies war jedoch nicht bei 24-Hydroxycholesterin zu sehen.

Werden alle Versuchsbedingungen und Zelltypen miteinander verglichen, lässt sich keine generelle Korrelation zwischen dem Gehalt an Oxysterolen und der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Gene feststellen. Wird jedoch der Gehalt an 24-Hydroxycholesterin in Kontrollzellen, die ohne freies Cholesterin kultiviert wurden und in Kontrollzellen, die mit freiem Cholesterin kultiviert wurden, verglichen, ist für viele Gene ein Trend zu erkennen. In den mit Serum kultivierten Zellen ist die Expression von ABCG1 in den Zellen mit dem höheren Gehalt an 24-Hydroxycholesterin erhöht, während die Expression der Gene SREBP1c, SREBP2, LDL-Rezeptor, HMG-CoA-Reduktase, SCD1, FAS und CYP27 in den Zellen mit einem höheren Gehalt an 24-Hydroxycholesterin erniedrigt ist. Die Expression von ABCA1 blieb trotz des erhöhten Oxysterolgehalts unverändert. In den ohne Serumzusatz kultivierten Zellen zeigte sich ein etwas anderes Bild. Hier war die Expression von ABCG1 und CYP27, in den mit freiem Cholesterin beladenen Zellen erhöht und die Expression von SCD1, der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors war erniedrigt. Die Expression von ABCA1, SREBP1c, SREBP2 und FAS war trotz der Erhöhung des Gehalts

an 24-Hydroxycholesterin unverändert. Vergleicht man den Gehalt an 24-Hydroxycholesterin mit der Expression der untersuchten Gene in den TD1-Zellen, sieht der Trend anders aus. In den mit Serum kultivierten TD1-Zellen ist nur die Expression von ABCA1 in den Zellen mit dem höheren Gehalt an 24-Hydroxycholesterin erhöht, während die Expression der Gene SREBP1c, SREBP2, LDL-Rezeptor, HMG-CoA-Reduktase, SCD1, FAS und ABCG1 in den Zellen mit einem höheren Gehalt an 24-Hydroxycholesterin erniedrigt ist. Die Expression von CYP27 blieb trotz des erhöhten Oxysterolgehalts unverändert. In den ohne Serumzusatz kultivierten Zellen zeigte sich auch hier ein etwas anderes Bild. Hier war die Expression von ABCG1 und ABCA1, in den mit freiem Cholesterin beladenen Zellen erhöht und die Expression von SREBP1c, FAS, SCD1, der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors war erniedrigt. Die Expression von SREBP2 und CYP27 war trotz der Erhöhung des Gehalts an 24-Hydroxycholesterin unverändert. Wurden die TD2-Zellen, die mit Serum und ohne Cholesterin inkubiert wurden mit denen, die mit Serum und Cholesterin kultiviert wurden, verglichen, war eine Hochregulation der Expression bei gleichzeitigem Anstieg von 24-Hydroxycholesterin nur bei ABCG1 zu erkennen. Die Expression von SREBP2, SREBP1c, FAS, SCD1, ABCA1, CYP27 und der HMG-CoA-Reduktase war unverändert. Die Expression des LDL-Rezeptors war trotz des erhöhten Oxysterolgehalts erniedrigt. In den ohne Serum, aber ohne und mit Cholesterin beladenen TD2-Zellen, wurde keines der untersuchten Gene hochreguliert. Die Expression von SREBP1c, CYP27 und ABCA1 war unverändert und die Expression von SREBP2, LDL-Rezeptor, HMG-CoA-Reduktase, SCD1, FAS und ABCG1 war trotz des erhöhten Gehalts an 24-Hydroxycholesterin erniedrigt.

Es wurde, wie erwartet, bei den Kontroll- und den TD1-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen eine inverse Korrelation des Anstiegs im Gehalt an 25-Hydroxycholesterin mit einem Expressionsanstieg in den Genen FAS, SCD1, LDL-Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase beobachtet. Bei den TD2-Zellen war dies bei FAS, SCD1 und HMG-CoA-Reduktase bei Cholesterin-Beladung in den mit Serum-supplementiertem Medium nicht zu sehen, beim LDL-Rezeptor hingegen

schon. Bei den TD1-Zellen, die ohne Serum, aber mit Cholesterin kultiviert wurden, konnte man den Effekt allerdings in allen vier Genen sehen. Desweiteren konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zu den Kontroll- und den TD1-Zellen die Expression von FAS, SCD1, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor in den TD2-Zellen, welche den höchsten Gehalt an 25-Hydroxycholesterin hatten, am niedrigsten war.

27-Hydroxycholesterin hat vermutlich nur eine geringe Bedeutung für die Cholesterinhomöostase (BJORKHEM, 2002). Daher ist wahrscheinlich auch die Bedeutung von 27-Hydroxycholesterin für die Regulation der Expression der in dieser Arbeit untersuchten Gene gering. Daher soll an dieser Stelle auf eine ausführliche Betrachtung des Zusammenhangs zwischen dem Gehalt an 27-Hydroxycholesterin und der Expression der hier untersuchten Gene verzichtet werden.

**Tab. 13: Gehalt an 24-Hydroxycholesterin in den Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in ng/mg Zellprotein.**

Spender	CON	TD 1	TD 2
DMEM+FCS	n.d. <sup>5</sup>	1,5 ± 0,3	n.d.
DMEM+FCS+FC	11,8 ± 1,2	6 ± 0,9	18,2 ± 1
DMEM	2,7 ± 0,1	n.d.	n.d.
DMEM+FC	26,15 ± 2	12,6 ± 0,1	20,5 ± 1,5

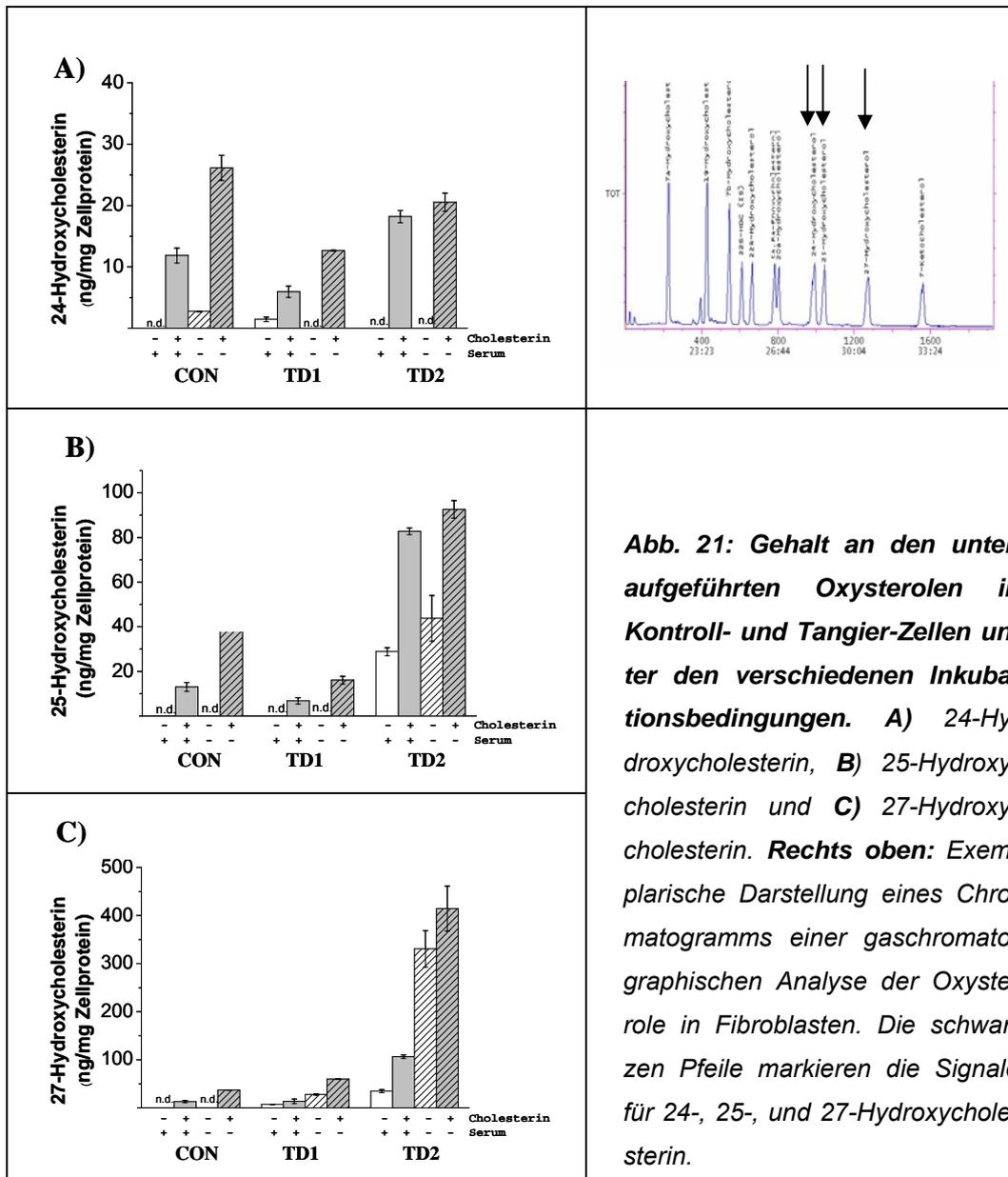
**Tab. 14: Gehalt an 25-Hydroxycholesterin in den Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in ng/mg Zellprotein.**

Spender	CON	TD 1	TD 2
DMEM+FCS	n.d.	n.d.	28,8 ± 1,7
DMEM+FCS+FC	13 ± 1,9	6,8 ± 1,4	82,7 ± 1,5
DMEM	n.d.	n.d.	43,7 ± 10,2
DMEM+FC	47,6 ± 2,1	16 ± 1,7	92,5 ± 3,9

<sup>5</sup> Nicht detektierbar.

**Tab. 15: Gehalt an 27-Hydroxycholesterin in den Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in ng/mg Zellprotein.**

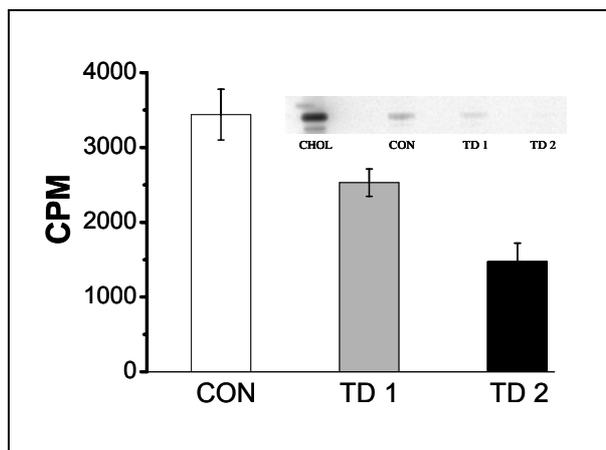
Spender	CON	TD 1	TD 2
DMEM+FCS	n.d.	7,2 ± 0,1	34,9 ± 3,1
DMEM+FCS+FC	12,9 ± 2,1	13,6 ± 4,8	106,5 ± 3,5
DMEM	n.d.	27,8 ± 1,4	330 ± 38,1
DMEM+FC	37,1 ± 0,1	59,9 ± 0,2	414 ± 46



**Abb. 21: Gehalt an den unten aufgeführten Oxysterolen in Kontroll- und Tangier-Zellen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen. A) 24-Hydroxycholesterin, B) 25-Hydroxycholesterin und C) 27-Hydroxycholesterin. Rechts oben: Exemplarische Darstellung eines Chromatogramms einer gaschromatographischen Analyse der Oxysterole in Fibroblasten. Die schwarzen Pfeile markieren die Signale für 24-, 25-, und 27-Hydroxycholesterin.**

#### 4. Messung der endogenen Cholesterin-Biosynthese mittels $^3\text{H}$ -Acetat

Aufgrund der reduzierten Expression der HMG-CoA-Reduktase in den Fibroblasten der Tangier-Patienten, vor allem bei den TD2-Zellen, sollte mit diesem Versuch die endogene Cholesterin-Biosynthese untersucht werden. Die Methode ist in Kapitel 3.7 beschrieben. Wie in der Abb. 22 dargestellt zeigt sich bei den Kontrollzellen eine stärkere Bande des gebildeten, radioaktiv markierten Cholesterin als bei den TD1-Zellen. Bei den TD2-Zellen ist diese Bande kaum sichtbar. Die Säulen zeigen das Ergebnis der anschließenden Zählung der radioaktiven Zerfälle (Counts pro Minute) im Beta-Counter. Die endogene Cholesterin-Biosynthese ist hiernach bei den TD1-Zellen um 27 %, bei den TD2-Zellen um 58 % reduziert.



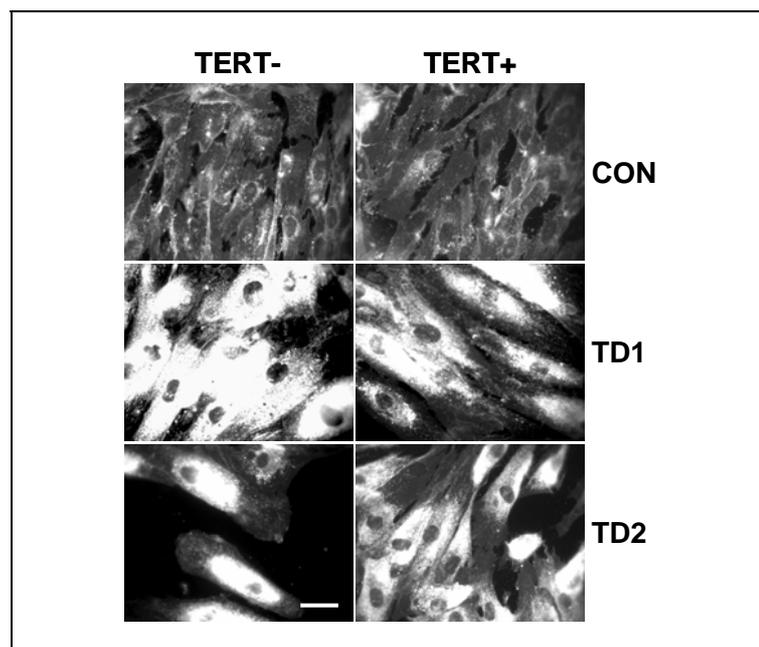
**Abb. 22:** Darstellung der  $^3\text{H}$ -Zerfälle im radioaktiv markierten Cholesterin pro Minute in Kontroll- und Tangier-Zellen (CON: 3680 CPM, TD1: 2660 CPM, TD2: 1650 CPM).



## V. Diskussion

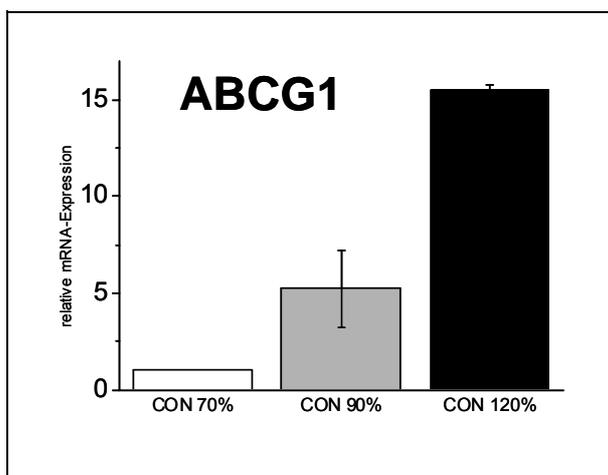
### 1. Das verwendete Zellkulturmodell

Aufgrund des Funktionsverlustes des ABCA1-Proteins, Cholesterin aus Zellen herauszuschleusen, kommt es in verschiedenen Geweben von Tangier-Patienten zu starken Ablagerungen von Cholesterinestern (vgl. Kap. 1.2). Bedingt durch diese Ablagerungen unterscheiden sich die aus Tangier-Patienten isolierten Fibroblasten in ihrer Morphologie von den Fibroblasten gesunder Kontrollspender. Die Zellen der Tangierpatienten sind beispielsweise deutlich größer als entsprechende Kontrollzellen und der Cholesterin-Gehalt ist im Vergleich zu Fibroblasten gesunder Spender erhöht (vgl. Abb. 23).



**Abb. 23:** Filipin-Färbung nicht immortalisierter (TERT-) und immortalisierter (TERT+) Kontrollfibroblasten (CON) und Tangier-Fibroblasten (TD1 und TD2). Da Filipin einen fluoreszierenden Komplex mit intrazellulärem freiem Cholesterin bildet, wurden Zellen angefärbt, um die Menge an freiem Cholesterin in Kontroll- und Tangier-Zellen detektieren zu können. Es ist zu sehen, dass die Zellen der Spender TD1 und TD2 im Vergleich zu den Kontrollzellen einen höheren Gehalt an freiem Cholesterin aufweisen. Es ist ferner zu erkennen, dass die Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich größer sind. Der in der Abb. weiß dargestellte Balken entspricht zirka 10  $\mu\text{m}$  (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Michael Walter).

Weiterhin sind große Unterschiede im Wachstumsverhalten der Kontrollfibroblasten und der Tangier-Zellen zu beobachten. Die Tangier-Fibroblasten wachsen langsamer als die entsprechenden Kontrollzellen. Es kam ferner hinzu, dass sich das Wachstumsverhalten insbesondere der Tangierzellen von Passage zu Passage änderte. Diese Veränderung trat nicht vorhersehbar auf. Aufgrund dieser Unterschiede im Wachstum war es schwierig, einen homogenen Konfluenzzustand der Zellen aller Spender zu Beginn der Inkubationsversuche zu gewährleisten. Weiterführende Versuche haben gezeigt, dass der Konfluenzzustand der Zellen die Genexpression einiger Gene maßgeblich beeinflusst. So schwankt beispielsweise die Expression von ABCG1 in Zellen nach Erreichen von 70 % und 90 % der vollständigen Konfluenz sowie in Zellen, die nach Erreichen der Konfluenz weitere zwei Wochen in Kultur gehalten worden sind (mit 120 % bezeichnet), deutlich (vgl. Abb. 24). Ein Expressionsanstieg in den am Cholesterin-Efflux beteiligten Genen bei zunehmender Konfluenz der Zellen ist schon früher vermutet worden (FIELDING *et al.*, 1999). In der gleichen Weise wird eine Zellzyklus-abhängige Regulation der Cholesterin-Biosynthese vermutet. Dies ist eine Erklärung für die relativ starken Schwankungen in der Expression und die daraus resultierenden hohen Standardabweichungen bei einigen der in dieser Arbeit untersuchten Gene.



**Abb. 24: Unterschiede in der mRNA-Expression von ABCG1 in den Kontrollzellen bei 70 %, 90 % und 120 % Konfluenz.**

Ein weiterer kritischer Punkt ist das unterschiedliche Alter der verwendeten Zellen. So stammen die Kontrollzellen von der Vorhaut

Neugeborener, während die Spender der Tangier-Zellen zum Zeitpunkt der Biopsie zwischen 60 und 70 Jahren alt waren. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit standen jedoch keine Kontrollzellen eines Spenders im entsprechenden Alter der Tangier-Patienten zur Verfügung. In weiteren Versuchen im Anschluss an diese Arbeit sollen daher Kontrollfibroblasten immortalisiert werden, die einem 60 Jahre alten, gesunden männlichen Spender mittels Biopsie entnommen worden sind.

## 2. Etablierung der Methoden

### 2.1. Echtzeit-RT-PCR für Genexpressionsanalysen

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Echtzeit-RT-PCR-SYBR®Green-Assays eigneten sich sehr gut für die relativen Genexpressionsanalysen der in Kapitel 3.4.5 aufgeführten Gene. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, auch Gene reproduzierbar zu analysieren, deren Expression in den in dieser Arbeit verwendeten humanen TERT-immortalisierten Fibroblasten sehr niedrig war. Die Messung der Expression aller Gene erfolgte im linearen Messbereich der verwendeten Echtzeit-RT-PCR-Methode. Darüber hinaus waren alle Assays hochspezifisch, da die Amplifikation in allen Fällen nur zu einem einzigen Produkt führte. Die Identität aller PCR-Produkte konnte durch Sequenzierungen eindeutig bestätigt werden. Die PCR-Effizienzen aller Assays lag mit mehr als 90 Prozent in dem für sinnvolle Auswertungen notwendigen Bereich. Die zum Teil schlechte Reproduzierbarkeit und großen Standardabweichungen der Genexpressionsdaten in dieser Arbeit sind daher wahrscheinlich nicht auf die Messmethodik an sich zurückzuführen (vgl. Kapitel 5.1).

### 2.2. Gaschromatographische Analysen

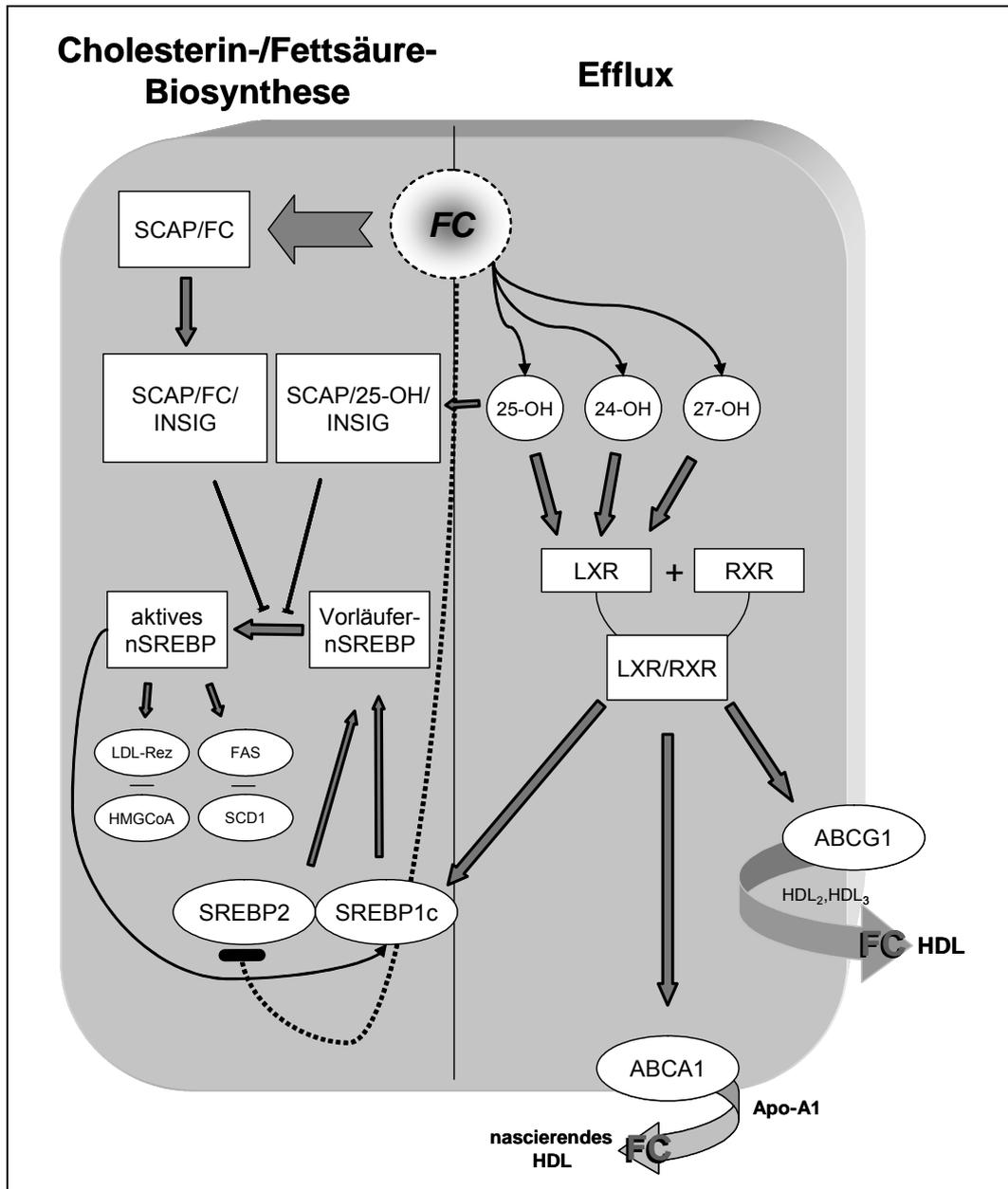
In dieser Arbeit wurde der zelluläre Gehalt an Gesamt-Cholesterin, freiem Cholesterin, Fettsäuren und den Oxysterolen in Fibroblasten mittels gaschromatographischer Verfahren untersucht. Die in der vorliegenden

Arbeit verwendeten Verfahren wurden von Dr. Frank Kannenberg an unserem Institut etabliert (CULLEN *et al.*, 1997; KRATZ *et al.*, 2002; KANNENBERG *et al.*, in Vorbereitung). Die eingesetzten Methoden erwiesen sich für die im Rahmen dieser Arbeit erforderlichen Untersuchungen als sehr gut geeignet. Die Chromatogramme der aufgearbeiteten Proben zeigten spezifische Signale und die Ergebnisse waren sehr gut reproduzierbar, so dass auch kleine Änderungen im Gehalt der untersuchten Substanzen quantifiziert werden konnten. Weiterhin waren die gaschromatographischen Methoden ausreichend sensitiv, um auch die kleinen Mengen an Oxysterolen und Fettsäuren, die von Fibroblasten produziert werden, quantitativ zu erfassen.

### 3. Die Regulation des zellulären Cholesterin-Stoffwechsels in gesunden Zellen

Um die Ergebnisse dieser Arbeit in ihren physiologischen Kontext zu bringen, soll zunächst eine Übersicht über die bekannten Regulationsmechanismen des zellulären Cholesterin-Stoffwechsels gegeben werden. Abb. 25 zeigt diese funktionellen und regulatorischen Zusammenhänge zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Faktoren. Die Abb. ist in die verschiedenen physiologischen Stoffwechselwege Cholesterin-Efflux, Cholesterin-Biosynthese und Fettsäure-Biosynthese gegliedert.

Die Proteine SREBP1c und SREBP2 sind zentrale Regulatoren des zellulären Cholesterin- und Fettsäurestoffwechsels. In einer gesunden Vertebratenzelle mit niedrigem Cholesterin-Gehalt wird die rezeptorvermittelte Aufnahme und zelleigene Synthese von Cholesterin durch SREBP2 aktiviert. Das SREBP2-Vorläuferprotein ist an das Endoplasmatische Retikulum gebunden. Durch die Bindung des Proteins SCAP an SREBP2 wird das Vorläuferprotein mittels COPII-haltiger Vesikel vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat transportiert (SUN *et al.*, 2005).



**Abb. 25: Schematische Darstellung der Regulationsmechanismen des zellulären Cholesterin-Stoffwechsels in einer Vertebraten-Zelle.** Cholesterin wird nach Aufnahme durch die Zelle u.a. zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert. Hier bindet es an das membran-gebundene SCAP-Protein. Der daraus resultierende SCAP/FC-Komplex bindet an das INSIG-Protein. Aufgrund der dadurch hervorgerufenen Retention von SREBP am Endoplasmatischen Retikulum wird die Spaltung des SREBP-Vorläuferproteins am Golgi-Apparat zum aktiven Spaltprodukt inhibiert. Auf diese Weise erfolgt keine Aktivierung der SREBP-Zielgene (FAS, SCD1, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor), da weniger aktives SREBP in den Zellkern gelangt. Des Weiteren kann Cholesterin die mRNA-Expression von SREBP2 über ein SRE-Element und über den Transkriptionsfaktor NF-Y inhibieren. Für die SREBP1c-Expression ist eine Autoregulation über das aktive Spaltprodukt beschrieben. Ein weiterer Teil des Cholesterins wird durch mitochondriale Enzyme zu 24-,25- und 27-Hydroxycholesterin

hydroxyliert. Diese Oxysterole fungieren als aktivierende Liganden für LXR-Transkriptionsfaktoren. LXR bildet anschließend ein Heterodimer mit dem durch Bindung von 9-cis-Retinsäure aktivierten Transkriptionsfaktor RXR. Nach der Translokation des LXR/RXR-Heterodimers in den Zellkern verstärkt dieses dort durch Bindung an spezifische Stellen im Promoter der Gene u.a. die Expression von ABCA1, ABCG1 und SREBP1c. Darüber hinaus bindet 25-Hydroxycholesterin mit der gleichen Wirkung wie Cholesterin, allerdings über einen anderen Mechanismus und mit fünffach höherer Potenz an das Protein INSIG. 25-Hydroxycholesterin ist somit ein starker Suppressor der SREBP-Spaltung. In der Abb. werden folgende Abkürzungen verwendet: FC, freies Cholesterin; SCAP, sterol cleavage activating protein; nSREBP, sterol regulatory element binding protein 1c oder 2; LDL, Lipoproteine geringerer Dichte; HDL, Lipoproteine hoher Dichte; LXR, liver X receptor; RXR, retinoid X receptor; ABCA1/G1, ATP-Bindungskassettentransporter A1/G1; FAS, Fettsäuresynthase; SCD1, Stearoyl-CoA-Reduktase; HMGCoA,  $\beta$ -Hydroxy-Methyl-Glutaryl-CoA-Reduktase; OH, Hydroxycholesterin. Referenzen sind in den entsprechenden Stellen im Text angegeben.

Am Golgi-Apparat erfolgt die zweifache Spaltung des SREBP2-Proteins durch die Proteasen SP1 (*site-1 protease*) und SP2 (*site-2 protease*) zum reifen SREBP2 (GOLDSTEIN *et al.*, 2002). Das reife SREBP2 kann in den Zellkern translozieren und bindet dort an die SRE-Elemente in den Promotoren von Zielgenen, deren Expression dadurch induziert wird. Auf diese Weise wird beispielsweise die Expression der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors verstärkt, so dass vermehrt Cholesterin von der Zelle gebildet und mehr LDL endozytiert wird. In analoger Weise erfolgt die Aktivierung des SREBP1c-Vorläuferproteins zum reifen SREBP1c. Im Falle von SREBP1c wird jedoch nicht die Synthese und Aufnahme von Cholesterin verstärkt, sondern es wird beispielsweise durch die vermehrte Expression von FAS und SCD1 die Synthese von Fettsäuren bzw. einfach ungesättigten Fettsäuren aktiviert.

Nehmen Zellen von Vertebraten hingegen Cholesterin auf, so gelangt dieses in Abhängigkeit von der Art der Aufnahme auf verschiedenen Wegen zunächst in die Zellmembran und wird dann vesikulär zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert (SIMONS und IKONEN, 2002). Hier bindet das sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befindliche Cholesterin an die sterol-sensitive Domäne von SCAP, das in

der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden ist (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2004). Die Bindung von Cholesterin an SCAP bewirkt eine Konformationsveränderung von SCAP. Aufgrund dieser Änderung in der Proteinkonformation kann sich der Komplex aus SCAP und freiem Cholesterin (SCAP/FC) an das Protein INSIG anlagern, das ebenfalls in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden ist. Durch den dadurch entstehenden Proteinkomplex (SCAP/FC/INSIG) wird verhindert, dass SCAP an die Vorläufer-Proteine von SREBP1c und SREBP2 bindet, die an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden vorliegen. Hierdurch wird die Eskortierung der SREBP-Vorläuferproteine durch SCAP vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat verhindert (YANG *et al.*, 2002). Da die Spaltung der SREBP-Vorläuferproteine zur aktiven Form am Golgi-Apparat stattfindet, wird durch die Inhibierung des SREBP-Transports vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat auch die dort sonst stattfindende SREBP-Spaltung verhindert. Es werden daher keine reifen SREBP-Proteine mehr gebildet, die in der Lage wären, in den Zellkern zu translozieren und dort an die SRE-Bindungsstellen im Promoter der Zielgene zu binden, um so deren Genexpression zu aktivieren (HORTON, 2002). Das Resultat ist eine Suppression der mRNA-Expression der Zielgene von SREBP1c und SREBP2 (z.B. FAS, SCD1, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor).

Des Weiteren ist Cholesterin in der Lage, die mRNA-Expression von SREBP2 zu inhibieren (SATO *et al.*, 1996). Diese Regulation erfolgt zum einen über ein SRE-Element im Promotor des SREBP2-Gens und des Weiteren über den Transkriptionsfaktor NF-Y, der an ein CCAAT-Element im Promotor des SREBP2-Gens bindet und die Expression dieses Gens inhibiert. Ein weiterer Teil des Cholesterins wird durch mitochondriale Enzyme der Cytochrom p450-Familie, CYP46 und CYP27, zu 24- und 27-Hydroxycholesterin hydroxyliert (BJÖRKHEM, 2002). Die Bildung eines weiteren in dieser Arbeit untersuchten Oxysterols, aus Cholesterin mit dem Namen 25-Hydroxycholesterin, wird durch das Enzym Cholesterin-25-Hydroxylase katalysiert, das nicht der Cytochrom p450-Familie, sondern einer kleineren Gruppe von eisenhaltigen Enzymen ohne Häm-Komponente angehört (LUND *et al.*, 1998). 24-, 25- und 27-

Hydroxycholesterin sind neben weiteren, in dieser Arbeit nicht untersuchten Oxysterolen mehr oder weniger starke Liganden der LXR-Transkriptionsfaktoren LXR $\alpha$ <sup>6</sup> und LXR $\beta$  (LUND *et al.*, 1998; BJÖRKHEM, 2002; ORY *et al.*, 2004). Die Transkriptionsfaktoren LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  bilden nach Bindung ihrer Liganden Heterodimere mit dem Kernrezeptor RXR<sup>7</sup>, der durch Bindung seines Liganden 9-*cis*-Retinsäure aktiviert wird. Das LXR/RXR-Heterodimer transloziert in den Zellkern und bindet an spezielle Bindungsstellen in den Promotoren von Zielgenen, um die Expression dieser Gene zu verstärken. Zu den Genen, deren Expression durch die Kernfaktoren LXR/RXR induziert wird, gehören vor allem Gene, die am Cholesterin-Export beteiligte Proteine kodieren. Dies sind beispielsweise die in dieser Arbeit untersuchten Proteine ABCA1 (COSTET *et al.*, 2000; SCHWARTZ *et al.*, 2000) und ABCG1 (LORKOWSKI *et al.*, 2001; KENNEDY *et al.*, 2001). Die Expression des Transkriptionsfaktors SREBP1c wird ebenfalls durch Oxysterole über die Kernfaktoren LXR und RXR aktiviert (SCHULTZ *et al.*, 2000; REPA *et al.*, 2000).

Darüber hinaus ist 25-Hydroxycholesterin von den drei in dieser Arbeit untersuchten Oxysterolen unter *in-vitro*-Bedingungen der potenteste Suppressor der Cholesterin-Biosynthese durch eine Inhibierung der Expression der HMG-CoA-Reduktase (GOLDSTEIN und BROWN, 1974; KANDUTSCH und CHEN, 1974; LEHMANN *et al.*, 1997; PEET *et al.*, 1998). Ebenso wie Cholesterin kann 25-Hydroxycholesterin auch die Spaltung von SREBP inhibieren. Im Vergleich zu Cholesterin ist 25-Hydroxycholesterin hierbei jedoch fünfmal potenter (ADAMS *et al.*, 2004). Ähnlich wie Cholesterin veranlasst 25-Hydroxycholesterin SCAP an INSIG zu binden. Allerdings bindet es weder direkt an SCAP, noch ist eine Konformationsänderung von SCAP zu beobachten, wie sie mit der Bindung von Cholesterin an SCAP einhergeht. Derzeit wird eine Beteiligung eines weiteren an das Endoplasmatischen Retikulum gebundenen Proteins vermutet, das jedoch noch nicht identifiziert worden ist (SUN *et al.*, 2005).

---

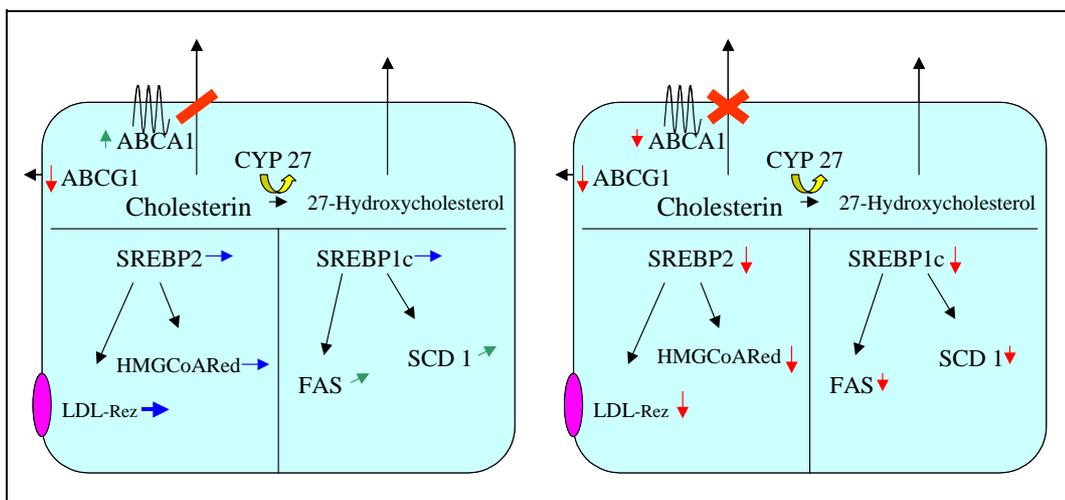
<sup>6</sup> Engl., *liver X receptor*

<sup>7</sup> Engl., *retinoid X receptor*

Der Regulationsmechanismus von SREBP1c ist sehr komplex und bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. In Fibroblasten wurde nach Beladung mit Cholesterin eine geringe, aber statistisch signifikante Reduktion der mRNA-Expression von SREBP1c beobachtet (Fu *et al.*, 2001). Dies deutet auf einen zusätzlichen Regulationsmechanismus hin, der unabhängig von der Regulation durch den LXR-Rezeptor ist. Des Weiteren wurde von AMEMIYA-KUDO *et al.* (2000) eine Autoregulation der mRNA-Expression von SREBP1c durch das aktive, gespaltene SREBP1c-Protein diskutiert.

#### 4. Die Regulation des zellulären Lipidstoffwechsels in Tangier-Zellen

Im Folgenden soll aus Gründen der besseren Übersicht zunächst nur auf die Ergebnisse der Analysen eingegangen werden, die mit in Serumhaltigem Medium kultivierten Fibroblasten angefertigt wurden. Diese Kulturbedingungen werden nachfolgend als basale Inkubationsbedingungen bezeichnet. Abb. 26 zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen Mechanismen, mit deren Hilfe die Tangier-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen die in meiner Arbeit untersuchten Gene regulieren. Diese Mechanismen sollen nachfolgend diskutiert werden.



**Abb. 26: Schematische Darstellung der Regulation der in dieser Arbeit untersuchten Gene in den Tangier-Zellen. Rechts: TD1-Zellen mit intaktem, aber**

inaktivem ABCA1-Protein. **Links:** TD2-Zellen mit unvollständigem, nicht membrangebundenem ABCA1-Protein) im Vergleich zu Kontrollfibroblasten. Rote Pfeile: Herabregulation. Grüne Pfeile: Hochregulation; Blaue Pfeile: keine Veränderung.

Die quantitative Analyse des intrazellulären Cholesterin-Gehaltes der in dieser Arbeit untersuchten Zellen mittels Gaschromatographie ergab erwartungsgemäß in den Zellen der Patienten mit Tangier-Krankheit einen höheren Gehalt an Gesamt-Cholesterin als in den Kontrollzellen, da diese Zellen aufgrund des ABCA1-Defektes nicht in der Lage sind, Cholesterin zu exportieren. Die TD2-Fibroblasten wiesen hierbei einen geringfügig höheren Gehalt an intrazellulärem Cholesterin im Vergleich zu den TD1-Zellen auf. Der Anteil des freien Cholesterins am Gesamt-Cholesterin war in allen Zellen vergleichbar. Dies deutet daraufhin, dass die Tangier-Zellen trotz des größeren Gehalts an Cholesterin prozentual nicht mehr Cholesterin in Form von z.B. Cholesterinestern speichern als die Zellen des Kontrollspenders. Dies ist ein Unterschied zu Befunden in anderen Zelltypen. So ist der Cholesterin-Gehalt in kultivierten, aus Monozyten des peripheren Blutes gewonnenen Makrophagen der beiden Tangier-Patienten nur unwesentlich höher als der Gehalt an Cholesterin in entsprechenden Kontrollzellen (LORKOWSKI *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den Fibroblasten speichern Makrophagen Cholesterin in Form von Cholesterinestern. Diese sind daher in den kultivierten Tangier-Makrophagen im Vergleich zu den Kontrollmakrophagen deutlich höher. Interessanterweise war der prozentuale Anstieg des Cholesterins in den untersuchten Zellen nach Cholesterin-Beladung sehr unterschiedlich. So stieg der Gehalt an Gesamt-Cholesterin in den TD1-Fibroblasten nach 30-stündiger Inkubation mit Cholesterin nur um 17 %, in den Kontrollzellen jedoch um 41 % und in den TD2-Zellen um 340 %. Die Ursache für den geringen Anstieg des Cholesterin-Gehalts in den Kontrollzellen beruht wahrscheinlich auf deren Fähigkeit, Cholesterin mit Hilfe der ABC-Transportproteine ABCA1 und ABCG1 zu exportieren. Es kommt vermutlich hinzu, dass die in Serum-haltigem Medium kultivierten Kontrollzellen deutlich mehr ABCG1 exprimieren als die entsprechend kultivierten Tangier-Fibroblasten: Kürzlich publizierte Arbeiten weisen

darauf hin, dass ABCG1 einen zusätzlichen und von ABCA1 möglicherweise unabhängigen Exportweg für überschüssiges Cholesterin darstellt (KENNEDY *et al.*, 2005). Unklar ist jedoch, warum es nur zu einer so geringen Akkumulation von Cholesterin nach Beladung in den TD1-Zellen kommt. Da diese Zellen ebenso wie die TD2-Fibroblasten nicht in der Lage sind, Cholesterin mit Hilfe von ABCA1 zu exportieren, war hier eine ebenso starke Akkumulation von Cholesterin wie in den TD2-Zellen zu erwarten. Die Beobachtung, dass die TD1-Zellen nach Inkubation mit freiem Cholesterin weniger Cholesterin speichern, steht im Einklang mit den bei den entsprechenden Patienten beobachteten Befunden. Der Patient TD1 hat trotz des ABCA1-Defektes nur eine sehr mild ausgeprägte Arteriosklerose, während der Patient TD2 massive arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße aufweist.

Mittels gaschromatographischer Analysen konnte in dieser Arbeit ferner gezeigt werden, dass wie erwartet der Anstieg des Gesamt-Cholesterins in der Zelle nach Beladung mit freiem Cholesterin mit einem Anstieg der gemessenen Oxysterole 24-, 25- und 27-Hydroxycholesterin einhergeht. Bemerkenswert ist jedoch, dass der Gehalt an 25- und 27-Hydroxycholesterin in den TD2-Zellen zehnfach höher war als in den Kontrollfibroblasten und den TD1-Zellen, obwohl der Gehalt an Cholesterin durch die Beladung mit freiem Cholesterin nur um den Faktor 4,5 anstieg. Die Gründe hierfür sind jedoch unbekannt.

Es konnte in dieser Arbeit ferner gezeigt werden, dass unter basalen Inkubationsbedingungen die Expression von SREBP1c in den TD1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht, in den TD2-Zellen allerdings signifikant erniedrigt war (vgl. Abb. 10). Da die TD2-Fibroblasten von allen untersuchten Zellen den höchsten Cholesterin-Gehalt aufwiesen und in der Literatur eine leichte Suppression der SREBP1c-Expression durch eine Beladung mit Cholesterin beschrieben wurde (vgl. Kap. 5.3), ist dies ein zu erwartender Befund. Nach der Cholesterin-Beladung zeigte sich bei den Kontrollzellen und bei den TD1-Zellen ebenfalls eine Tendenz zur Herunterregulation von SREBP1c. Bei den TD2-Zellen war dies jedoch nicht feststellbar. Es ist denkbar, dass aufgrund der niedrigen SREBP1c-

Expression in den TD2-Fibroblasten unter basalen Bedingungen eine weitere Supprimierung der SREBP1c-Expression durch die Cholesterin-Beladung nicht mehr induziert werden kann.

Die Expression von SREBP2 war wie in Abb. 12 dargestellt in den TD2-Zellen am niedrigsten. Dies ist plausibel, da diese Zellen den höchsten Gehalt an Cholesterin aufweisen, das wie oben bereits erwähnt die SREBP2-Expression hemmt (SATO *et al.*, 1996). Darüber hinaus wiesen die TD2-Fibroblasten den höchsten Gehalt an 25-Hydroxycholesterin auf, das ebenfalls inhibierend auf die Spaltung von SREBP2 wirkt (ADAMS *et al.*, 2004). Im Vergleich zu den Kontrollzellen hatte der höhere Cholesterin-Gehalt der TD1-Zellen jedoch keine Auswirkungen auf die Expression von SREBP2. Nach der Beladung mit Cholesterin konnte in Kontrollzellen und TD1-Fibroblasten die zu erwartende Herunterregulation der SREBP2-Expression induziert werden. Da sowohl die Kontrollzellen als auch die TD1-Fibroblasten im Vergleich zu den TD2-Zellen nur geringe Mengen von 25-Hydroxycholesterin bilden, wird die Reduktion der SREBP2-Expression in diesen Zellen möglicherweise größtenteils über die inhibierende Wirkung von Cholesterin auf die Spaltung von SREBP2 und weniger über die Wirkung von 25-Hydroxycholesterin vermittelt. Die Gründe hierfür sind jedoch nicht bekannt. Analog zu der Expression von SREBP1c war jedoch keine verminderte Expression von SREBP2 in den TD2-Zellen nach der Beladung mit Cholesterin zu beobachten. Möglicherweise ist hierfür ebenfalls die niedrigere basale Expression von SREBP2 in den TD2-Fibroblasten verantwortlich, so dass diese durch die Aufnahme von Cholesterin oder die Bildung von 25-Hydroxycholesterin während der Beladung nicht weiter vermindert werden kann.

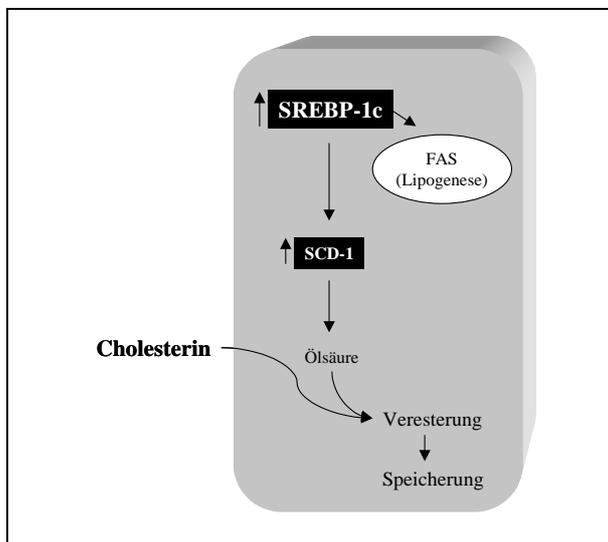
Die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene von SREBP1c und SREBP2 (FAS, SCD1, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor) unterliegt dem gleichen Regulationsmechanismus wie die Expression von SREBP2. Demnach ist eine reduzierte Expression dieser Gene die Folge einer inhibierten Spaltung der SREBP-Proteine durch Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin (HORTON, 2002). Die Ergebnisse der Expressionsanalysen der in dieser Arbeit untersuchten Gene sind anhand der aus der

Literatur bekannten Daten daher gut nachzuvollziehen (HORTON, 2002). In den TD2-Zellen, die den höchsten Gehalt an Cholesterin und 25-Hydroxycholesterin aufwiesen, ist die Expression der SREBP-Zielgene FAS, SCD1, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor am niedrigsten.

In den TD1-Zellen ist im Vergleich zu den Kontrollzellen keine reduzierte mRNA-Expression der SREBP-Zielgene zu erkennen. Im Gegenteil zu der zu erwartenden verminderten Expression zeigen die Zielgene von SREBP1c, FAS und SCD1, eine Tendenz zur Hochregulation. Eine Erklärung hierfür ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich. Nach der Cholesterin-Beladung hingegen zeigten alle Zellen parallel zu dem erhöhten Gehalt an Cholesterin- und 25-Hydroxycholesterin (vgl. Abb.en 17 und 21) eine Suppression der Expression der SREBP-Zielgene (siehe Abb.en 11 und 13). Eine Ausnahme bilden jedoch die Gene SCD1, FAS und der HMG-CoA-Reduktase in den TD2-Zellen, deren Expression sich trotz des erhöhten Cholesterin- und 25-Hydroxycholesterin-Gehaltes nicht weiter supprimieren ließ. Auch hier stellt sich die Frage, ob die Expression dieser Gene unter den basalen Bedingungen bereits so niedrig ist, dass eine weitere Herabregulation dieser Gene durch die Beladung mit Cholesterin nicht mehr möglich ist.

Die zu Beginn dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor SREBP1c und die von ihm regulierten Gene SCD1 und FAS in Tangier-Fibroblasten hochreguliert werden, um das vermehrt anfallende intrazelluläre Cholesterin als Cholesterinester in einer nicht-zytotoxischen Form speichern zu können, ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen. Die gaschromatographischen Analysen deuten darauf hin, dass Fibroblasten nicht vermehrt Cholesterinester bilden (vgl. Abb. 27). Die Analyse des Fettsäuregehalts mittels Gaschromatographie gibt ebenfalls keine Hinweise darauf, dass in Tangier-Fibroblasten verstärkt Fettsäuren produziert werden, die zur Cholesterin-Veresterung benötigt werden. Der in diesem Zusammenhang berechnete SCD-Index ist jedoch etwas kritisch zu betrachten, da der SCD-Index in der vorliegenden Arbeit nur für die Umsetzung von Stearinsäure zu Ölsäure gemessen werden konnte. Die Berechnung des SCD-Index für die Umsetzung von

Palmitinsäure zu Palmitölsäure war nicht möglich, da die Palmitölsäure nicht quantifiziert werden konnte. Daher sind Rückschlüsse auf die SCD1-Aktivität nur unter der Annahme gültig, dass die Umsetzung von Stearinsäure zu Ölsäure in gleichem Umfang erfolgt wie die Umsetzung von Palmitinsäure zu Palmitölsäure. Dies wäre ein Ansatz für weiterführende Versuche. Für eine Messung der Cholesterin-Veresterungsrate wäre eine Beladung der Zellen mit radioaktiv-markierter Ölsäure und einer anschließenden Quantifizierung des gebildeten Cholesterinoleats mittels Dünnschichtchromatographie sinnvoll.



**Abb. 27: Schematische Darstellung der bisher experimentell nicht belegten Hypothese, dass aufgrund des erhöhten Cholesterin-Gehaltes der SREBP1c-Stoffwechselweg hochreguliert ist (REPA et al., 2000).**

Die Vermutung, dass die Zellen der Tangier-Patienten durch eine reduzierte Expression der HMG-CoA-Reduktase und einer damit verbundenen Drosselung der Cholesterin-Biosynthese versuchen, einer Cholesterin-Überladung entgegenzuwirken, konnte unter basalen Bedingungen nur im Falle der TD2-Zellen bestätigt werden. Dennoch ergab die Analyse der endogenen Cholesterin-Biosynthese mittels der Umsetzung von radioaktiven  $^3\text{H}$ -Acetat zu Tritium-markiertem Cholesterin, dass trotz der gleichen Expression der HMG-CoA-Reduktase in TD1-Fibroblasten und entsprechenden Kontrollzellen die endogene Cholesterin-Biosynthese um 27 Prozent reduziert war. In den TD2-Zellen war die endogene Cholesterin-Biosynthese -wie aufgrund der verminderten Expression der HMG-CoA-Reduktase erwartet- am

niedrigsten und im Vergleich zu den Kontrollzellen um 58 Prozent reduziert. Die Ursache für die verminderte Cholesterin-Biosynthese in den TD1-Fibroblasten ist unbekannt. Es ist jedoch möglich, dass die Cholesterin-Biosynthese in den TD1-Zellen auf andere Weise reguliert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass Zellen die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase kurzzeitig auch durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung regulieren können (BEG *et al.*, 1987; GIBSON, 1985; Michal, 1999), während eine Langzeit-Regulation der Cholesterin-Biosynthese durch Veränderungen der Transkriptions- und/oder Translationsrate erfolgen (Michal, 1999). Von Michal wurde weiterhin beschrieben, dass 25-Hydroxycholesterin sowohl die Transkription der HMG-CoA-Reduktase hemmt als auch den Abbau des HMG-CoA-Reduktase-Proteins beschleunigt. Interessanterweise ist in den TD2-Zellen nicht nur die Cholesterin-Biosyntheserate am stärksten erniedrigt, sondern auch der Gehalt an 25-Hydroxycholesterin am höchsten. Darüber hinaus kann die Synthese von Cholesterin auch auf der Ebene anderer, an der Cholesterin-Synthese beteiligten Enzyme reguliert werden (Michal, 1999). Es ist also durchaus möglich, dass (a) eine Regulation der Transkription der HMG-CoA-Reduktase in geringem Maße durch das aufgenommene Cholesterin und das gebildete 25-Hydroxycholesterin in den TD1-Zellen hervorgerufen wird und diese Änderung jedoch zu gering ist, um sie mit Hilfe der Echtzeit-RT-PCR messen zu können und (b) die Regulation der HMG-CoA-Reduktase-Aktivität nicht transkriptional erfolgt. Weiterführende Analysen der Menge an HMG-CoA-Reduktase-Protein in den Zellen mittels Western-Blot könnten helfen, diese Frage zu klären.

Die Expression von CYP27 war trotz der sehr unterschiedlichen Gehalte an 27-Hydroxycholesterin in den verschiedenen Zellen, konstant. Eine reduzierte Expression von CYP27 war nur bei den Kontrollzellen unter Cholesterin-Beladung zu sehen (vgl. Abb. 15). Die Hypothese, dass Fibroblasten von Tangier-Patienten über eine Hochregulierung der Expression von CYP27 und einer damit einhergehenden vermehrten Bildung von wasserlöslichem 27-Hydroxycholesterin einen alternativen Stoffwechselweg für den Export von Cholesterin haben, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Bemerkenswerterweise wird in

Makrophagen die Expression von CYP27 durch eine Beladung mit Cholesterin (in Form einer Inkubation mit LDL) induziert (Llaverias *et al.*, 2005). Der Mechanismus der Regulation der CYP27-Expression in Makrophagen ist jedoch nicht näher charakterisiert.

Die Expression von ABCG1 war in den Tangier-Fibroblasten signifikant reduziert (Abb. 14). Dies ist insofern nicht zu erklären, da der erhöhte Cholesterin- und Oxysterol-Gehalt in diesen Zellen und die deshalb zu erwartende Aktivierung des LXR/RXR-Regulationswegs eigentlich eine Hochregulation der ABCG1-Expression bewirken sollten, wie dies für Makrophagen beschrieben worden ist (LORKOWSKI *et al.*, 2001). Die zu erwartende verstärkte Expression von ABCG1 nach Cholesterin-Beladung ist hingegen in den Fibroblasten von allen drei Spendern zu sehen (vgl. Abb. 15). Es ist derzeit nicht bekannt, wie der molekulare Defekt im ABCA1-Gen in den Zellen der Tangier-Patienten die Expression von ABCG1 beeinflussen könnte. Die Vermutung, dass durch eine verstärkte Expression von ABCG1 der durch das ABCG1-Protein vermittelte Cholesterin-Efflux forciert wird und der ABCA1-Defekt auf diese Weise von der Zelle kompensiert wird, konnte zumindest nicht auf der Ebene der Transkription bestätigt werden.

Die Expression von ABCA1 ist in den TD1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zirka zweifach hochreguliert, in den TD2-Zellen hingegen auf etwa die Hälfte erniedrigt (vgl. Abb. 14). Anhand der zahlreichen Befunde aus der Literatur wäre eine Hochregulation der ABCA1-Expression aufgrund des höheren Gehalts an 25-Hydroxycholesterin in den Tangier-Zellen zu erwarten. Es ist unklar, warum in den TD2-Zellen ein gegenteiliger Effekt zu beobachten war, obwohl diese Zellen den höchsten Gehalt an 25-Hydroxycholesterin aufwiesen (vgl. Abb. 21). Es wurde in unserer Gruppe ferner diskutiert, ob das vollständige, aber durch die Mutation eigentlich inaktive ABCA1-Protein des Patienten TD1 eine funktionelle Restaktivität besitzt. In diesem Falle könnte dies den Sinn der kompensatorischen Hochregulation der ABCA1-mRNA in den TD1-Fibroblasten erklären. Die niedrige Expression von ABCA1 in den TD2-Zellen könnte auf den molekularen Defekt zurückzuführen sein. Für diese

Überlegungen existieren jedoch keine durch Experimente begründeten Daten. Eine Steigerung der ABCA1-Expression nach Cholesterin-Beladung war nur in den TD1-Zellen zu sehen. Dieser Expressionsanstieg von ABCA1 wäre jedoch in allen untersuchten Zellen zu erwarten gewesen. Eine Erklärung für den fehlenden Anstieg der Expression in den Kontrollzellen und den TD2-Fibroblasten nach der Beladung mit Cholesterin gibt es derzeit nicht. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass die TD2-Zellen trotz der erniedrigten ABCA1-Expression nach der Beladung mit Cholesterin dennoch den höchsten Gehalt des LXR-Liganden 25-Hydroxycholesterin aufweisen.

Im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit ist die Frage aufgekommen, inwieweit Unterschiede in den zellulären Regulationsmechanismen bei den Tangier-Fibroblasten Hinweise für eine Erklärung der unterschiedlichen Phänotyp-Ausprägungen der Tangier-Patienten geben könnten. Die Beobachtung, dass die TD1-Zellen nach Inkubation mit freiem Cholesterin weniger Cholesterin speichern, steht im Einklang mit den bei den entsprechenden Patienten beobachteten Befunden. Der Patient TD1 hat einen klinisch milden Phänotyp, während Patient TD2 an schwerer Arteriosklerose leidet. Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Befunde können die Ursachen für diesen Unterschied jedoch nicht erklären.

## 5. Die Auswirkungen des Serum-Entzugs

Wie in Kapitel 5.1 bereits ausgeführt wurde, sind vermutlich die Aktivität der Fettsäure-Biosynthese, die Aktivität der Cholesterin-Biosynthese und insbesondere die Effizienz des Cholesterin-Effluxes vom Zellzyklus und vom Status der Zellteilung abhängig (FIELDING *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden sich teilende Zellen mit wachstumsarretierten Zellen verglichen. Zellen, die sich nicht mehr teilen, benötigen kein Cholesterin für die Synthese der Zellmembran. Um die Zelle vor Überladung durch nicht genutztes Cholesterin zu schützen, müssen kompensatorische Regulationsmechanismen greifen. Ob die in meiner

Arbeit untersuchten Gene in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, sollte mittels Expressionsanalysen untersucht werden. Des Weiteren sollte mittels Gaschromatographie untersucht werden, ob die durch Serum-Entzug wachstumsarretierten Zellen im Vergleich zu den sich teilenden in Serum kultivierten Kontrollzellen einen erhöhten Gehalt an Cholesterin, Fettsäuren und Oxysterolen aufweisen.

In Zellkulturmodellen kann ein Wachstumsarrest beispielsweise durch zwei verschiedene Kultivierungsbedingungen induziert werden. Die eine Möglichkeit verursacht einen Wachstumsarrest durch Kontaktinhibition. Dieses Verfahren wurde erstmals 1970 von ABERCROMBIE beschrieben. Die andere Möglichkeit ist der Entzug von Serum während der Kultivierung. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. In der Literatur ist jüngst beschrieben worden, dass der Weg in den Wachstumsarrest hierbei über unterschiedliche molekulare Mechanismen verlaufen kann (Gos *et al.*, 2005). Dies soll an dieser Stelle der Diskussion allerdings nicht weiter berücksichtigt werden, da diese Frage nach den molekularen Ursachen des Wachstumsarrests nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Die Analyse der Genexpression der an der Fettsäure-Biosynthese beteiligten Gene SREBP1c, FAS und SCD1 zeigte in den wachstumsarretierten Zellen eine Tendenz zur Hochregulation in allen drei untersuchten Zelllinien (siehe Abb. 11). Diese Daten sind aber aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht sehr aussagekräftig. Die gaschromatographischen Analysen ergaben keine Unterschiede im Gehalt an den detektierbaren Fettsäuren zwischen den proliferierenden und wachstumsgehemmten Zellen (vgl. Abb. 19). Den vorliegenden Daten können keine Hinweise darauf entnommen werden, dass die Regulation der an der Fettsäure-Biosynthese beteiligten Gene SREBP1c, FAS und SCD1 einen hohen Stellenwert für den Wachstumsarrest der untersuchten Fibroblasten besitzt.

Die Expression von SREBP2, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor war in den unter Serum-Entzug kultivierten Zellen ebenfalls tendenziell erhöht (vgl. Abb. 13). Auch für diese Analysen ergab sich, dass die

Versuche schlecht reproduzierbar und die Standardabweichungen entsprechend hoch waren. Die augenscheinlich fehlende Suppression der Expression von SREBP2, HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor lässt dennoch den Schluss zu, dass die Zellen der erhöhten Cholesterin-Belastung wahrscheinlich nicht durch eine Suppression der Expression der an der Cholesterin-Biosynthese bzw. Cholesterin-Aufnahme beteiligten Gene entgegenwirken. Im Gegensatz dazu war jedoch die Expression der ATP-Bindungskassettentransporter ABCA1 und ABCG1 deutlich erhöht (Abb. 15). Dieser Anstieg der Expression der beiden ABC-Transporter weist auf einen kompensatorischen Mechanismus hin, da der Cholesterin-Export durch eine gesteigerte Expression dieser beiden Proteine induziert wird (LAWN *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004). Diese Beobachtung stimmt gut mit dem in der Literatur beschriebenen Befund überein, dass der Wachstumsarrest von Makrophagen mit einem gesteigerten Cholesterin-Efflux einhergeht, der das überschüssige Cholesterin aus der Zelle entfernt. Unklar ist hingegen, warum der Anstieg der Expression von ABCA1 deutlich niedriger ist als der von ABCG1. Eine Erklärung liefern aktuelle Arbeiten von KENNEDY *et al.* (2005), die darauf hindeuten, dass möglicherweise vornehmlich ABCG1 für den Export von überschüssigem Cholesterin zuständig ist.

Ein besonders ausgeprägter Anstieg der Expression von ABCG1 wurde nach Serum-Entzug in den Kontrollzellen beobachtet (Abb. 15). Dieser Anstieg der ABCG1-Expression konnte noch zusätzlich induziert werden, wenn die Zellen im wachstumsarretierten Zustand mit Cholesterin beladen wurden. Ein schwächerer, aber deutlich ausgeprägter Expressionsanstieg von ABCG1 wurde auch in den TD1-Zellen (7,5-fach) und in den TD2-Zellen (3,5-fach) beobachtet (vgl. Abb. 15). Dass zumindest in den Kontrollzellen der auf dem Cholesterin-Export basierende Kompensationsmechanismus funktioniert, wird durch die gaschromatographischen Analysen des Gehaltes an Gesamt-Cholesterin und freiem Cholesterin in diesen Zellen verdeutlicht. In den Kontrollzellen gab es keinen Unterschied im Gehalt an Gesamt-Cholesterin bzw. freiem Cholesterin in den proliferierenden Zellen im Vergleich zu den wachstumsgehemmten Zellen. In den TD1-Zellen hingegen ist der

Cholesterin-Gehalt um 35 %, in den TD2-Zellen um 42 % in den wachstumsgehemmten Zellen erhöht. Die Ursache hierfür ist vermutlich die niedrige basale Expression von ABCG1 in den Tangier-Zellen, so dass dieser Exportweg nicht zur Kompensation des defekten ABCA1-Transporters zur Verfügung steht.

Der Gehalt an Oxysterolen ist in wachstumsarretierten Kontrollzellen im Vergleich zu den proliferierenden Zellen unverändert (Abb. 21). Dies ist aufgrund des gleichen Cholesterin-Gehalts der unter den beiden verschiedenen Bedingungen kultivierten Zellen zu erwarten. In den Tangier-Zellen hingegen zeigt sich ein etwas komplexeres Bild. 24- und 25-Hydroxycholesterin sind in den TD1-Zellen unter beiden Kulturbedingungen kaum bis gar nicht detektierbar (Abb. 21). In TD2-Zellen ist 24-Hydroxycholesterin ebenfalls nicht nachzuweisen, während 25-Hydroxycholesterin in den wachstumsarretierten Zellen leicht erhöht ist. Der Gehalt an 27-Hydroxycholesterin ist in beiden Tangier-Zelllinien nach Serum-Entzug deutlich erhöht. Die Ursache hierfür ist sicherlich der deutlich erhöhte Cholesterin-Gehalt der Tangier-Zellen unter Serum-Entzug im Vergleich zu den in serumhaltigem Medium kultivierten Zellen. Unklar ist jedoch warum vornehmlich 27-Hydroxycholesterin gebildet wird. Die Expression von CYP27 zeigt nur in den Kontrollzellen und den TD1-Zellen eine leichte Tendenz zur Hochregulation, während sie in den TD2-Zellen konstant bleibt.

Die vorliegenden Ergebnisse geben trotz der hohen Standardabweichungen bei einigen Messungen der Genexpression Hinweise darauf, dass vermutlich ABCG1 eine zentrale Rolle als Regulator des Cholesterin-Gehalts in Fibroblasten spielt und kompensatorisch den Cholesterin-Export während des Wachstumstums dieser Zellen steuert.

Weitere Untersuchungen des ABCG1-vermittelten Cholesterin-Effluxes, sowie ergänzende Expressionsanalysen weiterer am Cholesterin-Haushalt beteiligter Gene mittels Echtzeit-RT-PCR und Western-Blot (kombiniert mit Inkubationen der Zellen mit den verschiedenen Oxysterolen oder einer Synchronisierung der Zellen durch inhibierend in den Zellzyklus

eingreifende Substanzen) sollen helfen, die Bedeutung von ABCG1 als Regulator der zellulären Cholesterin-Homöostase weiter aufzuklären.



## VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die zelluläre Cholesterin-Homöostase in menschlichen Zellen von Patienten mit der seltenen Tangier-Erbkrankheit (TD) untersucht. Diese Patienten besitzen verschiedene Mutationen im ABCA1-Gen, welches eine zentrale Rolle im Cholesterin-Export spielt, und haben aufgrund des niedrigen bzw. fehlenden HDL im Plasma ein erhöhtes Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen auszuprägen. Es ist jedoch unklar, wieso es trotz der relativ einheitlichen HDL-Defizienz zu völlig unterschiedlichen Identitätsmustern der Arteriosklerose kommt.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, Auswirkungen des Funktionsverlustes von ABCA1 auf die Regulation der zellulären Cholesterin-Homöostase zu untersuchen. Dazu wurden Telomerase-immortalisierte Fibroblasten zweier Tangier-Patienten mit verschiedenen ABCA1-Mutationen und unterschiedlich ausgeprägter klinischer Manifestation der Arteriosklerose (TD1 und TD2) mit Fibroblasten eines gesunden Spenders verglichen.

Der Cholesterin-Gehalt in TD-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen war 1,4 bzw. 1,5-fach erhöht. Diese zelluläre Cholesterin-Akkumulation führte zur verminderten Expression der an der Cholesterin-Synthese und -Aufnahme beteiligten Gene, HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors. Daher war die endogene Cholesterin-Biosynthese im Vergleich zur Kontrolle um 27 % (TD1) bzw. 58 % (TD2) reduziert.

Die Anreicherung von Cholesterin in den TD-Fibroblasten ging mit der verminderten Expression der Gene einher, die an der Regulation der Cholesterin-Homöostase bzw. dem Cholesterin-Export (ABCA1, ABCG1 und SREBP1c) beteiligt sind. Diese Störung war auch an einem entsprechend gegenläufigen Gehalt an Oxysterolen erkennbar (ein geringer Cholesterin-Export bewirkte einen höheren Oxysterol-Spiegel). Diese Untersuchungsergebnisse deckten jedoch gleichzeitig die Tatsache auf, dass keine strikte Korrelation zwischen einer verminderten Expression des defekten Cholesterin-Export-Gens (ABCA1) und der intrazellulären Cholesterin-Akkumulation existiert. Da die Expression von ABCA1, ABCG1 und SREBP1c laut den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen durch den Transkriptionsfaktor LXR reguliert wird, muß es – auf der Basis

der hier vorgelegten Ergebnisse – LXR-unabhängige, aber wichtige Regulationsmechanismen des Cholesterin-Stoffwechsels geben. Die komplexe und unerwartete Regulation der LXR-Zielgene könnte erklären, warum Patient TD2 eine schwere Arteriosklerose aufweist, während Patient TD1 keinen klinischen Befund hat. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um diese unbekanntes und von Oxysterolen unabhängigen Regulationsmechanismen aufzuklären.

## Summary

### **Analysis of Cellular Cholesterol Homeostasis in Telomerase-Immortalized Tangier Fibroblasts**

In this study, the cellular cholesterol homeostasis in human fibroblasts derived from patients with the rare human inherited disorder Tangier Disease (TD) was analyzed. The patients had different mutations in the ABCA1 gene, which is critical for cholesterol export from cells. Due to the low HDL plasma levels TD patients have a higher prevalence of cardiovascular disease. However, it is unknown why Tangier patients have different clinical phenotypes of arteriosclerosis.

The aim of the present study was to characterize the consequences of ABCA1 loss of function on the regulation of cellular cholesterol homeostasis. For this purpose telomerase-immortalized cells derived from two Tangier patients with different ABCA1 mutations and different clinical phenotypes and cells derived from a healthy donor were used.

The cellular cholesterol content in TD cells was 1.4 or 1.5-fold higher compared to controls. This intracellular cholesterol accumulation led to a decreased expression of genes involved in cholesterol synthesis and uptake, namely HMG-CoA reductase and LDL receptor. Hence cholesterol synthesis was reduced to 27% in TD1 and 58% in TD2 fibroblasts compared to controls.

The decrease of cholesterol accumulation in TD fibroblasts correlates with a reduced expression of genes involved in cholesterol homeostasis and export (ABCA1, ABCG1, SREBP1c). This disorder was also recognizable in an analogical decrease of the oxysterol content (a reduced cholesterol export caused a high oxysterol level). These results revealed the fact that there is no strict correlation between the decreased expression of the defective cholesterol export gene (ABCA1) and an intracellular cholesterol accumulation. According to the findings of others the expression of ABCA1, ABCG1 and SREBP1c is controlled by the transcription factor LXR. Thus, based on the results presented in this study, other LXR-

independent, but also important mechanisms for regulating the cholesterol pathway must exist.

However, the complex and unexpected kind of regulation of LXR-dependent target genes may also explain why patient TD2 has severe atherosclerosis in contrast to patient TD1 showing a mild phenotype. Further studies are required to elucidate the yet unknown mechanisms of regulation of LXR target genes that may be independent of the cellular oxysterol content.

## VII. Literaturverzeichnis

- [1] ABERCROMBIE, M. Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* **1970**; *6(2)*:128-142.
- [2] ADAMS, C.M., REITZ, J., DE BRABANDER, J.K., FERAMISCO, J.D., LI, L., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and Insigs. *J Biol Chem* **2004**; *279(50)*:52772-52780.
- [3] AKKERMAN, J.W.N., NIEUWENHUIS, H.K., SIXMA, J.J. *In: Thrombose und Arteriosklerose*. AKKERMAN, J.W.N., NIEUWENHUIS, H.K., SIXMA, J.J., Hrsg. Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss **1987**.
- [4] ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim **2004**.
- [5] AMEMIYA-KUDO, M., SHIMANO, H., YOSHIKAWA, T., YAHAGI, N., HASTY, A.H., OKAZAKI, H., TAMURA, Y., SHIONOIRI, F., IZUKA, Y., OHASHI, K., OSUGA, J., HARADA, K., GOTODA, T., SATO, R., KIMURA, S., ISHIBASHI, S., YAMADA, N. Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem* **2000**; *275(40)*:31078-31085.
- [6] ASSMANN, G. *Lipid metabolism and atherosclerosis*. Schattauer-Verlag, Stuttgart **1982**.
- [7] ASSMANN, G., CULLEN, P. Erkennung und Behandlung von Fettstoffwechselstörungen. Beilage zum *Deutschen Ärzteblatt* *51/52* **1995**.
- [8] ASSMANN, G., CULLEN, P., SCHULTE, H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation* **2002**; *105(3)*:310-315.
- [9] ASSMANN, G., VON ECKARDSTEIN, A., BREWER, H.B., JR. Familial high density lipoprotein deficiency: Tangier Disease. *In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. SCRIVER, C.R., BEAUDET,

- A.L., SLY, W.S., VALLE, D., Hrsg. 8. Auflage, pp. 2937-2960, McGraw-Hill, New York **2001**.
- [10] ASSMANN, G., NOFER, J.R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* **2003**; *54*:321-341.
- [11] 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 HDL<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **1994**; *269*(15):11572-11577.
- [12] BEG, Z.H., STONIK, J.A., BREWER, H.B., JR. Modulation of the enzymic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by multiple kinase systems involving reversible phosphorylation: a review. *Metabolism* **1987**; *36*(9):900-917.
- [13] BEISIEGEL, U., PATSCH, J.R. Chylomikronämie *In*: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. SCHWANDT, P., RICHTER, W.O., Hrsg. Schattauer-Verlag, Stuttgart **1995**.
- [14] BJORKHEM, I., ANDERSSON, O., DICZFALUSY, U., SEVASTIK, B., XIU, R.J., 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 USA* **1994**; *91*(18):8592-8596.
- [15] BJORKHEM, I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest* **2002**; *110*(6):725-730.
- [16] BJORKHEM, I., DICZFALUSY, U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2002**; *22*(5):734-742.
- [17] BODZIOCH, M., ORSO, E., KLUCKEN, J., LANGMANN, T., BOTTCHE, A., DIEDERICH, W., DROBNIK, W., BARLAGE, S., BUCHLER, C., PORSCH-OZCUREMEZ, M., KAMINSKI, W.E., HAHMANN, H.W., OETTE, K., ROTHE, G., ASLANIDIS, C., LACKNER, K.J., SCHMITZ, G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* **1999**, *22*(4):347-351.
- [18] BORTNICK, A.E., ROTHBLAT, G.H., STOUT, G., HOPPE, K.L., ROYER, L. J., MCNEISH, J., FRANCONI, O.L. The correlation of ATP-binding

- cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* **2000**; 275(37):28634-28640.
- [19] BROWN, M.S., KOVANEN, P.T., GOLDSTEIN, J.L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* **1981**; 212(4495):628-635.
- [20] CALI, J.J., HSIEH, C.L., FRANCKE, U., RUSSEL, D.W. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem* **1991**; 266(12):7779-7783.
- [21] CHAKRABARTI, R., SCHUTT, C.E. The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. *Nucleic Acids Res* **2001**; 29(11):2377-2381.
- [22] COSTET, P., LUO, Y., WANG, N., TALL, A.R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* **2000**; 275(36):28240-28245.
- [23] CULLEN, P., VON ECKARDSTEIN, A., ASSMANN, G. Diagnosis and management of new cardiovascular risk factors. *Eur Heart J* **1998**; 19(Supplement 0):O13-O19.
- [24] CULLEN, P., BAETTA, R., BELLOSTA, S., BERNINI, F., CHINETTI, G., CIGNARELLA, A., VON ECKARDSTEIN, A., EXLEY, A., GODDARD, M., HOFKER, M., HURT-CAMEJO, E., KANTERS, E., KOVANEN, P., LORKOWSKI, S., MCPHEAT, W., PENTIKAINEN, M., RAUTERBERG, J., RITCHIE, A., STAELS, B., WEITKAMP, B., DE WINTHER, M.; MAFAPS CONSORTIUM. Rupture of the atherosclerotic plaque: does a good animal model exist? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; 23(4):535-542.
- [25] DANIELSEN, E.M., HANSEN, G.H., POULSEN, M.D. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* **1993**; 120(6):1347-1356.
- [26] DAVIES, M.J., WOOLF, N. *In: Atheroma. Atherosclerosis in ischaemic heart disease: the mechanisms.* Wong, S., Hrsg. Science Press Limited, London **1990**.

- [27] DIETSCHY, J.M., TURLEY, S.D., SPADY, D.K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* **1993**; *34(10)*:1637-1659.
- [28] DULBECCO, R., FREEMAN, G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* **1959**; *8(3)*:396-397.
- [29] EDWARDS, P.A., TABOR, D., KAST, H.R., VENKATESWARAN, A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* **2000**; *1529(1-3)*:103-113.
- [30] FALK, E. Why do plaques rupture? *Circulation* **1992**; *86(6 Supplement)*:III30-III42.
- [31] FIELDING, C.J., BIST, A., FIELDING, P.E. Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry* **1999**; *38(8)*:2506-2513.
- [32] FU, X., MENKE, J.G., CHEN, Y., ZHOU, G., MACNAUL, K.L., WRIGHT, S.D., SPARROW, C.P., LUND, E.G. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* **2001**; *276(42)*:38378-38387.
- [33] GIBSON, D.M. Regulation of HMG-CoA-reductase. *Academic Press, New York* **1985**.
- [34] GLASS, C.K., WITZTUM, J.L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* **2001**; *104(4)*:503-516.
- [35] GODSLAND, I.F., WYNN, V., CROOK, D., MILLER, N.E. Sex, plasma lipoproteins, and atherosclerosis – Prevailing assumptions and outstanding questions. *Am Heart J* **1987**; *114(6)*:1467-1503.
- [36] GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., ANDERSON, R.G.W., RUSSEL, D.W., SCHNEIDER, W.J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1985**; *1*:1-39.
- [37] GOLDSTEIN, J.L., RAWSON, R.B., BROWN, M.S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding

- protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch Biochem Biophys* **2002**; 397(2):139-148.
- [38] GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **1997**; 89(3):331-340.
- [39] GORDON, D.J., RIFKIND, B.M. High-density lipoprotein - the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* **1989**; 321(19):1311-1316.
- [40] GOS, M., MILOSZEWSKA, J., SWOBODA, P., TREMBACZ, H., SKIERSKI, J., JANIK, P. Cellular quiescence induced by contact inhibition or serum withdrawal in C3H10T1/2 cells. *Cell Prolif* **2005**; 38(2):107-116.
- [41] HAVEL, R.J., EDER, A., BRAGDON, J.H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **1955**, 34(9):1345-1353.
- [42] HAYFLICK, L., MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **1961**; 25:585-621.
- [43] HAYFLICK, L. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **1965**; 37:614-636.
- [44] HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **1996**; 6(10):986-994.
- [45] HENNERICI, M.G. The unstable plaque. *Cerebrovasc Dis* **2004**; 17 Supplement 3:17-22.
- [46] HERSBERGER, M., VON ECKARDSTEIN, A. Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs* **2003**; 63(18):1907-1945.
- [47] HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **1992**; 8:67-113.
- [48] HIGUCHI, R. Principles and Applications for DNA Amplification. *In: PCR-Technology*. EHRlich, H.A., Hrsg. Stockton Press, New York **1989**.
- [49] HORTON, J.D. Sterol regulatory element-binding proteins:

- transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans* **2002**; *30(Part 6)*:1091-1095.
- [50] JACKSON, S.M., ERICSSON, J., EDWARDS, P.A. Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Subcell Biochem* **1997**; *28*:1-21.
- [51] KANG, K., MIYAZAKI, M., NTAMBI, J.M., PARIZA, M.W. Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* **2004**; *315(3)*:532-537.
- [52] KEIL, U., SPELSBERG, A. Epidemiologie der Atheroskleroserisiken. In: Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. SCHWANDT, P., RICHTER, W.O., Hrsg. Schattauer-Verlag, Stuttgart **1995**.
- [53] KENNEDY, M.A., VENKATESWARAN, A., TARR, P.T., XENARIOS, I., KUDOH, J., SHIMIZU, N., EDWARDS, P.A. Characterization of the human ABCG1 gene. *J Biol Chem* **2001**; *276(42)*:39438-39447.
- [54] KENNEDY, M.A., BARRERA, G.C., NAKAMURA, K., BALDAN, A., TARR, P., FISHBEIN, M.C., FRANK, J., FRANCONI, O.L., EDWARDS, P.A. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* **2005**; *1(2)*:121-131.
- [55] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**; *227(259)*:680-685.
- [56] LIANG, H.Q., RYE, K.A., BARTER, P.J. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J Lipid Res* **1994**; *35(7)*:1187-1199.
- [57] LIVAK, K.J., FLOOD, S.J., MARMARO, J., GIUSTI, W., DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **1995**; *4(6)*:357-362.
- [58] LLAVERIAS, G., LACASA, D., VAZQUEZ-CARRERA, M., SANCHEZ, R.M., LAGUNA, J.C., ALEGRET, M. Cholesterol regulation of genes involved in sterol trafficking in human THP-1 macrophages. *Mol Cell*

- Biochem* **2005**; 273(1-2):185-191.
- [59] LOBSTEIN, J.F. Lehrbuch der Pathologischen Anatomie. Brodhagsche Buchhandlung, Stuttgart **1835**.
- [60] LORKOWSKI, S., RUST, S., ENGEL, T., JUNG, E., TEGELKAMP, K., GALINSKI, E.A., ASSMANN, G., CULLEN, P. Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**; 280(1):121-131.
- [61] LORKOWSKI, S., KRATZ, M., WENNER, C., SCHMIDT, R., WEITKAMP, B., FÖBKER, M., REINHARDT, J., RAUTERBERG, J., GALINSKI, E.A., CULLEN, P. Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**; 283(4):821-830.
- [62] LORKOWSKI, S., CULLEN, P. Analyzing Gene Expression. Wiley-VCH, Weinheim **2001**.
- [63] LORKOWSKI, S., CULLEN, P. Genetics and molecular biology: apolipoprotein E - from plasma lipids to plaque stability. *Curr Opin Lipidol* **2002**; 13(6):689-692.
- [64] LOTTSPREICH, F., ZORBAS, H. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1998**.
- [65] LUND, E.G., KERR, T.A., SAKAI, J., LI, W.P., RUSSELL, D.W. 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(51):34316-34327.
- [66] LUNN, G., SANSONE, E.B. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. *Anal Biochem* **1987**; 162(2): 453-458.
- [67] MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York **1989**.
- [68] MEIR, K., KITSBERG, D., ALKALAY, I., SZAFER, F., ROSEN, H., SHPITZEN, S., AVI, L.B., STAELS, B., FIEVET, C., MEINER, V., BJORKHEM, I., LEITERSDORF, E. Human sterol 27-hydroxylase (CYP27)

- overexpressor transgenic mouse model. Evidence against 27-hydroxycholesterol as a critical regulator of cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* **2002**; 277(37):34036-34041.
- [69] MICHAL, G. Biochemical Pathways. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1999*.
- [70] MULLIS, K., FALOOMA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HOM, G., ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **1986**; 51 Part 1:263-273.
- [71] MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, H.K., SCHÄFER-KORTING, M. Lipidstoffwechselstörungen. *In: Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* MUTSCHLER, E., GEISLINGER, G., KROEMER, H.K., SCHÄFER-KORTING, M., Hrsg. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2001**.
- [72] NOFER, J.R., KEHREL, B., FÖBKER, M., LEVKAU, B., ASSMANN, G., VON ECKARDSTEIN, A. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **2002**; 161(1):1-16.
- [73] OGDEN, R.C., ADAMS, D.A. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol* **1987**; 152:61-87.
- [74] ORSO, E., BROCCARDO, C., KAMINSKI, W.E., BOTTCHER, A., LIEBISCH, G., DROBNIK, W., GOTZ, A., CHAMBENOIT, O., DIEDERICH, W., LANGMANN, T., SPRUSS, T., LUCIANI, M.F., ROTHE, G., LACKNER, K.J., 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(2):192-196.
- [75] ORY, D.S. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: Have the orphans found a home? *Circ Res* **2004**; 95(7):660-670.
- [76] PARHAMI, F., BASSERI, B., HWANG, J., TINTUT, Y., DEMER, L. L. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. *Circ Res* **2002**; 91(7):570-576.
- [77] PARTHASARATHY, S., BARNETT, J., FONG, L.G. High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim*

- Biophys Act* **1990**; 1044(2):275-283.
- [78] PAULWEBER, B. Schutzfaktor HDL-Cholesterin und kardiovaskuläres Risiko. *Journal der Kardiologie* **2004**;11:7-8.
- [79] PHELAN, M.C. Techniques for mammalian cell tissue culture. *In: Current Protocols in Molecular Biology*. AUSUBEL, F.A., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., Hrsg. pp. A.3F.1-A.3F.14. JOHN WILEY & SONS, New York **1996**.
- [80] PSCHYREMBEL, W. Klinisches Wörterbuch. DE GRUYTER, Berlin **1998**.
- [81] RADHAKRISHNAN, A., SUN, L.P., KWON, H.J., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell* **2004**; 15(2):259-268.
- [82] REPA, J.J., LIANG, G., OU, J., BASHMAKOV, Y., LOBACCARO, J.M., SHIMOMURA, I., SHAN, B., BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L., MANGELSDORF, D.J. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev* **2000**; 14(22):2819-2830.
- [83] ROGLER, G., TRUMBACH, B., KLIMA, B., LACKNER, K.J., SCHMITZ, G. HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1995**; 15(5):683-690.
- [84] ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **1993**; 362(6423):801-809.
- [85] ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **1995**; 57:791-804.
- [86] ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* **1999**; 340(2):115-126.
- [87] ROSS, R., GLOMSET, J.A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* **1973**; 180(93):1332-1340.
- [88] RUST, S., WALTER, M., FUNKE, H., VON ECKARDSTEIN, A., CULLEN, P., KROES, H.Y., HORDIJK, R., GEISEL, J., KASTELEIN, J., MOLHUIZEN,

- H.O., SCHREINER, M., MISCHKE, A., HAHMANN, H.W., ASSMANN, G. Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. *Nat Genet* **1998**; *20(1)*:96-98.
- [89] RUST, S., ROSIER, M., FUNKE, H., REAL, J., AMOURA, Z., PIETTE, J.C., DELEUZE, J.F., BREWER, H.B., DUVERGER, N., DENEFLÉ, P., ASSMANN, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* **1999**; *22(4)*:352-355.
- [90] SANGER, F., COULSON, A.R. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett* **1978**; *87(1)*:107-110.
- [91] SANGER, F., COULSON, A.R., BARREL, B.G., SMITH, A.J.M., ROE, B.A. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* **1980**; *143(2)*:161-178.
- [92] SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **1977**; *74(12)*:5463-5467.
- [93] SATO, R., INOUE, J., KAWABE, Y., KODAMA, T., TAKANO, T., MAEDA, M. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* **1996**; *271(43)*:26461-26464.
- [94] SCHULTZ, J.R., TU, H., LUK, A., REPA, J.J., MEDINA, J.C., LI, L., SCHWENDNER, S., WANG, S., THOOLEN, M., MANGELSDORF, D.J., LUSTIG, K.D., SHAN, B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* **2000**; *14(22)*:2831-2838.
- [95] SCHWARTZ, C.J., VALENTE, A.J., SPRAGUE, E.A., KELLEY, J.L., NEREM, R.M. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* **1991**; *14(2 Supplement 1)*:I1-I16.
- [96] SCHWARTZ, K., LAWN, R.M., WADE, D.P. ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**; *274(3)*:794-802.
- [97] SERFATY-LACROSNIERE, C., VIVEIRA, F., LANZBERG, A., ISAIA, P., BERG, J., JANUS, E.D., SMITH, M.P., JR., PRITCHARD, P.H., FROHLICH, J.,

- LEES, R.S., BARNARD, G.F., ORDOVAS, J.M., SCHAEFER, E.J. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **1994**; *107(1)*:85-98.
- [98] SIMONS, K., IKONEN, E. How cells handle cholesterol. *Science* **2000**; *290(5497)*:1721-1726.
- [99] SINGARAJA, R.R., BRUNKAM, L.R., VISSCHER, H., KASTELEIN, J.J.P., HAYDEN, M.R. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**; *23(8)*:1322-1332.
- [100] SMITH, J.D., FREEMAN, G., VOGT, M., DULBECCO, R. The nucleic acid of polyoma virus. *Virology* **1960**; *12*:185-196.
- [101] SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B. J., KLENL, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **1985**; *150(1)*:76-85.
- [102] STARY, H.C., CHANDLER, A.B., GLAGOV, S., GUYTON, J.R., INSULL, W., ROSENFELD, M.E., SCHAFFER, S.A., SCHWARTZ, C.J., WAGNER, W.D., WISSLER, R.W. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* **1994**; *14(5)*:840-856.
- [103] STARY, H.C., CHANDLER, A.B., DINSMORE, R.E., FUSTER, V., GLAGOV, S., INSULL, W., ROSENFELD, M.E., SCHWARTZ, C.J., WAGNER, W.D., WISSLER, R.W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1995**; *15(9)*:1512-1531.
- [104] Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland 2002 (<http://www.gbe-bund.de>). Statistisches Bundesamt, Wiesbaden **2004**.
- [105] SUN, L.P., LI, L., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. Insig required for

- sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins *in vitro*. *J Biol Chem* **2005**; *280*(28):26483-26490.
- [106] VENKATESWARAN, A., LAFFITTE, B.A., JOSEPH, S.B., MAK, P.A., WILPITZ, D.C., EDWARDS, P.A., TONTONAZ, P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**; *97*(22):12097-12102.
- [107] VIRCHOW, R. Die Zellulärpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Verlag von August Hirschwald, Berlin **1858**.
- [108] VIRMANI, R., KOLODZIE, F. D., BURKE, A.P., FARB, A., SCHWARTZ, S. M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2000**; *20*(5):1262-1275.
- [109] VOET, D., VOET, J. Proteinabbau. *In: Biochemie*. VOET, D., VOET, J. G., Hrsg. Wiley-VCH, Weinheim **2000**.
- [110] VON ECKARDSTEIN, A. Cholesterol efflux from macrophages and other cells. *Curr Opin Lipidol* **1996**; *7*(5):308-319.
- [111] VON ECKARDSTEIN, A., LANGER, C., ENGEL, T., SCHAUKAL, I., CIGNARELLA, A., REINHARDT, J., LORKOWSKI, S., LI, Z., ZHOU, X., CULLEN, P., ASSMANN, G. ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J* **2001**; *15*(9):1555-1561.
- [112] VON ECKARDSTEIN, A., NOFER, J.R., ASSMANN, G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2001**; *21*(1):13-27.
- [113] VON ROKITANSKY, C. Über einige der wichtigsten Krankheiten der Arterien. K. K. Hof- und Staatsdruckereien, Wien **1852**.
- [114] VOYTAS, D. Agarose gel electrophoresis. *In: Current Protocols in Molecular Biology*. AUSUBEL, F.A., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K., Hrsg. pp. 2.5.1-2.5.9. JOHN WILEY & SONS, New York **1988**.

- [115] WALTER, M., KERBER, S., FECHTRUP, C., SEEDORF, U., BREITHARDT, G., ASSMANN, G. Characterization of atherosclerosis in a patient with familial high-density lipoprotein deficiency. *Atherosclerosis* **1994**; *110*(2):203-208.
- [116] WALTER, M., FORSYTH, N.R., WRIGHT, W., SHAY, J.W., ROTH, M.G. The establishment of telomerase-immortalized Tangier disease cell lines indicates the existence of an apolipoprotein A-I-inducible but ABCA1-independent cholesterol efflux pathway. *J Biol Chem* **2004**; *279*(20):29866-20873.
- [117] WANG, X., SATO, R., BROWN, M.S., HUA, X., GOLDSTEIN, J.L. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **1994**; *77*(1):53-62.
- [118] WANG, X., PAI, J.T., WIEDENFELD, E.A., MEDINA, J.C., SLAUGHTER, C.A., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. Purification of an interleukin-1 beta converting enzyme-related cysteine protease that cleaves sterol regulatory element-binding proteins between the leucine zipper and transmembrane domains. *J Biol Chem* **1995**; *270*(30):18044-18050.
- [119] WHO. The World Health Report 2003; WORLD HEALTH ORGANIZATION, Genf **2003**; 13-15.
- [120] WILFINGER, W.W., MACKEY, K., CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **1997**; *474*(6):478-481.
- [121] YANG, T., ESPENSHADE, P.J., WRIGHT, M.E., YABE, D., GONG, Y., AEBERSOLD, R., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* **2002**; *110*(4):489-500.
- [122] YOUNG, S.G., FIELDING, C.J. The ABCs of cholesterol efflux. *Nat Genet* **1999**; *22*(4):316-318.
- [123] ZHANG, Z., LI, D., BLANCHARD, D.E., LEAR, S.R., ERICKSON, S.K., SPENCER, T.A. Key regulatory oxysterols in liver: analysis as delta4-

3-ketone derivatives by HPLC and response to physiological perturbations. *J Lipid Res* **2001**; 42(4):649-658.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2004 bis Oktober 2005 am Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Walter angefertigt. Die Betreuung der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Wolfgang Schmahl vom Institut für Tierpathologie der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schmahl danke ich sehr herzlich für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Walter für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung eines interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. Gerd Assmann danke ich für die Aufnahme an das Institut und für die finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Lorkowski für sein Wissen um die Genexpressionsanalysen und seine Bereitschaft, diese Arbeit Korrektur zu lesen. Seine Tipps und seine ständige Diskussionsbereitschaft waren essentiell für das Gelingen dieser Arbeit.

Bei Thomas Böking bedanke ich mich für die exzellente, praktische Hilfe, vor allem bei der Echtzeit-RT-PCR, für die lustigen Stunden und seine Freundschaft.

Marianne Jansen-Rust danke ich für die unschätzbare Hilfe bei vielen Experimenten, für unsere gemeinsamen Unternehmungen und für ihr offenes Ohr zu jeder Zeit.

Herrn Dr. Frank Kannenberg danke ich für die Durchführung der gaschromatographischen Analysen, für sein exzellentes Fachwissen und seine herzliche Art.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Michael Schnoor für die unersetzlichen Tipps im Labor und für das Korrigieren dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. Beate Brennhäusen bedanke ich mich für die aufbauenden Gespräche, ihre warme und herzliche Art und für schöne Abendessen.

Allen Kollegen und Kolleginnen am Institut danke ich für das tolle Betriebsklima. Für ihre Hilfe und Gesellschaft danke ich besonders Karin Tegelkamp, Elisabeth Jung, Anja Mieschke, Melanie Bach, Xie Qian, Michaela Schreiner und Ulrich Seelhöfer.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für ihre Liebe und ihre wertvolle Unterstützung bei der Betreuung meiner Tochter Anna.

Ein liebevoller Dank geht an Anna und Stefan für die Geduld und das Verständnis während der letzten Monate dieser Arbeit.