

---

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

**Ein neuer Mechanismus der Cholesterolsenkung durch Phytosteroole**

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

vorgelegt von

Reinhard Brauner

aus München

2013

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Reinhard. L. Lorenz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Constanze Kubisch  
Prof. Dr. Berthold Koletzko  
Priv. Doz. Dr. Heike Künzel

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christian Johannes

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

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2013

---

Für meine Familie und Ana



# Inhaltsverzeichnis

## INHALTSVERZEICHNIS..... I

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... VI

### 1 EINLEITUNG ..... 1

#### 1.1 Cholesterol ..... 1

- 1.1.1 Cholesterol – Chemische Struktur und Funktion ..... 1
- 1.1.2 Cholesterolmetabolismus ..... 2
- 1.1.3 Reverser Cholesteroltransport und der Steroltransporter ABCA1 ..... 4

#### 1.2 Phytosterole ..... 5

- 1.2.1 Chemische Struktur ..... 5
- 1.2.2 Vorkommen ..... 7
- 1.2.3 Phytosterolmetabolismus ..... 7
- 1.2.4 Cholesterolsenkender Effekt der Phytosterole ..... 9

#### 1.3 Regulation des zellulären Sterolhaushalts ..... 10

- 1.3.1 Nuklearer Transkriptionsfaktor LXR ..... 10
- 1.3.2 Oxysterole ..... 12

### 2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT ..... 15

### 3 MATERIAL UND METHODEN ..... 16

#### 3.1 Material ..... 16

- 3.1.1 Geräte und Arbeitsmittel, Kits ..... 16
- 3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien ..... 18
- 3.1.3 Lösungen und Puffer ..... 21
- 3.1.4 Oligonukleotidprimer ..... 22

#### 3.2 Zellbiologische Methoden ..... 22

- 3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien ..... 22
- 3.2.2 Etablierung des Caco-2-Transwell-Modells ..... 25
- 3.2.3 Primäre humane Makrophagen ..... 26
- 3.2.4 Bakterienkultur ..... 27
- 3.2.5 Mitochondrien-Isolierung ..... 27

---

<b>3.3 Lipidchemische Methoden .....</b>	<b>28</b>
3.3.1 Lipidextraktion.....	28
3.3.2 Verseifung von Lipiden .....	29
3.3.3 Komplexierung von Sterolen an Cyclodextrin.....	29
3.3.4 Mizellenpräparation .....	29
3.3.5 Sterolumsatz in isolierten Mitochondrien .....	30
3.3.6 Thermooxidation von Sterolen.....	30
<b>3.4 Analytische Methoden.....</b>	<b>31</b>
3.4.1 Dünnschichtchromatographie .....	31
3.4.2 Festphasenextraktion.....	31
3.4.3 Derivatisierung.....	32
3.4.4 Gaschromatographie/ Massenspektrometrie .....	32
<b>3.5 Radiochemische Methoden .....</b>	<b>34</b>
3.5.1 Tritiumdetektion .....	34
3.5.2 Traceraufreinigung.....	35
<b>3.6 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.6.1 Agarosegelektrophorese .....	35
3.6.2 Transformation von <i>E. coli</i> .....	35
3.6.3 Präparation von Plasmid-DNA und Sequenzierung .....	36
3.6.4 Transfektion von HEK 293-Zellen.....	36
3.6.5 LXRE-Transaktivierungssassay .....	37
3.6.6 RNA-Isolierung und reverse Transkription.....	38
3.6.7 Quantitative Real-time RT-PCR .....	39
<b>3.7 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>40</b>
3.7.1 Extraktion von Gesamtprotein .....	40
3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
3.7.3 Messung der zellulären Laktatdehydrogenase-Freisetzung.....	41
<b>3.8 Statistische Auswertung .....</b>	<b>42</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Cholesterol- und Phytosterol-Handling in Enterozyten .....</b>	<b>43</b>
4.1.1 Mizelläre Sterolzugabe .....	43
4.1.2 Sterolzugabe als ethanolische Lösung .....	44
4.1.3 Sterolzugabe als Cyclodextrinkomplex.....	45
4.1.4 Sterolzugabe als Cyclodextrinkomplex im Transwell-System.....	46
4.1.5 Einfluss von Sitosterol auf das Cholesterol-Handling .....	47

<b>4.2 Etablierung und Optimierung der Lipidextraktion und Lipidanalytik.....</b>	<b>49</b>
4.2.1 Lipidextraktion .....	49
4.2.2 Traceraufreinigung .....	51
4.2.3 Bestimmung der $^3\text{H}$ -Nachweisgrenze auf Dünnschichtplatten .....	54
<b>4.3 Sterolmetabolisierung in potentiellen Zielzellen des Sterolsortings.....</b>	<b>54</b>
4.3.1 Sterolmetabolisierung in Enterozyten.....	54
4.3.2 Sterolmetabolisierung in primären humanen Makrophagen .....	65
4.3.3 Sterolmetabolisierung in Hepatozyten .....	72
<b>4.4 Veresterung von exogenem Cholesterol und nativen Phytosterolen in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten .....</b>	<b>74</b>
4.4.1 Veresterung von Cholesterol und Phytosterolen in Enterozyten .....	74
4.4.2 Veresterung von Cholesterol und Phytosterolen in Makrophagen.....	76
4.4.3 Veresterung von Cholesterol und Phytosterolen in Hepatozyten.....	77
<b>4.5 Sterolkonversion in isolierten Mitochondrien.....</b>	<b>78</b>
4.5.1 Methodenoptimierung.....	79
4.5.2 Cholesterol- und Phytosterolkonversion in isolierten Mitochondrien .....	80
4.5.3 Hemmung von CYP27 in isolierten Mitochondrien .....	81
<b>4.6 Einfluss von Cholesterol und Phytosterolen auf die LXR-Aktivierung.....</b>	<b>85</b>
4.6.1 Effekte seitenketten-hydroxylierter Cholesterolmetaboliten auf die LXR-Aktivierung .....	85
4.6.2 Effekte nativer und seitenketten-hydroxylierter Phytosterole und Cholesterol auf die LXR-Aktivierung .....	87
<b>4.7 Einfluss von Cholesterol und Phytosterolen auf die spezifische mRNA-Expression in Enterozyten .....</b>	<b>88</b>
4.7.1 Transkription der Cytochrom P450 Oxidase CYP27.....	88
4.7.2 Transkription der Steroltransporter ABCG8 und ABCA1 .....	90
<b>4.8 Effekte von LXR/RXR-Liganden auf die enterozytäre Sterolesekretion .....</b>	<b>91</b>
4.8.1 Effekte von 22(R)-OH-C, 9-cis-RA und ApoA-I auf die Cholesterolesekretion.....	91
4.8.2 Effekt von 27-OH-Cholesterol als enterozytärer LXR-Ligand.....	92
4.8.3 Interaktion von Phytosterolen mit der LXR-induzierten Sterolesekretion .....	94
4.8.4 Enterozytäres Cholesterol- und Phytosterol-Handling nach LXR-Aktivierung.....	95
<b>4.9 Evaluierung der Toxizität nativer Phytosterole gegenüber Cholesterol und Einfluss auf die Zellmorphologie .....</b>	<b>96</b>
4.9.1 Primäre humane Makrophagen .....	96
4.9.2 Caco-2-Zellen .....	98

<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Cholesterol und Phytosterole werden in Enterozyten unterschiedlich gehandhabt .....</b>	<b>101</b>
5.1.1 Effekte bei mizellärer Sterolzugabe .....	101
5.1.2 Effekte unabhängig von der mizellären Sterolzugabe.....	103
<b>5.2 Metabolisierung von Cholesterol und Phytosterolen in Enterozyten zu seitenketten-hydroxylierten Metaboliten.....</b>	<b>105</b>
5.2.1 Enterozyten konvertieren Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol und Cholestensäure .....	107
5.2.2 Enterozyten konvertieren Phytosterole durch CYP27 nur mit verminderter Effizienz zu seitenketten-hydroxylierten Metaboliten.....	108
<b>5.3 Makrophagen konvertieren Phytosterole ebenfalls mit verminderter Effizienz zu 27-oxidierten Metaboliten.....</b>	<b>109</b>
<b>5.4 Phytosterole beeinflussen die 27-Hydroxylierung von Cholesterol durch CYP27 .....</b>	<b>111</b>
5.4.1 Metabolisierung von Cholesterol und Phytosterolen in isolierten Mitochondrien .....	111
5.4.2 Phytosterole hemmen die CYP27-katalysierte Hydroxylierung von Cholesterol .....	113
<b>5.5 Funktionelle Auswirkungen der Interaktion von Phytosterolen mit Cholesterol an CYP27 in Enterozyten .....</b>	<b>114</b>
5.5.1 Die Rolle von nativen Sterolen, 27-OH-Cholesterol und seitenketten-hydroxylierten Phytosterolen als LXR-Liganden .....	114
5.5.2 Phytosterole verhindern die Cholesterol-induzierte CYP27-Expression .....	116
5.5.3 Phytosterole beeinflussen die Expression der Steroltransporter ABCA1 und ABCG8 .....	117
5.5.4 27-OH-Cholesterol erhöht die basolaterale enterozytäre Sterolesekretion in Enterozyten .....	117
5.5.5 Phytosterole hemmen die LXR-vermittelte basolaterale Cholesterolesekretion in Enterozyten	
	120
<b>5.6 Cholesterol als bevorzugtes ACAT-Substrat gegenüber Phytosterolen.....</b>	<b>121</b>
<b>5.7 Effekte von Phytosterolen auf das Cholesterol-Handling peripherer Zellen.....</b>	<b>124</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>128</b>
<b>7 LITERATUR .....</b>	<b>131</b>
<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>151</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>152</b>

<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>154</b>
------------------------	------------

## Abkürzungsverzeichnis

22(R)-OH-C	22(R)-Hydroxycholesterol
22(S)-OH-C	22(S)-Hydroxycholesterol
24(S)-OH-C	24(S)-Hydroxycholesterol
24(S),25-OH-C	24(S),25-epoxycholesterol
25-OH-C	25-Hydroxycholesterol
27-OH-C	27-Hydroxycholesterol
27-COOH-C	Cholestensäure (= 27-Carboxycholesterol)
27-OH-Ca	27-Hydroxycampesterol
27-COOH-Ca	27-Carboxycampesterol
27-OH-S	27-Hydroxysitosterol
27-COOH-S	27-Carboxysitosterol
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG5/G8	ATP-binding cassette transporter G5/G8
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CD	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
cDNA	komplementäre DNA
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein
CoA	Coenzym A
Ct	threshold cycle
CYP	Cytochrom P450
CYP27	Sterol-27-Hydroxylase
DC	Dünnschichtchromatographie
DEE	Diethylether
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpm	Desintegrations per minute
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GC	Gaschromatographie
HBSS	Hank's balanced salt solution
HDL	High density lipoprotein
hLXR	Humaner Liver-X-Rezeptor
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
HRP	horse radish peroxidase
HS	Humanserum
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low density lipoprotein
LDL-C	LDL-assoziertes Cholesterol
HDL-C	HDL-assoziertes Cholesterol
LXR	Liver-X-Rezeptor
LXRE	LXR $\alpha$ response element
M	Molarität
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoro-acetamid
MTP	mikrosomales Triglycerid-Transfer-Protein
NADH/H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1 Protein
OH-C	Hydroxycholesterol
OSBP	Oxysterol binding protein
PAGE	Polyacrylamidgelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS(-/-)	PBS ohne Calcium und Magnesium (-/-)
PBS(+/+)	PBS mit Calcium und Magnesium (+/+)
Papp	Apparenter Permeationskoeffizient
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RA	9-cis retinoic acid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RXR	Retinoid-X-receptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Solid-phase extraction
SR	Scavenger receptor
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein

T09	T091317
TEMED	Tetramethylendiamin
TLC	Thin layer chromatography
TMCS	Trimethylchlorosilan
TMS	Trimethylsilylether
TMSI	N-Trimethylsilylimidazole
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
VLDL	Very low density lipoprotein

Es wurden die allgemeinen SI-Einheiten und die Elementsymbole der chemischen Elemente nach IUPAC verwendet.

# 1 Einleitung

Cholesterol ist zweifellos die einzelne Substanz, die am besten belegbar und am vielfältigsten in die komplexe Pathogenese der Atherosklerose involviert ist (1;2). Seine Aufnahme aus der Nahrung kann durch die strukturell eng verwandten Phytosterole reduziert werden (3). Dies findet mittlerweile sogar in funktionellen Lebensmitteln eine breite Anwendung (4), obwohl der molekulare Wirkmechanismus der Phytosterole nicht vollständig aufgeklärt ist.

## 1.1 Cholesterol

### 1.1.1 Cholesterol – Chemische Struktur und Funktion

Cholesterol (Cholest-5-en-3 $\beta$ -ol) besteht aus einem 5,6-ungesättigten tetracyclischen Sterangerüst, einer iso-octyl-Seitenkette am Kohlenstoffatom C-17, jeweils einer Methylgruppe in Position C-10 und C-13 und einer Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Konfiguration an Position C-3 (Abbildung 1.1). Die polare Hydroxylgruppe des Cholesterols verleiht dem ansonsten apolaren Molekül einen amphiphilen Charakter (5).

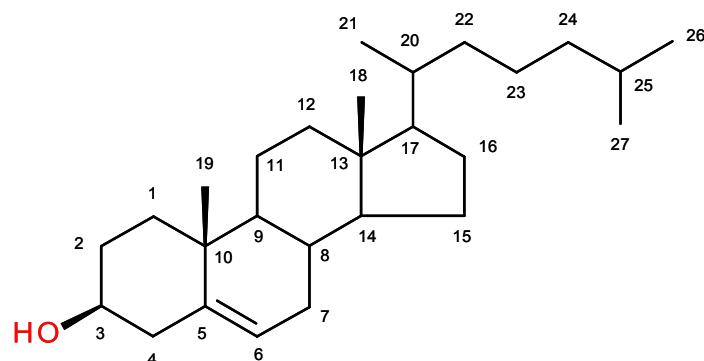


Abbildung 1.1: Chemische Struktur des Cholesterols mit Benennung nach IUPAC-IUB-Nomenklatur

Cholesterol erfüllt im Organismus vielfältige Funktionen. Aufgrund seines amphiphilen Charakters kann es in Lipid-Doppelschichten einlagern und beeinflusst so die Stabilität von Zellmembranen. Weiterhin dient Cholesterol als Prekursor von Gallensäuren und Steroidhormonen. Ein Zwischenprodukt aus der Cholesterol-Biosynthese, 7-Dehydrocholesterol, stellt einen Vorläufer für die Bildung von Cholecalciferol dar. Erst in den letzten Jahren wurde die regulatorische Rolle von bestimmten oxidierten Derivaten des Cholesterols, so genannten Oxycholesterolen (siehe 1.3.2.1), bei der zellulären Cholesterolhomöostase und inflammatorischen Vorgängen in Zellen entdeckt (6).

### 1.1.2 Cholesterolmetabolismus

Cholesterol steht dem Körper aus exogenen und endogenen Quellen zur Verfügung. Hauptsyntheseorte für die endogene Produktion sind Leber und zentrales Nervensystem, aber auch die intestinale Mukosa (7). In einer Reihe von Reaktionsschritten entsteht aus 18 Molekülen Acetyl-CoA das Cholesterol. Einer der wichtigsten Schritte ist die Bildung von Mevalonat aus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. Die Reaktion wird von der 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) katalysiert. Die HMG-CoA-Reduktase gilt als Schrittmacherenzym der Cholesterol-Biosynthese, da dieses Enzym im Sinne einer negativen Rückkopplung durch Cholesterol gehemmt werden kann. Über verschiedene Zwischenstufen entsteht nach Ringschluss zum Sterangerüst Lanosterol, und nach Sättigung der Seitenkette und Modifikation der Doppelbindungen im Ringsystem schließlich Cholesterol. Täglich werden im menschlichen Organismus ca. 1 - 2 g Cholesterol synthetisiert (8).

Ein Teil des Cholesterols wird exogen aufgenommen. Dabei weisen fettreiche, tierische Produkte wie Butter, Eier oder Leber einen hohen Cholesterolgehalt auf. Bei einer gemischten Diät liegt die tägliche Cholesterolzufuhr mit der Nahrung, je nach Betonung der tierischen Komponente, bei 200 - 500 mg/Tag (8;9). Mit der Galle werden zusätzlich 800 - 1200 mg/Tag Cholesterol in das Darmlumen sezerniert (10). Cholesterol wird im Durchschnitt zu 50 - 60% (11) absorbiert, wobei die individuelle fraktionelle Absorptionsrate mit 29 - 80% jedoch beträchtlich variieren kann (12).

#### 1.1.2.1 Intestinale Resorption

Für die Resorption des Cholesterols wird die Emulgierung und der Einbau in gemischte Mizellen als notwendig erachtet. Cholesterolester werden zunächst durch die pankreatische Cholesterol-Esterase zu freiem Cholesterol hydrolysiert (13). Freies Cholesterol aus Nahrung und Galle aggregiert mit Gallensäuren, Mono- bzw. Diacylglycerolen, freien Fettsäuren und Phospholipiden zu gemischten Mizellen. Dabei stellen die Mizellen ein amphiphiles Aggregat dar, in dessen lipophilen Kern Cholesterol eingelagert wird. Cholesterol wird aus den gemischten Mizellen durch den *unstirred water layer* der Dünndarm-Mukosa zur Bürstensaummembran der Epithelzellen transportiert (14).

Die Aufnahme von Sterolen in den Enterozyten wurde lange Zeit als passiver Vorgang angesehen. Mit der Identifikation potentieller Sterol-Transportproteine in der Bürstensaummembran konnte gezeigt werden, dass die Sterolabsorption überwiegend ein proteinvermittelter spezifischer Vorgang ist (10). Dabei scheint dem Protein Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) eine Hauptbedeutung als intestinaler Steroltransporter zuzukommen. NPC1L1 ist auf der apikalen Seite des Enterozyten lokalisiert. Durch Hemmung dieses Proteins mittels des Wirkstoffes Ezetimib lässt sich die Cholesterolaufnahme in den Enterozyten signifikant hemmen (15). Die Beteiligung weiterer Proteine wie SR-BI, Aminopeptidase N und des Annexin-2/Caveolin-1 Heterokomplexes bei der Sterolresorption wird ebenfalls für möglich gehalten (10).

Nach Aufnahme in den Enterozyten wird ein Teil des resorbierten Cholesterols und endogen synthetisiertes Cholesterol durch die Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase 2 (ACAT 2) mit Fettsäuren verestert. Unter dem Einfluss des mikrosomalen Triglycerid-Transfer-Proteins (MTP) werden Cholesterolester, Triglyceride und Phospholipide mit dem Apolipoprotein ApoB48 als Chylomikronen über die Lymphe abgegeben (16;17). Ein Teil des resorbierten freien Cholesterols wird über einen ApoB-unabhängigen Transport über den in der basolateralen Membran exprimierten ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) auf Apolipoprotein ApoA-I beladen und als HDL ins Blut abgeführt (siehe auch 1.1.3). In Zellkultur- und knock out-Modellen kann dieser Prozess bis zu 30% der intestinalen basolateralen Cholesterolesekretion ausmachen (18;19). Die Expression von ABCA1 steht unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors Liver-X-Rezeptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), wobei eine Aktivierung des LXR durch spezifische LXR-Liganden zu einer gesteigerten Expression von ABCA1 auf mRNA und Proteinebene führt (siehe 1.3.1) (20).

Enterozytär verbleibendes freies Cholesterol kann über die in der apikalen Enterozytenmembran exprimierten ATP-binding cassette transporter G5/G8 (ABCG5, ABCG8) zurück in das Darmlumen transportiert werden. ABCG5- und ABCG8 sind heterodimere Halbtransporter und werden in der apikalen Membran intestinaler Mukosazellen und der kanalikulären Membran von Hepatozyten exprimiert (21). Die Expression von ABCG5 und ABCG8 kann nach einigen Studien am Mausmodell durch in die Enterozyten resorbiertes Cholesterol über die LXR-Achse stimuliert werden (22-24), jedoch konnte ein entsprechender Effekt an humanen Zellmodellen oder in vivo bisher nicht gezeigt werden.

### 1.1.2.2 Transport in Lymphe und Blut

In Enterozyten verestertes exogenes Cholesterol und in deutlich geringerem Maße auch freies Cholesterol gelangt mit Chylomikronen in die Lymphe und in den Blutkreislauf. Unter Einfluss der endothelständigen Lipoprotein-Lipase werden deren Triglyceride hydrolysiert. Die dabei verbleibenden cholesterinreichen Chylomikronen-Remnants werden von der Leber über spezifische Rezeptoren aufgenommen. In der Leber wird aufgenommenes Cholesterol und in der Leber endogen neu synthetisiertes Cholesterol als Ester gespeichert oder in Very Low Density Lipoproteine (VLDL) eingebaut und ins Blut abgegeben. Aus VLDL entstehen durch Einfluss der Lipoprotein-Lipase und des Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP) die Intermediate Density Lipoproteine (IDL) und schließlich die cholesterolreichen Low Density Lipoproteine (LDL). Die LDL-Partikel transportieren das Cholesterol in die peripheren Gewebe, wo sie von LDL-Rezeptoren in die Zellen aufgenommen werden (7;25). Der Transport von Cholesterol in High Density Lipoproteinen (HDL) von peripheren Geweben, inklusive des Dünndarms, zur Leber wird als reverser Cholesteroltransport bezeichnet (siehe 1.1.3).

### 1.1.2.3 Ausscheidung durch die Leber

Überschüssiges Cholesterol wird über die Leber nach Oxidation zu Gallensäuren oder direkt in freier Form ausgeschieden. Dabei wird freies Cholesterol aus den Hepatozyten aktiv von den Steroltransportern ABCG5/ABCG8 in die Gallenkanälchen sezerniert (21). Die Gallensäuren werden über den Transporter ABCB11 aus den Leberzellen in die Galle transportiert (26). Im Darmlumen mischt sich das biliär sezernierte Cholesterol mit dem Nahrungscholesterol. Nicht resorbiertes Cholesterol wird in freier Form oder durch Darmbakterien modifiziert ausgeschieden (27). Interessanterweise wurde kürzlich auch ein trans-intestinaler Cholesterolefflux postuliert, bei welchem Enterozyten systemisch anflutendes Cholesterol über die basolaterale Membran absorbieren und über die apikale Membran in das Darmlumen sezernieren. Dieser Prozess scheint, zumindest im Mausmodell, einen deutlichen Beitrag zur Sterolelimination im Körper zu leisten (28) und scheint zumindest partiell über ABCG5/G8 vermittelt zu sein (29).

### 1.1.3 Reverser Cholesteroltransport und der Steroltransporter ABCA1

Der Begriff Reverser Cholesteroltransport charakterisiert den Rücktransport von Cholesterol aus den peripheren extrahepatischen Zellen und Geweben zur Leber. Periphere Zellen wie z.B. Makrophagen, Muskelzellen und Fettzellen sind nicht in der Lage, Lipoproteine zu synthetisieren und können Cholesterol nicht in größerem Maße metabolisieren. Diese Zellen müssen überschüssiges Cholesterol entweder als Ester speichern oder es sezernieren. Somit dient der reverse Cholesteroltransport primär der Vermeidung des Überschusses an Cholesterol in peripheren Zellen (30).

Gerade in Zellen wie den Makrophagen, welche nicht in der Lage sind Lipoproteine zu synthetisieren, kommt dem reversen Cholesteroltransport eine wichtige Bedeutung zu. Die Aufnahme von Cholesterol ist in Makrophagen primär über die Expression des LDL-Rezeptors und eine Beeinflussung der de novo Cholesterol-Biosynthese geregelt (30;31). Im atherogenen Prozess führt die unkontrollierte Aufnahme von oxLDL über Scavenger-Rezeptoren, verbunden mit einer fehlenden Feedback-Inhibition, zu einer Akkumulation von Cholesterolestern und schließlich zur Bildung von Schaumzellen. Dies wird als einer der initialen Vorgänge bei der Entstehung der Atherosklerose angesehen (32;33).

Der quantitativ dominierende Mechanismus des zellulären Cholesteroleffluxes aus peripheren Zellen ist der Efflux über den Cholesteroltransporter ABCA1 (34). ABCA1-Transporter werden auf fast allen peripheren Zellen exprimiert und vermitteln den unidirektionalen Export von freiem Cholesterol und Phospholipiden über die Plasmamembran. Cholesterol wird dabei auf ApoA-I in naszierenden diskoidalen HDL-Partikeln übertragen. ApoA-I dient als Akzeptor für die Lipide und stellt die Hauptproteinkomponente in HDL-Partikeln dar. Es kommt zu einer Veresterung des freien Cholesterols durch die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), HDL wird

weiter mit Lipiden beladen und es erfolgt im Plasma eine teilweise Übertragung von Cholesterolestern auf ApoB-haltige Lipoproteine mittels des Cholesterinester-Transferproteins (CETP) (7).

An der Leber wird die selektive Aufnahme von Cholesterolestern aus HDL über den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) vermittelt oder es werden HDL-Partikel über einen ApoE-Rezeptor internalisiert (35;36). In der Leber wird Cholesterol entweder als freies Cholesterol über die Galle sezerniert, in Gallensäuren konvertiert, als Cholesterolester gespeichert oder erneut in Lipoproteine verpackt.

Auch der Beitrag des Dünndarms zum reversen Cholesteroltransport konnte gezeigt werden. Enterozyten sind in der Lage ApoA-I zu synthetisieren und exprimieren auf der basolateralen Membran den Steroltransporter ABCA1 (18;37). Die Genexpression von ABCA1 kann unter anderem über den Transkriptionsfaktor LXR und dessen Bindung an das entsprechende LXR-Response-Element im Promotorbereich von ABCA1 vermittelt werden (38). Dabei kommt dem Dünndarm eine wichtige Rolle in der HDL-Biogenese in vivo zu. Bis zu 30% der gesamten HDL-Produktion im Körper scheint enterozytären Ursprungs zu sein (18). ABCA1 hat somit entscheidenden Anteil am reversen Cholesteroltransport und stellt gleichzeitig einen potentiellen Effektor für die ApoB-unabhängige Absorption von Cholesterol aus dem Enterozyten über die basolaterale Membran dar (39).

Anhand einer autosomal-rezessiven Erkrankung des Lipidstoffwechsels, der Tangier-Krankheit, lässt sich die Bedeutung von ABCA1 für die Cholesterolhomöostase erkennen. Durch Mutationen des ABCA1-Gens kommt es bei betroffenen Patienten zu äußerst niedrigen ApoA-I und HDL-Plasmaspiegeln (40). Der Efflux von Cholesterol und Phospholipiden aus den Zellen über den ABCA1-Transporter ist bei dieser Krankheit drastisch reduziert. Durch den gestörten reversen Cholesteroltransport kommt es folglich zu einer Akkumulation von Cholesterolestern in peripheren Zellen, wie z.B. Makrophagen, neuronalen Zellen oder glatten Muskelzellen. Der niedrige HDL-Plasmaspiegel von oftmals < 10 mg/dl bei homozygoten Patienten korreliert mit einem mehrfach erhöhten Risiko für frühzeitige atherosklerotische Gefäßerkrankungen (41;42).

## 1.2 Phytosterole

### 1.2.1 Chemische Struktur

Als Phytosterole werden die Sterole von Pflanzen bezeichnet. Sie stellen dort, als Analoga zu Cholesterol in Sägerzellen, eine wichtige Strukturkomponente zur Gewährleistung der Stabilität der Zellmembranen dar (43). Einige Phytosterole dienen auch als Vorläufer zur Synthese von Brassinosteroiden. Diese polyhydroxylierten Sterole haben als Phytohormone Einfluss auf Wachstums- und Transportvorgänge der Pflanze (44).

Strukturell weisen Phytosterole und Cholesterol eine große Ähnlichkeit auf. Beide bestehen aus einem tetracyclischen Sterangerüst mit einer Hydroxylgruppe an C-3 und einer Seitenkette an C-17. Der Hauptunterschied zu Cholesterol besteht in der Verzweigung und Sättigung der Seitenkette. Während die Seitenkette von Cholesterol 8 C-Atome aufweist, besteht die Seitenkette von Phytosterolen durch eine zusätzliche Methyl- oder Ethyl-Gruppe an C-24 aus 9 oder 10 C-Atomen. Der Großteil der Phytosterole besitzt an C-4 keine Methylsubstitution, zählt demnach zu den 4-Desmethyl-Sterolen. Diese lassen sich je nach Position und Anzahl der Doppelbindungen im B-Ring des Sterangerüstes ferner unterteilen in  $\Delta 5$ -,  $\Delta 7$ - oder  $\Delta 5,7$ -Sterole. Charakteristisch für viele Phytosterole sind weiterhin eine Doppelbindung in der Sterolseitenkette an Position C-22 ( $\Delta 22$ ) oder C-24 ( $\Delta 24$ ). Die vollständig gesättigten Derivate der Phytosterole werden als Phytostanole bezeichnet. Sie sind jedoch in Pflanzen in meist nur geringen Mengen zu finden (43;45).

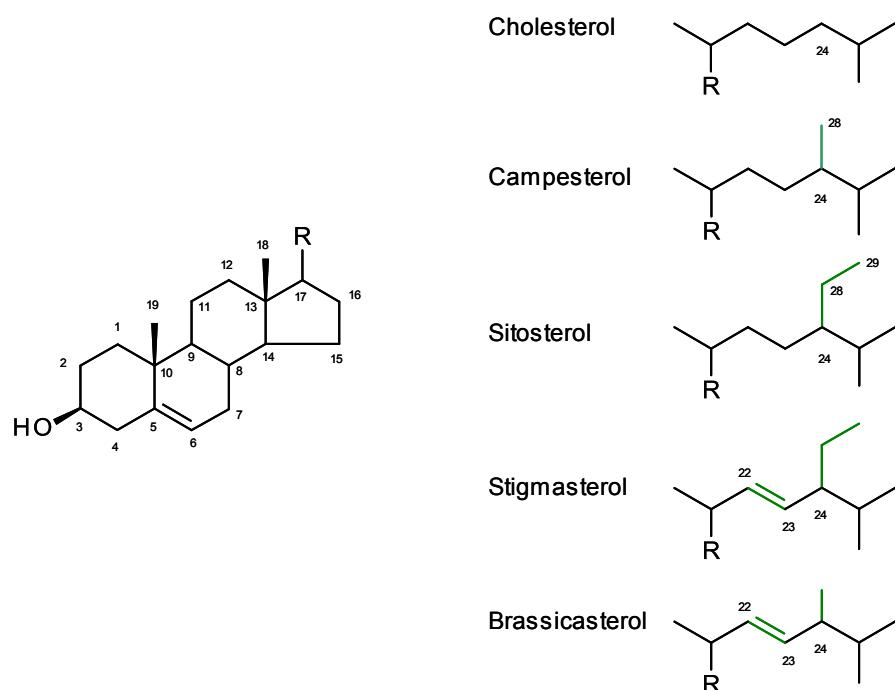


Abbildung 1.2: Chemische Struktur von Cholesterol und verschiedenen Phytosterolen

Mehr als 200 verschiedene Phytosterole wurden bisher in Pflanzen identifiziert. Die am häufigsten vorkommenden Phytosterole sind dabei der Gruppe der  $\Delta 5$ -Sterole zuzuordnen.  $\beta$ -Sitosterol ((24R)-ethylcholest-5-en-3 $\beta$ -ol) kann als am häufigsten vorkommendes Pflanzensterol 45-95% des Gesamtsterolgehaltes in Pflanzen ausmachen, Campesterol ((24R)-methylcholest-5-en-3 $\beta$ -ol) bis zu 30% und Stigmasterol (24(S)-ethylcholest-5,22-dien-3 $\beta$ -ol) bis zu 25% (46;47). Die Nomenklatur richtet sich nach den IUPAC-IUB-Richtlinien von 1976 und 1989. Dabei werden nach

älterer Nomenklatur den C-Atomen an C-24 die Nummern 28 und 29 zugewiesen und nach neuerer Nomenklatur die Nummern 24-1 und 24-2 (48).

### 1.2.2 Vorkommen

Phytosterole können vom menschlichen Körper nicht synthetisiert werden. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf pflanzliche Produkte. Getreide und pflanzliche Öle, aber auch Nüsse und verschiedene Gemüse weisen die höchsten Gehalte an pflanzlichen Sterolen auf (43). Der Gehalt variiert dabei erheblich und kann in pflanzlichen Ölen wie Maiskeimöl und Sonnenblumenöl Gehalte von bis zu 900 mg/100 g erreichen. In stark raffinierten Ölen wie Palmöl sind die Mengen mit 49 mg/100 g jedoch deutlich reduziert. Getreide wie Gerste oder Weizen enthalten ca. 70 mg/100 g, stellen jedoch eine Hauptquelle der Aufnahme mit der Nahrung dar, da der Verzehr in der Regel höher ist als der von pflanzlichen Ölen. Die Menge an Phytosterolen in Gemüse und Früchten unterliegt ebenfalls einer hohen Schwankung. Hauptquellen stellen hier Broccoli und Salat mit 30 -38 mg/100 g, Mandeln mit 143 mg/100 g und Beerenfrüchte mit bis zu 28 mg/100 g dar (49;50).

### 1.2.3 Phytosterolmetabolismus

Die durchschnittliche tägliche Aufnahme mit der Nahrung liegt bei westeuropäischer Ernährungsweise zwischen ca. 140 und 450 mg/Tag (51). Dabei ergeben sich deutliche Unterschiede je nach Betonung der pflanzlichen Komponente der Nahrung. So kann die Phytosterol-Aufnahme bei Vegetariern bis zu 1000 mg/Tag betragen. Die Aufnahme an Phytostanolen liegt bei ca. 10% der Phytosterol-Aufnahme (51;52).

Trotz der vergleichsweise hohen Zufuhr und der strukturell großen Ähnlichkeit von Phytosterolen ist die systemische Absorption im Vergleich zu Cholesterol gering. Cholesterol wird im Durchschnitt zu 50-60% absorbiert (11). Phytosterole dagegen werden mit 0,6 - 7,5% in erheblich geringerem Umfang absorbiert (51). Unterschiede in der Absorption sind auch innerhalb der Gruppe der Phytosterole zu erkennen. Mit zunehmender Länge der Seitenkette scheint die Absorptionsrate abzunehmen. Campesterol wird zu 9,4 - 14,8% und Sitosterol zu 3,1 - 4,5% absorbiert (45). Die durchschnittliche Serumkonzentration von Phytosterolen beträgt 0,3 - 1,7 mg/dl, im Vergleich zu deutlich höheren Serumkonzentrationen von 125 - 320 mg/dl Gesamtcholesterol (45).

Phytosterole werden nach oraler Aufnahme wie das Cholesterol im Verdauungstrakt emulgiert und in gemischte Mizellen eingebaut. Jedoch weisen Phytosterole aufgrund ihres hydrophoberen Charakters eine höhere Affinität als Cholesterol zu gemischten Mizellen auf (siehe 1.2.4). Die Aufnahme der Phytosterole und Phytostanole aus dem Darmlumen erfolgt wie beim Cholesterol vermutlich größtenteils mit Hilfe des NPC1L1-Proteins (15). Dabei scheint NPC1L1 eine gewisse Präferenz für Cholesterol gegenüber einigen pflanzlichen Sterolen zu haben (53;54). Durch Hemmung von

NPC1L1 mittels Ezetimib lässt sich jedoch sowohl die Cholesterol- als auch die Phytosterolresorption in Enterozyten hemmen (15;55). Dies bestätigen Arbeiten am NPC1L1-Knockoutmodell der Maus (15;56). Der genaue Mechanismus der Phytosterolresorption und potentielle Unterschiede zur Cholesterolresorption sind dennoch als noch nicht abschließend geklärt zu betrachten.

Nach der Resorption in die Enterozyten wird ein Teil der Phytosterole intrazellulär verestert. Die Affinität der ACAT 2 scheint jedoch zumindest für einige Phytosterole geringer als für Cholesterol zu sein (57). Über das intrazelluläre Handling und die basolaterale, systemische Absorption der Phytosterole ist im Vergleich zu Cholesterol wenig bekannt. Phytosterole werden in veresterter und freier Form offenbar auch in Chylomikronen verpackt (58) und gelangen über das Lymphsystem in den Blutkreislauf. Ebenso scheint ein Teil der freien Phytosterole über den basolateral exprimierten Steroltransporter ABCA1 auf ApoA-I übertragen zu werden (59).

Unveresterte Phytosterole werden über die apikal exprimierten Steroltransportproteine ABCG5/G8 größtenteils zurück ins Darmlumen exportiert (60;61). ABCG5/G8 wurde zunächst eine Sterolselektivität zugeschrieben, da Phytosterole bevorzugt gegenüber Cholesterol aus dem Enterozyten zurück in das Darmlumen transportiert werden (62). Dennoch konnte in Versuchen mit isoliertem ABCG5 und ABCG8-Protein keine direkte Substratspezifität der Transporter selbst für Sitosterol oder Cholesterol festgestellt werden (63;64). Es müssen demnach weitere, höchstwahrscheinlich intrazelluläre, Einflüsse auf das unterschiedliche Sorting von Phytosterolen gegenüber Cholesterol vermutet werden.

Mutationen in den Genen der ABCG5- oder ABCG8-Steroltransportproteine sind die Ursache der Krankheit Sitosterolämie (61;65;66). Sitosterolämie ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, welche durch massiv erhöhte Konzentrationen pflanzlicher Sterole, vor allem von Sitosterol, im Plasma und in Geweben gekennzeichnet ist. Im Gegensatz zu gesunden Personen mit einer Phytosterol-Plasmakonzentration von weniger als 1-2 mg/dl, liegt die Plasmakonzentration bei Sitosterolämie-Patienten bei 12-40 mg/dl (66;67). Klinische Symptome der Sitosterolämie sind Xanthomatosen und atherosklerotische Gefäßveränderungen schon in jugendlichem Alter, verbunden mit einem stark erhöhten Risiko für letal verlaufende kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Xanthomatose ist dabei ähnlich der Xanthomatose bei primärer Hypercholesterolemie mit tendinösen und/oder tuberösen Xanthomen und Xanthelasmen der Haut, jedoch ist die Phytosterolablagerung und das Verhältnis Phytosterol zu Cholesterol erhöht (67;68). Neben der erhöhten Phytosterolkonzentration im Plasma ist die Cholesterolkonzentration im Plasma meist im Normbereich oder lediglich moderat erhöht. Charakteristisch ist das hohe Verhältnis von Phytosterolen zu Cholesterol im Plasma (66). Ob Phytosterole dabei selbst atherogenes Potential besitzen, wird kontrovers diskutiert (66;69-71). Die Behandlung von Sitosterolämie-Patienten mit Ezetimib führt zu einer erfolgreichen Senkung der Phytosterol-Plasmaspiegel (72;73). Ezetimib wurde ursprünglich als Inhibitor der intestinalen

Cholesterolresorption identifiziert und wirkt offenbar durch Hemmung der Sterolaufnahme von Cholesterin und Phytosterolen über NPC1L1 in die Enterozyten (9).

In der Leber werden Phytosterole im Gegensatz zu Cholesterin nicht oder nur in äußerst geringem Maße zu primären C24-Gallensäuren metabolisiert (74), obwohl dies aufgrund früherer Studien vermutet worden war (75). Vielmehr werden Phytosterole in der Leber durch die heterodimeren Halbtransporter ABCG5/G8 über die kanalikuläre Hepatozytenmembran in die Galle ausgeschieden. In der Leber zeigen die Steroltransporter ABCG5/ABCG8 nur eine geringe Präferenz in der Exkretion von Phytosterolen gegenüber Cholesterin. Interessanterweise wird die hepatobiliäre Cholesterolekretion jedoch auch vornehmlich über ABCG5/G8 vermittelt (76;77).

#### 1.2.4 Cholesterolsenkender Effekt der Phytosterole

Der cholesterolsenkende Effekt von Phytosterolen wurde vor mittlerweile mehr als 50 Jahren von Peterson gezeigt. Durch Fütterung von Pflanzensterolen aus der Sojabohne konnte die Erhöhung des Cholesterolspiegels in Plasma und Leber nach cholesterolreicher Nahrung vermindert und ein Rückgang der atherosklerotischen Veränderungen an Hühnern beobachtet werden (78). Der Effekt konnte ebenfalls am Menschen nachgewiesen werden, wobei Zufuhrmengen von durchschnittlich 8,1 g/Tag zu einer Reduktion des Gesamtcholesterols um 27,7% führten (79). Im Zuge dieser viel versprechenden Ergebnisse wurden vermehrt Studien über den cholesterolsenkenden Effekt von Phytosterolen durchgeführt. Die zugeführten Phytosterole waren zumeist in kristalliner Form, unterschiedlichster chemischer Struktur und aus heutiger Sicht mit bis zu 30 g/Tag beachtlich hoch dosiert (80). Jedoch konnte schon in frühen Arbeiten eine Menge von 1,5 - 3 g/Tag als wirksam am Menschen nachgewiesen werden (81).

Das Problem der Verabreichung der kristallinen freien Phytosterole konnte durch Veresterung der Phytosterole mit Fettsäuren umgangen werden. Die erhöhte Fettlöslichkeit von Phytosterolessern erlaubte eine Inkorporation in fetthaltige Nahrungsmittel wie Öle und Streichfette (82).

Durch Verzehr solcher mit Phytosterolessern angereicherten Lebensmittel lassen sich Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin im Plasma effizient senken (51;82;83). Dabei scheint eine optimale Zufuhr bei Mengen von 2 - 3 g Phytosterolessern/Tag zu liegen, um eine Reduktion des LDL-Cholesterols im Plasma um 10-14% zu erreichen. Höhere Zufuhrmengen bewirken dabei kaum einen zusätzlichen Effekt auf die Senkung des Cholesterolspiegels (4;82).

Der Wirkmechanismus der Phytosterole ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Physico-chemische Effekte im Darmlumen sind nur zum Teil für die cholesterolsenkende Wirkung der Pflanzensterole verantwortlich. Phytosterole besitzen aufgrund der verlängerten Seitenkette eine geringfügig höhere Hydrophobizität als Cholesterin. In vitro treten die Phytosterole mit Cholesterin um den Einbau in gemischte Mizellen in

Konkurrenz. Durch den etwas hydrophoberen Charakter weisen Phytosterole eine höhere Affinität als Cholesterol zu gemischten Mizellen auf und können so Cholesterol teilweise aus den Mizellen verdrängen. Das überschüssige freie Cholesterol kann von Enterozyten kaum resorbiert werden und wird mit dem Stuhl ausgeschieden. Die Netto-Aufnahme von Cholesterol aus der Nahrung wird somit verringert (84;85). Darüber hinaus werden weitere intraluminale Effekte von Phytosterolen, wie z.B. eine Substrat-Konkurrenz um die Cholesterol-Esterase oder eine Co-Kristallisation mit Cholesterol, postuliert (80;86). Schon die Sättigung des Phytosterol-Effektes bei etwa -30% fraktioneller Cholesterolresorption durch 2 g Phytosterole/Tag spricht aber gegen eine dominante Rolle dieser physico-chemischen Effekte (87;88).

Mit Aufklärung der genetischen Ursache der Sitosterolämie und Charakterisierung der Sterolexporter ABCG5/ABCG8 konnte jedoch gezeigt werden, dass Phytosterole durchaus effektiv in die Enterozyten aufgenommen werden (89). Es konnte zudem gezeigt werden, dass Phytosterole nicht gleichzeitig mit Cholesterol intraluminal vorliegen müssen um einen cholesterolsenkenden Effekt auszuüben (90). Darüber hinaus konnte der Plasmacholesterolspiegel in verschiedenen Tiermodellen effizient durch subkutane Applikation von Phytosterolen oder Phytostanolen gesenkt werden (91;92). Diese experimentellen Ergebnisse und das intrazelluläre Vorliegen der Phytosterole lassen eine intrazelluläre Wirkung von Phytosterolen vermuten. Auch ein Einfluss auf die Veresterung von Cholesterol, die ApoB-Sekretion oder die Cholesterolsynthese wurde in Modellen gefunden (89). Dennoch ist der Metabolismus intrazellulär vorliegender Phytosterole und deren Effekte auf das Cholesterol-Handling nur wenig untersucht (89).

## 1.3 Regulation des zellulären Sterolhaushalts

### 1.3.1 Nukleärer Transkriptionsfaktor LXR

Liver X Rezeptoren (LXR) sind nukleäre Transkriptionsfaktoren, nach Aktivierung durch spezifische Liganden die Expression von Genen, insbesondere des Lipidstoffwechsels, regulieren (93). Es existieren mit LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  zwei Isoformen. Während LXR $\beta$  in nahezu allen Körperteilen exprimiert wird, beschränkt sich die Expression von LXR $\alpha$  vor allem auf Leber, Darm, Fettgewebe und Makrophagen. Die LXR-Subtypen sind in ihrer Sequenz sehr ähnlich und scheinen von denselben Liganden aktiviert zu werden (94;95). Als natürliche Liganden von LXR $\alpha$  und LXR $\beta$  werden seitenketten-hydroxylierte Cholesterolmetaboliten wie 22(R)-, 24(S)-, 27-Hydroxycholesterol und 24(S),25-Epoxycholesterol angesehen (96-98). Zudem existieren mittlerweile eine Reihe synthetischer, nicht-steroidaler LXR-Agonisten wie T0901317 oder GW3965 (99;100). Auch wurde kürzlich Glucose als LXR-Ligand postuliert (101). LXRs bilden mit einer weiteren Kategorie nukleärer Transkriptionsfaktoren, den Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), einen heterodimeren

Komplex. Als Ligand für RXR gilt u.a. 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA) (102). Nach Aktivierung durch Co-Aktivatoren und einer Dissoziation von Co-Repressoren (103) bindet der LXR/RXR-Komplex im Zellkern an das LXR-Response-Element (LXRE) in der Promoterregion eines LXR-Zielgens und vermittelt so die erhöhte Transkription des Gens. Als permissives Dimer führt schon die Aktivierung eines der beiden Transkriptionsfaktoren zu einer Steigerung der Transkription des Zielgens. Eine maximale Aktivierung ist jedoch nur durch die gleichzeitige Bindung eines Liganden an den jeweiligen Partner des LXR/RXR-Heterodimers erreichbar (94;102).

LXRs gelten als Schlüsselregulatoren des Lipidmetabolismus, insbesondere durch die Regulation des Stoffwechsels und der Homöostase von Cholesterin und Fettsäuren. Als Cholesterol-Sensoren regulieren LXRs die Expression einer Reihe von Genen, denen im zellulären Efflux, Transport und der Absorption und Exkretion von Cholesterin eine bedeutende Rolle zukommt. An der Vielzahl von identifizierten LXR-Zielgenen lässt sich die essentielle Bedeutung der LXRs erkennen (Tabelle 1.1) (94;104).

*Tabelle 1.1: Bedeutung ausgewählter LXR-Zielgene im Lipidstoffwechsel (nach (94;104))*

LXR-Zielgene	Bedeutung im Lipidstoffwechsel
ABCA1, ABCG5/ABCG8, ABCG1	Zellulärer Sterolefflux
CYP7A1	Gallensäurensynthese
CETP, LPL, ApoE, PLTP	Lipoproteinstoffwechsel
FAS, SREBP-1c	Lipogenese

In Tiermodellen steigerten synthetische LXR-Liganden den zellulären Cholesterolefflux aus peripheren Geweben und führten zu einer erhöhten fäkalen Sterolexkretion, verbunden mit einer Regression der Atherosklerose. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass LXR-Agonisten die HDL-Cholesterol-Konzentration im Plasma deutlich steigern und die intestinale Cholesterolresorption modifizieren können. Diese Effekte beruhen möglicherweise auf einer Beeinflussung der Expression der Steroleffluxtransporter wie ABCA1 und ABCG5/G8 in Darm und Makrophagen (38;94). Umgekehrt lässt sich in LXRa-Knockout Mausmodellen unter cholesterolreicher Nahrung eine erhöhte hepatische Lipidakkumulation feststellen. Zudem kommt es zu stark erhöhter LDL- und verminderter HDL-Plasmakonzentration (105).

Der regulatorische Einfluss auf den Cholesterolstoffwechsel macht die LXRs zu einem interessanten Ansatzpunkt für die Behandlung der Atherosklerose. So konnte anhand der zu Atherosklerose neigenden ApoE-/- oder LDLR-/- Mausmodelle sogar durch einen gewebsspezifischen knock-out von LXR im Knochenmark eine weitere signifikante Zunahme atherosklerotischer Läsionen gezeigt werden (106). Die

Behandlung von ApoE-/ oder LDLR-/Mäusen mit LXR-Agonisten führte dagegen zu einer Reduktion der Plaque-Ausdehnung um 34-53% (107). Da LXR-Agonisten allerdings auch über eine Aktivierung von SREBP-1c die Lipogenese stimulieren, kann es zu einer Erhöhung der Triglycerid-Konzentration im Plasma und Leber kommen (108). Jedoch wären mit der Entwicklung subtypenspezifischer oder gewebespezifischer LXR-Aktivatoren potente anti-atherosklerotische Pharmaka durchaus vorstellbar (109).

### 1.3.2 Oxysterole

#### 1.3.2.1 Oxycholesterole

Als Oxycholesterole werden oxidierte Derivate des Cholesterols bezeichnet, die mit einer oder mehreren funktionellen Sauerstoffgruppen versehen sind (Abbildung 1.3). Es kann sich dabei um eine Hydroxy-, Carboxyl-, Keto- oder Epoxygruppe handeln (110).

Mittlerweile ist eine Vielzahl von Hydroxycholesterol-Derivaten bekannt, denen unterschiedlichste biologische Effekte zugeschrieben werden. Dabei werden einerseits negative Effekte, wie die Beteiligung an Inflammationsvorgängen im Zusammenhang mit der Atheroskleroseentstehung oder Krankheiten wie Morbus Alzheimer diskutiert. Andererseits ist eine Anzahl von positiven Effekten beschrieben, wie beispielsweise den Einfluss auf die Regulation der Cholesterol-Biosynthese, der Cholesterol-Homöostase und der zellulären Sterolexkretion. Diese Effekte werden dabei hauptsächlich durch seitenketten-hydroxylierte Cholesterolmetaboliten in ihrer Rolle als LXR-Liganden vermittelt (6;111).

Oxycholesterole werden zum Teil mit der Nahrung aufgenommen oder endogen im Körper selbst gebildet. Dabei stellen cholesterolreiche Lebensmittel wie Milchprodukte, Fleisch oder Eier grundsätzlich eine potentielle Quelle für exogen zugeführte Oxidationsprodukte des Cholesterols dar. Besonders hohe Gehalte an Oxycholesterolen finden sich in verarbeiteten Produkten, v.a. wenn Verfahren wie Erhitzen unter hoher Temperatur zur Anwendung kommen (112).

Grundsätzlich können Oxycholesterole entweder durch nicht-enzymatische Autoxidationsvorgänge oder enzymatisch durch Umsatz mittels verschiedener Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen endogen im Organismus entstehen. Oxycholesterole lassen sich außerdem je nach Stellung der Sauerstoffgruppe prinzipiell in zwei Hauptkategorien einteilen: Oxycholesterole mit Stellung der Oxygruppe im Sterolringssystem und Oxycholesterole mit Stellung in der Sterolseitenkette. Dabei entstehen ring-oxidierte Oxycholesterole vorwiegend durch nicht-enzymatische Vorgänge. Eine Ausnahme stellt das  $7\alpha$ -Hydroxycholesterol und das 25-Hydroxycholesterol dar. Enzymatische Oxidation führt vornehmlich zu seitenketten-oxidierten Oxycholesterolen wie 24(S)-, 25- und 27-Hydroxycholesterol (110;111). Eine Sonderstellung nimmt das 24(S),25-Epoxycholesterol ein, da es nicht durch

autoxidative Vorgänge oder Monooxygenasen, sondern de-novo in einem Nebenweg der Cholesterolbiosynthese entsteht (113).

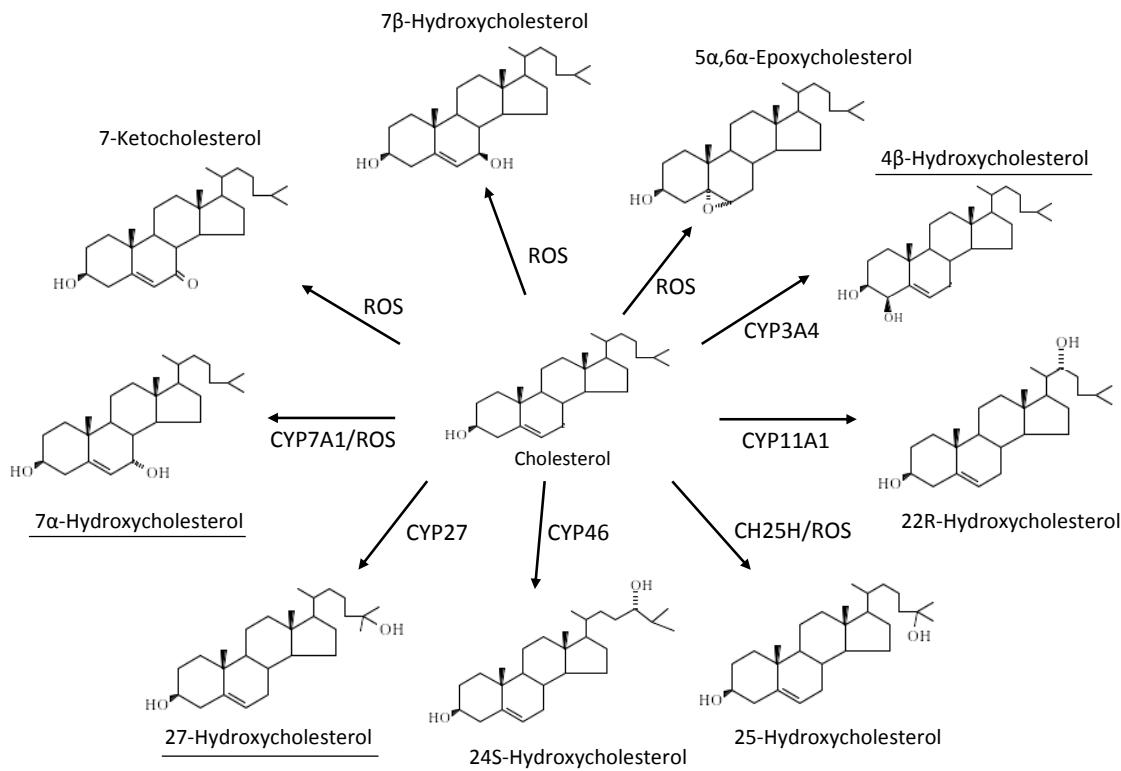


Abbildung 1.3: Strukturformeln ausgewählter Oxycholesterole. Endogen entstehende Oxycholesterole werden größtenteils enzymatisch durch verschiedene Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) katalysiert. Nicht-enzymatische Oxidation wird meist durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt. Die quantitativ bedeutsamsten Oxysterole im menschlichen Organismus sind unterstrichen (nach (114)).

Die quantitativ vorherrschenden Oxysterole im menschlichen Organismus sind 27-Hydroxycholesterol, 24-Hydroxycholesterol, 7α-Hydroxycholesterol und 4β-Hydroxycholesterol (115). 7α-Hydroxycholesterol stellt das erste Zwischenprodukt im klassischen Stoffwechselweg der Gallensäurebiosynthese dar. Das verantwortliche Enzym CYP7A1 ist dabei das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im klassischen Weg der Gallensäuresynthese. 7α-Hydroxycholesterol kann jedoch auch durch Autoxidationsvorgänge entstehen (6). 25-Hydroxycholesterol ist lediglich in geringen Mengen im Plasma vorhanden und kann entweder über Autoxidation oder enzymatisch über die Cholesterol-25-Hydroxylase entstehen (116). Besonders seitenketten-hydroxylierte Cholesterolmetaboliten wie 24(S)-, 27-Hydroxycholesterol und 27-Carboxycholesterol (Cholestensäure) sind aufgrund ihrer höheren Polarität wasserlöslicher als Cholesterol. Sie können die Zellmembran im Vergleich zu Cholesterol schneller passieren und aus extrahepatischen Geweben über den Blutkreislauf zur Leber transportiert werden. Dieser Mechanismus stellt eine

Alternative zum klassischen, über ABCA1 und HDL vermittelten, reversen Cholesteroltransport dar (117). Darüber hinaus ist 27-Hydroxycholesterol auch ein Zwischenprodukt des alternativen Stoffwechselwegs der Gallensäurebiosynthese (118).

Erst später wurde die Rolle von seitenketten-oxidierten Cholesterolmetaboliten als Liganden des Transkriptionsfaktors LXR erkannt (97). Dabei stellen die größtenteils durch CYP-Einfluss entstehenden Oxysterole 20(S)-, 22(R)-, 24(S)-, 25- und 27-Hydroxycholesterol und 24(S),25-Epoxycholesterol endogene LXR-Liganden dar. Diese Oxysterole vermitteln durch Aktivierung des LXR multiple Prozesse im Cholesterol- und Lipidmetabolismus (97;119).

Für einige Oxycholesterole wird dagegen eine pro-atherogene Wirkung diskutiert. Gerade durch Autoxidation entstandene Oxysterole wie 7-Ketocholesterol, 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholesterol, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholesterol, Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol konnten in atherosklerotischen Plaques und oxidiertem LDL nachgewiesen werden. Auch sind eine Reihe zytotoxischer Effekte dieser ring-oxidierten Oxycholesterole beschrieben (120-122).

### 1.3.2.2 Oxyphytosterole

Während oxidierte Derivate des Cholesterols inzwischen intensiv beforscht wurden, existieren über oxidierte Derivate der Phytosterole relativ wenige Daten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Cholesterol wird für Phytosterole eine ähnliche Oxidationsempfindlichkeit wie für Cholesterol angenommen (123). Eine Reihe ring-oxidierter Phytosterolderivate sind beschrieben, darunter die 7-Keto-, 4 $\beta$ -OH, 7 $\alpha$ -OH-, 7 $\beta$ -OH-, 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-, 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol-Metaboliten von Sitosterol und Stigmasterol (124;125). Es wird vermutet, dass diese ring-oxidierten Phytosterolderivate, ähnlich wie analoge Oxycholesterole, durch nicht-enzymatische Autoxidationsvorgänge entstehen (126). Für manche dieser Derivate wurde wie für Oxycholesterole eine giftige und pro-atherogene Wirkung postuliert (127;128). Im Gegensatz zu Cholesterol fehlen zur Oxidation von Phytosterolen im Organismus jedoch detaillierte Daten. Die Konversion von Cholesterol mittels Cytochrom P450 Monooxygenasen zu seitenketten-hydroxylierten Metaboliten und deren Rolle als LXR-Liganden ist gezeigt (97;119). Inwiefern jedoch analoge seitenketten-oxidierte Phytosterole gebildet werden und ob solche Oxymetaboliten biologische Effekte auf den Cholesterolstoffwechsel über ein Aktivierung von LXR ausüben können, ist unklar. Es wurde zwar mehrfach ein analoger Mechanismus vorgeschlagen (126;129), es existieren jedoch keine experimentellen Nachweise dafür.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Daraus ergeben sich zwei grundlegende Fragestellungen, deren Klärung die vorliegende Arbeit beizutragen versuchte:

1. Auf welcher Ebene kann die humane Zelle, im speziellen der humane Enterozyt, selektiv zwischen Cholesterin und pflanzlichen Sterolen unterscheiden um die systemische Aufnahme der pflanzlichen Sterole in den Körper zu begrenzen?
2. Sind für den cholesterolsenkenden Effekt der Phytosterole - neben der intraluminalen physico-chemischen Interaktion - zusätzliche intrazelluläre Mechanismen, etwa die Modulation der Oxysterol-LXR $\alpha$ -kontrollierten Cholesterolhomöostase im Enterozyten, verantwortlich?

Dies ist von erheblicher medizinischer Relevanz, da Phytosterole ohne sichere Kenntnis des Wirkmechanismus in breit verwendeten funktionellen Lebensmitteln Eingang in die Ernährung der Allgemeinbevölkerung gefunden haben, obwohl in der Modellerkrankung Sitosterolämie erhöhte Plasmaspiegel an Phytosterolen zu einer frühzeitigen Atherosklerose führen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte und Arbeitsmittel, Kits

##### Geräte und Arbeitsmittel

Alugram Sil G 60	Macherey-Nagel, Düren
Autoklav	Systec, Wetterberg
Flüssigszintillationszähler (LS 5801)	Beckman
DB5MS-Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm; 0,25-µm)	Macherey-Nagel, Düren
Eppendorf-Gefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Finnigan MAT TSQ 700	Finnigan MAT (jetzt Thermo Fisher, USA)
GeneQuant II	Amersham, Freiburg
Glasware	Neolab, Heidelberg
iCycler iQ Real-Time PCR Instrument	Bio-Rad, München
Infektionssystem CIS 3	Gerstel, Mülheim a.d. Ruhr
Lochrundplatten (6-well, 24-well, 96-well)	Sarstedt, Nümbrecht
Milli-Q Water Purification System	Millipore GmbH, Schwalbach
Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Neo Lab 16/18	Hermle Labortechnik, Wehingen
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Tubes 0,2 ml (Ultra thin wall)	Bioplastics, Landgraf
Pertrischalen (Ø 10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten	Gilson, Langenfeld,
Pipettenspitzen (2 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson, Langenfeld und Sarstedt, Nümbrecht
Poly-D-Lysine 96-well Microplates	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Skalpelle	Neolab, Heidelberg
Sterilbank GELAIRE BSB 4 <sup>a</sup>	Flow Laboratories, Michigan, USA

---

Sterile Spritzen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Sterilfilter 0,2 $\mu$ M Porengröße	Sartorius AG, Göttingen
Stickstoffbehälter	L'aire liquide, Champigny, F
Strata Si-1-Kartuschen (55 $\mu$ M, 70 A, 500 mg)	Phenomenex
T75-Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
TECAN-Reader	Genios
TEER-Messgerät EVOM mit STX-Elektrode	WPI-Europe, Berlin
Tracemaster 20 TLC scanner	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Transwell-Platten (0,4 $\mu$ M, 3 $\mu$ M Porengröße, Ø 4,67 cm <sup>2</sup> , Polykarbonatmembran)	Corning, Berlin
Varian 3400 Gaschromatograph	Varian, Palo Alto, USA
Varian 3800 Gaschromatograph	Varian, Palo Alto, USA
Varian Saturn 2200 ion trap	Varian, Palo Alto, USA
Varian Factor Four VF-5ms (30 m $\times$ 0,25 mm; 0,25- $\mu$ m)	Varian, Palo Alto, USA
Vortexer Heidolph Reax 2000	Heidolph
Waagen	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, München
Zellkulturflaschen	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3-C R	Kendro, Osterode
Zentrifuge Jonan MR 1822	Jonan, Unterhaching
Zentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen

### Kits

Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Endofree Maxi Kit	Qiagen, Hilden
LDH FS Kit	DiASys Diagnostic Systems, Holzheim
Nucleo Bond Kit	Macherey-Nagel, Düren

---

Nucleospin RNA II-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript Reverse Transcription-Kit	Qiagen, Hilden
Qproteome Mammalian Protein Preparation Kit	Qiagen, Hilden
QProteome Mitochondria Isolation Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien

22(R)-Hydroxycholesterol ( $\geq 98\%$ )	Sigma
22(S)-Hydroxycholesterol	Sigma
24(S),25-epoxycholesterol	Enzo Life Sciences, Lörrach
24(S)-Hydroxycholesterol	Enzo Life Sciences, Lörrach
25-Hydroxycholesterol	Sigma
27-Hydroxycholesterol	Steraloids oder Research Plus
9-cis retinoic acid	Sigma
Acrylamid	Sigma, Schnelldorf
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Anti-CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Antikörper anti-mouse-HRP	Amersham, Freiburg
Antikörper beta-aktin	Sigma
Antikörper CYP27A1 (P17)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Antikörper donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Beta-mercptoethanol	Sigma
Beta-Sitosterol ( $\geq 97\%$ )	Sigma
Beta-Sitosterol [22,23- $^3$ H] 40-60 Ci/mmol	Biotrend, Köln
BF <sub>3</sub> -Methanol	Thermo Fisher, Waltham, USA
Borsäure	Sigma
Bovines Serumalbumin	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Campesterol ( $\sim 65\% \alpha$ )	Sigma

---

Campesterol [23,24- <sup>3</sup> H] 40-60 Ci/mmol	Biotrend, Köln
CD (2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin)	Sigma
Cholensäure (24-COOH)	Steraloids, Newport
Cholesterol ( $\geq$ 98%)	Sigma
Cholesterol [1,2- <sup>3</sup> H(N)] 40-60 Ci/mmol	Biotrend, Köln
Cholesterolpalmitat [cholesteryl 1,2- <sup>3</sup> H(N)] 40-60 Ci/mmol	Biotrend, Köln
Cholesterolpalmitat	Sigma
CYP27A1 (P17) blocking peptide	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Delipidiertes FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Delipidiertes Humanserum	PAN Biotech, Aidenbach
DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat)	Sigma
Desmosterol ( $\geq$ 85%)	Sigma
DL Natrium-Isocitrat	Sigma
DMEM-Medium mit Glucose	PAN Biotech, Aidenbach
DMEM-Medium ohne Glucose	PAN Biotech, Aidenbach
DMSO	Sigma
DNA-Größenmarker	PeqLab Biotechnologies, Erlangen
EDTA	Sigma
Eisessig	Sigma
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma
External well factor Solution	Bio-Rad, München
FCS	PAN Biotech, Aidenbach
Ficoll-Dichtegradienten-Lösung	Biochrom, Berlin
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth, Karlsruhe
HBSS-Puffer (P04-32500)	PAN Biotech, Aidenbach
HEPES Puffer 1 M	Sigma
Isocitrat-Dehydrogenase	Sigma

Kaliumhydroxid	Sigma
LB-Medium	Sigma
Lipofectamine2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Bio-Rad, München
MEM non essential amino acid solution	Sigma
Monoolein	Sigma
MSTFA (N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoro-acetamid)	Macherey-Nagel, Düren
NADPH	Sigma
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-Taurocholat	Sigma
OptiMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Organische Lösungsmittel	Merck, Darmstadt
PBS mit Calcium und Magnesium (+/+)	PAN Biotech, Aidenbach
PBS ohne Calcium und Magnesium (-/-)	PAN Biotech, Aidenbach
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma
Phosphatidylcholin	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail (AEBSF, (104 mM), Aprotinin (80 µM), Bestatin (4 mM), E-64 (1.4 mM), Leupeptin (2 mM), Pepstatin A (1.5mM))	Sigma
Protein-Größenstandards	Bio-Rad, München
Random hexamer primer pd(N)6	GE Healthcare Europe, Freiburg
Rhodamin 123	Sigma
Rotiszint-Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	PAN Biotech, Aidenbach
SDS	Bio-Rad, München
Stigmasterol (~ 95%)	Sigma
SuperSignal Chemilumineszenz Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Silyl 911 (99% BSTFA + 1% TMCS)	Macherey-Nagel, Düren
T0901317	Sigma

TEMED	Sigma
TMSI (N-Trimethylsilylimidazole)	Sigma
Trimethylsulfoniumhydroxide (TMSH)	Macherey-Nagel, Düren
Trishydroxy-methylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA Solution 1X (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA)	Sigma
Tween 20	Sigma

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

Blockierungspuffer

100 ml TBS/Tween, 5% Magermilchpulver (v/w)

DEPC-Wasser

2 ml DEPC auf 1 L bidestilliertes Wasser (H2Odd) geben, 2 h inkubieren und anschließend autoklavieren

Laufpuffer

10-fach: 60 g THAM (Tris base); 288 g Glycin; 100 ml 20% SDS auf 2 L H2Odd  
80 ml Laufpuffer (10-fach) ad 800 ml H2Odd

Lower-Tris-Puffer

90,9 g Tris; 10 ml 20% SDS ad 10 ml H2Odd, auf pH 8,8 mit HCl einstellen

Probenpuffer

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

Sammelgel (3%)

3,25 ml H2Odd; 1,25 ml Upper-Tris-Puffer; 500  $\mu$ l Acrylamid; 30  $\mu$ l APS (10%); 5  $\mu$ l TEMED

TBE-Puffer

0,5 M Tris; 0,415 M Borsäure; 10 mM EDTA; H2Odd

TBST-Puffer

10 ml 1 M Tris ; 33 ml 5 M NaCl ad 1000 ml H2Odd; 0,1% Tween

Transferpuffer

3,03 g Tris; 14,4 g Glycin ad 800 ml H2Odd; 200 ml Methanol

### Trenngel

4,1 ml H2Odd; 2,5 ml Lower-Tris-Puffer; 3,33 ml Acrylamid; 60 µl APS (10%); 3,75 µl TEMED

### Upper-Tris-Puffer

6,06 g THAM (Tris base); 2 ml 20% SDS ad 100 ml H2Odd, auf pH 6,8 einstellen

### 3.1.4 Oligonukleotidprimer

Tabelle 3.1: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer

Primer	Länge Amplifikat	Sequenz
ABCA1	349 bp	f: 5'-TGA CAA GTC TGT GCA ATG GAT CAA-3' r: 5'-GAT ACG AGA CAC AGC CTG GTA GAT-3'
ABCG8	235 bp	f: 5'-CCG GGG GCT TCA TGA TAA ACT T-3' r: 5'-CTG AGG CCA ATG ACG ATG AGG TA-3'
Beta-aktin	153 bp	f: 5'-CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG-C-3' r: 5'-CAG AGG CGT ACA GGG ATA GC-3'
CYP27	311 bp	f: 5'-TGC GCC AGG CTC TGA ACC AG-3' r: 5'-TCC ACT TGG GGA GGA AGG TG-3'
GAPDH	250 bp	f: 5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA-3' r: 5'-TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3'

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

#### 3.2.1.1 Allgemeines

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Kultur aller verwendeten Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit. Die verwendeten Zellkulturgefäße waren aus Kunststoff und steril verpackt. Die Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

Die Lagerung der eukaryotischen Zelllinien erfolgte als Kryokultur in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden 4 x 10<sup>6</sup> Zellen gesammelt und mit 1,5 ml Einfriermedium (80% Kulturmediums, 10% FCS, 10% DMSO) versetzt. Nach Überführung in ein Kryoröhrchen wurden die Zellen 24 h bei -80°C gehalten und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen aus dem Stickstofftank

entnommen, kurz in einem Wasserbad angetaut und sofort in 15 ml Kulturmedium aufgenommen. Nach Abzentrifugieren der Zellen und Aufnahme in frischem Kulturmedium konnten die Zellen in Zellkulturflaschen verteilt werden.

### 3.2.1.2 Caco-2-Zellen

Kulturmedium C: DMEM-Medium, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 10% FCS

Die humane Karzinomzelllinie Caco-2 wurde ursprünglich aus dem humanen kolorektalen Adenokarzinom eines kauasischen Patienten isoliert. Nach Ausdifferenzierung weisen die adhärenten Zellen eine starke morphologische und funktionelle Ähnlichkeit zu humanen Dünndarmepithelzellen, den Enterozyten, auf. Bei Aussaat der Zellen auf permeablen Polycarbonatmembranen findet eine Differenzierung zu vollständig polarisierten, konfluenten Monolayern mit einem apikalen und einem basolateralen Membranbereich statt. Dies macht Caco-2-Zellen zu einem weit verbreiteten und akzeptierten Zellkulturmodell, um den Metabolismus von Testsubstanzen innerhalb der Dünndarmepithelzellen und den vektoriellen Transport von apikaler nach basolateraler Seite oder vice-versa durch das Dünndarmepithel in vitro zu untersuchen (130;131).

Die Kultivierung der Caco-2-Zellen erfolgte in T75-Zellkulturflaschen. Das Zellkulturmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Die Passage erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90%. Die Zellen wurden mit PBS(-/-) gewaschen, um Reste des im Medium enthaltenen FCS zu entfernen. Zum Ablösen wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 0,02% EDTA) für 2 min bei 37°C inkubiert und durch Klopfen von der Zellkulturflasche gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde mit Kulturmedium auf  $0,2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und für die Versuche in 6-well Lochrundplatten ( $0,15 \times 10^6$  Zellen/well) oder T75-Zellkulturflaschen ( $1 \times 10^6$  Zellen/Flasche) ausgesät.

Für Transportstudien wurden die Caco-2-Zellen auf eine Zelldichte von  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und davon 1,5 ml in 6-well Transwell-Platten mit einer Polykarbonatmembran (Porengröße von 0,4 µM,  $4,67 \text{ cm}^2$  Membranoberfläche) ausgesät. Um ein konfluentes Monolayer mit ausdifferenzierten Caco-2-Zellen zu erhalten wurden die Zellen ca. 21 Tage kultiviert, wobei jeden zweiten Tag das Kulturmedium erneuert wurde. Die Volumina betrugen auf der apikalen Seite 1,5 ml und auf der basolateralen Seite 2,5 ml. Die Integrität des Monolayers wurde durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands zwischen apikalem und basolateralem Kompartiment überprüft. Bei Erreichen von Widerständen  $\geq 400 \Omega$ , welche nur durch ein intakte Zellschicht erreichbar sind, wurden die Caco-2-Transwells für Transportversuche verwendet. Zellen mit Widerständen  $< 400 \Omega$  wurden nicht für die Transportexperimente verwendet. Die Integrität des Monolayers wurde vor und nach jedem Transportexperiment durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands überprüft.

Initial erfolgte auch eine Überprüfung der Dichtigkeit der Caco-2-Transwells mittels der Messung der Durchlässigkeit gegenüber dem Farbstoff Rhodamin 123. Der Transport bestimmter hydrophiler und schlecht permeabler Substanzen wie z.B. Natrium-Fluorescein und FITC-Dextran 4000 über ein intaktes Monolayer ist auf die parazelluläre Route begrenzt. Diese Substanzen eignen sich somit zur Überprüfung der Dichtigkeit und Integrität von Zellmonolayern (Artursson et al., 1996). Aus Gründen der Verfügbarkeit wurde alternativ Rhodamin 123 eingesetzt. Rhodamin 123 wird in absorptiver Richtung von apikal nach basolateral ausschließlich parazellulär transportiert und ist deshalb ebenfalls ein geeignetes Substrat für die Überprüfung der Dichtigkeit der Caco-2 Monolayer (132). Ein gängiger Parameter zur Beschreibung der Durchlässigkeit eines Zellmonolayers für bestimmte Substanzen ist der apparenre Permeationskoeffizient  $P_{app}$ :

$$P_{app} = \frac{dc}{dt} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{c_0} \cdot V_{Ak} \quad [cm/s]$$

$dc/dt$  = transportierte Stoffmenge pro Zeiteinheit, entspricht der Steigung der Regressionsgeraden des Auftrages Konzentration gegen Zeit [ $\mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{s}$ ]

$A$  = Fläche des Zellmonolayers [ $\text{cm}^2$ ], hier  $4,67 \text{ cm}^2$

$c_0$  = Ausgangskonzentration im Donorkompartiment [ $\mu\text{mol}/\text{L}$ ]

$V_{Ak}$  = Volumen des Akzeptorkompartiments [ $\text{cm}^3$ ]

Substanzen mit einem  $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  gelten als schlecht permeabel, mit einem  $P_{app}$  zwischen  $1-10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  als moderat permeabel und Substanzen mit einem  $P_{app} > 10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  als gut permeabel (131). Die Permeabilitätsprüfung wurde in Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS-Puffer) durchgeführt. Zu Beginn wurde das Medium in apikalem und basolateralem Kompartiment abgenommen und die Kompartimente zweimal mit HBSS-Puffer gespült. Auf der basolateralen Seite wurden 2,5 ml HBSS-Puffer vorgelegt und auf der apikalen Seite 1,5 ml HBSS-Puffer mit 50  $\mu\text{M}$  Rhodamin123. Nach definierten Zeitintervallen wurden aus dem basolateralen Akzeptorkompartiment 20  $\mu\text{l}$ -Aliquots entnommen und zur Fluoreszenz-Messung 1:10 mit 180  $\mu\text{l}$  HBSS-Puffer verdünnt. Die Fluoreszenz wurde im Mithras LB 940 gemessen (Ex 480 nm, Em 530 nm).

### 3.2.1.3 HepG2-Zellen

Kulturmedium HP: DMEM-Medium, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 10% FCS

Die Zelllinie HepG2 wurde ursprünglich aus einem humanen primären Hepatoblastom isoliert. Diese Zelllinie besitzt viele Funktionen, die für humane Hepatozyten

charakteristisch sind und stellt somit ein ideales und leicht handhabbares Modell zur Untersuchung von metabolischen Vorgängen in Leberzellen dar.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte analog der Kultivierung der Caco-2-Zellen in T75-Zellkulturflaschen. Nach Inkubation mit Trypsin-EDTA wurden die Zellen mit Medium HP auf  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und für die Versuche in 6-well Lochrundplatten ( $0,3 \times 10^6$  Zellen/well) ausgesät.

### 3.2.1.4 HEK 293-Zellen

Kulturmedium HK: DMEM-Medium, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren, 10% FCS

HEK 293-Zellen sind epitheliale humane embryonale Nierenzellen, denen durch Transformation mit einem humanen Adenovirus Typ 5 künstlich Charakteristika einer immortализierten Krebszelllinie gegeben wurden. Aufgrund der einfachen Handhabbarkeit in der Zellkultur und der sehr hohen Transfektionseffizienz wird diese Zelllinie häufig für Reportergenassays verwendet. Ein Nachteil ist jedoch die schlechte Adhärenz an Zellkulturplatten. Dies kann jedoch umgangen werden, indem Poly-D-Lysin-beschichtete Platten verwendet werden.

Die Kultivierung der HEK 293-Zellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen. Für Experimente zur Co-transfektion wurden 80-90% konfluent gewachsene Zellen trypsinisiert und in Medium HK ohne P/S und mit 5% FCS homogenisiert. Danach wurden die Zellen mit demselben Medium auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden je 0,1 ml dieser Suspension auf Poly-D-Lysin-beschichtete 96-well Lochrundplatten ( $1 \times 10^6$  Zellen/well) verteilt. Da Aussaat und Transfektion simultan erfolgten siehe hierzu auch Kapitel 3.6.4.

### 3.2.2 Etablierung des Caco-2-Transwell-Modells

In der Arbeitsgruppe wurden Caco-2-Zellen bisher rein als adhärente, unpolarisierte Zellkultur verwendet. Für die Verwendung der Caco-2-Zellen als Modellsystem für die intestinale Absorption von Cholesterin und Phytosterolen ist eine Differenzierung zu vollständig polarisierten, konfluenten Monolayern mit einem apikalen und einem basolateralen Membranbereich nötig. Ein essentielles Kriterium bei der Verwendung von Caco-2 Zellen als Modellsystem für die intestinale Absorption ist dabei die Sicherstellung der Integrität bzw. Dichtigkeit des Zellmonolayers (131;132).

Zur Überprüfung wurde initial das Transportverhalten des fluoreszenden Farbstoffes Rhodamin 123 von apikaler nach basolateraler Seite bestimmt. Caco-2 Zellen wurden auf Polykarbonatmembranen ausgesät und der transepitheliale elektrische Widerstand über die Kulturdauer weiterverfolgt. Nach 21 Tagen wiesen die Zellen einen transepithelialen Widerstand von  $> 400 \Omega$  auf und wurden für den Versuch verwendet.

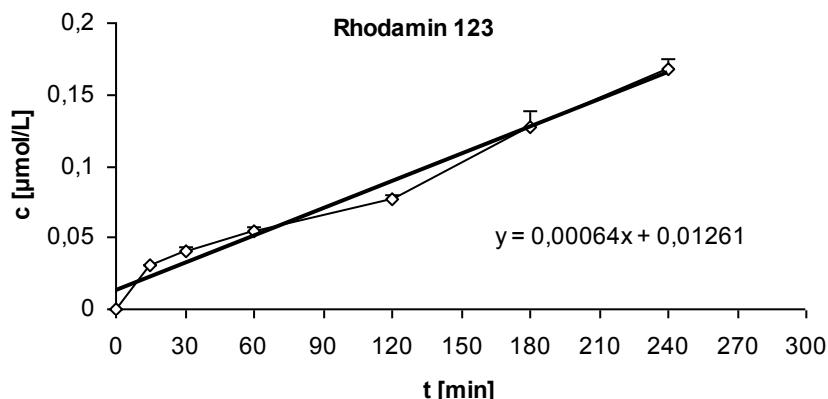


Abbildung 3.4: Akkumulation von Rhodamin 123 im basolateralem Kompartiment einer Caco-2 Transwell-Kultur nach apikaler Inkubation mit 50  $\mu$ M Rhodamin 123.  $n=6 \pm SEM$

Nach Auftrag der transportierten Menge an Rhodamin 123 pro Zeiteinheit wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden der apparte Permeationskoeffizient  $P_{app}$  (siehe 3.2.1.2) für Rhodamin berechnet. Der  $P_{app}$  betrug  $1,13 \times 10^{-7}$  cm/s und lag somit deutlich unter der in der Literatur angegebenen Grenze von  $1,0 \times 10^{-6}$  cm/s für schlecht permeable Substanzen (131).

### 3.2.3 Primäre humane Makrophagen

Kulturmedium M: RPMI 1640, 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 10% autologes Humanserum

Primäre humane Monozyten/Makrophagen wurden aus 200 ml peripherem humanem Vollblut isoliert. Die Blutabnahme erfolgte in 50 ml Spritzen, in welche zuvor 2 ml 4%-iges EDTA vorgelegt wurde, um die Blutgerinnung zu vermeiden. Zur Isolation wurde in ein 50 ml Röhrchen 15 ml Ficoll-Dichtegradienten-Lösung vorgelegt und darüber 30 ml Vollblut geschichtet. Zur Ausbildung des Dichtegradienten wurde die überschichtete Lösung ohne Bremse zentrifugiert (600 g, 20 min, 4°C). Der entstandene Interphasenring mit den dort angereicherten peripheren mononukleären Zellen wurde abgenommen, jeweils zwei Proben vereinigt und nach Auffüllen mit kaltem RPMI 1640 ohne Bremse zentrifugiert (600 g, 10 min, 4°C). Nach Vereinigung aller Zellsedimente wurden diese in 1,5 ml Monopuffer (PBS, 5 mM EDTA pH 7,4, 0,5% FCS) resuspendiert. 400  $\mu$ l anti-CD14 MicroBeads wurden zugefügt und der Ansatz für 15 min bei 4°C inkubiert. Das nahezu exklusiv auf Monozyten und Makrophagen exprimierte Oberflächenantigen CD14 bindet in diesem Schritt an die mit anti-CD14 Antikörper beschichteten magnetischen MicroBeads. Die Zellsuspension wurde nach der Inkubation auf Säulchen, welche in einem magnetischen Ständer eingespannt waren, überführt und mit 500  $\mu$ l Monopuffer gewaschen. Die CD14 positiven Zellen wurden

anschließend ohne Magnet mit 1 ml Monopuffer in ein mit 15 ml RPMI 1640 (+Penicillin/Streptomycin) gefülltes 50 ml Röhrchen eluiert, gewaschen und nach Aufnahme in 2 ml RPMI 1640 gezählt. Die so selektionierten Monozyten/Makrophagen wurden entweder in 6-well Lochrundplatten ( $1 \times 10^6$  Zellen/well) oder in 10 cm Petrischalen ( $4 \times 10^6$  Zellen) ausgesät. Da der überwiegende Teil der isolierten Zellen aus Monozyten besteht, wurden die Zellen für 1,5 h in humanserumfreiem RPMI 1640 kultiviert, wodurch eine Differenzierung aller Monozyten zu Makrophagen induziert wurde. Anschließend wurden die Makrophagen mit Kulturmedium M inkubiert und alle 3-4 Tage einem Mediumwechsel unterzogen.

### 3.2.4 Bakterienkultur

Als Bakterienstamm wurden in der Arbeit *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C in LB-Medium unter aeroben Bedingungen und unter kontinuierlichem Schütteln bei 160 U/min in Erlenmeyer-Kolben. Die für die Transformation benötigten hitze-kompetente *E. coli* wurden freundlicherweise von Frau Dr. Sabine Rode zur Verfügung gestellt. Zur Lagerung von *E. coli* wurden 1,5 ml einer Übernacht-Kultur mit 0,5 ml LB-Medium mit 40% Glycerin versetzt und in flüssigen Stickstoff gegeben. Die Lagerung erfolgte anschließend bei -80°C.

### 3.2.5 Mitochondrien-Isolierung

Die Isolierung hochreiner, metabolisch aktiver Mitochondrien erfolgte unter Verwendung des *QProteome Mitochondria Isolation Kit* (Qiagen) und wurde nach Hersteller-Protokoll mit den vom Hersteller bereitgestellten Pufferlösungen durchgeführt. Alle Arbeiten wurden bei 4°C ausgeführt.

Für die Mitochondrien-Isolierung wurden HepG2-Zellen in T75-Zellkulturflaschen ausgesät und über 3 Wochen vermehrt, bis ein hochkonfluenter Zellrasen vorlag. Die Zellen wurden mit PBS(-) gewaschen und Zellen aus 2 Kulturflaschen wurden in einem 15 ml Röhrchen zusammengeführt. Nach selektivem Aufbrechen der Plasmamembran mit Lysis-Puffer wurde der Überstand mit den zytosolischen Proteinen verworfen. Das resultierende Pellet mit den darin enthaltenen Zellmembranbestandteilen und intakten Zellorganellen wurde mithilfe eines Disruption-Puffers und mechanischem Reiz unter 10-maligem Aufziehen durch eine Spritze aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren von Zellkernen und Zellbruchstücken konnte der Überstand mit der darin enthaltenen mikrosomalen Fraktion und den Mitochondrien isoliert werden. Nach einem Waschschritt mit kaltem Aufbewahrungspuffer und erneutem Zentrifugieren lagen reine Mitochondrien im Pellet vor. Entgegen dem Protokoll des Herstellers wurden die Mitochondrien sofort in eiskaltem PBS(-) resuspendiert. Nach Abnahme eines Aliquots zu Bestimmung der Proteinkonzentration

wurden die Mitochondrien bei 4°C gelagert und am selben Tag für weitere Versuche verwendet.

### 3.3 Lipidchemische Methoden

#### 3.3.1 Lipidextraktion

Die Lipidextraktion aus Medium und Zellen erfolgte mittels einer modifizierten Methode nach Bligh und Dyer und nach einer Methode von Björkhem (133-135). Nach initialen Versuchen zur Extraktionseffizienz wurde sich in der vorliegenden Arbeit für die modifizierte Methode nach Bligh (135) bzw. Folch (136) als Methode der Wahl entschieden. Das Inkubationsmedium von kultivierten Zellen wurde abgenommen und zentrifugiert (1000 g, 5 min), um eventuell abgelöste Zellen abzutrennen. Die noch adhärenten Zellen wurden mit PBS(-/-) gespült, mit einem Zellschaber in 5 ml kaltes PBS(-/-) abgekratzt und mit 20 µl Protease Inhibitor Cocktail (AEBSF, (104 mM), Aprotinin (80 µM), Bestatin (4 mM), E-64 (1.4 mM), Leupeptin (2 mM), Pepstatin A (1.5mM)) versetzt. Nach einem Aufbrechen der Zellmembranen im Ultraschallbad (10 min, 4°C) wurden 20 µl für die Proteinmessung abgenommen. Für die modifizierte Methode nach Bligh/Folch wurde in ein 50 ml Glasrörchen mit Rundboden 6 ml Methanol vorgelegt. Zunächst wurden 10 µg 22-S-OHC, 10 µg Cholensäure und in manchen Fällen 10 µg Ergosterol als interne Standards zugesetzt. Ein 5 ml Aliquot des Mediums oder der Zellsuspension wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert (pH 3). Das zu extrahierende Medium oder die in PBS(-/-) gelöste Zellfraktion wurde in die Methanolphase gegeben. Diese Mischung wurde 5 min im Ultraschallbad gehalten. Nach Zugabe von 12,5 ml Chloroform und 0,15 M NaCl-Lösung wurde das Gemisch 10 min geschüttelt und für 1 min gevortext. Nach Zentrifugation (2000 g, 15 min) wurde die untere Phase mit einer Glaspipette abgenommen und in ein neues Glas überführt. Zu der zurückgebliebenen Phase wurde erneut 12,5 ml Chloroform gegeben und für 1 min gevortext und zentrifugiert (2000 g, 15 min). Nach Abnahme der unteren Fraktion wurde dieser Schritt nochmals wiederholt. Nach Zusammenführen aller unteren Phasen wurden diese unter Stickstoffstrom bei 40°C eingeengt. Für die Extraktionsmethode nach Björkhem wurden 10 ml Medium oder 5 ml Zellsuspension in PBS(-/-) mit 10 µg 22-S-OHC und 10 µg Cholensäure als interne Standards versetzt. Das Medium oder die Zellsuspension wurde mit 1 M Salzsäure angesäuert (pH 3) und 10 ml destilliertes Wasser und 30 ml Diethylether hinzugefügt. In einem Scheidetrichter wurde die Mischung intensiv 2 min geschüttelt. Nach Eintreten einer Phasentrennung wurde die untere, wässrige Phase abgelassen und nochmals gegen 30 ml Diethylether ausgeschüttelt. Der Vorgang wurde ein drittes Mal wiederholt, die Diethyletherphasen wurden vereint und im Rotationsverdampfer bei 40°C unter Vakuum (80 mbar) eingeengt.

### 3.3.2 Verseifung von Lipiden

Nach Auftrennung von Lipidextrakten mittels Dünnschichtchromatographie (DC) (siehe 3.4.1) wurden definierte Bereiche, deren  $R_f$ -Werte mit Ester-Standards korrelierten, von der DC-Platte eluiert. Das Eluat wurde in ein 50 ml Glasrörchen überführt und eingeengt. Durch Zugabe von 4,15 ml Methanol und 0,85 ml 5,88 M KOH wurde das Eluat in den basischen pH-Bereich (pH 14) gebracht. Nach Verdrängen des Sauerstoffs mit Stickstoff wurde die Lösung unter Rühren für 24 h bei RT inkubiert. Nach der alkalischen Hydrolyse wurde die Lösung mit Phosphorsäure auf pH 3 gebracht, mit jeweils 10 ml Chloroform und 5 ml 0,15 M NaCl-Lösung versetzt und extrahiert.

### 3.3.3 Komplexierung von Sterolen an Cyclodextrin

450 mg 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (CD) wurden in 1 ml destilliertem, steril-filtriertem Wasser gelöst, um eine 45%-ige (w/v) CD-Lösung herzustellen. Dies entsprach einer CD-Konzentration des Stocks von 322 mmol/L. In einem Glasvial wurden 3 mg Cholesterin, 3,109 mg Campesterol oder 3,217 mg Sitosterol vorgelegt und 2 ml der CD-Lösung dazugegeben. Nach 5 min im Ultraschallbad wurde die Lösung für 1 h bei RT geschüttelt. Für die Komplexierung von radioaktiv markierten Sterolen an CD wurde 13,7  $\mu$ Ci aufgereinigter  $^3$ H-markierter Steroltracer in einem Glasrörchen vorgelegt. Dazu wurde jeweils 1 ml des Sterol-CD-Komplexes gegeben. Nach 1 min im Ultraschallbad wurden die Lösungen für 30 min bei RT geschüttelt. Somit ergab sich für alle verwendeten  $^3$ H-markierten Sterol-CD-Komplexe eine Konzentration von 3,88 mmol/L mit einer spezifischen Aktivität von 3,53  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol Sterol.

### 3.3.4 Mizellenpräparation

Natrium-Taurocholat wurde in ein 50 ml Glasrörchen vorgelegt, Monoolein und Phosphatidylcholin wurden als Chloroform-Lösung hinzugefügt. Die Lösungsmittel wurden unter Stickstoffstrom abgedampft. Dann wurde DMEM-Medium dazugegeben, so dass die finalen Konzentrationen in der Lösung 5 mM Na-Taurocholat, 300  $\mu$ M Monoolein, 50  $\mu$ M Phosphatidylcholin waren. Die mizelläre Lösung wurde gevortext und für 30 min bei RT im Ultraschallbad gehalten. Zur Aufnahme von Cholesterin oder Sitosterol in die Mizellen wurde das jeweilige Sterol alleine oder in Kombination als Ethanol-Lösung in ein 50 ml Glasrörchen vorgelegt. Zur Markierung wurde  $^3$ H-Cholesterin oder  $^3$ H-Sitosterol in Ethanol (2-10  $\mu$ Ci, je nach zu präparierender Gesamtmenge) zugegeben. Nach Abdampfen des Ethans wurde mizelläre Lösung dazugegeben, gevortext und für 30 min bei RT im Ultraschallbad inkubiert. Die finale Sterolkonzentration betrug jeweils 50  $\mu$ M und die jeweilige spezifische Aktivität des  $^3$ H-markierten Sterols 4  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol Sterol.

### 3.3.5 Sterolumsatz in isolierten Mitochondrien

Cholesterol wurde als  $^3\text{H}$ -markierter Cholesterol-CD-Komplex (3.3.3) in einem 10 ml Glaskolben vorgelegt, so dass die Cholesterol-Endkonzentrationen in 500  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$  oder 240  $\mu\text{M}$  betrugen. Als NADPH-regenerierendes System fungierten DL Natrium-Isocitrat (5 mM), Isocitrat-Dehydrogenase (1 U) und NADPH (1 mM). Zuletzt wurden isolierte Mitochondrien (300  $\mu\text{g}$  Protein) zugegeben, der Reaktionsansatz mit PBS(-/-) auf 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 90 min bei 37°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml eiskaltem Ethylacetat-Hexan 1:1 (v/v) gestoppt. Die Sterole wurden im Anschluss durch dreimalige Extraktion gegen 3 ml Ethylacetat-Hexan 1:1 (v/v) extrahiert. Die Lösungsmittelphase wurde unter Stickstoffstrom abgedampft. Die Extrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie (3.4.1) aufgetrennt und mittels Radio-DC-Scanner nach  $^3\text{H}$ -markierten Umsatzprodukten untersucht (3.5.1). Für die Strukturidentifizierung wurden die Metaboliten von der DC-Platte eluiert und für die GC/MS präpariert. Für den Umsatz von Phytosterolen und zur Herstellung von seitenketten-hydroxylierten Phytosterolen mittels Biokonversion wurden ebenfalls isolierte Mitochondrienfraktionen verwendet. Phytosterole wurden als  $^3\text{H}$ -markierte Sterol-CD-Komplexe in einem 10 ml Glaskolben vorgelegt, so dass die Sterol-Endkonzentrationen in 500  $\mu\text{l}$  80 oder 160  $\mu\text{M}$  betrugen. Der Umsatz erfolgte analog des Cholesterolumsatzes. Nach Scannen der DC-Platte mittels Radio-DC-Scanner (3.5.1) wurden die Bereiche, in denen polare Metaboliten zu identifizieren waren, mit 3 x 5 ml Methanol:Essigsäure 98:2 (v/v) aus der Kieselgelmatrix der DC-Platte eluiert. Die Strukturidentifizierung und Quantifizierung erfolgte mittels GC/MS. Für Versuche zur Hemmung des Cholesterolumsatzes in isolierten Mitochondrienfraktionen wurden parallel zum  $^3\text{H}$ -markierten Cholesterol-CD-Komplex CD-Komplexe von Phytosterolen oder Desmosterol zum Reaktionsansatz gegeben. Die Endkonzentrationen der Phytosterole betrugen 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$  oder 240  $\mu\text{M}$  in 500  $\mu\text{l}$ . Um Effekte von unbeladenem CD auf die Hemmung auszuschalten, wurden Kontrollen mit  $^3\text{H}$ -markierten Cholesterol ohne Phytosterole, jedoch mit äquivalenter CD-Konzentration angesetzt. Als Negativkontrollen fungierten in allen Versuchen vollständige Reaktionsansätze ohne Mitochondrien.

### 3.3.6 Thermooxidation von Sterolen

5 mg des untersuchten Sterols wurden in einem 100 ml Glaskolben in 5 ml Chloroform gelöst. Unter Vakuum wurde das Chloroform in einem Rotationsverdampfer bei 37°C verdampft, so dass ein gleichmäßiger dünner Sterolfilm an der Innenfläche des Kolbens zurückblieb. Der Kolben wurde geöffnet für 1 – 24 h in einen luftventilierten Ofen gegeben. Nach Ablauf der Thermooxidation wurden die Sterole in Chloroform aufgenommen und über Festphasenextraktion (3.4.2) in Fraktionen unterschiedlicher Polarität aufgetrennt.

## 3.4 Analytische Methoden

### 3.4.1 Dünnschichtchromatographie

Lipidextrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) in Lipide unterschiedlicher Polaritäten aufgetrennt. Die Extrakte wurden in 2x10 µl Chloroform aufgenommen und mittels einer Glaskapillare punktförmig auf eine Dünnschichtplatte Alugram Sil G 60 (Macherey-Nagel) aufgetragen. Als Laufmittel wurde zu Beginn der experimentellen Arbeit Diethylether (DEE) verwendet, im weiteren Verlauf wurde Hexan:Ethylacetat 6:4 (v/v) oder Hexan:Ethylacetat 6:4 (v/v) mit 2% Essigsäure verwendet. Die Laufkammer wurde mit dem jeweiligen Laufmittel für 24 h ausreichend gesättigt. Nach Entwicklung der Platte im jeweiligen Laufmittel wurden die Platten getrocknet. Falls native Sterolmetaboliten als Standard aufgetragen wurden, wurde dieser Teil der DC-Platte mit 80%-iger Schwefelsäure fein besprüht, wodurch die Sterole als rötliche Flecken erkennbar wurden. Die Auswertung  $^3\text{H}$ -markierter Sterolmetaboliten erfolgte mittels Radio-DC-Scanner (3.5.1). Für die Isolierung von  $^3\text{H}$ -markierten Sterolmetaboliten von der DC-Platte wurden die korrespondierenden Bereiche mit einem Skalpell von der DC-Platte abgekratzt und mit 3 x 5 ml Methanol:Essigsäure 98:2 (v/v) aus der Kieselgelmatrix eluiert.

### 3.4.2 Festphasenextraktion

Zur Trennung von Lipidextrakten in Fraktionen unterschiedlicher Polarität und zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Sterolen wurde eine Festphasenextraktion (solid phase extraction; SPE) durchgeführt. Es wurden Strata Si-1-Kartuschen (Phenomenex) mit 500mg SiOH verwendet. Die SPE-Kartuschen wurden mit 4 ml Hexan konditioniert. Der Probenauftrag erfolgte in 3 x 50 µl Chloroform. Anschließend wurde die SPE-Kartusche mit 5 ml Hexan gewaschen. Im Anschluss erfolgte die schrittweise Elution der Sterolmetaboliten mit Hexan:Diethylether-Mischungen. Dabei wurde der Diethyletheranteil sukzessive erhöht was zu einer jeweils erhöhten Polarität des Lösungsmittelgemisches führte. Die Eluate wurden in separaten Glasröhrchen aufgefangen, die Lösungsmittel unter Stickstoff abgeblasen und mittels GC/MS analysiert.

Tabelle 3.2: Lösungsmittelgemische für die Auf trennung von Sterolen nach ihrer Polarität in der Festphasenextraktion

Hexan:DEE-Mischungsverhältnis	Polarität eluierter Sterolmetaboliten	Beispiel
Hexan:DEE 9:1	Apolar	Sterolester
Hexan:DEE 6:4	durchschnittlich polar	Cholesterin, Phytosterole
DEE	Polar	Seitenketten-hydroxylierte Sterolmetaboliten
DEE:Essigsäure 98:2	hochpolar	Carboxylverbindungen

### 3.4.3 Derivatisierung

Um die Flüchtigkeit der untersuchten Sterolmetaboliten für die GC zu erhöhen und somit das chromatographische Verhalten zu verbessern, wurden die Lipidextrakte und Referenzsubstanzen derivatisiert. Carboxylverbindungen wurden mit  $\text{BF}_3$ -Methanol (14% Bor-trifluorid in methanolischer Lösung) zu Methylestern konvertiert. Dazu wurden die Proben mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{BF}_3$ -Methanol versetzt und für 20 min bei 45°C inkubiert. Die Silylierung von Sterolen zu ihren Trimethylsilylether (TMS)-Derivaten erfolgte in 100  $\mu\text{l}$  Silyl 911 (99% BSTFA + 1% TMCS) für 1-2 h bei 45°C. Die Methylierung wurde teilweise auch mit 100  $\mu\text{l}$  TMSH für 1 h bei 60°C ausgeführt und die Proben anschließend in 400  $\mu\text{l}$  ACN gelöst und mit 100  $\mu\text{l}$  MSTFA:TMSI (80:20, v/v) für 1 h silyliert. Vor Silylierung und Methylierung wurde der Sauerstoff in den Reaktionsgefäßen mittels Stickstoff verdrängt. Zur Abtrennung der entstandenen Methylester wurde der Reaktionsansatz zweimal gegen 1 ml Hexan:Wasser (1:1) extrahiert. Für Lipidextrakte mit unbekannten Metaboliten wurde zuerst eine Methylierung durchgeführt, das Extrakt unter Stickstoff abgeblasen. Im Anschluss folgte eine Derivatisierung der Proben zu Trimethylsilylether-Derivaten. Da die Gegenwart von Feuchtigkeit bei der Silylierung zu geringen Ausbeuten und Instabilität der derivatisierten Analyten führt, war ein vorheriges vollständiges Trocken der Probe unter Stickstoffstrom hier essentiell.

### 3.4.4 Gaschromatographie/ Massenspektrometrie

Bei der Gaschromatographie werden flüchtige Substanzgemische über eine stationäre Phase entweder in mit feinkörnigem Trägermaterial gefüllten Säulen oder in innen beschichteten Kapillaren mit Hilfe eines inerten Trägergases (z.B. Stickstoff, Wasserstoff, Helium) in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt. Die Auswahl der GC-Säule bzw. Kapillare richtet sich in der Regel nach dem jeweiligen Trennproblem. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Steroltrennung vorrangig eine DB5MS-Kapillarsäule verwendet, welche mit einem Phenyl-Arylene-Polymer beschichtet ist.

Die Kapillarsäule befindet sich zudem in einem Säulenofen, wodurch eine entsprechende Variation der Temperatur zur Optimierung der Trennung ermöglicht wird. Die Detektion der Substanzen im Gasstrom erfolgt dann mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS). Die Massenspektrometrie stellt eine Analysetechnik zur Bestimmung der Molekülmasse pro Ladung freier Ionen im Hochvakuum dar. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle zur Erzeugung eines Strahls gasförmiger Ionen, einem Massenanalysator, welcher die entstandenen Ionen in einem Magnetfeld nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) auf trennt, sowie einem Verstärker und Detektor zur Intensitätsmessung der auftreffenden Ionen. Für den über die GC aufgetrennten Analyten lässt sich so auch die Häufigkeit, mit der bestimmte ionisierte Massenfragmente auftreten, ermitteln. Daraus können quantitative und qualitative Informationen über den Analyten gewonnen werden.

In der vorliegenden Arbeit waren die charakteristischen Ionen für die Quantifizierung für 22(S)-Hydroxycholesterol,  $m/z$  385; 27-Hydroxycholesterol,  $m/z$  456; Cholensäure,  $m/z$  370 und für Cholestensäure,  $m/z$  412. Da kein käuflicher Cholestensäure-Standard verfügbar war, wurde dieser Metabolit in der Annahme quantifiziert, dass das Fragment  $m/z$  412 in selber Proportion entsteht wie das analoge Fragment des internen Standards Cholensäure (24-COOH). Zur Identifizierung und Quantifizierung von Sterolen und Oxysterolen wurde ein Gaschromatograph (Varian 3400), gekoppelt mit einem Quadrupol-Massenspektrometer (Finnigan MAT TSQ 700) verwendet.

Die Analysebedingungen waren dabei:

Injectork:	CIS 3
	Injektionsvolumen: 1 - 5 $\mu$ l
	Injektionsmodus: splitless
	Injektortemperatur: 60°C für 6 s, auf 280°C bei Heizrate 10 °C/s, 280°C für 1 min
Säule:	DB5MS-Kapillarsäule
	Länge: 30 m
	Innerer Durchmesser: 0,25 mm
	Filmdicke: 0,25 $\mu$ m
Mobile Phase:	Helium
	Fluss: 1,1 ml/min
	Flussgeschwindigkeit: 40 cm/s
Ofen:	Temperaturprogramm:
	1. Temperaturstufe: 265°C, 2 min

2. Temperaturstufe: 310°C bei Heizrate 4.5°C/min, 310°C für 25 min

Transferline: Temperatur: 280°C

MS: Ionisierung: *electron impact* (EI)

Temperatur Ionenquelle: 150°C

Ionisierungsenergie: 70 eV

Multiplierspannung: 2600-3000 V

SCAN-Modus: m/z 90-600; Scanrate 0,5 scans/s

SIM-Modus: m/z der Fragmente der Standards oder der erwarteten Fragmente der gesuchten Metaboliten

Teilweise wurde als System auch ein Varian GC 3800 Gaschromatograph, ausgestattet mit einer Varian Factor Four VF-5ms Säule (30 m, 0,25 mm Innerer Durchmesser, 0,25 µm Filmdicke), gekoppelt mit einem Varian Saturn 2200 verwendet (Analysebedingungen: Injektortemperatur 250°C, Injektionsvolumen 1 µl, Injektionsmodus: splitless, mobile Phase: Helium 1,4 ml/min, Temperaturprogramm: 50°C für 1 min, auf 260°C bei 50°C/min, 2. Temperaturstufe 310°C bei Heizrate 4°C/min, 310°C für 5 min. Transfer line 270°C, Temperatur Ionenquelle: 200°C, MS full scan Modus (EI, 70 eV)).

## 3.5 Radiochemische Methoden

### 3.5.1 Tritiumdetektion

Nach der Auftrennung  $^3\text{H}$ -markierter Sterolmetaboliten mittels DC wurden die DC-Platten mit einem automatischen Radio-Dünnschicht-Scanner *Tracemaster 20 AutomaticTLC-Linear Analyzer* (Berthold) gescannt. Da die  $\beta$ -Strahlung von Tritium in der Luft nur wenige mm beträgt, ist ein Zählgas (90% Argon, 10% Methan) nötig. Die emittierte  $\beta$ -Strahlung der  $^3\text{H}$ -markierten Substanzen ionisiert Argon-Atome und die dabei freigesetzten Elektronen gelangen auf einen parallel zur Laufstrecke der DC verlaufenden, positiv geladenen Zähldraht. Durch Ableitung der Ladung lässt sich zum einen die Lage des  $\beta$ -Strahlers auf der DC-Platte feststellen. Eine Quantifizierung erfolgte über Integration der Zahl der pro Ortseinheit eingegangen Impulse über die gesamte Messzeit von 30 min. Somit wird der  $\beta$ -Strahler auf der gescannten Spur durch einen Peak definierter Lage und Höhe charakterisiert. Die erste Identifizierung der Metaboliten erfolgte über Vergleich der  $R_f$ -Werte mit parallel gemessenen Sterolstandards. Hierbei wurden sowohl  $^3\text{H}$ -markierte Sterole als auch unmarkierte Sterole verwendet. Bei unbekannten Metaboliten wurden die korrespondierenden Bereiche von der DC-Platte eluiert und mittels GC/MS analysiert.

Die Messung der Radioaktivität in Medium, Zellaufschlüssen in PBS und Lösungen in Chloroform oder Ethanol erfolgte in einem Flüssigszintillationszähler (LS 5801, Beckman). Es wurden 10 µl Aliquots in 5 ml Rotiszint-Szintillationsflüssigkeit gegeben und gevortext. Nach 30 min Äquilibrierung wurden die Proben im Flüssigszintillationszähler 2 min gemessen und die Aktivität als *desintegrations per minute* (dpm) angegeben.

### 3.5.2 Traceraufreinigung

Die  $^3\text{H}$ -markierten Steroltracer wurden vor ihrem Gebrauch auf ihre radiochemische Reinheit überprüft und falls nötig mittels Festphasenextraktion (3.4.2) aufgereinigt. Dabei wurden zuerst in einer Hexan:DEE-Fraktion 7,5:2,5 die apolareren Verunreinigungen der  $^3\text{H}$ -markierten Sterole abgetrennt. Die radiochemisch reinen Sterole eluierten dann mit einer Hexan:DEE-Fraktion 6:4. Nachfolgend wurde mit einer Hexan:DEE-Fraktion 5:5 eluiert, um Reste des reinen  $^3\text{H}$ -markierten Sterols weitgehend ohne polare Verunreinigungen zu erhalten. Die Kartusche wurde danach mit reinem DEE gespült. In der DEE-Phase befanden sich die polaren Verunreinigungen.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 Agarosegelektrophorese

Die Durchführung der Agarosegelektrophorese diente der Kontrolle und Abschätzung von Größe und Reinheit von DNA-Fragmenten. In Abhängigkeit der Größe der Fragmente werden üblicherweise Agarosekonzentrationen von 0,8-2% (w/v) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Agarosekonzentration von 1,5% (w/v) verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben mit 100 ml TBE-Puffer versetzt und durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und die Lösung in einer Gelkammer zu einem festen Gel ausgehärtet. Nach vollständigem Aushärten des Gels wurde eine Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer befüllt, so dass das Gel vollständig bedeckt war. Aufzutragende DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumina 5-fach DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels gegeben. Parallel dazu wurde ein DNA-Größenmarker mit definierten Molekulargewichten aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auf trennung erfolgte bei 80 - 110 Volt. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die Basen der DNA lässt sich die DNA unter UV-Licht (312 nm) visualisieren.

### 3.6.2 Transformation von *E.coli*

Ein 100 µl Aliquot kompetenter *E. coli* wurde auf Eis langsam angetaut und nach Zugabe von 50 ng Plasmid-DNA (pTK-LXREx3-luc, pCMX-hLXR $\alpha$  oder pGL4.74[hRluc/TK]) weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock

für 90 s bei 42°C und eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 100 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit dem selektiven Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch das im Plasmid enthaltene Resistenzgen gegen Ampicillin wurde eine positive Selektion transformierter *E. coli* erreicht.

### 3.6.3 Präparation von Plasmid-DNA und Sequenzierung

Über Nacht gewachsene Bakterienkolonien wurden mit einer Impföse von der LB-Agarplatte genommen. Dabei wurde eine Bakterienkolonie in 10 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Diese Starterkultur wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd weiter vermehrt. Für Midi-Präparationen wurden die Kulturen in 25-50 ml LB-Medium angesetzt, für Maxi-Präparationen in 100 ml LB-Medium. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation (6000 g, 10 min, 4°C). Aus dem Bakteriensediment konnte dann die Plasmid-DNA gewonnen werden.

Für die Aufreinigung kleiner Mengen zum Zwecke der Sequenzierung wurden Midi-Präparationen mit dem *Nucleo Bond Kit* (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die erhaltene DNA wurde in destilliertem Wasser gelöst. Die Aufreinigung großer, endotoxinfreier Mengen Plasmid-DNA zum Einsatz für Transfektionen erfolgte mit dem *Endofree Maxi-Preparationskit* (Macherey-Nagel). Die gereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend in einer entsprechenden Menge des im Kit enthaltenen TE-Puffers gelöst. Die Durchführung der Midi- und Maxi-Präparationen erfolgte jeweils gemäß Anleitung des Herstellers. Die Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration erfolgte photometrisch. (Konzentration RNA (µg/ml):  $A_{260\text{nm}} \times 50$  (Multiplikationsfaktor doppelsträngige DNA)  $\times 20$  (Verdünnungsfaktor bei Messung); Reinheit: Optische Dichte<sub>260 nm</sub>/optische Dichte<sub>280 nm</sub> = 1,8 - 2,0). Vor erstmaliger Verwendung eines Plasmides für Transfektionsversuche erfolgte eine Sequenzierung der Plasmid-DNA um die Richtigkeit des Inserts zu garantieren. Hierzu wurde 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zur Sequenzierung an die Firma Agowa Genomics (jetzt LGC Genomics, Berlin) versandt. Die Verifizierung der Sequenzen erfolgt mittels der Software BLAST.

### 3.6.4 Transfektion von HEK 293-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK 293-Zellen erfolgte mit dem Reagenz *Lipofectamine2000* (Invitrogen). Es wurden Poly-D-Lysin-beschichtete 96-well Lochrundplatten verwendet, um die Adhärenz der HEK 293-Zellen zu gewährleisten. Die DNA-Mengen der verwendeten Plasmidkonstrukte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Plasmidkonstrukte und transfizierte DNA-Mengen je well

Konstrukt	Menge [µg]
pTK-LXREx3-luc	0,2
pCMX-hLXR $\alpha$	0,05
pGL4.74[hRluc/TK]	0,004
<i>Total</i>	0,254

Zur Bereitung der Lipofectamine2000-DNA-Komplexe wurde die vorgelegte DNA (Tabelle 3.3) mit OptiMEM-Medium auf 25 µl aufgefüllt. Da immer mehrere wells einer 96-well Lochrundplatte transfiziert wurden, erfolgte dieser Ansatz als Master-Mix einem Eppendorf-Gefäß, hochgerechnet für die jeweilige Anzahl der wells. Nach kurzem Vermischen wurden je 25 µl dieser DNA-OptiMEM-Verdünnung pro well verteilt. In einem anderen Eppendorf-Gefäß wurde Lipofectamine2000 vorgelegt, mit OptiMEM auf 25 µl aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Das optimale Volumen an benötigtem Lipofectamine2000 muss individuell bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Menge der zu transfizierenden DNA in µg/well verdoppelt und diese Menge als Volumen in µl Lipofectamine2000 vorgelegt. Auch dieser Ansatz erfolgte als Master-Mix. Im Anschluss wurden je 25 µl dieser Lipofectamine2000-OptiMEM-Verdünnung zu den 25 µl in der 96-well Lochrundplatte vorgelegten DNA-OptiMEM-Verdünnung gegeben und durch vorsichtiges Bewegen der Platte vermischt. Nach 20 min Inkubation konnten sich in diesem Schritt die Lipofectamine2000-DNA-Komplexe bilden. Während der Inkubationszeit wurden 90% konfluente HEK 293-Zellen trypsiniert und in Medium HK ohne P/S und mit 5% FCS homogenisiert. Die Zellen wurden mit diesem Medium auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 100 µl der Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen) pro well der Lipofectamine2000-DNA-Komplexe verteilt und unter vorsichtigem Schütteln vermischt. Nach 36 h waren die Zellen für die Inkubation als Vorbereitung für den LXRE-Transaktivierungsassay bereit.

### 3.6.5 LXRE-Transaktivierungsassay

Für die Durchführung des LXRE-Transaktivierungsassays wurden die Komponenten des *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega) nach Herstellerprotokoll vorbereitet. Dies beinhaltete die Rekonstituierung des Substrates für die Firefly-Luziferase und das Versetzen des Puffers für die Renilla-Luziferase mit *Stop and Go*-Substrat. Die Messung der Lichtemission bei den Wellenlängen 540 nm (Firefly) und 480 nm (Renilla) erfolgte im Mithras-Luminometer LB 940 (Berthold). Transfizierte HEK 293-Zellen wurden 24 oder 36 h mit LXR-Standardagonisten und den zu testenden potentiellen LXR-Agonisten stimuliert. Als Medium wurde Medium HK ohne P/S mit 5% delipidiertem FCS verwendet, um Effekte von eventuell in FCS

vorhandenen Lipidkomponenten mit LXR- und/oder RXR-stimulierendem Charakter auszuschließen. Nach 24 h Inkubation mit den zu testenden Substanzen wurden die Zellen äußerst vorsichtig 1 x mit PBS(-/-) gewaschen und die Zellkulturplatte durch Umdrehen auf einem Papiertuch 5 min bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl passivem Lysepuffer (im Reagenzienansatz enthalten) für 15 min unter leichtem Schütteln lysiert. Die Zelllysate wurden mit einer 100 µl Pipette homogenisiert und 5 µl wurden in ein weiße 96-well Lochrundplatte gegeben. Nach automatisierter Zugabe von je 25 µl des Firefly-Substrates und des Renilla-Substrates erfolgte eine Messung der Lichtintensität und die Darstellung der Rohdaten als *relative light units* (RLU) im Mithras-Luminometer. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte durch Beziehung der RLU (Firefly) auf die RLU (Renilla) mittels Division.

### 3.6.6 RNA-Isolierung und reverse Transkription

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des *Nucleospin RNA II-Kit* (Macherey-Nagel) und wurde nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Alle Arbeiten mit RNA wurden in speziell dafür ausgewiesenen Bereichen und unter Verwendung von autoklavierten Einwegmaterialien und DEPC-Wasser ausgeführt, um eine Degradierung der RNA durch RNAasen und eine Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden. Für die RNA-Isolierung wurden Caco-2-Zellen in 6-well Lochrundplatten ( $0,15 \times 10^6$  Zellen) und primäre Makrophagen in 10 cm Petrischalen ( $4 \times 10^6$  Zellen) 24 oder 48 h nach Versuchsbeginn verwendet. Die Zellen wurden in 15 ml Röhrchen gesammelt und zentrifugiert (200 g, 5 min, RT). Im Anschluss erfolgte die Isolierung der RNA gemäß Hersteller-Protokoll. Dies beinhaltet zum einen die Lyse der Zellen unter denaturierenden Bedingungen und die Adsorption der RNA an eine Silikamembran in speziellen Zentrifugationsröhren. Nach Filtration und dem Entfernen von Resten genomicscher DNA mittels Verdau durch DNAase I folgten mehrere Waschschritte. Die gereinigte RNA wurde je nach Menge in 60-80 µl RNAse-freiem Wasser gelöst und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung des Reinheitsgrades und der Konzentration erfolgte photometrisch. (Konzentration RNA (µg/ml):  $A_{260\text{nm}} \times 40$  (Multiplikationsfaktor RNA)  $\times 20$  (Verdünnungsfaktor bei Messung); Reinheit: Optische Dichte<sub>260 nm</sub>/optische Dichte<sub>280 nm</sub> = 1,8-2,0). Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem *Omniscript Reverse Transcription-Kit* (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers mit den in Tabelle 3.4 beschriebenen Mengen und Volumina.

Tabelle 3.4: Protokoll Reverse Transkription

Substanz	Endkonzentration/Volumen
10-fach RT-Puffer	2 µl
dNTPs	200 µM
Random hexamer primer pd(N) <sub>6</sub>	20 µM
Reverse Transkriptase	4 U
RNA	1000 ng
RNAase-freies Wasser	variabel (Endvolumen 20 µl)

### 3.6.7 Quantitative Real-time RT-PCR

Die quantitative Real-time RT-PCR ermöglicht den Nachweis der RNA-Expression und die Evaluierung der Menge der exprimierten RNA, die durch ein spezifisches Gen kodiert wird. Somit können zum einen Aussagen über das Vorhandensein eines spezifischen Gens in Zellen oder Geweben getroffen werden. Darüber hinaus lässt sich über eine Quantifizierung der spezifischen RNA-Amplifikate die Expression eines Gens unter bestimmten Stimuli darstellen. Der Nachweis der zu cDNA umgeschriebenen RNA erfolgt dabei, im Gegensatz zur klassischen PCR, in Echtzeit. Fluoreszenzfarbstoffe, wie das in dieser Arbeit verwendete SYBR Green I, interkalieren in doppelsträngige DNA und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Emission (SYBR Green I: 480 nm) wird mittels einer CCD-Kamera gemessen. Nach jedem vollständigen PCR-Zyklus wird diese Emission gemessen und da die Fluoreszenz durch den interkalierenden Farbstoff proportional mit der Menge der PCR-Produkte ansteigt, ist eine Quantifizierung möglich.

Die Quantifizierung der Expression erfolgte in dieser Arbeit als relative Quantifizierung. Die Expression des Zielgens wurde dabei auf eine endogene Kontrolle (sog. *housekeeping-gene*) bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür β-Aktin und GAPDH verwendet. Zielgen und *housekeeping-gen* werden zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion als Ct-Wert (threshold cycle) gemessen. Dabei wird der Zyklus der PCR-Reaktion angegeben, bei der die SYBR-Green-Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz überschreitet.

Die relative Quantifizierung wurde mit der Delta-delta-Ct-Methode berechnet, wobei „Behandlung“ die Stimulation mit der zu untersuchenden Substanz ausdrückt:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{housekeeping-gen})$$

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

Die Werte wurden dann als n-fache Expression (fold change) im Vergleich zur Kontrolle mit folgender Formel berechnet:

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

Für die Durchführung der Real-time PCR wurden in der vorliegenden Arbeit ein iCycler (Bio-Rad) und das *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) verwendet. Dieser Master-Mix enthält bereits DNA-Polymerase (HotStarTaq *Plus*), Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP mix) und basiert auf einem speziellen Puffersystem (TrisCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl, MgCl<sub>2</sub>, Qiagen spezifisches, patentiertes Additiv „Q-Bond“). Dieses Puffersystem erhöht die Affinität der DNA-Polymerase zu einzelsträngiger DNA und ermöglicht damit einen äußerst kurzen *Annealing*-Schritt und eine Kombination von *Annealing*- und *Extension*-Schritt. Das verwendete Real-time PCR-Temperaturprotokoll und das Protokoll für den PCR-Reaktionsansatz sind in Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6 dargestellt.

*Tabelle 3.5: Real-time PCR-Temperaturprotokoll*

<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Aktivierung DNA-Polymerase	5 min	95°C
Denaturierung	10 s	95°C
Annealing/Extension	30 s	60°C
<i>Zyklenzahl: 40-45</i>		

*Tabelle 3.6: Protokoll PCR-Reaktionsansatz*

<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration/Volumen</b>
QuantiFast Master-Mix	12,5 µl
Primer ( <i>forward</i> )	100 nM
Primer ( <i>reverse</i> )	100 nM
cDNA	200 ng
RNAase-freies Wasser	variabel (Endvolumen 25 µl)

## 3.7 Proteinbiochemische Methoden

### 3.7.1 Extraktion von Gesamtprotein

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem *Qproteome Mammalian Protein Preparation Kit* (Qiagen) und wurde nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Alle Arbeiten wurden bei 4°C und unter Zugabe von Protease-Inhibitoren ausgeführt um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden. Die Proteinisolierung wurde nach den jeweiligen Versuchen mit Caco-2-Zellen, HepG2-Zellen und primären humanen Makrophagen durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden abgekratzt, in 1 ml eiskaltem PBS(-/-) aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße

überführt. In Petrischalen kultivierte primäre humane Makrophagen wurden in 5 ml eiskaltem PBS(-/-) aufgenommen und in 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (450 g, 5 min, 4°C) wurde das resultierende Pellet in Mamalian Lysis Puffer (mit Protease-Inhibitoren nach Protokoll versetzt) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (14000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen abgenommen, ein Aliquot zur Bestimmung der Proteinmenge abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

### 3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des *DC Protein Assay* (Bio-Rad) und wurde exakt nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Der Assay basiert auf der Reaktion von Protein mit Kupferionen in alkalischer Umgebung und einer darauf folgenden Reduktion des gelblichen Folin-Reagenz durch den Kupfer-Protein-Komplex zu einem bläulichen Komplex (*Lowry*), jedoch mit dem Vorteil eines zeitstabileren Farbumschlags. Nach einer Inkubationsdauer von 15 min erfolgte die Messung der Absorption der Proben bei 690 nm. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer analog behandelten BSA-Eichgerade. Die Eichgerade wurde aus einer BSA-Stammlösung (50 mg/ml) durch Verdünnung mit entsprechendem Lyse-Puffer hergestellt, um der Eigenfluoreszenz des Puffers Rechnung zu tragen.

### 3.7.3 Messung der zellulären Laktatdehydrogenase-Freisetzung

Zur Messung potentieller Zellschädigung durch die verwendeten Sterole wurde die Freisetzung des zytosolischen Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellkultur-Überstand gemessen. Die Bestimmung erfolgte photometrisch mit dem *LDH FS Kit* (DiaSys) nach Hersteller-Protokoll. Dabei wird Laktat unter Verbrauch von NAD<sup>+</sup> mittels LDH zu Pyruvat oxidiert. Das dabei entstehende reduzierte NADH/H<sup>+</sup> lässt sich durch eine Zunahme der Extinktion bei 340 nm je Zeiteinheit charakterisieren. Diese Zunahme ist dabei proportional zur Aktivität der LDH und somit proportional zur Anzahl geschädigter Zellen. Der Zellkultur-Überstand von Caco-2-Zellen und primären humanen Makrophagen wurde nach Versuchsende für die Lipidextraktion (3.3.1) abgenommen. Nach Zentrifugation des Überstandes (1000 g, 5 min) wurde ein Aliquot von 20 µl für den Assay verwendet. Die Bestimmung erfolgte je Probe als Doppelwert. Die Ergebnisse wurden als U/l ermittelt und als % LDH-Freisetzung angegeben:

$$\% \text{ LDH-Freisetzung} = [( \text{Messwert} - \text{LDH min} ) / ( \text{LDH max} - \text{LDH min} )] \times 100$$

Die minimale LDH-Freisetzung wurde dabei aus dem Überstand unbehandelter Kontrollproben (LDH min) bestimmt und die maximale LDH-Freisetzung wurde durch Behandlung mit 0,3% Triton X-100 (LDH max) ermittelt.

### 3.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) von mindestens drei Versuchen dargestellt. Bei Ergebnissen aus zwei Versuchen erfolgte die Darstellung als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD). Abweichungen davon wurden in den Bildunterschriften angegeben. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz zweier Mittelwerte erfolgte mit Hilfe des zweiseitig gepaarten Student's t-Tests oder des Wilcoxon-Rangsummen-Tests (Mann-Whitney-Test). Mehr als zwei Mittelwerte wurden mittels ANOVA oder mittels Kruskal-Wallis-Test, falls keine Normalverteilung gegeben war, verglichen. Post hoc-Tests wurden nach Holm-Sidak oder Dunn durchgeführt. Berechnungen erfolgten mit den Programmen SigmaStat und GraphPadPrism. Unterschiede mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Darstellung der Signifikanzniveaus: \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

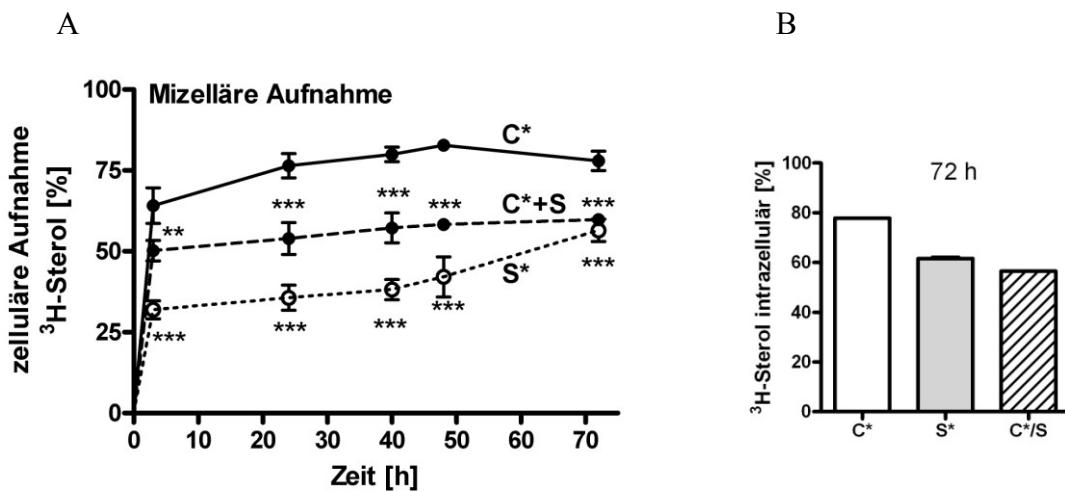
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Cholesterol- und Phytosterol-Handling in Enterozyten

Die Absorption der Nahrungssterole findet im Dünndarm statt. Als weit verbreitetes in vitro Modell steht die enterozytäre Caco-2-Zellline zur Verfügung. Diese Zelllinie eines Dickdarm-Karzinoms verhält sich ähnlich den Mukosazellen des Dünndarms und ist deshalb als enterozytäres Modellsystem gut geeignet. Die Resorption der Sterole von der luminalen Seite in die Enterozyten und die systemische Sekretion über die basolaterale Membranseite stellt den ersten Schritt im Metabolismus der Nahrungssterole dar. Um die Sterolabsorption in vitro zu simulieren, wurde zu Beginn der Arbeit überprüft, wie sich Cholesterol und Phytosterole im Caco-2-Zellmodell verhalten. Gleichzeitig sollte versucht werden, das Modellsystem zu vereinfachen, um mechanistische Effekte und Handling der einzelnen Sterole möglichst unabhängig von exogenen Einflüssen betrachten zu können.

#### 4.1.1 Mizelläre Sterolzugabe

Die Darreichung der Sterole in gemischten Mizellen stellt die physiologischste Form der Sterolzufuhr dar. Um das Caco-2-Zellmodell auf den in vivo bekannten Effekt der Phytosterole auf die fraktionelle Cholesterolabsorption zu untersuchen wurde einleitend die Aufnahme von mizellär gebundenem Cholesterol, Sitosterol und die Aufnahme von Cholesterol unter gleichzeitiger Anwesenheit von Sitosterol am Caco-2-Zellmodell untersucht (Abbildung 4.1). Es zeigte sich eine schnelle Aufnahme (>60%) von Cholesterol (50 µM) in die Caco-2-Zellen nach 3 h. Nach spätestens 24 h waren etwa 75% des Cholesterols intrazellulär vorhanden. Die Aufnahme stieg auch nach längerer Inkubationszeit nicht weiter an. Für Sitosterol (50 µM) zeigte sich eine zeitlich etwas verzögerte und insgesamt verminderte Aufnahme in die Enterozyten. Am Endpunkt der Inkubation nach 72 h waren etwa 53% des Sitosterol intrazellulär vorhanden. Das gleichzeitige Angebot von isomolarem Sitosterol und Cholesterol in den gemischten Mizellen führte zu einer Verringerung der Aufnahme von Cholesterol in die Enterozyten auf ca. 50% nach 3 h. Der Effekt blieb über den gesamten Zeitverlauf der Inkubation erhalten. Somit wurde Sitosterol zwar weniger als Cholesterol, aber doch in erheblichem Ausmaß in die Enterozyten aufgenommen.



**Abbildung 4.1: Aufnahme von mizellär gebundenen Sterolen in Caco-2-Zellen.** Caco-2-Zellen wurden mit Mizellen mit  $^3\text{H}$ -Cholesterin (durchgezogene Linie),  $^3\text{H}$ -Sitosterol (gepunktete Linie) oder  $^3\text{H}$ -Cholesterin mit unmarkiertem Sitosterol (gestrichelte Linie) für 72 h inkubiert und die zelluläre Aufnahme gemessen (A), Endpunktmessung nach 72 h (B); Sterolkonzentration 50  $\mu\text{M}$ ; spezifische Aktivität 4  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  Sterol; Mizellenbildende Substanzen: 5 mM Na-Taurocholat, 300  $\mu\text{M}$  Monoolein, 50  $\mu\text{M}$  Phosphatidylcholin,  $^3\text{H}$ -markierte Sterole sind mit \* gekennzeichnet.  $n=3 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

#### 4.1.2 Sterolzugabe als ethanolische Lösung

Die Darreichung der Sterole in gemischten Mizellen stellt jedoch ein System dar, in dem die Enterozyten zusätzlich zu den Sterolen hohen Konzentrationen der mizellenbildenden Substanzen Taurocholat, Monoolein und Phosphatidylcholin ausgesetzt sind. Um Einflüsse durch die anderen Komponenten der Mizellen auf den enterozytären Sterolstoffwechsel (137) zu vermeiden und den potentiellen Einfluss von Sitosterol auf das Handling von Cholesterin auch in einem mizellenfreien System zu untersuchen, wurden die Sterole in ethanolischem Lösung angeboten. Gleichzeitig sollte auch das Caco-2-Transwell-Modell eingeführt werden, um anhand konfluenter Monolayer aus differenzierten Caco-2-Zellen den vektoriellen Steroltransport, i.e. die apikale Aufnahme und die Sekretion in das basolaterale Kompartiment, getrennt zeigen zu können. In ethanolischem Lösung angebotenes Cholesterin (50  $\mu\text{M}$ ) wurde zu insgesamt 61% von den Caco-2-Zellen aufgenommen (Abbildung 4.2, A). Nach 24 h war die Cholesterolaufnahme in die Enterozyten mit 47% noch nicht vollständig abgeschlossen und war insgesamt langsamer als aus Mizellen. Für Sitosterol (50  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich eine etwa nur halb so hohe apikale Aufnahme in die Caco-2-Zellen als für Cholesterin. Nach 72 h Inkubation lagen aber 33% des Sitosterol intrazellulär vor. Die gleichzeitige Inkubation von isomolarem Sitosterol führte zu einer Reduktion der Aufnahme von Cholesterin in die Enterozyten um etwa 50%. Die basolaterale Sekretion von Cholesterin stieg über den gesamten Zeitverlauf bis 72 h kontinuierlich an (Abbildung 4.2, B). Die basolaterale Sekretion von Sitosterol war im Vergleich zu

Cholesterol um 50% reduziert und stieg über den Zeitverlauf der Inkubation ungeachtet der kontinuierlichen apikalen Aufnahme nur minimal an. Die basolaterale Sekretion von Cholesterol bei gleichzeitiger Inkubation mit Sitosterol blieb auf einem niedrigen Niveau und stieg während der Inkubationsdauer nur gering an. Insgesamt war die basolaterale Sekretion von Cholesterol unter diesen Bedingungen um 64% im Vergleich zu Cholesterol allein reduziert. Die Präferenz von Cholesterol gegenüber dem Phytosterol Sitosterol und die Cholesterol-Phytosterol Interaktion konnte demnach auch in Abwesenheit von Mizellen klar gezeigt werden.

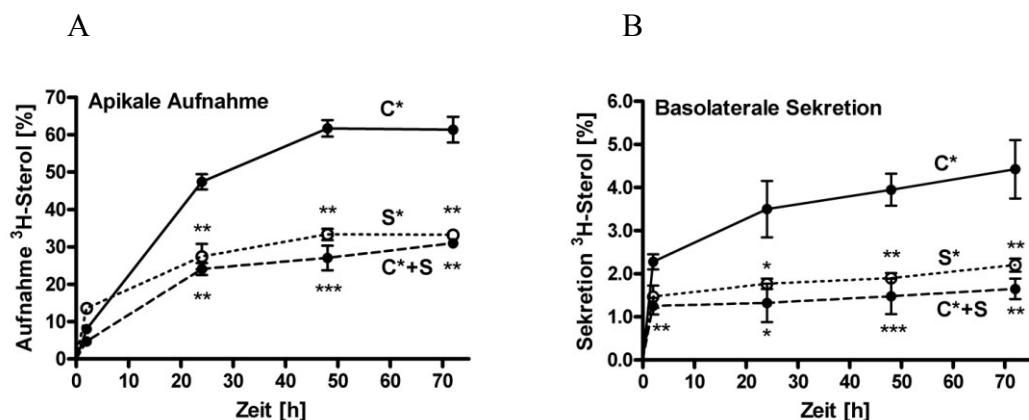


Abbildung 4.2: Aufnahme von Sterolen als ethanolische Lösung im Caco-2-Transwell-Modell. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit <sup>3</sup>H-Cholesterol (durchgezogene Linie), <sup>3</sup>H-Sitosterol (gepunktete Linie) oder <sup>3</sup>H-Cholesterol mit unmarkiertem Sitosterol (gestrichelte Linie) für 72 h inkubiert. Nach 2, 24, 48, 72 h wurde die apikale Aufnahme (A) sowie die basolaterale Sekretion (B) gemessen; Sterolkonzentration 50  $\mu$ M; spezifische Aktivität 3.5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol Sterol; <sup>3</sup>H-markierte Sterole sind mit \* gekennzeichnet.  $n=3-4 \pm$  SEM; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

#### 4.1.3 Sterolzugabe als Cyclodextrinkomplex

Um den intrazellulären Metabolismus und spezifische intrazelluläre Effekte vergleichen zu können, war für die weitere Untersuchung des zellulären Sterol-Handlings eine möglichst äquivalente intrazelluläre Konzentration von extern zugeführtem Cholesterol und Phytosterolen wünschenswert. Die Zugabe von Sterolen in ethanolischer Lösung kann aufgrund des hydrophoben Charakters der Sterole als kritisch betrachtet werden, da bei Verdünnung im hydrophilen Zellkulturmedium Mikrokristalle ausfallen könnten. Die Komplexierung von Sterole an 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (CD) stellt eine in der Literatur häufig beschriebene Maßnahme zu Erhöhung der Wasserlöslichkeit im Zellkulturmedium und der zellulären Verfügbarkeit von Sterolen dar (138). Um das Problem der Löslichkeit im Medium zu umgehen und gleichzeitig ein System ohne Mizelläre Komponenten zu etablieren, wurden Cholesterol und die Phytosterole Campesterol und Sitosterol an CD komplexiert und in dieser Form Caco-2-Zellen über 72 h angeboten (Abbildung 4.3).

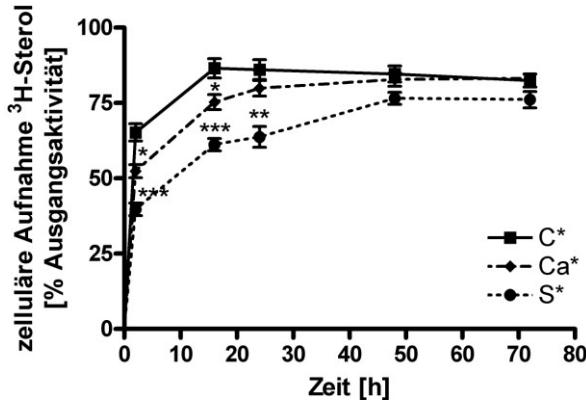


Abbildung 4.3: Aufnahme von Sterolen als CD-Komplex in Caco-2-Zellen. Caco-2-Zellen wurden mit den an CD komplexierten Sterolen  $^3\text{H}$ -Cholesterol (durchgezogene Linie),  $^3\text{H}$ -Campesterol (gestrichelte Linie) oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol (gepunktete Linie) für 72 h inkubiert und die zelluläre Aufnahme nach 2, 16, 24, 48, 72 h gemessen; Sterolkonzentration 50  $\mu\text{M}$ ; spezifische Aktivität 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  Sterol;  $^3\text{H}$ -markierte Sterole sind mit \* gekennzeichnet.  $n=3-5 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Cholesterol wurde effektiv und schnell in die Enterozyten aufgenommen. Nach 2 h waren bereits 69% des Cholesterols aufgenommen und nach 16 h war die Cholesterolaufnahme mit 91% am höchsten. Im weiteren Zeitverlauf kam es zu einem geringen Abfall durch Rücktransport  $^3\text{H}$ -markierter Cholesterolprodukte in das Zellkulturmedium. Campesterol und Sitosterol wurden langsamer aufgenommen als Cholesterol. Das Maximum der Aufnahme ab 48 h näherte sich aber dem Cholesterol an und bei 72 h Inkubationsdauer war die intrazellulär vorhandene Sterolmenge nahezu gleich.

#### 4.1.4 Sterolzugabe als Cyclodextrinkomplex im Transwell-System

Die intrazelluläre Handhabung der so vergleichbar zugeführten Sterole sollte auch im Caco-2 Transwell-Modell überprüft werden. Die initialen Versuche wurden in lipidfreier Umgebung in DMEM-Medium mit delipidiertem FCS durchgeführt, um das Sterol-Handling möglichst exklusiv ohne Einfluss weiterer Lipidkomponenten betrachten zu können.

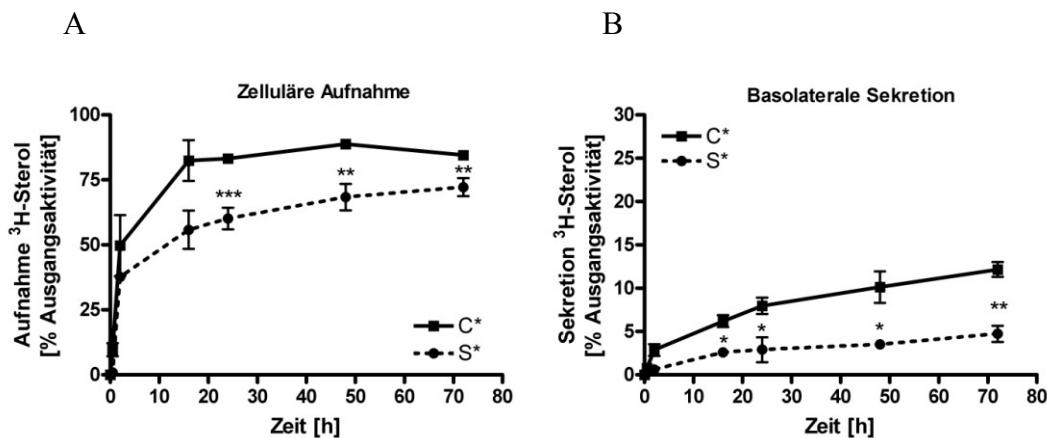


Abbildung 4.4: Aufnahme und Sekretion von Sterolen als CD-Komplex im Caco-2-Transwell-Modell. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol (durchgezogene Linie),  $^3\text{H}$ -Sitosterol (gepunktete Linie) für 72 h in DMEM-Medium mit 10 % delip. FCS inkubiert. Nach 2, 24, 48, 72 h wurde die apikale Aufnahme (A) sowie die basolaterale Sekretion (B) gemessen; Sterolkonzentration 50  $\mu\text{M}$ ; spezifische Aktivität 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  Sterol;  $^3\text{H}$ -markierte Sterole sind mit \* gekennzeichnet.  $n=3-4 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Ca. 80% des Cholesterols wurden in den ersten 24 h der Inkubation in die Enterozyten aufgenommen. Nach 48 h war die Aufnahme von Cholesterol mit ca. 90% abgeschlossen. Die zelluläre Aufnahme von Sitosterol als CD-Komplex war mit 71% nach 72 h etwas geringer als die von Cholesterol. Resorbiertes Cholesterol wurde auf der basolateralen Seite kontinuierlich sezerniert und erreichte 10,4% des auf der apikalen Seite eingesetzten Cholesterols. Sitosterol wurde mit 5,4% in geringerem Maße über die basolaterale Membranseite sezerniert. Obwohl die Sitosterolaufnahme von apikaler Seite nach 72 h nur um 14% geringer als Cholesterol war, wurde Sitosterol zu rund 60% weniger effektiv als Cholesterol auf die basolaterale Seite der Enterozyten transportiert. Selbst bei durch CD-Komplexierung erzwungener apikaler Aufnahme von Cholesterol und Sitosterol bleibt bei der basolateralen Sekretion ein deutlicher Unterschied erhalten.

#### 4.1.5 Einfluss von Sitosterol auf das Cholesterol-Handling

Um unter diesen Bedingungen den Einfluss von Sitosterol auf das Cholesterol-Handling in Enterozyten zu untersuchen, wurden Caco-2-Zellen im Transwell-System für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$  Cholesterol (C) oder 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol (S) in Kombination mit reinem  $^3\text{H}$ -Cholesterol (c\*) oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol (s\*) (50 mCi/ $\mu\text{mol}$ , chemische Konzentration 4 nM) unterlegt, inkubiert. An unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die apikale Absorption sowie die basolaterale Sekretion des markierten  $^3\text{H}$ -Sterols gemessen.

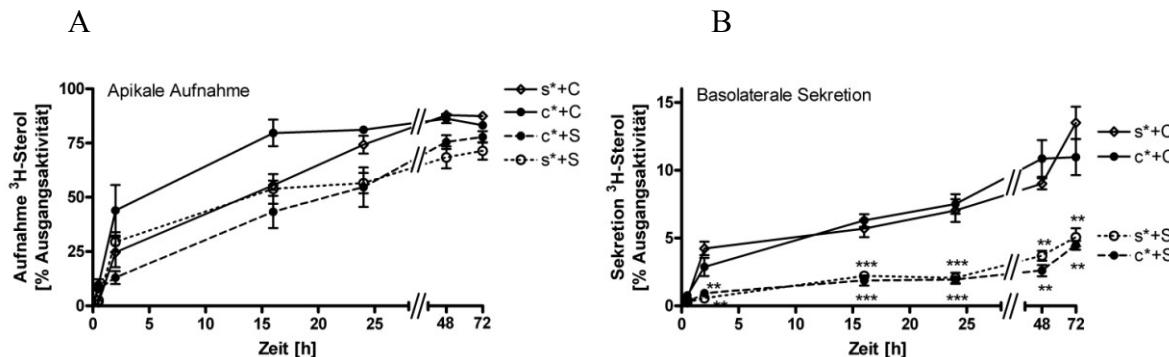


Abbildung 4.5: Einfluss von Cholesterin und Sitosterol auf das Handling von  $^3\text{H}$ -Cholesterin und  $^3\text{H}$ -Sitosterol im Caco-2-Transwell-Modell. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit 4 nM  $^3\text{H}$ -Cholesterin + 50  $\mu\text{M}$  Cholesterin (durchgezogene Linie, ●;  $\text{c}^*+\text{C}$ ), 4 nM  $^3\text{H}$ -Cholesterin + 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol (gestrichelte Linie, ●;  $\text{c}^*+\text{S}$ ), 4 nM  $^3\text{H}$ -Sitosterol + 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol (gepunktete Linie, ○;  $\text{s}^*+\text{S}$ ) 4 nM  $^3\text{H}$ -Sitosterol + 50  $\mu\text{M}$  Cholesterin (durchgezogene Linie, ◇;  $\text{s}^*+\text{C}$ ) für 72 h in DMEM-Medium mit 10 % delip. FCS inkubiert. Nach 0.5, 2, 16, 24, 48, 72 h wurde die apikale Aufnahme (A) sowie die basolaterale Sekretion (B) gemessen; spezifische Aktivität der Tracer 50 mCi/ $\mu\text{mol}$ ;  $^3\text{H}$ -markierte Sterole sind mit \* gekennzeichnet.  $n=3-5 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Das Handling von  $^3\text{H}$ -Sitosterol (4 nM) bei gleichzeitiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Cholesterin ( $\text{s}^*+\text{C}$ ) entsprach dem Handling von  $^3\text{H}$ -Cholesterol (4 nM) mit 50  $\mu\text{M}$  Cholesterin alleine ( $\text{c}^*+\text{C}$ ) (Abbildung 4.5). Die  $^3\text{H}$ -Sitosterolabsorption war unter diesen Bedingungen im Vergleich zur Absorption von  $^3\text{H}$ -Cholesterol geringfügig verzögert, jedoch nach 24 h mit etwa 70% annähernd gleich. Die basolaterale Sekretion von  $^3\text{H}$ -Sitosterol war trotz dieser zeitlich verzögerten Aufnahmekinetik über den gesamten Zeitverlauf auf demselben Niveau der basolateralen Sekretion von  $^3\text{H}$ -Cholesterol alleine. Im Gegensatz dazu war die basolaterale Sekretion von  $^3\text{H}$ -Sitosterol bei gleichzeitiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol ( $\text{s}^*+\text{S}$ ) signifikant geringer.

Es zeigte sich ein unterschiedliches Handling des  $^3\text{H}$ -Cholesteroltracers bei gleichzeitiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Cholesterin ( $\text{c}^*+\text{C}$ ) oder 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol ( $\text{c}^*+\text{S}$ ) (Abbildung 4.5). Sitosterol verzögerte unter diesen Bedingungen die  $^3\text{H}$ -Cholesterolabsorption und reduzierte sie über den gesamten Zeitverlauf. Der Effekt war jedoch zwischen 2 und 24 h deutlicher ausgesprochen. Auch die basolaterale Sekretion von  $^3\text{H}$ -Cholesterol wurde durch die Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol signifikant verringert. Die Hemmung der basolateralen Sekretion von 65% nach 48 h konnte dabei nicht allein durch die verringerte apikale Aufnahme (~30%) erklärt werden. Das Handling der  $^3\text{H}$ -markierten Sterole in nanomolarer Konzentration folgte insgesamt weitgehend dem Handling des dominierenden begleitenden Sterols in mikromolarer Konzentration. Bei nanomolaren Konzentrationen ist der Enteroyztt augenscheinlich nicht in der Lage, zwischen Sterolen zu unterscheiden. Für die Selektivität der Sterolabsorption und die

effektive Interaktion von Cholesterol mit Sitosterol müssen offensichtlich höhere zelluläre Sterolkonzentrationen vorliegen. Dies spricht gegen eine direkte Spezifität der Aufnahme- und Sekretionstransporter und für eine Rolle von regulatorischen oder metabolischen Zwischenschritten bei den Phytosterol-Effekten. Deshalb wurde im Folgenden nach Metaboliten der aufgenommenen Sterole und ihren biologischen Effekten gesucht.

## 4.2 Etablierung und Optimierung der Lipidextraktion und Lipidanalytik

### 4.2.1 Lipidextraktion

Die Extraktion von Lipiden unterschiedlicher Polarität aus Zellen und Medium stellt häufig eine wesentliche Fehlerquelle in der Lipidanalytik dar. Die Herausforderungen hierbei sind zum einen die Entfernung der Nicht-Lipide aus der zu untersuchenden Probe ohne den gleichzeitigen quantitativen Verlust von Lipiden und zum anderen die Tatsache, dass die optimale Extraktion einer spezifischen Lipidklasse nicht zwangsläufig die Extrahierbarkeit anderer Lipidklassen sicherstellt, da Extraktions-Methoden unterschiedlich selektiv für die Lipidanalyten sein können. Die Extraktionsmethodik wurde deshalb zu Beginn für die weiteren Schritte der vorliegenden Arbeit validiert und optimiert. Voraussetzung für die Suche nach unbekannten Sterolmetaboliten war eine Extraktion möglichst der gesamten Sterolfraktionen, sowohl polarer als auch apolarer Derivate, in quantitativer Weise.

Basierend auf Extraktionsprotokollen nach Björkhem (133;134), Bligh (135) und Folch (136) wurden die Extraktionseffizienzen von  $^3\text{H}$ -markiertem Cholesterol und dem  $^3\text{H}$ -markierten polaren Oxysterol 22(R)-Hydroxycholesterol bestimmt und schrittweise optimiert. Für diese initialen Versuche wurde 10 ml DMEM-Medium (10% FCS) mit 1  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol supplementiert. Nach der Methode von Björkhem wurde das Medium zuerst gegen ein 3-faches Volumen an Diethylether im Scheidetrichter extrahiert. Optisch ließ sich nach 2-minütigem Ausschütteln der Proben eine sehr gute Phasentrennung zwischen wässriger und Diethylether-Phase beobachten. Jedoch befand sich nach dreimaliger Wiederholung noch mehr als die Hälfte des  $^3\text{H}$ -Cholesterols in der wässrigen Phase und nur 46% in der DEE-Phase (Abbildung 4.6).

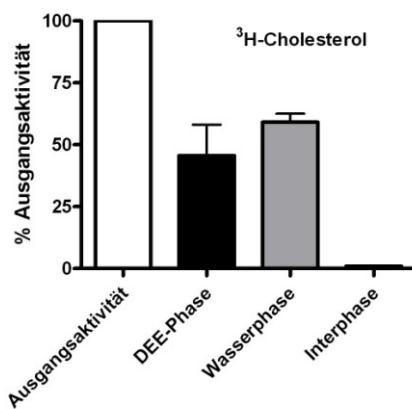


Abbildung 4.6: Verteilung von  $^3\text{H}$ -Cholesterin in Dieethyletherphase, Wasserphase und Interphase nach Extraktion von 10 ml DMEM-Medium nach der Methode von Björkhem (134).  $n=3 \pm \text{SEM}$ .

Um eine bessere Extraktionseffizienz zu erreichen wurde daraufhin die Methode von Bligh und Dyer angewendet (Abbildung 4.7, A). Die Extraktion gegen Chloroform und Methanol führte zu einer Verteilung von 65% des  $^3\text{H}$ -Cholesterols in die Chloroformphase. Jedoch fand sich mit ca. 35% weiterhin ein erheblicher Teil der Aktivität in der zähflüssigen Interphase zwischen der Chloroformphase und wässrigen Phase wieder und war selbst nach dreimaliger Wiederholung für die Extraktion unzugänglich. Eine Modifizierung der Methode durch Erhöhung des Chloroformvolumens führte zu einer Verlagerung des Cholesterols aus der Interphase in die Chloroformphase (Abbildung 4.7, B). Die Phasentrennung war auch optisch deutlich verbessert. In der Interphase befanden sich nun noch 17% der Ausgangsaktivität, die Extraktionseffizienz konnte so auf über 80% gesteigert werden. Eine weitere Verbesserung sollte durch Zugabe von 0,15M NaCl-Lösung und Erhöhung des Methanolvolumens erreicht werden (Abbildung 4.7, C). Für eine genauere Evaluierung wurden die Phasen nach erstem und zweitem Extraktionsschritt getrennt aufgefangen und gemessen. Es fand sich nur ein kleiner Teil des  $^3\text{H}$ -Cholesterol in den Wasserphasen und der Interphase wieder. Mit einer Extraktionseffizienz von insgesamt 91% war jetzt fast das gesamte eingesetzte  $^3\text{H}$ -Cholesterol in der Chloroformphase vorhanden.

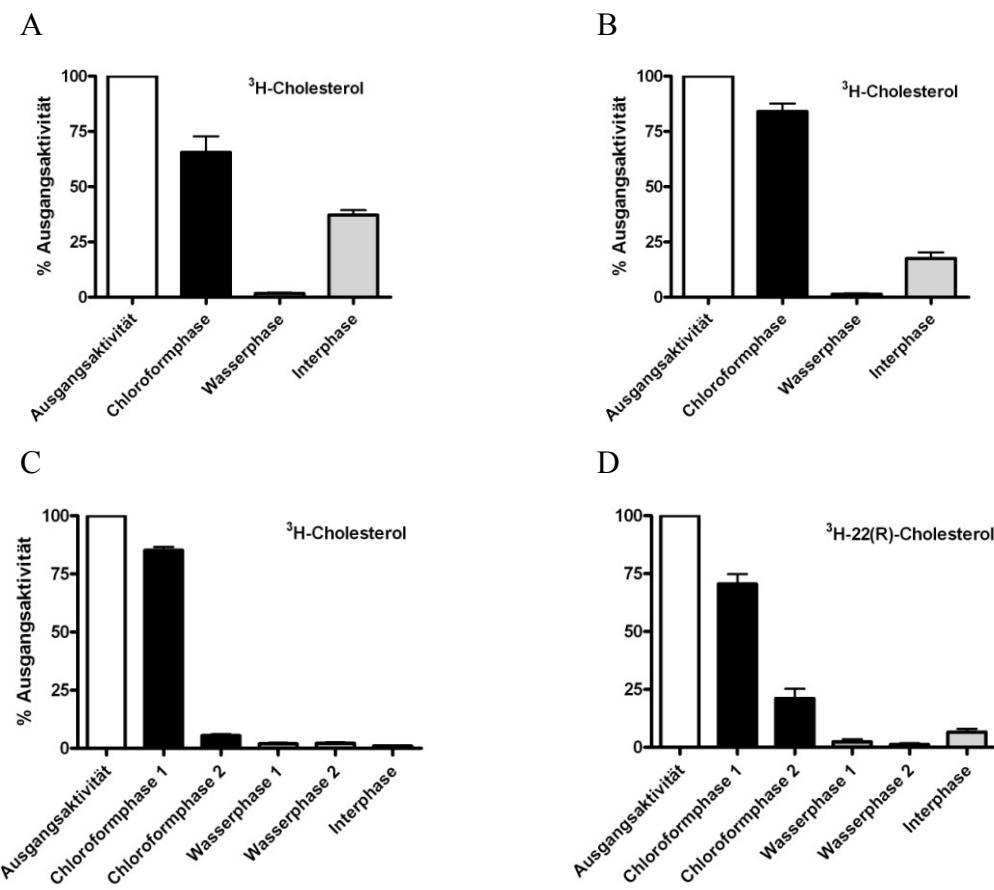


Abbildung 4.7: Verteilung von  $^{3}\text{H}$ -Cholesterol (A,B,C) und  $^{3}\text{H}$ -22(R)-Hydroxycholesterol (D) in Chloroformphase, Wasserphase und Interphase nach Extraktion von 10 ml DMEM-Medium nach der Methode von Bligh und Dyer (135) (A), modifiziert mit erhöhtem Chloroformvolumen (B), und modifiziert mit erhöhtem NaCl und Methanolvolumen (C,D).  $n=3-4 \pm \text{SEM}$ .

Um eine selektive Extraktion von Sterolen mittlerer Polarität auszuschließen, wurde die für Cholesterol optimierte Extraktionsmethode auch für das polarere Oxysterol  $^{3}\text{H}$ -22(R)-Hydroxycholesterol überprüft (Abbildung 4.8, D). Die Extraktionseffizienz betrug insgesamt ebenfalls über 90%. Die Verluste in die wässrige Phase lagen unter 4%. Die in dieser Arbeit etablierte Extraktionsmethode war demnach für eine parallele quantitative Extraktion nativer Sterole und Oxysterole geeignet.

#### 4.2.2 Traceraufreinigung

Für die sichere Entdeckung der zellulären Metabolisierung von radioaktiv markierten Sterolen war das Vorliegen von Steroltracern mit hoher radiochemischer Reinheit ohne kontaminierende Störpeaks von besonderer Bedeutung. Die gekauften Steroltracer wurden dazu dünnenschicht-chromatographisch aufgetrennt und mittels Radio-DC-Scanner nach  $^{3}\text{H}$ -markierten Verunreinigungen untersucht. Dabei ergaben sich radiochemische Reinheiten von 93 – 97% für Cholesterol-[1,2- $^{3}\text{H}$ (N)], 92 – 98% für Beta-Sitosterol-[22,23- $^{3}\text{H}$ ] und 94 – 98% für Campesterol-[23,24- $^{3}\text{H}$ ]. Mit längerer

Aufbewahrung der Tracer nahm die radiochemische Reinheit weiter ab. Zur Aufreinigung wurden die Tracer mit Lösungsmitteln über eine Silika-Kartusche in Fraktionen unterschiedlicher Polarität aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen dünnenschichtchromatographisch untersucht. Am Beispiel des  $^3\text{H}$ -Cholesterols ist der Aufreinigungsprozess schematisch dargestellt (Abbildung 4.8, A). Hochreines  $^3\text{H}$ -Cholesterol eluierte größtenteils in der Hexan:DEE-Fraktion 6:4 (v:v). Nach Validierung des Aufreinigungsprozesses für  $^3\text{H}$ -Cholesterol wurden die Phytosterole  $^3\text{H}$ -Sitosterol und  $^3\text{H}$ -Campesterol analog aufgereinigt (Abbildung 4.8, B). So wurden radiochemische Reinheiten von bis zu 98,9% für  $^3\text{H}$ -Cholesterol, 99,3% für  $^3\text{H}$ -Sitosterol und 98,6% für  $^3\text{H}$ -Campesterol erzielt. Die  $R_f$ -Werte für Cholesterol und die zwei Phytosterole unterschieden sich nur minimal. Die so durchgeführte Etablierung der Aufreinigung und Dünnschichtchromatographie führte auch zu Erkenntnissen über die Fraktionierung und DC-Laufeigenschaften von Sterolmetaboliten unterschiedlicher Polarität.

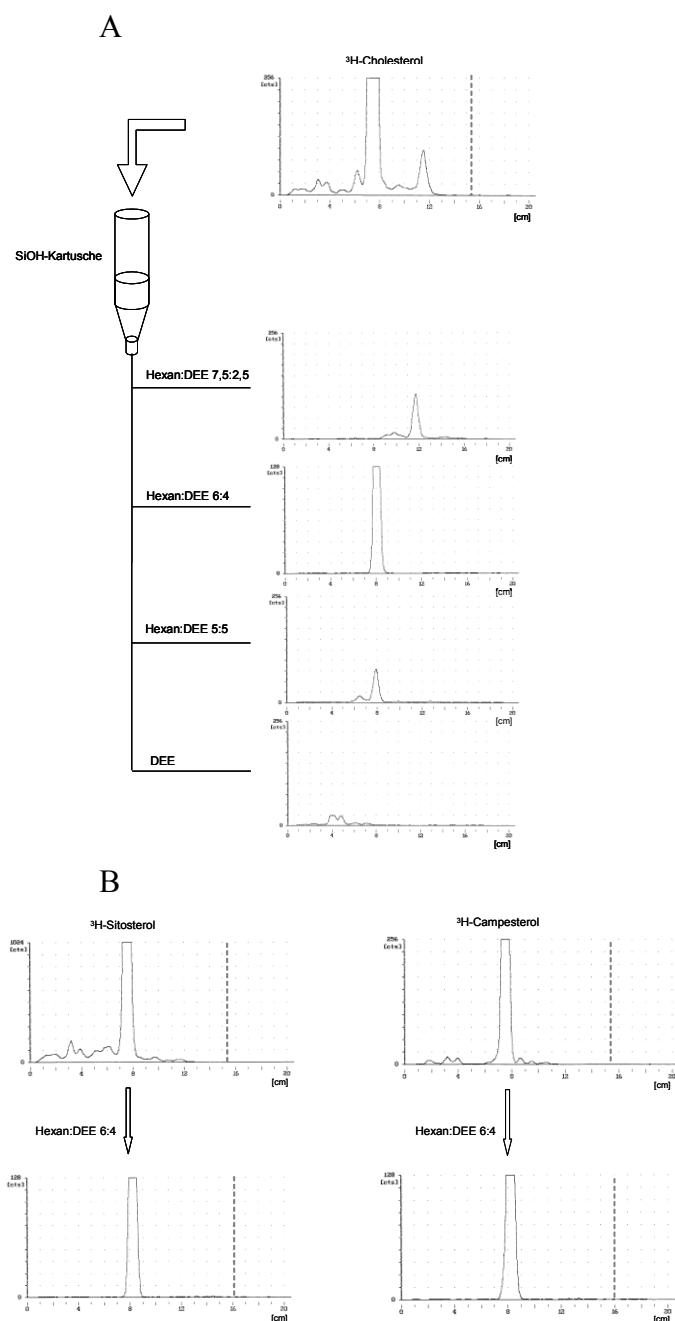


Abbildung 4.8: A: Überprüfung der radiochemischen Reinheit von  $^3\text{H}$ -Cholesterin mittels Dünnschichtchromatographie und Aufreinigung über Silika-Kartusche. Radiochemische Verunreinigungen und  $^3\text{H}$ -Cholesterin wurden durch steigende Diethyletherkonzentrationen in Hexan schrittweise eluiert und erneut chromatographisch überprüft. Hochreines  $^3\text{H}$ -Cholesterin eluierte größtenteils mit der Hexan:DEE-Fraktion 6:4; Laufmittel DC Hexan:Ethylacetat 6:4; Laufmittelfront als gestrichelte Linie markiert. B: Überprüfung der radiochemischen Reinheit von  $^3\text{H}$ -Sitosterol und  $^3\text{H}$ -Campesterol (obere Reihe) und korrespondierende Hexan:DEE-Fraktion 6:4 mit dem hochreinem Tracer (untere Reihe) mittels Dünnschichtchromatographie; Laufmittel Hexan:Ethylacetat 6:4.

### 4.2.3 Bestimmung der $^3\text{H}$ -Nachweisgrenze auf Dünnschichtplatten

Neben der Beseitigung von Verunreinigungen der tritierten Steroltracer war die Bestimmung der Nachweisgrenze von Sterolmetaboliten auf dem Radio-DC-Scanner wichtig. So konnte die Sensitivität für die Entdeckung potentieller  $^3\text{H}$ -markierter Metaboliten als Peaks auf der Dünnschichtplatte abgeschätzt werden. Absteigende Mengen von  $^3\text{H}$ -22(R)-Hydroxycholesterol wurden auf eine Dünnschichtplatte aufgebracht und mit dem Laufmittel Hexan:Ethylacetat 6:4 entwickelt, um analoge Bedingungen zu den späteren Versuchsbedingungen zu simulieren. Nach Messung mit dem Radio-DC-Scanner für 30 min je Spur wurden die Peakflächen integriert. Bei einer Auftragsaktivität von 200.000 dpm (Abbildung 4.9, links) war im Vergleich zu diesem Peak eine Aktivität von 250 dpm (Abbildung 4.9, rechts) bei gleicher Verstärkung noch als Peak erkennbar. Bei größter Verstärkung hebt sich die Aktivität noch deutlicher über dem Messhintergrund ab (Abbildung 4.9, rechts, kleines Fenster). Bei einem Auftrag von 200.000 dpm ist demnach ein Umsatz zu einem Metaboliten ab ca. 0,1% mit dieser Methode nachweisbar.

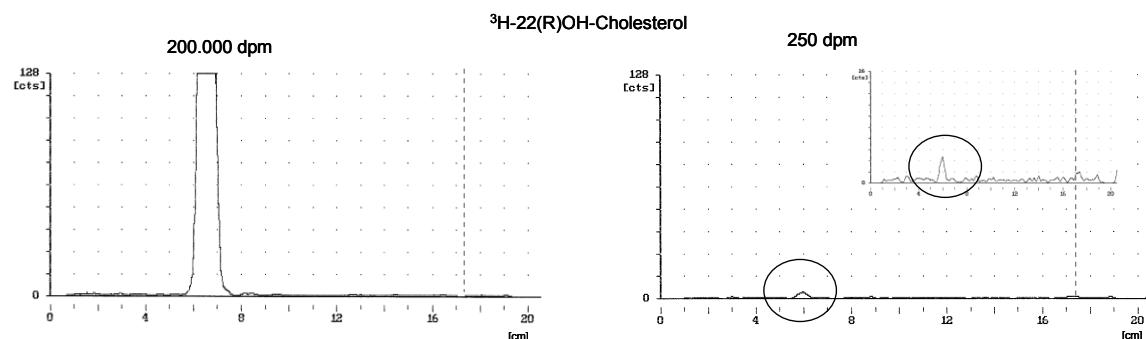


Abbildung 4.9: Bestimmung der Nachweisgrenze von  $^3\text{H}$ -markierten Sterolen auf Dünnschichtplatten.  $^3\text{H}$ -22(R)-OH-Cholesterol wurde in unterschiedlichen Aktivitäten 200.000 dpm (links) und 250 dpm (rechts) auf DC-Platte appliziert, chromatographiert und mittels Radio-DC-Scan 30 min je Spur gemessen; Laufmittel Hexan:Ethylacetat 6:4, Laufmittelfront als gestrichelte Linie markiert.

## 4.3 Sterolmetabolisierung in potentiellen Zielzellen des Sterolsortings

### 4.3.1 Sterolmetabolisierung in Enterozyten

Die bisherigen Experimente zeigten deutlich, dass Phytosterole auch in einem mizellenfreien System Auswirkungen auf die enterozytäre Cholesterolresorption und die basolaterale Cholesterolesekretion der Enterozyten haben. Die Phytosterole selbst wurden zu einem erheblichen Teil von dem enterozytären Zellmodell Caco-2 resorbiert, jedoch in geringerem Maße basolateral sezerniert als Cholesterol. Es scheint ein intrazellulärer Mechanismus vorzuliegen, mit dem der Enterozyt effektiv zwischen resorbiertem Cholesterol und Phytosterolen unterscheiden kann. Zum anderen deuteten

die Ergebnisse auf einen intrazellulären Wirkmechanismus der Phytosterole hin, welcher das Cholesterol-Handling im Enterozyten beeinflusst. Die Regulation des Handlings von zellulärem Cholesterol wird unter anderem durch oxidierte Metaboliten des Cholesterols vermittelt. Es sollte deshalb untersucht werden, ob Phytosterole analog zu Cholesterol zu regulatorischen Oxymetaboliten umgewandelt werden können oder ob die Entstehung von Oxycholesterol-Metaboliten durch Phytosterole beeinflusst wird.

#### 4.3.1.1 Cholesterolmetabolisierung in Enterozyten

Über die Bildung von oxidierten Cholesterolmetaboliten in Enterozyten lagen zu Beginn der Arbeit keine Daten vor. Deshalb sollte initial der Metabolismus von exogen zugeführtem Cholesterol im Enterozyten genauer untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol ( $50 \mu\text{M}$ ,  $3,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide aus Inkubationsmedium und Zellen extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Im Radio-DC-Scanner wurde die DC-Platte auf  $^3\text{H}$ -markierte Metaboliten untersucht (Abbildung 4.10).

Es zeigte sich eine Metabolisierung von Cholesterol zu zwei unbekannten polaren Metaboliten mit  $R_f$ -Werten von 0,27 (Peak 1) und 0,34 (Peak 2), wobei der im Vergleich etwas apolarere Metabolit (Peak 2) in größerer Menge vorlag (Abbildung 4.10, A). Aufgrund des verwendeten Laufmittelgemisches aus Hexan:Ethylacetat (6:4, v/v) nimmt die Laufgeschwindigkeit und somit auch der  $R_f$ -Wert des Analyten mit abnehmender Polarität zu. Die Metaboliten wurden vorzugsweise in das Inkubationsmedium sezerniert. Intrazellulär konnte vorerst nur ein Metabolit gefunden werden (Abbildung 4.10, B). Cholesterol wurde intrazellulär massiv verestert (Peak 4) und zu einem geringen Teil auch als Ester in das Inkubationsmedium sezerniert. Die Ester wurden über ihren  $R_f$ -Wert zu  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat und durch alkalische Hydrolyse tentativ identifiziert.

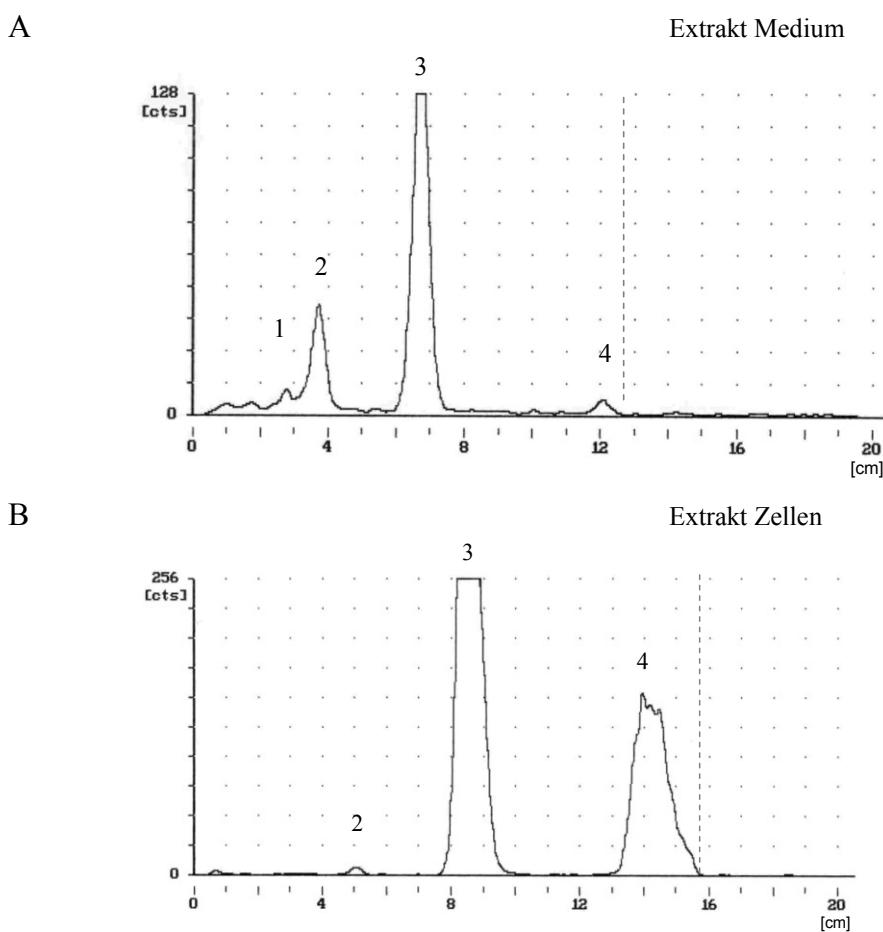


Abbildung 4.10: DC-Radio-Chromatogramm der Lipidextrakte von Caco-2-Zellen nach 72 h-Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol. Extrakte aus Medium (A) und Zellen (B) wurden im Laufmittel Hexan:Ethylacetat (6:4) aufgetrennt. Peak 1 und 2 stellen unbekannte polare Metaboliten dar, Peak 3 und Peak 4 stellen nicht metabolisiertes  $^3\text{H}$ -Cholesterol, respektive verestertes  $^3\text{H}$ -Cholesterol dar, wie durch authentische Standards ( $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat) gezeigt; Laufmittelfront als gestrichelte Linie markiert.

Um einen ersten Hinweis auf die Identität der Metaboliten zu bekommen, wurde eine Reihe kommerziell erhältlicher Cholesterolmetaboliten dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt (Abbildung 4.11). Im System Hexan:Ethylacetat (6:4, v/v) liefen Seitenketten-hydroxylierte Cholesterolmetaboliten deutlich vor Cholesterin. Die unbekannten Cholesterolmetaboliten (Abbildung 4.10, Peak 1, 2) liefen mit einem  $R_f$ -Wert, der in etwa den Seitenketten-hydroxylierten Sterolen 25-Hydroxycholesterol (25-OH-C) und 27-Hydroxycholesterol (27-OH-C) entsprach.

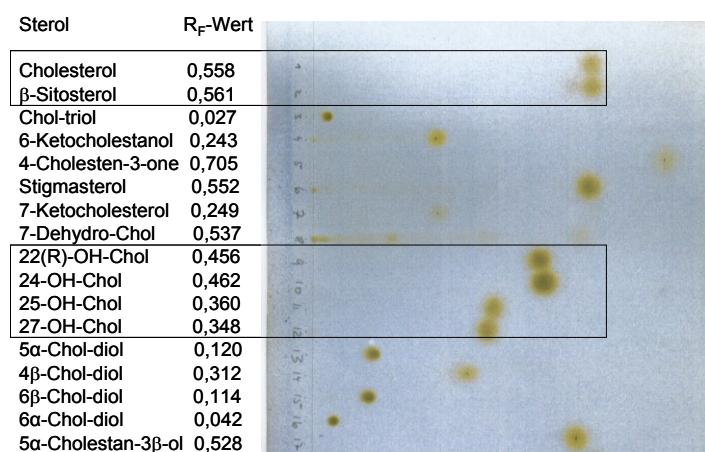


Abbildung 4.11: Dünnschichtchromatographische Trennung von oxidierten Cholesterolmetaboliten im Vergleich zu nativen Sterolen. Auftrag 1-5  $\mu$ g je Sterol; Laufmittel Hexan:Ethylacetat (6:4); Laufmittelfront entspricht rechtem Bildrand.

#### 4.3.1.2 Strukturidentifizierung der polaren Metaboliten

Für eine exakte Identifizierung der potentiellen Hydroxymetaboliten wurde der korrespondierende Peakbereich (Peak 1, 2)<sup>i</sup> von der DC-Platte eluiert und mittels GC/MS genauer untersucht. Nach Silylierung zu TMS-Ethern wurde der unbekannte Metabolit mit authentischen Standards von 22(R)-OH-C, 24(S)-OH-C, 25-OH-C und 27-OH-C verglichen. Anhand des erfassten Massenspektrums im Vergleich zu den Referenzspektren konnte in dem eluierten Bereich mit 27-OH-C genau ein seitenketten-hydroxyliertes Produkt identifiziert werden. Das Massenspektrum mit den charakteristischen Fragmenten ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Charakteristische Fragmente der Oxysterole 22(R)-OH-C, 24(S)-OH-C, 25-OH-C konnten nicht nachgewiesen werden. Charakteristische Ionen im Spektrum von 27-OH-C waren das Molekülion des TMS-Ethers mit der Masse m/z 546 ( $M^+$ ). Das Fragment mit der Masse m/z 417 ergibt sich aus der Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe an C3 und einem Fragment C1-C3 des Sterolringes A ( $M^+-129$ ). Das Fragment mit der Masse m/z 456 ergibt sich durch die Abspaltung einer Trimethylsilanolgruppe ( $M^+-90$ ) aus dem TMS-Ether. Dieses Ion wies die höchste Intensität auf.

<sup>i</sup> Peak 1 konnte nachträglich in Makrophagen eindeutig als das Carboxyprodukt Cholestensäure (27-COOH-C) identifiziert werden. Die Strukturaufklärung kann dort nachvollzogen werden (Kapitel 4.3.2.1).

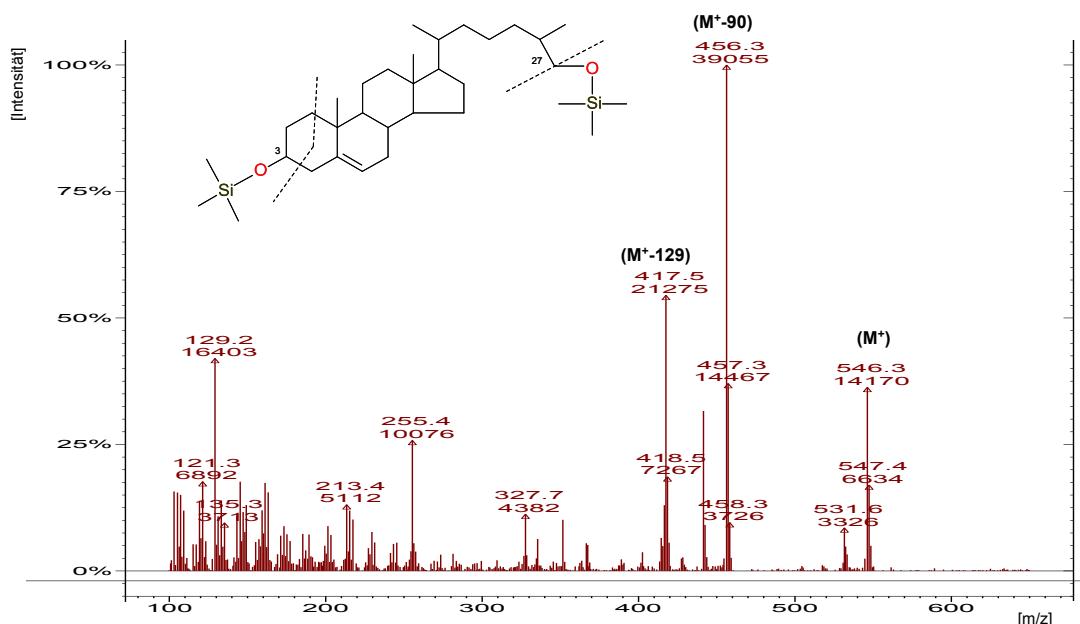


Abbildung 4.12: Massenspektrum des Trimethylsilyl-Ethers von 27-Hydroxycholesterol. Charakteristische Ionen sind 417 ( $M^{+}-129$ ), 546 ( $M^{+}$ ), 456 ( $M^{+}-90$ ). Strukturformel des 27-OH-C mit charakteristischer Fragmentierung.

#### 4.3.1.3 Phytosterolmetabolisierung

Nachdem 27-OH-C und in geringerem Maße 27-COOH-C als oxidierte Cholesterolmetaboliten in Caco-2-Zellen nachgewiesen wurden, sollte untersucht werden, inwiefern die Phytosteroole Campesterol und Sitosterol im Enterozyten metabolisiert werden. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit  $^{3}\text{H}$ -Campesterol (50  $\mu\text{M}$ , 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide aus Inkubationsmedium und Zellen extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

Im Radio-DC-Scan zeigte sich ein Peak im Bereich polarer Sterolmetaboliten. Der  $R_f$ -Wert entsprach exakt dem  $R_f$ -Wert des bei Cholesterol identifizierten 27-OH-C. Campesterol und Cholesterol laufen unter den Versuchsbedingungen auf der DC-Platte mit nahezu identischen  $R_f$ -Werten (siehe Traceraufreigung, Abbildung 4.8). Aufgrund der Annahme, dass sich hydroxilierte Campesterolmetaboliten ebenfalls analog zu den Cholesterolmetaboliten verhalten, ließ sich 27-OH-Campesterol (27-OH-Ca) als Produkt vermuten. Der Umsatz des Campesterols war jedoch geringer als bei Cholesterol. Für eine Strukturaufklärung des potentiellen Hydroxymetaboliten wurde der korrespondierende Peakbereich von der DC-Platte eluiert, zu TMS-Ether konvertiert und mittels GC/MS untersucht. Aufgrund der Fragmentierung unter Berücksichtigung der um 14 g/mol höheren Molekulmasse von Campesterol im Vergleich zu Cholesterol konnte das Produkt 27-OH-Campesterol identifiziert werden (Abbildung 4.13). Charakteristische Ionen im Spektrum von 27-OH-Ca waren das Molekülion des TMS-Ethers mit der Masse  $m/z$  560 ( $M^{+}$ ). Das Fragment mit der Masse  $m/z$  431 ergibt sich aus der Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe an C3 und einem Fragment C1-C3 des

Sterolringes A ( $M^+-129$ ). Das Fragment mit der Masse  $m/z$  470 ergibt sich durch die Abspaltung einer Trimethylsilanolgruppe ( $M^+-90$ ) aus dem TMS-Ether. Dieses Ion wies die höchste Intensität auf.

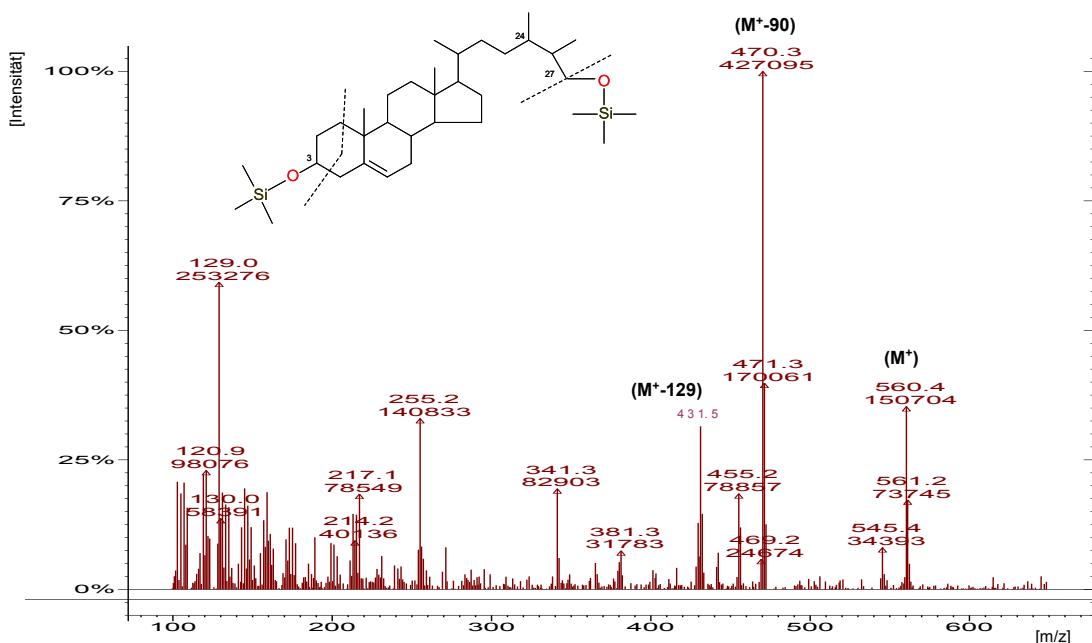


Abbildung 4.13: Massenspektrum des Trimethylsilyl-Ethers von 27-Hydroxycampesterol. Charakteristische Ionen sind  $431$  ( $M^+-129$ ),  $560$  ( $M^+$ ),  $470$  ( $M^+-90$ ). Strukturformel des 27-OH-Ca mit charakteristischer Fragmentierung.

Ein weiterer polarer Peak sehr geringen Ausmaßes lief im Bereich des  $R_f$ -Wertes des Carboxymetaboliten von 27-COOH-C. Zwar konnte hier kein eindeutiges MS-Spektrum gewonnen werden. In Anbetracht der Analogie des Laufverhaltens von Campesterol und Cholesterol wurde der Metabolit vorläufig als 27-COOH-Campesterol (27-COOH-Ca) identifiziert.

Für die Untersuchung der Metabolisierung von Sitosterol ( $50 \mu\text{M}$ ,  $3,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) wurden Caco-2-Zellen als Enterozytenmodell für  $72 \text{ h}$  mit  $^3\text{H}$ -Sitosterol inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide aus Inkubationsmedium und Zellen extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Im Radio-DC-Scan zeigte sich ein Peak im Bereich polarer Sterolmetaboliten. Der  $R_f$ -Wert entsprach dem  $R_f$ -Wert des bei Cholesterol identifizierten 27-OH-C. Auch Sitosterol läuft auf der DC-Platte mit dem Fließmittel Hexan:Ethylacetat 6:4 mit nahezu identischen  $R_f$ -Wert wie Cholesterol (siehe Traceraufreingung, Abbildung 4.8). Der  $R_f$ -Wert des unbekannten Sitosterolmetaboliten ließ in Analogie zu Cholesterol 27-OH-Sitosterol (27-OH-S) als Produkt vermuten. Der Umsatz der Sitosterols war jedoch noch geringer als der Umsatz des Campesterols. Aufgrund der Fragmentierung unter Berücksichtigung der um  $28 \text{ g/mol}$  höheren Molekülmasse von Sitosterol im Vergleich zu Cholesterol konnte das Produkt als 27-OH-Sitosterol identifiziert werden. Charakteristische Ionen im Spektrum von

27-OH-S waren das Molekülion des TMS-Ethers mit der Masse m/z 574 ( $M^+$ ). Das Fragment mit der Masse m/z 445 ergibt sich aus der Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe an C3 und einem Fragment C1-C3 des Sterolringes A ( $M^+-129$ ). Das Fragment mit der Masse m/z 484 ergibt sich durch die Abspaltung einer Trimethylsilanolgruppe ( $M^+-90$ ) aus dem TMS-Ether. Dieses Ion wies die höchste Intensität auf.

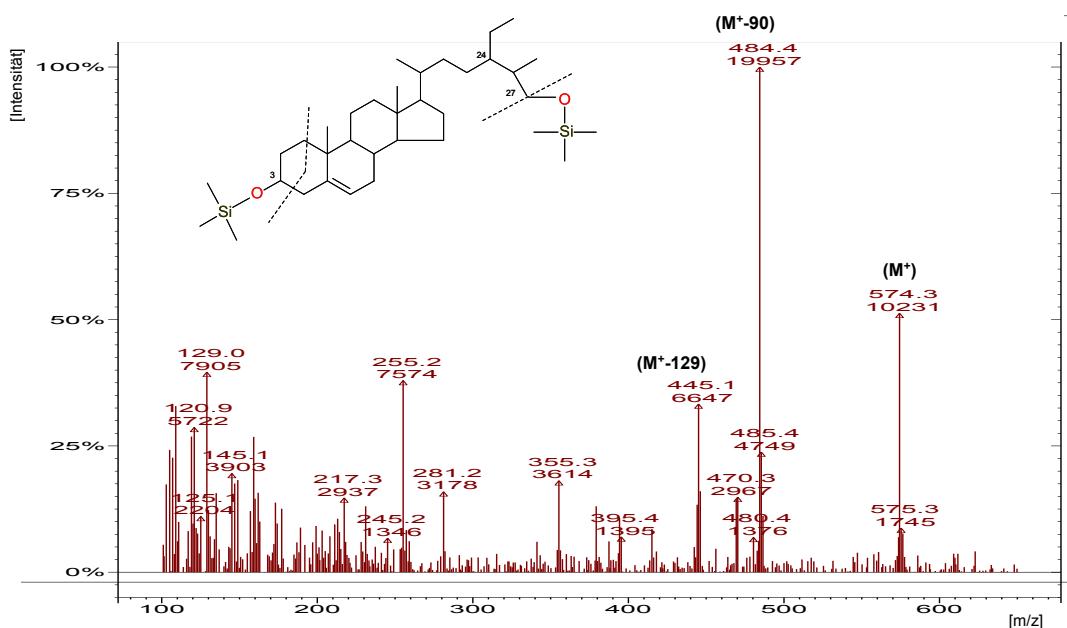


Abbildung 4.14: Massenspektrum des Trimethylsilyl-Ethers von 27-Hydroxysitosterol. Charakteristische Ionen sind 445 ( $M^+-129$ ), 574 ( $M^+$ ), 484 ( $M^+-90$ ). Strukturformel des 27-OH-S mit charakteristischer Fragmentierung.

#### 4.3.1.4 Hemmung von CYP27 durch Cyclosporin A

Die Ergebnisse deuteten auf CYP27 als primäres sterolmetabolisierendes Enzym in Enterozyten mit Präferenz für Cholesterin im Vergleich zu Phytosterolen hin. Das für die Metabolisierung verantwortliche Enzym CYP27 lässt sich durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CyA) effektiv hemmen (139). Durch Inkubation mit CyA sollte die wesentliche Beteiligung von CYP27 am Umsatz von extern zugeführtem Cholesterin und Phytosterolen aufgezeigt werden. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu$ M  $^3$ H-Cholesterin,  $^3$ H-Campesterol oder  $^3$ H-Sitosterol mit oder ohne 10  $\mu$ M CyA inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide aus Inkubationsmedium und Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Sterolmetaboliten mittels GC/MS quantifiziert.

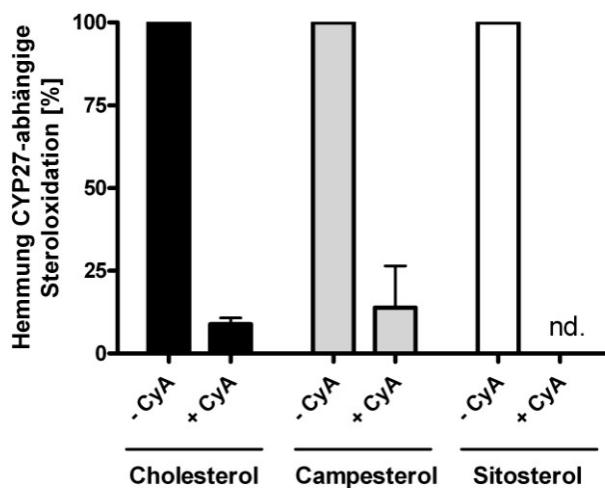


Abbildung 4.15: Hemmung des CYP27-Umsatzes von  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in Caco-2-Zellen durch Cyclosporin A. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen  $^3\text{H}$ -Sterols mit oder ohne 10  $\mu\text{M}$  CyA inkubiert. Werte ohne CyA wurden als 100% gesetzt. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt, eluiert und mittels GC/MS quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=3 \pm \text{SEM}$ .

Durch die Inkubation mit CyA konnte die Metabolisierung der Sterole durch CYP27 signifikant reduziert werden (Abbildung 4.15). Bei Cholesterol führte die Inkubation mit CyA zu einer signifikanten Hemmung des Umsatzes von Cholesterol zu 27-oxidierten Metaboliten auf  $8,7 \pm 1,7\%$  des Umsatzes ohne CyA. Die Metabolisierung von Campesterol zu 27-oxidierten Metaboliten wurde durch CyA auf  $13,9 \pm 12,6\%$  des Umsatzes ohne CyA gesenkt. Für Sitosterol waren nach der Inkubation mit CyA keine 27-oxidierten Metaboliten detektierbar.

#### 4.3.1.5 Kapazität des Enzyms CYP27 in Caco-2-Zellen

Die Hemmung der Bildung von 27-Oxysterolmetaboliten durch CyA belegt die Rolle von CYP27 als primäres sterolmetabolisierendes Enzym in Enterozyten. Zur genaueren Charakterisierung sollte im Folgenden die Affinität des Enzyms CYP27 für das Substrat Cholesterol in Enterozyten charakterisiert werden. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit steigenden Mengen an  $^3\text{H}$ -Cholesterol (20-120  $\mu\text{M}$ , 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Im Anschluss wurden die Sterole aus dem Inkubationsmedium und den Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und die Menge des zu den Oxymetaboliten 27-OH-C und 27-COOH-C metabolisierten exogen zugeführtem  $^3\text{H}$ -Cholesterols quantifiziert (Abbildung 4.16).

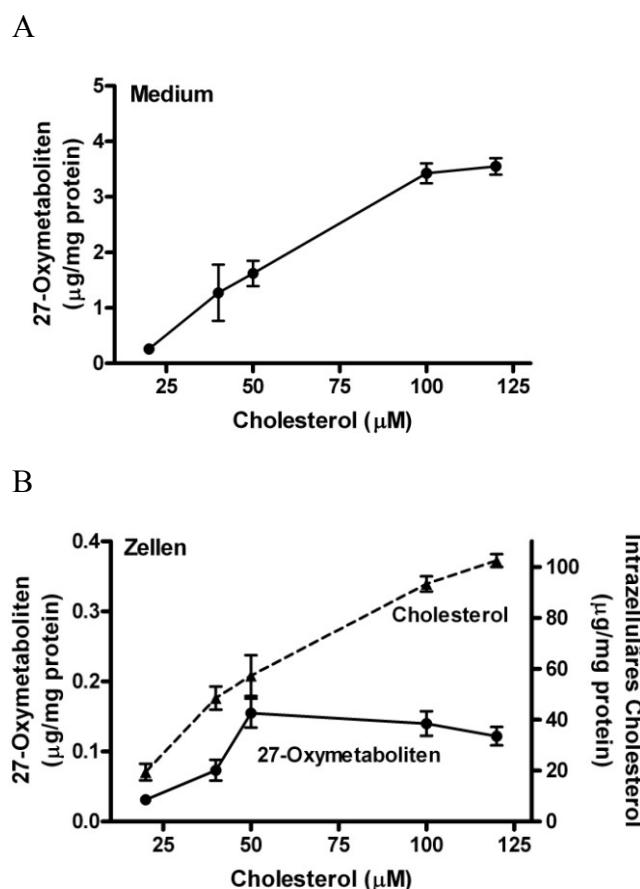


Abbildung 4.16: Metabolisierung unterschiedlicher Konzentrationen von  $^3\text{H}$ -Cholesterol in Caco-2-Zellen. Sekretion von 27-oxidierten  $^3\text{H}$ -Cholesterolmetaboliten in das Inkubationsmedium (A), Intrazellulär vorhandene  $^3\text{H}$ -Cholesterolmetaboliten (B). Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit 20, 40, 50, 100 oder 120  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und quantifiziert.  $n=4-11 \pm \text{SEM}$ .

Der Umsatz zu Oxymetaboliten nahm mit steigender intrazellulärer Cholesterolmenge zu, was eine Enzymsättigung bis zu 120  $\mu\text{M}$  ausschließt. Ein Großteil der 27-hydroxylierten und 27-carboxylierten Metaboliten wurde in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.16, A). Mit zunehmender Cholesterolmenge stieg die Menge an CYP27-Produkten im Medium nahezu linear an. Ein Teil der 27-oxidierten Metaboliten blieb intrazellulär vorhanden (Abbildung 4.16, B). Auch hier stieg die umgesetzte Menge mit zunehmender Cholesterolmenge an, erreichte jedoch ein Plateau bei 50  $\mu\text{M}$  Cholesterol, wahrscheinlich limitiert durch eine effektive Sekretion der Oxymetaboliten in das Medium.

#### 4.3.1.6 Quantitativer Vergleich der Cholesterol- und Phytosterolmetabolisierung

Innerhalb des definierten linearen Bereichs der CYP27-Aktivität sollte die quantitative Metabolisierung von  $^3\text{H}$ -Cholesterol durch CYP27 im Vergleich zu den Phytosterolen  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in Caco-2 Zellen genauer untersucht werden. Caco-2-

Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu$ M der  $^3$ H-markierten Sterole Cholesterol, Campesterol und Sitosterol inkubiert, die Sterole aus dem Inkubationsmedium und den Zellen extrahiert. Die intrazellulär aufgenommenen Sterole wurden über die aufgenommene Radioaktivität bestimmt. Die Lipidextrakte wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, von der DC-Platte eluiert und mittels GC/MS quantifiziert.

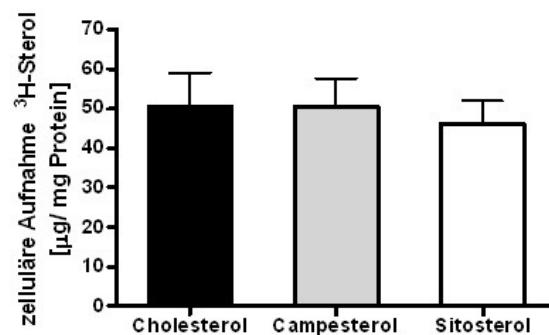


Abbildung 4.17: Aufnahme von Sterolen als CD-Komplex in Caco-2-Zellen. Caco-2-Zellen wurden mit den an CD komplexierten Sterolen  $^3$ H-Cholesterol,  $^3$ H-Campesterol oder  $^3$ H-Sitosterol für 72 h inkubiert und die zelluläre Aufnahme gemessen; Sterolkonzentration 50  $\mu$ M; spezifische Aktivität 3,5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol Sterol.  $n=9-11 \pm$  SEM.

Nach 72 h Inkubationsdauer war die intrazellulär aufgenommene Menge der verschiedenen Sterole annähernd gleich (Abbildung 4.17). Eine unterschiedliche Metabolisierung war demnach unter den gewählten Inkubationsbedingungen, also Angebot der Sterole als Cyclodextrinkomplex, nicht durch eine unterschiedliche intrazelluläre Verfügbarkeit des Cholesterols und der Phytosterole zu erklären.

Ein Großteil der gesamten 27-hydroxylierten und 27-carboxylierten Metaboliten von Cholesterol und den eingesetzten Phytosterolen wurde in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.18, A). Dabei wurde Cholesterol von Caco-2-Zellen hauptsächlich zu 27-OH-C metabolisiert ( $1,46 \pm 0,21$   $\mu$ g/mg Protein). Etwa 10% der sezernierten 27-hydroxylierten Metaboliten waren als Carboxyprodukt 27-COOH-C vorhanden ( $0,16 \pm 0,03$   $\mu$ g/mg Protein). Campesterol wurde signifikant schlechter von den Caco-2-Zellen als Substrat akzeptiert. Das vorherrschende Campesterolprodukt war 27-OH-Ca ( $0,25 \pm 0,04$   $\mu$ g/mg Protein) und betrug somit nur 17% des Cholesterolmetaboliten 27-OH-C im Inkubationsmedium. Zu einem äußerst geringen Teil wurde Campesterol zu dem potentiellen Carboxyprodukt 27-COOH-Ca metabolisiert ( $0,02 \pm 0,01$   $\mu$ g/mg Protein). Sitosterol stellte das am schlechtesten metabolisierte Sterol in Caco-2-Zellen dar. Der vorherrschende Sitosterolmetabolit war 27-OH-S ( $0,02 \pm 0,01$   $\mu$ g/mg Protein). Das potentielle Carboxyprodukt von Sitosterol, 27-COOH-S, war hingegen nicht detektierbar.

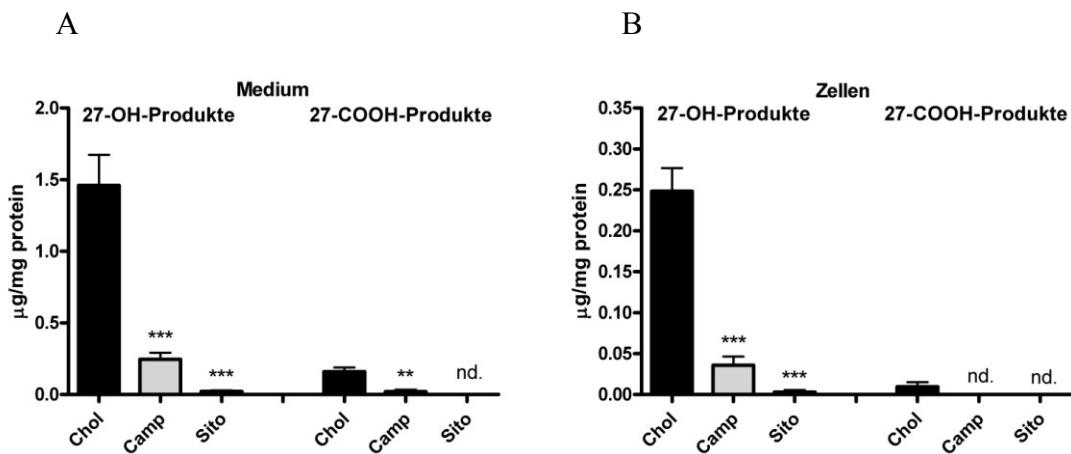


Abbildung 4.18: Metabolisierung von  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in Caco-2-Zellen. A: Sekretion von Metaboliten in das Inkubationsmedium, B: Intrazellulär vorhandene Metaboliten. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen  $^3\text{H}$ -Sterols (spezifische Aktivität 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt, eluiert und mittels GC/MS quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=9-11 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Ein geringerer Teil der 27-hydroxylierten Metaboliten wurde intrazellulär retiniert (Abbildung 4.18, B). Von potentiellen Carboxyprodukten der Sterole konnte nur der Cholesterolmetabolit 27-COOH-C intrazellulär nachgewiesen. Carboxyprodukte von Campesterol und Sitosterol konnten intrazellulär nicht detektiert werden. Das intrazellulär verbleibende 27-OH-C war mit  $0,25 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein wie auch schon bei den sezernierten Metaboliten der vorherrschende Cholesterolmetabolit. 27-COOH-C war in den Zellen in geringerer Menge detektierbar ( $0,01 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein). Der Campesterolmetabolit 27-OH-Ca war mit  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein auch intrazellulär in geringerer Menge wie 27-OH-C vorhanden. 27-OH-S war nur in äußerst geringer Menge in den Caco-2-Zellen nachweisbar.

#### 4.3.1.7 Veresterung hydroxylierter Sterole in Enterozyten

Der Umsatz zu 27-oxidierten Sterolmetaboliten wurde grundsätzlich nach der Extraktion von Inkubationsmedium und Zellen ohne alkalische Hydrolyse bestimmt, um die Veresterung der unterschiedlichen nativen Sterole vergleichen zu können (siehe Kapitel 4.4). Allerdings war zunächst unklar, ob unbekannte Metaboliten von Cholesterol oder der Phytosterole intrazellulär verestert wurden und somit der Analyse entgingen. Um zu untersuchen, ob einerseits die entstandenen 27-hydroxylierten Metaboliten in Caco-2-Zellen verestert werden und andererseits eventuell unbekannte Metaboliten als Ester vorliegen, wurden die entstandenen Ester einer alkalischen Hydrolyse zugeführt. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$  der tritierten Sterole inkubiert. Die Sterole wurden aus den Zellen extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die dem Ester korrespondierenden Bereiche wurden von der DC-Platte eluiert und alkalisch hydrolysiert. Im Anschluss wurden die

Lipide erneut mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die hydroxylierten  $^3\text{H}$ -Metaboliten quantifiziert (Abbildung 4.19).

Im Vergleich zum Gesamtumsatz wurde nur ein minimaler Teil der 27-hydroxylierten Metaboliten in Caco-2-Zellen verestert. Von den Cholesterolmetaboliten aus exogen zugeführtem Cholesterol lag nur 27-OH-C mit  $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  verestert vor. 27-COOH-C konnte nach alkalischer Hydrolyse nicht detektiert werden. Bei den Campesterolmetaboliten wurde nur 27-OH-Ca mit  $0,01 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  in veresterter Form in den Caco-2-Zellen detektiert. In Caco-2-Zellen wurden keine Sitosterolmetaboliten verestert. Die Effizienz der alkalischen Hydrolysen betrug insgesamt  $96,6 \pm 1,1\%$ , so dass keine potentiell veresterten oxidierten Metaboliten der Analyse entgingen.

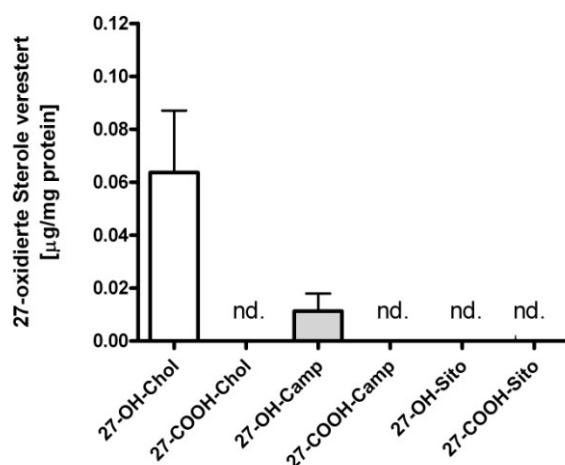


Abbildung 4.19: Veresterung von 27-oxidierten Sterolmetaboliten in Caco-2-Zellen. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol ( $50 \mu\text{M}, 3,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Sterole wurden aus den Zellen extrahiert und die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Ester wurden mittels  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat als Standard identifiziert und quantifiziert. Dem Ester korrespondierende Bereiche wurden von der DC-Platte eluiert und mit 1M methanolischer KOH für 24 h bei RT alkalisch hydrolysiert. Im Anschluss wurden die extrahierten Lipide erneut mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die hydroxylierten  $^3\text{H}$ -Metaboliten quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=3 \pm \text{SEM}$ .

### 4.3.2 Sterolmetabolisierung in primären humanen Makrophagen

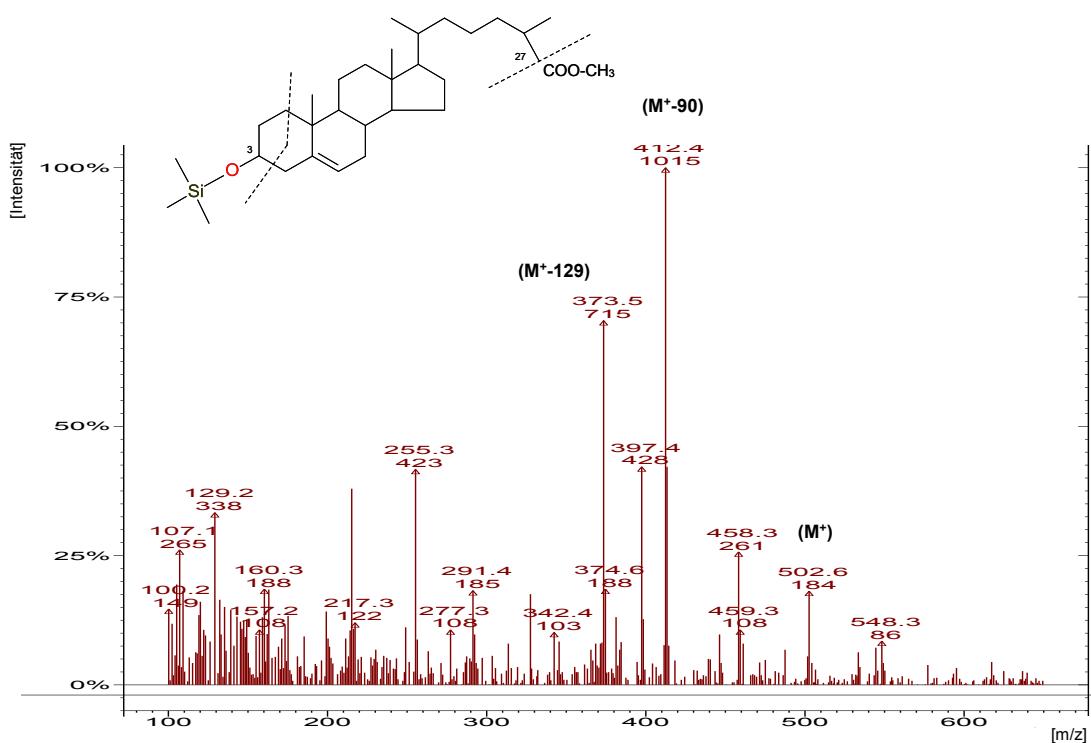
Die Ergebnisse an Caco-2-Zellen belegen CYP27 als sterolmetabolisierendes Enzym in Enterozyten. Die Identifikation des potentiellen Cholesterolmetaboliten gestaltete sich jedoch zunächst schwierig. Die etwas polarere Natur ließ die weitere Oxidation durch CYP27 zu einem Carboxymetaboliten vermuten (Abbildung 4.10, A, Peak 1). Primäre humane Makrophagen exprimieren CYP27 in hohem Maße (133). Daher sollten Makrophagen zuerst als Modellsystem für die Identifizierung entstehender Sterolmetaboliten genutzt werden.

#### 4.3.2.1 Strukturidentifizierung der Cholestensäure

27-Hydroxycholesterol entsteht rein enzymatisch durch das Cytochrom P450 CYP27. Die Identifizierung von 27-Hydroxycholesterol in Caco-2-Zellen und die spezifische Hemmung mittels Cyclosporin A legte die Expression dieses Enzyms nahe. CYP27 katalysiert dabei nicht nur die Oxidation von Cholesterol zu 27-OH-C sondern auch die weitere Oxidation der 27-OH-Gruppe zur Carboxygruppe. Das potentiell entstandene Produkt, die Cholestensäure (27-COOH-C), konnte aufgrund der ausschließlichen Derivatisierung zu TMS-Ethern nicht eindeutig mittels GC/MS identifiziert werden.

Primäre humane Makrophagen wurden deshalb für 72 h mit 50  $\mu$ M  $^3$ H-Cholesterol (50  $\mu$ M, 3,5  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol) inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide aus dem Inkubationsmedium extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und der Peak mit dem vermuteten Carboxymeraboliten von der DC-Platte eluiert. Um das Produkt eindeutig identifizieren zu können, wurde der Silylierung eine Methylierungsreaktion vorgeschaltet. Die potentiellen Carboxylverbindungen wurden mit  $\text{BF}_3$ -Methanol zu Methylestern konvertiert und anschließend zu ihren TMS-Ethern derivatisiert.

Das Massenspektrum des Produktes wies tatsächlich ein für 27-COOH-C erwartbares Spektrum auf. Charakteristische Ionen im Spektrum von 27-COOH-C waren dabei das Molekülion des TMS-Ethers mit der Masse m/z 502 ( $\text{M}^+$ ). Das Fragment mit der Masse m/z 373 ergab sich aus der Abspaltung der Trimethylsilanolgruppe an C3 und einem Fragment C1-C3 des Sterolringes A ( $\text{M}^+-129$ ). Das Fragment mit der Masse m/z 412 ergab sich durch die Abspaltung einer Trimethylsilanolgruppe ( $\text{M}^+-90$ ) aus dem TMS-Ether. Dieses Ion wies die höchste Intensität auf. Das Ion bei m/z 291 repräsentiert den C- und D-Ring des Steroidgerüstes mit intakter Seitenkette.



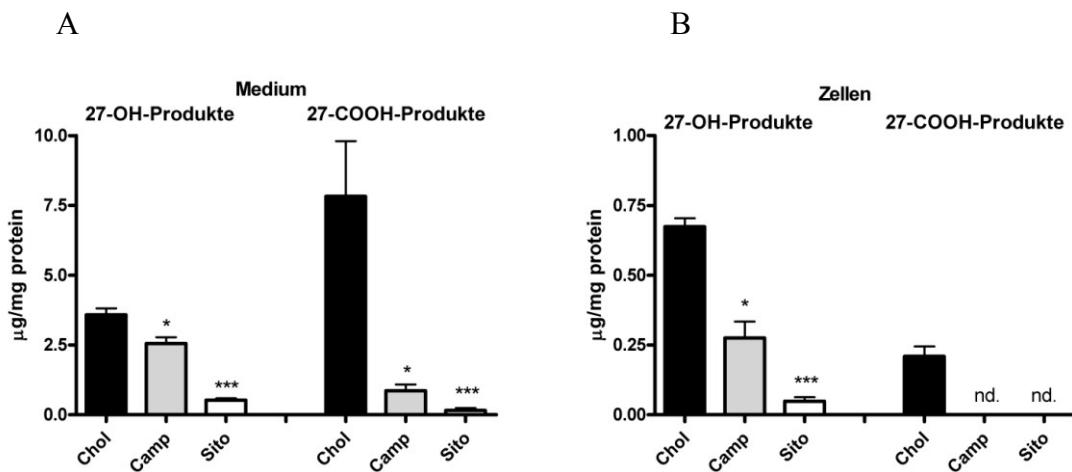


Abbildung 4.21: Metabolisierung von  $^3\text{H}$ -Cholesterin,  $^3\text{H}$ -Campesterin und  $^3\text{H}$ -Sitosterin in primären humanen Makrophagen. A: Sekretion von Metaboliten in das Inkubationsmedium, B: Intrazellulär vorhandene Metaboliten. Makrophagen wurden für 72 h mit  $^3\text{H}$ -markiertem Cholesterin, Campesterin oder Sitosterin ( $50 \mu\text{M}, 3,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt, eluiert und mittels GC/MS quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=4-7 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0.05$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Ein Großteil der 27-hydroxylierten und 27-carboxylierten Metaboliten von sowohl Cholesterin als auch von den eingesetzten Phytosterolen wurde in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.21, A). Dabei wurde Cholesterin vornehmlich zu dem Carboxyprodukt 27-COOH-C metabolisiert ( $7,8 \pm 2,0 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ). Mit  $3,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  waren nur etwa 25% der sezernierten 27-hydroxylierten Cholesterinmetaboliten als 27-OH-C vorhanden. Im Gegensatz dazu wurde Campesterin zu einem geringeren Teil zu dem potentiellen Carboxyprodukt 27-COOH-Ca metabolisiert ( $0,9 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ). Das vorherrschende Campesterinprodukt war 27-OH-Ca ( $2,6 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ). Sitosterin war, wie schon in Enterozyten, das am schlechtesten metabolisierte Sterol. Der vorherrschende Sitosterinmetabolit war 27-OH-S ( $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ). Das potentielle Carboxyprodukt von Sitosterin, 27-COOH-S, war hingegen nur in sehr geringem Maße detektierbar ( $0,15 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ).

Ein geringerer Teil der 27-hydroxylierten Metaboliten wurde intrazellulär retiniert (Abbildung 4.21, B). Von potentiellen Carboxyprodukten der Sterole konnte nur der Cholesterinmetabolit 27-COOH-C intrazellulär detektiert werden. Die Carboxyprodukte von Campesterin und Sitosterin waren intrazellulär nicht nachweisbar. Das intrazellulär verbleibende 27-OH-C war mit  $0,67 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  in größerer Menge als 27-COOH-C ( $0,21 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ) in den Makrophagen detektierbar. Der Campesterinmetabolit 27-OH-Ca war mit  $0,028 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  in geringerer Menge als 27-OH-C vorhanden. 27-OH-S war hingegen nur in sehr geringem Maße in den Makrophagen detektierbar.

### 4.3.2.3 Hemmung von CYP27 durch Cyclosporin A

Die Ergebnisse in primären humanen Makrophagen deuten ebenfalls auf CYP27 als primäres sterolmetabolisierendes Enzym in diesen Zellen hin. Die effektive Hemmung des Enzyms CYP27 durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A (CyA) war in Caco-2-Zellen gezeigt worden. Im Folgenden sollte auch in Makrophagen durch Inkubation mit CyA die wesentliche Beteiligung von CYP27 am Umsatz von Cholesterol und Phytosterolen belegt werden. Primäre humane Makrophagen wurden für 72 h mit 50  $\mu$ M  $^3$ H-Cholesterol,  $^3$ H-Campesterol oder  $^3$ H-Sitosterol mit oder ohne 10  $\mu$ M CyA inkubiert. Im Anschluss wurden die Lipide aus Inkubationsmedium und Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mittels GC/MS analysiert.

Die Inkubation mit CyA führte zu einer massiven Reduktion der Metabolisierung aller Sterole durch CYP27. Durch die Inkubation mit CyA konnte der Umsatz von Cholesterol zu 27-oxidierten Metaboliten auf  $17,5 \pm 1,8\%$  des Umsatzes ohne CyA reduziert werden (Abbildung 4.22). Die Metabolisierung von Campesterol und Sitosterol zu 27-oxidierten Metaboliten wurde durch CyA auf  $15,6 \pm 9,0\%$  respektive  $5,3 \pm 4,6\%$  des jeweiligen Umsatzes ohne CyA gesenkt.

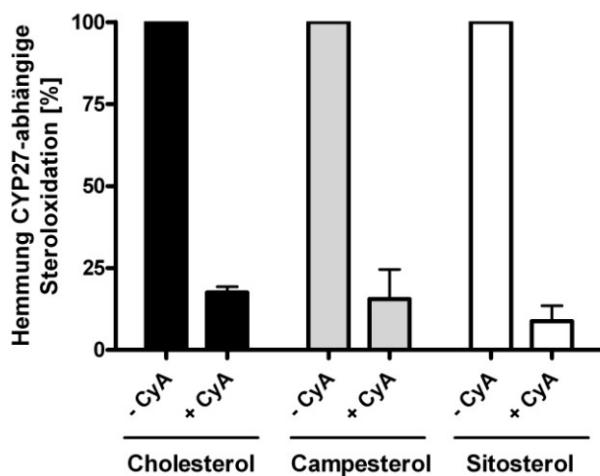


Abbildung 4.22: Hemmung des CYP27-Umsatzes von  $^3$ H-Cholesterol,  $^3$ H-Campesterol und  $^3$ H-Sitosterol in primären humanen Makrophagen durch Cyclosporin A. Primäre humane Makrophagen wurden für 72 h mit 50  $\mu$ M des jeweiligen  $^3$ H-Sterols mit oder ohne 10  $\mu$ M CyA inkubiert. Werte ohne CyA wurden als 100 % gesetzt. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mittels GC/MS quantifiziert. nd. = nicht detektiert, n=3-5  $\pm$  SEM.

### 4.3.2.4 Kapazität des Enzyms CYP27 in Makrophagen

Im Folgenden sollte die Kapazität der 27-Hydroxylierung für die Substrate Cholesterol und Sitosterol in primären humanen Makrophagen charakterisiert werden. Primäre humane Makrophagen wurden für 72 h mit 20 oder 50  $\mu$ M  $^3$ H-Cholesterol bzw.  $^3$ H-Sitosterol inkubiert. Im Anschluss wurden die Sterole aus dem Inkubationsmedium

und den Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Menge der metabolisierten Sterole mittels GC/MS quantifiziert.

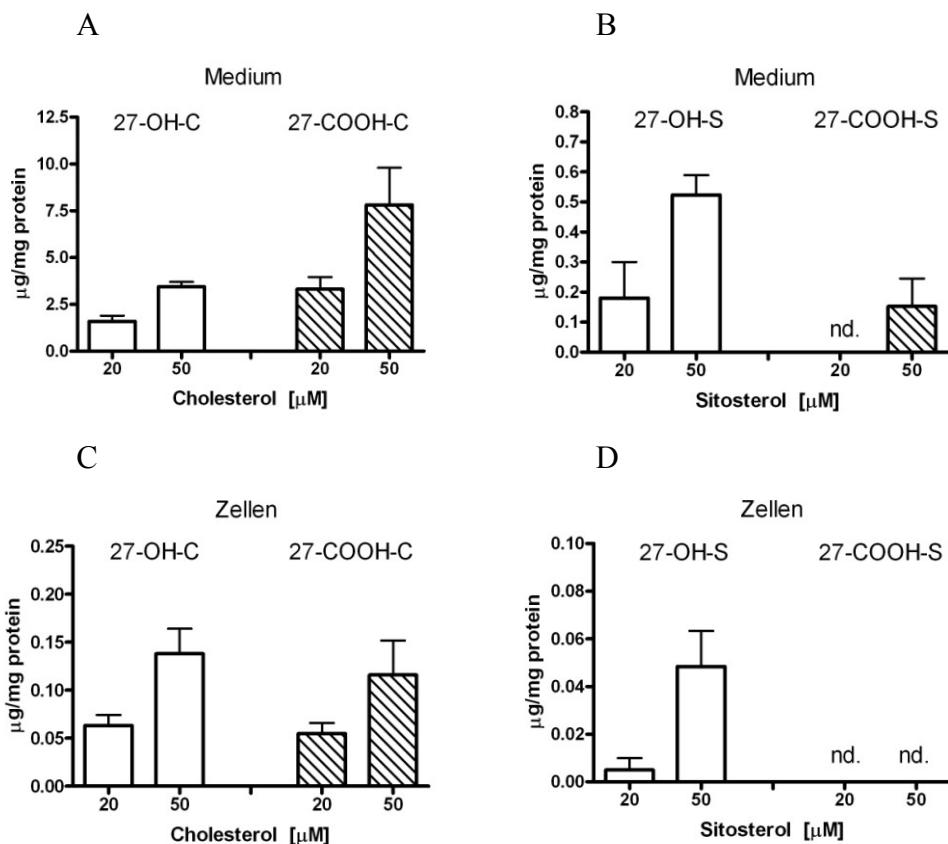


Abbildung 4.23: Metabolisierung unterschiedlicher Konzentrationen von  $^3\text{H}$ -Cholesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in primären humanen Makrophagen. Sekretion von  $^3\text{H}$ -Cholesterol- (A) oder  $^3\text{H}$ -Sitosterolmetaboliten (B) in das Inkubationsmedium und intrazellulär vorhandene  $^3\text{H}$ -Cholesterol- (C) oder  $^3\text{H}$ -Sitosterolmetaboliten (D). Makrophagen wurden für 72 h mit 20 oder 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Sterol inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mittels GC/MS quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=3-5 \pm \text{SEM}$ .

Der überwiegende Teil der 27-hydroxylierten und 27-carboxylierten Metaboliten wurde in das Inkubationsmedium sezerniert. Mit Zunahme der Cholesterolkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  auf 50  $\mu\text{M}$  stieg die Menge der CYP27-Produkte 27-OH-C und 27-COOH-C im Medium in nahezu proportionaler Menge an (Abbildung 4.23, A). Sowohl nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  als auch mit 50  $\mu\text{M}$  war 27-COOH-C der jeweils vorherrschende Metabolit in Makrophagen. Auch mit Zunahme der Sitosterolmenge von 20  $\mu\text{M}$  auf 50  $\mu\text{M}$  stieg die Menge der durch CYP27 umgesetzten Sitosterolmetaboliten an. Die Metabolisierung von Sitosterol zu 27-OH-S wurde um die ca. 2,5-fache Menge gesteigert. 27-COOH-S konnte im Medium nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Sitosterol nicht detektiert werden. Die Erhöhung des extern zugeführten Sitosterols auf 50  $\mu\text{M}$  führte zu klar nachweisbaren Mengen des Carboxymeraboliten im Medium (Abbildung 4.23, B).

Unabhängig von der zugeführten Menge des jeweiligen Sterols blieb ein wesentlich geringerer Teil der 27-hydroxylierten Metaboliten intrazellulär vorhanden. Mit Zunahme der Cholesterolmenge von 20  $\mu\text{M}$  auf 50  $\mu\text{M}$  stieg die intrazellulär vorhandene Menge an 27-OH-C und 27-COOH-C an. Das Verhältnis von 27-OH-C zu 27-COOH-C ist jedoch im Gegensatz zu den ins Medium sezernierten Produkten sowohl nach Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  als auch 50  $\mu\text{M}$  in etwa 1:1 (Abbildung 4.23, C). Die Zunahme der Sitosterolmenge von 20  $\mu\text{M}$  auf 50  $\mu\text{M}$  führte zu einem Anstieg der intrazellulären Menge an 27-OH-S. Carboxymetaboliten von Sitosterol konnten intrazellulär nicht detektiert werden (Abbildung 4.23, D).

#### 4.3.2.5 Veresterung hydroxylierter Sterole in Makrophagen

Der Umsatz zu 27-hydroxylierten Sterolmetaboliten wurde analog zu den Experimenten mit Caco-2-Zellen nach der Extraktion von Inkubationsmedium und Zellen grundsätzlich ohne alkalische Hydrolyse bestimmt. Um zu untersuchen, ob die entstandenen Metaboliten in primären humanen Makrophagen verestert werden, wurden die entstandenen Ester einer alkalischen Hydrolyse zugeführt.

Primäre humane Makrophagen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol inkubiert. Die Sterole wurden aus den Zellen extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die dem Ester korrespondierenden Bereiche wurden von der DC-Platte eluiert und alkalisch hydrolysiert. Im Anschluss wurden die Lipide erneut mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die oxidierten  $^3\text{H}$ -Metaboliten quantifiziert (Abbildung 4.24).

Im Vergleich zum Gesamtumsatz wurde nur ein geringer Teil der 27-hydroxylierten Metaboliten in primären humanen Makrophagen verestert. Von den Cholesterolmetaboliten aus exogen zugeführtem Cholesterol lagen 27-OH-C mit  $0,56 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein und 27-COOH-C mit  $0,09 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein als Ester vor. Von den Campesterolmetaboliten wurde nur 27-OH-Ca mit  $0,14 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein als Ester in den Makrophagen detektiert. Sitosterolmetaboliten wurden in den Makrophagen nicht verestert. Die Effizienz der alkalischen Hydrolysen betrug insgesamt  $94,9 \pm 2,4\%$ .

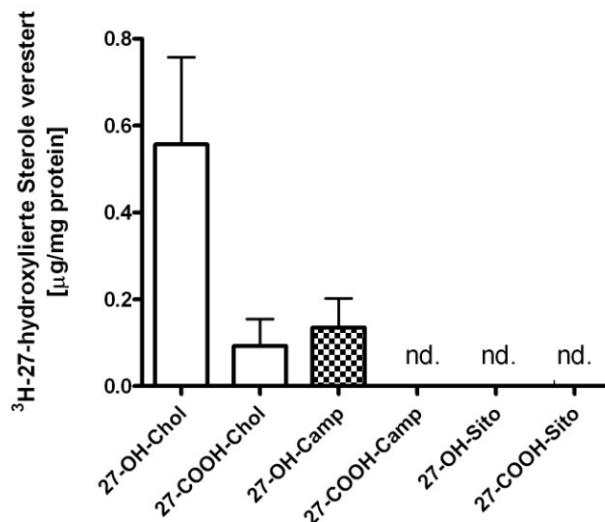


Abbildung 4.24: Veresterung von  $^3\text{H}$ -27-hydroxylierten Sterolmetaboliten in primären humanen Makrophagen. Makrophagen wurden für 72 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol (50  $\mu\text{M}$ , 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) inkubiert. Sterole wurden aus den Zellen extrahiert und die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt. Ester wurden mittels  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat als Standard identifiziert und quantifiziert. Die dem Ester korrespondierenden Bereiche wurden von der DC-Platte eluiert und mit 1 M methanolischer KOH für 24 h bei RT alkalisch hydrolysiert. Im Anschluss wurden die Lipide erneut mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die oxidierten  $^3\text{H}$ -Metaboliten quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=3-6 \pm \text{SEM}$ .

#### 4.3.3 Sterolmetabolisierung in Hepatozyten

Cholesterol wird über die Leber nach Umbau zu Gallensäuren oder direkt in freier Form ausgeschieden (21). Phytosterole werden höchstwahrscheinlich nicht oder nur in äußerst geringem Maße zu C24-Gallensäuren metabolisiert (74;75). Cholesterol und Phytosterole werden in Hepatozyten über die Steroltransporter ABCG5/ABCG8 in die Galle sezerniert (21). Dabei scheint eine Präferenz für Phytosterole gegenüber Cholesterol zu existieren, die sich nicht durch die Selektivität von ABCG5/ABCG8 erklären lässt. Ebenso wie in Enterozyten ist jedoch die intrazelluläre Metabolisierung der Phytosterole in Hepatozyten unbekannt. Um einen potentiellen Beitrag zum Sterol-Handling in Hepatozyten zu untersuchen sollte im Folgenden die Metabolisierung von Cholesterol im Vergleich zu Phytosterolen in dem Hepatozyten-Zellmodell HepG2 genauer untersucht werden. HepG2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol inkubiert. Die Sterole wurden in Analogie zu Caco-2-Zellen und Makrophagen als CD-Komplex zugeführt. Die Sterole wurden nach der Inkubationsperiode aus dem Inkubationsmedium und den Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und per GC/MS analysiert. Die Menge der aufgenommenen Sterole wurde über die intrazellulär vorhandene Radioaktivität bestimmt.

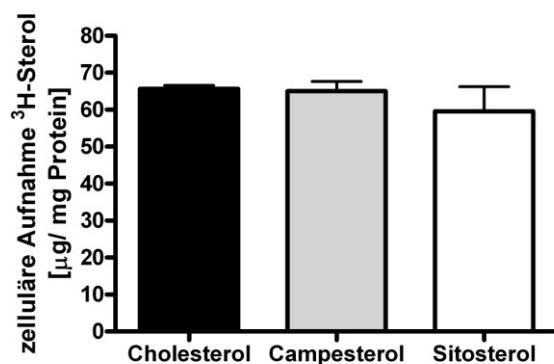


Abbildung 4.25: Aufnahme von Sterolen als CD-Komplex in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden mit den an CD komplexierten Sterolen  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol für 72 h inkubiert und die zelluläre  $^3\text{H}$ -Aufnahme gemessen; Sterolkonzentration 50  $\mu\text{M}$ ; spezifische Aktivität 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$  Sterol.  $n=3 \pm \text{SEM}$ .

Nach prolongierter Inkubationsdauer für 72 h war die intrazellulär vorhandene Sterolmenge annähernd gleich. Dabei wurde Cholesterol zu 73% (66  $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot), Campesterol zu 71% (65  $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot) und Sitosterol zu 63% (59  $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot) der Ausgangsaktivität in die HepG2-Zellen aufgenommen (Abbildung 4.25).

Sowohl Cholesterol als auch die Phytosterole Campesterol und Sitosterol wurden von den HepG2-Zellen teilweise zu polareren Produkten metabolisiert (Abbildung 4.26). Die entstandenen Metaboliten wiesen eine Hydroxyl- oder Carboxylgruppe an C27 auf. Ein Großteil der gesamten 27-hydroxylierten und 27-carboxylierten Metaboliten von Cholesterol und den eingesetzten Phytosterolen wurde in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.26, A). Dabei wurde Cholesterol vornehmlich zu 27-OH-C metabolisiert ( $1,91 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ) und zu einem deutlich geringeren Teil zu dem Carboxyprodukt 27-COOH-C ( $0,25 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ). Campesterol wurde ebenfalls hauptsächlich zu 27-OH-Ca umgesetzt ( $0,89 \pm 0,06 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ), was in etwa der Hälfte des Umsatzes von Cholesterol zu 27-OH-C entsprach. Zu einem geringeren Teil wurde Campesterol zu dem Carboxyprodukt 27-COOH-Ca metabolisiert ( $0,15 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ). Sitosterol war auch in den Hepatozyten das am schlechtesten metabolisierte Sterol. Der Sitosterolmetabolit 27-OH-S war mit  $0,38 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$  vorherrschend. Der Carboxyprodukt von Sitosterol, 27-COOH-S, war hingegen nur in sehr geringem Maße detektierbar ( $0,05 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mg Protein}$ ).

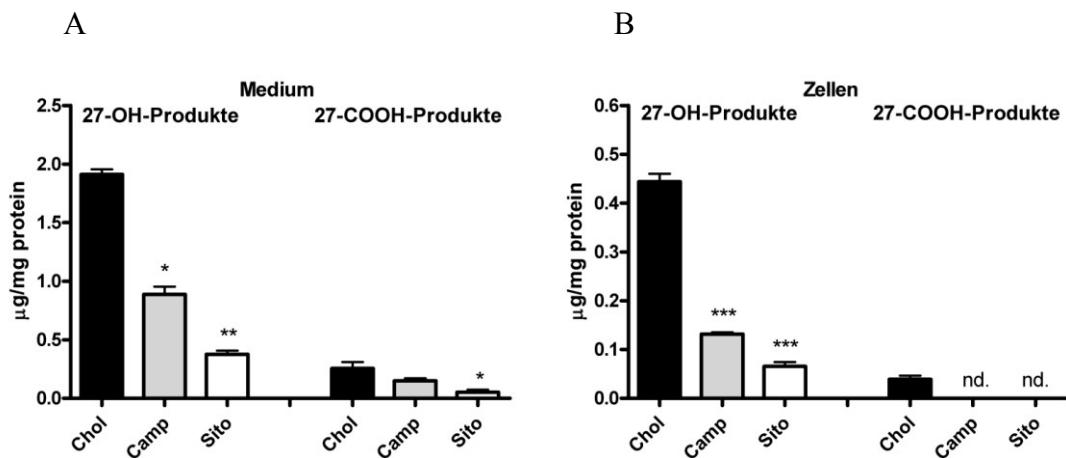


Abbildung 4.26: Metabolisierung von  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in HepG2-Zellen A: Sekretion von Metaboliten in das Inkubationsmedium, B: Intrazellulär vorhandene Metaboliten. HepG2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen  $^3\text{H}$ -Sterols inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt, eluiert und mittels GC/MS quantifiziert. nd. = nicht detektiert,  $n=3 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Ein deutlich geringerer Teil der 27-hydroxylierten Metaboliten wurde intrazellulär retiniert (Abbildung 4.26, B). Von den potentiellen Carboxyprodukten der Sterole konnte nur der Cholesterolmetabolit 27-COOH-C intrazellulär nachgewiesen werden. Die Carboxyprodukte von Campesterol und Sitosterol konnten intrazellulär nicht detektiert werden. Das intrazellulär verbleibende 27-OH-C war mit  $0,44 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein wie auch schon bei den sezernierten Metaboliten der vorherrschende Cholesterolmetabolit in den HepG2-Zellen. 27-COOH-C war in den Zellen in geringerer Menge detektierbar ( $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein). Der Campesterolmetabolit 27-OH-Ca war in signifikant geringerer Menge ( $0,13 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) als 27-OH-C vorhanden. 27-OH-S war mit  $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$  Protein in noch geringerer Menge intrazellulär detektierbar.

#### 4.4 Veresterung von exogenem Cholesterol und nativen Phytosterolen in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten

##### 4.4.1 Veresterung von Cholesterol und Phytosterolen in Enterozyten

Nach Resorption der Sterole in die Enterozyten wird ein Teil der Sterole, insbesondere durch die Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase 2 (ACAT2), mit freien Fettsäuren verestert und als Bestandteil von Chylomikronen über die Lymphe absorbiert (16;140). Unterschiede in dem Veresterungsverhalten der unterschiedlichen Sterole könnten somit als ein Beitrag zur zellulären Sterolselektivität in Frage kommen. Im Folgenden sollte

deshalb die Substratspezifität der ACAT für Cholesterol und die Phytosterole Campesterol und Sitosterol in Caco-2-Zellen charakterisiert werden.

Zuerst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Veresterung für das normale ACAT2-Substrat Cholesterol untersucht. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit steigenden Konzentrationen von  $^3\text{H}$ -Cholesterol inkubiert. Im Anschluss wurden die Sterole aus dem Inkubationsmedium und den Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und die Menge des veresterten  $^3\text{H}$ -Cholesterols quantifiziert.

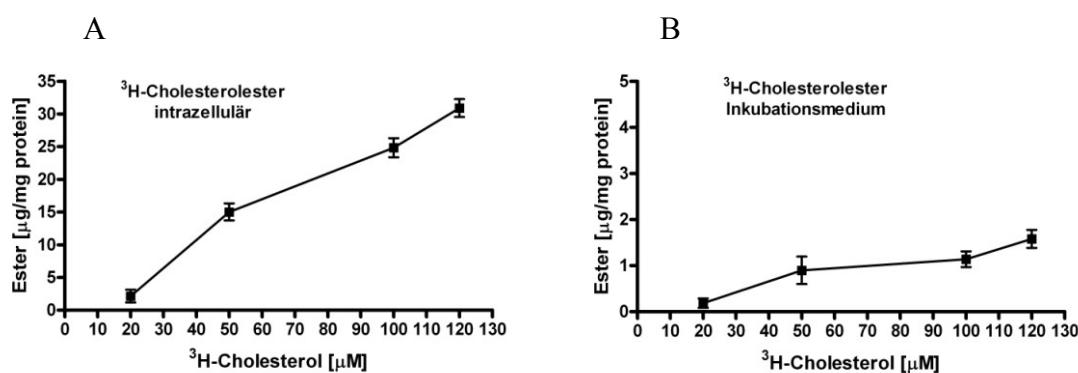
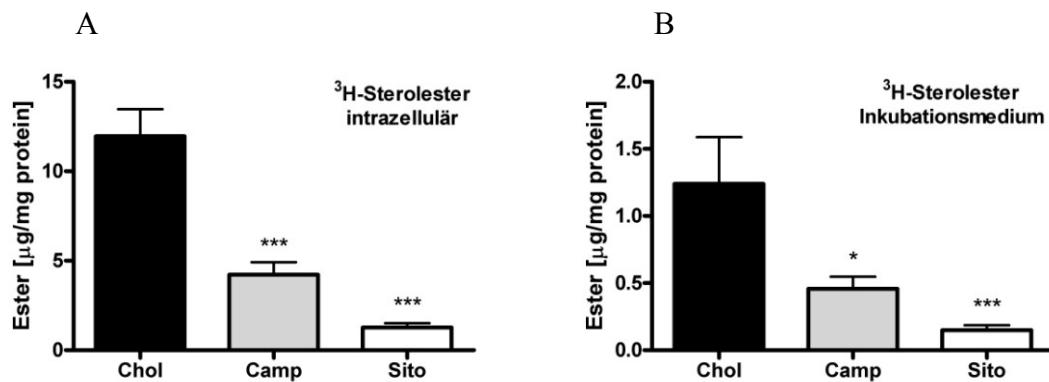


Abbildung 4.27: Veresterung von  $^3\text{H}$ -Cholesterol in Caco-2-Zellen (A) und Sekretion von  $^3\text{H}$ -Cholesterolester in das Inkubationsmedium (B). Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit steigenden Mengen (20, 50, 100, 120  $\mu\text{M}$ )  $^3\text{H}$ -Cholesterol inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, mittels  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat als Standard identifiziert und anschließend quantifiziert;  $n=3-7 \pm \text{SEM}$ .

Mit zunehmender Cholesterolmenge stieg die intrazelluläre Ablage von Cholesterol als Ester nahezu linear an (Abbildung 4.27, A). Ein Großteil des veresterten Cholesterol blieb dabei intrazellulär vorhanden. Ein Teil der Cholesterolester wurde in das Inkubationsmedium sezerniert. Auch hier stieg die Menge der in das Inkubationsmedium sezernierten Cholesterolester mit steigender Cholesterolzufuhr an (Abbildung 4.27, B).

Im linearen Bereich der ACAT-Aktivität sollte anschließend die Veresterung von Cholesterol, Campesterol und Sitosterol in Caco-2 Zellen untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$  der tritierten Sterole inkubiert und die Menge der veresterten tritierten Sterole quantifiziert.



Im Vergleich zu Cholesterin (11,9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) wurde intrazellulär signifikant weniger Campesterin (4,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) verestert und als Ester abgelegt (Abbildung 4.28, A). Sitosterol (1,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) wurde im Vergleich zu Cholesterin 10-fach weniger potent in den Caco-2-Zellen verestert und als Sitostolester intrazellulär abgelegt. Ein Teil der Sterolester wurde aus den Caco-2-Zellen in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.28, B). Die sezernierte Menge machte für Cholesterin (1,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein), Campesterin (0,45  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) und Sitosterol (0,15  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) ca. 10% des intrazellulär abgelegten Esters des jeweiligen Sterols aus. Insgesamt wurde von den exogen zugeführten Sterolen Cholesterin mit 35,2% am effektivsten verestert. Campesterol wurde mit 12,3% deutlich schlechter verestert. Sitosterol stellte mit einer Veresterung von 4,4% das schlechteste Sterolsubstrat für eine Veresterung in Caco-2-Zellen dar. Auch bei reduzierter Sterolmenge (20  $\mu\text{M}$ ) wurde Cholesterin (1,19  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) deutlich besser verestert als Sitosterol (0,175  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein). Ein Teil der Ester wurde in das Inkubationsmedium sezerniert. Auch hier lag Cholesterin (0,187  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) stärker verestert vor als Sitosterol (0,013  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein).

#### 4.4.2 Veresterung von Cholesterin und Phytosterolen in Makrophagen

Die Akkumulation von Sterolen in Makrophagen findet als freies Sterol und als Sterolester statt. In Makrophagen wird die Veresterung insbesondere durch das Enzym Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase 1 (ACAT1) katalysiert (141). Im Folgenden sollte deshalb die Substratspezifität der ACAT1 für Cholesterin und die Phytosterole Campesterol und Sitosterol charakterisiert werden. Makrophagen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Cholesterin,  $^3\text{H}$ -Campesterin und  $^3\text{H}$ -Sitosterin inkubiert und die Menge des veresterten Sterols quantifiziert. Im Anschluss wurden die Sterole aus dem Inkubations-

medium und den Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und die Menge der veresterten tritierten Sterole quantifiziert.

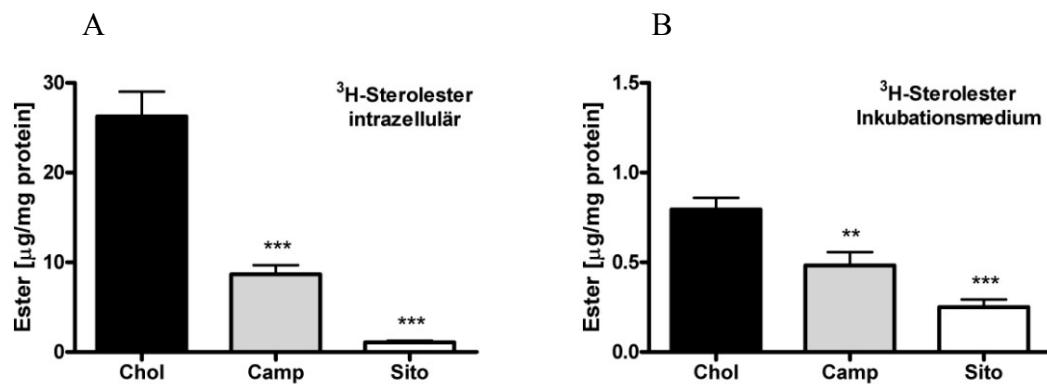


Abbildung 4.29: Veresterung von  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in primären humanen Makrophagen. A: Intrazellulär vorhandene  $^3\text{H}$ -Sterolester, B: Sekretion von  $^3\text{H}$ -Sterolestern in das Inkubationsmedium. Makrophagen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Sterol inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, mittels  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat als Standard identifiziert und quantifiziert.  $n=7-9 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Im Vergleich zu Cholesterol (26,3  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) wurde intrazellulär signifikant weniger Campesterol (8,7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) verestert und als Ester abgelegt (Abbildung 4.29, A). Sitosterol (1,1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) wurde in den Makrophagen im Vergleich zu Cholesterol deutlich weniger potent verestert und als Sitosterolester intrazellulär abgelegt. Ein geringer Teil der Sterolester wurde aus den Makrophagen in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.29, B). Die sezernierte Menge betrug für Cholesterol 0,79  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein, Campesterol 0,48  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein und Sitosterol 0,25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein. Cholesterol wurde von den exogen zugeführten Sterolen mit insgesamt 50,8% am effektivsten verestert. Campesterol wurde mit 24,4% weniger effektiv verestert. Sitosterol stellte mit einer Veresterung von 6,1% das schlechteste Substrat für eine Veresterung in Makrophagen dar. Bei reduzierter Sterolmenge (20  $\mu\text{M}$ ) wurde Cholesterol (13,2  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) deutlich besser verestert als Sitosterol (1,03  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein). Ein Teil der Ester wurde in das Inkubationsmedium sezerniert. Auch hier lag Cholesterol (0,46  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) stärker verestert vor als Sitosterol (0,29  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein).

#### 4.4.3 Veresterung von Cholesterol und Phytosterolen in Hepatozyten

In Hepatozyten wird ein Teil des Cholesterols, welches über HDL- und LDL-Partikel zur Leber gelangt, verestert und in dieser Form gespeichert oder über ApoB-haltige Lipoproteine in den Blutkreislauf abgegeben. Es sollte auch an HepG2-Zellen als Hepatozyten-Modell untersucht werden, wie Cholesterol im Vergleich zu den Phytosterolen Campesterol und Sitosterol verestert wird. HepG2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol inkubiert und die Menge

des veresterten Sterols quantifiziert. Die Sterole wurden aus Inkubationsmedium und Zellen extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie analysiert und die Menge des veresterten  $^3\text{H}$ -Cholesterols quantifiziert.

Im Vergleich zu Cholesterol (23,9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) wurde intrazellulär signifikant weniger Campesterol (7,6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) verestert und als Ester abgelegt (Abbildung 4.30, A). Sitosterol (1,0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein) wurde im Vergleich zu Cholesterol weniger potent in den HepG2-Zellen verestert und als Sitosterolester abgelegt. Ein Teil der Sterolester wurde aus den HepG2-Zellen in das Inkubationsmedium sezerniert (Abbildung 4.30, B). Die sezernierte Menge machte für Cholesterol 1,7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein, Campesterol 0,78  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein und Sitosterol 0,50  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein aus. Cholesterol wurde von den exogen zugeführten Sterolen mit insgesamt 44,5% am effektivsten verestert. Campesterol wurde mit 14,5% weniger effektiv verestert. Sitosterol stellte mit einer Veresterung von 3,0% das schlechteste Substrat für eine Veresterung in HepG2-Zellen dar.

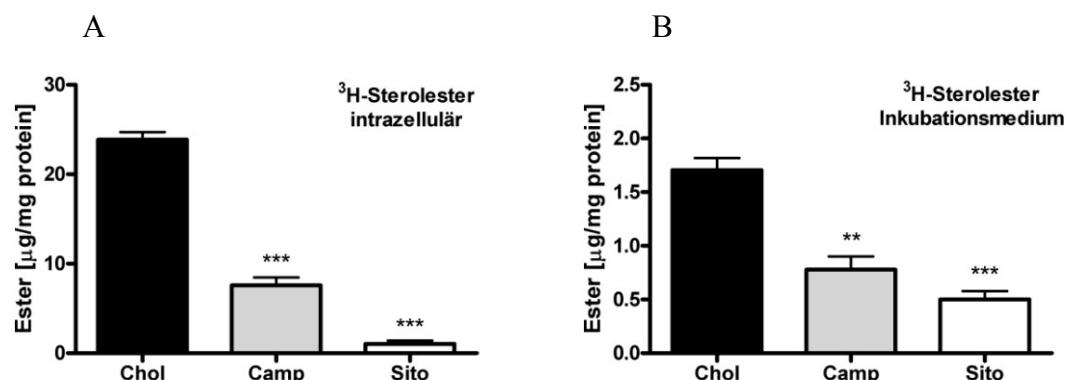


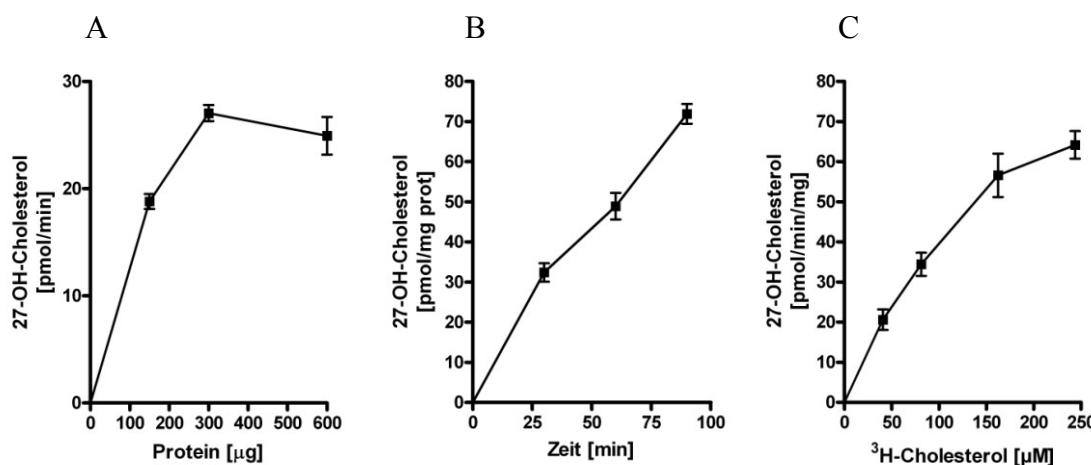
Abbildung 4.30: Veresterung von  $^3\text{H}$ -Cholesterol,  $^3\text{H}$ -Campesterol und  $^3\text{H}$ -Sitosterol in HepG2-Zellen. A: Intrazellulär vorhandene  $^3\text{H}$ -Sterolester, B: Sekretion von  $^3\text{H}$ -Sterolestern in das Inkubationsmedium. HepG2-Zellen wurden für 72 h mit 50  $\mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Sterol inkubiert. Sterole wurden aus dem Medium und den Zellen extrahiert, die Extrakte dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mittels  $^3\text{H}$ -Cholesterolpalmitat als Standard identifiziert und quantifiziert.  $n=3 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

## 4.5 Sterolkonversion in isolierten Mitochondrien

In der vorliegendend Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass alle an der Sterol-Reexkretion beteiligten Zellen in der Lage waren, Cholesterol und Phytosterole mittels der Cytochrom P450 Oxidase CYP27 mit unterschiedlicher Effizienz zu Oxysterol-metaboliten umzuwandeln. CYP27 ist an der inneren Mitochondriewand lokalisiert (118). Um Wechselwirkungen von Phytosterolen und Cholesterol auf Ebene des Enzyms CYP27 unabhängig von der Aufnahme in die Zellen betrachten zu können, wurden intakte Mitochondrien aus HepG2-Zellen präpariert und die Sterolkonversion zu 27-Oxymetaboliten in einem rekonstituierten System untersucht.

### 4.5.1 Methodenoptimierung

Zu Beginn sollte die Methode zum Umsatz von Sterolen in isolierten Mitochondrien hinsichtlich eingesetzter mitochondrialer Proteinmenge und Sterolkonzentration charakterisiert werden. Mitochondrien wurden aus konfluenten HepG2-Zellen isoliert. Cholesterol wurde als  $^3\text{H}$ -markierter Cholesterol-CD-Komplex (80  $\mu\text{M}$ ) vorgelegt. Der Ansatz wurde mit einem NADPH-regenerierenden System komplettiert. Steigende mitochondriale Proteinmengen wurden zugegeben und der Umsatz von Cholesterol zu 27-OH-C nach 90 min bestimmt. Des Weiteren sollte die Konstanz des Umsatzes von Cholesterol (80  $\mu\text{M}$ ) über die Zeit und der Bereich des linearen Umsatzes bei steigenden Substratkonzentrationen für Cholesterol (40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 240  $\mu\text{M}$ ) pro definierte mitochondriale Proteinmenge ermittelt werden.



*Abbildung 4.31: Charakterisierung der Proteinkonzentration und Inkubationsdauer sowie Bestimmung der Substratsättigung für Cholesterol durch CYP27 in isolierten Mitochondrien. Steigende mitochondriale Proteinmengen wurden mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol (80  $\mu\text{M}$ ) inkubiert (A). 300  $\mu\text{g}$  mitochondriales Protein wurde für unterschiedliche Dauer mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol (80  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Steigende Konzentrationen  $^3\text{H}$ -Cholesterol (40 - 240  $\mu\text{M}$ ) wurden mit 300  $\mu\text{g}$  mitochondrialem Protein inkubiert (C). Cholesterol als CD-Komplex, Spezifische Aktivität (3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ). Die Konversion zu  $^3\text{H}$ -27-OH-C wurde nach 90 min mittels TLC und Radio-DC-Scan bestimmt;  $n=2 \pm \text{SD}$  (A,B),  $n=4-6 \pm \text{SEM}$  (C).*

Der Umsatz  $^3\text{H}$ -markierten Cholesterols (80  $\mu\text{M}$ ) zu  $^3\text{H}$ -27-OH-Cholesterol hing bis zu einer mitochondrialen Proteinmenge von 300  $\mu\text{g}$  linear von der Proteinmenge ab und erreichte ein Plateau. Durch eine höhere Proteinmenge konnte kein zusätzlicher Umsatz festgestellt werden (Abbildung 4.31, A), anscheinend begrenzt durch Erschöpfung des NADPH-regenerierendes Systems bei den gewählten Konzentrationen (siehe 3.3.5). Der Umsatz von  $^3\text{H}$ -markiertem Cholesterol zu  $^3\text{H}$ -27-OH-Cholesterol folgte darüber hinaus bei 300  $\mu\text{g}$  mitochondriaalem Protein bis mindestens 90 min einem linearen Verlauf (Abbildung 4.31, B). Die Metabolisierung zu  $^3\text{H}$ -27-OH-Cholesterol nahm bis zu einer Substratkonzentration von 160  $\mu\text{M}$  annähernd linear zu. Bei 160  $\mu\text{M}$  Cholesterol war mit einem Umsatz von  $56 \pm 5$  pmol/min/mg Protein  $^3\text{H}$ -27-OH-Cholesterol eine Sättigung des Enzyms CYP27 zu beobachten. Eine höhere

Cholesterolkonzentration führte nicht mehr zu einer proportionalen Erhöhung des Umsatzes unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 4.31, C). Somit wurde eine 90-minütige Inkubation bei 300 µg Protein als Standardbedingung für weitere Versuche gewählt.

#### 4.5.2 Cholesterol- und Phytosterolkonversion in isolierten Mitochondrien

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen sollte die Substratspezifität von CYP27 für Cholesterol im Vergleich zu Phytosterolen an isolierten Mitochondrien untersucht werden. Wie bereits gezeigt (Abbildung 4.31), ist die Konversion von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol bis zu einer Substratkonzentration von 160 µM nahezu linear. Der Umsatz der unterschiedlichen Sterole sollte deshalb bei halbmaximaler Substratkonzentration (80 µM) und im Optimum der Substratkonzentration (160 µM) bestimmt werden. Cholesterol, Campesterol oder Sitosterol wurden als  $^3$ H-markierte Sterol-CD-Komplexe in unterschiedlichen Konzentrationen vorgelegt. Die Mitochondrienansätze wurden mit einem NADPH-regenerierenden System komplettiert und 300 µg mitochondriales Protein zugefügt. Der Umsatz der Sterole zu den jeweiligen  $^3$ H-27-Hydroxysterolen wurde nach 90 min bestimmt.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Umsatz von Cholesterol, Campesterol und Sitosterol durch CYP27 zu den jeweiligen 27-Hydroxymetaboliten (Abbildung 4.32). Cholesterol stellte bei einer Konzentration von 80 µM mit einem Umsatz von  $38,9 \pm 2,8$  pmol/mg/min Protein das beste Substrat für CYP27 dar. Signifikant geringer wurde das Phytosterol Campesterol zu dem 27-OH-Campesterol umgesetzt ( $6,7 \pm 0,7$  pmol/mg/min Protein). Das am geringsten umgesetzte Substrat stellte das Sitosterol mit einem Umsatz von  $3,9 \pm 0,4$  pmol/min/mg Protein 27-OH-Sitosterol dar. Auch im Plateau maximaler Sättigung des CYP27-Enzyms bei einer Konzentration von 160 µM Sterol war ein identisches Muster des Umsatzes zu den seitenketten-hydroxylierten Sterolmetaboliten zu erkennen. Cholesterol war das am besten metabolisierte Sterol und die beiden Phytosterole Campesterol und Sitosterol wurden in signifikant geringerem Maße als Substrat akzeptiert.

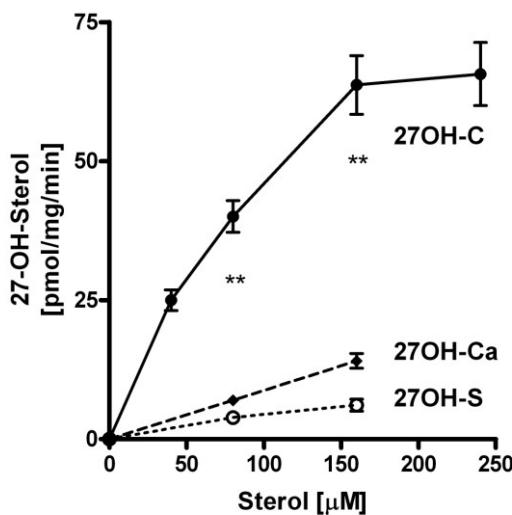


Abbildung 4.32: Metabolisierung von Cholesterin und Phytosterolen durch CYP27 in isolierten Mitochondrien. Unterschiedliche Konzentrationen an  $^3\text{H}$ -markiertem Cholesterin (40-240  $\mu\text{M}$ ), Campesterol und Sitosterol (80  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ ) wurden mit 300  $\mu\text{g}$  mitochondrialem Protein inkubiert. Die Konversion zu  $^3\text{H}$ -27-OH-Sterol wurde nach 90 min mittels TLC und Radio-DC-Scan bestimmt.  $n=4-10 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ )

#### 4.5.3 Hemmung von CYP27 in isolierten Mitochondrien

Die unterschiedliche Substratspezifität von CYP27 gegenüber Cholesterin und Phytosterolen in isolierten Mitochondrien entspricht bisher weitgehend den Ergebnissen in Enterozyten, Makrophagen und Hepatozyten. Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die Phytosterole Campesterol und Sitosterol Einfluss auf den Umsatz von Cholesterin zu 27-OH-Cholesterol nehmen. Es wurde sowohl im Plateau des Cholesterolumsatzes als auch im nicht gesättigten, linearen Bereich gemessen.

Der Einfluss der Phytosterole Campesterol und Sitosterol auf den Umsatz von Cholesterin zu 27-OH-Cholesterol sollte zunächst bei Sättigung des Enzyms im Optimum der Substratkonzentration bestimmt werden (Abbildung 4.33).

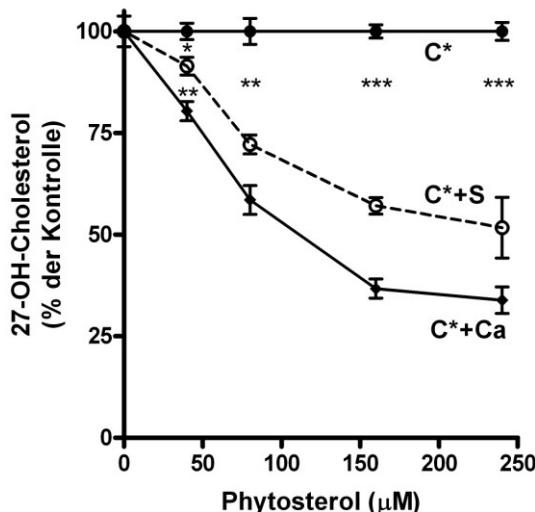


Abbildung 4.33: Hemmung der Metabolisierung von Cholesterin durch Phytosterole in isolierten Mitochondrien.  $^3\text{H}$ -Cholesterin ( $\text{C}^*$ ,  $160 \mu\text{M}$ ;  $3,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) wurde parallel mit steigenden Konzentrationen an Campesterol ( $\text{C}^*+\text{Ca}$ ) oder Sitosterol ( $\text{C}^*+\text{S}$ ) ( $40 - 240 \mu\text{M}$ ) und  $300 \mu\text{g}$  mitochondrialen Protein inkubiert. Die Konversion von Cholesterin zu  $^3\text{H}$ -27-OH-C wurde nach 90 min mittels TLC und Radio-DC-Scan bestimmt; Sterole als CD-Komplex; Darstellung als % der Kontrolle ( $\text{C}^*$ , Cholesterin ohne Phytosterole).  $n=3-4 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Die Zugabe von Sitosterol in steigenden Konzentrationen zum Reaktionsansatz mit  $160 \mu\text{M}$  Cholesterin führte zu einer signifikant verminderten Metabolisierung von Cholesterin zu 27-OH-Cholesterin und somit zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Cholesterolumsatzes. Bei einer Sitosterolkonzentration von  $160 \mu\text{M}$  war mit  $58,9 \pm 1,5\%$  Umsatz im Vergleich zum 27-OH-Cholesterol-Umsatz ohne Sitosterol eine deutliche Hemmung erreicht. Bei  $240 \mu\text{M}$  Sitosterol war nur ein geringfügiger weiterer Abfall auf  $57,4 \pm 6,9\%$  zu sehen. Die Zugabe von Campesterol in steigenden Konzentrationen zum Reaktionsansatz mit  $160 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -Cholesterin als Substrat führte zu einer stärkeren Hemmung des Enzyms CYP27 als durch Sitosterol. Eine Campesterolkonzentration von  $160 \mu\text{M}$  führte schon zu einer signifikanten Hemmung auf  $35,9 \pm 3,7\%$  der Ausgangsaktivität ohne Campesterol. Bei  $240 \mu\text{M}$  war nur noch eine unwesentliche Steigerung der Hemmung auf  $35,7 \pm 3,8\%$  zu sehen.

Der Auftrag des 27-OH-Cholesterolumsatzes bei steigender Cholesterolkonzentration unter Anwesenheit von  $240 \mu\text{M}$  Campesterol oder Sitosterol als Hanes-Woolf-Diagramm bestätigte die kompetitive Hemmung von CYP27 durch Phytosterole (Abbildung 4.34).

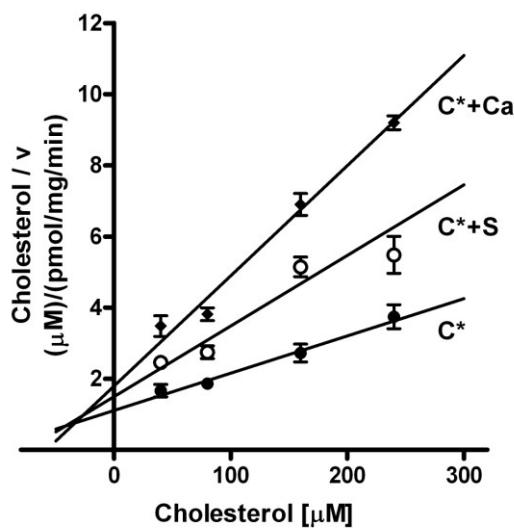


Abbildung 4.34: Hemmung der Metabolisierung steigender Cholesterolmengen in isolierten Mitochondrien durch Phytosterole. Steigende Konzentrationen  $^3\text{H}$ -Cholesterol ( $\text{C}^*$ , 40  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 160  $\mu\text{M}$ , 240  $\mu\text{M}$ ; 3,5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) wurden parallel mit Campesterol oder Sitosterol (240  $\mu\text{M}$ ) und 300  $\mu\text{g}$  mitochondrialem Protein inkubiert. Die Konversion von Cholesterol zu  $^3\text{H}$ -27-OH-C wurde nach 90 min mittels TLC und Radio-DC-Scan bestimmt und die Daten als Hanes-Woolf-Diagramm aufgetragen; Sterole als CD-Komplex;  $n=4 \pm \text{SEM}$ .

Der Einfluss der Phytosterole Campesterol und Sitosterol auf den Umsatz von Cholesterol zu 27-OH-Hydroxycholesterol sollte auch bei halbmaximaler Substratkonzentration bestimmt werden (Abbildung 4.35). Die Zugabe von Sitosterol in steigenden Konzentrationen zum Reaktionsansatz mit 80  $\mu\text{M}$  Cholesterol führte zu einer verminderten Metabolisierung von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol ab einer Sitosterolkonzentration von 160  $\mu\text{M}$ . Die Zugabe von Campesterol in steigenden Konzentrationen führte schon bei niedrigen Campesterolkonzentrationen zu einem verminderten Umsatz von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol. Die CYP27-Hemmung durch Campesterol war dabei über den ganzen Konzentrationsverlauf durchwegs stärker als durch Sitosterol. Im Gegensatz zur Hemmung bei 160  $\mu\text{M}$  Cholesterol nahm die Hemmung bei 80  $\mu\text{M}$  Cholesterol bis zu einer Phytosterolkonzentration von 240  $\mu\text{M}$  noch linear ab.

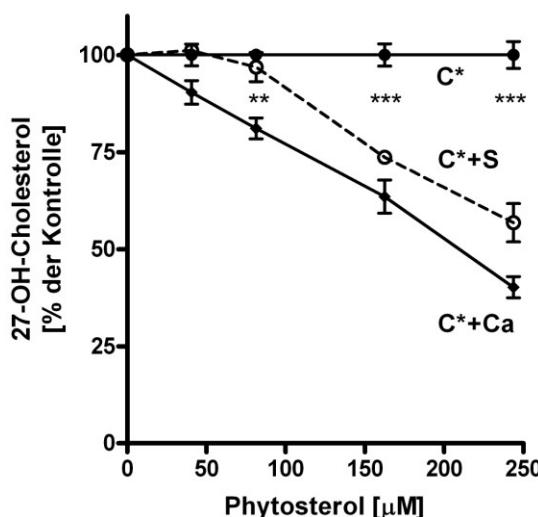


Abbildung 4.35: Hemmung der Metabolisierung von Cholesterin in isolierten Mitochondrien durch Phytosterole.  $^3\text{H}$ -Cholesterin ( $\text{C}^*$ ,  $80 \mu\text{M}$ ;  $3,5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ) wurde parallel mit steigenden Konzentrationen an Campesterol oder Sitosterol ( $40 - 240 \mu\text{M}$ ) und  $300 \mu\text{g}$  mitochondrialem Protein inkubiert. Die Konversion von Cholesterin zu  $^3\text{H}$ -27-OH-C wurde nach 90 min mittels TLC und Radio-DC-Scan bestimmt; Sterole als CD-Komplex; Darstellung als % der Kontrolle ( $\text{C}^*$ , Cholesterin ohne Phytosterole);  $n=3-5 \pm \text{SEM}$ . \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Dies spiegelte zunächst nur den Umsatz des exogen zugeführten  $^3\text{H}$ -Cholesterols wieder. Da isolierte Mitochondrien jedoch auch endogen Cholesterin enthalten und dieses auch als Substrat für CYP27 Verfügung stehen könnte, wurde der Gesamtumsatz von exogenem und endogenem Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol zusätzlich mittels GC/MS überprüft. Cholesterol wurde als Sterol-CD-Komplex vorgelegt ( $160 \mu\text{M}$ ). Campesterol und Sitosterol wurden in maximal hemmender Konzentration zum Reaktionsansatz gegeben ( $240 \mu\text{M}$ ). Als Kontrolle fungierten analoge Ansätze ohne Mitochondrien. Die Ansätze wurden mit einem NADPH-regenerierenden System komplettiert und Mitochondrien ( $300 \mu\text{g}$  Protein) zugefügt. Der Umsatz von Cholesterol zu Hydroxysterolen wurde nach 90 min mittels GC/MS bestimmt.

Kontrollen ohne Mitochondrien wiesen keine hydroxylierten Metaboliten auf. Die Inkubation der Mitochondrien mit  $160 \mu\text{M}$  Cholesterol führte zu einem Umsatz von  $285 \pm 23 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein 27-OH-Cholesterol (Abbildung 4.36). Die Inkubation mit zusätzlich  $240 \mu\text{M}$  Campesterol führte zu einer signifikanten Hemmung des Umsatzes von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol. Auch das Sitosterol zeigte eine signifikante Hemmung des CYP27-katalysierten Umsatzes von Cholesterol, wenn auch etwas weniger ausgeprägt. Es fand sich nach GC/MS-Analyse auch ein sehr geringer Umsatz von Cholesterol zu 25-OH-Cholesterol. Weitere Oxysterolmetaboliten wurden jedoch nicht detektiert. Der Umsatz zu diesem mutmaßlichen Nebenprodukt war jedoch unter allen Inkubationsbedingungen mit einem Umsatz von rund  $10 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein äußerst gering, eine Ko-Inkubation von  $240 \mu\text{M}$  Campesterol oder Sitosterol

beeinträchtigte den Umsatz von Cholesterol zu 25-OH-Cholesterol nicht messbar. Diese Gesamtumsatzdaten bestätigten die  $^3\text{H}$ -Umsatzdaten.

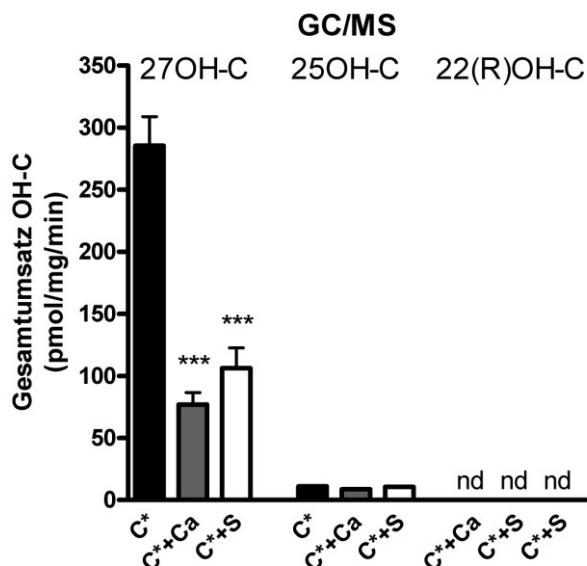


Abbildung 4.36: Hemmung der Metabolisierung von externem und endogenem Cholesterol in isolierten Mitochondrien durch Phytosterole. Cholesterol (160  $\mu\text{M}$ ) wurde parallel mit Campesterol- oder Sitosterol (240  $\mu\text{M}$ ) und 300  $\mu\text{g}$  mitochondrialem Protein inkubiert. Nach Lipidextraktion wurde die Konversion von Cholesterol zu 27-OH-C und 25-OH-C mittels GC/MS quantifiziert. Als interner Standard wurde 100 ng 22-S-OHC verwendet.  $n=3 \pm \text{SEM}$ ; \*\*\* ( $p < 0.001$ )

## 4.6 Einfluss von Cholesterol und Phytosterolen auf die LXR-Aktivierung

27-OH-C ist ein beschriebener endogener LXR $\alpha$ -Agonist (96). Durch Bindung eines Liganden an den Transkriptionsfaktor LXR $\alpha$  erfolgt eine Konformationsänderung für LXR $\alpha$  und schließlich die Bindung an das LXR-Response-Element (LXRE) in der Promotorregion eines Zielgens und in Folge dessen die Aktivierung der Genexpression. Durch Kopplung des LXRE mit dem Luc-Gen für Firefly-Luziferase in einem Reportergenkonstrukt lässt sich eine LXR $\alpha$ -Aktivierung mit nachfolgender Bindung an das LXRE als anschließende Aktivierung des Gens für die Firefly-Luziferase nachweisen. Mithilfe dieses Assays sollte das LXR $\alpha$ -aktivierende Potential von Cholesterol und Phytosterolen in nativer und in seitenketten-hydroxylierter Form charakterisiert werden.

### 4.6.1 Effekte seitenketten-hydroxylierter Cholesterolmetaboliten auf die LXR-Aktivierung

Phytosterole beeinflussten die Metabolisierung von Cholesterol zu 27-OH-C. Es sollte deshalb zunächst der LXR $\alpha$ -aktivierende Effekt des seitenketten-hydroxylierten

Cholesterinmetaboliten 27-OH-C im Vergleich zu dem meist verwendeten LXR $\alpha$ -Liganden 22(R)-OH-C und zu dem synthetischen LXR $\alpha$ -Liganden T0901317 alleine und in Kombination mit dem RXR-Liganden 9-cis-RA genauer untersucht werden. HEK 293-Zellen wurden dazu mit den Plasmiden pTK-LXRE3-luc, pCMX-hLXR $\alpha$  und pGL4.74[hRluc/TK] transient transfiziert. Die Zellen wurden mit 22(R)-OH-C, 22(S)-OH-C, 27-OH-C (jeweils 10  $\mu$ M) oder T0901317 (5  $\mu$ M) jeweils ohne oder mit dem RXR-Liganden 9-cis-RA (1  $\mu$ M) für 24 h inkubiert.

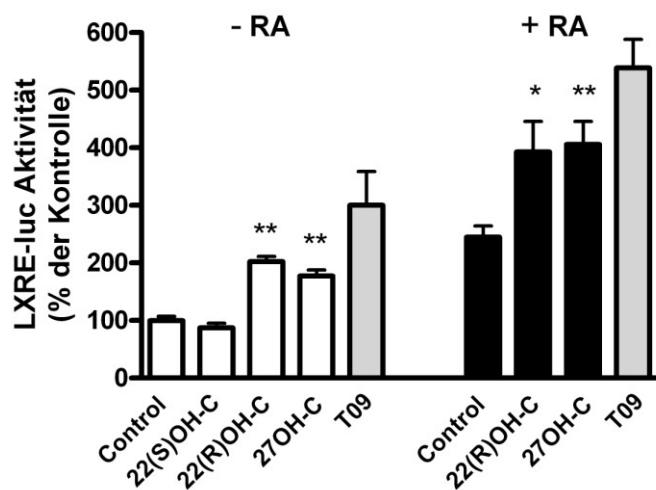


Abbildung 4.37: Analyse der Aktivierung von LXR $\alpha$  durch seitenketten-hydroxylierte Cholesterinmetaboliten mittels der Aktivierung der Luciferase im Plasmidkonstrukt pTK-LXRE3-luc. HEK 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pTK-LXRE3-luc, pCMX-hLXR und pGL4.74[hRluc/TK] transient transfiziert. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Oxysterol (10  $\mu$ M) oder T0901317 (5  $\mu$ M) jeweils ohne oder mit dem RXR-Liganden 9-cis-RA (1  $\mu$ M) für 24 h in Medium HK ohne P/S mit 5% delipidiertem FCS inkubiert. Als Kontrolle diente Lösungsmittel (EtOH). T0901317 diente als Positivkontrolle (nicht in der Varianzanalyse berücksichtigt). Anschließend erfolgte die Messung der Firefly- und Renilla-Luciferaseaktivität.  $n=4-8 \pm SEM$ ; \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ )

Die Inkubation der transfizierten Zellen mit dem Oxysterol 22(R)-OH-C führte zu einer signifikanten Aktivierung von LXR $\alpha$  (Abbildung 4.37). Das Stereoisomer 22(S)-OH-C hingegen führte zu keiner LXR $\alpha$ -Aktivierung. Eine maximale Aktivierung von LXR $\alpha$  wird durch die Bildung eines LXR/RXR-Heterodimers und die folgende Bindung an das LXR Response Element erreicht. Der RXR-Ligand 9-cis-RA alleine führte zu einer etwas höheren Aktivierung der Transkription. Daraus ließ sich gleichzeitig auch auf das Vorhandensein des Transkriptionsfaktors RXR in HEK 293-Zellen schließen. Die Inkubation der HEK293-Zellen mit der Kombination von 22(R)-OH-C mit 9-cis-RA zeigte tatsächlich einen deutlichen synergistischen Effekt in der LXR-Aktivierung. Der Cholesterinmetabolit 27-OH-C alleine zeigte eine signifikante Induktion der LXRE-Luciferaseaktivität. Der Effekt war in derselben Größenordnung wie der Effekt des etablierten LXR-Liganden 22(R)-OH-C. Die Kombination von 27-OH-C mit 9-cis-RA führte zu einer Induktion der LXRE-Luciferaseaktivität auf demselben Niveau der

Kombination von 22(R)-OH-C mit 9-cis-RA. Der synthetische, nicht-steroidale LXR $\alpha$ -Agonist T0901317 führte sowohl alleine als auch in Kombination mit 9-cis-RA zu einer höheren Stimulation als durch die Hydroxycholesterolmetaboliten alleine oder in Kombination mit 9-cis-RA.

#### **4.6.2 Effekte nativer und seitenketten-hydroxylierter Phytosterole und Cholesterol auf die LXR-Aktivierung**

Eine Wirkung nativer Phytosterole als LXR $\alpha$ -Liganden wurde postuliert (87), konnte jedoch bisher nicht eindeutig geklärt werden (129). Daher sollte zum einen die Wirkung nativer Phytosterole im Vergleich zu Cholesterol als potentielle Liganden des Transkriptionsfaktors LXR $\alpha$  überprüft werden. Darüber hinaus zeigte der Cholesterolmetabolit 27-OH-C eine signifikante Induktion der LXRE-Luziferaseaktivität (4.6.1). Wie bisher gezeigt, akzeptiert die Cytochrom P450 Oxidase CYP27 zwar auch Phytosterole als Substrat. Der Umsatz der Phytosterole ist allerdings deutlich geringer als der Umsatz von Cholesterol. Die Wirkung der so entstandenen seitenketten-hydroxylierten Phytosterole als potentielle LXR $\alpha$ -Liganden ist bisher unbewiesen und sollte deshalb ebenfalls genauer untersucht werden. In isolierten Mitochondrien wurden die seitenketten-hydroxylierten Phytosterolmetaboliten 27-OH-Campesterol und 27-OH-Sitosterol biosynthetisiert (siehe 3.3.5, 4.5.2), mittels Dünnschichtchromatographie aufgereinigt und anschließend quantifiziert. Die chromatographische Trennung der 27-OH-Phytosterole von 27-OH-C war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Da Mitochondrien durch endogen vorhandenes Cholesterol ein Grundniveau an 27-OH-C aufweisen und durch Cyclodextrin das Enzym CYP27 minimal stimuliert wird, fungierte ein Mitochondrienansatz mit unbeladenem CD als zusätzliche Kontrolle. So konnte eine mögliche LXR $\alpha$ -stimulierende Aktivität durch endogenes entstandenes 27-OH-C kontrolliert werden. HEK 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pTK-LXRE3-luc, pCMX-hLXR $\alpha$  und pGL4.74[hRluc/TK] transient transfiziert. Die Zellen wurden mit Cholesterol, Campesterol oder Sitosterol oder mit den jeweiligen Hydroxymetaboliten 27-OH-Cholesterol, 27-OH-Campesterol oder 27-OH-Sitosterol (jeweils 10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert, anschließend lysiert und die Luziferaseaktivitäten gemessen. Als Kontrolle dienten Lösungsmittel (EtOH) und Mitochondrienextrakt mit unbeladenem CD, als Positivkontrolle T0901317 (5  $\mu$ M).

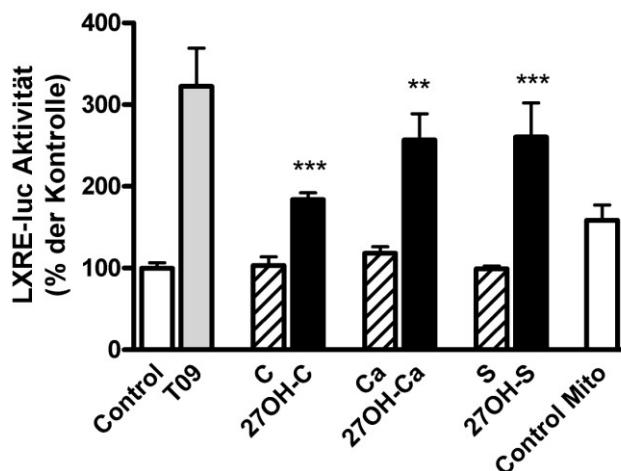


Abbildung 4.38: Analyse der Aktivierung von LXR $\alpha$  durch native Sterole und 27-OH-Sterole mittels der Aktivierung der Luziferase im Plasmidkonstrukt pTK-LXRE $\alpha$ 3-luc. HEK 293-Zellen wurden mit den Plasmiden pTK-LXRE $\alpha$ 3-luc, pCMX-hLXR $\alpha$  und pGL4.74[hRluc/TK] transient transfiziert. Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Cholesterin, Campesterol, Sitosterol oder 27-OH-C, 27-OH-Ca, 27-OH-S für 24 h in Medium HK ohne P/S mit 5% delipidiertem FCS inkubiert. Als Kontrolle diente Lösungsmittel (Kont=EtOH, Kont-Mito=Mitochondrienumsetsatz mit unbeladenem CD in EtOH) und als Positivkontrolle 5  $\mu$ M T0901317 (nicht in der Varianzanalyse berücksichtigt). Anschließend erfolgte die Messung der Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität.  $n=3-6 \pm SEM$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

Die Inkubation der transfizierten Zellen mit dem synthetischen LXR-Agonisten T0901317 führte zu einer signifikanten Aktivierung von LXR $\alpha$  (Abbildung 4.38). Durch natives Cholesterin konnte keine Aktivierung von LXR $\alpha$  erreicht werden. Auch die Inkubation mit den nativen Phytosterolen Campesterol und Sitosterol führte zu keiner signifikanten LXR $\alpha$ -Aktivierung. Die Hydroxymetaboliten 27-OH-Cholesterin, 27-OH-Campesterol und 27-OH-Sitosterol führten dagegen zu einer signifikanten LXR $\alpha$ -Aktivierung gegenüber den entsprechenden nativen Sterolen. Die Mitochondrienkontrolle wies im Vergleich eine Stimulation zur absoluten Nullkontrolle EtOH auf, bedingt durch in Mitochondrien endogen vorhandenes 27-OH-C.

## 4.7 Einfluss von Cholesterin und Phytosterolen auf die spezifische mRNA-Expression in Enterozyten

### 4.7.1 Transkription der Cytochrom P450 Oxidase CYP27

Anhand der vorangegangenen Ergebnisse in unterschiedlichen Zellmodellen und isolierten Mitochondrien hatte sich eine mögliche Rolle von CYP27 bei der Sterol-Interaktion abgezeichnet. 27-OH-Metaboliten konnten als vorherrschende Konversionsprodukte der Sterole in Enterozyten identifiziert und ihre Eigenschaft als LXR-Liganden gezeigt werden. Aufgrund der zentralen Rolle von CYP27 sollte auch der

Einfluss von Cholesterin und Phytosterolen auf die RNA-Expression von CYP27 untersucht werden.

Zur Untersuchung von CYP27 war die Etablierung der quantitativen Real-time RT-PCR in Caco-2-Zellen notwendig. Dazu wurde die Gesamt-RNA von Caco-2-Zellen isoliert und mit CYP27-spezifischen Primern (3.1.4) amplifiziert. Es zeigte sich, dass CYP27 in Caco-2-Zellen auf RNA-Ebene exprimiert wird (Abbildung 4.39, A). Die Länge der erhaltenen CYP27-Amplifikate entsprach dabei der erwarteten Länge von 311 bp. Die Effizienz der PCR-Reaktion war mit nahezu 100% bei einem Korrelationskoeffizienten von 1,000 und einer Steigung von  $-3,31$  (ca.  $-\log_2(10)$ ) bereits optimal (Abbildung 4.39, B).

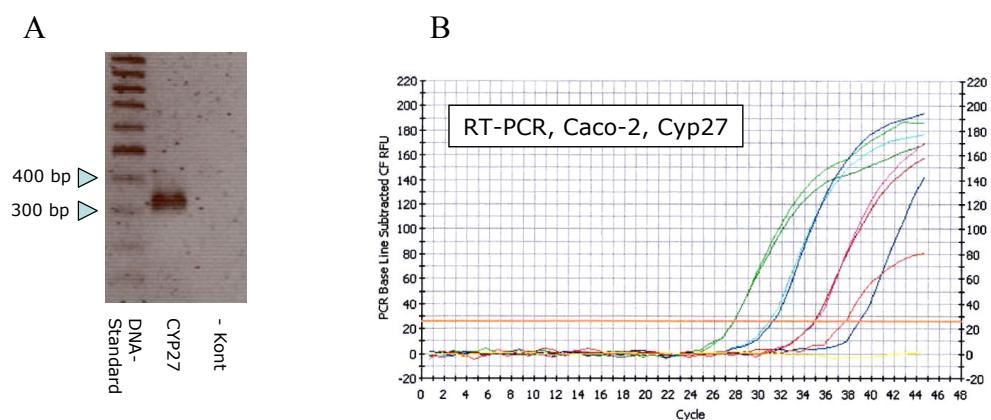


Abbildung 4.39: Expression von CYP27-RNA in Caco-2-Zellen. Gesamt-RNA wurde aus Caco-2-Zellen isoliert und 1000 ng RNA mit CYP27-spezifischen Primern amplifiziert; Größe- und Reinheit der spezifischen CYP27-Amplifikate wurden im 1,5%-igen Agarosegel kontrolliert (A). Etablierung der CYP27-PCR anhand 10-er Verdünnungsschritten der RNA (1000 ng RNA – 1 ng RNA) (B).

Cholesterin und Phytosterole liegen nach Zufuhr mit der Nahrung *in vivo* jedoch nicht nicht isoliert im Enterozyten vor sondern simultan. Um dieser Situation gerecht zu werden und die Interaktion der Sterole auf Ebene der RNA-Expression nachvollziehen zu können wurden den Caco-2-Zellen Cholesterin und Phytosterole in Kombination angeboten. Caco-2-Zellen wurden mit 50  $\mu$ M Cholesterin oder Sitosterol alleine oder mit 50  $\mu$ M Cholesterin in Gegenwart von 50  $\mu$ M Sitosterol oder Campesterol für 24 h in DMEM-Medium mit 10% delipidiertem FCS inkubiert, anschließend die Gesamt-RNA isoliert und CYP27-spezifische mRNA mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

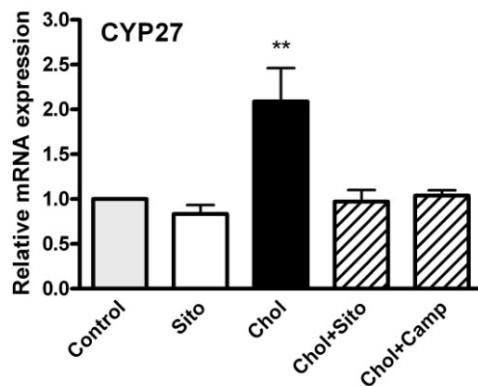


Abbildung 4.40: Expression CYP27-spezifischer mRNA mittels Real-time RT-PCR. Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle (Control, nur CD), 50  $\mu$ M Cholesterol, 50  $\mu$ M Sitosterol, 50  $\mu$ M Cholesterol und 50  $\mu$ M Sitosterol zusammen oder 50  $\mu$ M Cholesterol und 50  $\mu$ M Campesterol als CD-Komplex in DMEM-Medium mit 10% delipidiertem FCS inkubiert.  $n=3-5 \pm SEM$ ; \*\* ( $p < 0.01$ )

Cholesterol alleine bewirkte eine deutliche Induktion der CYP27-Transkription nach 24 h. Inkubierte man die Caco-2-Zellen zusätzlich mit Sitosterol oder Campesterol konnte die durch Cholesterol induzierte CYP27-Transkription verhindert werden. Die Inkubation mit Sitosterol alleine führte ebenfalls zu keiner gesteigerten CYP27-Transkription (Abbildung 4.40).

#### 4.7.2 Transkription der Steroltransporter ABCG8 und ABCA1

Die Steroltransporter ABCG5/G8 und ABCA1 werden in Enterozyten zumindest teilweise LXR-abhängig exprimiert. Die Interaktion der Sterole an CYP27 und die unterschiedliche Konversion der Sterole zu seitenketten-hydroxylierten LXR-Agonisten könnte somit die Regulation der zellulären Sterolexporter beeinflussen.

Im Folgenden sollte deshalb der Einfluss von Cholesterol und Phytosterolen auf die RNA-Expression der Steroltransporter ABCG5/G8 und ABCA1 untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden mit 50  $\mu$ M Cholesterol oder Sitosterol alleine oder mit 50  $\mu$ M Cholesterol in Gegenwart von 50  $\mu$ M Sitosterol oder Campesterol für 24 h in DMEM-Medium mit 10% delipidiertem FCS inkubiert und anschließend die Gesamt-RNA isoliert. Repräsentativ für das ABCG5/G8-Heterodimer wurde ABCG8-spezifische mRNA mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Aus derselben mRNA wurde ebenfalls ABCA1-spezifische mRNA amplifiziert.

Keines der untersuchten Sterole beeinflusste die ABCG8-Transkription in Caco-2-Zellen (Abbildung 4.41, A). Im Gegensatz dazu bewirkte Cholesterol alleine eine signifikante Induktion der ABCA1-Transkription nach 24 h (Abbildung 4.41, B). Die Inkubation der Caco-2-Zellen mit Sitosterol führte zu einer deutlich gesteigerten, nicht signifikanten Induktion der mRNA-Transkription von ABCA1. Inkubierte man die

Caco-2-Zellen mit Sitosterol oder Campesterol in Gegenwart von Cholesterin, konnte die durch Cholesterin induzierte ABCA1-Transkription verhindert werden.

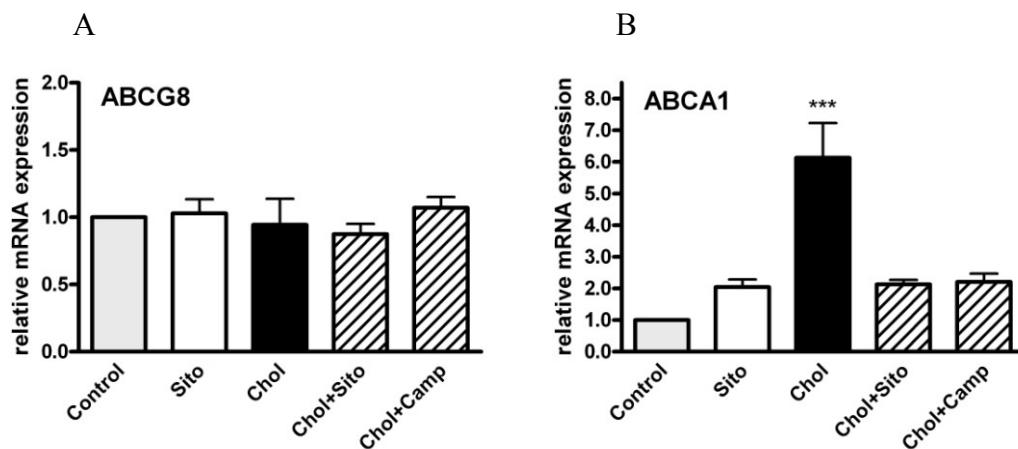


Abbildung 4.41: Expression ABCG8- (A) und ABCA1-spezifischer (B) mRNA mittels Real-time RT-PCR. Caco-2-Zellen wurden für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle (Control, nur CD), 50  $\mu$ M Cholesterin, 50  $\mu$ M Sitosterol, 50  $\mu$ M Cholesterin und 50  $\mu$ M Sitosterol zusammen oder 50  $\mu$ M Cholesterin und 50  $\mu$ M Campesterol als CD-Komplex in DMEM-Medium mit 10% delipidiertem FCS inkubiert.  $n=3-5 \pm SEM$ ; \*\*\* ( $p < 0.001$ )

## 4.8 Effekte von LXR/RXR-Liganden auf die enterozytäre Sterolesekretion

### 4.8.1 Effekte von 22(R)-OH-C, 9-cis-RA und ApoA-I auf die Cholesterolesekretion

Zu Beginn sollte am Enterozyten-Modell der Effekt von LXR/RXR-Liganden auf den Efflux von Cholesterin anhand des bekannten LXR-Agonisten 22(R)-OH-C und des RXR-Agonisten 9-cis-RA überprüft werden. Außerdem sollte der Einfluss des Apolipoproteins ApoA-I auf die intestinale Cholesterolesekretion dargestellt und die Eignung des Caco-2-Transwell-Systems zur Bestimmung des Einflusses von LXR/RXR-Liganden auf die apikale und basolaterale Sterolesekretion untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden auf permeablen Filtermembranen ausgesät und über 21 Tage ausdifferenziert bis ein konfluenter Monolayer vorlag. Die Zellen wurden für 24 h mit 1  $\mu$ Ci/well  $^3$ H-Cholesterin apikal vorinkubiert und gewaschen, um nicht aufgenommenes  $^3$ H-Cholesterin zu entfernen. Zur Untersuchung des Effektes der LXR/RXR-Liganden wurden die Zellen für weitere 24 h mit 22(R)-OH-C (25  $\mu$ M) und 9-cis-RA (1  $\mu$ M) auf apikaler Seite inkubiert. Bei einem Teil der Zellen wurde ApoA-I (20  $\mu$ g/ml) als Akzeptor für sezerniertes Cholesterin auf der basolateralen zugegeben. Nach 24 h wurde die  $^3$ H-Cholesterol-Resekretion in das apikale und basolaterale Kompartiment des Transwell-Systems gemessen.

Im Vergleich zu Kontrollzellen veränderte die Zugabe von 22(R)-OH-C und 9-cis-RA in Kombination die apikale Sekretion von Cholesterin nicht. Auch die basolaterale Zugabe von ApoA-I hatte keinen Einfluss auf die apikale Cholesterolesekretion (Abbildung 4.42, A). Im Gegensatz dazu konnte durch die Inkubation mit 22(R)-OH-C und 9-cis-RA die Cholesterolesekretion in das basolaterale Kompartiment um  $34,0 \pm 8,3\%$  gesteigert werden. Durch die Vorlage von ApoA-I als Akzeptor für Cholesterin konnte die basolaterale Sekretion um zusätzlich  $42,2 \pm 26,1\%$  gesteigert werden (Abbildung 4.42, B). ApoA-I erhöhte zwar die basolaterale Sekretion, jedoch ist die Cholesterolesekretion nach LXR/RXR-Aktivierung in Caco-2-Zellen demnach auch ohne die exogene Zugabe von ApoA-I signifikant gegenüber der Kontrolle induzierbar. Weitere Versuche wurden aus diesem Grunde ohne basolaterale Zugabe von ApoA-I durchgeführt.

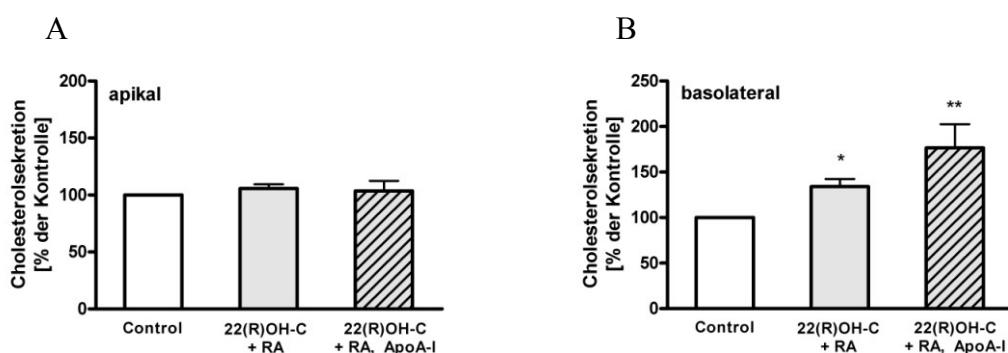


Abbildung 4.42: Effekte von 22(R)-OH-C, 9-cis-RA und ApoA-I auf die Cholesterolesekretion in Enterozyten. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden für 24 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterin in DMEM (10% FCS) vorinkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und auf apikaler Seite mit 22(R)-OH-C (25  $\mu\text{M}$ ) und 9-cis-RA (1  $\mu\text{M}$ ) oder der Kontrolle (0,6 % EtOH, 0,06 % DMSO) in DMEM (10% delip. FCS) inkubiert. Bei einem Teil der Zellen wurde ApoA-I (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf der basolateralen Seite zugegeben. Nach 24 h wurden 10  $\mu\text{l}$ -Aliquots des Mediums von apikaler und basolateraler Seite entnommen und im Szintillationszähler gemessen.  $n=3-4 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ )

#### 4.8.2 Effekt von 27-OH-Cholesterol als enterozytärer LXR-Ligand

Im den vorangegangenen Versuchen zum LXRE-Transaktivierungsassay war die Bedeutung von 27-OH-Cholesterol als LXR $\alpha$ -Agonist gezeigt worden (4.6.1). Es sollte deshalb die Relevanz des LXR $\alpha$ -aktivierenden Effektes von 27-OH-C für den Sterolefflux am enterozytären Zellmodell Caco-2 untersucht werden. Der Effekt von 27-OH-C sollte dabei im Vergleich zu dem anerkannten LXR $\alpha$ -Liganden 22(R)-OH-C und zu dem synthetischen LXR $\alpha$ -Liganden T0901317 charakterisiert werden. Caco-2-Zellen wurden auf permeablen Filtermembranen über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden anschließend für 24 h mit 1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$   $^3\text{H}$ -Cholesterol apikal vorinkubiert. Zur Untersuchung des Effektes der LXR/RXR-Liganden wurde ein Teil der Zellen für weitere 24 h mit 22(R)-OH-C, 27-OH-C (25  $\mu\text{M}$ ), T0901317 (5  $\mu\text{M}$ ) als Positiv-

kontrolle alleine oder in Kombination mit 9-cis-RA auf apikaler Seite inkubiert. Nach 24 h wurde die  $^3\text{H}$ -Cholesterol-Resekretion in das apikale und basolaterale Kompartiment des Transwell-Systems gemessen.

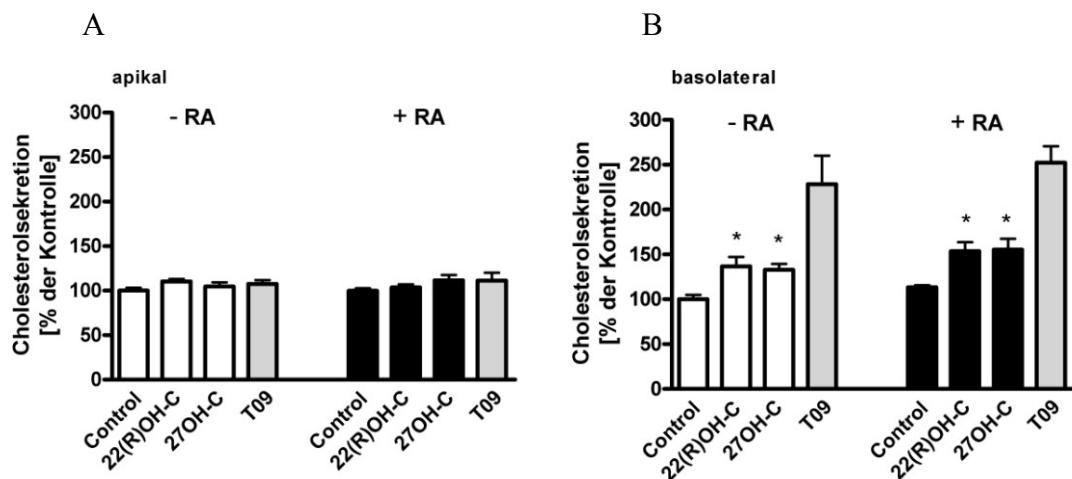


Abbildung 4.43: Effekte von seitenketten-hydroxylierten Cholesterolmetaboliten auf die Cholesterolesekretion in Enterozyten. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden für 24 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterol in DMEM (10% FCS) vorinkubiert. Die Zellen wurden gewaschen um nicht aufgenommenes  $^3\text{H}$ -Cholesterol zu entfernen und auf apikaler Seite mit 22(R)-OH-C, 27-OH-C (je 25  $\mu\text{M}$ ) oder T0901317 (5  $\mu\text{M}$ ) alleine oder in Kombination mit 9-cis-RA (1  $\mu\text{M}$ ) oder der Kontrolle (0,6 % EtOH, 0,06 % DMSO) in DMEM (10% delip. FCS) inkubiert. Nach 24 h wurden 10  $\mu\text{l}$ -Aliquots des Mediums von apikaler und basolateraler Seite entnommen und im Szintillationszähler gemessen.  $n=3-6 \pm \text{SEM}$ ; \* ( $p < 0.05$ )

Die Inkubation der Caco-2-Zellen mit den seitenketten-hydroxylierten Cholesterolmetaboliten 22(R)-OH-C und 27-OH-C und dem synthetischen LXR-Liganden T0901317 führte zu keinem signifikanten Anstieg der Cholesterolesekretion in das apikale Kompartiment. Die Kombination der LXR-Liganden mit dem RXR-Liganden 9-cis-RA hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die apikale Cholesterolesekretion (Abbildung 4.43, A). Die basolaterale Cholesterolesekretion hingegen konnte durch die Oxysterole 22(R)-OH-C und 27-OH-C um  $36,6 \pm 10,4\%$  respektive  $33 \pm 6,3\%$  signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert werden (Abbildung 4.43, B). Die Inkubation in Kombination mit RXR-Liganden 9-cis-RA zeigte einen geringen synergistischen Effekt in der LXR/RXR-Aktivierung und führte zu einer erhöhten basolateralen Cholesterolesekretion im Vergleich zu den Hydroxysterolen alleine. Die Kombination von 27-OH-C mit 9-cis-RA zeigte mit einer um  $55,3 \pm 12,6\%$  erhöhten basolateralen Cholesterolesekretion einen signifikanten Effekt in der LXR/RXR-Aktivierung. Die seitenketten-hydroxylierten Liganden 22(R)-OH-C und 27-OH-C waren in ihrem Effekt weniger potent als die Maximalstimulation mit dem synthetischen LXR-Agonisten T0901317, welche als Positivkontrolle fungierte. Auch in Kombination mit 9-cis-RA war der Effekt mit dem synthetischen LXR-Agonisten T0901317 am ausgeprägtesten.

### 4.8.3 Interaktion von Phytosterolen mit der LXR-induzierten Sterolesekretion

Der Oxycholesterolmetabolit 27-OH-C erhöhte als LXR $\alpha$ -Agonist die Expression des basolateralen Steroltransporters ABCA1 und die basolaterale Cholesterolesekretion in Enterozyten. Phytosterole hemmten die CYP27-abhängige Metabolisierung von Cholesterol zu 27-OH-C. Es sollte deshalb die funktionelle Relevanz der Phytosterol-Cholesterol-Interaktion auf die enterozytäre Cholesterolesekretion am Transwell-Modell der Caco-2 Zellen überprüft werden. Caco-2-Zellen wurden auf permeablen Filtermembranen ausgesät, über 21 Tage ausdifferenziert und für 24 h mit 1  $\mu$ Ci/well  $^3$ H-Cholesterol apikal vorinkubiert. Zur Untersuchung des Effektes der Phytosterole auf die LXR-abhängige Sterolesekretion wurden die Zellen mit Cholesterol alleine (20  $\mu$ M) oder in unterschiedlicher Kombination mit Sitosterol (100  $\mu$ M), 27-OH-C (25  $\mu$ M) oder T0901317 (5  $\mu$ M) als Positivkontrolle inkubiert. Nach 24 h wurde die  $^3$ H-Cholesterol-Resekretion in das apikale und basolaterale Kompartiment gemessen.

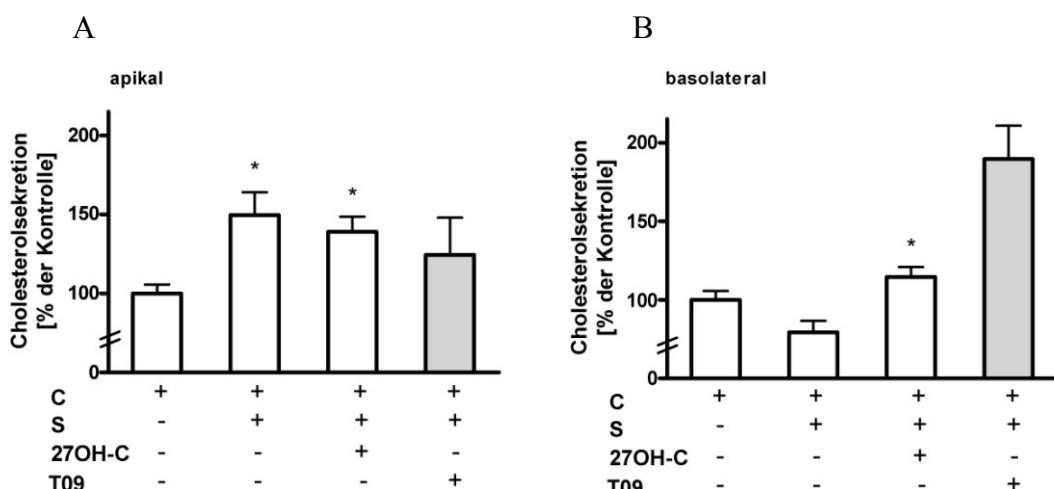


Abbildung 4.44: Effekt der Sitosterol-Cholesterol Interaktion auf die enterozytäre Cholesterolesekretion. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert und für 24 h mit  $^3$ H-Cholesterol in DMEM (10% FCS) vorinkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und auf apikaler Seite mit Cholesterol (20  $\mu$ M), Cholesterol und Sitosterol (100  $\mu$ M) und diesen Sterolen plus 27-OH-C (25  $\mu$ M) oder T0901317 (5  $\mu$ M) in DMEM (10% delip. FCS) inkubiert. Nach 24 h wurden 10  $\mu$ l-Aliquots des Mediums von apikaler und basolateraler Seite im Szintillationszähler gemessen. n=3-5  $\pm$  SEM; \* ( $p < 0.05$ )

Die Ko-Inkubation von Cholesterol und Sitosterol erhöhte die apikale Cholesterolesekretion signifikant gegenüber Cholesterol alleine und reduzierte die basolaterale Sekretion (Abbildung 4.44). Die zusätzliche Zugabe von exogenem 27-OH-C hob die Reduktion der basolateralen Cholesterolesekretion auf und führte gegenüber der Ko-Inkubation von Cholesterol mit Sitosterol zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion. Die gesteigerte apikale Cholesterol-Resekretion unter Ko-Inkubation von Cholesterol mit Sitosterol nahm dabei geringfügig ab. Der potente synthetische LXR-Agonist T0901317 konnte die Hemmung der basolateralen Cholesterolesekretion

komplett aufheben und führte zu einer massiven Steigerung der basolateralen Sekretion gegenüber Cholesterin alleine. Gleichzeitig nahm die apikale Cholesterin-Resekretion unter T0901317 ab.

#### 4.8.4 Enterozytäres Cholesterol- und Phytosterol-Handling nach LXR-Aktivierung

In Caco-2-Zellen führte die Aktivierung durch LXR-Liganden zu einer Steigerung der basolateralen Cholesterinsekretion. Es war jedoch unklar, ob ein LXR-Agonist exklusiv die basolaterale Sekretion von Cholesterin oder darüber hinaus auch die apikale oder basolaterale Sekretion von Sitosterol in Caco-2-Zellen beeinflussen kann. Caco-2-Zellen wurden auf permeable Filtermembranen ausgesät und über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden für 24 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterin oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit oder ohne dem synthetischen LXR-Liganden T0901317 (5  $\mu\text{M}$ ) auf apikaler Seite inkubiert. Die Sterinsekretion in Form von  $^3\text{H}$ -Cholesterin oder  $^3\text{H}$ -Sitosterol auf die apikale und basolaterale Seite des Transwell-Systems wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

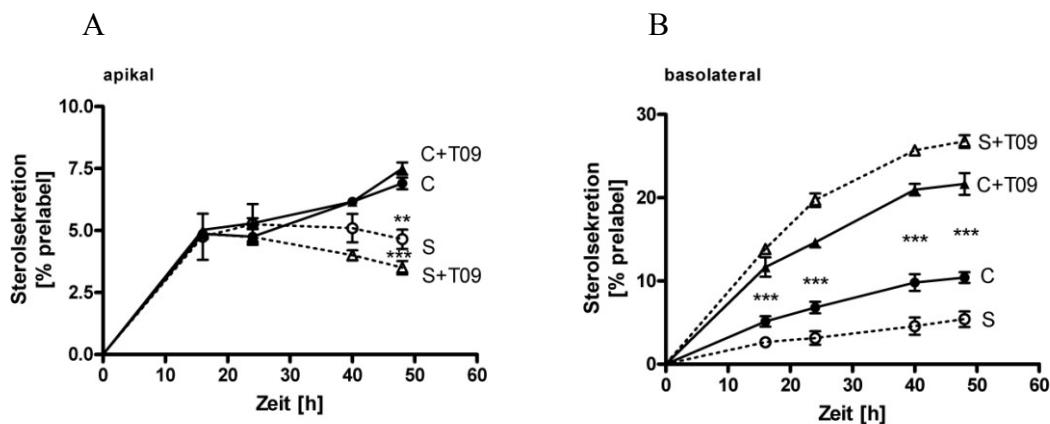


Abbildung 4.45: Effekte des synthetischen LXR-Liganden T0901317 auf die Cholesterin- und Sitosterinsekretion in Enterozyten. Caco-2-Zellen wurden im Transwell-System über 21 Tage ausdifferenziert. Die Zellen wurden für 24 h mit  $^3\text{H}$ -Cholesterin in DMEM (10% FCS) vorinkubiert. Die Zellen wurden gewaschen um nicht aufgenommenes  $^3\text{H}$ -Sterol zu entfernen und auf apikaler Seite mit oder ohne T0901317 (5  $\mu\text{M}$ ) in DMEM (10% delip. FCS) inkubiert. Nach 16, 24, 40 und 48 h wurden 10  $\mu\text{l}$ -Aliquots des Mediums von apikaler und basolateraler Seite im Szintillationszähler gemessen.  $n=3 \pm \text{SEM}$ ; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ )

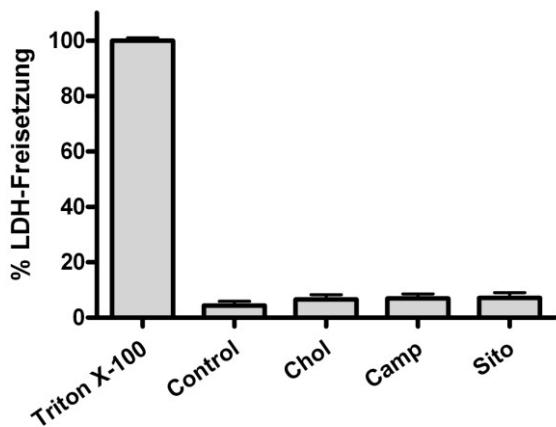
Die apikale Resekretion von  $^3\text{H}$ -Cholesterin und  $^3\text{H}$ -Sitosterol war bis 24 h identisch und stieg nur langfristig für Cholesterin gegenüber Sitosterol an. Die Zugabe von T0901317 konnte die apikale Sekretion von Cholesterin nicht beeinflussen, die apikale Sitosterol-Resekretion fiel sogar durch T0901317 etwas ab (Abbildung 4.45, A). Die basolaterale Sekretion von Cholesterin stieg unter T0901317 schon nach spätestens 16 h signifikant gegenüber der Kontrolle an und führte über den gesamten Zeitverlauf zu einer erhöhten Cholesterinsekretion. Die basolaterale Sekretion von Sitosterol entsprach

ca. 60% der basolateralen Cholesterolesekretion. Die basolaterale Sitosterolesekretion stieg nach Inkubation mit dem synthetischen LXR-Liganden T0901317 fünfachsfach gegenüber der Kontrolle ohne LXR-Ligand an und lag sogar höher als die T0901317-stimulierte basolaterale Sekretion von Cholesterol. Der Effekt blieb über den gesamten Zeitverlauf bestehen (Abbildung 4.45, B). T0901317 verringerte gleichzeitig die apikale Resekretion von Sitosterol gegenüber der Kontrolle ohne LXR-Ligand, was ein sekundäres Phänomen der intrazellulären Substratverfügbarkeit darstellen dürfte.

## **4.9 Evaluierung der Toxizität nativer Phytosterole gegenüber Cholesterol und Einfluss auf die Zellmorphologie**

### **4.9.1 Primäre humane Makrophagen**

Die Erkrankung Sitosterolämie ist durch erhöhte Phytosterol-Plasmakonzentrationen, insbesondere von Sitosterol, gekennzeichnet und ist mit atherosklerotischen Gefäßveränderungen und einem stark erhöhten Risiko für letal verlaufende kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Der genaue Mechanismus ist jedoch unklar, eine Akkumulation von freien, unveresterten Phytosterolen in Makrophagen am Ort der Läsion wird diskutiert (66). Im Rahmen der Versuche zum Umsatz von Phytosterolen und Cholesterol sollte eine mögliche Toxizität der freien Sterole in primären humanen Makrophagen genauer untersucht werden. Makrophagen wurden für 72 h mit 50  $\mu$ M Cholesterol, Campesterol oder Sitosterol als CD-Komplex inkubiert. Als Kontrolle fungierte Inkubationsmedium mit unbeladenem CD und als Kontrolle für maximale Zellschädigung wurde 0,3% Triton-X-100 eingesetzt. Die Messung potentieller Zellschädigung durch die verwendeten Sterole wurde über die Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH) in den Zellkultur-Überstand charakterisiert.



*Abbildung 4.46: Einfluss von Cholesterin und Phytosterolen auf die Zellintegrität von Makrophagen.* Makrophagen wurden für 72 h mit der Lösungsmittelkontrolle (nur CD), Cholesterin, Campesterol oder Sitosterol (jeweils 50  $\mu$ M) in RPMI-Medium mit 10% delipidiertem HS inkubiert. Als Kontrolle für maximale Zellschädigung fungierte 0,3% Triton-X-100. Die LDH-Freisetzung in das Medium wurde gemessen und als „% LDH-Freisetzung“ dargestellt.  $n=4-5 \pm SEM$ .

Es zeigte sich sowohl für die CD-Kontrolle als auch die jeweiligen Sterole eine äußerst geringe LDH-Freisetzung im Vergleich zur Triton-X-100-Kontrolle für maximale Zellschädigung (Abbildung 4.46). Dabei war die LDH-Freisetzung der CD-Kontrolle mit  $4,3 \pm 1,6\%$  nur etwas geringer als unter Cholesterin mit  $6,6 \pm 1,7\%$ , Campesterol mit  $6,9 \pm 1,7\%$  und Sitosterol mit  $7,1 \pm 1,9\%$  (Abbildung 4.46). Damit wiesen die eingesetzten Sterolmengen von 50  $\mu$ M allenfalls eine minimal toxische Wirkung auf primäre humane Makrophagen auf. Es konnte kein Unterschied in der Wirkung zwischen Cholesterin und Phytosterolen festgestellt werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern eine Akkumulation von Cholesterin und Phytosterolen in primären humanen Makrophagen zu einer Änderung der Zellmorphologie führen kann. Die primären humanen Makrophagen wurden dazu vor Messung der LDH-Freisetzung mikroskopisch analysiert.

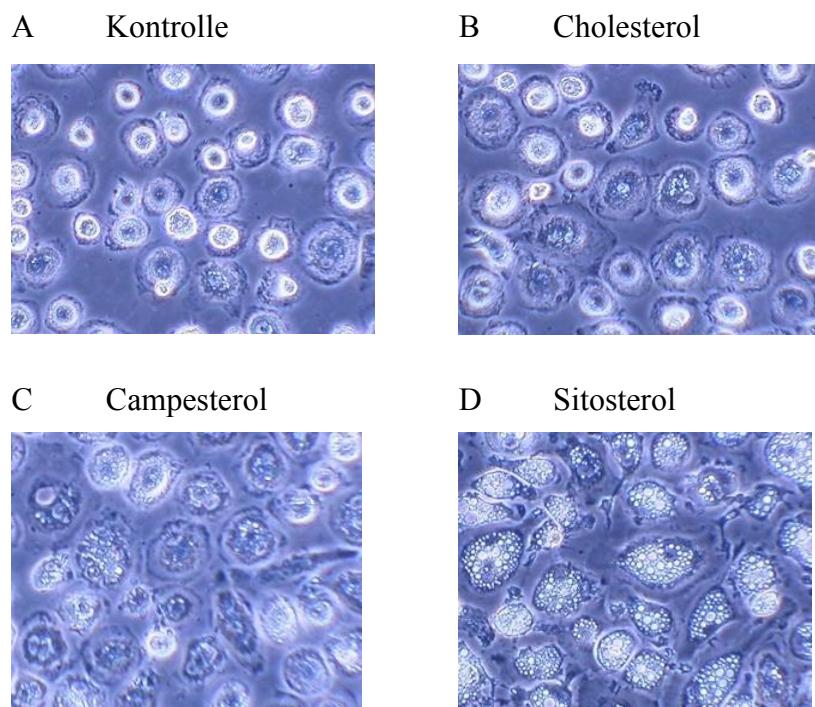


Abbildung 4.47: Mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie von primären humanen Makrophagen nach Sterolinkubation. (Mikroskopische Vergrößerung 20-fach). Primäre humane Makrophagen wurden für 72 h mit der Lösungsmittelkontrolle (nur CD) oder 50  $\mu$ M des jeweiligen Sterols als CD-Komplex in RPMI-Medium mit 10% delipidiertem HS inkubiert.

Es war ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollzellen, Zellen unter Cholesterolbeladung und Zellen unter Phytosterolbeladung zu beobachten (Abbildung 4.47). Die Kontrollzellen hatten, vermutlich durch ihren geringeren Sterol- bzw. Lipidgehalt eine kleinere, rundliche Struktur (A). Nach Inkubation mit Cholesterol kam es zu einer Zunahme des Zellvolumens (B), wahrscheinlich hervorgerufen durch eine Akkumulation von Cholesterol. Die Beladung der Makrophagen mit Sitosterol führte zu einer an Schaumzellen erinnernde Morphologie, charakterisiert durch eine massive, vermutlich lysosomale, Akkumulation des Sterols (D). Die Inkubation der primären Makrophagen mit Sitosterol unterschied sich jedoch deutlich von der Inkubation mit Campesterol. Bei Campesterol war die Morphologie eher der mit Cholesterol beladenen Makrophagen ähnlich, jedoch mit einer Tendenz zu vermuteten Anreicherungen wie unter Sitosterolbeladung (C). Trotz der deutlich veränderten Zellstruktur konnte wie oben gezeigt (Abbildung 4.46) auch nach 72 h Inkubation noch keine zellschädigende Wirkung bei Campesterol und Sitosterol festgestellt werden.

#### 4.9.2 Caco-2-Zellen

Während der Sterolresorption im Dünndarm werden freies Cholesterol und freie Phytosterole in großen Mengen in die Enterozyten aufgenommen. Gerade bei hoher Cholesterolzufuhr mit der Nahrung muss der Enterozyt ein erhöhtes Aufkommen an

Cholesterin resorbieren und prozessieren. Auch die Zufuhr von wirksamen Mengen an freien Phytosterolen im Rahmen einer Ernährung mit phytosterolhaltigen Functional Food Produkten kann hohe Mengen von 2-3 g/Tag betragen. Am Enterozytenmodell sollte deshalb auch eine mögliche Toxizität der unterschiedlichen freien Sterole genauer untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit steigenden Mengen an Cholesterin oder mit definierten Mengen (50  $\mu$ M) Cholesterin, Campesterol und Sitosterol als CD-Komplex inkubiert. Als Kontrolle fungierte Inkubationsmedium mit unbeladenem CD, als Kontrolle für maximale Zellschädigung wurde 0,3% Triton-X-100 eingesetzt. Die Messung potentieller Zellschädigung wurde über die Freisetzung der LDH in den Zellkultur-Überstand gemessen.

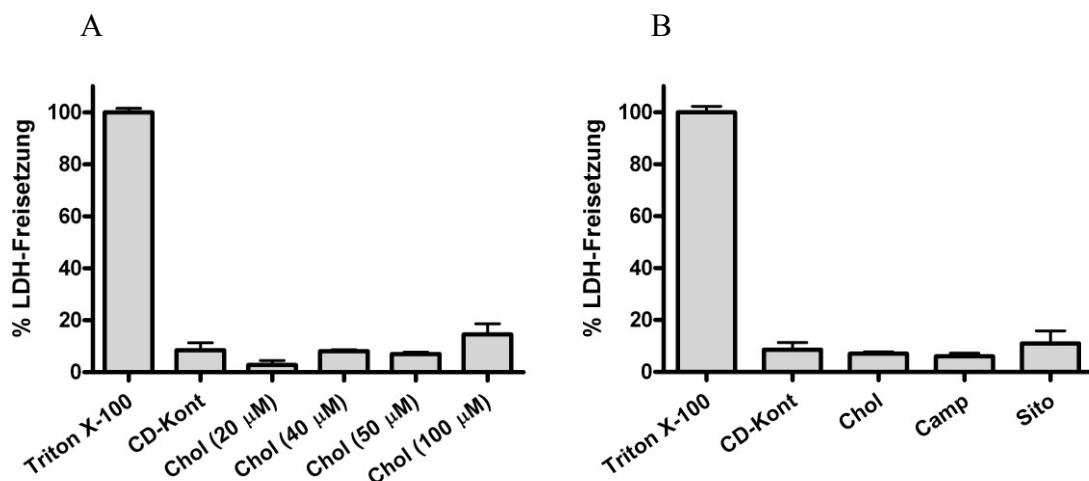


Abbildung 4.48: Einfluss von Cholesterin und Phytosterolen auf die Zellintegrität von Caco-2-Zellen. Caco-2-Zellen wurden für 72 h mit der Lösungsmittelkontrolle (nur CD), steigenden Mengen an Cholesterin (20, 40, 50, 100  $\mu$ M) (A) oder 50  $\mu$ M Cholesterin, Campesterol oder Sitosterol (B) in DMEM-Medium mit 10% delipidiertem FCS inkubiert. Kontrolle für maximale Zellschädigung: 0,3% Triton-X-100. Die LDH-Freisetzung in das Medium wurde gemessen und als „% LDH-Freisetzung“ dargestellt.  $n=3-7 \pm \text{SEM}$ .

Insgesamt wurde die Inkubation mit steigenden Cholesterolmengen von Caco-2-Zellen gut toleriert. Eine Zunahme der Cholesterolmenge führte jedoch tendenziell zu einer Zunahme der prozentuellen LDH-Freisetzung und erreichte mit  $14,6 \pm 4,1\%$  einen Höchstwert bei 100  $\mu$ M (Abbildung 4.48, A). Es zeigte sich darüber hinaus sowohl für die CD-Kontrolle als auch für die unterschiedlichen Sterole bei 50  $\mu$ M eine äußerst geringe LDH-Freisetzung im Vergleich zur Triton-X-100-Kontrolle für maximale Zellschädigung (Abbildung 4.48). Die LDH-Freisetzung der CD-Kontrolle mit  $8,7 \pm 2,8\%$  bewegte sich im Bereich derer von Cholesterol mit  $7,1 \pm 0,7\%$  und Campesterol mit  $6,0 \pm 1,1\%$ . Die LDH-Freisetzung von  $10,9 \pm 4,9\%$  nach Sitosterol-Inkubation war tendenziell höher als bei Cholesterol und Campesterol.

Auch für Caco-2-Zellen sollte die Auswirkung einer Akkumulation von Phytosterolen und Cholesterin auf die Zellmorphologie untersucht werden. Caco-2-Zellen wurden dazu vor Messung der LDH-Freisetzung mikroskopisch analysiert.

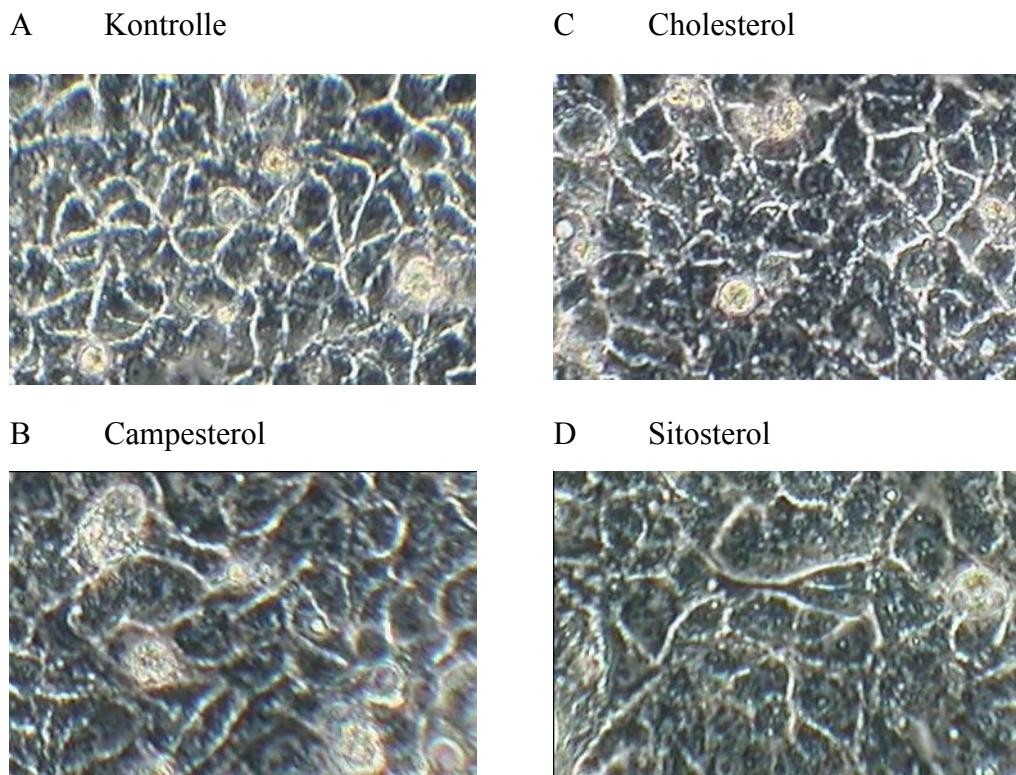


Abbildung 4.49: Mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie von Caco-2-Zellen nach Sterolinkubation. (Mikroskopische Vergrößerung 20-fach). Caco-2-Zellen wurden 72 h mit der Lösungsmittelkontrolle (nur CD) oder 50  $\mu$ M des jeweiligen Sterols als CD-Komplex in DMEM-Medium mit 10% delipidiertem FCS inkubiert.

Die Caco-2-Zellen schienen die hohen Konzentrationen an freien Sterolen deutlich besser zu tolerieren als primäre humane Makrophagen. Es konnte kein Unterschied in der Morphologie der Caco-2-Zellen zwischen Kontrollzellen, Zellen unter Cholesterolbeladung und Zellen unter Phytosterolbeladung ausgemacht werden. Lediglich eine Zunahme des Zellvolumens fiel unter Phytosterolbeladung auf.

## 5 Diskussion

Der cholesterolsenkende Effekt der Phytosterole ist nicht allein durch intraluminale Vorgänge erklärbar. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergaben Belege für einen neuen intrazellulären Mechanismus der Cholesterolsenkung durch Phytosterole.

### 5.1 Cholesterol und Phytosterole werden in Enterozyten unterschiedlich gehandhabt

Die Aufnahme über die apikale Enterozytenmembran und die basolaterale Sekretion stellen die entscheidenden Schritte der Absorption von Cholesterol und Phytosterolen im Dünndarm dar. Um die Absorption der Nahrungssterole in vitro zu simulieren und das enterozytäre Handling der Phytosterole im Vergleich zu Cholesterol darzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die humane Caco-2-Zellline als Modellsystem gewählt. Aufgrund der Vergleichbarkeit des Lipidhandlings im Dünndarm in vivo mit dem Handling in Caco-2-Zellen wird diese Zelllinie häufig als Modell für die enterozytäre Prozessierung von Lipiden und Sterolen verwendet (130;142-144). Nach erfolgreicher Etablierung des Caco-2-Transwell-Modells (3.2.2) wurde die apikale Aufnahme und basolaterale Sekretion des vorherrschenden Phytosterols Sitosterol im Vergleich zu Cholesterol bei verschiedenen Darreichungsformen untersucht.

#### 5.1.1 Effekte bei mizellärer Sterolzugabe

Die Zugabe der Sterole in Form gemischter Mizellen entspricht weitgehend der in vivo Situation im Dünndarm und stellt die physiologischste Form der Sterol- bzw. Lipidexposition in vitro dar. Caco-2-Zellen, die über 72 h mit 50  $\mu$ M  $^3$ H-Cholesterol in Mizellen inkubiert wurden, zeigten erwartungsgemäß eine schnelle und effektive Resorption des Cholesterols. Die gleichzeitige Präsenz von Sitosterol und  $^3$ H-Cholesterol in den gemischten Mizellen führte zu einer signifikanten Verringerung der zellulären Aufnahme von  $^3$ H-Cholesterol um annähernd 30%. Dieser Effekt ist in Einklang mit Ergebnissen zur enterozytären Cholesterolaufnahme von Field et al. (88). Die Ergebnisse wären noch mit dem bislang vorgeschlagenen, intraluminalen Wirkmechanismus der Phytosterole erklärbar. Aufgrund des minimal hydrophoberen Charakters zeigen Phytosterole eine höhere Affinität als Cholesterol zur Lipidphase gemischter Mizellen und treten somit in Konkurrenz zu Cholesterol um den Einbau in die Mizellen (85-87). Sitosterol wurde aus gemischten Mizellen zwar etwas schlechter resorbiert als Cholesterol. Jedoch wurde auch Sitosterol von Enterozyten zu mehr als 50% aufgenommen. Dies lässt nur auf eine partielle Selektivität der Aufnahme von Phytosterolen und Cholesterol in Enterozyten schließen.

Die molekularen Mechanismen der intestinalen Resorption von Cholesterol und anderen Sterolen werden - trotz der bekannten Relation zwischen erhöhtem Plasmacholesterol

und kardiovaskulären Erkrankungen (145) - erst seit einigen Jahren intensiver beforscht (10). Die über lange Zeit angenommene Theorie der passiven Diffusion der Sterole über die Bürstensaummembran ist als alleiniger Resorptionsmechanismus nicht mehr zu halten. Es wird vielmehr ein aktiver Transportvorgang angenommen, an dem multiple membranständige oder membranassoziierte Transportproteine beteiligt sind (10;146). Dem in der apikalen Enterozytenmembran exprimierten Protein NPC1L1 wird eine Hauptrolle bei der Sterolresorption aus dem Darmlumen beigemessen (15). Durch Hemmung dieses Proteins mittels Ezetimib lässt sich die Cholesterolaufnahme in Enterozyten signifikant reduzieren (15). Jedoch hemmt Ezetimib auch die Aufnahme von Phytosterolen in Enterozyten (15), wie an Sitosterolämie-Patienten und am Sitosterolämie-Mausmodell gezeigt werden konnte (72;73). Im NPC1L1(-/-)-Knockoutmodell der Maus zeigt sich sowohl für Cholesterol als auch für Sitosterol eine verminderte intestinale Aufnahme (56). Dies lässt vermuten, dass NPC1L1 nicht zwischen verschiedenen Sterolen unterscheiden kann und die Absorption von sowohl Cholesterol als auch Phytosterolen vermittelt. In einigen Zellmodellen scheint jedoch ein gewisser Unterschied in der Akzeptanz unterschiedlicher Substrate durch den Steroltransporter NPC1L1 zu bestehen (54;147). So konnte an einer stabil NPC1L1-transfizierten Hepatozyten-Zelllinie ein quantitativ höherer Transport von Cholesterol gegenüber Sitosterol in die Zellen und eine unterschiedliche Aufnahmekinetik für Cholesterol und Sitosterol gezeigt werden (54;147). Dieser bevorzugte Transport von Cholesterol gegenüber Sitosterol wurde auch an der Caco-2-Zellline gefunden. Sitosterol stellte ein etwas schlechteres Substrat für NPC1L1 in Caco-2-Zellen, besonders nach Überexprimierung von NPC1L1, dar (53). Dies deckt sich mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. In Caco-2-Zellen wird NPC1L1 auf mRNA- und Proteinebene in selbem Maße exprimiert wie im proximalen Jejunum, welches als Hauptort der Sterolresorption gilt (148). Somit lassen sich aus den Ergebnissen am verwendeten Caco-2-Transwellmodell Rückschlüsse auf die in-vivo Situation ziehen. Die Daten lassen vermuten, dass die Resorption von Cholesterol wie von Sitosterol von NPC1L1 vermittelt wird und dabei eine gewisse Sterolselektivität besteht, jedoch trotz Bevorzugung von Cholesterol auch Sitosterol in erheblichem Ausmaß in Enterozyten aufgenommen wird.

Es gibt Hinweise auf die direkte Regulation von NPC1L1 durch Sterole. So reduzierte Sitosterol die Expression von NPC1L1 auf mRNA- und Proteinebene in Enterozyten, was in einer verminderten Sterolresorption resultierte (149). Allerdings konnte in der Arbeit von Jesch et al. ein ähnlicher Effekt auch für Cholesterol festgestellt werden, was für einen generellen Steroleffekt und gegen einen spezifischen Phytosterol-Einfluß auf die NPC1L1-Expression spricht (149). Da im NPC1L1-Knockoutmodell allerdings noch 30% der fraktionellen Cholesterolresorption erhalten bleibt (55), muss es weitere NPC1L1-unabhängige Wege der Sterolresorption geben. Diese könnten möglicherweise durch Sterolselektivität oder spezifische Regulation durch Phytosterole zum unterschiedlichen Sterolhandling beitragen. Potentielle Effektorproteine der

Cholesterolresorption in Enterozyten wie SR-BI, CD36 und Aminopeptidase N wurden jedoch noch nicht auf ihre Beeinflussung durch Phytosterole untersucht (89).

### 5.1.2 Effekte unabhängig von der mizellären Sterolzugabe

Die genaue Formulierung von gemischten Mizellen kann allerdings erheblichen Einfluss auf den enterozytären Steroltransport haben (137). Es existiert eine Anzahl unterschiedlicher chemischer Formulierungen für die Herstellung gemischter Mizellen für die Solubilisierung von Sterolen. Die Konzentrationen verschiedener amphiphiler Substanzen variieren zum Teil beträchtlich. Gallensäuren, insbesondere Taurocholat, stellen in der Regel die Hauptkomponente dar. Es werden dabei selbst die in den Versuchen verwendeten Komponenten Taurocholat, Monoolein und Phosphatidylcholin in der Literatur in unterschiedlicher Konzentration verwendet (88;150-152).

Um diese Einflüsse des mizellären Systems einzuschränken und den Effekt der Phytosterole auf die Cholesterol-Resorption davon unabhängig zu untersuchen, wurden die Sterole in der vorliegenden Arbeit auch als ethanolische Lösung angeboten. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Resorption aus dem apikalen Kompartiment des Caco-2-Transwell-Systems mit ca. 60% des Cholesterols geringer und zeitlich etwas verzögerter als unter mizellärer Zugabe. Auch bei Zugabe in ethanolischer Lösung blieb aber die apikale Sitosterolaufnahme unter der von Cholesterol. Es zeigte sich somit eindeutig, dass die Selektivität der Sterolresorption nicht an die mizelläre Zugabeform der Sterole gebunden ist. In dem mizellenfreien System ließ sich ebenfalls ein Effekt der Sitosterolinkubation auf die Cholesterolaufnahme nachweisen. Die Aufnahme von Cholesterol in die Enterozyten konnte dabei durch Sitosterol signifikant reduziert werden. Während sich dieser Effekt bei Inkubation mittels gemischter Mizellen noch mit dem physico-chemischen Verdrängungseffekt von Cholesterol aus Mizellen durch hydrophoberes Sitosterol hätte erklären lassen, belegt der erhaltene Effekt in ethanolischer Lösung mizellen-unabhängige Mechanismen. Da die Inkubation in Medium mit delipidiertem FCS durchgeführt wurde, bestand auch keine Gefahr einer zusätzlichen Lipid-Sterol-Interaktion. Die absolute basolaterale Sekretion von Sitosterol war in den Versuchen mit ethanolischer Zugabe geringer als die basolaterale Sekretion von Cholesterol alleine. Der Unterschied in der basolateralen Sekretion ließ sich aber nicht allein durch die differentielle apikale Aufnahme der Sterole erklären. Die kontinuierlich steigende apikale Aufnahme von Sitosterol würde sonst auch eine steigende basolaterale Sekretion erwarten lassen. Da dies nicht zu beobachten war, ist die Beteiligung eines intrazellulären Mechanismus der spezifischen Phytosterolerkennung zu vermuten, welcher die basolaterale Sitosterolesekretion selektiv begrenzt. Die Beeinflussung der basolateralen Cholesterolesekretion durch die Ko-Inkubation mit Sitosterol zeigte gleichzeitig, wie die Interaktion von Cholesterol mit Phytosterolen das Handling von Cholesterol in Enterozyten auch an diesem Teilschritt beeinflusst.

Um im Folgenden das differenzielle intrazelluläre Handling verschiedener Sterole vergleichen zu können, waren für die weiteren Untersuchungen möglichst äquivalente intrazellulär vorhandene Mengen von extern zugeführtem Cholesterol und Phytosterolen wünschenswert. Cholesterol und die Phytosterole Campesterol und Sitosterol wurden an 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (CD) komplexiert und in dieser Form den Zellen angeboten um die Löslichkeit der Sterole im Medium zu erhöhen und gleichzeitig ein System ohne mizelläre Komponenten beizubehalten. Die Komplexierung von Cholesterol an CD stellt eine in der Literatur gut untersuchte Maßnahme zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit von Sterolen im Zellkulturmedium dar (138). Lipophile Sterole können in die hydrophobe Kavität des CD eingelagert werden. Durch die hydrophile Oberfläche des CD erhöht sich die Wasserlöslichkeit der Sterole erheblich auf bis zu 20 mg/ml (153). Das molare Verhältnis von CD zu Sterol im CD-Sterol-Komplex ist von entscheidender Bedeutung für die zelluläre Sterolzufuhr mittels CD. Liegt das Sterol in ausreichend hoher Menge vor, fungiert das sterolbeladene CD als effizienter Steroldonor (154). Die Aufnahme der CD-komplexierten Sterole in die Caco-2-Zellen war effektiv und schnell. Campesterol und Sitosterol wurden nur wenig langsamer resorbiert als Cholesterol und die kumulativ aufgenommenen Mengen der Sterole nivellierten sich über den Zeitverlauf nahezu aus. Campesterol, welches sich nur durch eine Methylgruppe an C24 von Cholesterol unterscheidet wurde etwas besser resorbiert als Sitosterol, welches eine Ethylgruppe an C24 besitzt. Es konnte somit auch nach Komplexierung der Sterole an CD eine residuale Selektivität der Phytosterolresorption in Abhängigkeit der Sterolseitenketten-Substitution über den Zeitverlauf gezeigt werden, jedoch in geringerem Ausmaß als bei ethanolisch oder mizellär vermittelter Sterolzugabe. Die Tatsache, dass die initiale Resorptionskinetik der an CD komplexierten Sterole unterschiedlich, das Plateau jedoch nahezu gleich war, lässt neben einer selektiven, transporter-vermittelten Aufnahme noch andere Mechanismen vermuten. Eventuell wird durch die Bindung des CD-Sterol-Komplexes an die Zelloberfläche der passive Transfer der Sterole über die Plasmamembran in die Zelle (138;154) erleichtert.

Die Komplexierung der Phytosterole an Cyclodextrin führte zu einer besseren intrazellulären Verfügbarkeit im Vergleich zur mizellären Darreichung oder ethanolischen Lösung. Die basolaterale Phytosterolsekretion und der Einfluss von Phytosterolen auf die basolaterale Cholesterolsekretion in Enterozyten ließen sich so verlässlicher beurteilen, da eine zu unterschiedliche apikale Resorption allein schon eine unterschiedliche basolaterale Resorption bedingen könnte. Trotz der so erreichten erhöhten Phytosterolaufnahme in Caco-2-Zellen entsprach die basolaterale Sekretion von Sitosterol im Transwell-System nicht der von Cholesterol. Eine um 20% geringere apikale Sitosterolaufnahme war mit einer fast 50% geringeren basolateralen Sekretion von Sitosterol im Vergleich zu Cholesterol assoziiert. Der basolaterale Steroltransporter ABCA1 (37) scheint jedoch selbst keine Sterolspezifität aufzuweisen (155). Die Befunde lassen den Schluss zu, dass ein effektives intrazelluläres Sorting von Sterolen

unterschiedlicher Seitenkettenstruktur zur unterschiedlichen basolateralen Sekretion führt.

Gleichzeitig zeigte sich auch ein eindeutiger Einfluss einer Inkubation mit Sitosterol auf die basolaterale Cholesterolesekretion. Die Inkubation von  $^3\text{H}$ -Cholesterol in nanomolarer Konzentration bei gleichzeitiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol führte zwar nur zu einer geringfügig verminderten Aufnahme im Vergleich zur Inkubation von  $^3\text{H}$ -Cholesterol mit 50  $\mu\text{M}$  Cholesterol, jedoch zu einer bis zu 65%-igen Hemmung der basolateralen Sekretion von  $^3\text{H}$ -Cholesterol. Es muss demnach ein dominanter intrazellulärer Mechanismus in Enterozyten vorliegen, der die verminderte basolaterale Cholesterolesekretion unter Phytosteroleinfluss bedingt. Interessanterweise war bei der Inkubation von  $^3\text{H}$ -Sitosterol in nanomolarer Konzentration bei gleichzeitiger Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Sitosterol oder 50  $\mu\text{M}$  Cholesterol ebenfalls ein deutlicher Unterschied in der basolateralen Sekretion von  $^3\text{H}$ -Sitosterol nachweisbar. Das Handling von  $^3\text{H}$ -Sitosterol in nanomolarer Konzentration bei gleichzeitiger Inkubation mit einem Überschuss an Cholesterol unterschied sich überraschenderweise nicht gegenüber dem Handling von  $^3\text{H}$ -Cholesterol mit einem Überschuss an Cholesterol. Das Handling der  $^3\text{H}$ -markierten Sterole in nanomolarer Konzentration folgte also insgesamt weitgehend dem Handling des dominierenden unterliegenden Sterols in mikromolarer Konzentration. Dies spricht zusätzlich gegen eine direkte Substratspezifität der Steroltransportproteine. Offenbar müssen für die Selektivität der Sterolabsorption und für die Interaktion von Cholesterol mit Sitosterol höhere zelluläre Sterolkonzentrationen vorliegen, welche von regulatorischen Sensoren und Effektoren wahrgenommen werden können. Die Sterolselektivität und die Phytosterol-Cholesterol-Interaktion bleiben jedenfalls auch unter der Cyclodextrin-vermittelten, mizellenfreien Inkubation erhalten.

## 5.2 Metabolisierung von Cholesterol und Phytosterolen in Enterozyten zu seitenketten-hydroxylierten Metaboliten

Physico-chemische Effekte im Darmlumen und eine limitierte Präferenz für Cholesterol gegenüber Phytosterolen beim apikalen Eintritt in die Enterozyten können demnach nur teilweise für den Wirkungen der Phytosterole und das selektive Sorting unterschiedlicher Sterole verantwortlich sein. Das deutet auf zusätzliche intrazelluläre Mechanismen von Phytosterolen beim cholesterolsenkenden Effekt und bei der Diskriminierung zwischen Cholesterol und Phytosterolen hin. Phytosterole müssen auch nicht gleichzeitig mit Cholesterol intraluminal vorliegen, um eine cholesterolsenkende Wirkung auszuüben (90-92). Mit der molekularen Aufklärung der genetischen Basis der Sitosterolämie als dysfunktionelle Mutationen der enterozytär und biliär exprimierten zellulären Sterolexporter ABCG5/G8 konnte gezeigt werden, dass Phytosterole effizient in die Enterozyten aufgenommen und bei ABCG5/G8-Defekten auch deutlich höher systemisch resorbiert werden (58;89). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Phytosterole zu einem erheblichen Teil von den Enterozyten apikal aufgenommen,

jedoch nur in geringerem Maße als Cholesterol basolateral sezerniert. Nach der Aufnahme in Enterozyten werden Phytosterole nämlich bevorzugt über die an der apikalen Enterozytenmembran exprimierten Sterolexporter ABCG5/G8 zurück in das Darmlumen transportiert (21). Dies belegt, dass das Sorting zwischen Phytosterolen und Cholesterol ein aktiver biologischer Prozess ist, welcher vornehmlich intrazellulär stattfindet.

Die Charakterisierung der ABCG5/G8-Transporter zeigt, dass die Mutation in einem einzelnen Gen zu einem deutlichen Verlust der Selektivität der systemischen Sterolabsorption führen kann (76;156). Letztendlich ist der genaue Mechanismus dieser Sterolselektivität jedoch weiterhin unklar. Anhand von *in vitro* Versuchen mit aufgereinigtem nativen und rekombinantem ABCG5/G8 konnte nämlich keine direkte Substratspezifität für Sitosterol oder Cholesterol festgestellt werden (63;64). Auch wird die hepatobiliäre Sekretion von Cholesterol maßgeblich über ABCG5/G8 vermittelt (76;77). Darüber hinaus fand sich bei Sitosterolämie-Patienten und im ABCG5/G8-Knockoutmodell der Maus eine gesteigerte fraktionelle Cholesterolabsorption (58;157), was wiederum auch für eine Cholesterol-Resekretion aus Enterozyten durch ABCG5/G8 spricht. Diese Daten schließen eine Sterolspezifität des ABCG5/G8-Heterodimers selbst als Mechanismus der Sterolselektion weitgehend aus. Auch der dominierende enterozytische Resorptionsweg über NPC1L1 wies wie gezeigt nur begrenzte Sterolspezifität auf.

Die basolaterale, also systemische, Abgabe des Cholesterols aus Enterozyten erfolgt über mindestens zwei Wege: in Chylomikronen hauptsächlich in Form von Cholesterolestern durch Einwirkung der ACAT2 (158) und unverestert als freies Cholesterol über den an der basolateralen Membran exprimierten Steroltransporter ABCA1 (37). Auch für diesen basolateralen Steroltransporter wurde eine Sterolspezifität bislang nicht gefunden (155).

Trotz der fehlenden Substratspezifität der Steroltransporter selbst stellt die Regulation dieser Steroltransporter einen potentiellen Ansatzpunkt auf der Suche nach differenziellen intrazellulären Effekten von Phytosterolen dar. Die Expression von ABCA1 steht unter Kontrolle des nukleären Transkriptionsfaktors LXR $\alpha$  (20). Die Expression von ABCG5/G8 bei der Maus scheint ebenfalls unter Kontrolle von LXR $\alpha$  zu stehen. Einige Studien am Mausmodell lassen eine Aktivierung von ABCG5/G8 durch aufgenommenes Cholesterol über die LXR-Achse vermuten (22-24), jedoch konnte ein entsprechender Effekt an humanen Zellmodellen (59;143) oder *in vivo* bisher nicht gezeigt werden. Als natürliche LXR-Liganden sind seitenketten-oxidierte Cholesterolmetaboliten beschrieben (97;98). Eine weitere Hypothese war daher, dass Effekte von Phytosterolen auf den enterozytären Cholesterolstoffwechsel möglicherweise über eine Beeinflussung der intrazellulären Oxysterolsynthese vermittelt werden könnten.

### 5.2.1 Enterozyten konvertieren Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol und Cholestensäure

Initial wurde deshalb der Metabolismus von Cholesterol in Enterozyten, speziell im Hinblick auf die Entstehung seitenketten-hydroxylierter Cholesterolmetaboliten, untersucht. Dafür wurde zunächst ein System zur Lipidextraktion von Sterolmetaboliten unterschiedlicher Polarität erfolgreich etabliert (4.2.1). Mit diesem modifizierten, auf einem von Bligh und Dyer (135) basierenden Protokoll, konnten Extraktionseffizienzen von über 90% für  $^3\text{H}$ -Cholesterol und  $^3\text{H}$ -22(R)-Hydroxycholesterol erreicht werden. Die Methode war der ebenfalls getesteten Methode von Björkhem, welche auf einer Lipidextraktion gegen Diethylether basiert (133;134), in der Extraktionsausbeute überlegen. Ein weiterer Vorteil der angewendeten Methode war die simultane, quantitative Extraktion des Cholesterols und polarer Metaboliten des Cholesterols. Nach Auf trennung des Extraktes mittels Dünnschichtchromatographie ließen sich so verlässliche Aussagen über die relative quantitative Verteilung unterschiedlich polarer Sterolprodukte in einer Probe machen.

Im Inkubationsmedium von Caco-2-Zellen konnten nach 72 h Inkubation mit tritiertem Cholesterol zwei polare Metaboliten im Lipidextrakt gefunden werden. Die zunächst unbekannten Metaboliten wurden mittels GC/MS-Analyse als 27-Hydroxycholesterol (27-OH-C) und Cholestensäure (27-COOH-C) identifiziert. Das deutlich vorherrschende Produkt war in Caco-2-Zellen 27-OH-C. 27-COOH-C war in geringerem Maße vorhanden. 27-OH-C entsteht enzymatisch durch die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP27. Dasselbe Enzym katalysiert auch die iterative Oxidation zum Carboxyprodukt 27-COOH-C (118). Die Hemmung der Bildung von 27-OH-C und 27-COOH-C durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A, welches als Inhibitor für CYP27 beschrieben ist (134;139), belegte CYP27 als katalysierendes Enzym der Oxidation. Beide Oxymetaboliten wurden als LXR-Liganden vorgeschlagen (96;159). Weitere relevante Oxysterole wie 22(R)-OH-C, 24(S)-OH-C und 24(S),25-Epoxycholesterol, für welche ebenfalls eine Funktion als LXR-Agonisten belegt ist (97;98), konnten in Caco-2-Zellen dagegen nicht nachgewiesen werden. Somit werden in Enterozyten nach Resorption von Cholesterol mit 27-OH-C und 27-COOH-C genau zwei Oxysterole mit potentiell regulatorischer Wirkung gebildet. Die Verwendung von delipidiertem Serum in der Zellkultur schloss dabei eine externe Kontamination mit Sterolen und Sterolmetaboliten aus, da das Serum, wie durch GC/MS-Messungen überprüft wurde, tatsächlich lipidfrei war. Mit zunehmender Cholesterolkonzentration stieg die Menge an CYP27-Produkten in Caco-2-Zellen kontinuierlich an. Somit reagiert der Enterozyt auf den steigenden Einstrom von Nahrungscholesterol aus dem Darmlumen mit einer linear steigenden Produktion von 27-oxidierten Cholesterolmetaboliten.

### 5.2.2 Enterozyten konvertieren Phytosterole durch CYP27 nur mit verminderter Effizienz zu seitenketten-hydroxylierten Metaboliten

Nachdem die bioaktiven Cholesterolmetaboliten 27-OH-C und 27-COOH in Enterozyten nachgewiesen werden konnten, wurde analog die Metabolisierung der Phytosterole Campesterol und Sitosterol untersucht. Das unterschiedliche intrazelluläre Handling dieser zwei am häufigsten in der Ernährung vorkommenden Pflanzensterole muss letztendlich durch die C24-Alkyl-Substitution vermittelt werden. Anhand der bisherigen Ergebnisse wird das enterozytäre Cholesterol-Handling durch Bildung der Oxysterole 27-OH-C und 27-COOH, und somit möglicherweise über einen LXR-vermittelten Vorgang, mitgeprägt. Es wurde vorgeschlagen, dass analog oxidierte Phytosterole biologische Effekte auf den Cholesterolstoffwechsel ausüben können (126;129), es existiert jedoch bisher kein experimenteller Nachweis. Solche Oxymetaboliten könnten über eine LXR-Aktivierung und anschließende Regulation von enterozytären LXR-Zielgenen Einfluss auf das lokale Cholesterol-Handling nehmen. Obwohl Phytosterole effizient in die Enterozyten aufgenommen werden, war die enterozytäre Metabolisierung von Phytosterolen bislang noch nicht genauer untersucht.

Im Inkubationsmedium von Caco-2-Zellen konnte nach 72 h Inkubation mit tritiertem Campesterol und Sitosterol jeweils ein polarer Metabolit eindeutig nachgewiesen werden. Die zunächst unbekannten Metaboliten liefen in der DC mit einem  $R_f$ -Wert, der dem  $R_f$ -Wert des bei Cholesterol identifizierten 27-OH-C quasi entsprach. Die Methyl- und Ethyl-Gruppe in der Sterolseitenkette an C-24 beeinflusst das Laufverhalten von Phytosterolen im Vergleich zu Cholesterol in einer mobilen DC-Phase von Hexan:Ethylacetat 6:4 tatsächlich nur minimal (siehe 4.2.2, 4.3.1.1). Aufgrund dieser Analogie wurde in diesen Produkten 27-OH-Campesterol (27-OH-Ca) und 27-OH-Sitosterol (27-OH-S) vermutet. Nach Elution, Derivatisierung und Analyse mittels GC/MS konnte anhand der charakteristischen Massenspektren die vermutete Identität der Metaboliten eindeutig bestätigt werden. Dabei fragmentierten die Phytosterolmetaboliten ebenfalls analog dem Cholesterolmetaboliten 27-OH-C, allerdings mit der um 14 g/mol bzw. 28 g/mol höheren Molekülmasse von Campesterol und Sitosterol. Bei Campesterol konnte ein weiterer polarer Peak in sehr geringer Menge im Bereich des  $R_f$ -Wertes des 27-Carboxymetaboliten von Cholesterol nachgewiesen werden. Zwar konnte kein sicheres MS-Spektrum gewonnen werden, in Anbetracht der Analogie des Laufverhaltens von Campesterol und Cholesterol wurde der Metabolit jedoch tentativ als 27-COOH-Campesterol (27-COOH-Ca) identifiziert. Ebenfalls analog zu Cholesterol war das Carboxyprodukt in geringerer Menge in Enterozyten vorhanden als das jeweilige Hydroxyprodukt. Es konnten keine anderen hydroxylierten Phytosterolmetaboliten wie 22(R)-OH-, 24(S)-OH-, 24(S),25-Epoxy-Phytosterole in Caco-2-Zellen nachgewiesen werden. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass Phytosterole nach Resorption in Enterozyten teilweise durch das Enzym CYP27 an Position C-27 oxidiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden bei Campesterol und Sitosterol mit 27-OH-Ca und 27-OH-S zwei Oxysterole gebildet, die aufgrund ihrer

Strukturähnlichkeit zu 27-OH-C eine über LXR-vermittelte regulatorische Wirkung der Phytosterole als möglich erscheinen ließen. Im Gegensatz zu Cholesterol wurden die Phytosterole allerdings signifikant schlechter als Substrat von CYP27 akzeptiert. Dabei korrelierte der Umsatz der Phytosterole als CYP27-Substrat invers mit der Länge der Sterolseitenketten-Substitution. Die unterschiedliche 27-Oxidierung von Cholesterol und Phytosterolen ließ eine Sterol-Interaktion auf Ebene des Enzyms CYP27 vermuten.

Das für die Metabolisierung verantwortliche CYP27 wird durch Cyclosporin A gehemmt (134;139). Tatsächlich konnte, in Analogie zum Substrat Cholesterol, auch die Umsetzung von Campesterol und Sitosterol zu 27-oxidierten Metaboliten durch Cyclosporin A fast vollständig geblockt werden. Die Ergebnisse heben die Rolle von CYP27 als primäres sterolmetabolisierendes Enzym - abgesehen von ACAT2 - in Enterozyten hervor. Die spezifische Hemmung belegt darüber hinaus die rein enzymatische Bildung der 27-OH-Phytosterole durch CYP27 und lässt nicht-enzymatische Autoxidationsvorgänge ausschließen. Nicht-enzymatische Autoxidationsvorgänge können potentiell während der Probenaufbereitung zur Entstehung relevanter Mengen oxidierter Sterolprodukte führen und dies kann zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen (160). Durch konsequentes Verdrängen des Sauerstoffs in allen Reaktionsgefäß, rasche Probenaufbereitung und alkalyische Hydrolyse bei niedriger Temperatur konnte unerwünschten Oxidationsvorgängen während der Aufbereitung und Lagerung der Proben effektiv vorgebeugt werden.

### **5.3 Makrophagen konvertieren Phytosterole ebenfalls mit verminderter Effizienz zu 27-oxidierten Metaboliten**

In der vorliegenden Arbeit konnte eine äußerst effektive Metabolisierung von Cholesterol in Makrophagen gezeigt werden. Ähnlich der Metabolisierung von Cholesterol in Enterozyten konnten mittels GC/MS-Analyse zwei dominierende Produkte, 27-OH-C und 27-COOH-C, identifiziert werden. Die Rolle von 27-OH-C als LXR-Ligand wurde zuerst in cholesterolbeladenen Makrophagen beschrieben (96;161). In Makrophagen stimuliert 27-OH-C als LXR-Agonist die Expression des Sterolexporters ABCA1 (96). In Folge wird die Cholesterolesekretion durch Beladung auf ApoA-I signifikant gesteigert, da Makrophagen Cholesterol exportieren und es vermehrt im reversen Cholesteroltransport zur Leber transportiert wird (96). Auch 27-COOH-C wurde als LXR-Ligand beschrieben (159). Weitere, in anderen Modellen als LXR-Agonisten beschriebene Cholesterolderivate, wie 22(R)-OH-C, 24(S)-OH-C und 24(S),25-Epoxycholesterol konnten jedoch auch in Makrophagen nicht endogen nachgewiesen werden. 27-OH-C und 27-COOH-C sind folglich die quantitativ wichtigsten, in humanen Makrophagen gebildeten Cholesterolmetaboliten mit LXR-aktivierendem Potential. Diese Konversion von Cholesterol zu 27-OH-C und 27-COOH-C ist in verschiedenen Makrophagenmodellen voll erhalten (133;134;162). Im Gegensatz zu Enterozyten stellte in Makrophagen 27-COOH-C den Haupt-

cholesterolmetaboliten dar. Die Menge und das Verhältnis der beiden sezernierten 27-oxidierten Metaboliten scheinen abhängig von der CYP27-Aktivität der jeweiligen Zelle und der Art des Angebots des Cholesterols (133). In initialen Versuchen wurde die Proteinexpression von CYP27 in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelltypen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass primäre humane Makrophagen im Vergleich zu Caco-2 Enterozyten vermehrt CYP27 exprimieren. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesteroloxydation durch CYP27 ist die Oxidation zum 27-OH-Produkt (133). 27-OH-C tritt nach Dissoziation von CYP27 erneut in Konkurrenz mit Cholesterol um die Substratbindestelle. Der Überschuss an Enzym gewährleistet folglich die potentere weitere Umsetzung zu 27-COOH-C. Dies spiegelt sich im erhöhten Verhältnis von 27-COOH-C zu 27-OH-C in Makrophagen im Vergleich zu Caco-2-Zellen wieder.

Die Metabolisierung der Phytosterole Campesterol und Sitosterol in primären humanen Makrophagen wurde erstmalig in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dabei wurde deutlich, dass beide Phytosterole ähnlich dem Cholesterol, jedoch mit geringerer Effizienz, zu 27-oxidierten Metaboliten umgesetzt wurden. Es ließen sich weder im Inkubationsmedium noch intrazellulär weitere seitenketten-oxidierte Phytosterolmetaboliten nachweisen. Es lag demnach nahe, dass in Makrophagen, genauso wie in Enterozyten, die entstandenen Metaboliten von Campesterol und Sitosterol durch Einfluss des Enzyms CYP27 gebildet werden. Tatsächlich ließ sich die Bildung der polaren Metaboliten von Cholesterol wie auch der beiden eingesetzten Phytosterole in primären humanen Makrophagen durch Einsatz des CYP27-Inhibitors Cyclosporin A (134;139) effektiv verhindern. Auffallend war die deutliche Substratspezifität von CYP27 in Makrophagen. Die Phytosterole wurden im Vergleich zu Cholesterol signifikant schlechter umgesetzt. Während 27-COOH-C sogar den vorherrschenden Metaboliten beim Umsatz von Cholesterol darstellt, werden Campesterol und Sitosterol nur in geringen Mengen bis zum Endprodukt der CYP27-abhängigen Oxidation umgesetzt. Dies spiegelt das Quadrat der relativen Umsetzungseffizienz durch CYP27 von Phytosterolen gegenüber Cholesterol wieder, was zur kurzzeitigen Dissoziation von 27-OH-Metaboliten vor der 2. Oxidation durch CYP27 passt. Insgesamt korrelierte die Umsetzung der Phytosterole durch CYP27 wiederum invers mit der Länge der Sterolseitenketten-Substitution. Auch in Makrophagen scheint demnach eine Sterol-Interaktion auf Ebene eines unterschiedlichen Umsatzes von Cholesterol und Phytosterolen durch das Enzym CYP27 vorzuliegen.

Den Metaboliten 27-OH-C und 27-COOH-C wird neben ihrer Funktion als LXR-Liganden auch eine Rolle als direkte reverse Transportform für Cholesterol als Alternative oder Ergänzung zum klassischen, über ABCA1 und HDL vermittelten, reversen Cholesteroltransport zugeschrieben (133;163). An Makrophagen wurde dieser Mechanismus zur erleichterten Resekretion von überschüssigem Cholesterol aus extrahepatischen Geweben und Transport über den Blutkreislauf zur Leber ausführlich untersucht (133;163). Die seitenketten-oxidierten Cholesterolmetaboliten sind polarer

als Cholesterol und können auch die Zellmembran im Vergleich zu nicht metabolisiertem Cholesterol erleichtert passieren (164). Gerade in Makrophagen, welche nicht in der Lage sind, selbst Lipoproteine zu synthetisieren (30), kann der Abfluss von überschüssigem Cholesterol in Form von Oxymetaboliten aus der Zelle so einen zusätzlichen Beitrag zum reversen Cholesteroltransport über HDL leisten. Es konnte gezeigt werden, dass es einen kontinuierlichen Fluss von 27-oxidierten Sterolen aus extrahepatischen Geweben zur Leber gibt, wo sie weiter zu Gallensäuren oxidiert werden. Die Größenordnung dieses Flusses lässt durchaus eine quantitative Bedeutung für die Cholesterolhomöostase vermuten (164). Die deutlich verminderte Konversion von Sitosterol und Campesterol zu polareren Produkten, insbesondere zu den Carboxymetaboliten 27-COOH-Ca und 27-COOH-S, lässt auch eine spezifische periphere Akkumulation von Phytosterolen aufgrund verminderter Sekretion in Form oxiderter Phytosterolmetaboliten in Makrophagen als möglich erscheinen (siehe auch 5.7).

## 5.4 Phytosterole beeinflussen die 27-Hydroxylierung von Cholesterol durch CYP27

### 5.4.1 Metabolisierung von Cholesterol und Phytosterolen in isolierten Mitochondrien

Das Enzym CYP27 wird in Mitochondrien exprimiert. CYP27 ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert dort die Oxidation der Sterolseitenkette (118). Der Transport von Sterolen zur inneren Mitochondrienmembran umfasst einerseits den Transport des hydrophoben Sterols durch das hydrophile Ambiente des Cytoplasma und zum anderen den Transport durch die äußere und innere Mitochondrienmembran (165;166). Generell lässt zwischen vesikulären und nicht-vesikulären Mechanismen des cytoplasmatischen Transports unterscheiden (165). Der nicht-vesikuläre Transport von Cholesterol durch das Cytoplasma wird größtenteils durch bestimmte Carrier-Proteine mit hydrophober Kavität vermittelt. Als Prototyp eines solchen Proteins kann das Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) angesehen werden, welches den Transfer von Cholesterol zur äußeren Mitochondrienmembran vermittelt (165). Offenbar sind aber noch weitere Proteine an diesem Prozess beteiligt. So wird für den Transport zur inneren Mitochondrienmembran die Beteiligung des peripheren Benzodiazepin Rezeptors in Interaktion mit StAR vermutet (167). In den letzten Jahren wurden auch eine Reihe weiterer StAR-related lipid transfer (START) Proteine entdeckt (167;168). Die Bindekapazitäten der Transportproteine gegenüber Phytosterolen im Vergleich zu Cholesterol könnten einen Einfluss auf den Transport der verschiedenen Sterole zum Mitochondrium haben. So wurde für StarD1 eine Bindung von Sitosterol und Cholesterol postuliert (169). Für StarD5 konnte keine Bindung von Sitosterol bestätigt werden, von Cholesterol dagegen schon (170). Analoge Ergebnisse konnten für das

Protein StarD4 und Stigmasterol gezeigt werden (171). Das Sterol Carrier Protein 2 (SCP2) weist als ein weiteres, dem Lipidtransfer zugeschriebenes, Protein ebenfalls eine unterschiedliche Bindung von Sitosterol und Cholesterol auf (169), auch wenn diesem Protein eine untergeordnete Relevanz im intrazellulären Cholesteroltransport zukommen scheint (167).

Es war folglich durchaus möglich, dass die unterschiedliche Metabolisierung in Zellen auf potentiell unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Phytosterole an Transportproteine im Cytoplasma beruht. Um die Akzeptanz der unterschiedlichen Sterole durch CYP27 direkt betrachten zu können, wurden Mitochondrien aus HepG2-Zellen isoliert und die Sterolkonversion in einem rekonstituierten System untersucht. Dies sollte es ermöglichen, die Sterolkonversion durch CYP27 unabhängig von Differenzen der zellulären Aufnahme der Sterole und des intrazellulären Handlings, wie der aufgezeigten unterschiedlichen Veresterung oder potentiellen Unterschieden im intrazellulären Steroltransport, zu betrachten.

Sowohl bei halbmaximaler als auch bei maximaler Sättigung zeigte sich eine signifikant bessere Metabolisierung von Cholesterol gegenüber Campesterol und Sitosterol zu den jeweiligen Hydroxysterolen 27-OH-Cholesterol, 27-OH-Campesterol und 27-OH-Sitosterol. Die weitere Oxidation der 27-Hydroxysterole zu 27-Carboxyprodukten war im rekonstituierten System weder für Cholesterol noch für Phytosterole sicher zu entdecken. Dies konnte für das Substrat Cholesterol auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden (172-174). Die Akzeptanz der Phytosterole als Substrat von CYP27 korrelierte wiederum invers mit der Länge der Sterolseitenketten-Substitution im Vergleich zu Cholesterol. Diese Diskriminierung zwischen den verschiedenen Sterolen stimmt daher auch im rekonstituierten CYP27-System mit der zuvor in verschiedenen Zellmodellen gezeigten unterschiedlichen Sterolkonversion überein. Die Ergebnisse passen auch gut zu frühen Studien des Sterolmetabolismus der Rattenleber (175). Der unterschiedliche Umsatz von Cholesterol und Phytosterolen zu 27-Oxymetaboliten liegt demnach nicht in einem ungleichen Transport durch das Cytoplasma zur Mitochondrienmembran begründet. Vielmehr ist die direkte Substratspezifität des metabolisierenden Enzyms CYP27 selbst für den unterschiedlichen relativen Umsatz der verschiedenen Sterole verantwortlich.

Der absolute Umsatz von Sitosterol in Caco-2-Zellen war mit ca. 2% des Umsatzes von Cholesterol nur wenig geringer als der prozentuale Umsatz in isolierten Mitochondrien. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass steroltransportierende Proteine in Caco-2-Zellen eine limitierende Rolle für die Differenz im Sterolumsatz spielen. Im Enterozyten ist der intrazelluläre Transport von Cholesterol zum Mitochondrium bisher nicht untersucht. Es ist unbekannt, ob und welche der 15 mittlerweile beschriebenen STAR-Proteine im Dünndarm exprimiert werden. Makrophagen und Hepatozyten akzeptierten in vorliegender Arbeit Campesterol und Sitosterol etwas besser als Substrat für CYP27 als Enterozyten, was möglicherweise in einer differentiellen Expression von STAR-Proteinen begründet sein könnte. Die zelluläre Sterolaufnahme erreichte in Enterozyten

nach 48-72h für die verschiedenen Sterole ein vergleichbares Plateau. Die Kinetik der Sterolresorption war für Cholesterol jedoch etwas schneller. Dies könnte zu einer initial bevorzugten 27-Hydroxylierung aufgrund besserer Substratverfügbarkeit von Cholesterol gegenüber z.B. Sitosterol führen und dementsprechend zu einem höheren Verhältnis von 27-OH-Cholesterol zu 27-OH-Sitosterol. Zusammenfassend stellten isolierte Mitochondrien ein rekonstituiertes System dar, mit dem die Interaktion von Cholesterol mit Phytosterolen direkt auf Ebene des mitochondrialen Enzyms CYP27 und unabhängig von zellulären Transportmechanismen untersucht werden konnte.

#### **5.4.2 Phytosterole hemmen die CYP27-katalysierte Hydroxylierung von Cholesterol**

Um CYP27 als möglichen Ort der Interaktion von Cholesterol mit Phytosterolen weiter zu charakterisieren, wurde der Einfluss von Phytosterolen auf die 27-Hydroxylierung von Cholesterol untersucht. Bei Ko-Inkubation von isolierten Mitochondrien mit Cholesterol und steigenden Mengen der Phytosterole Campesterol und Sitosterol nahm die Konversion von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol ab. Es zeigte sich demnach eine konzentrationsabhängige Hemmung von CYP27 durch die Phytosterole und eine Korrelation der Länge der Seitenketten-Substitution der Phytosterole mit dem Grad der CYP27-Inhibition. Dabei war Campesterol, welches das bessere CYP27-Substrat im Vergleich zu Sitosterol darstellte, gleichzeitig effektiver in der Inhibititon der 27-Hydroxylierung von Cholesterol, was für eine affinere Bindung spricht. Es besteht demnach eine direkte Interaktion unterschiedlicher Phytosterole mit Cholesterol auf Ebene des CYP27-katalysierten Umsatzes zu dem LXR-Liganden 27-OH-Cholesterol.

Es konnte auch eine geringe Menge an 25-OH-Cholesterol in den Reaktionsansätzen nachgewiesen werden. 25-OH-Cholesterol kann auch auf nicht-enzymatischem Wege durch Autoxidation entstehen (110). Kontrollen ohne Mitochondrien wiesen jedoch keine hydroxylierten Metaboliten auf. Zumindest eine Autoxidation des Cholesterols während der Probenaufbereitung konnte somit ausgeschlossen werden. Vermutlich katalysiert CYP27 auch in sehr geringem Maße die Hydroxylierung am C-Atom C25 (176), was die Entstehung dieses Metaboliten in isolierten Mitochondrien erklärt. Der Umsatz zu 25-OH-Cholesterol blieb jedoch sehr niedrig und unter Phytosterol-inkubation nicht erkennbar beeinflusst. Dies spricht gegen eine Bedeutung dieses Metaboliten in der Interaktion von Cholesterol mit Phytosterolen an CYP27.

Die gezeigten Ergebnisse passen zu einer Arbeit, in welcher der Einfluss von Sitosterol auf die Gallensäurebiosynthese bei der Erkrankung Sitosterolämie untersucht wurde (177). Neben der Eigenschaft als LXR-Agonist (96) ist 27-OH-Cholesterol auch ein Zwischenprodukt des alternativen Biosynthesewegs der Gallensäuren, während das ring-oxidierte  $7\alpha$ -Hydroxycholesterol das zentrale Zwischenprodukt im klassischen Stoffwechselweg der Gallensäurebiosynthese darstellt (118). Der bei Sitosterolämie-Patienten beobachtbare reduzierte Cholesterol-Katabolismus, in Verbindung mit nur mäßig erhöhten Plasma-Cholesterolkonzentrationen, steht möglicherweise in

Zusammenhang mit einer Hemmung der Cytochrom P450 Oxygenasen. Die CYP27-Aktivität in Lebermitochondrienfraktionen von Sitosterolämie-Patienten, zu denen Phytosterole sicher Zugang hatten, ist tatsächlich reduziert (177). Dem gegenüber zeigt ein Einzelfall-Bericht eines Sitosterolämie-Patienten in isolierten Fibroblasten der Haut eine normale CYP27-Aktivität (178). Der alternative Biosynthesewegs macht allerdings nur einen Anteil von ungefähr 5-10% der gesamten Gallensäureproduktion aus (179). Die systemische Bedeutung einer Beeinflussung der hepatischen 27-Hydroxylierung von Cholesterol in Hinblick auf diesen untergeordneten Gallsäuresyntheseweg ist demnach schwer einzuschätzen.

In der beschriebenen Studie von Nguyen et al. zur CYP27-Aktivität in Sitosterolämie-Patienten (177) wurde die funktionelle Bedeutung seitenketten-hydroxylierter Cholesterolmetaboliten als LXR-Liganden nicht erwogen. Aus Sicht der aktuellen Forschung und der Relevanz seitenketten-hydroxylierter Oxysterole als endogen gebildete Metaboliten und LXR-Agonisten (95) bekommt die spezifische Hemmung des CYP27-Enzyms durch Phytosterole jedoch eine zusätzliche, wichtige Bedeutung. Sofern 27-OH-Cholesterol, insbesondere im Enterozyten, als LXR-Ligand die LXR-regulierten Steroltransporter nachhaltig beeinflusst, könnte eine Verminderung dieses Oxysterols durch Phytosterole das Sterolhandling der Zellen verändern. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich Campesterol und Sitosterol mit einer Methyl-respektive Ethyl-Gruppe in der Sterolseitenkette an C-24 untersucht. Die Vielzahl der in der Natur vorkommenden Phytosterole (46;47) lassen darunter durchaus weitere potente Inhibitoren der CYP27-Hydroxylierung vermuten. Die quantitative Dominanz der untersuchten Phytosterole Campesterol und Sitosterol in der Ernährung (47) weist diesen aber eine Hauptbedeutung in der Beeinflussung der Konversion von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol durch CYP27 zu.

## **5.5 Funktionelle Auswirkungen der Interaktion von Phytosterolen mit Cholesterol an CYP27 in Enterozyten**

### **5.5.1 Die Rolle von nativen Sterolen, 27-OH-Cholesterol und seitenketten-hydroxylierten Phytosterolen als LXR-Liganden**

Es stellte sich somit die Frage nach den funktionellen Auswirkungen der Interaktion von Phytosterolen und Cholesterol an CYP27 durch Beeinträchtigung der 27-OH-Cholesterolbildung und nach der Bioaktivität der entstehenden 27-OH-Phytosterole als potentielle LXR $\alpha$ -Liganden. Im LXRE-Transaktivierungsassay aktivierte 27-OH-Cholesterol in der vorliegenden Arbeit den Transkriptionsfaktor LXR $\alpha$  ebenso potent wie der meist verwendete LXR $\alpha$ -Ligand 22(R)-OH-Cholesterol (97), welcher in Enterozyten, Makrophagen, Hepatozyten und Mitochondrienpräparationen jedoch endogen nicht nachweisbar war. Im Gegensatz dazu führten weder natives Cholesterol noch die nativen Phytosterole Campesterol und Sitosterol zu einer LXR $\alpha$ -Aktivierung.

Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors LXR $\alpha$  bereits durch native Phytosterole wurde als potentieller intrazellulärer Wirkmechanismus der Phytosterole vorgeschlagen (180).

Es existieren allerdings nur drei Studien, die das LXR $\alpha$ -aktivierende Potential der nativen pflanzlichen Sterole direkt untersuchten. In einer Studie konnte die LXR-Aktivierung durch bestimmte Phytosterole in einem zellfreien Coaktivator-Rekrutierungs-Assays gezeigt werden (87). In einer anderen Arbeit, in der HEK293-Zellen mit einem GAL4-hLXR Expressionsvektor in Kombination mit einem GAL4-responsiven Luziferase Reporterplasmid transfiziert, konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (129). Ein ähnlicher Ansatz mit einem CHO-7-zellbasierten System konnte für Sitosterol auch keine direkte LXR-Aktivität nachweisen (181). In einer Studie an Makrophagen konnte mittlerweile ebenfalls keine Stimulation des LXR-abhängigen Steroltransporters ABCA1 durch Campesterol oder Sitosterol selbst gefunden werden (182). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich folglich mit den Ergebnissen der Arbeiten von Kaneko et al., Yang et al. und Sabeva et al. (129;181;182) und sprechen gegen die vorgeschlagene LXR-Aktivierung durch native Phytosterole (87). Möglicherweise können auch weitere Strukturunterschiede in der Seitenkette der Phytosterole eine Rolle zu spielen. Stigmasterol, welches eine Doppelbindung in der Seitenkette an Position C22-C23 und eine Ethylgruppe an C24 aufweist, scheint LXR-aktivierendes Potential zu besitzen (181;183), was ebenfalls nicht durchwegs bestätigt werden konnte (129). Eine direkte Interaktion der vorherrschenden nativen Phytosterole Campesterol und Sitosterol mit Oxycholesterolen auf LXR-Ebene ist anhand der Daten somit weitgehend auszuschließen.

Im Gegensatz zu den nativen Sterolen waren die 27-hydroxylierten Metaboliten aller Sterole im LXRE-Transaktivierungsassay jedoch als LXR $\alpha$ -Agonisten aktiv. Für 27-OH-Cholesterol wurde die Rolle als LXR-Ligand in cholesterolbeladenen Makrophagen beschrieben (96;161). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass das Vorliegen einer 27-Hydroxygruppe sowohl dem Cholesterol als auch den Phytosterolen LXR $\alpha$ -aktivierendes Potential verleiht und hebt die Relevanz der Seitenketten-Hydroxylierung an Position C27 der Sterole für die LXR-Aktivierung hervor. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass eine Hydroxylgruppe an Position C22, C24 oder C27 der Cholesterolseitenkette wichtig für die Bindung an LXR $\alpha$  ist (184). Dies scheint auch für 27-hydroxylierte Phytosterole der Fall zu sein. Die fehlende LXR-Aktivität nativer Sterole und die nachweisbare LXR-Aktivität hydroxylierter Sterole in der vorliegenden Arbeit stimmt voll mit einer Arbeit an einem triple-Sterol-Hydroxylase-knock-out Modell der Maus überein (185). Dadurch wurde die potentiell irreführende Konversion von zellulärem Cholesterol zu seitenketten-hydroxylierten Metaboliten verhindert und die Expression LXR-induzierter Gene unterbunden. Die Überexprimierung der Sulfotransferase SULT2B1b in Makrophagen, welche Oxycholesterole durch Sulfatierung inaktiviert, führte ebenfalls zu einer Inaktivierung des LXR-Signalweges (185). Dies zeigt auch deutlich die Bedeutung endogen

enstehender Oxysterole im LXR-Signalweg. Zwar scheint die signifikante Hemmung von CYP27 durch Phytosterole und damit die verringerte Konversion von Cholesterol zu dem LXR-Liganden 27-OH-Cholesterol in Konkurrenz zu dem etwas höheren Potential der 27-hydroxylierten Phytosterole als LXR-Liganden zu stehen. Die insgesamt sehr geringe Konversion der Phytosterole Campesterol und Sitosterol zu deren 27-OH-Produkten limitiert die funktionelle Relevanz der entstehenden Oxyphytosterole für die LXR $\alpha$ -Aktivierung in vivo jedoch. Durch die potente Hemmung von CYP27 durch Phytosterole besteht vielmehr eine Netto-Reduktion der LXR $\alpha$ -Aktivierung durch Phytosterole.

### 5.5.2 Phytosterole verhindern die Cholesterol-induzierte CYP27-Expression

Cholesterol, jedoch nicht Sitosterol, führte zu einer gesteigerten CYP27-Expression in Caco-2-Zellen. Die Ko-Inkubation von Cholesterol mit Sitosterol oder Campesterol konnte die Stimulation der CYP27-Expression auf mRNA-Ebene in Caco-2-Zellen verhindern. Aufgrund der fehlenden LXR-Aktivierung durch natives Cholesterol scheint die Induktion der CYP27-Expression durch ihr Produkt 27-OH-Cholesterol selbst vermittelt zu sein. Ob das CYP27-Gen ein LXR-Response-Element aufweist und damit ein direktes LXR-Zielgen darstellt, wurde bisher nicht näher untersucht.

In der vorliegenden Arbeit war die CYP27-Expression in Caco-2-Zellen unter Cholesterolinkubation verdoppelt. Die Expression von CYP27 unter Cholesterol-inkubation wurde bisher lediglich in zwei Makrophagen-Zellmodellen genauer betrachtet (186;187). In THP-1-Makrophagen führt die Beladung mit acetyliertem LDL zu einer Zunahme des intrazellulären Cholesterols und einem Anstieg der CYP27-Expression um mehr als das 4-fache (186). Die Expression von CYP27 in Caco-2-Zellen entsprach in der vorliegenden Arbeit in etwa der Hälfte der Expression in HepG2-Zellen. In THP-1-Makrophagen ist die absolute CYP27-Expression mit 1/50 der Expression in HepG2-Zellen sogar viel geringer (187). Offensichtlich reagieren Zellen mit so geringer basaler CYP27-Expression mit einer höheren relativen Steigerung der CYP27-Expression auf einen Anstieg des intrazellulären Cholesterols. Allerdings konnten die Ergebnisse in einer weiteren Arbeit für THP-1-Makrophagen nicht bestätigt werden (187). Möglicherweise wird die CYP27-Expression in Makrophagen anders als in Enterozyten reguliert, wo das mit der Nahrungsaufnahme zeitlich rasch schwankende Angebot von Cholesterol dynamisch in der 27-OH-C-Bildung widergespiegelt wird.

In Enterozyten stimulierte die erhöhte Produktion von 27-OH-C als LXR-Agonist wiederum die Expression von CYP27 selbst. Damit ergibt sich im Enterozyten eine auto-amplifizierende Schleife der CYP27-Expression. Phytosterole unterbrechen diese Autoinduktion von CYP27, da in Gegenwart von Phytosterolen die Bildung von 27-OH-C vermindert ist. Eventuell sind dabei auch andere Transkriptionsfaktoren wie der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) von zusätzlicher Bedeutung (188).

### 5.5.3 Phytosterole beeinflussen die Expression der Steroltransporter ABCA1 und ABCG8

Die Reaktion des Enterozyten auf den akuten Einstrom von exogenem Nahrungscholesterol aus dem Darmlumen mit einer erhöhten Produktion des LXR-Liganden 27-OH-Cholesterol und die Hemmung der Metabolisierung von Cholesterol zu 27-OH-C durch Phytosterole könnte natürlich enterozytäre LXR-Zielgene, wie die Steroltransporter ABCG5/G8 und ABCA1 beeinflussen. Tatsächlich führte die Inkubation mit Cholesterol alleine in Caco-2-Zellen zu einer massiven Steigerung der ABCA1-Expression um das 6-fache. Der basolateral exprimierte Sterolexporter ABCA1 weist ein LXR-Response-Element in der Promoterregion auf und steht unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors LXR $\alpha$  (37). Die Inkubation mit Sitosterol führte nur zu einer tendenziellen Steigerung der ABCA1-Expression, vermutlich induziert durch geringe Mengen entstandenen 27-OH-S als LXR-Ligand. Die funktionelle Relevanz 27-hydroxylierter Phytosterole für die enterozytäre LXR $\alpha$ -Aktivierung ist also tatsächlich von untergeordneter Bedeutung.

Die Ko-Inkubation mit Cholesterol und den Phytosterolen Campesterol oder Sitosterol verhinderte effektiv die durch alleinige Cholesterolzufuhr induzierte Steigerung der ABCA1-Expression in Enterozyten. Die Ergebnisse belegen die Reduktion der durch Cholesterol induzierten LXR $\alpha$ -Aktivierung durch Phytosterole über eine verminderte Bildung des LXR-Agonisten 27-OH-C. Die Transkription von ABCG8 konnte in Caco-2-Zellen dagegen weder durch Inkubation mit Cholesterol noch durch Inkubation mit Phytosterolen gesteigert werden. Studien am Tiermodell der Maus und des Hamsters zeigen zwar eine Induktion von ABCG5/G8 durch Cholesterol und synthetische LXR-Agonisten und zwar vorrangig in Hepatozyten im Gegensatz zu Enterozyten (22-24;189), jedoch konnte ein entsprechender Effekt an den humanen Zellmodellen Caco-2, T84 und HT-29 (59;143) und in vivo bisher nicht gefunden werden. Darüber hinaus konnte bislang auch kein LXRE-Element im Promotor der humanen ABCG5- und ABCG8-Gene identifiziert werden (146). Offensichtlich unterscheidet sich die Regulation von ABCG5/G8 in Dünndarm und Leber bei Menschen und Nagetieren. Eine LXR-induzierte, apikale Sterol-Resekretion durch ABCG5/G8 scheint jedenfalls in humanen Enterozyten von untergeordneter Bedeutung zu sein.

### 5.5.4 27-OH-Cholesterol erhöht die basolaterale enterozytäre Sterolsekretion in Enterozyten

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass 27-OH-C das Hauptprodukt von CYP27 in Enterozyten darstellt. Die Wirkung von 27-OH-C als LXR-Ligand konnte im LXRE-Transaktivierungsassay bestätigt werden. 27-OH-C steigert die Expression des Steroltransporters ABCA1 in Makrophagen (96;161). In Folge wird die zelluläre Cholesterolsekretion durch Übertragung auf ApoA-I signifikant gesteigert und vermehrt Cholesterol im reversen Cholesteroltransport zur Leber transportiert (96). Trotz der Kenntnisse über 27-OH-C in Makrophagen wurde eine funktionelle

Auswirkung dieses Hydroxycholesterol-Metaboliten auf die Cholesterolabsorption im Dünndarm bislang nicht untersucht. Exogenes Cholesterol steht Enterozyten für die basolaterale, systemische Abgabe aus mindestens zwei metabolischen Zwischen-Pools zur Verfügung (19). Apikal aufgenommenes Cholesterol wird zum einen Teil zuerst durch ACAT2 verestert und erst nach zeitlicher Verzögerung über den ApoB-abhängigen Chylomikronenweg als Cholesterolester sezerniert (19;158), während frisch resorbiertes Cholesterol aus dem Darmlumen hauptsächlich als freies Cholesterol über den basolateral exprimierten (37) Steroltransporter ABCA1 (18) auf ApoA-I/HDL übertragen wird (19). Nach Zellkultur- und knock out-Modellen kann der ApoB-unabhängige Weg über ABCA1 25-30% der basolateralen nutritiven Cholesterolsekretion im Darm ausmachen (18;19). Die mit zunehmender resorbiert Cholesterolmenge gesteigerte Produktion des LXR-Liganden 27-OH-C, die in Folge weiter erhöhte Expression von CYP27 und des LXR-Zielgens ABCA1 in Kombination mit einer konstanten ABCG8-Expression ließ eine veränderte systemische Netto-Cholesterolabsorption erwarten.

Die apikale, luminaire Cholesterol-Resekretion im Caco-2-Transwellmodell konnte weder alleine noch durch die Kombination des von 27-OH-C und des RXR-Liganden 9-cis-RA gesteigert werden. Für den Sterol-Reexport aus Enterozyten ins Darmlumen scheinen die apikal konstitutiv exprimierten Sterolexporter ABCG5/G8 hauptverantwortlich zu sein (59;190). Eine LXR-Aktivierung durch 27-OH-C in Enterozyten hatte keinen Einfluss auf die apikale ABCG5/G8-Expression und Resekretion von Cholesterol. Im Gegensatz dazu konnte die basolaterale Cholesterolsekretion durch 27-OH-C signifikant um ca. 30% gesteigert werden. 27-OH-C ist demnach eindeutig als enterozytär wirksamer LXR-Ligand anzusehen. 27-OH-C stimulierte den basolateralen Cholesterolefflux im selben Maße wie der Standard-LXR-Agonist 22(R)-OH-C. Besonders in Kombination mit dem RXR-Liganden 9-cis-RA zeigte sich ein synergistischer Effekt in der LXR/RXR-Aktivierung in einer um mehr als 50% gesteigerten basolateralen Cholesterolsekretion. Es konnte somit erstmals gezeigt werden, dass 27-OH-C als LXR-Ligand die gerichtete, basolaterale Cholesterolsekretion in Enterozyten, und damit die systemische Absorption, maßgeblich prägt. Diätetisches Cholesterol bahnt sich somit den ApoB-unabhängigen Weg der Cholesterolresorption weitgehend selbst. Durch einen erhöhten Cholesterolgehalt im Enterozyten kommt es zu einer vermehrten Produktion von 27-Oxycholesterol-Metaboliten, einer LXR-Aktivierung mit weiterer Steigerung der Expression von CYP27, und in Folge zu einer gesteigerten Expression des basolateralen Sterolexporters ABCA1 und zu erhöhter basolateraler Sekretion des Cholesterols über ABCA1.

Dies deckt sich mit Versuchen an unterschiedlichen Enterozyten-Modellen, in denen die LXR-abhängige Stimulation der basolateralen Cholesterolsekretion als ein durch ABCA1 vermittelter Vorgang gezeigt werden konnte (37;143). Mit ApoA-I als Akzeptor wurde die Menge des basolateral sezernierten Cholesterols zusätzlich gesteigert. Lipid-freies ApoA-I dient als Akzeptor für über ABCA1 exportiertes

Cholesterol. Die so entstehenden naszenten HDL-Partikel partizipieren am reversen Cholesteroltransport zur Leber (42). In Caco-2-Zellen war die Zugabe von exogenem ApoA-I für die LXR/RXR-stimulierte Sterolsekretion nicht zwingend notwendig. Als zusätzlicher Akzeptor für Cholesterol konnte mit ApoA-I jedoch eine Steigerung des basolateral sezernierten Cholesterols erreicht werden. Caco-2-Zellen sind wie normale Enterozyten in der Lage ApoA-I auch selbst zu bilden und basolateral zu sezernieren (144). Andere Enterozyten-Modelle, wie z.B. T84- und HT-29-Zellen, haben diese Fähigkeit zu Synthese und Sekretion von ApoA-I dagegen nicht (59).

Der synthetische, pharmakologische LXR-Agonist T0901317 führte zu einer noch deutlicheren Steigerung der basolateralen Cholesterolsekretion. Es konnte gezeigt werden, dass natürliches 22(R)-OH-C einen partiellen LXR-Agonisten darstellt (103). Als partieller Agonist zeigt dieses Oxysterol eine geringere Aktivierung der Bindung von Co-Aktivatoren an LXR $\alpha$ . Aufgrund der ähnlichen Struktur als seitenketten-hydroxyliertes Sterol ist 27-OH-C vermutlich ebenfalls als partieller LXR-Agonist anzusehen. Die Induktion der Cholesterolsekretion dieser beiden Oxysterole liegt in derselben Größenordnung. Im Gegensatz dazu induzieren volle Agonisten, zu denen der hier verwendete synthetische Agonist T0901317 zu zählen ist, sowohl eine massive Bindung von Co-Aktivatoren an LXR $\alpha$ , als auch eine Dissoziation von Co-Repressoren von LXR $\alpha$  (103). Dies führt zu einer stärkeren Induktion der LXR-Zielgene. Vor diesem Hintergrund ist wohl die höhere Potenz des synthetischen Liganden T0901317 gegenüber den natürlichen, seitenketten-hydroxylierten Sterolen in der Stimulation des enterozytären basolateralen Cholesteroleffluxes zu sehen. Die Stimulation der Enterozyten mit den endogenen LXR-Liganden 22(R)-OH-C und 27-OH-C zeigte jedenfalls in beiden Fällen keine erhöhte Sekretion von Cholesterol in das apikale Medium. Aber selbst mit dem potennten synthetischen Liganden T0901317 konnte keine erhöhte apikale und damit luminale Resekretion von Cholesterol in Enterozyten nachgewiesen werden. Die unveränderte apikale Sekretion ist demnach nicht durch eine eventuell unzureichende Aktivierung durch partielle Agonisten wie 22(R)-OH-C oder 27-OH-C zu erklären.

Es konnte also kein Hinweis auf eine gesteigerte apikale Sekretion unter LXR-stimulierenden Bedingungen im humanen Modell festgestellt werden. Tatsächlich blieb in der vorliegenden Arbeit auch eine gesteigerte Expression des Steroltransporters ABCG8 nach Cholesterolzufuhr in humanen Enterozyten aus. Studien am Mausmodell und am Hamster lassen zwar eine Aktivierung von ABCG5/G8 durch Cholesterol über diese LXR-Achse vermuten (22-24;189). Jedoch konnte ein entsprechender Effekt auch an weiteren humanen Enterozytenmodellen (59;143) bisher nicht gefunden werden. Der partielle LXR-Agonisten-Status der Oxysterole im Gegensatz zum Vollagonisten-Status des unphysiologischen, synthetischen T0901317 könnte bei den tierexperimentellen Daten die Induktion von ABCG5/G8 mit T0901317 (22;23) partiell erklären. Offensichtlich sind die apikalen Sterolexporter ABCG5/G8 in Enterozyten konstitutiv exprimiert und durch vermehrte Sterolresorption in die Zelle nicht wesentlich

induzierbar. Da die ursprüngliche Annahme einer apikalen Lokalisation von ABCA1 (191) widerlegt wurde (37) und nur ABCG5/G8 an der apikalen Enterozytenmembran exprimiert wird (192) führt die Stimulation mit LXR-Liganden im humanen Enterozyten somit lediglich zu einer gesteigerten basolateralen Cholesterolkretion über ABCA1. Wie in humanen Enterozyten führt eine erhöhte Cholesterolkzufuhr auch in Tiermodellen zu einer massiv erhöhten ABCA1-Expression und in Relation dazu lediglich zu einer milder ausgeprägten Steigerung der ABCG5/G8-Expression in allen Segmenten des Dünndarms (22;193). Dies lässt vermuten, dass die basolateralen LXR-vermittelten Steroltransportmechanismen des Enterozyten auch im Tiermodell sensitiver auf eine gesteigerte Cholesterolkzufuhr reagieren als die apikalen Transportmechanismen.

### **5.5.5 Phytosterole hemmen die LXR-vermittelte basolaterale Cholesterolkretion in Enterozyten**

Eine Beeinflussung der Bildung von 27-OH-C durch Phytosterole sollte demnach die basolaterale, apoB-unabhängige Cholesterolkretion durch Verminderung der Bildung endogener LXR-Liganden aus Cholesterol verringern. Phytosterole hemmten die Metabolisierung von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol und die folgende LXR-induzierte Stimulation des basolateralen Steroltransporters ABCA1. Die funktionelle Auswirkung dieser Interaktion von Cholesterol und Phytosterolen an CYP27 in Enterozyten zeigte sich tatsächlich in einer reduzierten basolateralen Cholesterolkretion nach Ko-Inkubation von Cholesterol und Sitosterol. Die exogene Substitution von LXR-Agonisten wie 27-OH-C kann die basolaterale Cholesterolkretion dagegen steigern und so die Interferenz zwischen Cholesterol und Phytosterolen wieder überwinden.

Der potente synthetische LXR-Agonist T0901317 konnte die Hemmung der basolateralen Cholesterolkretion durch Sitosterol ebenfalls komplett aufheben und führte zu einer massiven Steigerung der basolateralen Sekretion von Cholesterol. T0901317 steigerte jedoch auch die basolaterale Sekretion von Sitosterol selbst. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Arbeit von Field et al., die eine konzentrationsabhängige Zunahme der basolateralen Sitosterolkretion unter LXR-Aktivierung feststellen konnte (59). Eine Steigerung der apikalen Re-Sekretion von Sitosterol durch T0901317 war dort aber ebenfalls nicht festzustellen (59). Die direkte Substratspezifität der ABC-Steroltransporter ist also limitiert und ABCA1 selbst scheint nicht für die Selektivität der Sterolabsorption im Dünndarm verantwortlich zu sein. Eine Substratspezifität von ABCA1 kann somit auch nicht für eine unterschiedliche, LXR-abhängige basolaterale Sekretion von Cholesterol und Sitosterol verantwortlich sein. Daher ist die sterolinduzierte LXRA-Aktivierung, aber nicht die Sterolart selbst, der wesentliche Faktor in der systemischen Absorption eines Sterols über ABCA1, jedoch nicht in der luminalen enterozytären Resekretion durch ABCG5/G8. Die Ergebnisse sprechen ebenfalls gegen ein direktes LXR-aktivierendes Potential der nativen Phytosterole selbst

(180) als Beitrag zu ihrem cholesterolsenkenden Effekt, da durch Stimulation des basolateralen Steroltransportes ABCA1 die basolaterale Cholesterolskretion sogar gesteigert würde. Vielmehr begrenzt die Hemmung von CYP27 die Synthese von 27-OH-C und die Induktion der basolateralen Sekretion von Cholesterol und Phytosterolen über ABCA1.

Auch Studien am Mausmodell untersuchten den Effekt der nativen Phytosterole, und hier im Speziellen des Sitosterols, auf die dominierenden intestinalen Steroltransporter ABCA1 und ABCG5/G8 (193-195). Ein Einfluß nativer Phytosterole auf die intestinale Sterolskretion konnte in den Tiermodellen nicht gezeigt werden. Diese Studien wurden jedoch unter der Hypothese eines LXR-aktivierenden Potentials der native Phytosterole selbst durchgeführt. In Untersuchungen am Enterozyten wurde der Effekt von Phytosterolen auf zelluläre LXR-abhängige Steroltransporter zudem ausschließlich gesondert für das jeweilige Phytosterol alleine betrachtet (59;88). Letztlich ist aber die gleichzeitige Präsenz von Phytosterolen mit resorbiertem Cholesterol essentiell, um die Metabolisierung des Cholesterol zu 27-OH-C und die folgende Stimulation von ABCA1 zu antagonisieren.

Dass eine solche Reduktion der Stimulation durch eine verminderte LXR-Aktivierung im Enterozyten vermittelt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit am Caco-2-Zellmodell erstmalig aufgezeigt. Der inhibitorische Effekt von Phytosterolen auf die Bildung des enterozytär wirksamen Cholesterolmetaboliten 27-OH-Cholesterol durch CYP27 und des damit einhergehenden verminderten basolateralen Cholesteroltransports wurde damit als ein neuer intrazellärer Mechanismus etabliert, welcher zum cholesterolsenkenden Effekt der Phytosterole beiträgt. Unsere Ergebnisse werden auch durch eine anders intendierte Studie am Mausmodell unterstützt (193). Die durch cholesterolreiche Basisnahrung induzierte massive Stimulation der enterozytären ABCA1-Expression wurde dort durch Zugabe von Sitosterol zur Nahrung ebenfalls auf Ausgangsniveau reduziert (193). Dies erklärt auch, warum selbst bei sehr hohen Dosen Phytosterole die Reduktion der fraktionellen Cholesterolresorption nur etwa 30% beträgt. Durch die verminderte Bildung des LXR-Liganden 27-OH-Cholesterol wird ausschließlich der ApoB-unabhängige Weg der basolateralen enterozytären Cholesterolskretion über die verminderte Expression von ABCA1 beeinflusst. Bei einer direkten Substratkonkurrenz von Phytosterolen und Cholesterol um die Mizellenbildung oder um einen Transporter wäre ein solcher Plateaueffekt nicht zu erwarten.

## 5.6 Cholesterol als bevorzugtes ACAT-Substrat gegenüber Phytosterolen

Ein Teil des aufgenommenen Cholesterols in Enterozyten wird über den ApoB-abhängigen Chylomikronenweg basolateral sezerniert. Vor der Inkorporation in Chylomikronen wird ein Großteil des Cholesterols durch ACAT2 mit Fettsäuren verestert (140). Eine Beeinflussung der ACAT-katalysierten Veresterung von

Cholesterol durch Phytosterole wurde bereits vorgeschlagen (89) und so erschien eine Cholesterol-Phytosterol-Interaktion auf Ebene von ACAT als zusätzlicher intrazellulärer Mechanismus möglich.

ACAT kommt in einer Vielzahl von Zelltypen und Geweben in den zwei Isoformen ACAT1 und ACAT2 vor. Während ACAT1 ubiquitär exprimiert wird, scheint die Expression von ACAT2 hauptsächlich auf die Mukosa des Dünndarms begrenzt zu sein (196). Die Veresterung von Cholesterol dient mehreren Zwecken. Die Veresterung führt zu einer verminderten Membranlöslichkeit und zu einer Ablagerung der Cholesterolester im Cytoplasma in Fetttröpfchen. Dies schützt die Zelle vor einem Überschuss an freiem Cholesterol, da dessen Akkumulation in Zellmembranen zytotoxisch wirken kann (196). Enterozytär resorbiertes Cholesterol wird wie erwähnt für die Sekretion über Chylomikronen teilweise verestert (140). Auch in der Leber wird freies Cholesterol vor der Abgabe in die Zirkulation als VLDL-Partikel durch ACAT verestert. Gleichzeitig stellen Cholesterolester eine Speicherform für Cholesterol, beispielsweise in der Leber und Nebenniere, dar (196;197). Die chronische Ansammlung von Cholesterol und Cholesterolestern in Makrophagen und die damit verbundene Degeneration zu Schaumzellen gilt jedoch als einer der ersten Schritte des atherosklerotischen Prozesses (198).

Da Phytosterole effizient in Enterozyten aufgenommen werden und folglich zumindest lokal hohe Phytosterolkonzentrationen vorliegen, wurde ein möglicher Einfluss der verschiedenen Sterole auf ACAT2 in Enterozyten untersucht. Die Resorption von Cholesterol in steigender Konzentration führt zu einer nahezu linearen Zunahme von Cholesterolestern und im Zeitverlauf zu einer steigenden Sekretion von intrazellulär verestertem Cholesterol. Die Kapazität von ACAT2 scheint demnach nicht limitierend zu sein. Ein Einstrom von Cholesterol aus dem Darmlumen, z.B. nach fettricher Nahrungsaufnahme, kann somit akut bewältigt werden und resultiert nicht in einer möglicherweise toxischen Ansammlung freien Cholesterols. Im vorliegenden Caco-2-Zellmodell konnte tatsächlich keine erhöhte LDH-Freisetzung und damit kein Hinweis auf zelltoxische Einflüsse durch hohe Cholesterolresorption festgestellt werden. In Caco-2-Zellen resorbiertes Cholesterol wurde insgesamt zu 35%, Campesterol wurde zu 12% und Sitosterol lediglich zu 4% verestert. Die geringe Veresterung von Sitosterol steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen am Tiermodell und an humanen Enterozyten (88;199). Der Vergleich der Akzeptanz der unterschiedlichen Sterole als Substrat für ACAT zeigte demnach eindeutige Präferenz für Cholesterol gegenüber Phytosterolen und eine inverse Korrelation zwischen zunehmender Länge der Sterolseitenketten-Substitution an C24 und verminderter Akzeptanz als ACAT-Substrat.

Da Phytosterole in geringerem Maße, aber dennoch deutlich messbar durch ACAT verestert wurden, ist eine Konkurrenz als Substrat gegenüber Cholesterol denkbar. In Caco-2-Zellen konnte unter Phytosterolbeladung eine Reduktion der intrazellulären Cholesterolester und eine Abnahme des basolateral sezernierten ApoB48 gefunden werden, was auf eine Abnahme der Chylomikronensekretion schließen lässt (88;200).

Auch in HepG2-Zellen wurde die Sekretion von ApoB100 unter Phytosterolbehandlung gesenkt (200). In Versuchen mit isolierten ACAT-Enzymen und in Enterozyten konnte eine verminderte Cholesterolveresterung unter paralleler Sitosterolinkubation beobachtet werden (88;201), was eine verminderte basolaterale Sekretion des Cholesterols in Chylomikronen plausibel erscheinen lässt. Neben der Sterol-Interaktion an CYP27 trägt also vermutlich auch eine Sterol-Interaktion an ACAT2 zum intrazellulären Effekt der Phytosterole bei.

Die geringere Veresterung von Sitosterol und Campesterol im Vergleich zu Cholesterol konnte in der vorliegenden Arbeit neben Enterozyten ähnlich auch in primären humanen Makrophagen und Hepatozyten beobachtet werden. In den untersuchten Zellmodellen variiert die Expression der Isoformen ACAT1 und ACAT2. Die Ergebnisse lassen also einen Schluss auf die Akzeptanz der Phytosterole durch die jeweilige ACAT-Isoform zu. In Caco-2-Zellen nimmt die Expression von ACAT2 auf mRNA- und Proteinebene mit der Ausdifferenzierung von Caco-2-Zellen zu humanen Dünndarmepithelzellen um ca. das 10-fache zu. ACAT1 wird dagegen relativ stabil auf geringerem Niveau exprimiert. Mit zunehmender Differenzierung nimmt der Anteil des ACAT2-veresterten Cholesterols gegenüber ACAT1-veresterten Cholesterols deutlich zu (202;203). Folglich entsprechen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse an Caco-2-Zellen vorrangig der Substratspezifität von ACAT2. ACAT1 ist dagegen in primären humanen Makrophagen vorherrschend und nimmt mit zunehmender Ausdifferenzierung zu (198;204). Die Veresterung der Sterole in primären humanen Makrophagen wird dementsprechend nahezu exklusiv durch ACAT1 katalysiert. In Hepatozyten scheinen beide Isoformen exprimiert zu werden. Es existieren allerdings unterschiedliche Auffassungen über die quantitative Verteilung und deren jeweiliger Relevanz. So konnte in humanen Hepatozyten sowohl ACAT1 und ACAT2 nachgewiesen werden, wobei  $ACAT2 > 50\%$  der Aktivität ausmachte (197;204), in anderen Arbeiten nur ca. 20% der Aktivität (202). Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendete Ziellinie HepG2 wurde unterschiedlich hinsichtlich der ACAT-Aktivität charakterisiert. So wurde ein Verhältnis ACAT1:ACAT2 von 1:1 bis hin zu einem Verhältnis von 6:1 in verschiedenen Arbeiten gefunden (197;202). Die unterschiedliche Datenlage macht eine verlässliche Aussage zur Substratspezifität von ACAT in HepG2-Zellen schwierig.

Tatsächlich variierte die Veresterung von Cholesterol im Verhältnis zu den Phytosterolen, besonders im Vergleich von Enterozyten und Makrophagen. In primären humanen Makrophagen war der gesamte veresterte Anteil der extern zugeführten Sterole 51% für Cholesterol, 24% für Campesterol und 6% für Sitosterol. Da in Enterozyten vorrangig ACAT2 und in Makrophagen ACAT1 die Veresterung katalysiert, lassen die unterschiedlichen Veresterungseffizienzen einen Schluss auf die Substratakzeptanz der jeweiligen ACAT-Isoform zu. Die Relation der entstandenen Cholesterolester zu Phytosterolestern ist in Makrophagen kleiner, was auf eine größere Akzeptanz der Phytosterole als Substrat von ACAT1 hinweist. Der Enterozyt kann so anscheinend effektiver eine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Sterolsubstraten treffen als

der Makrophage. Eine Studie an isolierten ACAT-Enzymen zeigt tatsächlich eine gewisse Präferenz, zumindest von Sitosterol, durch ACAT1 und lässt vermuten, dass ACAT2 besser zwischen Cholesterol und Phytosterolen differenzieren kann (205). Die in Enterozyten basolateral exprimierten Steroltransporter ABCG5/G8 re-exportieren bevorzugt unveresterte Sterole in das Darmlumen (63;206). Unterschiede in der Veresterung von Cholesterol und Phytosterolen durch ACAT könnten daher zu einer unterschiedlich effizienten Re-Exkretion der Sterole beitragen.

In Enterozyten, wo ACAT2 dominiert, wäre dies als ein wichtiger Beitrag zur selektiven Sterolabsorption zu sehen, da durch die verminderte Veresterung eine erhöhte Menge freier Phytosterole für den Re-Export über ABCG5/G8 in das Darmlumen vorliegt. Andererseits könnte die verminderte Selektivität von ACAT1 in Makrophagen durchaus negative Auswirkungen aufgrund erhöhter Phytosteroolester-Akkumulation haben. Im Krankheitsbild der Sitosterolämie ist die Phytosterol-Plasmakonzentration und die Konzentration von Phytosterolen in atherosklerotischen Läsionen deutlich erhöht (67). Darüber hinaus liegen interessante Befunde vor, die zumindest ACAT1 als allosterisches Enzym mit zwei Sterolbindestellen darstellen, eine für Bindung des Substrates und eine Aktivierungsbindestelle (201). Nach diesem Modell kann die Substratbindestelle eine Anzahl verschiedener Sterole mit unterschiedlicher Effizienz aufnehmen, während die Aktivierungsbindestelle äußerst selektiv für Cholesterol ist. Sitosterol kann so unter Stimulation von Cholesterol effizienter verestert (201) und anschließend als Ester abgelagert werden. Eine erhöhte Ablagerung der Phytosterole als Ester ließe einen Beitrag zur Entstehung der Schaumzellen als initiale Veränderungen in der Gefäßwand in Sitosterolämie-Patienten vermuten.

## 5.7 Effekte von Phytosterolen auf das Cholesterol-Handling peripherer Zellen

Geringe Mengen Phytosterole entgehen der enterozytären Sterolselektivität und werden systemisch aufgenommen. Bei hochdosierten Phytosterolgaben können sich diese Mengen über längere Zeit kumulativ aufaddieren (69;207). Insbesondere bei Sitosterolämie kommt es dann zur Ansammlung in peripheren Makrophagen. Die Sterol-Interaktion auf Ebene eines unterschiedlichen Umsatzes von Cholesterol und Phytosterolen durch CYP27 und der Hemmung des Umsatzes von Cholesterol zu 27-OH-Cholesterol durch Phytosterole hat in peripheren Makrophagen potentiell eine funktionelle Bedeutung durch Beeinflussung des lokalen Sterolhandlings.

Sitosterolämie-Patienten weisen eine um das 50- bis 200-fach erhöhte Konzentration pflanzlicher Sterole in Plasma und Gewebe auf (66). Diese massive Erhöhung führt zu klinischen Symptomen wie xanthomatösen Ablagerungen und atherosklerotischen Gefäßveränderungen, verbunden mit einem stark erhöhten Risiko für vaskuläre Ereignisse, oft schon im frühen Lebensalter (67) trotz größtenteils normaler

Cholesterolkonzentration im Plasma. Dies führte zu der Annahme, dass Phytosterole selbst atherogenes Potential besitzen (66;69). Es konnte gezeigt werden, dass sich in Xanthomen von Sitosterolämie-Patienten zwar erhöhte Phytosterolkonzentrationen finden lassen, dort aber gleichzeitig auch die Akkumulation von freiem und verestertem Cholesterol erhöht ist (70). Die Akkumulation von Cholesterol in Makrophagen und die damit verbundene Differenzierung zu Schaumzellen gilt als einer der initialen Schritte bei der Entstehung der Atherosklerose (32;33). Der Konsum phytosterolhaltiger Nahrungsmittel führt auch bei Gesunden zu einer etwas erhöhten Konzentration von Phytosterolen im Plasma (207;208). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der Konsum phytosterolhaltiger Margarine über einen längeren Zeitraum neben erhöhten Phytosterol-Plasmaspiegeln auch zu einer erhöhten Konzentration von Phytosterolen im Gewebe führt (69).

Trotz der pathogenetischen Relevanz einer Akkumulation von Cholesterol und potentiell auch Phytosterolen gibt es bislang lediglich eine Arbeit, welche die Ansammlung und Re-Sekretion von Phytosterolen und Cholesterol in Makrophagen vergleicht (209). Die Aufnahme in Makrophagen war dort bei allen untersuchten Sterolen annähernd gleich und entsprach damit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Im Unterschied zu Enterozyten ist die Sterolaufnahme in Makrophagen also nicht sterol-selektiv. Für die Re-Sekretion wurde jedoch eine bevorzugte Sekretion von Phytosterolen, besonders von Sitosterol und Sitostanol, postuliert (209). In der vorliegenden Arbeit wurden Cholesterol und Campesterol in Makrophagen besser oxidiert als Sitosterol und eine erhöhte Re-Sekretion von Campesterol und Cholesterol auch in Form von 27-OH- und 27-COOH-Metaboliten festgestellt. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der obigen Studie (209). Die Erklärung für diese scheinbare Diskrepanz liegt im verwendeten Zellmodell. Als Makrophagen-Modell wurden in der Studie von Hovenkamp et al. THP-1-Zellen verwendet (209), in dieser Arbeit dagegen primäre humane Makrophagen. Die Expression von CYP27 in THP-1-Zellen ist um den Faktor 1000 geringer als in primären humanen Makrophagen. Dies spiegelt sich auch auf der Proteinebene wider und führt zu einer äußerst geringen absoluten Produktion aller CYP27-Metaboliten in THP-1-Makrophagen (187). Dementsprechend wird Cholesterol von THP1-Zellen auch nicht in Form von 27-OH-C und 27-COOH-C exportiert. In primären humanen Makrophagen sind der Umsatz von Cholesterol zu CYP27-Metaboliten und die Sekretion der 27-oxidierten Metaboliten dagegen deutlich höher. Da in der Arbeit mit THP-1-Makrophagen lediglich die Sekretion der Gesamtradioaktivität gemessen wurde, konnte die Sekretion von nativen Sterolen und Oxymetaboliten nicht getrennt betrachtet werden (209). Im Hinblick auf die Bedeutung der Cholesterolesekretion führt dies im THP-1-Makrophagen-Modell damit zu einer Unterschätzung der tatsächlichen *in vivo* Cholesterolesekretion von Makrophagen und in Folge zu einer relativen Überschätzung der Phytosterolesekretion, da die Sekretion als 27-oxidierte Metaboliten nur unzureichend berücksichtigt wird. Der Vergleich des Netto-Sterolhandlings von Cholesterol und Phytosterolen lässt sich daher

nur an einem Zellsystem mit normaler CYP27-Aktivität reell darstellen. Im Vergleich zu THP-1-Makrophagen stellen primäre humane Makrophagen das besser die in vivo Situation beschreibende Makrophagen-Modell dar (187). Insgesamt ist die Sekretion von Phytosterolen als 27-OH- und 27-COOH-Metaboliten gegenüber Cholesterol vermindert und eine Akkumulation von Phytosterolen als möglicher atherogener Faktor denkbar.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass steigende Mengen an freiem Sitosterol in Makrophagen zu caspase-unabhängigem, autophagozytotischem Zelltod führen können (210). Tatsächlich wiesen primäre humane Makrophagen nach Phytosterolinkubation morphologische Auffälligkeiten im Vergleich zur Cholesterolinkubation auf. Dabei ließ sich nach Sitosterolinkubation eine an Schaumzellen erinnernde Morphologie zeigen, charakterisiert durch eine massive, vermutlich lysosomale, Akkumulation des Sterols. Jedoch war die Freisetzung der Laktatdehydrogenase gegenüber Cholesterolinkubation nur minimal erhöht, was gegen einen zytotoxischen Einfluss des Sitosterol spricht.

Es lassen sich zwei potentiell schädigende Konzepte der Phytosterole auf Makrophagen postulieren. In einer ersten Phase der Atherogenese kommt es zu einer extrazellulären Akkumulation atherogener Lipoproteine im subendothelialen Raum, deren unkontrollierte Aufnahme durch Makrophagen und schließlich Ausbildung von Schaumzellen (32;211). Die Akkumulation von Phytosterolen in Makrophagen führte zu einer an Schaumzellen erinnernden Zellmorphologie. Phytosterole stellen ein schlechteres ACAT-Substrat in dar (siehe 5.6) und es steigt auch der Gehalt an freien Phytosterolen in Makrophagen mit zunehmender Aufnahme, bedingt durch den eingeschränkten Sekretionsmechanismus über 27-oxidierte Phytosterole. Dies passt zu einem atherogenen Potenzial der Phytosterole selbst.

In einer zweiten Phase kann es schließlich final zu einer Ruptur der Makrophagenreichen Plaques kommen. Im Laufe dieser Phase kommt es in der Regel sekundär zu einer verstärkten Akkumulation freien Cholesterols (212). Die Zunahme des Gehaltes an freiem Cholesterol gilt dabei als ein Auslöser des Zelluntergangs in Makrophagen fortgeschritten Läsionen (213). Die Analyse von Xanthomen von Sitosterolämie-Patienten zeigt, dass Phytosterole nur einen kleineren Teil der Gesamtsterolmenge ausmachen und der Großteil aus freiem und verestertem Cholesterol selbst besteht (65;66;69), trotz der meist im Normbereich liegenden Plasmacholesterol-Konzentration (66). Diese Akkumulation von Cholesterol in Makrophagen durch Phytosterole (69) könnte durch die Hemmung von CYP27, reduzierte Bildung von 27-OH-Cholesterol, verminderte LXR-Aktivierung und damit einer verminderten Expression des Steroltransporters ABCA1 verursacht zu sein. Ein solches Phytosterolinduziertes „Trapping“ von Cholesterol in Makrophagen könnte die Schaumzellbildung und frühzeitigen atherosklerotischen Veränderungen bei Sitosterolämie-Patienten (65;66) plausibel erklären.

Dies weist der in Enterozyten gefundenen Hemmung von CYP27 durch Phytosterole über die Erklärung der Sterol-Interaktion auch in peripheren Zellen eine weitere Bedeutung im Sterolhandling zu, die auch bei der Verwendung von Phytosterolen in funktionellen Lebensmitteln in Betracht gezogen werden muss. Falls die auch bei Gesunden unter pharmakologischen Dosen von Phytosterolen etwas erhöhten Phytosterol-Plasmaspiegel (207;208) langfristig zur Akkumulation von Phytosterolen in peripheren Makrophagen führen, könnte die CYP27-Hemmung den reversen Cholesteroltransport über ABCA1 und direkt über 27-Oxycholesterolmetaboliten beeinträchtigen.

## 6 Zusammenfassung

Phytosterole, die Sterole von Pflanzen, unterscheiden sich von Cholesterin nur durch eine Alkylsubstitution an C24 und eventuell eine Doppelbindung in der Sterolseitenkette. Trotz vergleichbarer Zufuhr von 200 - 600 mg/d und der großen strukturellen Ähnlichkeit werden von Phytosterolen nur 0,6 - 7%, von Cholesterin jedoch etwa 60% systemisch absorbiert. Phytosterole senken in hohen Dosen ( $> 2\text{ g/d}$ ) die Cholesterolabsorption um etwa 30% und die LDL-Cholesterin-Spiegel um bis zu 15% und werden deshalb zunehmend in „funktionellen Lebensmitteln“ vermarktet.

Als Mechanismus wurde lange eine rein luminale, physico-chemische Interferenz mit der mizellären Emulgierung von Cholesterin postuliert. Spätestens seit der molekularen Aufklärung der Phytosterolspeicherkrankheit Sitosterolämie als dysfunktionelle Mutationen der apikalen Steroltansportproteine ABCG5/G8 stand fest, dass Phytosterole sehr wohl in Enterozyten aufgenommen, aber durch ABCG5/G8 effektiv ins Darmlumen resezerniert werden. Da ABCG5/8 auch Cholesterin transportieren kann, blieb die intestinale Sterol-Selektivität und -Interaktion weiterhin unklar.

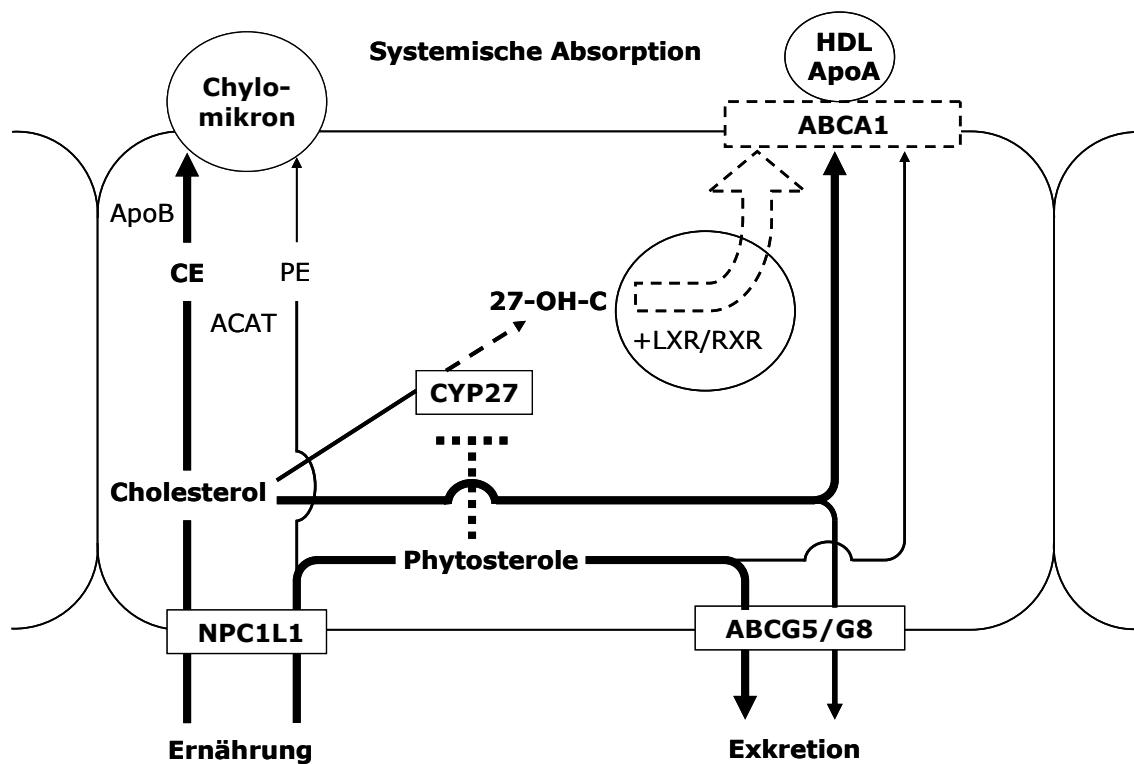
In allen Zellen wird ein Cholesterolüberschuss über bestimmte Oxycholesterole signalisiert, die den nukleären Transkriptionsfaktor LXR $\alpha$  aktivieren und so u.a. die Expression des zellulären Cholesterolexporters ABCA1 stimulieren. Dies ließ eine Rolle von Oxycholesterolen oder analogen regulatorischen Oxyphytosterolen bei der enterozytären Sterol-Interaktion und -Selektivität vermuten.

Deshalb wurde am humanen Enterozytenmodell Caco-2 das Handling und die Metabolisierung von Phytosterolen und Cholesterin allein und in Kombination verglichen. Sitosterol wurde eindeutig, wenn auch langsamer als Cholesterin, von Enterozyten akkumuliert, reduzierte aber bei Kombination die Cholesterolabsorption. Dies war teilweise durch Hemmung der apikalen Aufnahme, aber überwiegend der basolateralen Cholesterolesekretion bedingt, unabhängig von der Mizellenbildung, und nicht durch Sättigung einer limitierten Transportkapazität erklärbar.

Im humanen Enterozyten und vergleichend in Hepatozyten und Makrophagen wurde deshalb nach potentiell regulatorischen Oxysterolen gesucht. Aus allen Sterolen wurden in diesen Zellen nur die 27-Hydroxy- und 27-Carboxy-Metaboliten gebildet, andere LXR-agonistische Oxysterole waren nicht nachweisbar. Der Umsatz war für Sitosterol und Campesterol abhängig von der Länge der C24-Alkylsubstitution deutlich geringer als für Cholesterin. In Ko-Inkubationen hemmten Phytosterole konzentrations- und C24-alkyl-abhängig die Bildung von 27-OH-Cholesterin. Diese kompetitive Hemmung und die geringe 27-Hydroxylierung von Phytosterolen selbst wurde auch in Präparationen des katalysierenden Enzyms, der an der inneren Mitochondrienwand lokalisierten Cytochrom P450 Oxidase CYP27, direkt gezeigt.

Die Bioaktivität der 27-OH-Sterole als LXR $\alpha$ -Agonisten wurde direkt im LXRE-Transaktivierungs-Assay nachgewiesen und die stimulierte Expression von CYP27 und

des in Enterozyten nur basolateral lokalisierten Cholesteroltransporters ABCA1 gezeigt. Dementsprechend steigerte 27-OH-Cholesterol auch selektiv die basolaterale, systemische Cholesterolesekretion, während der apikal exprimierte Sterolexporter ABCG8 und die apikale Sterolresekretion unverändert blieben. Umgekehrt hob in Ko-Inkubationen mit Phytosterolen die exogene Substitution eines synthetischen LXR $\alpha$ -Agonisten als Ersatz für das reduzierte endogene 27-OH-Cholesterol die Hemmung der Cholesterolabsorption durch Phytosterole komplett auf und überfuhr die Sterolselektivität. Auch in Tracer-Experimenten mit nanomolaren Phytosterol- und Cholesterolkonzentrationen, die die Aktivierung von LXR $\alpha$  nicht beeinflussen können, konnte keine direkte Sterolselektivität der ABCG5/8 und ABCA1-Transporter nachgewiesen werden.



Neben physico-chemischen mizellären Effekten und der allenfalls limitierten direkten Cholesterolpräferenz der Steroltransporter NPC1L1, ABCG5/G8 und ABCA1 wurde für ACAT2, die apikal einströmendes Cholesterol zu >35% verestert und in die ApoB-abhängige basolaterale Chylomikronensekretion einschleust, bereits eine relative Sterolselektivität beschrieben. Bei den eigenen Untersuchungen wurde ein neuer Mechanismus auf der regulatorischen Ebene der LXR $\alpha$ -Aktivierung im Enterozyten gefunden:

Im Zentrum steht die kompetitive Hemmung des „Cholesterol-Sensors“ CYP27 durch Phytosterole und die nur geringe 27-Hydroxylierung der Phytosterole selbst. Dadurch wird bei gleichzeitigem Einstrom von Phytosterolen und Cholesterol in Enterozyten die

Bildung des dominierenden LXR $\alpha$ -Agonisten 27-OH-Cholesterol verhindert. Normalerweise vermittelt dies über LXR-Aktivierung und Induktion von CYP27, LXR $\alpha$  und ABCA1 eine selbstinduzierbare Komponente der Cholesterolabsorption auf dem ApoA-abhängigen Weg. Der lokale LXR $\alpha$ -Antagonismus von Phytosterolen blockt diese Selbstbahnung, lenkt Cholesterol vermehrt um zur luminalen Resekretion durch die konstitutiv apikal exprimierten ABCG5/8 und trägt auch zur Sterolselektivität bei. In peripheren Makrophagen könnten Phytosterole über Hemmung von CYP27, LXR $\alpha$  und ABCA1 durch Sterol-„Trapping“ die frühe Atherosklerose trotz eher niedriger Cholesterolspiegel bei Sitosterolämie erklären. Ob auch bei ABCG5/G8-Gesunden die unter pharmakologischen Phytosteroldosen erhöhten Plasmaspiegel langfristig zur Phytosterol- und paradoxen Cholesterol-Akkumulation in peripheren Zellen führen können, ist gegenwärtig unklar.

## 7 Literatur

1. Libby P, Aikawa M, Schünbeck U. Cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2000;1529(1-3):299-309.
2. Martin SS, Blumenthal RS, Miller M. LDL cholesterol: the lower the better. *Med.Clin.North Am.* 2012;96(1):13-26.
3. Ostlund RE, Jr. Phytosterols and cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2004;15(1):37-41.
4. Plat J, Mensink RP. Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol.* 2005;96(1A):15D-22D.
5. Löffler G, Petrides PE. Biochemie und Pathobiochemie, Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1998;6. Auflage.
6. Schroepfer GJ, Jr. Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiol.Rev.* 2000;80(1):361-554.
7. Charlton-Menys V, Durrington PN. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental Physiology* 2008;93(1):27-42.
8. Sudhop T, Lutjohann D, Kodal A, Igel M, Tribble DL, Shah S et al. Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption by Ezetimibe in Humans. *Circulation* 2002;106(15):1943-8.
9. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and plant sterol absorption: recent insights. *Am J Cardiol.* 2005;96(1A):10D-4D.
10. Levy E, Spahis S, Sinnett D, Peretti N, Maupas-Schwalm F, Delvin E et al. Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr.Opin.Lipidol.* 2007;18(3):310-8.
11. Matthan NR, Lichtenstein AH. Approaches to measuring cholesterol absorption in humans. *Atherosclerosis* 2004;174(2):197-205.
12. Bosner MS, Lange LG, Stenson WF, Ostlund RE, Jr. Percent cholesterol absorption in normal women and men quantified with dual stable isotopic tracers and negative ion mass spectrometry. *J Lipid Res.* 1999;40(2):302-8.

13. Heidrich J, Contos L, Hunsaker L, Deck L, Vander Jagt D. Inhibition of pancreatic cholesterol esterase reduces cholesterol absorption in the hamster. *BMC Pharmacology* 2004;4(1):5.
14. Lammert F, Wang DQH. New Insights Into the Genetic Regulation of Intestinal Cholesterol Absorption. *Gastroenterology* 2005;129(2):718-34.
15. Davis HR, Jr., Zhu Lj, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis. *J.Biol.Chem.* 2004;279(32):33586-92.
16. Mathur SN, Born E, Murthy S, Field FJ. Microsomal triglyceride transfer protein in CaCo-2 cells: characterization and regulation. *J.Lipid Res.* 1997;38(1):61-7.
17. Sudhop T, Lutjohann D, von Bergmann K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. *Pharmacology & Therapeutics* 2005;105(3):333-41.
18. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116(4):1052-62.
19. Iqbal J, Anwar K, Hussain MM. Multiple, Independently Regulated Pathways of Cholesterol Transport across the Intestinal Epithelial Cells. *J.Biol.Chem.* 2003;278(34):31610-20.
20. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC1 Gene Expression and ApoA-I-Mediated Cholesterol Efflux Are Regulated by LXR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;274(3):794-802.
21. Hazard SE, Patel SB. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch.* 2007;453(5):745-52.
22. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding Cassette Sterol Transporters ABCG5 and ABCG8 by the Liver X Receptors alpha and beta. *J.Biol.Chem.* 2002;277(21):18793-800.
23. Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003;278(18):15565-70.

24. Plosch T, Kruit JK, Bloks VW, Huijkman NCA, Havinga R, Duchateau GSMJ et al. Reduction of Cholesterol Absorption by Dietary Plant Sterols and Stanols in Mice Is Independent of the Abcg5/8 Transporter. *J.Nutr.* 2006;136(8):2135-40.
25. Simons K, Ikonen E. How cells handle cholesterol. *Science* 2000;290(5497):1721-6.
26. Arrese M, Ananthanarayanan M. The bile salt export pump: molecular properties, function and regulation. *Pflugers Arch* 2004;449(2):123-31.
27. Macdonald IA, Bokkenheuser VD, Winter J, McLernon AM, Mosbach EH. Degradation of steroids in the human gut. *J.Lipid Res.* 1983;24(6):675-700.
28. Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2006;40():-39.
29. van der Veen JN, van Dijk TH, Vrins CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K et al. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009;284(29):19211-9.
30. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002;161(2):245-54.
31. Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2006;99(10):1031-43.
32. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407(6801):233-41.
33. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture: Oxidative Modification of LDL and Atherogenesis. *Circulation* 1997;95(4):1062-71.
34. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(5):712-9.
35. Silver DL, Wang N, Xiao X, Tall AR. High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2001;276(27):25287-93.

36. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271(5248):518-20.
37. Ohama T, Hirano Ki, Zhang Z, Aoki R, Tsujii Ki, Nakagawa-Toyama Y et al. Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;296(3):625-30.
38. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K et al. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289(5484):1524-9.
39. Kruit JK, Plösch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PHE, Groen AK et al. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 2005;128(1):147-56.
40. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC et al. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat.Genet.* 1999;22(4):352-5.
41. Serfaty-Lacroix C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED et al. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 1994;107(1):85-98.
42. Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1343-72.
43. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research* 2002;41(6):457-500.
44. Clouse SD. Brassinosteroids. Plant counterparts to animal steroid hormones? *Vitam.Horm.* 2002;65:195-223.
45. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000;80(7):939-66.
46. Lutjohann D. Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols. *Br.J Nutr* 2004;91(1):3-4.

47. Kritchevsky D. Phytosterols. *Adv.Exp.Med Biol* 1997;427:235-43.
48. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989. *Eur J Biochem* 1989;186(3):429-58.
49. Piironen V, Toivo J, Lampi AM. Plant Sterols in Cereals and Cereal Products. *Cereal Chemistry* 2002;79(1):148-54.
50. Piironen V, Toivo J, Puupponen-Pimiä R, Lampi AM. Plant sterols in vegetables, fruits and berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003;83(4):330-7.
51. Ostlund RE, Jr. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 2002;22:533-49.
52. Ostlund RE, Jr., McGill JB, Zeng CM, Covey DF, Stearns J, Stenson WF et al. Gastrointestinal absorption and plasma kinetics of soy Delta 5-phytosterols and phytostanols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282(4):E911-E916.
53. Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. Niemann-Pick C1-Like 1 Overexpression Facilitates Ezetimibe-Sensitive Cholesterol and beta-Sitosterol Uptake in CaCo-2 Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320(2):559-64.
54. Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metab* 2008;7(6):508-19.
55. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004;303(5661):1201-4.
56. Tang W, Ma Y, Jia L, Ioannou YA, Davies JP, Yu L. Genetic inactivation of NPC1L1 protects against sitosterolemia in mice lacking ABCG5/ABCG8. *J Lipid Res* 2009;50(2):293-300.
57. de Jong A, Plat J, Mensink RP. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2003;14(7):362-9.
58. Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Kent CR, Rudel LL. ACAT2 and ABCG5/G8 are both required for efficient cholesterol absorption in mice: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J.Lipid Res.* 2012;53(8):1598-609.

59. Field FJ, Born E, Mathur SN. LXR/RXR ligand activation enhances basolateral efflux of beta-sitosterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2004;45(5):905-13.
60. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J.Lipid Res.* 2004;45(2):301-7.
61. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290(5497):1771-5.
62. Igel M, Giesa U, Lutjohann D, von Bergmann K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J.Lipid Res.* 2003;44(3):533-8.
63. Wang J, Sun F, Zhang DW, Ma Y, Xu F, Belani JD et al. Sterol transfer by ABCG5 and ABCG8: in vitro assay and reconstitution. *J Biol Chem* 2006;281(38):27894-904.
64. Wang J, Zhang DW, Lei Y, Xu F, Cohen JC, Hobbs HH et al. Purification and reconstitution of sterol transfer by native mouse ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* 2008;47(18):5194-204.
65. Bhattacharyya AK, Connor WE. Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 1974;53(4):1033-43.
66. Sudhop T, von Bergmann K. Sitosterolemia--a rare disease. Are elevated plant sterols an additional risk factor? *Z.Kardiol.* 2004;93(12):921-8.
67. Lutjohann D, von Bergmann K. Phytosterolaemia: diagnosis, characterization and therapeutical approaches. *Ann.Med* 1997;29(3):181-4.
68. Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V. Sitosterolemia. *J.Lipid Res.* 1992;33(7):945-55.
69. Weingartner O, Lutjohann D, Ji S, Weisshoff N, List F, Sudhop T et al. Vascular Effects of Diet Supplementation With Plant Sterols. *Journal of the American College of Cardiology* 2008;51(16):1553-61.
70. Weingartner O, Bohm M, Laufs U. Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolemia. *Eur Heart J* 2009;30(4):404-9.

71. Calpe-Berdiel L, Mendez-Gonzalez J, Blanco-Vaca F, Carles Escola-Gil J. Increased plasma levels of plant sterols and atherosclerosis: a controversial issue. *Curr.Atheroscler.Rep.* 2009;11(5):391-8.
72. Salen G, von Bergmann K, Lutjohann D, Kwiterovich P, Kane J, Patel SB et al. Ezetimibe effectively reduces plasma plant sterols in patients with sitosterolemia. *Circulation* 2004;109(8):966-71.
73. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC. Ezetimibe normalizes metabolic defects in mice lacking ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2005;46(8):1739-44.
74. Boberg KM, Einarsson K, Bjorkhem I. Apparent lack of conversion of sitosterol into C24-bile acids in humans. *J.Lipid Res.* 1990;31(6):1083-8.
75. Salen G, Ahrens E.H.Jr., Grundy SM. Metabolism of beta-sitosterol in man. *JClin Invest.* 1970;49:952-67 1970(49):952-67.
76. Klett EL, Lu K, Kosters A, Vink E, Lee MH, Altenburg M et al. A mouse model of sitosterolemia: absence of Abcg8/sterolin-2 results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med* 2004;2:5.
77. Kosters A, Frijters RJ, Schaap FG, Vink E, Plosch T, Ottenhoff R et al. Relation between hepatic expression of ATP-binding cassette transporters G5 and G8 and biliary cholesterol secretion in mice. *J Hepatol.* 2003;38(6):710-6.
78. PETERSON DW. Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc.Soc Exp.Biol Med* 1951;78(1):143-7.
79. POLLAK OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 1953;7(5):702-6.
80. Trautwein EA, Duchateau GSMJE, Lin Y, Mel'nikov SM, Molhuizen HOF, NTanios FY. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2003;105(3-4):171-85.
81. Lees AM, Mok HY, Lees RS, McCluskey MA, Grundy SM. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 1977;28(3):325-38.
82. St Onge MP, Jones PJ. Phytosterols and human lipid metabolism: efficacy, safety, and novel foods. *Lipids* 2003;38(4):367-75.

83. Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Duchateau GS, Meijer L, Zock PL et al. Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J.Nutr.* 2009;139(2):271-84.
84. Ikeda I, Sugano M. Some aspects of mechanism of inhibition of cholesterol absorption by beta-sitosterol. *Biochim Biophys Acta* 1983;732(3):651-8.
85. Ikeda I, Tanabe Y, Sugano M. Effects of sitosterol and sitostanol on micellar solubility of cholesterol. *J Nutr Sci Vitaminol.(Tokyo)* 1989;35(4):361-9.
86. Mel'nikov SM, Seijen ten Hoorn JW, Eijkelenboom AP. Effect of phytosterols and phytostanols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an in vitro study. *Chem Phys Lipids* 2004;127(2):121-41.
87. Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J.Lipid Res.* 2005;46(11):2468-76.
88. Field FJ, Born E, Mathur SN. Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1997;38(2):348-60.
89. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 2009;203(1):18-31.
90. Moghadasian MH, Frohlich JJ. Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *Am J Med* 1999;107(6):588-94.
91. Vanstone CA, Raeini-Sarjaz M, Jones PJ. Injected phytosterols/stanols suppress plasma cholesterol levels in hamsters. *J Nutr Biochem* 2001;12(10):565-74.
92. Konlande JE, Fisher H. Evidence for a nonabsorptive antihypercholesterolemic action of phytosterols in the chicken. *J Nutr* 1969;98(4):435-42.
93. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat.Med* 2002;8(11):1243-8.
94. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Disease. *Mol Endocrinol* 2003;17(6):985-93.

95. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol* 2000;16:459-81.
96. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD et al. 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Ligand for Liver X Receptor in Cholesterol-loaded Cells. *J.Biol.Chem.* 2001;276(42):38378-87.
97. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383(6602):728-31.
98. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL et al. Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway. *J.Biol.Chem.* 1997;272(6):3137-40.
99. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 2002;45(10):1963-6.
100. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L et al. Role of LXR<sub>s</sub> in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14(22):2831-8.
101. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 2007;445(7124):219-23.
102. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995;9(9):1033-45.
103. Albers M, Blume B, Schlueter T, Wright MB, Kober I, Kremoser C et al. A Novel Principle for Partial Agonism of Liver X Receptor Ligands: COMPETITIVE RECRUITMENT OF ACTIVATORS AND REPRESSORS. *J.Biol.Chem.* 2006;281(8):4920-30.
104. Joseph SB, Tontonoz P. LXR<sub>s</sub>: new therapeutic targets in atherosclerosis? *Curr.Opin.Pharmacol.* 2003;3(2):192-7.
105. Dietschy JM, Turley SD. Control of Cholesterol Turnover in the Mouse. *J.Biol.Chem.* 2002;277(6):3801-4.

106. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA et al. Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99(18):11896-901.
107. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002;99(11):7604-9.
108. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Genes & Development* 2000;14(22):2819-30.
109. Oosterveer MH, Grefhorst A, Groen AK, Kuipers F. The liver X receptor: Control of cellular lipid homeostasis and beyond Implications for drug design. *Prog.Lipid Res* 2010;49(4):343-52..
110. Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* 2009;30(3):111-22.
111. Gill S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog.Lipid Res* 2008;47(6):391-404.
112. Savage GP, Dutta PC, Rodriguez-Estrada MT. Cholesterol oxides: their occurrence and methods to prevent their generation in foods. *Asia Pac.J Clin Nutr* 2002;11(1):72-8.
113. Brown AJ. 24(S),25-Epoxycholesterol: A messenger for cholesterol homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009;41(4):744-7.
114. Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J.Clin.Invest.* 2002;110(6):725-30.
115. Bjorkhem I, Diczfalusi U. Oxysterols: Friends, Foes, or Just Fellow Passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(5):734-42.
116. Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim.Biophys.Acta* 2000;1529(1-3):126-35.

117. Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest* 2002;110(6):725-30.
118. Javitt NB. 25R,26-Hydroxycholesterol revisited: synthesis, metabolism, and biologic roles. *J.Lipid Res.* 2002;43(5):665-70.
119. Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig.Med Dosw.(Online.)* 2007;61:736-59.
120. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review). *J Nutr Biochem* 2002;13(12):700-10.
121. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol.* 1996;34(2):193-211.
122. Wielkoszynski T, Gawron K, Strzelczyk J, Bodzek P, Zalewska-Ziob M, Trapp G et al. Cellular toxicity of oxycholesterols. *Bioessays* 2006;28(4):387-98.
123. Guardiola F. Phytosterol oxidation products: state of the art. *Reprod.Nutr Dev.* 2004;44(6):597-8.
124. Grandgirard A, Martine L, Joffre C, Juaneda P, Berdeaux O. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives application to a phytosterol-enriched food. *J Chromatogr.A* 2004;1040(2):239-50.
125. Johannes C, Lorenz RL. Preparation and mass spectrometry of 14 pure and  $^{18}\text{O}(2)$ -labeled oxidation products from the phytosterols beta-sitosterol and stigmasterol. *Anal.Biochem* 2004;325(1):107-16.
126. Hovenkamp E, Demonty I, Plat J, Lutjohann D, Mensink RP, Trautwein EA. Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge. *Progress in Lipid Research* 2008;47(1):37-49.
127. Adcox C, Boyd L, Oehrl L, Allen J, Fenner G. Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric.Food Chem* 2001;49(4):2090-5.

128. Maguire L, Konoplyannikov M, Ford A, Maguire AR, O'Brien NM. Comparison of the cytotoxic effects of beta-sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7beta-hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *Br.J Nutr* 2003;90(4):767-75.
129. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem* 2003;278(38):36091-8.
130. Salvini S, Charbonnier M, Defoort C, Alquier C, Lairon D. Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *Br J Nutr* 2002;87(3):211-7.
131. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. *Pharm.Res* 1997;14(6):763-6.
132. Troutman MD, Thakker DR. Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells. *Pharm.Res* 2003;20(8):1192-9.
133. Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A et al. Elimination of Cholesterol in Macrophages and Endothelial Cells by the Sterol 27-Hydroxylase Mechanism. COMPARISON WITH HIGH DENSITY LIPOPROTEIN-MEDIATED REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT. *J.Biol.Chem.* 1997;272(42):26253-61.
134. Bjorkhem I, Andersson O, Diczfalusy U, Sevastik B, Xiu R, Duan C et al. Atherosclerosis and Sterol 27-Hydroxylase: Evidence for a Role of this Enzyme in Elimination of Cholesterol from Human Macrophages. *PNAS* 1994;91(18):8592-6.
135. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J Biochem Physiol* 1959;37(8):911-7.
136. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226(1):497-509.
137. Petruzzelli M, Groen AK, van Erpecum KJ, Vrins C, van der Velde AE, Portincasa P et al. Micellar lipid composition profoundly affects LXR-dependent cholesterol transport across CaCo2 cells. *FEBS Letters* 2009;583(8):1274-80.

138. Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2007;1768(6):1311-24.
139. Segev H, Honigman A, Rosen H, Leitersdorf E. Transcriptional regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) and promoter mapping. *Atherosclerosis* 2001;156(2):339-47.
140. Temel RE, Hou L, Rudel LL, Shelness GS. ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J.Lipid Res.* 2007;48(7):1618-27.
141. Dove DE, Su YR, Zhang W, Jerome WG, Swift LL, Linton MF et al. ACAT1 Deficiency Disrupts Cholesterol Efflux and Alters Cellular Morphology in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):128-34.
142. Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. Polyunsaturated fatty acids decrease the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 in CaCo-2 cells: effect on fatty acid synthesis and triacylglycerol transport. *Biochem J* 2002;368(Pt 3):855-64.
143. Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ. LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2002;43(7):1054-64.
144. Traber MG, Kayden HJ, Rindler MJ. Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. *J.Lipid Res.* 1987;28(11):1350-63.
145. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur.Heart J* 1997;18(12):1231-48.
146. Brown JM, Yu L. Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunol.Endocr.Metab Agents Med Chem.* 2009;9(1):18-29.
147. Brown JM, Rudel LL, Yu L. NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1) mediates sterol-specific unidirectional transport of non-esterified cholesterol in McArdle-RH7777 hepatoma cells. *Biochem J* 2007;406(2):273-83.

148. Sane AT, Sinnett D, Delvin E, Bendayan M, Marcil V, Menard D et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J.Lipid Res.* 2006;47(10):2112-20.
149. Jesch ED, Seo JM, Carr TP, Lee JY. Sitosterol reduces messenger RNA and protein expression levels of Niemann-Pick C1-like 1 in FHs 74 Int cells. *Nutrition Research* 2009;29(12):859-66.
150. Tsuzuki W. Absorption properties of micellar lipid metabolites into Caco2 cells. *Lipids* 2007;42(7):613-9.
151. Cantafora A, Blotta I, Rivabene R, Pisciotta L, Bertolini S. Evaluation of RNA messengers involved in lipid trafficking of human intestinal cells by reverse-transcription polymerase chain reaction with competimer technology and microchip electrophoresis. *Electrophoresis* 2003;24(21):3748-54.
152. Kramer W, Girbig F, Corsiero D, Pfenninger A, Frick W, Jahne G et al. Aminopeptidase N (CD13) is a molecular target of the cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in the enterocyte brush border membrane. *J Biol Chem* 2005;280(2):1306-20.
153. Sigma Aldrich. Product Information (2-Hydroxypropyl)-®-cyclodextrin solution. 2010. Ref Type: Catalog
154. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 1997;38(11):2264-72.
155. Takahashi K, Kimura Y, Kioka N, Matsuo M, Ueda K. Purification and ATPase Activity of Human ABCA1. *J.Biol.Chem.* 2006;281(16):10760-8.
156. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulennin S, Hidaka H et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat.Genet.* 2001;27(1):79-83.
157. Lutjohann D, Bjorkhem I, Beil UF, von Bergmann K. Sterol absorption and sterol balance in phytosterolemia evaluated by deuterium-labeled sterols: effect of sitostanol treatment. *J Lipid Res* 1995;36(8):1763-73.
158. Turley SD, Dietschy JM. Sterol absorption by the small intestine. *Curr.Opin.Lipidol.* 2003;14(3):233-40.

159. Song C, Liao S. Cholestenoic Acid Is a Naturally Occurring Ligand for Liver X Receptor alpha. *Endocrinology* 2000;141(11):4180-4.
160. Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusi U. Determination of Cholesterol Oxidation Products in Human Plasma by Isotope Dilution-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry* 1995;225(1):73-80.
161. Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint BL, Furtos I, Ruhl R et al. Transcriptional Regulation of Human CYP27 Integrates Retinoid, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, and Liver X Receptor Signaling in Macrophages. *Mol.Cell.Biol.* 2004;24(18):8154-66.
162. Babiker A, Andersson O, Lindblom D, van der Linden J, Wiklund B, Lutjohann D et al. Elimination of cholesterol as cholestenoic acid in human lung by sterol 27-hydroxylase: evidence that most of this steroid in the circulation is of pulmonary origin. *J.Lipid Res.* 1999;40(8):1417-25.
163. Babiker A, Diczfalusi U. Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation. *Biochim Biophys Acta* 1998;1392(2-3):333-9.
164. Lund E, Andersson O, Zhang J, Babiker A, Ahlborg G, Diczfalusi U et al. Importance of a Novel Oxidative Mechanism for Elimination of Intracellular Cholesterol in Humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(2):208-12.
165. Soccio RE, Breslow JL. Intracellular Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(7):1150-60.
166. Pandak WM, Ren S, Marques D, Hall E, Redford K, Mallonee D et al. Transport of Cholesterol into Mitochondria Is Rate-limiting for Bile Acid Synthesis via the Alternative Pathway in Primary Rat Hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 2002;277(50):48158-64.
167. Miller WL. StAR Search--What We Know about How the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Mediates Mitochondrial Cholesterol Import. *Mol Endocrinol* 2007;21(3):589-601.
168. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2007;1771(6):663-76.

169. Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF, III. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem* 1998;41):-8.
170. Rodriguez-Agudo D, Ren S, Hylemon PB, Redford K, Natarajan R, Del Castillo A et al. Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein. *J.Lipid Res.* 2005;46(8):1615-23.
171. Rodriguez-Agudo D, Ren S, Wong E, Marques D, Redford K, Gil G et al. Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesterol ester formation. *J.Lipid Res.* 2008;49(7):1409-19.
172. Petrack B, Latario BJ. Synthesis of 27-hydroxycholesterol in rat liver mitochondria: HPLC assay and marked activation by exogenous cholesterol. *J.Lipid Res.* 1993;34(4):643-9.
173. Gueguen Y, Ferrari L, Souidi M, Batt AM, Lutton C, Siest G et al. Compared effect of immunosuppressive drugs cyclosporine A and rapamycin on cholesterol homeostasis key enzymes CYP27A1 and HMG-CoA reductase. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100(6):392-7.
174. Pikuleva IA, Bjorkhem I, Waterman MR. Expression, Purification, and Enzymatic Properties of Recombinant Human Cytochrome P450c27 (CYP27). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997;343(1):123-30.
175. Aringer L, Eneroth P, Nordstrom L. Side chain hydroxylation of cholesterol, campesterol and beta- sitosterol in rat liver mitochondria. *J.Lipid Res.* 1976;17(3):263-72.
176. Li X, Pandak WM, Erickson SK, Ma Y, Yin L, Hylemon P et al. Biosynthesis of regulatory oxysterol, 5-cholest-3beta , 25-diol 3-sulfate, in hepatocytes. *J.Lipid Res.* 2007;45(2):301-7
177. Nguyen LB, Shefer S, Salen G, Tint SG, Batta AK. Competitive inhibition of hepatic sterol 27-hydroxylase by sitosterol: decreased activity in sitosterolemia. *Proc.Assoc.Am Physicians* 1998;110(1):32-9.
178. Boberg KM, Bjorkhem I, Skrede S. Normal activity of C27-steroid 26-hydroxylase in cultured sitosterolemia fibroblasts. *Scand J Clin Lab Invest* 1987;47(7):701-4.

179. Javitt NB. Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292(5):1147-53.
180. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 2009;203(1):18-31.
181. Yang C, Yu L, Li W, Xu F, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J Clin Invest* 2004;114(6):813-22.
182. Sabeva NS, McPhaul CM, Li X, Cory TJ, Feola DJ, Graf GA. Phytosterols differentially influence ABC transporter expression, cholesterol efflux and inflammatory cytokine secretion in macrophage foam cells. *J Nutr Biochem* 2011;22(8):777-83.
183. Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F et al. Sterol Intermediates from Cholesterol Biosynthetic Pathway as Liver X Receptor Ligands. *J.Biol.Chem.* 2006;281(38):27816-26.
184. Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, Norstrom C, Stefansson K, Hallen D et al. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRAalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J* 2003;22(18):4625-33.
185. Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab* 2007;5(1):73-9.
186. Llaverias G, Lacasa D, Vazquez-Carrera M, Sanchez RM, Laguna JC, Alegret M. Cholesterol regulation of genes involved in sterol trafficking in human THP-1 macrophages. *Mol Cell Biochem* 2005;273(1-2):185-91.
187. Quinn CM, Jessup W, Wong J, Kritharides L, Brown AJ. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. *Biochem J* 2005;385(Pt 3):823-30.
188. Li T, Chen W, Chiang JYL. PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine. *J.Lipid Res.* 2007;48(2):373-84.
189. Jia X, Ebine N, Demonty I, Wang Y, Beech R, Muise V et al. Hypocholesterolaemic effects of plant sterol analogues are independent of ABCG5 and ABCG8 transporter expressions in hamsters. *Br.J Nutr* 2007;98(3):550-5.

190. Tachibana S, Hirano M, Hirata T, Matsuo M, Ikeda I, Ueda K et al. Cholesterol and plant sterol efflux from cultured intestinal epithelial cells is mediated by ATP-binding cassette transporters. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71(8):1886-95.
191. Plat J, Mensink RP. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J* 2002;16(10):1248-53.
192. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC et al. ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion. *J.Biol.Chem.* 2003;278(48):48275-82.
193. Field FJ, Born E, Mathur SN. Stanol esters decrease plasma cholesterol independently of intestinal ABC sterol transporters and Niemann-Pick C1-like 1 protein gene expression. *J Lipid Res* 2004;45(12):2252-9.
194. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Ribas V, Navarro-Sastre A, Garces-Garces J, Blanco-Vaca F. Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet. *Atherosclerosis* 2005;181(1):75-85.
195. Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. Are LXR-regulated genes a major molecular target of plant sterols/stanols? *Atherosclerosis* 2007;195(1):210-1
196. Chang TY, Li BL, Chang CCY, Urano Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297(1):E1-E9.
197. Parini P, Davis M, Lada AT, Erickson SK, Wright TL, Gustafsson U et al. ACAT2 Is Localized to Hepatocytes and Is the Major Cholesterol-Esterifying Enzyme in Human Liver. *Circulation* 2004;110(14):2017-23.
198. Sakashita N, Miyazaki A, Chang CC, Chang TY, Kiyota E, Satoh M et al. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) is induced in monocyte-derived macrophages: in vivo and in vitro studies. *Lab Invest* 2003;83(11):1569-81.
199. Field FJ, Mathur SN.  $\beta$ -Sitosterol: esterification by intestinal acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) and its effect on cholesterol esterification. *J.Lipid Res.* 1983;24(4):409-17.
200. Ho SS, Pal S. Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. *Atherosclerosis* 2005;182(1):29-36.

201. Liu J, Chang CC, Westover EJ, Covey DF, Chang TY. Investigating the allosterism of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) by using various sterols: in vitro and intact cell studies. *Biochem J* 2005;391(Pt 2):389-97.
202. Chang CCY, Sakashita N, Ornvold K, Lee O, Chang ET, Dong R et al. Immunological Quantitation and Localization of ACAT-1 and ACAT-2 in Human Liver and Small Intestine. *J.Biol.Chem.* 2000;275(36):28083-92.
203. Song BL, Wang CH, Yao XM, Yang L, Zhang WJ, Wang ZZ et al. Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 gene expression in intestinal Caco-2 cells and in hepatocellular carcinoma. *Biochem J* 2006;394(Pt 3):617-26.
204. Smith JL, Rangaraj K, Simpson R, Maclean DJ, Nathanson LK, Stuart KA et al. Quantitative analysis of the expression of ACAT genes in human tissues by real-time PCR2. *J.Lipid Res.* 2004;45(4):686-96.
205. Temel RE, Gebre AK, Parks JS, Rudel LL. Compared with Acyl-CoA:Cholesterol O-Acyltransferase (ACAT) 1 and Lecithin:Cholesterol Acyltransferase, ACAT2 Displays the Greatest Capacity to Differentiate Cholesterol from Sitosterol. *J.Biol.Chem.* 2003;278(48):47594-601.
206. von Bergmann K, Sudhop T, Lutjohann D. Cholesterol and Plant Sterol Absorption: Recent Insights. *The American Journal of Cardiology* 2005;96(1, Supplement 1):10-4.
207. Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Gylling H, Erkkila AT, Uusitupa MI. Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarines in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr* 2000;54(9):715-25.
208. Weststrate JA, Meijer GW. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1998;52(5):334-43.
209. Hovenkamp E, Lourbacos A, Duchateau GS, Tareilus EW, Trautwein EA. Preferential Efflux of Phytosterols over Cholesterol from Macrophages. *Lipids* 2007;42(12):1125-32
210. Bao L, Li Y, Deng SX, Landry D, Tabas I. Sitosterol-containing Lipoproteins Trigger Free Sterol-induced Caspase-independent Death in ACAT-competent Macrophages. *J.Biol.Chem.* 2006;281(44):33635-49.

211. Ross R. Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
212. Oliver M.F., Davies M.J. Hypothesis - The atheromatous lipid core. *European Heart Journal* 1998;19(1):16-8.
213. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest* 2002;110(7):905-11.

## Publikationsliste

### Veröffentlichungen

Brauner R, Johannes C, Ploessl F, Bracher F, Lorenz RL. Phytosterols Reduce Cholesterol Absorption by Inhibition of 27-Hydroxycholesterol Generation, Liver X Receptor alpha Activation and Expression of the Basolateral Sterol Exporter ATP Binding Cassette A1 in Caco-2 Enterocytes. *J Nutr* 2012 142(6):1-9

Brauner R, Pudel V. Kommentar "The role of low-fat diets in body weight control: a meta-analysis of ad libitum dietary intervention studies". *dge-info*, 07/2001

### Poster

Brauner R, Johannes C, Lorenz RL: „Evidence for an intracellular mechanism contributing to cholesterol lowering activity of phytosterols”, *Nutrition* 2009: 8. Dreiländertagung der AKE, DGEM und der GESKES, Zürich, Schweiz; 4.-6. Juni 2009. *Aktuelle Ernährungsmedizin* 34, 2009

### Vorträge

Brauner R, Johannes C, Lorenz, RL. Localizing the mechanism of phytosterol cholesterol interaction. IV. Symposium des DFG-Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“, Herrsching, Deutschland, 10.-11. November 2007

Brauner R, Lorenz, RL. Intrazelluläre Wirkmechanismen als Beitrag zur cholesterolsenkenden Eigenschaft der Phytosterole. Seminar „Biochemische Grundlagen der Arteriosklerose“ (Ergänzungsveranstaltung „MeCuM und MeCuM LMU“ im WS 06/07 und WS 07/08 des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, LMU München)

Brauner R, Lorenz, RL. Possible intracellular effects of phytosterols and oxyphytosterols on LX $\alpha$ -mediated cholesterol handling. Progress-Reports des DFG-Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ München, Deutschland, 09/2007, 12/2008

Johannes C, Brauner R, Rubic T, Hrusovar N, Lorenz, RL. Enterozytäre Phytosterol-Absorption, Phytosterol-Oxidation, aktivierte Signalwege und metabolische Effekte. Workshop DFG-Verbundprojekt: Lipide und Phytosterole in der Ernährung, Karlsruhe, 1.-2. Oktober 2007

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard L. Lorenz für die interessante Themenstellung an der Schnittstelle zwischen kardiovaskulärer und ernährungswissenschaftlicher Forschung und für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit. Danke auch für zahlreiche „fachfremde“ Diskussionen. Es war toll, von Ihrem breiten Wissen profitieren zu können...ich denke wir haben vielen Themenfelder abgegrast, Politik, Fußball, Finanzkrise, etc. Vor allem aber: Danke, dass Sie immer an mich geglaubt haben.

Herrn Prof. Dr. Peter C. Weber danke ich für die Aufnahme in sein Institut, sein Interesse an meiner Arbeit und die finanzielle Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Christian Weber danke ich für die Aufnahme in sein Institut in der Endphase der Doktorarbeit.

Für die Aufnahme in das Graduierten-Kolleg GRK438 und die Gewährung eines Promotionsstipendiums möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Siess bedanken. Ebenso für die gute Zusammenarbeit innerhalb des GRKs, angenehme Diskussionen und seine freundliche Art.

Dr. Christian Johannes danke ich ganz besonders für die Unterstützung bei der GC/MS-Analytik, unzählige wissenschaftliche Diskussionen, seine ruhige Art und für die Freundschaft auch über Institutsgrenzen hinaus.

Gabriele Berberich danke ich für die unermüdliche Unterstützung, besonders bei der lipidchemischen Analytik, ihr Interesse an meinem Forschungsthema und ihre aufmunternden Worte, wenn es mal nicht so lief.

Bei Brigitte Zimmer und Diana Wagner bedanke ich mich für ihre hervorragende technische Unterstützung und ihre Geduld. Ich weiß, dass es in der „Übergangszeit“ im Institut nicht immer leicht war.

Dr. Antje Behring danke ich für die Freundschaft, ihr Interesse an meinem Forschungsthema und besonders für diese ansteckend positive Art.

Dr. Florian Plössl danke ich für die Unterstützung bei der GC/MS-Analyse und wertvolle Tipps zur Analytik.

Bei den medizinischen Doktoranden bzw. Diplomanden Pavel Mitev, Johannes Koch und Denis Zukic möchte ich mich für ihr Interesse am Thema der Phytosterole und für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ich möchte mich auch bei Frau Eva Bretzke bedanken, die in allen administrativen Fragen hilfreich zur Seite stand.

Allen GRK438-Kollegiaten danke ich für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Graduiertenkollegs.

Den Kolleginnen und Kollegen Anna Khandoga, Dhamendra Pandey, Pankaj Goyal, Ariane Rode, Sabine Rode, Natalie Hrusovar, Vanessa van Vliet, Susanne Cornfine, Barbara Böhlig, PD Dr. Stefan Linder, PD Dr. Wolfgang Erl, Dr. Vera Krump-Konvalinkova möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an dich, Ana. Muchas gracias de aguantar estos largos años del doctorado. Sin tu apoyo y tu amor no hubiera sido posible finalizar este proyecto. Gracias! Ahora viene una nueva época de la vida!

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder Tobias bedanken. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und mir die Möglichkeit gegeben habt, bis hierher zu kommen!

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt habe und mich außer der angegebenen Hilfsmittel keiner weiteren bedient habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Bisher habe ich noch an keiner Doktorprüfung teilgenommen. Die hier vorgelegte Dissertation wurde bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, den 21. Januar 2013

Reinhard Brauner