

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
LABORATORIUMSMEDIZIN
UND KLINISCHE CHEMIE
DIREKTOR: PROFESSOR DR. SCHMITZ
MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG**



**MECHANISMEN DER GENINDUKTION VON LIPID- UND
CHOLESTERINSTOFFWECHSELGENEN DURCH VITAMIN A-METABOLITEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Susanne Elisabeth Heiduczek
2008

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
LABORATORIUMSMEDIZIN
UND KLINISCHE CHEMIE
DIREKTOR: PROFESSOR DR. SCHMITZ
MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT REGENSBURG**



**MECHANISMEN DER GENINDUKTION VON LIPID- UND
CHOLESTERINSTOFFWECHSELGENEN DURCH VITAMIN A-METABOLITEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Susanne Elisabeth Heiduczek
2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	PD Dr. Thomas Langmann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Schäffler
Tag der mündlichen Prüfung:	19.02.2009

Die vorliegende Dissertation entstand in der Zeit von April 2004 bis August 2008 in der Abteilung für klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht in:

Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, vol.1740, p.155 – 161

Widmung

Meinen Eltern, Geschwistern und meinem Martin

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.“
Justus von Liebig (1803 – 1873), chemische Briefe

„Es ist nicht das Wissen, sondern das Lernen, nicht das Besitzen, sondern das Erwerben, nicht das Dasein, sondern das Hinkommen, was den größten Genuß gewährt.“

Carl Friedrich Gauß (1777 – 1855), Schreiben von Gauss an F. Bolyai

Mechanismen der Geninduktion von Lipid- und Cholesterinstoffwechselgenen durch Vitamin A-Metaboliten

Inhaltsangabe

1	Einleitung.....	3
1.1	Arterioskleroseentstehung.....	3
1.2	Die ABC-Transporter A1, G1 und G4 und ihre Funktion im Lipidstoffwechsel.....	5
1.3	Aufgaben von Retinoiden im Körper.....	9
1.4	Regelkreise des Fett- und Cholesterinstoffwechsels.....	11
2	Zielsetzung.....	13
2.1	Zellmodell zur Untersuchung der Hochregulation von Lipidstoffwechselgenen durch Retinoide.....	13
2.2	Untersuchung der Expression von ABCG1-Isoformen in THP-1 Zellen, in in vitro differenzierten Makrophagen und in HepG2 Zellen.....	14
2.3	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Lokalisierung des Retinsäureresponsive-Elementes im ABCG1-Gen.....	14
2.4	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Lokalisierung des Retinsäureresponsive-Elementes im CYP27A1-Gen.....	15
3	Material und Methoden.....	16
3.1	THP-1 Zellstimulationsreihe.....	16
3.1.1	THP-1 Zellkultur.....	16
3.1.2	THP-1 Zellstimulation.....	17
3.1.3	RNA-Isolierung aus THP-1 Zellen.....	18
3.1.4	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	19
3.1.5	Qualitätsbestimmung der RNA.....	21
3.1.6	Reverse Transcription.....	22
3.1.7	Realtime PCR.....	22
3.2	Stimulation der in vitro differenzierten menschlichen Makrophagen.....	23
3.3	Realtime PCR der ABCG1 Isoformen in HepG2 Zellen.....	24
3.4	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive Elementes im ABCG1-Gen.....	24
3.4.1	Versuchsaufbau.....	25
3.4.2	Zellkultur und Allgemeines.....	25
3.4.3	Zelltransfektion.....	26
3.4.4	Zellstimulation.....	27
3.4.5	Ernten.....	27
3.4.6	β -Galbestimmung.....	27
3.4.7	Proteinbestimmung.....	28
3.4.8	Luziferaseassay.....	29
3.5	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäureresponsive-Elementes im CYP27A1-Gen.....	29

Inhaltsangabe

4	Ergebnisse.....	31
4.1	Auswirkungen von Retinoiden auf den Cholesterinstoffwechsel von THP-1 Zellen	31
4.1.1	Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Genexpression von ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α	32
4.1.2	Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Genexpression von ABCG1-Isoformen.....	33
4.1.3	Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Genexpression der Gene ABCA1, ABCG1-Isoformen, CYP27A1 und LXR α	34
4.1.4	Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide mit und ohne TNF α und Messung der Gene ABCA1, ABCG1, ABCG1-Isoformen, CYP27A1, ABCG4 und LXR α	35
4.2	Untersuchung der Expression der ABCG1-Isoformen in in vitro differenzierten menschlichen Makrophagen und in HepG2 Zellen	38
4.3	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elementes im ABCG1-Gen.....	41
4.4	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elementes im CYP27A1-Gen	44
5	Diskussion	46
5.1	Forschungsstand des Zusammenspiels von ABC-Transportern, Retinoiden und Lipiden in Makrophagen	46
5.2	Retinoidstimulation von THP-1 Zellen zur Untersuchung der Hochregulierung von Lipidstoffwechselgenen	47
5.3	Untersuchung der Expression der ABCG1-Hauptisoformen in THP-1 Zellen, in vitro differenzierten Makrophagen und HepG2 Zellen	52
5.4	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elements im ABCG1-Gen.....	54
5.5	Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elements im CYP27A1-Gen	55
6	Zusammenfassung	58
7	Literaturangabe.....	60
8	Anhang	76
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	76
8.2	Eigenständigkeitserklärung.....	78
8.3	Danksagung	79
8.4	Curriculum vitae.....	80

1 Einleitung

1.1 Arterioskleroseentstehung

Jährlich versterben in der Bundesrepublik Deutschland nach Angaben des Statistischen Bundesamtes etwa 300 000 Menschen an den Folgen von Herz-Kreislaufkrankungen. Davon erlagen 55 % der Männer und 45 % der Frauen einem Herzinfarkt. Zu den Herz-Kreislaufkrankungen zählt auch die Koronare Herzkrankheit (KHK). Männer erkranken mit einer Lebenszeitprävalenz von 30 % etwa doppelt so häufig wie Frauen an einer KHK, aber mittlerweile häuft sich auch bei Frauen jenseits der Menopause dieses Erkrankungsbild.

Die KHK ist noch nicht bis ins letzte Detail erforscht, aber es wurden viele Erkenntnisse über ihre Entstehung und Ursache gewonnen. In der Framinghamstudie (Wilson et al. 1998) und der PROCAM-Studie (Assmann et al. 2002) zum Beispiel deckte man wichtige Risikofaktoren der KHK auf. Dazu gehören Rauchen, zunehmendes Alter, Hypertonie und kardiovaskuläre Insulte in der Familienanamnese. Laut PROCAM steigt das Infarktrisiko mit steigendem LDL-Spiegel und die Framinghamstudie lieferte ähnliche Ergebnisse.

Die Pathogenese der KHK ist eng mit dem Vorhandensein einer Arteriosklerose verbunden. Nach derzeitigem Wissensstand gibt es einen Zusammenhang zwischen Cholesterin- und Lipidüberschuss im Blut, und einige lipid- und cholesterinsenkende Medikamente wie Statine und Fibrate haben bereits ihren therapeutischen Nutzen bewiesen (LaRosa et al. 1999; Shek et al. 2001; Vaughan et al. 1996).

Die Entstehung der Arteriosklerose ist ein komplexer Vorgang, und nach der „Response to Injury“-Hypothese von Russel Ross (1929-1999) löst ein Endotheldefekt in der Arterienintima einen inflammatorischen Prozess im Inneren des Gefäßes wie bei einer Entzündungsreaktion aus (Ross et al. 1999). Nach Aktivierung von Endothelzellen werden auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle exprimiert, die Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten an der Zellwand anhaften lassen. Durch Zytokine und Chemokine angelockt kommen weitere Monozyten, um in die Intima einzudringen. Dort differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen und produzieren ihrerseits chemotaktische Stoffe. Durch eine lokale Verletzung der Gefäßwand wird laut Ross die Proliferation glatter Muskelzellen angeregt, die zu einer starken Schwellung der Intima eines Gefäßes führt (ebenda).

Einleitung

Der von Ross identifizierte „platelet derived growth factor“, ein von Thrombozyten abgegebener Wachstumsfaktor (Ross et al. 1995), stimuliert die übermäßige Proliferation glatter Muskelzellen, die zusammen mit Fibroblasten, extrazellulärer Matrix, Makrophagen und Lymphozyten arteriosklerotische Plaques bilden. Wenn die Plaques aufreißen, kann dies zur Aktivierung zahlreicher Thrombozyten führen, und durch Thrombusbildung kann es zum kompletten Gefäßverschluß kommen (ebenda). Makrophagen spielen eine tragende Rolle bei der Arterioskleroseentstehung. Bei einem Überschuß an Cholesterin im Serum werden diese von Makrophagen über Scavenger-Rezeptoren („Müllschlucker“-Rezeptoren) aufgenommen (Yamada et al. 1998). Menschliche Makrophagen und Mausmakrophagen exprimieren Zelloberflächenrezeptoren, die LDL binden und aufnehmen (ebenda). Dies führt zur unkontrollierten Aufnahme mit Bildung von intrazellulären Cholesterinanhäufungen, die dem Makrophagen ein schaumiges Aussehen geben (Brown et al. 1983). Bei der Entstehung der Arteriosklerose spielen Schaumzellen vermutlich eine bedeutsame Rolle, da sie in frühen und fortgeschrittenen Stadien von arteriosklerotischen Läsionen entdeckt wurden (Gerrity et al. 1981).

Die überschüssigen Lipide im Blut stammen aus der Nahrung, werden in das Blut aufgenommen und sammeln sich im Extrazellularraum an. Verkürzt dargestellt werden Triglyzeride und Cholesterin von Low Density Lipoprotein (LDL) in die Peripherie des Blutkreislaufes und von dessen Gegenspieler High Density Lipoprotein (HDL) im Rahmen des Reversen Cholesterintransportes wieder zurück zur Leber und anderen Cholesterin verwertenden Organen transportiert, um dort als Grundlage für die Gallensäurebiosynthese oder zur Bildung von Steroidhormonen und Vitamin D zu dienen (Fielding et Fielding 1997).

Je mehr Cholesterin in Form des oxidierten LDL im Blut vorhanden ist und je weniger durch HDL zur Leber zurücktransportiert wird, desto mehr Cholesterin wird von Monozyten aufgenommen. Daher streben die neuesten Therapierichtlinien zur Behandlung der Koronaren Herzerkrankung eine Senkung des LDL Cholesterins auf unter 100 mg/dl an (Smith et al. 2001).

1.2 Die ABC-Transporter A1, G1 und G4 und ihre Funktion im Lipidstoffwechsel

Da Makrophagen Adenosin-Triphosphat-binding cassette Transporter (ABC-Transporter) auf ihrer Oberfläche exprimieren und diese, wie zahlreiche Forschungsergebnisse gezeigt haben, in den Lipidstoffwechsel involviert sind, hängen auch die ABC-Transporter eng mit dem Arteriosklerosegeschehen zusammen.

Die ABC-Transporter ABCA1, ABCG1 und ABCG4 spielen in dieser Dissertation eine wichtige Rolle, daher wird ihre Funktion nachfolgend näher erläutert.

ABC-Transporter sind eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Proteinfamilie, deren namensgebende „ATP-binding cassette“ oder Nukleotidbindungsdomäne sich im Laufe der Evolution kaum verändert hat und sich deshalb bei Pro- und Eukaryonten auf DNA-Ebene kaum unterscheidet (Higgins et al. 1992).

Der Prototyp eines Fullsize ABC-Transporters ist der ABCA1 Transporter, der am Genort 9q31 lokalisiert ist (Luciani et al. 1994; Rust et al. 1998). Der Fullsize-Transporter besteht aus zwei Nukleotidbindungsdomänen mit Walker A und B „motif“ (Walker et al. 1982) und zwei Transmembrandomänen (TMDs), wobei jede der TMDs aus sechs membranumwundenen Helices aufgebaut ist (Higgins et al. 1992; Luciani et al. 1994). Die TMDs bestimmen, welche Moleküle transportiert werden, und die Energie dazu wird an der Nukleotidbindungsstelle mit ATP bereitgestellt (Dean et al. 2001).

Bei einer Länge von 6603 bp und 2201 Aminosäuren (Klein et al. 1999) wiegt der ABCA1-Transporter 220 kDa (Langmann et al. 1999). Diese Erkenntnisse wurden durch Klonierung der gesamten cDNA des ABCA1-Gens gewonnen (ebenda). ABC-Transporter benötigen zum transmembranen Transport die Hydrolyse von ATP an ihren zwei Nukleotidbindungsstellen (Klein et al. 1999). Wenn ATP fehlt, führt dieser Mangel zum programmierten Zelltod, und auf dem Weg dorthin werden bestimmte Mechanismen, die weniger wichtig für die Zelle sind, bei Energiemangel abgestellt (Buttgereit et al. 2000). ABC-Transporter gehören jedoch zu den stärksten Energiekonsumenten in einer Zelle (Nagel et al. 1999).

ABC-Transporter kommen in Zellen in Plasmamembranen, Peroxisomen, dem Golgi Apparat, im Endoplasmatischen Retikulum und in intrazellulären Sekretionsvesikeln vor (Schmitz et al. 2000; Orso et al. 2000). Außerdem bilden ABC-Transporter Multifunktionskomplexe (Ammala et al. 1996; Weixel et al. 2000) und übertragen ihre

Einleitung

Substanzen über Lipiddoppelschichten (Broccardo et al. 1999). Von ABC-Transportern werden unter anderem Ionen, Aminosäuren, Peptide, Zucker, Vitamine und Steroidhormone transportiert (Higgins et al. 1992).

Es wurde bereits nachgewiesen, in welchem Körpergewebe das humane ABCA1-Gen (hABCA1-Gen) exprimiert wird und dass die hABCA1 Expression durch Sterole in Zellen reguliert wird (Langmann et al. 1999). Das humane ABCA1-Gen ist das menschliche Ortholog zum Maus-ABC1-Gen (ebenda). In den Geweben von Plazenta, Lunge, Trachea, Nebennieren, Milz, Uterus, Prostata, Hoden und Thymus kommt das ABCA1-Gen vermehrt vor (Langmann et al. 2003). Die höchste Expression kommt in der Plazenta, der Leber, der Lunge, der Nebenniere und in fetalem Gewebe vor (Langmann et al. 1999). Die Arbeitsgruppe um Kielar fand übereinstimmend dazu heraus, dass die mRNA-Mengen von ABCA1 während der menschlichen Adipozyten- und Monozytenproliferation hochreguliert werden (Kielar et al. 2003) und dass die höchsten mRNA Mengen von ABCA1 in Makrophagen vorhanden sind, die zuvor mit E-LDL beladen wurden, gefolgt von hohen Expressionswerten in Leber, Lunge, Plazenta und Magen (Kielar et al. 2001). Die niedrigsten Expressionswerte von ABCA1 wurden in Pankreas und Herz gefunden (ebenda). Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um THP-1 Zellen, Monozyten und Fibroblasten (ebenda).

Daher sind ABC-Transporter in den zellulären Lipidtransport intensiv eingebunden, und wie die klassischen Transporter MDR1 und MDR2, die zur ABCB-Subfamilie zählen, befördern sie Phospholipide zwischen innerer und äußerer Plasmamembran (van Helvoort et al. 1996, Crawford et al. 1997).

ABCA1 ist darüber hinaus ein wichtiger Regulator des HDL-Stoffwechsels (Bodzioch et al. 1999, Brooks-Wilson et al. 1999, Rust et al. 1999), da es eine Schlüsselrolle bei der HDL-Cholesterinregulation im Plasma und bei der Wahrung des zellulären Cholesteringleichgewichtes einnimmt, welches bei Patienten mit der Tangier Erkrankung gestört ist (Orso et al. 2000).

Bei Tangier-Patienten zum Beispiel liegt ein Defekt im ABCA1-Gen vor, und der Transport von Lipiden vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran ist gestört (Orso et al. 2000). Möglicherweise bewegt sich ABCA1 zwischen Plasmamembran und Golgi als Bestandteil eines vesikulären Transportweges hin und her (ebenda). In dieser Veröffentlichung wird unter anderem auch beschrieben, dass ABCA1 in Makrophagen durch Cholesterinbeladung hochreguliert wird und als Cholesterin- und

Phospholipidexporter fungiert. Die familiäre HDL-Defizienz bzw. Tangier-Erkrankung oder Analpha-Lipoproteinämie wird autosomal rezessiv vererbt (Bodzioch et al. 1999, Brooks-Wilson et al. 1999, Rust et al. 1999), und die Apolipoprotein A₁-Synthese ist gestört. Ein Mangel an HDL-Cholesterin, eine Hypercholesterinämie und Cholesterinablagerungen in verschiedenen Organen, besonders im Monozyten-Makrophagensystem, treten auf. Diese Faktoren führen zum klinischen Bild einer Hepatosplenomegalie, peripheren Polyneuropathie und Muskelatrophie. ABCA1 spielt folglich eine tragende Rolle im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel, und im Hinblick auf die Ätiologie der Arteriosklerose und von Dyslipidämien ist es interessant, die Aufgaben dieses Genes auf zellulärer Ebene genauer zu untersuchen.

Zwei weitere, für den Lipidstoffwechsel genauer zu erforschende Gene, die in dieser Dissertation eine große Rolle spielen, stellen das ABCG1-Gen und das ABCG4-Gen dar, welche mit dem ABCA1-Gen phylogenetisch verwandt sind (Langmann et al. 2000). Die Aminosäuresequenzen von ABCG1 und ABCG4 stimmen zu 72 % überein (Annilo et al. 2001). Im Gegensatz zu ABCA1 handelt es sich bei ABCG1 und ABCG4 um Halfsize-Transporter. Nur in Verbindung können Halfsize-Transporter als aktive Transporter funktionieren. Halfsize-Transporter bestehen aus einer einzelnen Nukleotidbindungsdomäne (NBD) und einer Transmembrandomäne, die sich aus sechs membranumwindenden Helices zusammensetzt (Schmitz et al. 2001; Klein et al. 1999).

Die Genloki lauten bei ABCG1 21q22.3 (Bonne-Tamir et al. 1996) und bei ABCG4 11q23 (Engel et al. 2001). Das humane ABCG1-Gen wurde als erstes als Homolog des vorbekannten *Drosophila*-white-Genes beschrieben (Chen et al. 1996; Croop et al. 1997), deshalb trägt die ABCG-Familie nun den Namen „White Family“. Das gesamte Genom von Chromosom 21 wurde bereits entschlüsselt (Hattori et al. 2000). Der genomische Aufbau und die Promotorregion des ABCG1-Genes wurden untersucht von den Arbeitsgruppen um Langmann (Langmann et al. 2000) und Lorkowski (Lorkowski et al. 2001).

Bei einer Länge von mehr als 70 kb enthält das ABCG1-Gen 15 Exons, und an allen Exon-Intron Grenzen liegen GT/AG Sequenzen (Langmann et al. 2000). Der proximale Promotor ist ein untypischer Promotor ohne TATA-Boxen und enthält viele Bindungsstellen für Sp1 und ein Sterol-regulierendes Bindeprotein (ebenda). Beide Transporterformen ABCG1 und ABCG4 sind lipidsensitiv (Langmann et al. 2003).

Einleitung

Der ABCG1 Transporter, auch White genannt, kommt ubiquitär vor und transportiert Phospholipide und Cholesterin (Klucken et al. 2000).

ABCG1 kommt in Leber, Lunge, Milz, Plazenta, Trachea, Darm, Niere und im Knochenmark vor (Langmann et al. 2003) und ist zudem im Gehirn hochexprimiert (Croop et al. 1997; Klucken et al. 2000). Deshalb wird vermutet, dass ABCG1 eine mögliche Rolle bei der Entstehung genetischer neurologischer Erkrankungen spielen könnte (Langmann et al. 2003). Auch ABCG4 ist im ZNS hochexprimiert (Annilo et al. 2001) und dies höher als ABCG1 (Langmann et al. 2003). Des Weiteren kommt ABCG4 in Leber-, Lungen- und Nebennierengewebe vor und wird am höchsten in den Tonsillen und der Thymusdrüse exprimiert (ebenda).

Die White Familie vermittelt den ATP-abhängigen Transport einer Vielzahl amphiphiler und lipophiler Substrate (Higgins et al. 1992). Mit einer Untersuchung am menschlichen ABCG1-Gen enthüllten Klucken und Kollegen, dass das Gen zu den sterolabhängigen Genen gehört und bei der durch M-CSF vermittelten Differenzierung vom menschlichen Monozyten zum Makrophagen hochreguliert wird (Klucken et al. 2000). Zudem wurde gezeigt, dass ABCG1 eine Rolle beim Cholesterin- und Phospholipidtransport von Makrophagen spielt (ebenda). Das ABCG4-Gen soll seinerseits in den Cholesterintransport im Gehirn verwickelt sein (Annilo et al. 2001).

Eine Lipidbeladung von Makrophagen führt zur vermehrten mRNA Expression und zu erhöhten Proteinmengen des ABCG1-Gens, während HDL₃ zu einer Abnahme von beidem führt (Venkateswaran et al. 2000). Diese Mechanismen gleichen denen des ABCA1-Gens, das ebenfalls einen starken Einfluss auf den zellulären Cholesterinausstoß von Makrophagen hat und den Plasma HDL-Cholesterinspiegel reguliert (Langmann et al. 1999; Klucken et al. 2000).

Da es sich beim ABCG1-Gen um einen „Half size transporter“ handelt, muss das Gen, um einen funktionsfähigen aktiven Membrantransporter bilden zu können, ein Dimer bilden (Schmitz et al. 2001). Eine Studie von Langmann und Kollegen lieferte Hinweise darauf, dass ABCG1 mit sich selbst homodimerisieren und möglicherweise mit ABCG4, mit dem auf Genebene starke Homologien bestehen, heterodimerisieren könnte (Langmann et al. 2004; Cserepes et al. 2004).

Jedoch ist noch offen, mit welchen seiner ABCG1-Isoformen ABCG1 homodimerisiert und welche der Untereinheiten ähnliche Eigenschaften haben, zum

Beispiel welche ABCG1-Isoformen ebenso wie ABCG1 durch Retinoide hochreguliert werden, was eine der Fragestellungen der vorliegenden Dissertation ist.

1.3 Aufgaben von Retinoiden im Körper

Retinoide werden in dieser Dissertation zur Stimulation von Makrophagen verwendet, daher lohnt sich die genauere Betrachtung dieses Vitamins und seiner Eigenschaften. Retinoide weisen vielfältige Wirkmechanismen im Körper auf. Die Vorstufe des A Vitamins wird als Retinol, Retinylester oder β -Carotin im Dünndarm aufgenommen und in Zellen zu Retinsäure umgewandelt (Blomhoff et al. 1992). Als Speicherort der Retinylester dienen die Kupffer'schen Sternzellen in der Leber (ebenda).

In Form der verschiedenen Metaboliten 9-cis Retinsäure (9-cis RA) und All-trans Retinsäure (ATRA), das wegen der 100 bis 1000-fach höheren Potenz als aktiver Metabolit bezeichnet wird (Cullum et Zile 1985), sind die Retinoide zum Beispiel Cofaktoren für die Wirkung von Schilddrüsenhormonen und Vitamin D. Retinoidrezeptor-Proteine (RXR), an die die Retinoide binden, können mit sich selbst homodimerisieren und zum Beispiel mit dem Thyroid-Hormonrezeptor oder dem 1,25-Dihydroxy-D₃-Vitamin-Rezeptor heterodimerisieren (Yu et al. 1991).

Vitamin A und seine Metaboliten sind wichtig für die gesunde Entwicklung von Vertebraten (Clagett-Dame et De Luca 2002). Ein Mangel an β -Carotin, welcher im Serum nachweisbar ist, führt zum Beispiel zu Nachtblindheit, gestörter Dunkeladaption, Hyperkeratose, Infektanfälligkeit (Ross et Hämmerling 1994) und gestörtem Knochenwachstum (Underwood et al. 1984). Für die Sehfunktion des Auges ist Vitamin A von besonderer Bedeutung (Wald et al. 1934 und 1968; Palczewski et Saari, 1997). Zudem spielt das Vitamin eine Rolle bei der Spermatogenese, Oogenese, Embryogenese (Eskild et Hanson, 1994) und beim Wachstum und bei der Differenzierung von Epithel (Wolbach et Howe 1925, Fell et Mellanby 1953). Sowohl Vitamin A-Überschuss (Coberly et al.1996; Nau et al. 1993) als auch ein Mangel (Thompson et al. 1969; Wilson et al. 1953) führen zu Missbildungen während der Embryogenese. Bei einem Überangebot an Vitamin A kann es zum Beispiel zu ZNS-Missbildungen wie Spina Bifida und Exenzephalie kommen (Brockes et al. 1989; Kochhar et al. 1998; Nau et al. 1998; Shenefelt et al. 1972).

Einleitung

Retinoide binden an die Zellkernrezeptoren Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) und Retinsäurerezeptor (RAR = Retinod Acid Receptor), die beide aus drei Isoformen α , β und γ bestehen und eine Ligandenbindungsdomäne und eine DNA-Bindungsdomäne aufweisen. Dabei wird RAR durch ATRA und 9-cis RA aktiviert und RXR nur durch 9-cis RA (De Luca et al. 1991; Allenby et al. 1993; Levin et al. 1992; Heymann et al. 1992). Die Retinoidrezeptoren RAR und RXR bilden zusammen ein Heterodimer und wirken als Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte „Responsive Elemente“ (RARE = Retinoic acid response elements) an der Promotorregion von Zielgenen binden und so die Transkription eines Gens vermitteln (Clagett-Dame et De Luca 2002). Für die Transkription ist das Binden eines Liganden an RAR bzw. RXR notwendig (ebenda).

Retinoide werden in Form von ATRA (Tretinoin) oder 13-cis RA (Isotretinoin) (Blaner et Olson 1994) zur Behandlung von Tumoren, zum Beispiel der akuten promyelozytischen Leukämie (Huang et al. 1988) mit Remissionsraten von 84-87 %, eingesetzt. Allerdings entwickelt sich nach ATRA-Gabe bei vielen Patienten rasch eine Retinoidresistenz, und das Medikament hat nur eine Bioverfügbarkeit von etwa 50 % (Regazzi et al. 1997). Möglicherweise spielt bei der geringen Bioverfügbarkeit die Oxidierung durch Cytochrom P450-Enzyme wie CYP26A1 eine Rolle, wodurch ATRA inaktiviert wird (Ray et al. 1997). Durch Regelung der CYP26A1 Transkription durch ATRA wird die Oxidierung über einen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert (Loudig et al. 2000; Ray et al. 1997).

Als Nebenwirkung führen die Retinoide zu Hypertriglyceridämie, Transaminasenanstieg und zur Fettleber und senken meist auch den HDL-Spiegel (Costet et al. 2003). Wie diese Nebenwirkungen entstehen, ist noch weitgehend unbekannt.

Die Arbeitsgruppe um Costet und Kollegen wies nach, dass das ABCA1-Gen durch Retinsäure-Rezeptor vermittelte Induktion in Makrophagen hochreguliert wird (Costet et al. 2003). Dies wurde durch Promotorstudien mit Transfektion des menschlichen bzw. des murinen ABCA1-Gens in menschliche HEK293 Zellen bzw. in murine Peritonealmakrophagen mit ATRA Stimulation herausgefunden (ebenda). Zudem wurde der Cholesterinefflux aus den Makrophagen gemessen, der nach ATRA Stimulation angestiegen war (ebenda).

Diese und andere Forschungsergebnisse lieferten Anregungen, weiter in dieser Richtung zu forschen und die Auswirkung von Retinoiden auf menschliche und

murine Makrophagen und deren Expression von Lipid- und Cholesterinstoffwechselgenen zu untersuchen.

1.4 Regelkreise des Fett- und Cholesterinstoffwechsels

Cholesterin wird von Körperzellen zum einen über Plasmalipoproteine (Brown et Goldstein 1986) aufgenommen und zum anderen über die HMG-CoA-Reduktase synthetisiert (Bucher et al. 1960; Siperstein et al. 1966). Brown und Goldstein ermittelten den Mechanismus der zellulären, Rezeptor vermittelten Aufnahme von LDL-Partikeln und entdeckten, dass Defekte im LDL-Rezeptorgen für die Familiäre Hypercholesterinämie verantwortlich sind (Brown et Goldstein 1986). Sogenannte SREBP (sterol regulatory element binding proteins) vermitteln die Transkription der HMG-CoA-Reduktase und dem LDL-Rezeptor auf molekularer Ebene (Brown et Goldstein 1997). Ist die zelluläre Cholesterinkonzentration hoch, wird über Hemmung der SREBP die Transkription von HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptorendichte gesenkt (ebenda).

Im Jahre 1991 wurde die cDNA des menschlichen CYP27-Gens, das am Genlokus 2q33 liegt, zum ersten Mal geklont (Cali et Russell et al. 1991). Die Rolle des CYP27A1-Gens im Cholesterinstoffwechsel ist noch weitgehend ungeklärt. Bekannt ist, dass CYP27 für das Enzym Steroid-27-Monooxygenase kodiert, welches den ersten Schritt im alternativen Pfad (Russel et Setchell et al. 1992) der Gallensäurebiosynthese in Hepatozyten vollzieht. Die Gallensäuresynthese ist der wichtigste Weg, um Cholesterin wieder aus dem Körper auszuschleiden.

Axelson und Larsson vermuteten einen Zusammenhang zwischen dem Enzym Steroid-27-Monooxygenase und der Regulierung des zellulären Cholesterinstoffwechsels, weil ein Fehlen von 27-Hydroxycholesterin (27-OH-CH) und anderen Oxysterolen die Cholesterinbiosynthese unterbinden kann (Axelson et Larsson, 1996). Fehlt das Enzym, kann dies zu der seltenen autosomal erblichen Sterolspeicherkrankheit zerebrotendinöse Xanthomatose oder Bogaert-Scherer-Epstein-Krankheit führen, die durch Sehnen-Xanthome, juvenile Katarakte, neurologische Ausfälle, zum Beispiel spastische Lähmungen und Demenz, und einem frühen Auftreten von Arteriosklerose und Osteoporose gekennzeichnet ist (Björkhem et al. 1994).

Einleitung

Weitere Forschungsergebnisse erbrachten, dass die Aktivität der Steroid-27-Monooxygenase-Aktivität nach Zugabe von Cholesterin in das Zellkulturmedium von primären Rattenhepatozyten (Stravitz et al. 1996) zunahm. Die Arbeitsgruppe um Garuti stellte fest, dass weitere lipid- und sterolregulierende Mechanismen in die Expression des CYP27-Gens eingreifen (Garuti et al. 2002). Mit Klonierung von Promotorfragmenten des menschlichen CYP27-Gens in HepG2 Zellen wurde festgestellt, dass Sp1, Sp3 und der Hepatozyten Zellkernfaktor 4 (HNF4) die Expression dieses Gens beeinflussen (ebenda).

Cholesterin kann über die drei Wege einfache Diffusion, erleichterte Diffusion und über aktiven Transport wieder aus Zellen gelangen. Am aktiven Transport von Cholesterin aus den Zellen sind die ABC-Transporter maßgeblich beteiligt, und ihre Expression wird vom Liver-X-Rezeptor (LXR) und vom Retinoid-X-Rezeptor (RXR) geregelt; Retinoide und Oxysterole, die als Liganden dieser Transkriptionsfaktoren dienen, stimulieren die Expression von ABC-Transportern (Costet et al. 2000).

Nun stellt sich die Frage, ob die Gene ABCA1 und ABCG1 direkt durch die Retinoid-Rezeptoren RAR und RXR induziert werden oder ob es eine indirekte Aktivierung über LXR α und CYP27 gibt oder ob CYP27 den Signaltransduktionsweg über RAR/RXR reguliert. Im Rahmen dieser Dissertation wird unter anderem diese Frage gelöst.

2 Zielsetzung

2.1 Zellmodell zur Untersuchung der Hochregulation von Lipidstoffwechselgenen durch Retinoide

Ein Zellmodell ist bestens geeignet, um auf molekularbiologischer Ebene zelluläre Mechanismen zu untersuchen. Frei von den vielfältigen Einflüssen auf eine Zelle im lebenden Organismus kann man Zelltypen gezielt stimulieren und zum Beispiel die Genexpression von ABC-Transportern testen.

Im Anschluss an obige Forschungsergebnisse wurde die Hochregulation von Cholesterinstoffwechselgenen durch Retinoidstimulation bei der promyelozytischen Zelllinie THP-1 untersucht. Diese Zelllinie ist sehr gut für unsere Forschungszwecke geeignet, da es sich um menschliche Zellen und um eine Vorstufe von Monozyten handelt, und weil sich die THP-1 Zellen als Suspensionszellen leicht kultivieren und vermehren lassen.

Mit der ersten Stimulationsreihe sollte herausgefunden werden, ob die Gene ABCG1, ABCG1-Isoformen, ABCA1, ABCG4, CYP27-A1 und LXR α durch Retinoide hochreguliert werden. Die THP-1 Zellen wurden mit DMSO, β -Carotin, 9-cis RA und ATRA stimuliert, und anschließend wurde die Genexpression der oben aufgelisteten Gene gemessen. Die Hochregulation ist im Hinblick auf die Aufgabe der ABC-Transporter im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel interessant. Vermutet wurde, dass die Hochregulation bei der Stimulation mit ATRA stärker ausfallen würde als bei der Stimulation mit 9-cis Retinsäure, da es sich bei ATRA um den „aktiven“ Metaboliten handelt. Die schwächste Hochregulation sollte bei der Nullkontrolle auftreten.

In THP-1 Zellen wurde darüber hinaus noch die Wirkung einer Stimulation von 9-cis RA und Tumornekrosefaktor α (TNF α) bzw. ATRA und TNF α überprüft (siehe Tabelle 1).

Auf diese Weise sollte ein Einblick gewonnen werden, ob das Ausmaß der Expression von Cholesterinstoffwechselgenen abhängig vom proinflammatorischen Zustand eines Monozyten ist oder nicht.

THP-1 Zellen	Substanzen zur Zellstimulierung
1	Kontrolle
2	9-cis Retinsäure
3	9-cis Retinsäure mit TNF α
4	ATRA
5	ATRA mit TNF α
6	TNF α

Tabelle 1:
Versuchsaufbau des Zellmodells von THP-1 Zellen zur Untersuchung der Hochregulierung von Cholesterinstoffwechselgenen durch Retinoide und TNF α

2.2 Untersuchung der Expression von ABCG1-Isoformen in THP-1 Zellen, in *in vitro* differenzierten Makrophagen und in HepG2 Zellen

Herausgefunden werden sollte, welche der Hauptisoformen des ABCG1 Gens, nämlich ABCG157A-I_AbD, ABCG157B-E_AbD, ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD in THP-1 Zellen und bei *in vitro* differenzierten Makrophagen durch Retinoide hochreguliert werden. Bei THP-1 Zellen wurde die Hochregulierung der ABCG1-Isoformen auch im direkten Vergleich mit der Messung der ABCG1 Expression durchgeführt. Als Stimulantien wurden DMSO, β -Carotin, 9-cis RA und ATRA verwendet.

Bei den untersuchten HepG2 Zellen handelt es sich um menschliche Leberzellen, die auf ihre Expression von ABCG1-Isoformen ohne vorherige Stimulation mit Retinoiden untersucht wurden. Herausgefunden werden sollte, ob die ABCG1-Isoformen in HepG2 Zellen exprimiert werden und bei welcher Isoform die Expression am höchsten ist.

2.3 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Lokalisierung des Retinsäureresponsive-Elementes im ABCG1-Gen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, wo das Responsive Element für Retinsäuren im ABCG1-Gen in murinen Makrophagen liegt. Dazu wurden Reportergenkonstrukte zusammen mit Luziferase, β -Galaktosidase und einem nachweisbaren Protein in RAW264.7-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit Retinoiden stimuliert und die Induzierbarkeit der Genabschnitte durch die Retinoide 9-cis Retinsäure (9-cis RA) und All-trans Retinsäure (ATRA)

gemessen. Als Ausgangspunkt wurden vier Abschnitte des ABCG1-Gens genommen, die bei den Gensequenzen des Promotors -3000, -2000, -1000, -500 und -250 bp abwärts vom Startcodon (ATG) des ersten Exons des ABCG1-Gens lagen. In diesem Bereich wurde das Retinsäure-Responsive Element aufgrund früherer Forschungsergebnisse und Datenbankanalysen unserer Arbeitsgruppe (Langmann et al. 2000) vermutet.

Die RAW264.7 Zellreihe wurde verwendet, weil es sich dabei um Makrophagen handelt, die sich relativ gut transfizieren lassen, wie verschiedenste Forschungsergebnisse in der Vergangenheit gezeigt haben.

Als effektive Transfektionsmethode hat sich in unserer Arbeitsgruppe die Methode der Liposomenfusion etabliert (Felgner et al. 1987; Rose et al. 1991).

2.4 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Lokalisierung des Retinsäureresponsive-Elementes im CYP27A1-Gen

Das Ziel war es, die Lage des Retinsäure-Responsive Elementes im Promotor des CYP27A1-Gens in murinen Makrophagen einzugrenzen. Dazu wurden Reportergenkonstrukte zusammen mit Luziferase in RAW264.7 Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde ein β -Galaktosidase-Vektor in die Zellen transfiziert. Die murinen Makrophagen wurden anschließend mit Retinoiden stimuliert, um die Induzierbarkeit der Genabschnitte durch die Retinoide 9-cis Retinsäure (9-cis RA) und All-trans Retinsäure (ATRA) zu überprüfen. Drei Abschnitte des CYP27A1-Gens, die bei -1089, -512 und -191 abwärts des Startcodons (ATG) des ersten Exons des CYP27A1-Gens liegen, wurden aufgrund früherer Forschungsergebnisse (Garuti et al. 2002; Segev et al. 2001) und vorausgehender Datenbankanalysen ausgewählt.

3 Material und Methoden

3.1 THP-1 Zellstimulationsreihe

Für alle folgenden Versuche wurden, soweit nicht anders angegeben, sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur (Rt) und, wenn nötig, unter sterilen Bedingungen (Sterilbank HS 14, Heraeus, Hanau, Deutschland bzw. Sterilbank BSB/6A, Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland) oder unter dem Abzug durchgeführt. Die Zellen wurden in einem sterilen Brutschrank (Zellinkubator BB 6220, Heraeus instruments, Hanau, Deutschland) mit 9 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ inkubiert.

3.1.1 THP-1 Zellkultur

Die verwendeten THP-1 Zellen (FAB M3, Bestellnr.: DSM ACC16, DSMZ, Braunschweig, Deutschland), die auch Promyelozytenleukämiezellen genannt werden, stammen von Tumorzellen eines Menschen ab, der an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt war. Nach der FAB-Klassifikation werden diese Zellen als FAB M3 bezeichnet und sind nahezu unbegrenzt teilbar. Kultiviert wurden die THP-1 Zellen in sterilen 10 cm Zellkulturflaschen (Sarstedt, Newton, USA). Da die Zellen zu den Suspensionszellarten zählen, schwimmen sie frei im Medium, dies muss bei der Pflege und beim Ernten berücksichtigt werden.

Für die Kultivierung der Suspensionszellart THP-1 wurde das RPMI Medium (VLE RPMI 1640, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) unter Zugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FKS, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) und 1% MEM Medium (Dulbecco's MEM 0444A, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Der Mediumwechsel wurde zwei mal pro Woche durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die maximale Zellkonzentration von 1 Mio Zellen pro ml in der Zellkulturflasche nicht überschritten wurde, da es sonst zum Absterben von Zellen kommt. Dies wurde entweder durch Sichtkontrolle mit dem Mikroskop (Leitz Fluovert, Wetzlar, Deutschland) oder durch Auszählen mit dem Zellzähler (Sysmex Microcellcounter F-300, TOA Medical Electronics, Japan) vor jedem neuen Aussäen überprüft. Für den Mediumwechsel einer Zellkulturflasche wurde der Überstand abgesaugt, dadurch wurden auch Zellen mit entfernt, was gegen eine

überschießende Zellpopulation schützt. Anschließend wurde neues Medium dazugegeben, wobei das Gesamtvolumen 60 ml nicht überschreiten darf. Der Deckel der Zellkulturflaschen darf nicht vollständig zugeschraubt werden, da sonst der Gasaustausch nicht optimal gewährleistet ist und die Zellen absterben können.

Sollten die Zellen vermehrt werden oder waren in einer Flasche zu viele Zellen, wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium einer 10 ml Flasche geschüttelt und mit einer Pipette (NUNC, Roskilde, Dänemark) in ein Gefäß mit einem Füllungsvermögen von 10 ml gefüllt und 7 Min. bei 1200 U/Min. zentrifugiert. Nach Absaugen des überschüssigen Mediums wurden 5 ml frisches Medium zugegeben und die Zellen gleichmäßig suspendiert. 10 µl des Mediumzellgemisches wurden in einen Becher, der mit 5 ml PBS Puffer (Phosphate-buffered-Saline, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) gefüllt war, gegeben. Der Zellzähler ermittelte die Zellmenge, die in 10 µl Puffer enthalten war. Indem man die erhaltene Zahl mit 5000 multipliziert, kann man errechnen, wieviele Zellen man insgesamt in den 5 ml zur Verfügung hat, und man kann weiter berechnen, wieviele µl Zellsuspension man in eine Flasche pipettieren muß, um eine bestimmte Zellzahl auszusäen.

Pro Zellkulturflasche wurden eine halbe Mio. Zellen in 20 ml Medium für die weitere Kultivierung, beziehungsweise für die Stimulation 1 Mio. Zellen in 20 ml Medium suspendiert.

3.1.2 THP-1 Zellstimulation

Für den Stimulationsversuch wurde das Medium mit den Zellen in 50 ml Tubes überführt und 7 Min. bei 1200 U/Min. bei Rt zentrifugiert (Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland). Nach Absaugen des Mediums und nach Resuspension der Zellen mit 5 ml Medium wurden 10 µl Suspension entnommen, mit 5 ml PBS-Puffer (PBS, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) vermengt und mit dem Zellzähler ausgezählt.

Je 30 Millionen Zellen wurden auf sechs 10 cm Zellkulturflaschen mit 10 ml Medium ausgesät. In der ersten Versuchsreihe wurden die Zellen entweder mit 4 µl DMSO, 4 µl 9-cis-Retinsäure (9-cis RA) oder 4 µl All-trans-Retinsäure (ATRA) stimuliert.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden die Zellen mit 5 µM 9-cis RA, die zweite mit 5 µM ATRA, die dritte mit 9-cis-RA (5 µM) und 100 µg/ml TNF α , die vierte mit 5 µM ATRA und 100µg/ml TNF α und die fünfte ausschließlich mit 100 µg/ml TNF

α. Zur Stimulierung wurde die Lösung in Medium verdünnt, auf die Zellen in den Petrischalen geträufelt und sanft geschwenkt. Zur Kontrolle diente eine zeitgleich ausgesäte Schale, in der nur Zellen im Medium enthalten waren. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank (Typ BB 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37° Celsius wurden die Zellen geerntet und eine RNA-Isolierung durchgeführt.

3.1.3 RNA-Isolierung aus THP-1 Zellen

Für die RNA Isolierung wurde ein Satz von Quiagen verwendet (RNeasy Midi Kit, Quiagen, Hilden, Deutschland) und nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers vorgegangen. Die zugrundeliegende Methode der RNA-Isolierung, die „single step“-Methode genannt wird (Chomczynski et al. 1987), ist wirksam durch die Verwendung einer Guanidinisothiocyanatlösung, die als Salz Proteine und RNasen inaktiviert. Mit einer Silica-Gel-Membran bewirkt man die Bindung von RNA-Molekülen, die länger als 200 Nukleotide sind. Im letzten Schritt wird die RNA unter Niedrigsalzbedingungen wieder gelöst.

Der Satz enthält 50 RNeasy midi columns in 15 ml tubes, 50 collection tubes mit dem Inhalt 15 ml für die Elutionsschritte, RLT Puffer für die Denaturierung durch Guanidinisothiocyanat (GITC), 55 ml RPE Puffer für die Waschschritte und RW1 Puffer, der seinerseits GITC enthält. Der RPE Puffer muss vor dem ersten Gebrauch mit 220 ml 90 – 100 % Alkohol aufgefüllt werden, um wirksam zu sein. Außerdem ist Rnase-freies Wasser im Kit enthalten.

Für die RNA-Isolierung wurden 6 Zellkulturflaschen mit der Größe 10 cm, dem Inhalt 10 ml und einer Zellzahl von je 30 Mio. Zellen pro Flasche geerntet.

Da es sich bei THP-1 Zellen um Suspensionszellen handelt, wurde als erster Arbeitsschritt das Medium aus den Zellkulturflaschen in 15 ml tubes gefüllt. Darauf erfolgte 7 Min. Zentrifugieren (Zentrifuge Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) mit 1200 Umdrehungen pro Min., Verwerfen des Mediumüberstands und Waschen der Zellen mit PBS. Nach Resuspension zentrifugierte man bei gleicher Zeit und Drehzahl und wusch anschließend mit 2 ml PBS. Nach erneuter Resuspension, Zentrifugation bei 1200 U/Min. und Absaugen des überschüssigen Mediums wurden die Zellpellets mit je 2 ml RLT-Puffer, dem zuvor 10 µl/ml β-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, USA) zugesetzt wurde, lysiert. Die Suspensionen wurden in sechs RNase freie 15 ml tubes überführt. Nach 10 Sek.

Vortexen (Bender & Hobein, Zürich, Schweiz) wurde das Gemisch mit einer 20 G Nadel und einer 50 ml Spritze mehrmals aufgezogen und auf diese Weise eine homogene Emulsion erzeugt. Nun wurde als Waschschrift 2 ml 70 %iges Ethanol (Baker, Deventer, Holland) zugegeben, die tubes wurden geschüttelt und kräftig gemischt. Anschließend erfolgte die Übertragung auf Silica-Gel-Säulen. Nach 5 Min. Zentrifugieren bei 4000 U/Min. (Biofuge 15 R, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) wurde der Durchfluss verworfen, die Säulen mit je 4 ml RW 1 Puffer bedeckt, bei oben angegebener Drehzahl 5 Min. zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Es wurden zwei Waschschriffe mit 2,5 ml RPE Puffer durchgeführt mit anschließendem Zentrifugieren, wobei das erste Mal mit 2 Min. bei 4000 U/Min. und das zweite Mal mit 5 Min. bei 4000 U/Min. zentrifugiert wurde.

Für die letzten beiden Elutionsschritte wurden die Filter in neue 15 ml tubes umgesetzt. Direkt auf die Membran wurden je 200 µl Rnase-freies Wasser pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Rt wurden die tubes samt Filter 3 Min. zentrifugiert (4000 U/Min.). Das Eluat, das aus RNA und Wasser besteht, wurde wieder auf die Membran pipettiert und obiger Vorgang wiederholt. Die fertig isolierte RNA wurde in Eppendorf-Cups pipettiert, sofort auf Eis gestellt und bei - 80 °C eingefroren.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der fertig isolierten RNA der THP-1 Zellen wurde über die Messung am Photometer (Gene Quant Pro, Bio Chrom Ltd., Cambridge, England) bestimmt. Bei der Nukleinsäure RNA läßt sich die Konzentration bei der spezifischen Wellenlänge von 260 nm aus der optischen Dichte ermitteln. Um die Präzision der Werte zu erhöhen, wurde eine Zweifachmessung durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Als Leerwert diente dabei Aqua destillata (Nuclease free water, Promega, Madison, USA). War die Abweichung der beiden Werte groß, wurden zwei weitere Messungen durchgeführt. Die RNA wurde mit RNase freiem Wasser 1:10 verdünnt und in ein Eppendorf-Cup (Eppendorf-Netheler-Hinz-Company, Hamburg, Deutschland) gegeben, zum Beispiel für eine zweimalige Messung einer Probe 2 µl RNA + 18 µl RNase freies Wasser. Anschließend wurden 10 µl der Mischung in eine Küvette gegeben und im Photometer unter der Einstellung einer RNA-Messung und der Verdünnung 1:10 vermessen. Zwischen jedem Messschritt wurde die Küvette mit RNase-freiem Wasser ausgespült. Mit folgender Formel berechnete das Photometer

mit der bei 260 nm bestimmten optischen Dichte die Konzentration (c) der Ausgangslösung:

$$c = \text{optische Dichte} \times \text{Verdünnung} \times \text{Multiplikationsfaktor}$$

Bei dem Multiplikationsfaktor 40 für RNA und der bekannten Verdünnung (1:10) lässt sich die Formel verkürzen auf:

$$c = \text{optische Dichte} \times 10 \times 40 / 10 \text{ [wegen mg]}$$

$$c = \text{optische Dichte} \times 40 \text{ [konz in } \mu\text{g}/\mu\text{l]}$$

Proteine absorbieren bei einer spezifischen Wellenlänge von 280 nm; Peptide, Phenole, aromatische Verbindungen und Kohlenhydrate absorbieren bei einer spezifischen Wellenlänge von 230 nm. Daher kann man aus dem Quotienten $\text{optische Dichte}_{260\text{nm}} / \text{optische Dichte}_{280\text{nm}}$ auf den Reinheitsgrad der RNA schließen.

Bei der Messung der optischen Dichte bei obiger Verdünnung der RNA (1:10) sollte das Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 liegen; würde man nur reine RNA messen, sollte der Quotient $> 2,0$ sein.

Nach Berechnung des Mittelwerts der Zweifachmessung einer Probe, wurde für jede Probe das Volumen (v) in μl errechnet, das man für die Reverse-Transkriptase-Reaktion verwenden musste, um 2 μg RNA einzusetzen:

$$v = \frac{2\mu\text{g}}{c}$$

Diese Volumina wurden für die folgende Reverse Transkription in ein Eppendorf-Cup pipettiert und zusammen mit Aqua destillata (Nuclease free water, Promega, Madison, USA) auf ein Volumen von 21 μl aufgefüllt.

3.1.5 Qualitätsbestimmung der RNA

Die Qualitätsbeurteilung der fertigen RNA erfolgte mit dem Reaktionspaket von Agilent Technologies (RNA 6000 Nano Assay, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Qualitätsbestimmung diente dem Ausschluss einer Verunreinigung der RNA durch DNA-Fragmente, Oligonukleotide oder monomere Nukleotide, die in der Konzentrationsbestimmung messbar sind und die wahre Konzentration der RNA verfälschen können.

Der in den Chip eingebrachte Fluoreszenzfarbstoff verbindet sich mit den Proben und wird durch einen Laser detektiert, während sich die Nukleinsäuren im Spannungsfeld elektrophoretisch auftrennen. Der Rechner zeichnet die Gelelektrophorese im zeitlichen Verlauf auf und dokumentiert das Geschehen durch ein Elektropherogramm und ein „gel-like-picture“, bei dem die RNA-Fragmente in Banden dargestellt werden.

Eine intakte RNA weist nach 24 Sek. den ersten kleinen Peak auf, der als Markerpeak bezeichnet wird, nach 45 Sek. den zweitgrößeren Peak, nach 54 Sek. den größten Peak und die letzten beiden Spitzen sind ribosomal (10s-RNA und 28s-RNA). Die y-Achse stellt die Fluoreszenz dar, das heißt je mehr RNA, desto höher die Fluoreszenz und desto höher der Peak. Die x-Achse bezeichnet die Zeitachse.

Für eine Platte (Chip) mit 12 RNA-Proben benötigt man 1 µl einer Bezugsprobe (ladder), die man 2 Min. bei 72°C denaturieren muss.

Alle Vertiefungen des Chips wurden mit Gel und RNA gemäß der Anleitung zum „Reagent kit guide“ gefüllt. Mit dem Einsetzen von zwei Waschschritten vor der Messung oder eine Min. mit einem 100µl ZAP Chip und wenige Sek. mit einem mit 100µl RNase freiem Wasser gefüllten Chip wird die Verschleppung von RNA verhindert. In der Maske des Agilentsoftwaresystems (2100 Expert Software, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gab man die Probenkonzentration pro µl an. Nach ca. 30 Min. konnte man die Daten ausdrucken und erhielt nach einem erfolgreichen Lauf RNA-spezifische Kurven.

3.1.6 Reverse Transcription

Die Reverse Transcription erfolgte mit dem Promega Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA). Der Ansatz besteht aus 8 µl MgCl (25 mM), 4 µl dNTP Mix, 4 µl RT 10 x Buffer, 1 µl Random Primer, 1,2 µl AMV-RTase, 1 µl RNasin. Zum Ansatz wurden 21 µl RNA-Wasser-Gemisch mit einer RNA Konzentration von 2 µg gegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 42° C und 5 Min. bei 95° C inkubiert. Anschließend wurde die entstandene cDNA 1:5 verdünnt und bei - 20° C eingefroren.

3.1.7 Realtime PCR

Die Realtime Polymerase Chain Reaktion (Echtzeit Polymerasekettenreaktion, Echtzeit PCR) wurde mit dem ABI7900HT Gerät von Applied Biosystems (Foster City, USA) durchgeführt. Alle Reagentien inklusive Primer und Proben stammen von der Firma Applied Biosystems und wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers benutzt.

Die Echtzeit PCR baut auf den Versuchsbedingungen der Polymerasekettenreaktion zur gezielten Vervielfältigung eines DNA-Stranges auf (Mullis et Faloona et al., 1987). Im ersten Arbeitsgang wird der DNA-Doppelstrang bei 95°C denaturiert und spaltet sich in einzelsträngige DNA-Stränge (Schablonen) auf. Im zweiten Schritt wird die Temperatur wieder herabgesenkt, so dass die Primer optimal binden und sich dem komplementären Strang anlagern können. In der dritten Phase wird das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erreicht, die bei 72°C weitere Nukleotide in Richtung des 3'-Endes anbauen kann.

Der entstandene Doppelstrang dient wiederum als Vorlage. Die Reaktionskurve hat einen Z-förmigen Verlauf. Erst kommt es zu einem zaghaften linearen Anstieg der produzierten DNA-Menge, dann zu einer exponentiellen Explosion der Produktion, bis die Reaktion in einem Plateau verebbt, wenn Enzyme und Nukleotide fehlen.

Als Versuchsbedingungen bei der Echtzeit PCR gelten 2 Min. Erhitzen auf 50° C, 30 Min. auf 60° C und 5 Min. auf 95° C. Anschließend folgen 35 Zyklen mit abwechselndem 20 Sek. Erhitzen auf 94° C und 1 Min. Abkühlen auf 60° C.

Die Sichtbarmachung des PCR-Produktes („DNA-Template“) während der Amplifikation in Echtzeit wird durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer erreicht. Dazu setzt man spezielle Primer ein, die als TaqMan-Sonden (5'-„Nuklease-Assay“, „TaqMan probe“) bezeichnet werden und einen „Reporter“ Fluoreszenzfarbstoff am

5'Ende und einen „Quencher“ am 3'Ende tragen. Bei der Strangsynthese zerschneidet die Taq-Polymerase die Taq-Man Probe durch ihre 5'3'-Nukleaseaktivität in Stücke und führt so zum Loslösen des „Reporters“ vom „Quencher“ und zur Fluoreszenz des „Reporters“. Für die relative Quantifizierung wird ein hauseigenes Referenzgen, in unserem Labor die 18sRNA, genutzt.

Die Expressionen folgender Gene wurden im Rahmen eines relativen $\Delta\Delta$ ct Laufs (relative Quantifizierung) mit einer Echtzeit PCR gemessen: ABCG1, ABCG4, ABCA1, CYP 27 A1, LXR α , ABCG1 810 A-18, ABCG1 57 A-I, ABCG1 819 B-19, ABCG1 57 B-E. Auf eine Mikrotiterplatte wurde pro Well 5 μ l cDNA vorgelegt. Pro Gen wurde ein Mastermix erstellt, der pro Well 10 μ l Taqman Universal PCR Mastermix und 4 μ l H₂O enthält. Aus dem Mastermix wurden 15 μ l pro Well entnommen. Die cDNA wurde in Triplets vorgelegt und jedes Gen (1 μ l Gen) drei Mal vermessen und der Mittelwert gebildet.

Zur Auswertung wurde die ABI sequence detector software version 2.0 von Applied Biosystems verwendet. Die graphische Darstellung der relativen Hochregulation wurde mit Excel (Microsoft) ausgeführt.

3.2 *Stimulation der in vitro differenzierten menschlichen Makrophagen*

Zusätzlich wurden von der Abteilung klinische Chemie menschliche Monozyten bereitgestellt, die vom Blut freiwilliger Spender durch Gegenstrom-Zentrifugation am Elutriator (Sanderson et al. 1982) gewonnen wurden. In unserer Arbeitsgruppe wurden diese Monozyten durch M-CSF zu Makrophagen ausdifferenziert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit fertig isolierter RNA von in vitro differenzierten und mit Retinoiden stimulierten Makrophagen gearbeitet. Die Makrophagen sind mit DMSO, 9-cis RA oder ATRA stimuliert worden. Die RNA wurde wie in Punkt 3.1.6 zu cDNA umgewandelt, und die Echtzeit PCR wurde, wie bei den THP-1 Zellen unter 3.1.7 beschrieben, durchgeführt.

3.3 Realtime PCR der ABCG1 Isoformen in HepG2 Zellen

Bei der Zellreihe HepG2 (ATCC-Nr. HB-8065) handelt es sich um eine humane Hepatomzelllinie (Aden et al. 1979), die mit RPMI Medium (RPMI 1640, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) unter Zugabe von 10 % FKS und 1 % MEM gedeiht. Die Zellen wachsen adhärent und bilden konfluente Monolayer. Wegen des langsamen Zellwachstums muss das Medium nur etwa einmal pro Woche erneuert werden. Bei der Zellkultur und beim Ernten der Zellen wurde so verfahren, wie bei den RAW264.7 Zellen unter Gliederungspunkt 3.4.2 und 3.4.5 beschrieben wird. Die RNA-Isolierung, Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der RNA, Reverse Transkriptase und Echtzeit PCR der HepG2 Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie sie unter den Gliederungspunkten 3.1.3 bis 3.1.7 erläutert wurden. Ein bedeutender Unterschied in der Behandlung der beiden Zellarten liegt darin, dass es sich bei THP-1 Zellen um Suspensionszellen, bei Hep-G2 Zellen um adhärente Zellen handelt, die man erst mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale lösen muss.

3.4 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive Elementes im ABCG1-Gen

Als Ausgangspunkt wurden fertige Vektoren, die von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurden, verwendet und zwar fünf Abschnitte des menschlichen ABCG1-Gens, die -3000, -2000, -1000, -500 und -250 Basenpaarlängen abwärts des Startcodons des ersten Exons des ABCG1-Gens liegen. In diesem Promotorbereich wurde das Retinsäure-Responsive Element vermutet. RAW264.7 Zellen wurden mit den fertig hergestellten Plasmid-Vektoren transfiziert, die obige Gensequenzen und als Reporter gen für den quantitativen Nachweis Luziferase enthielten (pGL3-Basic Vektor, Promega, Madison, WI, USA). Die Zellen wurden mit β -Galaktosidase (β -Gal) cotransfiziert.

Um nachzuweisen, welcher Promotorbereich des ABCG1 durch Retinoide stimuliert wird, wurden die transfizierten Zellen mit ATRA und RXR stimuliert. Mit einer β -Gal-Messung als internem Standard wurde zusätzlich überprüft, ob die Transfektion stattgefunden hat, und mit einer Luziferaseaktivitätsmessung wurde festgestellt, bei welcher Gensequenz die höchste Expression von ABCG1 auftritt. Zusätzlich wurde die Proteinmenge bestimmt. Der Quotient aus Luziferase/(Proteinmenge mal β -Gal)

wurde für die einzelnen Werte gebildet, die Werte wurden gemittelt und durch den Mittelwert der Negativprobe geteilt, um das Ergebnis als Faktor x mal Mittelwert der Negativprobe zu erhalten.

3.4.1 Versuchsaufbau

Tag 1	Zellen aussäen
Tag 2	Zelltransfektion: β -Gal + Genabschnitte Nach einer Stunde: Zellstimulation mit DMSO, ATRA und RXR
Tag 3	Auswertung mit Proteinbestimmung, Transfektionseffizienzmessung (β -Galaktosidasassay) und Luziferaseassay

Tabelle 2:
Versuchsaufbau des RAW-Zellversuchs

3.4.2 Zellkultur und Allgemeines

Mit den RAW264.7 Zellen wurde eine murine monozytische Leukämiezelllinie (American Type Culture Collection, ATCC Nr. TIB-71) verwendet.

Die RAW264.7 Zellen wurden in DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) gezüchtet. Das Medium enthielt 10 % fetales Kälberserum (FKS) und MEM. Der Mediumwechsel wurde 1 ml pro Woche durchgeführt. Dabei wurde das Medium der adhärenen Zellreihe mit sterilen Einmalpipetten unter der Sterilbank vollständig abgesaugt und mit 20 ml frischem Medium aufgefüllt. Beim Splitten der Zellen wurde wie folgt vorgegangen: Nach vollständigem Absaugen des Mediums wurden die Zellkulturflaschen (NUNC, Roskilde, Dänemark) mit PBS Puffer gewaschen und nach 10 bis 15 Min. Inkubation im Brutschrank mit 5 ml Trypsin (Trypsin EDTA, PAN, Biotech) für eine vollständige Ablösung auf die Tischplatte aufgeklopft. Die Zellsuspension jeder Zellkulturflasche wurde mit einer 10 ml Pipette aufgenommen, in ein 20 ml tube mit 5 ml Medium gegeben und 7 Min. bei 1200 U/min zentrifugiert. Als nächstes wurde der Überstand an Medium und Trypsin abgesaugt, die Zellen mit 3 ml Medium resuspendiert, gezählt und danach ausgesät.

Zur Überprüfung der Reinheit der Zellkultur wurde regelmäßig ein Mykoplasmentest (Mycoplasma Detection Kit, Roche, Indianapolis, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Am ersten Tag des dreiteiligen Experiments wurden die murinen Makrophagen RAW264.7 ausgesät. Insgesamt wurden 6-well-Platten (Multiwell – 6 well, Becton Dickinson Company, NewYork, USA) mit 2 ml Medium und 0,7 Mio. Zellen pro well ausgesät. Einige Zellkulturflaschen wurden zur weiteren Kultivierung ausgesät und im Brutschrank beiseite gestellt. Wenn sich ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet hat, muss man darauf achten, das Medium täglich zu erneuern. Zwei Tage nach dem Aussäen wurde mit der Transfektion begonnen.

3.4.3 Zelltransfektion

Am übernächsten Tag wurden die Zellen mit dem Fugene 6 Transfection Reagent System von Roche (FuGENE 6 Transfection Reagent, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA) und β -Gal (β -Galactosidase Enzyme Assay System, Promega, Madison, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Die Mausmakrophagenzellen wurden mit den p-GL3 basic Vektoren (Promega, Madison, USA) transient transfiziert, die das Gen ABCG1 in verschiedenen Basenpaarlängen und Reporterger (Luziferase) enthielten.

Der Transfektion liegt die Methode der klassischen Lipofektion (Felgner et al. 1987) zugrunde, bei der die Zellen mit kationischen Liposomen transfiziert werden und die deutlich höhere Transfektionseffizienzen als zum Beispiel die CaPO_4 -Präzipitation liefert. Allerdings wurde die Methode schnell fortentwickelt, und beim Fugene Transfection Reagent handelt es sich bereits um ein DNA-kompaktierendes Gemisch. Die Liposomen-DNA-Komplexe fusionieren mit der Zellmembran, und die DNA kann in den Zellkern gelangen. Beim Fugene Transfection Reagent muss das Medium nach der Transfektion nicht gewechselt werden.

Für den Versuch wurden 11 sterile Platten mit je sechs Vertiefungen bereitgestellt. Eine Platte war für die Positiv- und Negativkontrolle vorgesehen (drei Vertiefungen für die Negativprobe, drei Vertiefungen für die Positivprobe) und wurde dementsprechend gekennzeichnet. Je zwei der restlichen zehn Platten wurden mit den Plasmiden beschriftet, die das Gen ABCG1 in den Basenpaarlängen 250, 500, 1000, 2000 und 3000 enthielten. Für das Transfektionsmedium wurde ein Mastermix mit 91 μl Medium (DMEM) und 9 μl Fugene hergestellt. Ein Cup enthielt beispielsweise 2 μg Plasmid, 1 μg β -Galaktosidase (β -Galaktosidase Enzyme Assay System, Promega, Madison, USA), und das Volumen wurde mit destilliertem H_2O auf

5 µl aufgefüllt. Die Konzentration der Plasmide wurde so ausgerechnet, daß 2 µg/µl Plasmide in der β-Galaktosidase (β-Gal) Lösung enthalten waren. Auf die Cups mit der β-Gal-Plasmid-Wassermischung wurden 1 µl der FugeneLösung gegeben; dabei mußte die komplexbildende Wirkung des Fugenes beachtet und die Pipettenspitze direkt ins Medium gehalten werden. Der Inhalt des entstandenen Cups wurde nach 15 Min. auf Vertiefungen der vorbereiteten und beschrifteten Platte geträufelt. Durch diese Arbeitsschritte sollten die Zellkerne durchlässig für Plasmid und β-Gal werden und die Fremd-DNA in sich aufnehmen. Ein pGL3-basic Vektor ohne Plasmid diente als Negativkontrolle und ein pGL3-CMV Vektor, der den Cytomegalievirus-Promotor enthielt, als Positivkontrolle.

3.4.4 Zellstimulation

Für jede Stimulation wurden Platten mit plasmidbeladenen Zellen vorbereitet und beschriftet.

Nach 1 h erfolgte die Stimulation für eine Dauer von 24 Stunden entweder mit 4 µl ATRA, 4 µl RXR oder 4 µl DMSO pro Vertiefung. Dabei wurden drei Vertiefungen mit je 4 µl einer Substanz beträufelt. Die Positiv- und Negativkontrolle wurden nicht stimuliert.

3.4.5 Ernten

Beim Ernten der Zellen wurde zuerst das Medium abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und danach mit 500 µl Reporter Lysis Buffer (RLP 5 x, Promega Corporation, Madison, USA) übergossen. Nach 10 Min. Inkubation bei Rt konnte man das Zellgemisch mit einer Pipette absaugen und jede Probe in ein Eppendorf-Cup geben. Mit Hilfe der Zentrifugation bei 12 000 U/Min. gewann man die DNA-Bruchteile im Überstand.

3.4.6 β-Galbestimmung

Die β-Galbestimmung diente der Prüfung der Transfektionseffizienz. Dazu wurden 100 µl des Überstands mit 100 µl Puffer auf je 1 Vertiefung der Mikrotiterplatte verteilt. Die Platte wurde in den 37° C Schüttelinkubator (GFL-3032, Großburgwedel,

Deutschland) gestellt und wenn sich nach ca. 2 bis 3 h eine leicht gelbe Färbung zeigte, vermessen.

Dem Promega-Kit (Promega, Madison, USA) zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität liegt der empfindliche Chemilumineszenz-Nachweis mit 1,2-Dioxetan-Substraten zugrunde. Bei Gelbfärbung der Proben ausser der Negativkontrolle zeigte sich, dass Plasmid in die Zellen eingebracht worden war. Wenn keine Gelbfärbung auftrat, musste Schritt 3.4.3 wiederholt werden.

Die Platte wurde bei 550 nm im Absorptionsspektrometer vermessen, und man erhielt eine Standardkurve, die die Konzentration von β -Gal auf der x-Achse von 0 bis 2000 μ g gegen die Zeit von 2 Sek. aufzeichnete. Ist β -Gal in steigender Konzentration in den Proben enthalten, entsteht eine diagonale ansteigende Funktionsgerade.

3.4.7 Proteinbestimmung

Bei der Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951) macht man sich die oxidativen Eigenschaften von Kupfer-I-Tartrat zunutze, das über Reduzierung des zugegebenen Folinreagens zu einer Blaufärbung der Proteinlösung führt.

25 μ l Überstand einer Probe wurden mit 200 μ l Proteindetektor mit der Gleichung Reagens A + Reagens B = 50 : 1 (BC Assay Reagent A und B, Uptima interchim, Molucon, Frankreich) versetzt und für jede Probe die Lösung jeweils zwei Mal angelegt (siehe Tabelle 3, Verdünnungsreihe).

Nach 30 Min. Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 420 nm vermessen. Die Konzentration konnte die Software (Sunrise Tecan Programm, Rechner HP Vectra El Flexscan F563-T, Hewlett Packard) anhand der Referenzkurve, die durch Rinderserumalbumin (AlbuMine Standard 2,0 mg/ml, Pierce, Rockford, USA) verschiedener Konzentrationen von 0,0 bis 1,5 mg/ml repräsentiert wurde, errechnen.

Stammlösung: 2mg/ml		Verdünnungsreihe
A:	1500 µg/ml	3 Teile Stammlösung + 1 Teil Wasser
B:	1000 µg/ml	Stammlösung 1: 1 verdünnen
C:	750 µg/ml	Lösung A 1: 1
D:	500 µg/ml	Lösung B 1: 1
E:	250 µg/ml	Lösung D 1: 1
F:	125 µg/ml	Lösung E 1: 1
G:	25 µg/ml	Lösung F 1: 4 verdünnen

Tabelle 3:

Standardreihe für die Proteinkonzentrationsberechnung

3.4.8 Luziferaseassay

Für den Luziferaseassay wurden 100 µl Überstand und 300 µl Luciferase vermengt, beschriftet und im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) vermessen, wobei nach den Anweisungen des Promega Kits vorgegangen wurde. Bei der Messung reagiert Luziferin mit Sauerstoff und Magnesium, und ATP katalysiert durch die Luziferase Oxyluziferin zu AMP, PPi und Licht der Wellenlänge 560 nm. Da jede Probe dreimal vorhanden war, wurden die Ergebnisse gemittelt. Eine signifikante Luziferaseaktivitätserhöhung zeigte sich erst ab einem 5- stelligen Fluoreszenzwert.

Die Proben für jede Stimulation und die Kontrollen waren immer dreifach angelegt. Aus jeder dieser Proben wurde der Quotient Luziferase/Protein x β-Gal gebildet, um einen normalisierten Wert, nämlich die relative Luziferaseaktivität, zu erhalten. Aus diesen drei Werten wurde ein Mittelwert gebildet und dieser ins Verhältnis zum Mittelwert der Negativprobe gesetzt, das heißt, jeder Mittelwert wurde durch den Mittelwert der Negativprobe geteilt.

3.5 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäureresponsive-Elementes im CYP27A1-Gen

Alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der Transfektion wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Transfektion wurden von unserer Arbeitsgruppe bereitgestellte Plasmide, die die drei Deletions-Konstrukte (-1089/+29, -512/+29, -1917/+29) des

Material und Methoden

menschlichen CYP27A1 Promotors enthielten, verwendet. Man klonierte die Konstrukte, die aus der DNA von menschlichen Leukozyten freiwilliger gesunder Spender stammten, in einen pGL3-basic Vektor. Ein pGL3-basic Vektor ohne Plasmid diente als Negativkontrolle und ein pGL3-CMV Vektor, der den Cytomegalievirus-Promotor enthielt, diente als Positivkontrolle.

Die Plasmide wurden mit dem AMAXA-System (Amaxa, Köln, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers transient in die Zellkerne der RAW264.7 Zellen transfiziert und nach einer Stunde mit 4 µl ATRA, 4 µl RXR oder 4 µl DMSO behandelt.

Nach 24 Stunden wurden der Luziferase- und der β -Galaktosidaseassay durchgeführt. Jedes Experiment wurde zwei Mal wiederholt, und die Messungen wurden in Triplets durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 *Auswirkungen von Retinoiden auf den Cholesterinstoffwechsel von THP-1 Zellen*

Bei Microarrayuntersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Langmann et al. 2005) wurde herausgefunden, dass Retinoide Gene des menschlichen Lipidstoffwechsels induzieren. Makrophagen und THP-1 Zellen wurden mit den Retinoiden β -Carotin, 9-cis Retinsäure und ATRA stimuliert, und es zeigte sich, dass β -Carotin den geringsten Effekt hatte, während 9-cis Retinsäure und ATRA fast gleich stark die Induktion von Genen, die den Fettsäurestoffwechsel und den Cholesterinstoffwechsel regeln, bewirkten. Sowohl bei undifferenzierten als auch bei in vitro differenzierten Makrophagen zeigten sich signifikante Hochregulationen des m-RNA Spiegels von Lipid regulierenden Genen, wie zum Beispiel den ABC-Transportern A1 und G1. Um die Microarray Untersuchungen mit einer unabhängigen und spezifischeren Methode zu verifizieren, wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, der auf Real Time TaqMan PCR basiert.

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden THP-1 Zellen beziehungsweise in vitro differenzierte Makrophagen 24 Stunden lang entweder nur mit DMSO behandelt oder jeweils mit einem der Retinoide β -Carotin, 9-cis RA oder ATRA stimuliert. Anschließend wurde mit der TaqMan RT PCR Methode die Genexpression ausgewählter Gene, die den Lipidstoffwechsel von THP-1 Zellen beeinflussen (Langmann et al. 2005), zusammen mit der hausinternen Standardreferenz 18s RNA gemessen. Als signifikante Erhöhung wurde eine Stimulation größer 2 auf der y-Achse betrachtet, da die hausinterne Kontrolle 18s RNA auf 2 hochreguliert wird. Ab einem CT Average von etwa 35 ist die Expression eines Genes so gering, dass sie von dem Messgerät nicht mehr erfasst wird.

4.1.1 Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Genexpression von ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α

Bei diesem Versuch wurde die Hochregulation der Gene ABCA1, ABCG1, CYP 27A1 und LXR α , die den Cholesterinstoffwechsel in Monozyten beeinflussen (Langmann et al. 2005) in der promyeloiden Zelllinie THP-1 gemessen. Bei allen 4 gemessenen Genen war die Genexpression in den Kontrollzellen, die nur mit Medium (RPMI) versetzt waren, gleichermaßen niedrig. Ähnlich tief fiel die Hochregulierung bei allen 4 Genen bei der Stimulation mit DMSO und β -Carotin aus.

Alle 4 Gene wurden signifikant hochreguliert durch die Stimulation mit 9-cis RA oder mit ATRA. Die Stimulation durch 9-cis RA fiel dabei wesentlich stärker aus; so beträgt beispielsweise die m-RNA Expression von ABCG1 in mit 9-cis RA stimulierten Zellen 35 und die von CYP27A1 77. Die stärkste Stimulation durch ATRA trat bei CYP27 A1 mit 57 auf. ABCG1 erreichte eine Expression von 35 in der mit 9-cis-RA stimulierten Probe und 3,4 in der mit ATRA stimulierten Probe. Das Gen CYP27A1 wurde in den THP-1 Zellen viel stärker durch 9-cis Retinsäure und ATRA stimuliert als in menschlichen Monozyten, LXR α wurde in den THP-1 Zellen sehr schwach im Gegensatz zur Expressionsantwort in Monozyten hochreguliert (Langmann et al. 2005). Mit diesem Experiment konnte erstmals eine m-RNA Hochregulation von Lipidstoffwechselgenen durch Retinoide in THP-1 Zellen nachgewiesen werden.

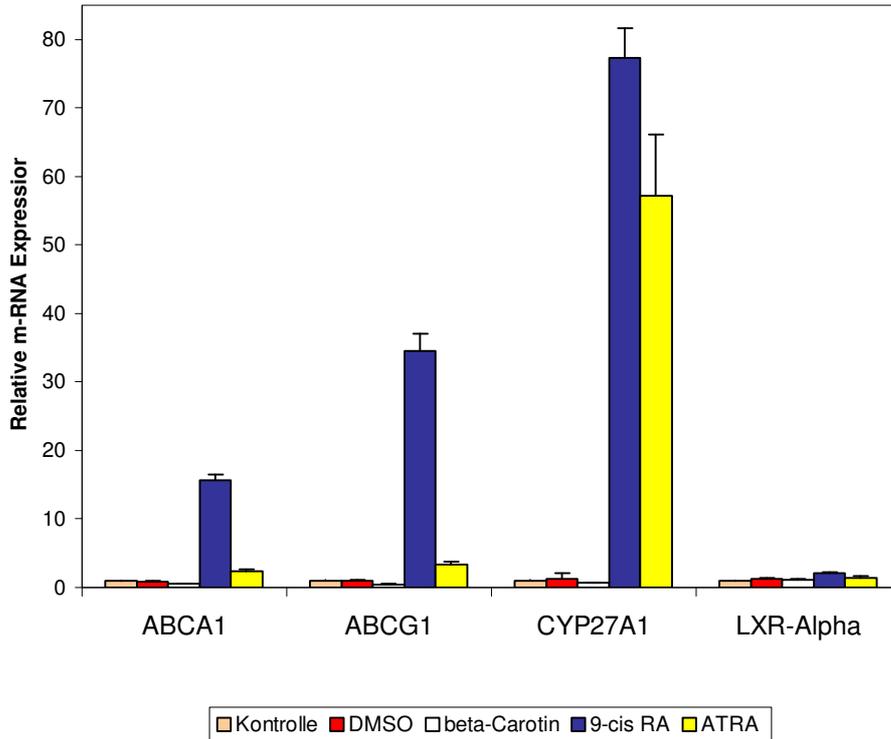


Diagramm 1:

Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Gene ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α

4.1.2 Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Genexpression von ABCG1-Isoformen

Bei dieser Untersuchung wurden die ABCG1-Isoformen ABCG157A-I_AbD, ABCG157B-E_AbD, ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD auf ihre Expression in THP-1 Zellen, die mit Retinoiden stimuliert wurden, getestet. Bei ABCG157A-I_AbD und ABCG157B-E_AbD war die durch 9-cis-RA ausgelöste Expressionserhöhung viel stärker als bei ATRA, dies ist mit dem Ergebnis von ABCG1 im vorangegangenen Versuch vergleichbar. Die Expression der mit 9-cis RA stimulierten Probe ist mit 55 bei ABCG157A-I_AbD bzw. 52 bei ABCG157B-E_AbD sogar noch stärker als bei ABCG1 mit 35 (siehe Diagramm 1).

Bei den Genen ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD war der CT Average Wert mit 45 zu hoch, dies bedeutet, dass der Wert der Expression dieser Gene nicht aussagekräftig ist.

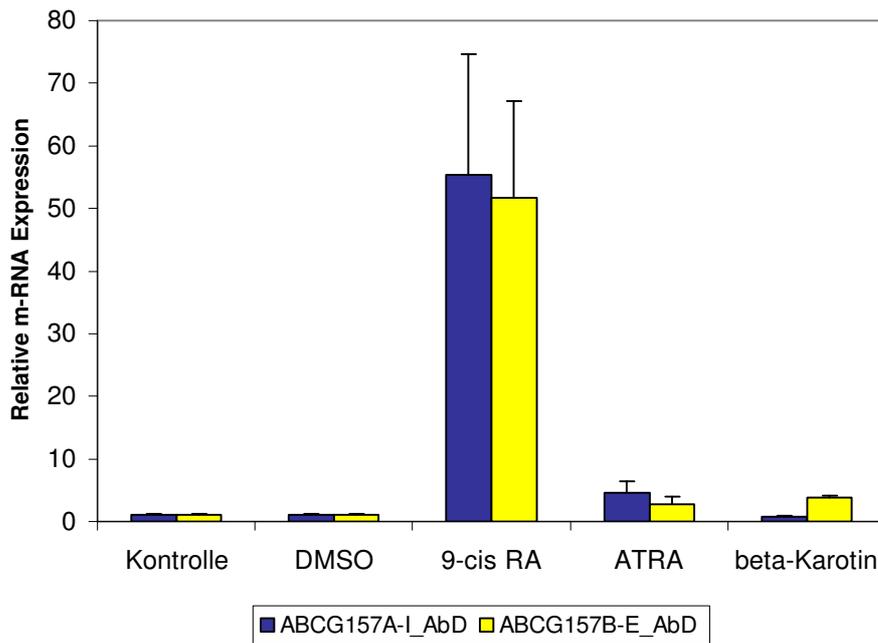


Diagramm 2:

Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Gene ABCG157A-I_AbD und ABCG157B-E_AbD

4.1.3 Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Genexpression der Gene ABCA1, ABCG1-Isoformen, CYP27A1 und LXR α

Um die Ergebnisse aus den beiden vorangegangenen Versuchen zu verifizieren, wurden die Gene zusammen untersucht. Bei ABCA1, ABCG157A-I_AbD, ABCG157B-E_AbD und CYP27A1 bestätigten sich die Ergebnisse der beiden vorherigen Untersuchungen, und die 9-cis RA Stimulation bewirkte die höchste Expression.

Bei ABCA1, ABCG157A-I_AbD und ABCG157B-E_AbD wurde ATRA sehr niedrig exprimiert.

Am höchsten wurde CYP27A1 hochreguliert. Jedoch fiel die Hochregulation bei ATRA wieder schwächer aus als bei 9-cis RA.

Bei LXR α war keine signifikante Hochregulation durch Retinoidstimulation feststellbar, die bei Versuch 1 mit 2,11 und 1,47 schon sehr niedrig ausgefallen war. Erneut konnte man bei den ABCG1-Isoformen ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD mit einem CT Average von 42 keine Expression erfassen.

Ergebnisse

Die Resultate bestätigen die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche im Hinblick auf die deutliche Steigerung der Genexpression von ABCA1, ABCG157A-I_AbD, ABCG157B-E_AbD und CYP27A1 durch Proben, die mit 9-cis RA stimuliert wurden.

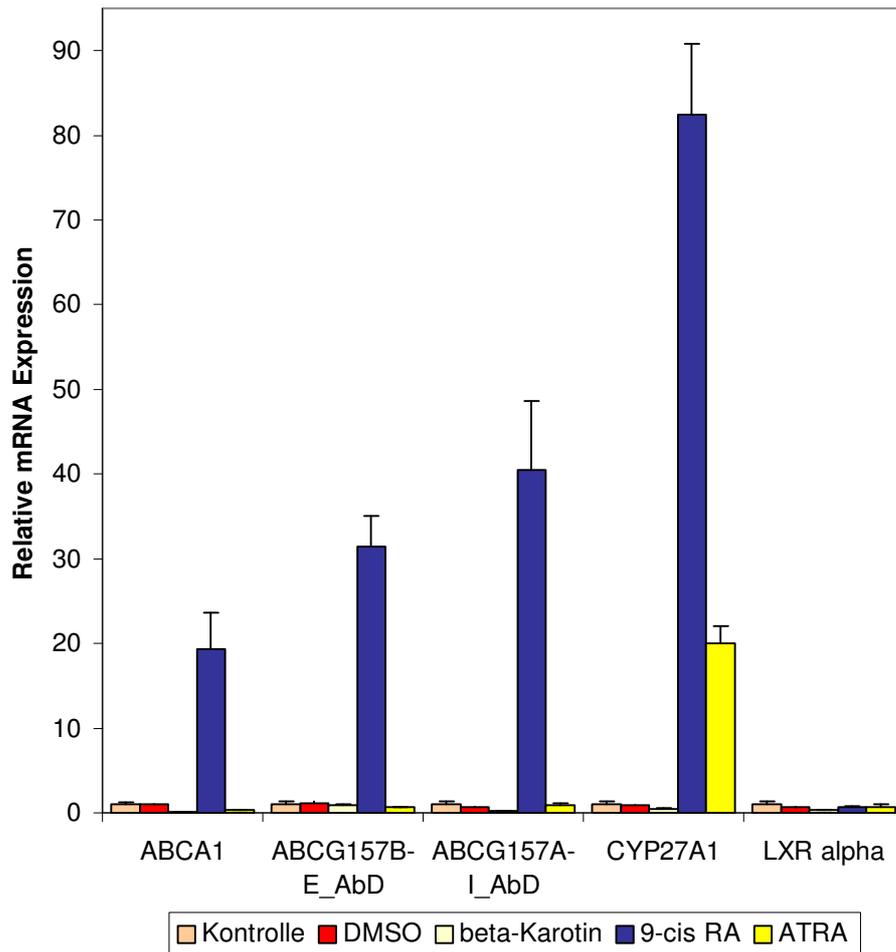


Diagramm 3:

Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Gene ABCA1, ABCG1-Isoformen, CYP27A1 und LXR α

4.1.4 Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide mit und ohne TNF α und Messung der Gene ABCA1, ABCG1, ABCG1-Isoformen, CYP27A1, ABCG4 und LXR α

Die Genexpression der Gene ABCA1, ABCG1, ABCG157A-I_AbD, ABCG157B-E_AbD ist bei den mit 9-cis RA stimulierten Zellen deutlich stärker als bei den mit ATRA stimulierten Zellen. Zudem wird deutlich, dass die Genexpressionserhöhung noch verstärkt wird durch Stimulation der Proben mit 9-cis-RA und TNF α . Eine alleinige Stimulation mit TNF α bewirkt jedoch keine Expressionserhöhung. Die Stimulation mit ATRA und TNF α wirkt sich niemals stärker aus als die alleinige

Ergebnisse

Stimulation mit ATRA. Am stärksten wird die Expression von CYP27A1 hochreguliert. Nur bei CYP27A1 bewirkt die mit ATRA und TNF α stimulierte Probe mit 33 eine signifikante Genexpressionserhöhung, die aber dreimal so niedrig ist als bei der alleinigen Stimulation mit ATRA. Auffällig bei diesem Experiment war, dass die Expression der mit ATRA stimulierten Probe am höchsten war.

Die ABCG4-Expression (siehe Diagramm 5) wurde nur in der mit ATRA stimulierten Probe induziert, aber 9-cis RA bewirkt keine Expressionserhöhung. LXR α erreichte eine schwache, aber signifikante Erhöhung der Genexpression bei den mit 9-cis RA stimulierten Zellen auf 3,7 bei den mit 9-cis-RA und TNF α stimulierten Zellen auf 3,8 und bei den mit ATRA stimulierten Zellen auf 4,4.

Bei ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD war wiederholt keine Expression messbar.

Ergebnisse

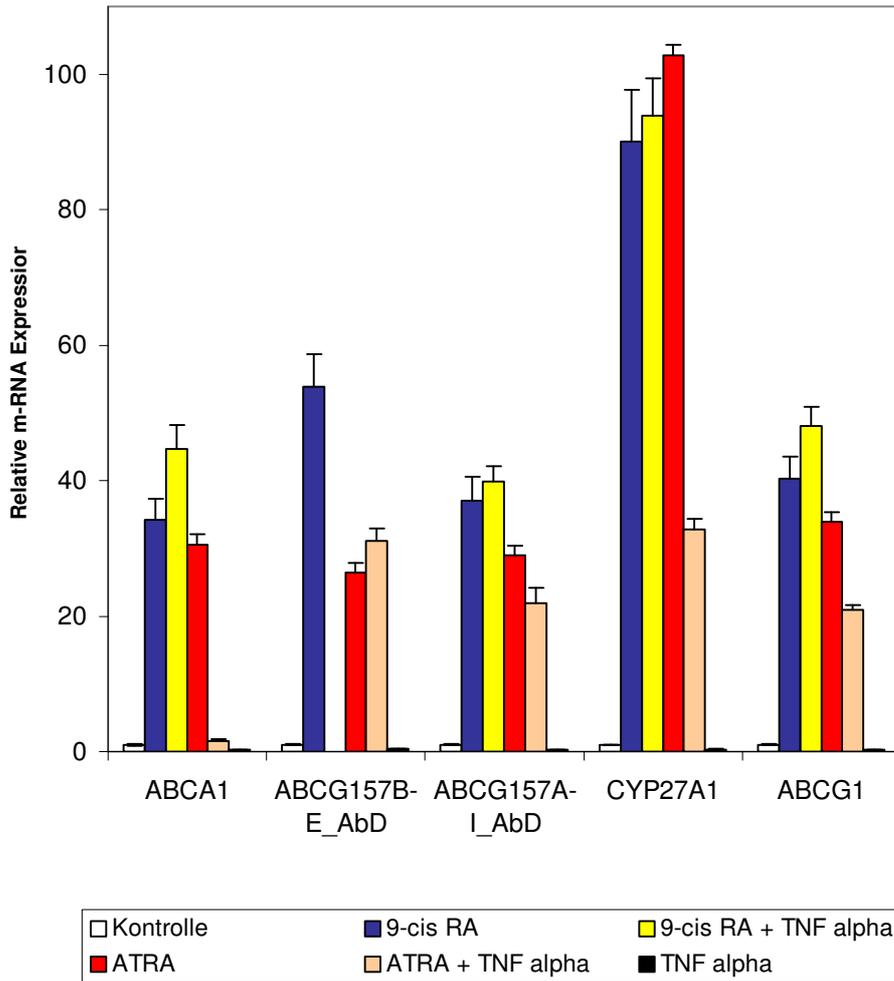


Diagramm 4:

Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Gene ABCA1, ABCG1, ABCG1-Isoformen, CYP27A1 und LXR α

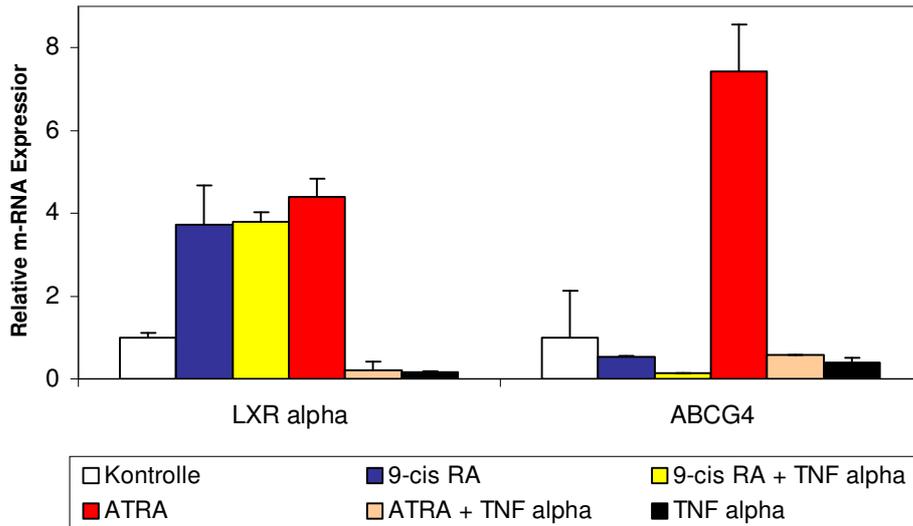


Diagramm 5:

Stimulation von THP-1 Zellen durch Retinoide und Messung der Gene LXR α und ABCG4

4.2 Untersuchung der Expression der ABCG1-Isoformen in in vitro differenzierten menschlichen Makrophagen und in HepG2 Zellen

Bei den Makrophagen bewirkte die Stimulation mit 9-cis RA die stärkste Hochregulation bei den Genen ABCG157A-I_AbD und ABCG157B-E_AbD. ATRA verursacht eine niedrigere Expression als bei den mit 9-cis RA stimulierten Zellen. Die Expression der Gene ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD liegt bei einem CT Average von 45 wieder ausserhalb des messbaren Bereiches. Die Ergebnisse der Microarray Untersuchungen und nachfolgende Echtzeit PCR Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden jetzt auch für die ABCG1 Isoformen bestätigt und zeigen, dass Lipidstoffwechselgene in Monozyten und Makrophagen durch Retinoide stimuliert werden.

Die Hep G2 Zellen wurden nicht stimuliert, um die Höhe der basalen Expression der ABCG1-Isoformen herauszufinden. Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, in welcher der vier Isoformen die Expression der Gene am höchsten ist. Im Vergleich zur 18s RNA mit einem Durchschnittswert von 1,28 sind die Expressionen des Gens ABCG157B-E_AbD in den Proben mit einem Durchschnittswert von 1,33 leicht erhöht. Eine Probe liegt mit 2,66 über dem höchsten Expressionswert der 18s RNA. Die basale Expression von ABCG157B-E_AbD ist höher als die von ABCG157A-I_AbD, dessen Durchschnittswert bei 0,69, also unter der 18s RNA-Expression, liegt.

Ergebnisse

Die höchste basale Expression in den Hep G2 Zellen war bei ABCG1 feststellbar, gefolgt von ABCA1. Die basale Expression von ABCG157B-E_AbD ist höher als die von ABCG157A-I_AbD.

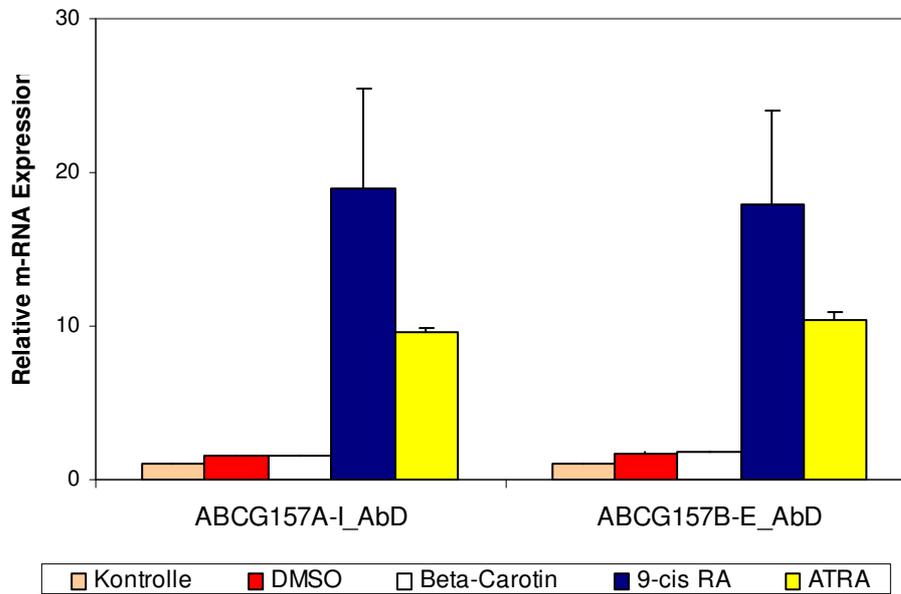


Diagramm 6:

Retinoidstimulation von in vitro differenzierten Makrophagen und Messung der Genexpression der ABCG1-Isoformen

Ergebnisse

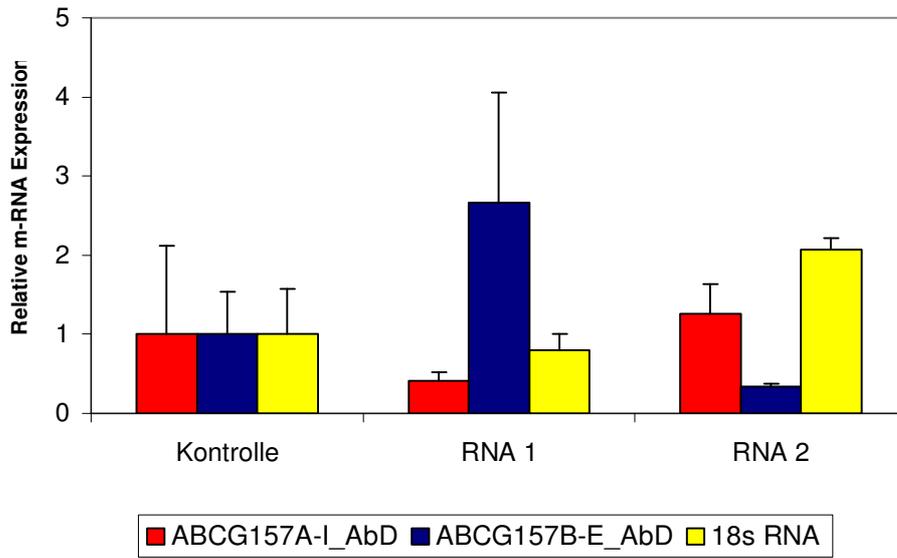


Diagramm 7:

Basale Genexpression der ABCG1-Isoformen in HepG2 Zellen

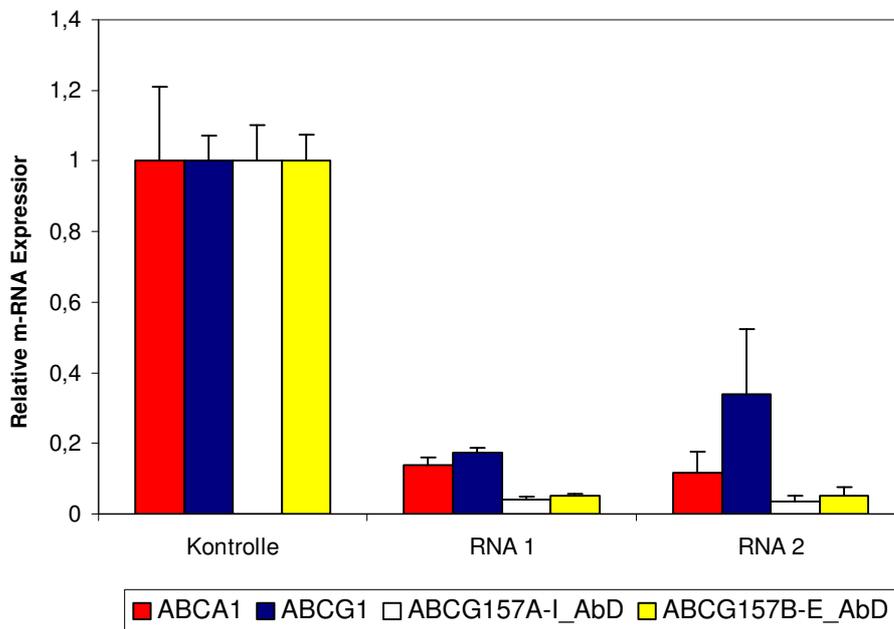


Diagramm 8:

Basale Genexpression von ABCA1, ABCG1 und ABCG1-Isoformen in HepG2 Zellen

4.3 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elementes im ABCG1-Gen

Um regulatorische Mechanismen herauszufinden, die für die Hochregulierung des ABCG1-Gens durch Retinoide verantwortlich sind, wurden Fragmente des humanen ABCG1-Gens zusammen mit β -Gal und Luziferase als Reporter-genkonstrukt in einen Vektor kloniert. Beginnend bei 3000 bp und endend bei 250 bp unterhalb des Startcodons des ersten Exons wurden die Konstrukte -3000, -2000, -500, -250 gewählt und in die murine Monozytenzelllinie RAW264.7 transfiziert.

Im ersten Versuch wurde geprüft, bei welchen Gensequenzen eine Expressionsantwort von ABCG1 auf Retinoide erfolgt. Die Gensequenzen ABCG1 -3000, -2000 und -500, die um die angegebene Basenpaarlänge vom Startcodon des ABCG1 Promotors entfernt waren, wurden in RAW267.4 Zellen transfiziert, anschließend mit Retinoiden stimuliert, und als letztes wurde die Expression mittels Luziferaseassay gemessen. Der Quotient Luziferase/Protein \times β -Galaktosidase wurde bestimmt; durch Mittelwertberechnung und Beziehung zur Negativprobe erhielt man vergleichbare Werte (siehe Methoden 3.4.8).

Bei allen Proben wirkte sich die 9-cis RA beziehungsweise ATRA Stimulation erhöhend auf die ABCG1 Expression aus. Die Expression des ABCG1 (-500) Genkonstruktes nach RXR und ATRA Stimulation ist 4 - 5 mal höher als die Promotorstimulation in den Abschnitten (-2000) und (-3000).

Ergebnisse

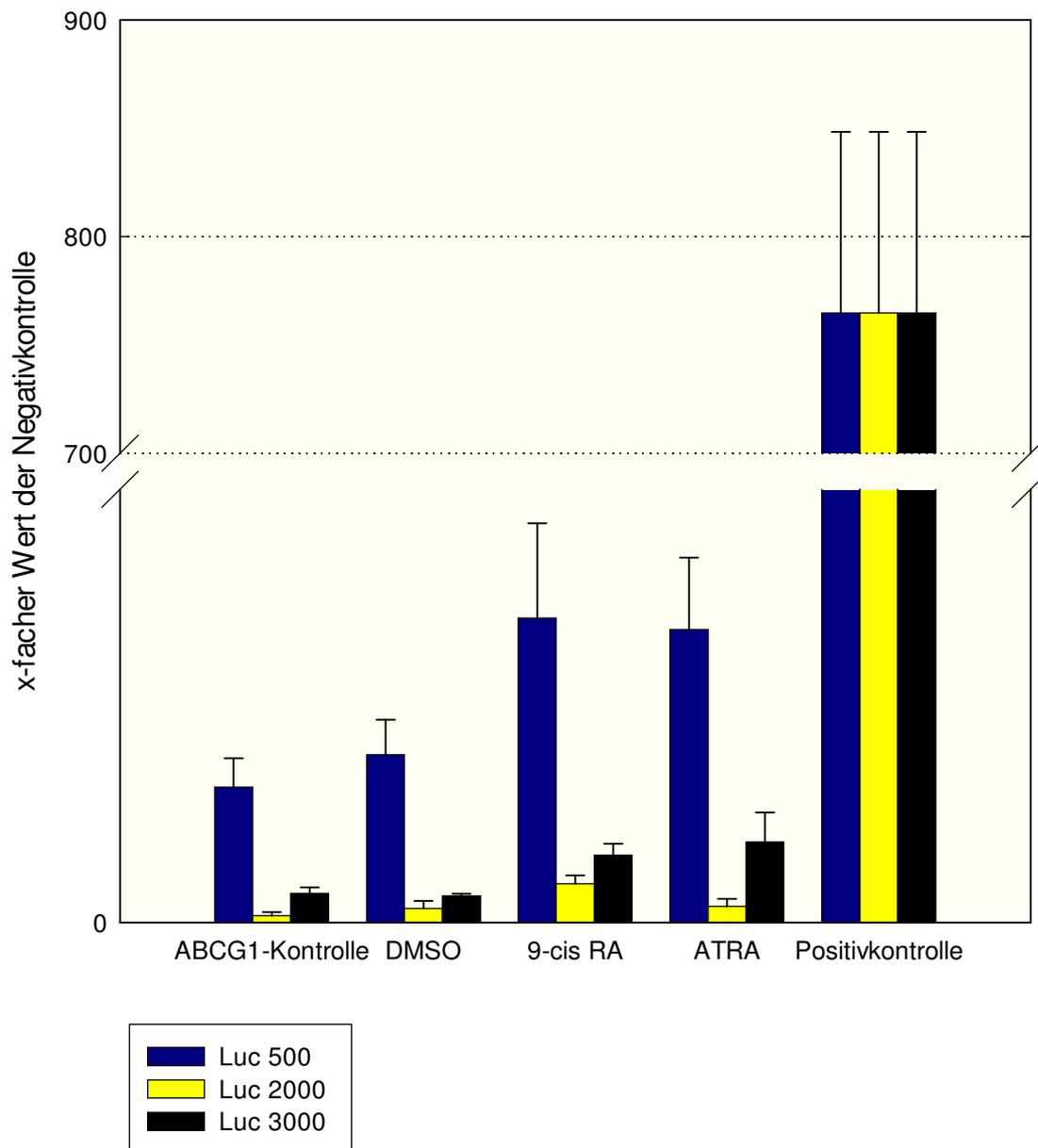


Diagramm 9:

Promotorstudie zur Identifizierung des Retinsäure-Responsive Elementes des ABCG1-Gens

Im folgenden Versuch wurde die Genexpression der Genabschnitte ABCG1 (-500) und ABCG1 (-250) nach Retinoidstimulation untersucht. Die ABCG1 (-500) Promotorregion wird zwar stärker als die Genregion (-250) stimuliert, weil aber die Exprimierung der Genregion (-250) fast ebenso stark ist, befindet sich die gesuchte Promotorregion höchstwahrscheinlich im Genabschnitt -250.

Ergebnisse

Bei der Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive Elementes im ABCG1-Gen wurde herausgefunden, dass der Retinsäure-induzierbare Promotorbereich vermutlich -250 bp abwärts des Startcodons des Promotors liegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern die Grundlage für eine weitere Erforschung der Promotorregionen im ABCG1-Gen.

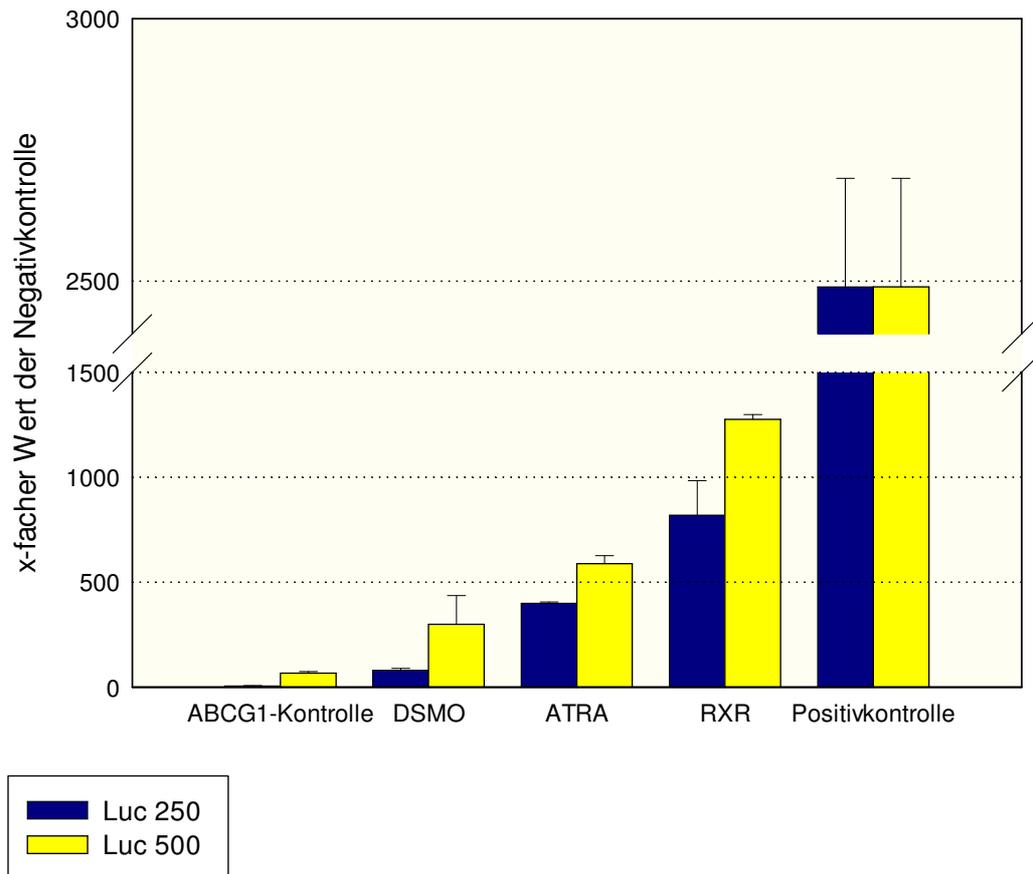


Diagramm 10:

Promotorstudie zur Identifizierung des Retinsäure-Responsive Elementes des ABCG1-Gens

4.4 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elementes im CYP27A1-Gen

Weil Vitamin A-Metaboliten das CYP27A1 in mehreren unabhängigen Versuchen sehr stark hochreguliert haben, lag die Vermutung nahe, dass es einen Genbereich im CYP27A1-Promotor gibt, der stark auf Retinsäure anspricht.

Nun war es die Aufgabe, das Retinsäure-Responsive Element der Promotorregion dieses Genes zu identifizieren. Auf frühere Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe gestützt, wurden drei Genabschnitte des proximalen Promotors des CYP27A1-Gens verschiedener Länge gewählt und ihre Expressionsantwort auf die Retinoide 9-cis RA und ATRA in murinen Makrophagen untersucht. Die drei Promotorregionen sprachen sowohl auf ATRA als auch auf 9-cis RA an, und übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Dissertation bei THP-1 Zellen stimulierte die 9-cis RA den CYP27A1 Promotor mehr als ATRA.

Am höchsten war die Expressionsantwort des –512 bp Promotorabschnittes unter Retinoidstimulation, während die Promotorexpression des –1089 bp Genabschnittes unter Retinodstimulation niedriger war als bei der DMSO Kontrolle. Weil das kürzeste Konstrukt –191 bp das Ausmaß der Genexpression, das bei –512 nach Retinoidstimulation aufgetreten war, bewahren konnte, konnten wir das Retinsäure-Responsive Element im proximalen Promotorbereich –191 bp entfernt vom Startkoden des ersten Exons des CYP27A1-Gens identifizieren. Übereinstimmend dazu fand unsere Arbeitsgruppe auch RXR/RAR Bindungsstellen in dieser Region.

Ergebnisse

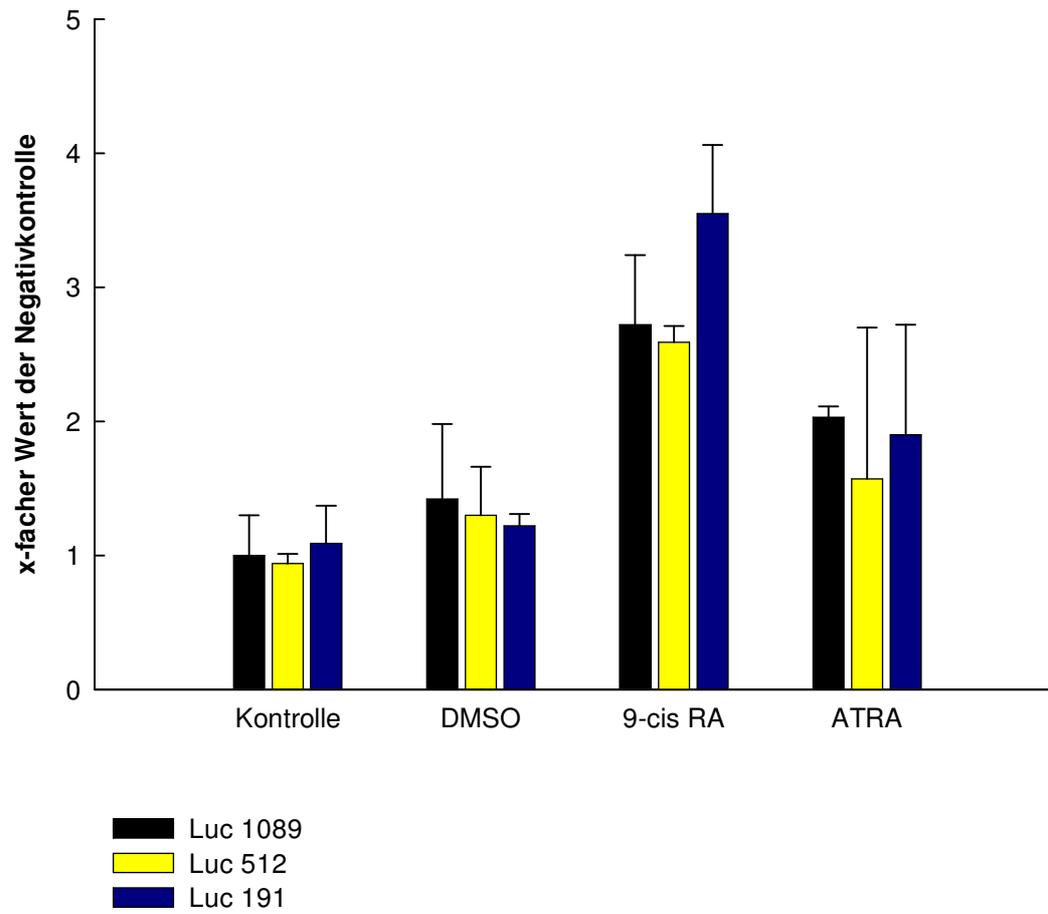


Diagramm 11:
Promotorstudie zur Ermittlung des Retinsäure-Responsive Elementes des CYP27A1-Gens

5 Diskussion

5.1 *Forschungsstand des Zusammenspiels von ABC-Transportern, Retinoiden und Lipiden in Makrophagen*

In der Einleitung wurde auf die zentrale Rolle der ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1 im Lipid- und Cholesterinstoffwechsel einer Zelle hingewiesen. Den ABC-Transportern werden zentrale Aufgaben im Fettstoffwechsel, vor allem im Gallensäure-, Phospholipid- und Steroltransport zugewiesen; deshalb sind sie maßgeblich an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt, die mit dem Ausfall dieser Stoffwechselfunktionen einhergehen (Borst et al. 2000; Lu et al. 2001; Schmitz et al. 2000; Schmitz et al. 2001a). Daher lohnt die genaue Betrachtung der ABC-Transporterfunktion, um mögliche Therapieansätze für die Behandlung von Dyslipidämien und der Arteriosklerose aufzudecken.

Die ersten beiden humanen ABC-Transporter, bei denen eine sterolsensitive Expressionsregulation durch Monozyten auf Gentranskriptionsebene gezeigt werden konnte, waren ABCA1 und ABCG1 (Langmann et al. 1999, Klucken et al. 2000). ABCA1 und ABCG1 kommen im menschlichen Körper ubiquitär vor, aber ihre mRNA Expression wird interessanterweise von Monozyten, die zu Gewebsmakrophagen heranreifen, induziert (Oram et al. 2000, Lawn et al. 1999, Langmann et al. 2002). Wenn die Makrophagen durch Beladung mit modifiziertem LDL (acLDL, oxLDL oder eLDL) zu Schaumzellen transfiziert werden, werden die mRNA und Proteinmengen von ABCA1 und ABCG1 7-100 fach hochreguliert (Langmann et al. 1999; Klucken et al. 2000; Venkateswaran et al. 2000a). Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die bei der Lipidbeladung von Makrophagen zur Induktion der ABCA1 oder ABCG1 Expression führen, noch nicht eindeutig identifiziert, sie sollen in dieser Dissertation zumindest teilweise aufgedeckt werden.

Man weiss, dass beim Einsatz von Oxysterolen über die Mediatoren LXR- α und LXR- β eine vermehrte Expression der ABCA1- und ABCG1-Transporter vermittelt wird (Costet et al. 2000; Schwartz et al. 2000).

Ebenso wie die Oxysterole könnten die Retinoide vermutlich über den Retinoidrezeptor RXR zu einer Zunahme der Genexpression von ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen, die mit Lipiden beladen werden, führen.

5.2 Retinoidstimulation von THP-1 Zellen zur Untersuchung der Hochregulierung von Lipidstoffwechselgenen

Mit Hilfe von „Knock-out“ Mäusen, denen LXR α und/oder LXR β fehlten und mit der Verwendung von synthetischen RXR und LXR Agonisten ist die Identifizierung von RXR/LXR abhängigen, sterolregulierten Genen leichter geworden. Mit diesen Methoden fand man heraus, dass ABCA1 durch LXR α , RXR α , cAMP, Retinoide und Oxysterole hochreguliert wird (Oram et al. 2000, Venkateswaran et al. 2000b, Costet et al. 2000, Repa et al. 2000). Auch bestimmte Stadien der Zelldifferenzierung von Monozyten können einen stimulatorischen Einfluss auf die Genexpression von ABCA1 haben (Lawn et al. 1999, Oram et al. 2000, Langmann et al. 2002). Während der Differenzierung von menschlichen Monozyten zu Makrophagen wird die ABCA1 mRNA- und Proteinexpression hochreguliert, wenn acetyliertes low-density Lipoprotein anwesend ist (AcLDL), und durch HDL₃ nimmt die ABCA1 Proteinexpression wieder ab (Langmann et al. 1999).

In weiteren Untersuchungen zur ABCA1-Genexpression wurden RAW264.7 und HepG2 Zellen 18 Stunden lang mit zunehmend höheren Dosen von Insulin, Glukose, Fettsäuren und Ketonkörpern inkubiert (Uehara et al. 2002). Während Glukose und Insulin keinen Effekt auf die ABCA1 Expression hatten, führten mehrfachungesättigte Fettsäuren und Ketonkörper zu einer Abnahme der ABCA1-Genexpression. Der stimulatorische Effekt von Oxysterolen (Costet et al. 2000, Venkateswaran et al. 2000) auf ABCA1 in HepG2 und RAW264.7 Zellen wurde vermindert durch EPA, Oleic acid und Acetoacetat. Die Versuche wurden durch Promotorstudien an RAW264.7 Zellen verifiziert, in die Teile des menschlichen ABCA1 Promotors eingebracht wurden, dabei regulierten EPA und Acetoacetat die Promotoraktivität des ABCA1-Gens um bis zu 70 % herab. Unter Oxysterol oder 9-cis RA Stimulation ergab sich eine Zunahme der Promotoraktivität um den Faktor 30 gegenüber der Kontrolle (Uehara et al. 2002).

Die antioxidativen Vitamine A (Retinol) und seine Metaboliten 9-cis Retinsäure (9-cis-RA) und All-trans Retinsäure (ATRA) üben einen antiatherogenen Effekt aus, der noch nicht bis ins Detail geklärt ist.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe mit Microarrays (Langmann et al. 2005) brachten die Erkenntnis, dass ein Gencluster des zellulären Lipid- und Cholesterinstoffwechsels in menschlichen Monozyten und in vitro differenzierten Makrophagen, die mit Retinsäure stimuliert wurden, stark induziert wurde. Unter anderem wurden

die Gene ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α , die in dieser Arbeit eine wichtige Rolle spielen, stark durch Retinoide stimuliert.

Mit quantitativer Realtime PCR wurden die Ergebnisse ausgewählter Gene unter Retinoidstimulation bestätigt. Zum Beispiel war bei den Fettsäurestoffwechselgenen Fettsäure-desaturase 2, Stearyl CoA Desaturase, Monoglyceridlipase und den Apolipoproteinen ApoC-I und ApoC-II die stärkste Hochregulierung durch 9-cis RA festzustellen. Bei ApoC-IV und Apo-E beispielsweise war der stimulierende Effekt von ATRA höher. Auch bei in vitro differenzierten Makrophagen wurde mit RT-PCR die Hochregulierung von ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α gemessen. Dabei traten die höchsten retinoidinduzierten Genexpressionen bei ABCA1, CYP27A1 und LXR α durch 9-cis Retinsäure auf, und bei ABCG1 durch ATRA. LXR α wurde etwas stärker als CYP27 hochreguliert. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe untermauern die induzierende Wirkung von Vitamin A und seinen Derivaten auf Apolipoproteine, Fettsäure- und Cholesterinstoffwechselgene und weisen auf die wichtige Funktion von Retinsäuren in diesen Regelkreisen hin.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Microarrayergebnisse unserer Arbeitsgruppe der Cholesterinstoffwechselgene ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α mittels quantitativer RT-PCR, einer sensitiven und spezifischen Methode, verifiziert. Um herauszufinden, ob die Gene ABCA1 und ABCG1 direkt durch die Retinoid-Rezeptoren RAR und RXR induziert werden oder ob es eine indirekte Aktivierung über LXR α und CYP27 gibt, wurden THP-1 Zellen in vitro mit Provitamin A (β -Carotin), 9-cis Retinsäure (9-cis-RA) und ATRA inkubiert. Die anschließende Genexpressionsmessung mit Echtzeit-PCR führte zum Ergebnis, dass Retinoide bei der promyelozytischen Zelllinie THP-1 zu einer Genexpressionserhöhung der Cholesterinstoffwechselgene ABCA1 und ABCG1 führen. Die stärkste Genexpressionserhöhung erfolgte durch 9-cis RA, die zweitstärkste durch ATRA; β -Carotin hatte keinen signifikanten stimulatorischen Effekt. Obwohl ATRA als der „aktive Metabolit“ (Cullum und Zile 1985) unter den Retinsäurederivaten bezeichnet wird, werden die promyelozytischen THP-1 Zellen stärker durch 9-cis RA hochreguliert. CYP27A1 wird viel stärker als ABCA1 und ABCG1 durch Retinoide stimuliert, und wie bei diesen Genen bewirkt 9-cis RA eine stärkere Hochregulierung als ATRA. Das einzige Gen, das durch β -Carotin hochreguliert wurde, ist CYP27A1.

Das ABCA1-Gen, dessen mRNA Expression mittels RT-PCR gemessen wurde, war in primären Monozyten und Makrophagen, die mit ATRA behandelt wurden, deutlich erhöht (Costet et al. 2003). Wenn man diese Ergebnisse mit denen dieser Dissertation vergleicht, fällt die Gemeinsamkeit auf, dass die ABCA1 Expression durch Retinoide in Makrophagen zunimmt. Neu war die Verwendung von 9-cis RA als Stimulus der ABCA1 Expression in Monozyten und die Erkenntnis, dass 9-cis RA das ABCA1 und andere Cholesterinstoffwechselfgene stärker hochreguliert als ATRA. Frühere Forschungsergebnisse zeigten, dass durch die Stimulation mit ATRA die m-RNA- und Proteinspiegel von ABCA1 und LXR α in murinen Makrophagen und THP-1 Zellen angehoben wurden (Costet et al. 2003, Wagsater et al. 2003). Auch wenn Wagsater et al. zum Ergebnis kamen, dass die mRNA Menge von ABCG1 durch die Stimulation mit ATRA nicht verändert wurde, haben die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und diese Dissertation in Versuchen an THP-1 Zellen durch reproduzierbare Ergebnisse bewiesen, dass 9-cis RA und ATRA starke Induktoren der ABCG1-Genexpression sowohl in primären menschlichen Monozyten als auch in THP-1 Zellen sind.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden THP-1 Zellen erstmals mit Retinoiden in Verbindung mit TNF α 24 Stunden lang stimuliert. Eine 9-cis RA und TNF α Stimulation hatte einen deutlichen stimulatorischen Effekt auf die mRNA Expression der untersuchten Cholesterinstoffwechselfgene, der noch höher war als unter alleiniger 9-cis RA Stimulation. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass das Zellstadium einer Zelle und der proinflammatorische Zustand einer Zelle einen Einfluss auf die Expression von Cholesterinstoffwechselfgenen haben.

In einer Versuchsreihe von Venkateswaran wurden menschliche Makrophagen 48 Stunden lang mit Lipiden inkubiert (Venkateswaran et al. 2000b). Es erfolgte ein ABC8 Anstieg nach Inkubation mit AcLDL, Cholesterin und (25)-OH-CH und hoch oxidiertem LDL. Keine ABC8 Erhöhung trat ein bei nativem LDL, alleiniger Cholesterinbehandlung, LPS und TNF α . Es wurde gefolgert, dass die sterol-sensitive Induktion in Makrophagen unabhängig von proinflammatorischen Stimuli und dem oxidativem Zustand der Zelle ist und dass die Behandlung mit TNF α oder LPS Einfluss auf die ABCG1 mRNA Expression hat (ebenda).

Da die Zellen in einem anderen Differenzierungsstadium als die THP-1 Zellen sind und die Einwirkzeit der Substanzen unterschiedlich ist, sind die Versuche nur bedingt

vergleichbar. Auf jeden Fall sollte im Anschluss an diese Ergebnisse weiter in dieser Richtung geforscht werden.

Weil in anderen Veröffentlichungen (Attie et al. 2001) berichtet wurde, dass HDL und seine Apolipoproteine den Cholesterinefflux aus Schaumzellen vermitteln, lenkte sich das Interesse darauf, ob Makrophagen unter dem Einfluss von Retinoiden ebenso Cholesterin ausstoßen. ABCA1 vermittelt in RAW264.7 Zellen den Efflux von Phospholipiden und Cholesterin aus Makrophagen nach lipidarmen Apolipoproteinen, z.B. apoA-I und apoE, um daraus HDL zu bilden (Oram et al. 2000). Bei Wang und Kollegen vermitteln ABCG1 und ABCG4 den Cholesterinefflux von transfizierten HEK293 Zellen nach HDL-3 und HDL-2 Partikeln, aber nicht nach apoA-I (Wang et al. 2004). Da HDL von ABCA1 reguliert wird und ABCA1 wiederum von Retinoiden, ist die Schlussfolgerung naheliegend, dass Retinoide auch den Cholesterinefflux von Makrophagen steuern.

Um herauszufinden, ob der Anstieg wichtiger Faktoren für den intrazellulären Cholesterinstoffwechsel unter dem Einfluss von Retinoiden auch funktionelle Auswirkungen hat, hat unsere Arbeitsgruppe den Lipidefflux von RAW264.7 Makrophagen gemessen. Die Zellen wurden mit 9-cis RA und ATRA stimuliert und ihr Phospholipid- und Cholesterinefflux nach ApoA-I wurde bestimmt. Dabei war 9-cis RA ein stärkerer Induktor als ATRA, und der Efflux von Cholesterin war stärker als der von Phospholipiden. Diese Untersuchungen zeigen, dass der Anstieg der mRNA Spiegel von Lipidstoffwechselgenen, die durch Retinoide stimuliert werden, auch mit einer messbaren Erhöhung des Cholesterineffluxes in Makrophagen einhergeht.

Schon in früheren experimentellen Studien (Langmann et al. 1999) wurde herausgefunden, dass AcLDL Beladung von Makrophagen einen starken m-RNA Anstieg von hABC1 (humanes ABCA1) zur Folge hat und die Proteinexpression während der Monozytendifferenzierung zunimmt, wie auch der hABC1 Spiegel nach Sterolbeladung zunimmt (ebenda). hABC1 ist ein sterolsensitives Gen, das durch Import und Export von Cholesterin in die Zelle reguliert wird (ebenda). Diese Ergebnisse verdeutlichen die funktionelle Relevanz der Geninduktion von Lipidstoffwechselgenen.

Die Berührungspunkte von Retinoiden und dem Lipidstoffwechsel sind vielfältig. Das CD36 Molekül, das in den Microarray-Untersuchungen und anschließenden RT-PCR Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe untersucht wurde und ebenfalls durch Retinoide hochreguliert wird, ist ein wichtiges Molekül, das mit der Pathogenese der

Arteriosklerose in Zusammenhang steht. CD36 vermittelt sowohl die Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen als auch die von Fettsäuren, und seine Transkription wird in THP-1 Zellen angeregt durch RAR (Wuttge et al. 2001). Des Weiteren soll die Hochregulierung von Acyl-Coenzym A durch ATRA in THP-1 Zellen die Speicherung von Cholesterinestern in Lipidtröpfchen bewirken (Yang et al. 2001).

Die Resultate dieser Dissertation zeigen, dass Gene wie ABCA1, ABCG1, CYP27A1 und LXR α , die für den Lipidefflux von Makrophagen zuständig sind, stark durch Retinoide hochreguliert werden und dass die Stimulation dieser Komponenten zu einer Abnahme von Lipiden in Monozyten und Makrophagen führt. Dies wird auch durch die Studien unserer Arbeitsgruppe über den zellulären Lipidefflux unterstützt. Makrophagen, die in Anwesenheit von 9-cis RA und ATRA inkubiert wurden, zeigten eine sehr starke Induktion sowohl ihres Phospholipid- als auch ihres Cholesterineffluxes hin zu Apo-AI, einem Rezeptor, der Cholesterinveresterung und Speichervorgänge ausgleicht (Langmann et al. 2005).

ABCG1 und ABCG4 werden wie ABCA1 in Makrophagen exprimiert und durch LXR/RXR Aktivierung über die Mediatoren 22-OH-CH und 9-cis RA hochreguliert (Klucken et al. 2000; Engel et al. 2001).

Das menschliche ABCG4-Gen wird wie ABCA1 und ABCG1 in menschlichen Makrophagen von Oxysterolen, Retinoiden und anderen Agonisten der Rezeptoren LXR/RXR reguliert (Engel et al. 2001) und agiert mit ABCG1 in Membranen (Cserepes et al. 2004). ABCG4 weist mit 84 % eine hohe Sequenzhomologie zu ABCG1 auf und erstreckt sich auf Chromosom 11q23.3 (Engel et al. 2001). Frühere Forschungsergebnisse, die mit RT-PCR erbracht wurden, zeigen, dass die Genexpression von ABCG4 in menschlichen Makrophagen nach Stimulation mit den Agonisten der Zellkernrezeptoren LXR/RXR 9-cis RA und 22R-Hydroxycholesterin in der Größenordnung von ABCA1 erhöht war (ebenda). Nach Cholesterinbeladung von menschlichen Makrophagen war die ABCG4 Expression ebenfalls erhöht (ebenda), dabei war die Expression von ABCG4 niedriger als die von ABCG1 (ebenda).

Angeregt durch obige Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Dissertation erstmals THP-1 Zellen mit 9-cis RA, ATRA und TNF α in Verbindung mit 9-cis RA oder ATRA stimuliert und das Ausmaß der ABCG4-Genexpression bestimmt. Durch alleinige ATRA Stimulation erreichte ABCG4 die höchste mRNA Expression, 9-cis RA jedoch bewirkte keine signifikante Expressionsteigerung. TNF α hatte zusammen mit ATRA im Vergleich zur Kontrolle einen supprimierenden Effekt auf die ABCG4 Expression.

Das ABCG4-Gen unterscheidet sich in seiner Reaktion von ABCG1 und von den anderen lipidsensitiven Genen bei den Ergebnissen dieser Dissertation darin, dass es als einziges Gen nicht durch 9-cis RA stimuliert wird. Auch wenn dieses Gen ähnlich wie ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen exprimiert und über ähnliche Mechanismen gesteuert wird, könnte die RAR-vermittelte Expressionssteigerung durch den Ligand ATRA überwiegen.

Andere Forschungsergebnisse (Venkateswaran et al. 2000a) erbrachten, dass bei Makrophagen, denen LXR α und LXR β fehlen, die ABCG1 Expression während der Sterolbeladung nicht hochreguliert wird, deshalb kommen LXR α und LXR β für ABCG1 als Transkriptionsfaktoren in Frage. Um die Vermutung zu bestätigen, dass ABCG1 und ABCG4 eine wichtige Rolle in der zellulären Lipid-Sterolregulation spielen, wurden die White 1 und White 2 Transporter und ihr Enantiomer in Insektenzellen exprimiert und mit Antikörpern fixiert (ebenda). Anschließend isolierte man Membranbestandteile und gewann die Erkenntnis, dass bei ABCG1 eine hohe basale ATPase Aktivität besteht, die durch Stimulation mit lipophilen Kationen noch erhöht werden konnte und bei Cyclosporin A-, Thyroxin- oder Benzamideinwirkung abnahm (ebenda). Bei ABCG4 wurde eine niedrigere basale ATPase Aktivität festgestellt, die nicht durch obige Substanzen zu beeinflussen war. Ein weiteres Ergebnis der Studie (Venkateswaran et al. 2000a) war, dass die Transporter ABCG1 und ABCG4 höchstwahrscheinlich sowohl homo- als auch heterodimerisieren, weil die ABCG4 K-M Mutante die ATPase Aktivität von ABCG1 selektiv verschwinden ließ.

Das ABCG4-Gen ist noch lange nicht ausreichend erforscht, um tiefergehende Aussagen über seine Rolle im Cholesterinstoffwechsel treffen zu können.

5.3 *Untersuchung der Expression der ABCG1-Hauptisoformen in THP-1 Zellen, in vitro differenzierten Makrophagen und HepG2 Zellen*

Das ABCG1-Gen wurde als ein Schlüsselgen des Lipidgleichgewichtes in Makrophagen bezeichnet (Klucken et al. 2000). Die ABCG1 Regulation durch Lipide kommt ausschließlich bei menschlichen oder murinen monomyeloiden Zellen vor, wie etwa in primären menschlichen Monozyten (ebenda), RAW264.7 Zellen (Langmann et al. 2005), Peritonealmakrophagen (Venkateswaran et al. 2000a) und Schaumzellen von arteriosklerotischen Zellen (Lorkowski et al. 2001).

Weitere Forschungsergebnisse zeigen, dass ABCG1 und ABCG4 wie ABCA1 zu einem vermehrten Cholesterinefflux von Zellen führen, indem HEK293 Zellen, versehen mit isotopischem HDL, kloniert und auf die Expression der cDNA untersucht wurden (Wang et al. 2004).

Um die Frage zu klären, welche der ABCG1 Isoformen durch Retinoide in THP-1 Zellen hochreguliert werden, wurden die ABCG1 Isoformen ABCG157B-E_AbD, ABCG157A-I_AbD, ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD durch Retinoide stimuliert.

ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD wurden etwa gleich stark wie ABCG1 durch 9-cis Retinsäure und ATRA stimuliert, die Isoformen ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD dagegen nicht. Die Expressionen der beiden Isoformen ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD wurden in unabhängigen Versuchen wiederholt gemessen, aber die Expressionswerte waren jedesmal so niedrig, dass die Werte ausserhalb des messbaren Bereiches lagen. Nur die beiden Isoformen ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD unterliegen einem Retinoideinfluss, der etwa genauso groß ist wie bei ABCG1. Deshalb werden die Isoformen ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD im fortlaufenden Text als retinoidsensitive Isoformen bezeichnet.

Im Gegensatz zu den in vitro differenzierten menschlichen Makrophagen, bei denen ABCG1 stärker durch ATRA stimuliert wurde (Langmann et al. 2005), erbrachte die 9-cis RA Stimulation von humanen monozytären THP-1 Zellen beim ABCG1-Gen und seinen retinoidsensitiven Isoformen eine stärkere Genexpressionserhöhung als durch ATRA.

In dieser Versuchsreihe wurden die ABCG1-Isoformen auf ihre Expressionserhöhung nach einer Retinoidstimulation auch bei in vitro differenzierten Makrophagen untersucht und es zeigte sich, dass die Isoformen ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD stark durch 9-cis RA und durch ATRA hochreguliert wurden.

9-cis Retinsäure hatte einen stärkeren Effekt. Die retinoidsensitiven Isoformen haben also auch einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel von Monozyten.

Als letztes wurde die basale Expression der ABCG1 Isoformen in HepG2 Zellen untersucht. Da ABCG1 in der Leber vorkommt (Langmann et al. 2003), stellte sich die Frage, ob die Isoformen ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD, ABCG1819B-I9_AbD und ABCG1810A-I8_AbD ohne Retinoidstimulation in der Leber exprimiert werden. Es zeigte sich, dass die Isoformen ABCG157B-E_AbD und

ABCG157A-I_AbD nicht signifikant, aber nachweisbar, in den HepG2 Zellen exprimiert sind, die anderen beiden Isoformen nicht.

Andere Forschungsergebnisse berichten, dass die basale ABCG1 Expression in HepG2 Zellen nicht hoch war und auch nach 48 stündiger Behandlung mit Oxysterolen nicht angestiegen ist (Venkateswaran et al.2000); dies lässt sich mit den Ergebnissen dieser Dissertation gut vereinbaren.

Somit bestätigt sich die Theorie, dass es Isoformen von ABCG1 gibt, die ähnliche Eigenschaften wie ABCG1 im Cholesterinstoffwechsel haben, die durch Retinoide hervorzurufen sind. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass ABCG1 einen Homodimerisierungspartner, zum Beispiel in ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD findet, zumal einige Funktionen der Gene und 72 % ihres Aminosäureaufbaus übereinstimmen (Annilo et al. 2001).

Zusätzlich wäre es interessant, die Expression der beiden Isoformen ABCG157B-E_AbD und ABCG157A-I_AbD unter Retinoidstimulation in Leberzellen zu messen.

5.4 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elements im ABCG1-Gen

Mit Hilfe von Sequenzanalysen und Race-PCR zeigten Langmann und Kollegen, dass sich das erste Exon des humanen ABCG1-Gens 110 bp aufwärts vom ATG Startkodon erstreckt und dass die zum ersten Exon proximale 5´ Region den ABCG1 Promotor enthält (Langmann et al. 2000).

Sequenzanalysen dieser Region ergaben, dass die 5´ umgebende Region einen hohen Guanin-Cytosin Gehalt hat und dass der proximale Promotor keine TATA-box besitzt (ebenda). Des Weiteren wurde ein Sterol regulierendes Element (SREBP) an Position –166 entdeckt und ein NFY (Nuklear Faktor Y) an Position –198; diese Bindungsstellen könnten bedeuten, dass NFY und SREBP an der Sterol vermittelten Induktion von ABCG1 beteiligt sind, was wiederum auf die Bedeutung dieses Gens im Fettstoffwechsel hinweist (ebenda). In einer Promotorstudie mit Klonierung von Gensequenzen des ABCG1-Gens in RAW 264.7 Zellen, THP-1 Zellen und HepG2 wurde herausgefunden, dass die stärkste Promotoraktivität im kürzesten Genkonstrukt (-234/+50bp) lag; die Promotorregion aufwärts –234 enthält möglicherweise ein „silencing“ Element, das die Transkription von ABCG1 unterdrückt (ebenda).

Eine ähnliche Strategie wurde im Rahmen dieser Dissertation verfolgt, um erstmals die Auswirkung einer Retinoidstimulation auf die ABCG1 Promotoraktivität des humanen ABCG1-Gens in murinen Makrophagen zu untersuchen, und die Ergebnisse zeigen, dass das Retinoid-Responsive Element höchstwahrscheinlich in der Promotorregion (-500) abwärts vom Startcodons des ersten Exons des ABCG1-Gens liegt; dadurch wird die These bestätigt, dass es eine Regulierungsstelle im ABCG1-Gen gibt, die auf Retinoide anspricht. Wie bei der Studie von Langmann (Langmann et al. 2000) nahm die Promotoraktivität mit den kürzer werdenden Konstrukten zu. Jedoch war die Promotoraktivität im Konstrukt 500 höher als im Konstrukt 250. Diese Ergebnisse liefern die Voraussetzung, um weiter in diese Richtung zu forschen. Vermutlich liegt das Responsive Element zwischen -250 und -500 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes, aber näher an -250 bp.

Der ATP-binding cassette transporter G1 beeinflusst den Cholesterin- und Phospholipidtransport in Makrophagen. Die Resultate dieser Arbeit liefern den Hinweis, dass Retinoide in den Fettstoffwechsel verwickelt sind, da ein bestimmter Genbereich zwischen -250 und -500 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes auf die Stimulation mit Retinoiden anspricht.

5.5 Promotorstudie in RAW264.7 Zellen zur Ermittlung der Lokalisation des Retinsäure-Responsive-Elements im CYP27A1-Gen

In dieser Dissertation wurde erstmals die Genexpression des CYP27A1-Gens in THP-1 Zellen untersucht, die mit den Vitamin A-Metaboliten β -Carotin, 9-cis RA und ATRA stimuliert wurden. Die Hochregulierung von CYP27A1 ist von besonderem Interesse, da sie von allen Lipid- und Cholesterinstoffwechselgenen, die in dieser Dissertation untersucht wurden, am höchsten war und als einziges Gen von β -Carotin, der Vorstufe von Vitamin A, hochreguliert wurde.

Das Retinsäure-Responsive-Element des Promotors dieses interessanten und bisher wenig erforschten Genes liegt im Bereich -191 bp abwärts des Startkodons des ersten Exons des CYP27A1-Gens. Wie bei den Experimenten mit THP-1 Zellen wurde der CYP27A1 Promotor am stärksten durch 9-cis RA stimuliert. Es wäre aufschlußreich, die Expressionsantwort des CYP27A1-Gens zusätzlich nach β -Carotin Stimulation zu untersuchen.

Um das CYP27A1-Gen in die Vorgänge des Cholesterinstoffwechsels einzugliedern, ist es wichtig, seine Aufgabe in Monozyten und Makrophagen zu betrachten, bei

denen es für die mitochondriale Umwandlung von Cholesterin zu 27-Hydroxycholesterin notwendig ist und so die erleichterte Diffusion von Cholesterin aus den Zellen erst ermöglicht.

Da unsere Arbeitsgruppe mit Microarrays und mit Versuchen an in vitro differenzierten Makrophagen herausfand, dass LXR α durch Retinoide hochreguliert wurde, vermutete man, dass es eine indirekte oxysterolabhängige Aktivierung von Cholesterinstoffwechselgenen über LXR α und 27-Hydroxycholesterin gibt, die von Retinoiden angestoßen wird (Langmann et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit erbrachten jedoch, dass LXR α in THP-1 Zellen auch unter Retinoidstimulation gar keine bzw. nur eine sehr schwache Genexpressionserhöhung aufweist, und dies, obwohl es bei den Microarrayuntersuchungen zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression gekommen war (ebenda). Der wichtigste Signaltransduktionsweg von ABCA1 scheint das direkte Binden von RAR/RXR Heterodimeren an das DR4 Element im Promotor von Cholesterinstoffwechselgenen zu sein, und dieser Weg soll über LXR abhängige Mechanismen dominieren (Costet et al. 2003, Schwartz et al. 2000). Indem Maus- und Peritonealmakrophagen mit ATRA, dem Haupt-RAR Liganden, behandelt wurden und der Cholesterinefflux nach Apo-AI gemessen wurde, wurde festgestellt, dass RAR Aktivatoren ABCA1 induzieren und den Cholesterinefflux von Makrophagen erhöhen (Costet et al. 2003). Die Arbeitsgruppe um Wang stellte bei Experimenten mit HEK293 Zellen fest, dass LXR und RXR Aktivierung zu vermehrtem Cholesterinefflux nach ApoAI und HDL führen (Wang et al. 2004). Diese Erkenntnisse ähneln den Ergebnissen dieser Dissertation, sind jedoch nur bedingt vergleichbar, da nicht HEK293 Zellen, sondern THP-1 Zellen verwendet wurden.

Am stärksten von allen LXR Zielgenen wurden ABCA1 und ABCG1 durch ATRA in murinen und menschlichen Makrophagen stimuliert (Wang et al. 2004). In dieser Dissertation wurden ebenfalls ABCA1 und ABCG1 durch ATRA und RXR in THP-1 Zellen hochreguliert, am stärksten aber wurde CYP27A1 hochreguliert.

Wang et al. stellten auch fest, dass RAR γ und RXR den ABCA1 Promotor über ein DR4 Element aktivieren (ebenda). In anderen Untersuchungen an knock-out Mäusen, denen entweder LXR α oder LXR β oder aber beide Rezeptoren fehlten, wurde im Gegensatz dazu wieder gezeigt, dass einige Oxysterole und RXR spezifische Liganden die ABCG1 mRNA Expression über den Liver-X-Rezeptorpfad hochregulieren (Venkateswaran et al. 2000a).

Diskussion

Da die Resultate dieser Arbeit keine signifikante Genexpressionserhöhung von LXR α durch Retinoide erbrachten, weist dies eher auf das Überwiegen einer direkten RAR/RXR vermittelten Signaltransduktion hin, die eng mit der Aktivierung des CYP27A1-Gens zusammenhängen könnte.

CYP27A1 stellt als Produkt (22)-OH-CH her, dies bewirkt wiederum eine LXR/RXR Aktivierung (Engel et al. 2001, Klucken et al. 2000). Alles weist darauf hin, dass CYP27A1 sowohl mit einem potentiellen LXR- als auch mit den RXR-Signalwegen zusammenhängt, wobei die RAR/RXR Signalwege vermutlich stärker begangen werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde herausgefunden, dass Retinoide die Expression von Lipid- und Cholesterinstoffwechselgenen induzieren. Bei diesen Genen handelt es sich zum einen um ABC-Transporter, die den reversen Cholesterintransport aus Makrophagen vermitteln und mit dem erhöhten Lipidefflux aus Makrophagen verbunden sind. Zum anderen wurde durch Retinoidstimulation das CYP27A1-Gen stark exprimiert, ein Gen, das für ein Enzym der Gallensäurebiosynthese kodiert, dabei im ersten Schritt 22-OH-CH produziert und nun auch mit dem Cholesteringleichgewicht in Zellen in Verbindung gebracht wird.

Die ABC-Transporterexpression wird über LXR/RXR und über den Weg der Stimulation durch Retinoide, wie in dieser Dissertation gezeigt wurde, und durch Oxysterole, dabei auch von dem Produkt der CYP27-Hydroxylase 22-OH-CH (Costet et al. 2000) geregelt. Da 22-OH-CH LXR/RXR aktiviert (Engel et al. 2001, Klucken et al. 2000) ist der Zusammenhang von CYP27 und ABC-Transportern offensichtlich.

Die Frage, ob die Gene ABCA1 und ABCG1 direkt durch die Retinoid-Rezeptoren stimuliert werden, ist geklärt. Die Ergebnisse der Retinoidstimulation mit anschließender Genexpressionsmessung erbrachten eine deutliche Expressionssteigerung dieser Gene, und in der Promotorstudie am ABCG1-Gen wurde das Retinsäure-Responsive-Element eindeutig identifiziert.

Aufgrund der Promotorstudie am CYP27A1-Gen lässt sich vermuten, dass es einen zusätzlichen Signaltransduktionsweg über CYP27A1 gibt, der mit dem RAR/RXR Signaltransduktionsweg verbunden ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Retinoide starke Induktoren von menschlichen Lipidstoffwechselgenen sind und zwar speziell von Genen, die mit dem reversen Cholesterintransport und mit dem erhöhten Lipidefflux von Makrophagen verbunden sind. Eine bedeutende Nebenwirkung von Retinoiden, zum Beispiel von ATRA, das als Bestandteil von Medikamenten gegen verschiedene Formen von Krebs eingesetzt wird (Soprano et al. 2004), ist die Entwicklung einer Hypertriglyceridämie. Daher scheint ATRA auf den ersten Blick nicht geeignet zu sein für eine antiatherogene Therapie.

Aber auf der Basis dieser Ergebnisse könnte die Entwicklung von selektiven Retinsäurerezeptoragonisten, die die Hochregulierung antiatherogener Gene fördern,

Zusammenfassung

ohne jedoch den Triglyceridspiegel zu beeinflussen, ein nützliches Mittel für die Behandlung oder Vorbeugung von Arteriosklerose sein.

7 Literaturangabe

Abe-Dohmae, S., Suzuki, S., Wada, Y., Aburatani, H., Vance, D.E., Yokoyama, S. (2000): Characterization of Apolipoprotein-Mediated HDL Generation Induced by cAMP in a Murine Macrophage Cell Line. *Biochemistry*, Vol. 39, 11092-11099.

Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B.B. (1979): Controlled synthesis of HbsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, Vol. 282, 615 – 616.

Allenby, G., Bocquel, M-T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P., Levin, A.A. (1993): Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids. *Biochemistry*, Vol. 90, 30-34.

Allenby, G., Janocha, R., Kazmer, S., Speck, J., Grippo, J.F., Levin, A.A. (1994): Binding of 9-cis-Retinoic Acid and All-trans-Retinoic Acid to Retinoid Acid Receptors α, β, γ . *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 24, 16689-16695.

Ammala, C., Moorhouse, A., Gribble, F., Ashfield, R. Proks, P., Smith, P.A., Sakura, H., Coles, B., Ashcroft, S.J., Ashcroft, F.M. (1996): Promiscuous coupling between the sulphonylurea receptor and inwardly rectifying potassium channels. *Nature*, Vol. 379, 545-548.

Annilo, T., Tammur, J., Hutchinson, A., Rzhetsky, A., Dean, M., Allikmets, R. (2001): Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4. *Cytogenet. Cell Genet.*, Vol. 94, 196-201.

Assmann, G., Cullen P., Schulte, H. (2002): Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation*, Vol. 105, 310-315.

Assmann, G., Smootz, E., Adler, K., Capurso, A., Oette, K. (1977): The Lipoprotein Abnormality in Tangier Disease. Quantification of Apoproteins. *J. Clin. Invest.*, Vol. 59, 565-575.

Attie, A.D., Kastelein, J.P., Hayden, M.R. (2001): Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, Vol. 42, 1717-1726.

Axelsson, M. et Larsson, O. (1996): 27-Hydroxylated low density lipoprotein (LDL) cholesterol can be converted to 7 α ,27-dihydroxy-4-cholesten-3-one (cytosterone) before suppressing cholesterol production in normal human fibroblasts. Evidence that an altered metabolism of ldl cholesterol can underline a defective feedback control in malignant cells. *J. biol.Chem.*, Vol. 31, 12724 – 12736.

Barth, N., Langmann, T., Schölmerich, J., Schmitz, G., Schäffler, A. (2002): Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 (*apM-1*) promoter: role of SP1/SP3 and TNF- α as regulatory pathways. *Diabetologia*, Vol. 45, 1425-1433.

- Bauer, B.E., Wolfger, H., Kuchler, K. (1999): Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1461, 217-236.
- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in Sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, Vol. 290, 1771-1775.
- Bertrand, M.E, Simons, M.L., Fox, K.A.A., et al. Management of Acute Coronary Syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2002; Vol. 23, 1809-1840.
- Björkhem, I. et Boberg, K.M. (1994): Inborn errors in bile acid biosynthesis and storage of sterols other than cholesterol. In: *The metabolic basis of Inherited Disease*. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (Hrsg.). McGraw-Hill, New York., 2073 –2100.
- Blaner, W.S., Olson, J.A. (1994): Retinol and retinoic acid metabolism. In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman (Hrsg): *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*. Verlag Raven Press, New York. S. 229-256.
- Blomhoff, R., Green, M.H., Norum, K.R. (1992): Vitamin A: Physiological and biochemical processing. *Annu. Rev. Nutr.*, Vol. 12, 37-57.
- Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Büchler, C., Porsch-Özcürümez, M., Kaminski, W.E., Hahmann, H.W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K.J. and Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat.Genet.* 22, 347-351.
- Bondjers, Julius, Kendall, Olsson: *Atherosclerosis and Its Complications: The Possible Effects of β -Blockade, Supplement to Circulation*, American Heart Association, Vol. 84, Nr.6, Dec.1991.
- Bonne-Tamir, A., DeStefano, A.L., Briggs, C.E., Adair, R., Franklyn, B., Weiss, S., Korostishevsky, M., Frydman, M., Baldwin, C.T., Farrer, L.A. (1996): Linkage of congenital recessive deafness (gene DFNB10) to chromosome 21q22.3. *Am. J.Hum.Genet.*, Vol. 58, 1254-1259.
- Borst, P., Zelcer, N., and van Helvoort, A., (2000). ABC transporters in lipid transport. *Biochim.Biophys.Acta*, Vol. 1486, 128-144.
- Broccardo, C., Luciani, M.-F., Chimini, G. (1999): The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1461, 395-404.
- Broccardo, C., Osorio, J., Luciani, M-F., Schriml, L.M., Prades, C., Shulenin, S., Arnould, E., Naudin, L., Lafargue, C., Rosier, C., Jordan, B., Mattei M.G., Dean, M., Denèfle, P., Chimini, G. (2001): Comparative analysis of the promoter structure and genomic organization of the human and mouse ABCA1 gene encoding a novel ABCA transporter. *Cytogenet Cell Genet*, Vol. 92, 264-270.

- Brockes, J.P. (1989): Retinoids, homebox genes, and limb morphogenesis. *Neuron*, Vol. 2, 1285-1294.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., Loubser, O., Ouelette, B.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, s., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J. and Hayden, M.R. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.*, Vol. 22, 336-345.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1983): Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for Cholesterol Deposition in Atherosclerosis. *Ann. Review Biochem.*, Vol. 52, 223 – 261.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, Vol. 232, 34-47.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1997): The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, Vol. 89, 331-340.
- Bucher, N.L., Overath, P., Lynen, F. (1960): Beta-Hydroxy-beta-methyl-glutaryl Coenzyme A reductase, cleavage and condensing enzymes in relation to cholesterol formation in rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 40, 491-501.
- Buechler, C., Ritter, M., Evelyn, O., Langmann, T., Klucken, J., Schmitz, G. (2000): Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro-and antiinflammatory stimuli. *The Journal of Leucocyte Biology*. Vol. 67, 97-103.
- Bustin, S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Molecular Endocrinology*, Vol. 25, 169-193.
- Buttgereit, F., Burmester G.R., Brand, M.B. (2000): Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol. Today*, Vol. 21, 194-199.
- Cali, J.J., Russel, D.W. (1991): Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reactions in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, 7774 – 7778.
- Cao, G., Beyer, T.P., Yang, X.P., Schmidt, R.J., Zhang, Y., Bensch, W.R., Kauffman, R.F., Gao, H., Ryan, T.P., Liang, Y., Eacho, P.I., Jiang, X.-C. (2002): Phospholipid Transfer Protein Is Regulated by Liver X Receptors in Vivo. *J. Biol. Chem.*, Vol 277, No. 42, 29561-39565.
- Cavelier, L., Qiu, Y., Bielicki, J.K., Veena, A., Cheng, J-F., Rubin, E.M. (2001): Regulation and Activity of the Human ABCA1 Gene in Transgenic Mice. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276. No. 21, 18046-18051.
- Chen, H., Rossier, C., Lalioti, M.D., Lynn, A., Chakravarti, A., Perrin, G., Antonarakis, S.E. (1996): Cloning of the cDNA for a Human Homologue of the Drosophila White Gene and Mapping to Chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.*, Vol. 59,66-75.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate-phenol-choloroform extraction. *Anal. Biochem.*, Vol. 162, 156-159.

Clagett-Dame et M., De Luca, H.F. (2002): The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu. Rev. Nutr.*, Vol. 22, 347-381.

Claudel, T., Leibowitz, M.D., Fiévet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J.J., Torpier, G., Lobaccaro, J.-M., Paterniti, J.R., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A., Auwerx, J. (2001): Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *PNAS*, Vol. 98, No. 5, 2610-2615.

Coberly, S., Lammer, E., Alaskar, M. (1996): Retinoic acid embryopathy: case report and review of literature. *Pediatr. Pathol. Lab. Med.*, Vol. 16, 823-836.

Conrad, P.A., Smart, E.J., Ying, Y.-S., Anderson, R.G., Bloom, G.S. (1995): Caveolin Cycles between Plasma Membrane Caveolae and the Golgi Complex by Microtubule-dependent and Microtubule-independent Steps. *J. Cell Biol.*, Vol. 131, No. 6, 1421-1433.

Costet P., Lalanne, F., Gerbod-Giannone, M.C., Molina, J.R., Fu, X., Lund, E.G., Gudas, L.J., Tall, A.R.(2003): Retinoic Acid Receptor-Mediated Induction of ABCA1 in Macrophages, *Molecular and Cellular Biologie*, Vol. 23, S.7756-7766.

Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent Transactivation of the *ABC1* promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor. *J.Biol.Chem.*, Vol. 275, 28240-28245.

Crawford, A.R., Smith, A.J., Hatch, V.C., Oude-Elferink, R.P., Borst, P., Crawford, J.M. (1997): Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on *mdr2* or *MDR3* P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *J. Clin. Invest.*, Vol. 100: 2562-2567.

Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., Wu, R.L. (1997): Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila* white gene. *Gene*, Vol. 185, 77-85.

Cserepes, J., Szentpétery, Z., Seres, L., Özvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Váradi, A., Sarkadi, B., Elkind, N.B. (2004): Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 320, 860-867.

Cullum, M.E., Zile, M.H. (1985): Metabolism of all-trans-retinoic acid and all-trans-retinyl acetate. Demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J.Biol.Chem.*, Vol. 260, 10590-10596.

Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. (2001): The Human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, Vol. 42, 1007 – 1017.

De Baker G., Ambrosioni, C., Borch-Johnson, K., et al. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* 2003; *Vol. 24*, 1601 – 1610.

De Luca, L.M. (1991): Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *The FASEB Journal*, *Vol. 5*, 2924-2933.

De Vree, J.M., Jacquemin, E., Sturm, E., Cresteil, D., Bosma, P.J., Aten, J., Deleuze, J.F., Desrochers, M., Burdelski, M., Bernard, O., Oude Elferink, R.P., and Hadchouel, M. (1998). Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *Vol. 95*, 282-287.

Eckhoff, C., Nau, H. (1990): Vitamin A supplementation increases levels of retinoic acid compounds in human plasma: possible implications for teratogenesis. *Arch. Toxicol.*, *Vol. 64*, 502-503.

Engel, T., Lorkowski, S., Lueken, A., Rust, S., Schlüter, B., Berger, G., Cullen, P., Assmann, G. (2001): The Human ABCG4 Gene Is Regulated by Oxysterols and Retinoids in Monocyte-Derived Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, *Vol. 288*, 483-488.

Eskild, W., Hansson, V.C. (1994) : Vitamin A function in the reproductive organs. Blomhoff, R. (Hrsg): *Vitamin A in health and disease*, Verlag Dekker, New York, 531-559.

Felgner P.L. et al. (1987): Lipofectin : A highly efficient, lipid-mediated DNA/transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *Vol. 84*, 7413 – 7417.

Fell, H.B., Mellanby, E. (1953): Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. *J. Physiol.*, *Vol. 119*, 470-488.

Fielding, C.J., Fielding, P.E. (1997): Intracellular Cholesterol transport. *J.Lipid.Res.*, *Vol. 38*, 1503-1521.

Francis, Robert: *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis and Endothelial Function*, New York, Basel, Hong Kong, 1992.

Garuti, R., Croce, M.A., Piccinini, L., Tiozzo, R., Bertolini, S., Calandra, S. (2002): Functional analysis of the promoter of human sterol 27-hydroxylase gene in HepG2 cells. *Gene*, *Vol. 283*, 133-143.

Gerrity, R.G. (1981): The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am. J. Pathol.*, *Vol. 103*, 181 – 190.

Gibbons, R.J., Abrams, J., Chatterjee K., et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina-summary article: a report of the American college of Cardiology/American Heart association Task Force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina). *J. Am Coll Cardiol.* 2003, *Vol. 41*, 159 – 68.

Gohlke, Helmut und Kübler, Wolfgang: Atherogenese – Von der Pathogenese zur Sekundärprävention, Zeitschrift für Kardiologie, Band 91, Supplement 2, 2002, II/25-29.

Grefhorst, A., Elzinga, B.M., Voshol, P.J., Plösch, T., Kok, T., Bloks, V.W., van der Sluijs, F.H., Haveskes, L.M., Romijn, J.A., Verkade, H.J., Kuipers, F. (2002): Stimulation of Lipogenesis by Pharmacological Activation of the Liver X Receptor Leads to Production of Large, Triglyceride-rich Very Low Density Lipoprotein Particles. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, No. 37, 34182-34190.

Hamm, C.W. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS). Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiol* 2004; Vol. 93, 324-341.

Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.-F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.-M., Devaux, P.F., McNeish, J., Marguet, D., Chimini, G. (2000): ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature Cell Biology*, Vol. 2, 399-406.

Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.-S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.-K., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., Schudy, A., Zimmermann, W., Rosenthal, A., Kudoh, J., Shibuya, K., Kawasaki, K., Asakawa, S., Shintani, A., Sasaki, T., Nagamine, K., Mitsuyama, S., Antonarakis, S.E., Minoshima, S., Shimizu, N., Nordsiek, G., Hornischer, K., Brandt, P., Scharfe, M., Schön, O., Desario, A., Reichelt, J., Kauer, G., Blöcker, H., Ramser, Heery, D.M., Pierrat, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R. (1994): Homo- and heterodimers of the retinoid X receptor (RXR) activate transcription in yeast. *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No. 5, 726-731.

Hattori, J., Beck, A., Klages, S., Hennig, S., Riesselmann, L., Dagand, E., Haaf, T., Wehrmeyer, S., Borzym, K., Gardiner, K., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., Reinhardt, R., Yaspo, M.-L. (2000): The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, Vol 405, 311-319.

Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J.: Dyck, J.A., Stein, R.B., Eichele, G., Evans, R.M., Thaller, C. (1992): 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell*, Vol. 68, 397-406.

Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu.Rev.Cell.Biol.*, Vol. 8, 67-113.

Higgins, C.F., Gallagher, M.P., Mimmack, M.L., and Pearce, S.R. (1988). A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *Bioessays*, Vol. 8, 111-116.

Huang, M.E., Ye, Y.C., Chen, S.R., Chai, J.R., Lu, J.X., Zhao, L., Gu, L.J., Wang, Z.Y. (1998): Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, Vol. 72, 567-572.

Irvine, Page: Chemistry Of Lipides As Related To Atherosclerosis, Springfield, 1957.

Jacqemin, E., de Vree, J.M., Cresteil, D., Sokal, E.M., Sturm, E., Dumont, M., Scheffer, G.L., Paul, M., Burdelski, M., Bosma, P.J., Bernard, O., Hadchouel, M. and Elferink, R.P. (2001). The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*, Vol. 120, 1448-1458.

Kaartinen, Maija: Mast Cells In The Human Arterial Intima, Implications For Atherosclerosis And Its Complications, Wihuri Research Institute, Helsinki, Finland, 1996.

Kielar, D., Dietmaier, W., Langmann, T., Charalampos, A., Probst, M., Naruszewicz, M., Schmitz, G. (2001): Rapid Quantification of Human ABCA1 mRNA in Various Cell Types and Tissues by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Clinical Chemistry* 47:12, 2089-2097.

Kielar, D., Kaminski, W.E., Liebisch, G., Piehler, A., Wenzel, J.J, Möhle, C., Heimerl, S., Langmann, T., Friedrich, S.O., Böttcher, A., Barlage, S., Drobnik, W., Schmitz, G. (2003): Adenosine Triphosphate Binding Cassette (ABC) Transporters are expressed and regulated during terminal keratinocyte differentiation: A potential role for ABCA7 in epidermal lipid reorganisation. *The Journal of Investigate Dermatology*, Vol. 121, NO.3, September 2003, 465-474.

Klein, I., Sarkadi, B., Váradi, A. (1999): An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1461, 237-262.

Klucken, J., Buchler, C., Orso, E., Kaminski, W.E., Porsch-Özcürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., and Schmitz, G. (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, Vol. 97, 817-822.

Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R. G., Gruenberg, J. (1999): Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biol.*, Vol. 1, 113-118.

Kochhar, D.M., Jiang, H., Penner, J.D., Johnson, A.T., Chandraratna, R.A. (1998): The use of a retinoid receptor antagonist in a new model to study vitamin A dependent developmental events. *Int.J.Dev.Biol.*, Vol. 42, 601-608.

Konta, T., Xu, Q., Furu, A., Nakayama, K., Kitamura, M. (2001): Selective Roles of Retinoic Acid Receptor and Retinoid X Receptor in the Suppression of Apoptosis by All-trans-Retinoic Acid. *JBC Papers in Press*, Vol. 276, No. 16, 12697-12701.

Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Chen, M., Castrillo, A., Repa, J., Wilpitz, D., Mangelsdorf, D., Tontonoz, P. (2003): The Phospholipid Transfer Protein Gene Is a Liver X Receptor Target Expressed by Macrophages in Atherosclerotic Lesions. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 23, No. 6., 2182-2191.

Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P. (2000): LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *PNAS*, Vol. 98, No. 2, 507-512.

Langmann, T., Aslanidis, C., Schuierer, M., Schmitz, G. (1996): Differentiation-Dependent Expression of a Human Carboxylesterase in Monocytic Cells and Transcription Factor Binding to the Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 230, 215-219.

Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E., and Schmitz, G. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): Evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 257, 29-33.

Langmann, T., Liebisch, G., Moehle, C., Schifferer, R., Dayoub, R., Heiduczek, S., Grandl, M., Dada, A., Schmitz, G. (2005): Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1740, p.155 – 161.

Langmann, T., Mauerer, R., Schmitz, G. (2006): Human ATP-Binding Cassette Transporter TaqMan Low-Density Array: Analysis of Macrophage Differentiation and Foam Cell Formation. *Clinical Chemistry*, Vol. 52, No. 2, 310-313.

Langmann, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., Schmitz, G. (2003): Real-Time Reverse Transcription-PCR Expression Profiling of the Complete Human ATP-Binding Cassette Transporter Superfamily in Various Tissues. *Clinical Chemistry*, Vol. 49:2, 230-238.

Langmann, T., Porsch-Özcürümez, M., Heimerl, S., Probst, M., Möhle, C., Taher, M., Borsukova, H., Kielar, D., Kaminski, W.E., Dittrich-Wengenroth, E., Schmitz, G. (2002): Identification of Sterol-independent Regulatory Elements in the Human ATP-binding Cassette Transporter A1 Promoter. Role of Sp1/3, E-box binding factors, and an Oncostatin M-Responsive Element. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 17, 14443-14450.

Langmann, T., Porsch-Özcürümez, M., Unkelbach, U., Klucken, J., and Schmitz, G., 2000. Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, Vol. 1494, 175-180.

Langmann, T., Schumacher, C., Morham, S.G., Honer, C., Heimerl, S., Moehle, C., Schmitz, G. (2003): ZNF202 is inversely regulated with its target genes ABCA1 and apoE during macrophage differentiation and foam cell formation. *JLR Papers in Press*, Vol. 44, 969-977.

LaRosa, J. C., He, J., Vupputuri, S. (1999): Effect of Statins on Risk of Coronary Disease: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *JAMA*, Vol. 282 (24), 2340 – 2346.

- Lawn, R.M, Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., Oram, J.F. (1999): The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol 104, No. 8, R25-R31.
- Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A.K., Salen, g., Dean, M., and Patel, S.B. (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat.Genet.*, Vol. 27, 79-83.
- Levin, A.A., Sturzenbecker, L.J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A. (1992): 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature*, Vol. 355, 359-361.
- Liao, H., Langmann, T., Schmitz, G., Zhu, Y. (2002): Native LDL Upregulation of ATP Binding Cassette Transporter –1 in Human Vascular Endothelial Cells. *Arterioscleros.Thromb.Vasc.Biol.*, Vol. 22, 127-132.
- Liu, G.J., Simpron, A.M., Swan, M.A., Tao, C., Tuch, B.E., Crawford, R.M., Jovanovic, A., Martin, D.K. (2006): ATP-sensitive potassium channels induced in liver cells after transfection with insulin cDNA and the GLUT 2 transporter regulate glucose-stimulated insulin secretion. *The FASEB Journal*, Vol. 17, 1682-1684.
- Liu, P., Li, W.-P., Machleidt, T., Anderson, R.G.W. (1999): Identification of caveolin-1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. *Nature Cell Biol.*, Vol. 1, 369-375.
- Lorkowski, S., Kratz, M., Wenner, C., Schmidt, R., Weitkamp, B., Fobker, M., Reinhardt, J., Rauterberg, J., Galinski, E.A., Cullen, P. (2001): Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter Gene ABCG1 (ABC8) in Tangier Disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 283, 821-830.
- Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C., Petkovich, M. (2000): Cytochrome P450RAI (CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol. Endocrinol.*, Vol. 14, 1483-1497.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, 265 – 275.
- Lu, K., Lee, M.H., and Patel, S.B. (2001). Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends Endocrinol.Metab.*, Vol. 12, 314-320.
- Luciani, M.-F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M.G., Chimini, G. (1994): Cloning of Two Novel ABC Transporters Mapping on Human Chromosome 9. *Genomics*, Vol. 21, 150-159.
- Minami, T., Aird, W.C. (2005): Endothelial Cell Gene Regulation. *Trends Cardiovasc. Med.*, Vol. 15, 174-184.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, Vol. 155, 335 - 350.

Nagel, G. (1999): Differential function of the two nucleotide binding domains on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1461, 263-274.

Nakamura, M., Uene, S., Sano, A., Tanabe, H. (1999): Polymorphisms of the human homologue of the Drosophila white gene are associated with mood and panic disorders. *Molecular Psychiatry*, Vol. 4, 155-162.

Nau, H. (1993): Embryotoxicity and teratogenicity of topical retinoic acid. *Skin. Pharmacolog.*, Vol. 6, Suppl. 1, 35-44.

Nau, H., Chahoud, I., Dencker, L. (1998): Teratogenicity of Vitamin A and retinoids. In *Vitamin A in Health and Disease*. Blomhoff (Hrsg), 615-663.

Okazaki, H., Osuga, J, Tsukamoto, K., Isoo, N., Kitamine, T., Tamura, Y., Tomita, S., Sekiya, M., Yahagi, N., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Shimano, H., Kimura, S., Nagai, R., Yamada, N., Ishibashi, S. (2002): Elimination of Cholesterol Ester from Macrophage Foam Cells by Adenovirus-mediated Gene Transfer of Hormone-sensitive Lipase. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, No. 35., 31893-31899.

Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R., Wade, D.P. (2000): ABCA1 Is the cAMP-inducible Apolipoprotein Receptor That Mediates Cholesterol Secretion from Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 44, 34508-34511.

Orsó, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Böttcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Götz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., Spruss, T., Luciani, M.-F., Rothe, G., Lackner, K.J., Chimini, G., Schmitz, G. (2000): Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nature Genetics*, Vol. 24, 192-196.

Palczewsky, K., Saari, J.C. (1997): Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.*, Vol. 7, 500-504.

Porsch-Özcürümez, M., Langmann, T., Heimerl, S., Borsukova, H., Kaminski, W.E., Drobnik, W., Honer, C., Schumacher, C., Schmitz, G.(2001): The Zinc Finger Protein 202 (ZNF202) is a Transcriptional Repressor of ATP Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 Gene Expression and a Modulator of Cellular Lipid Efflux. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 276, No. 15, 12427-12433.

Özvegy, C., Litman, T., Szakás, G., Nagy, Z., Bates, S. (2001): Functional Characterization of the Human Multidrug Transporter ABCG2, Expressed in Insect Cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 285, 111-117.

Ray, W.J., Bain, G., Yao, M., Gottlieb, D.I. (1997): CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced in retinoic acid and defines a new family. *J.Biol.Chem.*, Vol. 272, 18702-18708.

Regazzi, M.B., Iacona, I., Gervasutti, C., Lazzarino, M., Toma, S. (1997): Clinical pharmacokinetics of Tretinoin. *Chlin. Pharmacokinet.*, Vol. 32, 382-402.

- Remaley, A.T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., Peterson, K.M., Koch, C., Arnould, I., Prades, C., Duverger, N., Funke, H., Assman, G., Dinger, M., Dean, M., Chimini, G., Santamarina-Fojo, S., Fredrickson, D.S., Denevle, P., Brewer, H.B. (1999): Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): Genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *PNAS*, Vol. 96, No. 22, 12685-12690.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.-M., Shimomura, i., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Mangelsdorf, D.J. (2000): Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes and Development*, Vol. 14, 2819-2830.
- Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J. (2000): The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Ann.Rev.Cell.Dev.Biol.*, Vol. 16, 459-481.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.-M., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., Mangelsdorf, D.J. (2000): Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science*, Vol. 289, 1524-1429.
- Ries, S., Büchler, C., Langmann, T., Fehringer, P., Aslanidis, C., Schmitz, G. (1998): Transcriptional regulation of lysosomal acid lipase in differentiating monocytes is mediated by transcription factors Sp1 and AP-2. *J. Lipid Res.*, Vol. 39, 2125-2134.
- Rothblat, G., de la Llera-Moya, M., Atger, V., Kellner-Weibel, G., Williams, D.L., Phillips, M.C. (1999): Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of Lipid Research*, Vol. 40, 781-796.
- Rose, J.K., Buonocore, L., Whitt, M. (1991): A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *BioTechniques*, Vol. 10, 520 – 525.
- Ross, R. (1999): Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*, Vol. 340, 115 – 126.
- Ross, R. (1995): Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.*, Vol. 57, 791 – 804.
- Ross, A.C. et Hämmerling, U.G. (1994): Retinoids and the immune system. In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman (Hrsg): *The Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine*. Verlag Raven Press, New York, 521 – 543.
- Russel, D.W. et Setchell, K.D.R. (1992) : Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*, Vol. 31, 4737 – 4749.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.-C., Deleuze, J. F., Brewer, H.B., Duverger, N., Denevle, P., Assmann, G. (1999): Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature Genetics*, Vol. 22, 352-355.

- Rust, S., Walter, M., Funke, H., Von Eckardstein, A., Cullen, P., Kroes, H.Y., Hordijk, R., Geisel, J., Kastelein, J., Molhuizen, H.O., Schreiner, M., Mischke, A., Hahmann, H.W. and Assmann, G. (1998). Assignment of Tangier disease to chromosome 9q31 by a graphical linkage exclusion strategy. *Nat.Genet.*, Vol. 20, 96-98.
- Sanderson R. (1982): Separation of different kinds of nucleated cells from blood by centrifugation elutriation. In: Pretlow TG, Pretlow T (Hrsg.). *Cell separation methods and selected applications*. San Diego, Academic Press, 153 – 154.
- Saurin, W., Hofnung, M., and Dassa, E. (1999). Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J.Mol.Evol.*, Vol. 48, 22-41.
- Schmitz, G., Assmann, G., Robenek, H., Brennhäusen, B. (1985): Tangier disease: A disorder of intracellular membrane traffic. *Medical Sciences*, Vol. 82, 6305-6309.
- Schmitz, G., Kaminski, W.E., and Orso, E. (2000). ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr.Opin.Lipidol.*, Vol. 11, 493-501.
- Schmitz, G., Langmann, T. (2005): Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1735, 1-19.
- Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J.lipid Res.*, Vol. 42, 1513-1520.
- Schmitz, G. and Torzewski, M. (2001): Atherosclerosis is an inflammatory disease. In: *Inflammatory and infectious basis of atherosclerosis*, Basel, Boston, Berlin. Metha, J. (Hrsg), 1-14.
- Schwartz, K., Lawn, R.M., and Wade, D.P. (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, Vol. 274, 794-802.
- Schwartz, C.J., Wagner W.D., Wissler, R.W. (1994): A definition of initial fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis. American Heart Association. *Circulation* Vol. 89, 2462 – 2478.
- Schwarz, M, Lund, E.G., Russell, D.W. (1998a): Two 7 α -hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol.*, Vol. 9, 113 – 118.
- Schwarz, M, Russell, D.W., Dietschy, J.M., Turley, S.D. (1998b): Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 α -hydroxylase- deficient mice does not lead to diminished cholesterol turnover or to hypercholesterinemia. *J. Lipid Res.*, Vol. 39, 1833 – 1843.
- Scott, H.S., Kudoh, J., Wattenhofer, M., Shibuya, K., Berry, A., Chrast, R., Guipponie, M., Wang, J., Kawasaki, K., Asakawa, S., Minoshima, S., Younus, F., Mehdi, S.Q., Radhakrishna, U., Pappasavvas, M.-P., Gehrig, C., Rossier, C., Korostishevsky, M., Gal, A., Shimizu, N., Bonne-Tamir, B., Antonarakis, S.E. (2001): Insertion of β -satellite repeats identifies a transmembrane protease causing both congenital and childhood onset autosomal recessive deafness. *Nature Genetics*, Vol. 27, 59-63.

Segev, H., Honigman, A., Rosen, H., Leitersdorf E. (2001): Transcriptional regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) and promoter mapping. *Atherosclerosis*, Vol. 156, 339-347.

Senior, A., Gadsby, D. (1997): ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Cancer biology*, Vol. 8, 143 – 150.

Shek, A., Ferrill, M.J. (2001): Statin-fibrate combination therapy. *The Annals of Pharmacotherapy*, Vol. 35, 908 – 917.

Shenefelt, R.E. (1972): Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology*, Vol. 5, 103-118.

Shimbo, D., Chaplin, W., Crossmann, D., Haas, D., Davidson, K.W.(2005): Role of Depression and Inflammation in Incident Coronary Heart Disease Events. *Am.J.Cardiol.*, Vol. 96, 1016-1021.

Siperstein, M.D., Fagan, V.M.(1966): Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *J.Biol.Chem.*, Vol. 241, 602-609.

Smith, S.C. et al. (2001): AHA/ACC Guidelines for preventing heart attack in patients with atherosclerotic cardiovascular disease: 2001 update. A statement for health care professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*, Vol 104, 1577-1579.

Soprano, D.R., Qin, P., Soprano, K.J. (2004): Retinoic acid receptors and cancers. *Annu.Rev.Nutr.*, Vol. 24, 201 – 221.

Standeven, A.M., Beard, R.L., Johnson, A.T., Boehm, M.F., Escobar, M., Heyman, R., Chandraratna, R.A.S. (1996): Retinoid-Induced Hypertriglyceridemia in Rats is Mediated by Retinoid Acid Receptors. *Fundamental Applied Toxicology*, Vol. 33, No. 0164, 264-271.

Statistisches Bundesamt:

www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/internet/DE/Content/Publikationen/Querschnittsveroeffentlichungen/WirtschaftStatistik/Gesundheitswesen/Todesursachen2004

Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisley, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N.B., Gardiner, R.M., and Thompson, R.J. (1998). A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat.Genet.*, Vol. 20, 233-238.

Stravitz, R.T., Vlahcevic, Z.R., Russell, T.L., Heizer, M.L., Avadhani, N.G., Hylemon, P.B. (1996): Regulation of Sterol 27-Hydroxylase and an Alternative Pathway of Bile Acid Biosynthesis in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 57, 337 – 347.

Tang, G.W., Russel, R.M. (1990): 13-cis-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J.Lipid.Res.*, Vol. 31, 175-182.

- Tall, A.R., Costet, P., Wang, N. (2002): Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J. Clin. Invest.*, Vol. 110, No. 7, 899-904.
- Thompson, J.N., Howell, J.M., Pitt, G.A., McLaughlin, C.I. (1969): The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br.J.Nutr.*, Vol. 23, 471-490.
- Uehara, Y., Engel, T., Li, Z., Goepfert, C., Rust, S., Zhou, X., Langer, C., Schachtrup, C., Wiekowski, J., Lorkowski, S., Assmann, G., von Eckardstein, A. (2002): Polyunsaturated Fatty Acids and Acetoacetate Downregulate the Expression of the ATP-Binding Cassette Transporter A1. *Diabetes*, Vol. 51, 2922-2928.
- Underwood, B.A.(1984): Vitamin A in an animal and human nutrition. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (Hrsg): *The Retinoids*. Verlag Academic Press, Orlando, 281-392.
- Van de Werf, F., Ardissino, D., Betriu, A., et al. Task Force on the Management of Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. 2003; Vol. 24, 28 – 66.
- Van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P., van Meer, G. (1996): MDR1 p-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 p-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, Vol. 87, 507-517.
- Vaughan, C.J., Murphy, M.B., Buckley, B.M. (1996): Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, Vol. 348, 1079 – 1082.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., Tontonoz, P. (2000b): Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *PNAS*, Vol. 97, No. 22, 12097-12102.
- Venkateswaran, A., Repa, J.J., Lobaccaro, J.-M., Bronson, A., Mangelsdorf, D.J., Edwards, P.A. (2000a): Human White/Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-loaded Macrophages. *The Journal of Biol. Chem.*, Vol. 275, No. 19, 14700-14707.
- Veske, A., Oehlmann, R., Younus, F., Mohyuddin, A., Müller-Myhsok, B., Mehdi, S.Q., Gal, A. (1996): Autosomal recessive non-syndromic deafness locus (DFNB8) maps on chromosome 21q22 in a large consanguineous kindred from Pakistan. *Human Molecular Genetics*, Vol. 5, No. 1, 165-168.
- Vu-Dac, N., Gervois, P., Torra, I.P., Fruchart, J-C., Kosykh, V., Kooistra, T., Princen, H., Dallongeville, J., Staels, B. (1998): Retinoids Increase Human Apo C-III Expression at the Transcriptional Level via the Retinoid X Receptor. *J.Clin. Invest.*, Vol. 102, No. 3, 625-632.
- Wagsater, D., Dimberg, J., Sirsjo, A. (2003): Induction of ATP-binding cassette A1 by all-trans retinoic acid: possible role of liver X receptor alpha. *Int.J.Mol.Med.*, Vol. 11, 419 – 423.
- Wald, G. (1934): Carotenoids and Vitamin A cycle in vision. *Nature*, Vol. 134, 65.

- Wald, G. (1968): Molecular basis of visual excitation. *Science*, Vol. 162, 230-239.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.*, Vol. 1, 945-951.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., Tall, A.R. (2004): ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *PNAS*, Vol. 101, No. 26, 9774-9779.
- Weber, Peter und Leaf, Alexander (Hrsg): *Atherosclerosis Reviews*, New York 1991, Vol. 23.
- Weber, Peter und Leaf, Alexander (Hrsg): *Atherosclerosis Reviews, Atherosclerosis: Cellular Interactions, Growth Factors, and Lipids*, New York 1993.
- Weixel, K.M., Bradbury, N.A. (2000): The carboxyl terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator binds to AP-2 clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.*, Vol. 275, 3655-3660.
- Wenzel, J., Kaminski, W.E., Piehler, A., Heimerl, S., Langmann, T., Schmitz, G. (2003): ABCA10, a novel cholesterol-regulated ABCA6-like ABC transporter. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol. 306, 1089-1098.
- Wilson, P.W., D'Agostino, R.B., Levy D., Belanger, A.M., Silberhartz, H., Kannel, W.B. (1998): Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, Vol. 97, 1837-1847. Framingham-Studie
- Wilson, J.G., Roth, C.B., Warkany (1953): An analysis of the syndrome of malfunction induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of Vitamin A at various times during gestation. *Am.J.Anat.*, Vol. 92, 189-217. x
- Wolbach, S.B., Howe, P.R. (1925) : Tissue changes following deprivation of fat-soluble A Vitamin. *J. Exp. Med.*, Vol. 45, 753-778.
- Wu, C.-T., Budding, M, Griffen, M.S., Croop, J. (1991): Isolation and Characterisation of Drosophila Multidrug Resistance Gene Homologs. *Mol. Cell. Biol.*, Vol. 11, No. 8, 3940-3948.
- Wuttge, D.M., Romert, A., Eriksson, U., Törmä, H., Hansson, G.K., Sirsjö, A. (2001): Induktion of CD36 by all-trans retinoic acid: retinoic acid receptor signaling in the pathogenesis of atherosclerosis. *The FASEB Journal*, Vol. 15, 1221-1223.
- Xu, S., Laccotripe, M., Huang, X., Rigotti, A., Zannis, V.I., Krieger, M. (1997): Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: SR-B1, an HCL receptor that mediates selective lipid uptake. *J.Lipid.Res.*, Vol. 38, 1289-1298.
- Xue, J.C., Schwarz, E.J., Chawla, A., Lazar, M.A. (1996): Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPAR γ . *Mol.Cell.Biol.*, Vol. 4, 1567-1575.

Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., Kodama, T. (1998): Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Moll Life Sci.*, Vol. 54, 628 – 640.

Yang, J.B., Duan, Z.J., Yao, W., Lee, O., Yang, L., Yang, X.Y., Sun, X., Chang, C.C., Chang, T.Y., Li, B.L. (2001): Synergistic transcriptional activation of human Acyl-coenzyme A: cholesterol acetyltransferase-1 gene by interferon-gamma and all-trans-retinoic acid THP-1 cells. *J.Biol.Chem.*, Vol. 276, 20989 – 20998.

Yokoyama, S. (1998): Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim.Biophys.Acta.*, Vol. 1392, 1-15.

Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Naar, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1991): RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, Vol. 67, 1251-1266.

Zile, M.H. (1998): Vitamin A and embryonic development: An overview. *J.Nutr.*, Vol. 128, 455-458.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

22-OH-CH	22 Hydroxycholesterin
27-OH-CH	27 Hydroxycholesterin
9-cis RA	9-cis-Retinsäure
ABC8	ABCG1
acLDL	Acetylated low density lipoprotein
ATRA	All-Trans-Retinsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaPO ₄	Calciumphosphat
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CYP27 Gen	Sterol 27-Hydroxylase Gen
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagl´s Medium
DMSO Medium	Dimethylsullfoxyd Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (acid)
e-LDL	enzymatically modified low-density lipoprotein
EPA	Eicosapentaenoic acid
FKS	Fetales Kälberserum
GITC	Guanidinisothiocyant
hABCA1	humanes ABCA1
HEK 293	Human embryonal kidney cells
HepG2	Hepatocellular carcinoma, human
HMG-CoA	β -Hydroxy- β -Methyl-Glutaryl-Coenzym A
HNF4	Hepatozyten Zellkernfaktor 4
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LXR	Liver - X - Rezeptor
M-CSF	Monocyte colony stimulating factor
MEM Medium	Minimum essential Medium
MgCl	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
m-RNA	messenger RNA
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
NFY	Nuclear factor Y
nm	Nanometer
ox-LDL	Oxidiertes LDL
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
RAR	Retinsäurerezeptor
RAW 264.7 Zellen	Murine Makrophagen
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
RPMI Medium	Rosewell Park Memorial Institute Medium

Anhang

Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinoidrezeptor-Protein (Retinoid-X-Rezeptor)
Sek.	Sekunden
SRE	Sterol regulatory element
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
THP-1 Zellen	Humane monozytäre Leukämiezellen (human acute monocytic leukemia cell line)
TMDs	Transmembrandomänen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
U/min	Umdrehungen pro Minute
β -Gal	β -Galaktosidase

8.2 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Textstellen jeweils nach der Ausgabe gekennzeichnet habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Regensburg, den 14.08.2008

8.3 Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. Thomas Langmann für die interessante Themenstellung meiner Dissertation und die exzellente Betreuung, die sich insbesondere durch sein großes Interesse am Gelingen meiner Arbeit, Erreichbarkeit und unter anderem dadurch auszeichnete, dass er sich viel Zeit für die Beantwortung von Fragen nahm.

Für die wertvolle Unterstützung, Heranführung an die wissenschaftliche Tätigkeit und für viele praktische Ratschläge danke ich meinen ehemaligen Arbeitsteamkollegen Rania Dayoub, Christoph Möhle und den Medizinisch Technischen Assistenten Bettina Hartl, Manfred Haas und Wolfgang Hauer.

Allen weiteren nicht namentlich erwähnten Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern der Abteilung für klinische Chemie, die durch ihre Hilfe zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben, danke ich von Herzen.

8.4 Curriculum vitae

14.08.2008

Name: Susanne Elisabeth Heiduczek

Geburtsdatum: 18.07.1981

Persönliche Daten: Geboren am 18.07.1981 in Rotthalmünster
Familienstand: Ledig

Eltern: Johannes Heiduczek, OStR i.R.
Maria Heiduczek, StRin i.R.

Geschwister: Dr. Eva Köster, geb. Heiduczek, Juristin
Josef Heiduczek, Student der
Wirtschaftsmathematik

Schulbildung: 1987-1991 Grundschule Dietersburg
1991-2000 Gymnasium Pfarrkirchen

Schulabschluß: Abitur (Schnitt 1,5)

Studium: An der Universität Regensburg
WS 2000 - SS 2003 Vorklinikum Humanmedizin
WS 2003 - SS 2008 Universitätsklinikum Regensburg

Hochschulabschluß: SS 2008 mit der Note gut (Schnitt 2,5)