

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des Low-Density-Lipoprotein-Rezeptorsystems bei der  
Lykopin-Aufnahme in Endothelzellen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian Stührk

aus Lübeck

Datum der Promotion: 5.6.2016

## Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	4
1. Zusammenfassung .....	5
2. Einleitung .....	8
2.1 Problemstellung und Zielsetzung .....	8
2.2 Lykopin.....	9
2.3 Kardioprotektive Eigenschaften von Lykopin.....	10
2.4 Absorption und Transport von Lykopin im Blut.....	11
2.5 Lykopinstoffwechsel .....	12
3. Material und Methoden .....	14
3.1 Zellkultur .....	14
3.2 LDL-Präparation.....	14
3.3 Herstellung von Dil-LDL .....	15
3.4 Regulationsnachweis des LDLR durch LDL/LPDS-Stimulation.....	16
3.5 siRNA-Transfektion gegen den LDLR.....	17
3.6 siRNA-Transfektion gegen den LDLR und Dil-LDL-Stimulation .....	18
3.7 Zellyse .....	19
3.8 Proteinbestimmung.....	19
3.9 RNA-Isolation .....	20
3.10 DNase-Verdau und reverse Transkription .....	21
3.11 Real-time RT-PCR.....	22
3.12 Positivkontrolle für den Western Blot .....	23
3.13 Western Blot des LDL-Rezeptors.....	24
3.14 Lykopin-Supplementation.....	26
3.15 UV-HPLC-Bestimmung des Lykopingehalts im Plasma und LDL.....	27
3.16 Reinheitsbestimmung von Lykopin-supplementiertem LDL .....	29
3.17 Behandlung von HAEC mit Lykopin-FCS/-LDL.....	30
3.18 Bestimmung des Lykopingehalts in HAEC-Pellets.....	32
4. Ergebnisse .....	34
4.1 Regulation des LDLR in HAEC nach LDL/LPDS-Stimulation.....	34
4.2 Bestimmung der Effektivität unterschiedlicher siRNAs .....	35
4.3 FACS-Analyse transfizierter HAEC nach Dil-LDL-Stimulation.....	38

4.4	Plasma- und LDL-Lykopingehalt nach in-vivo Supplementation.....	40
4.5	Analyse der Reinheit von in-vivo Lykopin supplementiertem LDL.....	41
4.6	Stimulation von HAEC mit in-vivo Lykopin supplementiertem LDL.....	41
4.7	Lykopingehalt in FCS-Lykopin supplementierten HAEC .....	42
5.	Diskussion .....	47
6.	Literaturverzeichnis.....	56
7.	Eidesstattliche Versicherung.....	61
8.	Lebenslauf .....	62
9.	Danksagung.....	64

## Abkürzungsverzeichnis

BHT:	Butylhydroxytoluol
CD36:	Cluster of differentiation 36
Dil-Perchlorat:	1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Deoxyribonucleic acid
ECG-Medium:	Endothelial-cell-growth-Medium
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
FACS:	Fluorescence-activated cell sorting
FCS:	Fetal calf serum
HAEC:	Human aortic endothelial cell
HPLC:	High-performance liquid chromatography
HRP:	Horseradish peroxidase
IgG, M:	Immunglobulin G, M
LDL:	Low density lipoprotein
LDLR:	LDL-Rezeptor
LPDS:	Lipoprotein deficient serum
MeOH:	Methanol
mRNA:	Messenger ribonucleic acid
MTBE:	Methyl-tert-butylether
MWCO:	Molecular weight cut-off
oxLDL:	Oxidativ modifiziertes LDL
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PFA:	Paraformaldehyd
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
siRNA:	Small interfering ribonucleic acid
SR-BI:	Scavenger Rezeptor Klasse B I

# 1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit in der Todesursachenstatistik führend. Hauptursächlich an der Entstehung und Progression der Arteriosklerose beteiligt sind oxidativ modifizierte Lipoproteine. Karotinoide, insbesondere Lykopen, besitzen einen protektiven Effekt auf den Lipoprotein-Modifizierungsgrad. Ihre Verteilung in unterschiedlichen Geweben des humanen und tierischen Organismus, enterale Resorption, Transport- und Ausscheidungswege sind bekannt.

Die Resorption auf zellulärer Ebene ist bisher größtenteils ungeklärt. Endothelzellen bilden die Schnittstelle zwischen LDL-gebundenem Transport von Lykopen im Blut, der zellulären Resorption sowie intrazellulärer Wirkungsentfaltung. Sie sind darüber hinaus in der Krankheitsentstehung und Progression der Arteriosklerose und damit verbundener Pathologien involviert.

**Hypothese:** Bisher ist kein Zelloberflächenrezeptor, der an der Internalisierung von Karotinoiden in Endothelzellen beteiligt ist, beschrieben worden.

Die Verteilung des Lykopens auf unterschiedliche Lipoproteinklassen im Blut deutet auf eine zelluläre Aufnahme mittels Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor (LDLR) und Low-Density Lipoprotein (LDL) hin.

**Methode:** Primäre humane Aorten-Endothelzellen (HAEC) wurden bis zur Konfluenz von 80 % kultiviert. Die LDLR-mRNA-Expression wurde anschließend durch siRNA-Transfektion selektiv reduziert. Nach 24 Stunden Ruhephase wurden die Zellen mit einer 1 bzw. 5  $\mu\text{M}$  Lykopen-Konzentration für 48 Stunden behandelt. Die Lykopenkonzentration je  $10^6$  Zellen wurde per HPLC ermittelt. Die LDLR-mRNA-Expression und LDLR-Proteinmenge wurden durch Real-time RT-PCR und Western Blot bestimmt.

**Ergebnisse:** Die LDLR-mRNA-Expression war 72 Stunden nach siRNA-Transfektion in der 1 bzw. 5  $\mu\text{M}$  Lykopen-Gruppe auf  $69 \pm 31$  % bzw. 24 % reduziert. Die prozentuale Lykopenmenge je  $10^6$  HAEC in der 1 bzw. 5  $\mu\text{M}$  Lykopen-Gruppe sank auf  $55,64 \pm 27,76$  % bzw.  $59,74 \pm 6,10$  %. Die absolute Lykopenmenge sank von  $0,006 \pm 0,003$  auf  $0,004 \pm 0,003$  bzw. von  $0,025 \pm 0,01$  auf  $0,015 \pm 0,007$  nM/ $10^6$  Zellen. (Alle Angaben MW  $\pm$  SD, n = 3). Eine Reduktion des LDLR im Western Blot ließ sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nachweisen.

## **Diskussion:**

Die Lykopen-Aufnahme durch HAEC in-vitro scheint überwiegend über das LDL-Rezeptor-Liganden-System zu erfolgen. Wahrscheinlich erfolgt die in-vivo Versorgung humaner Endothelzellen mit Lykopen analog unseres Zellkulturmodells.

Die protektive Wirkung von Lykopen ist an ein funktionierendes Rezeptor-Liganden-System für die LDL-Clearance gekoppelt. So kann möglicherweise die akzelerierte Arteriosklerose bei familiärer Hypercholesterolämie mit einer zellulären antioxidativen Minderversorgung mit Lykopen verbunden sein.

Die relative Lykopenreduktion 72 Stunden nach siRNA-Transfektion ist größer als die zu diesem Zeitpunkt erreichte Reduktion der LDLR-mRNA-Expression und stellt wahrscheinlich das Resultat unterschiedlicher Expressionsreduktionen im Behandlungszeitraum dar. Die Versuchsergebnisse weisen eine hohe Schwankung auf. Zukünftige Versuche sollten mit einer höheren Lykopen-Endkonzentration und einer höheren n-Zahl durchgeführt werden.

## Summary

**Background:** Cardiovascular diseases are the main global cause of death. Arteriosclerosis is mainly promoted by oxidatively modified lipoproteins. Carotenoids, especially lycopene, have a protective effect on lipoprotein modification. Human and animal carotenoid tissue distribution, enteric resorption, transport and metabolisation are known. Yet cellular resorption is mostly unclear. Involved in development and progression of atherosclerosis and associated pathologies, endothelial cells represent the gateway between LDL bound blood transport of lycopene and cellular resorption with consecutive intracellular action.

**Hypothesis:** No cell surface receptor for the internalisation of carotenoids into endothelial cells has been described. Distribution of lycopene between different lipoprotein classes indicates cellular resorption via low density lipoprotein receptor (LDLR) and low density lipoprotein (LDL) pathway.

**Methods:** Primary human aortic endothelial cells (HAEC) were grown to 80 % confluency. LDLR mRNA expression was selectively reduced by a single siRNA transfection. After a 24 hour rest, cells were treated for 48 hours with either 1 or 5  $\mu\text{M}$  lycopene. The concentration of lycopene in  $10^6$  HAEC was determined by HPLC. LDLR mRNA expression and protein levels were investigated by real-time RT-PCR and western blot.

**Results:** LDLR mRNA expression 72 hours after siRNA transfection was reduced to  $69 \pm 31$  % and 24 % in the 1 and 5  $\mu\text{M}$  lycopene group, respectively. Relative cellular lycopene levels in  $10^6$  HAEC in the 1 and 5  $\mu\text{M}$  lycopene group were reduced to  $55,64 \pm 27,76$  % and  $59,74 \pm 6,10$  %, respectively. Absolute lycopene levels were reduced from  $0,006 \pm 0,003$  to  $0,004 \pm 0,003$  and from  $0,025 \pm 0,01$  to  $0,015 \pm 0,007$  nM/ $10^6$  cells, respectively (all data are mean  $\pm$  SD, n = 3) LDLR protein expression was reduced in western blot as well.

**Discussion:** In-vitro lycopene supply in HAEC is likely mediated by the LDLR/LDL system. Analogous to our cell culture model in-vivo lycopene supply of human endothelial cells is likely mediated by the LDLR/LDL system.

Protective effects of lycopene are closely tied to a functional receptor ligand system for LDL clearance. Accelerated atherosclerosis seen in familiar hypercholesterolemia may partially be caused by cellular deficiency of the antioxidant lycopene.

Relative lycopene reduction 72 hours after siRNA transfection was higher than corresponding LDLR mRNA expression levels. This may result from temporally variable reduction levels in mRNA expression during the course of the experiment. The results show a rather high variation. Future experiments should be done with a higher lycopene concentration and a higher number of experiments.

## 2. Einleitung

### 2.1 Problemstellung und Zielsetzung

Die weltweite Haupttodesursache stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Grundlage ist meist eine Arteriosklerose, an deren Entstehung und Progression vor allem oxidativ modifizierte Lipoproteine beteiligt sind. Einen protektiven Effekt auf den Modifizierungsgrad der Lipoproteine sowie positive Auswirkungen auf epidemiologische Parameter von Herz-Kreislauf-Erkrankungen haben Karotinoide und besonders Lykopen. Über den oxidativen Schutz der Lipoproteine hinaus scheint Lykopen einen großen Teil seiner Wirkung intrazellulär zu entfalten. Bisher sind die Gewebsverteilungen und die Stoffwechselwege im humanen und tierischen Organismus bekannt. Klarheit über den zellulären Resorptionsmechanismus von Lykopen und anderen Karotinoiden besteht jedoch nicht. Ein spezifischer, endothelialer Zelloberflächenrezeptor für die Internalisierung von Karotinoiden ist bisher nicht beschrieben worden.

Die Schnittstelle zwischen LDL-gebundenem Transport von Lykopen im Blut und der zellulären Resorption sowie einer möglichen intrazellulären Wirkungsentfaltung bilden Endothelzellen. Sie stellen in der Krankheitsentstehung und Progression der Arteriosklerose und damit verbundener Pathologien ein wichtiges Element dar.

Bei Watanabe Kaninchen, welche den LDLR nicht exprimieren, ließ sich die Progression der Arteriosklerose durch Supplementation von Lykopen im Gegensatz zum New Zealand Kaninchen, das über eine normale Lipoproteinrezeptorausstattung verfügt, nicht reduzieren.<sup>1,2</sup>

Ein funktionsfähiges LDL/LDLR-System scheint ein wichtiger Faktor bei der Kardio- bzw. Arterioskleroseprotektion durch Lykopen zu sein.

Konzentrationsunterschiede des Lykopins zwischen verschiedenen Gewebstypen, die mit der LDL-Rezeptorexpression korrelieren, der LDL-gebundene Transport im Blut sowie der Watanabe-/New Zealand-Kaninchenversuch lassen die Hypothese zu, dass die zelluläre Resorption Lykopins über den LDLR abläuft.

Durch siRNA-Transfektion humaner primärer Aorten-Endothelzellen gegen den LDLR und anschließende Behandlung mit in-vitro bzw. in-vivo Lykopen-supplementiertem FCS bzw. LDL soll der Resorptionsweg aufgeklärt werden. Die selektive Expressionsreduktion des LDLR nach siRNA-Transfektion sollte zu einer Verminderung des intrazellulären Lykopingehalts führen. Hierzu sollen die Expression des LDLR im Western Blot, die LDLR-mRNA-Expression in der Real-time RT-PCR und die zelluläre Menge an Lykopen in der HPLC miteinander verglichen werden.



## 2.3 Kardioprotektive Eigenschaften von Lykopen

Durch Arteriosklerose bedingte Todesfälle nehmen weltweit in der Todesursachenstatistik den vordersten Platz ein.<sup>7</sup>

In den USA leiden zur Zeit etwa 60 Millionen Bürger unter einer durch Arteriosklerose verursachten kardiovaskulären Erkrankung, wobei diese für 42 % der jährlichen Todesfälle verantwortlich zeichnet. Laut Statistischem Bundesamt machten in Deutschland kardiovaskuläre Erkrankungen mit 354.493 (ca. 40 %) von insgesamt 893.825 Todesfällen (2013) den größten Teil der jährlichen Todesfälle aus.<sup>8,9</sup>

Ernährungsgewohnheiten haben einen direkten Einfluss auf die Gesundheit. Unter ungesunder Ernährung wird eine fettreiche, ballaststoffarme, zuckerreiche und vitaminarme Diät verstanden. Gepaart mit anderen Lebens- und Genussmittelgewohnheiten ergeben sich Risikofaktoren für Arteriosklerose und andere systemische Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sowie für Diabetes mellitus und Krebserkrankungen. Eine gesunde Ernährung hingegen, hierbei vor allem die Mittelmeerdiät, kann das Risiko für eine Reihe von Erkrankungen reduzieren. Unter der Mittelmeerdiät werden Ernährungsgewohnheiten der frühen sechziger Jahre der Bevölkerung der Mittelmeeranrainerstaaten zusammengefasst: ein hoher Anteil an Gemüse, Früchten und komplexen Kohlenhydraten, eine moderate Menge an Fisch und Fleisch, wenig Rotwein zu den Mahlzeiten und Olivenöl als hauptsächliche Quelle von Fetten.<sup>10</sup>

Verschiedene klinische und laborexperimentelle Studien untersuchten die Auswirkungen der Mittelmeerdiät oder einer Lykopen-Supplementation und konnten u.a. eine signifikante relative Risikoreduktion bei der Gesamtmortalität, der Inzidenz von kardiovaskulären, neurodegenerativen und Krebs-Erkrankungen sowie eine Reduktion des Gesamt- und LDL-Cholesterols als auch des Blutdrucks nachweisen.<sup>10,11</sup>

Ebenfalls liegen Erkenntnisse über eine Reduktion der Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis vor, einem frühen Indikator für koronarerterielle Erkrankungen.<sup>12</sup>

Die oxidative Modifikation von LDL und damit seine proatherogene Wirkung wird durch Lykopen reduziert. Ebenfalls steigert eine Lykopinsupplementation die Aktivität antioxidativer Enzyme und führt zu verminderten DNA-Schäden und Down-Regulation von pro-inflammatorischen bzw. pro-atherogenen Signalkaskaden mit positiven Auswirkungen auf den Blutdruck und Endothelfunktionsparameter.<sup>13-16</sup>

Zusätzlich kann Lykopen als Antioxidanz die Radikalbildung reduzieren und hemmend in die Tumorentstehung durch Verbesserung der interzellulären Kommunikation über gap-junctions

eingreifen sowie als Signalmolekül relevante Schritte des Karzinomstoffwechsels beeinflussen.

17–25

## 2.4 Absorption und Transport von Lykopen im Blut

Die Bioverfügbarkeit von Karotinoiden und somit auch von Lykopen ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig und unterliegt starken Schwankungen. Einflussfaktoren sind u.a. die Spezies der Karotinoide, ihre Struktur und molekularen Verbindungen untereinander, Zusammensetzung der Nahrung (Fettgehalt, Ballaststoffe, Zubereitungsart) sowie genetische Faktoren.<sup>6,26,27</sup>

So erschweren z.B. ein hoher Ballaststoffanteil sowie ein niedriger Fettgehalt die Resorption. Anscheinend verursacht das gastrointestinale Milieu eine Isomerisierung von *all-trans* Lykopen zu *cis* Lykopen, welches eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt. Prinzipiell wird Lykopen im proximalen Abschnitt des Gastrointestinaltrakts (Magen und Duodenum) während des Verdauungsprozesses aus der Nahrung freigesetzt und assoziiert mit Hilfe von Gallensalzen und Pankreaslipase mit Lipiden zu Mizellen. Diese werden zum einen durch passive Diffusion, zum anderen über den Scavenger Rezeptor Klasse B I (SR-BI) und den cluster of differentiation 36 (CD36) über die Dünndarmmukosa aufgenommen.<sup>28,29</sup>

Aufgrund seiner Hydrophobizität kann Lykopen im Organismus nur gemeinsam mit Lipiden transportiert werden. In Chylomikronen gelangt Lykopen zur Leber und wird dort auf Lipoproteine verteilt (Abbildung 2).

Die prozentuale Verteilung des Lykopins unter den Lipoproteinklassen differiert und ist von deren Lipidgehalt abhängig. Lykopen befindet sich wegen seiner Apolarität im hydrophoben Kern der Lipoproteine und wird zu ca. 77 % durch LDL transportiert (Tabelle 1).<sup>6,27</sup>

**Tabelle 1: Prozentuale Verteilung von Lykopen auf die verschiedenen Lipoproteinklassen\***

VLDL	LDL	HDL	Referenz
10	73	17	<sup>30</sup>
5,8 ± 1,2	73,9 ± 1,9	20,3 ± 3	<sup>31**</sup>
7	76	17	<sup>32</sup>
k.A.	75	k.A.	<sup>33</sup>
10,2 ± 5,4	77,9 ± 6,1	11,9 ± 4,7	<sup>34**</sup>
~ 10	79 ± 9	~ 10	<sup>35</sup>
3-4	84-85	12-13	<sup>36</sup>
5,97 ± 3,25	78,13 ± 8,11	15,88 ± 7,34	<sup>37</sup>

\* Falls in der Primärliteratur vorhanden, sind die Standardabweichungen angegeben.

\*\* Angaben für *all-trans* Lykopen

LDL gehört zu einer heterogenen Klasse von Lipoproteinen, die sich anhand ihrer Dichte in drei Subgruppen einteilen lassen: groß ( $d = 1.018\text{--}1.030\text{ g/mL}$ ), intermediär ( $d = 1.030\text{--}1.040\text{ g/mL}$ ) und klein ( $d = 1.040\text{--}1.065\text{ g/mL}$ ).

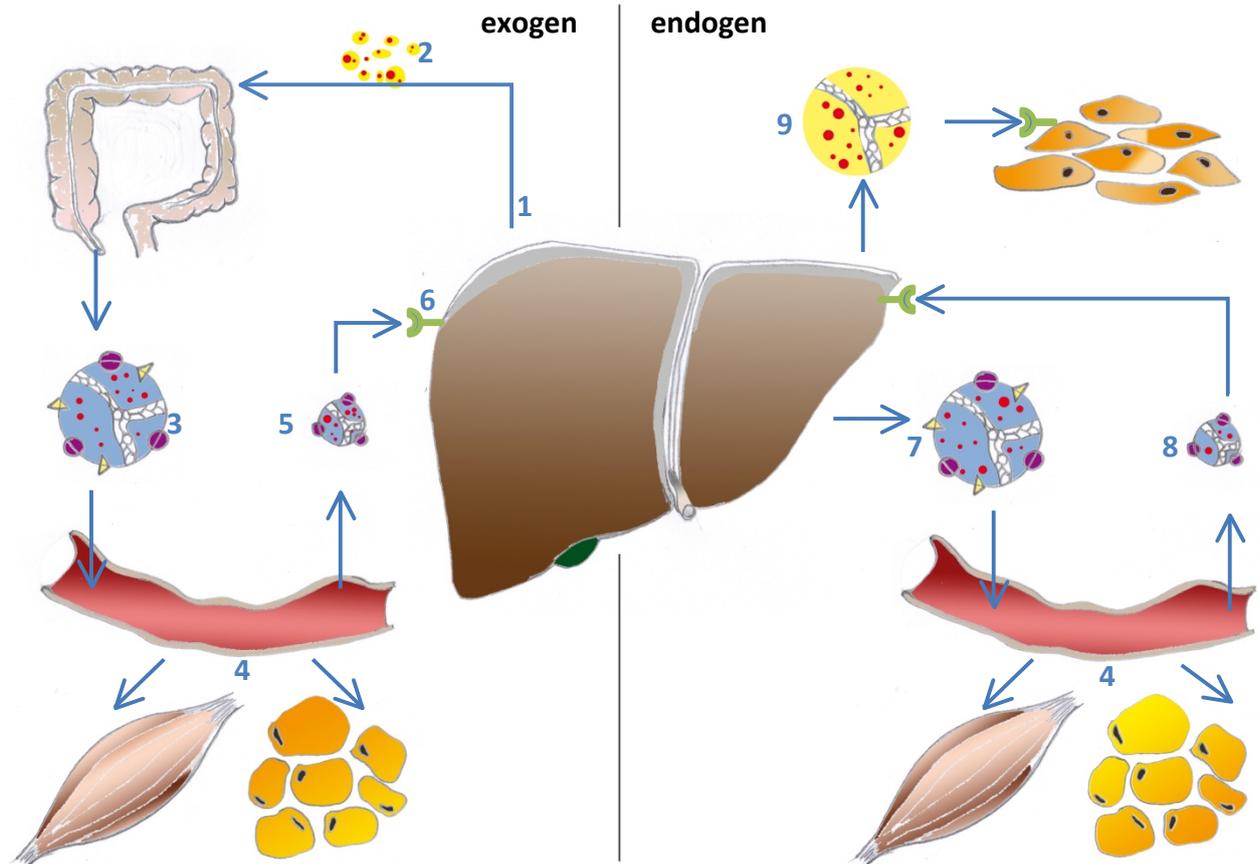
Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern, der Triglyceride und Cholesterolester enthält und einer hydrophilen Hülle aus Phospholipiden, freiem Cholesterol und einem einzigen Molekül Apo-Lipoprotein B-100. Dieses 550 kDa große aus 4536 Aminosäuren bestehende Molekül ist für die Interaktion mit dem LDLR verantwortlich und somit für die Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL in Körperzellen.<sup>38</sup>

Nachdem LDL durch den LDLR gebunden wurde, entstehen clathrin-coated pits, die sich zu Vesikeln formieren und ins Endosom gelangen. Hier wird das Lumen durch Wasserstoffionen angesäuert. Durch den niedrigen endosomalen pH von  $< 6$  kommt es zu einer Konformationsänderung des LDLR. Die  $\beta$ -propeller-Untereinheit der EGF-precursor-Domäne fungiert als alternativer Ligand und verdrängt LDL aus der Bindungsstelle. LDL wird daraufhin lysosomal verstoffwechselt, der LDLR recycelt und an die Zelloberfläche rücktransportiert.<sup>39–41</sup>

## 2.5 Lykopinstoffwechsel

Lykopen-Metabolite entstehen im tierischen und menschlichen Organismus entweder durch Oxidation oder Abbau durch die Karotinoid-9',10'-Monooxygenase. Zum Teil haben einige dieser Lykopen-Metabolite bioaktive Eigenschaften im Sinne einer möglichen signaltransduktiven Wirkung. Die Ausscheidung erfolgt durch den Urin und Fäzes.<sup>42–44</sup>

Im menschlichen und tierischen Organismus sind Karotinoide bzw. Lykopen in den meisten Geweben zu finden. Bis zu 10fach höhere Konzentrationen von Lykopen und anderen Karotinoiden lassen sich jedoch in Leber, Hoden, Prostata und Nebennieren gegenüber anderen Gewebstypen wie z.B. dem Fettgewebe nachweisen. Lykopen scheint sich besonders in Organen anzureichern, die eine hohe Anzahl an LDLR aufweisen, im Lipidstoffwechsel stark aktiv sind und einer hormonellen Regulation unterliegen.<sup>45–50</sup>



**Abbildung 2: Lipoproteinstoffwechsel und Lykopin-Transport im humanen Organismus, adaptiert nach <sup>51</sup>**

Formierung von Mizellen (2) aus Nahrungslipiden und darin enthaltenem Lykopin durch Gallensäure und Pankreasenzyme (1). Enterozyten des Dünndarms bilden Chylomikronen (3), aus denen vor allem im Muskel und Fettgewebe freie Fettsäuren durch die Lipoproteinlipase freigesetzt werden (4). Chylomikronen remnants (5) gelangen zur Leber und werden über den LDLR (6) resorbiert. Die Leber synthetisiert VLDL (7) aus denen analog zu (4) freie Fettsäuren freigesetzt werden. Intermediate dense lipoproteins (IDL) (8) gelangen wieder zur Leber und werden zu LDL (9) remodelliert. Rote Punkte: Lykopin, lila Kreise: ApoE, gelbe Dreiecke: ApoC, graue Spiralen: ApoB-48 bzw. -100

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Zellkultur**

Alle Experimente wurden mit primären humanen Aorten-Endothelzellen (HAEC) (Cat. No.: 304-05a, Lot.: 1559, Cell Applications Inc, San Diego) innerhalb von 16 Passagen durchgeführt. Direktes Arbeiten mit den Zellen erfolgte dabei stets in einer Sterilbank, Typ BSK 4 MP (antairBSK), die eine keimarme Umgebung bei laminarem Luftstrom gewährleistet. Zellstimulationen erfolgten, wenn nicht gesondert erwähnt, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Weitere grundsätzlich in der Zellkultur verwendete Geräte waren:

- Wasserbad: Typ: 1004 (Gesellschaft für Labortechnik mbH)
- Brutschrank: Typ: 3615018000310 (WTCbinder)
- Labofuge 400R (Heraeus Instruments) oder Centrifuge 5810 R (Eppendorf)
- Mikroskop: Typ: 090-135.001 (Leica)
- Verschiedene Pipetten und Pipettenspitzen (Eppendorf)

Soweit nicht gesondert aufgeführt wurden für die Zellkultur folgender/-es Puffer und Kulturmedium verwendet:

- Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS (PAA Laboratories GmbH): 137 mM NaCl , 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3 (HCl)
- ECG-Medium MV (5 % FCS): Endothelial Cell Growth Medium MV, C - 22020 (Promocell), SupplementMix, C - 39225 (Promocell), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml bzw. 10.000 µg/ml), A2213 (Biochrom AG)

#### **3.2 LDL-Präparation**

##### **Material**

- S-Monovette 9 ml K3E (Sarstedt AG & Co)
- Ultrazentrifugenröhrchen: Polyallomer, Centrifuge Tubes, Produktnummer: 331374 (Beckmann Instruments)
- L-70 Ultracentrifuge, Rotor SW 41 Ti (Beckman)
- Douncer
- Dialyseschlauch: ZelluTrans, Artikelnummer: E664.1 (Carl Roth GmbH)
- Spritzenfilter: Einmal-Filterhalter, Weißbrand 0,45 µm (Schleicher & Schuell GmbH)
- Einmalspritze, 20 ml (B. Braun Melsungen AG)

## **Lösungen**

- Dichtelösung I  $\rho = 1,006$ : H<sub>2</sub>O 500 ml, 1N NaOH 1 ml (MERCK), NaCl 11,4 g (MERCK), Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 g (SIGMA), H<sub>2</sub>O bis Dichte eingestellt
- Dichtelösung II  $\rho = 1,184$ : NaBr 24,98 g (MERCK), Dichtelösung I 100 ml

## **Durchführung**

Die LDL-Präparation mittels Ultrazentrifugation und zwei unterschiedlicher Dichtegradienten stellt ein Standardverfahren zur Isolation von LDL dar.

90 ml EDTA-Blut wurden für 15 Minuten bei 4500 U/min und 17 °C zur Plasmagewinnung zentrifugiert. Es folgte die Aufteilung in sechs gleich große Plasma-Fractionen zu 7-7,5 ml auf Ultrazentrifugen-Tubes und Überschichten mit Dichtelösung I. Nach Zentrifugation für 20 h bei 36000-40000 U/min und 17 °C war eine Auftrennung in drei Phasen erreicht (von oben nach unten): 1. Chylomikronen, 2. Dichtelösung I und 3. Lipoproteine. Die Chylomikronen-Schicht wurde abgesaugt und verworfen. Die mittlere Phase wurde zum größten Teil abgenommen, ein kleiner Teil verblieb auf der Lipoproteinphase zurück. Die Lipoproteinphase und der verbliebene Rest Dichtelösung I wurden durchmischt, in ein Becherglas umgefüllt und mit Dichtelösung II auf das Ausgangsvolumen von 42 ml aufgefüllt. Es folgte das Verteilen auf sechs Ultrazentrifugen-Tubes und die erneute Zentrifugation für 20 h Stunden bei 36000-40000 U/min und 17 °C. Nach diesem Schritt stellte sich die LDL-Fraktion als oberste Phase dar. Diese wurde abgenommen, über Nacht gegen PBS dialysiert und anschließend durch einen Spritzenfilter mit der Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$  sterilfiltriert. Nach Poteinbestimmung wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

### **3.3 Herstellung von Dil-LDL**

#### **Material**

- DMSO (MERCK)
- LPDS: Fetal calf lipoprotein deficient serum (Sigma Aldrich)
- Spritzenfilter: Einmal-Filterhalter, Weißbrand 0,45  $\mu\text{m}$  (Schleicher & Schuell GmbH)
- Einmalspritze, 20 ml (B. Braun Melsungen AG)
- Ultrazentrifugenröhrchen Polyallomer, Centrifuge Tubes, Produktnummer: 331374 (Beckmann Instruments)
- L-70 Ultrazentrifuge (Beckman)
- Vortexer (Jahnke & Kunkel)

## **Lösungen**

- Dil-Perchlorat Lösung: 3 mg 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (Dil; DilC18(3)) (Invitrogen), 1 ml DMSO (MERCK)
- Dichtelösung II  $\rho = 1,184$

## **Durchführung**

Ein Milligramm LDL wurde zu zwei Millilitern LPDS gegeben und diese Lösung durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Spritzenfilter sterilfiltriert. Nach Zufügen von 50  $\mu\text{l}$  Dil-Perchlorat-Lösung pro Milligramm LDL wurde der Ansatz leicht gevortext und für acht bis fünfzehn Stunden bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss folgte die Ultrazentrifugation mit Dichtelösung II für 20 h bei 36000 – 40000 U/min und 17 °C. Die LDL-Fraktion wurde abgenommen, über Nacht lichtgeschützt gegen PBS dialysiert und anschließend durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Spritzenfilter sterilfiltriert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Probe bei 4 °C gelagert.

## **3.4 Regulationsnachweis des LDLR durch LDL/LPDS-Stimulation**

### **Material**

- 6 cm Zellkulturschale, 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon)
- Zellschaber: Cell Scraper 25 cm (Sarstedt)

### **Lösungen**

- ECG-Medium MV, C-22020 (Promocell), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml bzw. 10.000  $\mu\text{g/ml}$ ), A2213 (Biochrom AG), SupplementMix, C - 39225 (Promocell), SupplementPack, C-39220 (Promocell)
- LDL (Eigenproduktion) in PBS
- LPDS: Fetal calf lipoprotein deficient serum (Sigma Aldrich)

### **Durchführung**

80%ig konfluente HAEC in 6 cm Zellkulturschalen wurden für 48 h stimuliert. Es wurden je zwei 6 cm Zellkulturschalen identisch behandelt. Die Menge an Medium betrug jeweils 4 ml. Folgende Stimulationen wurden vorgenommen: Zellkulturmedium mit 5 % FCS, Zellkulturmedium mit 5 % LPDS statt FCS, Zellkulturmedium mit 5 % FCS und LDL 10  $\mu\text{g/ml}$ , Zellkulturmedium mit 5 % FCS und LDL 25  $\mu\text{g/ml}$  und Zellkulturmedium mit 5 % FCS und LDL 75  $\mu\text{g/ml}$ .

Die Konzentrationsreihe diente dazu, einen möglichst aussagekräftigen Regulationsnachweis im Western-Blot und der Real-time RT-PCR zu erbringen. Der Stimulation folgten zwei Waschschrirte mit kaltem PBS. Anschließend wurden die Zellkulturschalen auf Eis gelagert. 1/6 der Oberfläche einer 6 cm Zellkulturschale dienten für die Isolation von RNA für die Real-time RT-PCR des LDLR, die restlichen 5/6 für den Nachweis des LDLR im Western Blot.

### **3.5 siRNA-Transfektion gegen den LDLR**

#### **Material**

- 6 cm Zellkulturschale (Falcon)

#### **Lösungen**

- Opti-MEM® I (Invitrogen)
- INTERFERin™ (Polyplus-transfection Inc)

#### **Verwendete siRNA**

- siNegK: Silencer® Select Negative Control # 1 siRNA, Cat #: 4390843, Lot #: ASO0EM1G, 5 nm (Ambion)
- siLDLR: LDLR, ID: s4, Silencer® Select Pre-designed siRNA, Cat #: 4392420, Lot #: ASO0GIXH, 5 nm (Ambion)

#### **Durchführung**

Zunächst wurde von jeder siRNA entsprechend den Herstellerangaben eine 100 µM Stocklösung I hergestellt. Dazu wurden zu 5 nm siRNA 50 µl Nuklease-freies Wasser gegeben. Aus dieser Stocklösung I wurden 2 µl entnommen und wiederum mit 18 µl Nuklease-freiem Wasser zu einer 10 µM Stocklösung II verdünnt. Die Lagerung der resuspendierten siRNA erfolgte laut Herstellerangaben bei -20 °C. Für die Transfektion wurden folgende Ansätze unmittelbar vor Verwendung zubereitet: Zu 1 ml Opti-MEM® I Serum-freien Transfektionsmedium wurden 1 bzw. 3 µl der 10 µM siRNA-Stocklösung II hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 bzw. 30 nM siRNA im Transfektionsmedium erreicht wurde. Weiterhin wurden 4,5 µl INTERFERin™ Transfektionsreagenz hinzugegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Mischen inkubiert.

Ca. 80%ig konfluente HAEC auf 6 cm Zellkulturschalen wurden mit PBS zweimal gewaschen. Dann wurde der Opti-MEM® I/INTERFERin™/siRNA-Mix auf die Zellen gegeben und diese damit für 4 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der

Transfektionsreagenz-Mix abgesaugt und die Zellen mit frischem ECG-Medium MV versorgt. 24 und 48 Stunden später wurden die Zellen für weiterfolgende Versuche verwendet.

### **3.6 siRNA-Transfektion gegen den LDLR und Dil-LDL-Stimulation**

#### **Material**

- 6 cm Zellkulturschale, 5 ml FACS-Rundbodenröhrchen, Polyesterol (Falcon)
- Vortexer (Jahnke & Kunkel)
- Durchflusszytometer CyAn-ADP (BeckmanCoulter)

#### **Lösungen**

- Trypsin (Invitrogen)
- Dil-LDL (Eigenproduktion)
- 0,2 % Paraformaldehyd, PFA (SIGMA) in PBS

#### **Durchführung**

Ca. 80-90%ig konfluente, 48 Stunden zuvor mit siLDLR 30 nM oder siNegK 30 nM transfizierte HAEC auf 6 cm Zellkulturschalen wurden mit 5 µg/ml Dil-LDL für drei unterschiedliche Zeitpunkte (16, 24 und 48 Stunden) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen, mit Trypsin geerntet und in Zellkulturmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl 0,2 % PFA in PBS resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt, welches in Dunkelheit auf Eis gelagert wurde.

Direkt vor der FACS-Messung wurden die Proben kurz gevortext. Die Fluoreszenz von Dil wurde im PE-Kanal bei 500 V und einem Gain von 1 bestimmt. Alle Einstellungen am FACS-Gerät sowie die Messprozedur wurden in einem Protokoll gespeichert, so dass für alle Messungen die gleichen Ausgangsbedingungen herrschten. Das Gate für jede HAEC Population wurde individuell justiert und  $1,2 \times 10^5$  Zellen je Probe analysiert. Es wurden drei Versuche mit Doppelproben durchgeführt. Gemessen wurden zu jedem Zeitpunkt: HAEC Mediumkontrolle, zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Zellen, HAEC transfiziert mit siLDLR 30 nM und 5 µg/ml Dil-LDL und HAEC transfiziert mit siNegK 30 nM und 5 µg/ml Dil-LDL

Die Auswertung erfolgte anhand der gemessenen Fluoreszenzeinheiten. Nach Abzug der Eigenfluoreszenz wurden Mittelwerte und SD für die unterschiedlichen Ansätze und Zeitpunkte berechnet.

### **3.7 Zellyse**

#### **Material**

- Complete-Mini (Roche)
- Zellschaber: Cell Scraper 25 cm (Sarstedt)

#### **Lösungen**

- RIPA-Lysepuffer: 150 mM NaCl (MERCK), 1 % NP40 (Igepal), 0,5 % Sodiumdesoxycholate (SIGMA), 0,1 % SDS (Serva), 50 mM Tris pH 8.0 (Carl Roth GmbH)

#### **Durchführung**

Nach zweimaligem Waschen mit 4 °C kaltem PBS wurden die Zellen mit 50 µl RIPA-Puffer und einer entsprechenden Menge Enzymaktivator (Complete mini) je 6 cm Schale lysiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Safe-Lock Tube gefüllt und 10 Minuten bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert. Für die spätere Proteinvermessung wurden 3 µl Aliquots pro Probe genommen. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **3.8 Proteinbestimmung**

#### **Material**

- Microtest Plate 96-Well (Sarstedt)
- BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Brutschrank: Heraeus Instruments, Typ B 6120 (Heraeus)
- Photometer: anthos htIII, WinRead 2.0 (anthos labtec instruments)
- Aqua ad iniectabilia (Braun)

#### **Durchführung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Biuret-Methode. Von den Proteinextrakten wurden 3 µl Aliquots abgenommen und mit 27 µl sterilem Wasser verdünnt. Pro Vertiefung einer 96-Well-Platte wurden 10 µl dieser Lösung und 200 µl Reagenz gemischt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die Extinktionsmessung bei 570 nm im Photometer und die Auswertung der Messdaten durch die Software WinRead 2.0.

Gemessen wurde grundsätzlich in Doppelwerten. Zur Ermittlung einer Eichkurve dienten Proteinstandards aus bovinem Serumalbumin in einer Konzentration von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l} - 0,025 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Als Leerwert diente steriles Wasser.

### **3.9 RNA-Isolation**

#### **Material**

- TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Gibco BRL)
- Chloroform, 2-Propanol, Ethanol (J.T. Baker)

#### **Durchführung**

Mittels Zellschaber wurden 1/6 der Oberfläche einer 6 cm Zellkulturschale abgekratzt, das Zellmaterial in PBS aufgenommen und in  $500 \mu\text{l}$  TRIzol<sup>®</sup> Reagent für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe zu erreichen. Je  $1 \text{ ml}$  TRIzol<sup>®</sup> wurden  $200 \mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben, die Probe kräftig geschüttelt und für ca. fünf Minuten bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Probe für 15 Minuten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  mit  $12.000 \times g$  zentrifugiert. Hierdurch trennte sich die Probe in 3 Phasen. Dabei waren eine rote, untere Phenolchloroform-Phase, eine Interphase und eine wässrige, obere Phase, welche die RNA enthielt, zu unterscheiden. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Mischen mit  $0,5 \text{ ml}$  Isopropanol/ml TRIzol<sup>®</sup> fällt man die RNA. Dafür wurde erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann 30 Minuten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $12.000 \times g$  zentrifugiert. Daraufhin konnte der Überstand abgenommen und die RNA mit  $1 \text{ ml}$  75%igem Ethanol/ml TRIzol<sup>®</sup> gewaschen werden.

Nach Zugabe von Ethanol wurde die Probe durchmischt und für 10 Minuten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  mit  $5.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgenommen und die RNA kurz an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in  $20 \mu\text{l}$  Aqua bidest. aufgenommen. Die RNA wurde photometrisch vermessen und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Für die photometrische Messung wurde  $1 \mu\text{l}$  der RNA 1:50 in Aqua bidest. verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt.

### 3.10 DNase-Verdau und reverse Transkription

#### Material

- DNase 1 (Ambion)
- UNO II (Biometra)
- 5 x First Strand Buffer (GibcoBRL)
- 0,1 M Dithiothreitol, M-MLV Reverse Transcriptase (GibcoBRL)
- Ultrapure dNTP Set 2'-Desoxynucleoside 5'-Triphosphate, (Pharmacia Biotech) (Stocklösung je 100 mM)
- Protector RNase Inhibitor (Roche)
- DN6 Hexamer (0,5 µg/µl) (TIBMolbiol)

#### Durchführung

Es wurden 0,5 µl DNase I (Ambion) (2 U/µl) pro 20 µl RT Ansatz zum Einsatz gebracht und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch eine anschließende Inkubation bei 75 °C für 10 Minuten wurde das Enzym hitzeinaktiviert und stellte somit keinen möglichen Störfaktor für die nachfolgende PCR mehr dar.

Die Reverse-Transkriptions-Reaktion dient dazu, RNA in DNA umzuschreiben, die als Ausgangsprodukt für die PCR verwendet wird. Die hierbei entstehende DNA ist komplementär zur RNA und wird als cDNA (c = complementary) bezeichnet. Sie enthält im Gegensatz zu genomischer DNA ausschließlich codierende Sequenzen. Für die Reverse Transkription wurden 500 ng Total-RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Es wurde eine M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase verwendet. Als Primer diente ein dN6-Oligonucleotid einer zufälligen Sequenz, ein sogenannter Random-Hexamer Primer.

Um sicher zu stellen, dass die Reaktionsbedingungen für alle RT-Ansätze gleich waren, wurde zunächst ein Master Mix für alle Proben angesetzt und hiervon je 8,5 µl zu dem jeweiligen RT-Primer-Mix hinzugegeben. Nach einer Annealing-Reaktion bei 25 °C für 5 Minuten erfolgte die Elongationsreaktion für 60 Minuten bei 37 °C. Um eine Renaturierung der cDNA zu verhindern, wurde der Ansatz im Anschluss an die Reverse Transkription Reaktion sofort auf Eis gelagert.

### 3.11 Real-time RT-PCR

#### Material

- Mastermix
- 10 x SYBR<sup>®</sup> Green PCR Puffer (Invitrogen)
- ABI PRISM 5700 Sequenz Detector (Applied Biotech)

#### Durchführung

In den vorliegenden Experimenten wurde der Farbstoff SYBR<sup>®</sup> Green 1 benutzt, der wahrscheinlich in eine kleine Furche der DNA interkaliert und in gebundenem Zustand fluoresziert. Dieses Fluoreszenzsignal wird genutzt, um den Amplifikationsprozess während der PCR darzustellen. Ein zusätzlicher Farbstoff, ROX, dient als interne Passivreferenz. Dieser Farbstoff ist im 10 x SYBR<sup>®</sup> Green PCR Puffer enthalten und hat keinen Anteil an der Amplifikation. Als passiver Referenzfarbstoff liefert er einen internen Standard, auf den das SYBR<sup>®</sup> Green Signal während der Datenaufzeichnung abgeglichen werden kann. Als weitere Spezifitätskontrolle dient die Schmelzkurvenanalyse. Nach jedem PCR-Lauf werden die Dissoziationskurven der entstandenen Produkte aufgezeichnet. Auf diese Weise kann das Vorliegen von Primerdimeren und unspezifischen Nebenprodukten, die ein verfälschtes Fluoreszenzsignal generieren würden, beurteilt werden.

Die PCRs in dieser Arbeit wurden mit dem ABI PRISM 5700 Sequenz Detector System (SDS) durchgeführt.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielsequenz relativ auf die Expression einer anderen, nicht verwandten Sequenz, eines sogenannten Housekeeping-Gens, bezogen.

Das ABIPRISM SDS gibt nach Ablauf einer PCR für jede Probe den entsprechenden CT-Wert an. Dieser sogenannte „Threshold Cycle“ bezeichnet die Zykluszahl, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über die Grundlinie (baseline) ansteigt. Diese Zykluszahl wird auf die Zykluszahl des zugehörigen Housekeeping-Gens abgeglichen ( $\Delta$  CT) und graphisch als  $2^{-\Delta Ct}$  dargestellt. Diese Darstellung ist sinnvoll, weil es pro Zyklus der PCR theoretisch zu einer exponentiellen Verdopplung der DNA-Produktmenge kommt.

Die Primer wurden mit Hilfe der „Primer Express“ Software der Firma PE Applied Biosystems ausgesucht. Die gewünschten Sequenzen wurden den gängigen Datenbanken entnommen.

Die Primer wurden aus der jeweiligen mRNA-Sequenz, also exonübergreifend und unter Auslassung der Intron-Strukturen gewählt, um möglichst keine genomische DNA, sondern ausschließlich cDNA zu amplifizieren. In diesem Fall sind folgende Angaben wichtig:

- LDL Rezeptor human (LDLR), Amplicon: 76 bp
- Fw. Primer: 5'-GGT-TTC-GGA-GCA-CGT-AAA-TGC-3'
- Rev. Primer: 5'-TGA-TAA-CAG-TTT-CAA-CCA-ATA-TAC-AAA-GTG-3'

Es wurde einen Mastermix für alle Proben angelegt.

#### **Ansatz 1:**

- Primerpaar in der vorher durch Optimierung bestimmten Konzentration
- Auffüllen mit aqua bidest. auf 11,5 µl je Reaktion (Gesamt: 11,5 µl x Anzahl der Proben)

#### **Ansatz 2:**

- 1 µl cDNA pro Primer
- je 12,5 µl SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Gesamt: 13,5 µl x Anzahl der Gene)

Pro Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte wurden abschließend 11,5 µl aus Ansatz 1 und 13,5 µl aus Ansatz 2 pipettiert.

### **3.12 Positivkontrolle für den Western Blot**

#### **Material**

- Ultraschallmixer: Generator: GM70, Ultraschallwandler: UW70, Stufenhorn: SH70G (Bandelin electronic Berlin)
- Bovine Nebenniere
- Ultrazentrifugenröhrchen Polyallomer, Centrifuge Tubes, Produktnummer: 331374 (Beckmann Instruments)
- L-70 Ultracentrifuge (Beckman)

#### **Lösungen**

- Puffer A: 20 mM Tris-HCl (Carl Roth GmbH), 0,15 mM NaCl (MERCK), 1 mM CaCl<sub>2</sub> (SIGMA), pH 8
- RIPA-Puffer (siehe 3.7)

#### **Durchführung**

Bovine Nebennieren wurden ca. 30 Minuten nach Schlachtung entnommen, auf Trockeneis gelagert, und bei Ankunft im Labor bei -80 °C eingefroren. Per Skalpell erfolgte die Trennung von Mark und Rinde rein makroskopisch auf einer auf Eis gelagerten Glasplatte. Das Mark wurde verworfen. 1 g Nebennierenrinde wurde im Mörser mit flüssigem Stickstoff gemischt und zerstoßen. Das zerkleinerte Gewebe wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml Puffer A

gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte die Zentrifugation bei 800 x g für 5 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt, der oben genannte Zentrifugationsschritt anschließend wiederholt. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugen-Tube überführt und 60 Minuten bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet entsprach der Membranfraktion. Es schlossen sich Absaugen des Überstands, Mischen des Pellets mit 2 ml RIPA-Lysepuffer und anschließende zweimalige Sonifikation für 15 Sekunden an. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Biuret festgestellt.

Dieses Protokoll orientierte sich in Teilen an folgender Arbeit: „Solubilization of the low density lipoprotein receptor“<sup>52</sup>

### **3.13 Western Blot des LDL-Rezeptors**

#### **Material**

- 4-12 % Tris-Glycin-Gradientengel TG 41210 (Anamed)
- Elektrophoresekammer: Minigel-Twin, Netzteil Elektrophorese: High Voltage Power Pack P30 (Biometra)
- Blotkammer: Pharmacia LKB Multiphor 2, Netzteil Blotkammer: Electrophoresis Power Supply – EPS 3500 XL (Pharmacia)
- Blotmembran: Immobilon-P (Milipore Corporation)
- Filterpapier: Chromatography Paper 3MM Chr (Whatman international)
- Entwicklerlösung: Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)
- Film: CL-XPosure<sup>TM</sup> Film 18 x 24 cm (Thermo Scientific)
- Entwicklermaschine: RDM8-27S1 (Colenta Labortechnik GmbH)

#### **Lösungen**

- 5 x SDS Probenpuffer: 655 µl 1 M Tris-Cl pH 6,8 (Carl Roth GmbH), 1,13 ml 87 % Glycerol (MERCK), 2,3 ml 10 % SDS (Serva), 500 µl β-Mercaptoethanol (Sigma), 10 mg Bromphenolblau (VEB Feinchemie Sebnitz)
- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris Base (Carl Roth GmbH), 192 mM Glycin (Carl Roth GmbH), 0,1 % SDS (Serva), pH 8,3
- Methanol (J. T. Baker)
- Blotpuffer: 12 mM Tris Base (Carl Roth GmbH), 96 mM Glycin (Carl Roth GmbH), pH 8.3

- Blockpuffer 1: 10 ml Roti-Block 10 x Konzentrat (Carl Roth GmbH), gelöst in 90 ml PBS (PAA Laboratories GmbH)
- Waschpuffer: 500 µl Tween 20 (SIGMA), gelöst in 500 ml PBS (PAA Laboratories GmbH)

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper im Western Blot**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
LDL Receptor antibody (ab30532), Abcam Inc.	1 zu 1000 in Blockpuffer 1	goat-anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004), Santa Cruz Biotechnology	1 zu 10000 in Blockpuffer 1
GAPDH antibody (sc-25778), Santa Cruz Biotechnology	1 zu 2000 in Blockpuffer 1	goat-anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004), Santa Cruz Biotechnology	1 zu 5000 in Blockpuffer 1
$\alpha$ -Tubulin (11H10) Rabbit mAb	1 zu 1000 in Blockpuffer 1	goat-anti-rabbit IgG-HRP (sc-2004), Santa Cruz Biotechnology	1 zu 5000 in Blockpuffer 1

## Durchführung

Der Western Blot wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. 4-12 % Tris-Glycin-Gradientengele wurden mit destilliertem Wasser abgespült, in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Geltaschen mit Lauffpuffer gespült. Es folgte der Vorlauf des Gels für zehn Minuten bei 125 Volt, 50 mA und 20 W. Die verwendeten Proben enthielten je 25 µg Protein und eine zweifache Endkonzentration SDS. Die Proben wurden für die korrespondierenden Versuche zu Punkt 4.1 und 4.2 dieser Arbeit für 2 Minuten bei 85 °C, für den Versuch zu Punkt 4.7 für 5 Minuten bei 25 °C aufgekocht, danach sofort auf Eis gestellt und direkt vor Beladen des Gels eine Minute bei 14/000 U/min zentrifugiert. Nach dem Laden der Proben wurde die Elektrophorese mit 125 V, 50 mA und 20 W so lange durchgeführt, bis die Bromphenol-Lauffront die Unterkante des Gels erreicht hatte. Es schloss sich der Blot mit einem kontinuierlichen Puffersystem für 90 Minuten bei 35 V, 150 mA und 5 W an. Der Aufbau für den Blot war wie folgt (von der Anodenseite zur Kathodenseite): drei Whatmanpapiere, PVDF-Membran, Elektrophorese-Gel, drei Whatmanpapiere.

Die Whatmanpapiere wurden zuvor in Blotpuffer eingeweicht, die Membran in Methanol aktiviert.

Nach Abschluss des Blots wurde die Membran für eine Stunde in Roti-Block blockiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Membran bei 4 °C unter leichtem Schwenken mit den entsprechenden, in Blockpuffer gelösten, primären Antikörpern.

Nach einstündigem Waschen in 0,05 % Tween-PBS (viermaliger Pufferwechsel), wurde die Membran bei Raumtemperatur eine Stunde mit dem entsprechenden in Blockpuffer gelösten sekundären HRP-gekoppelten Antikörper unter leichtem Schwenken inkubiert. Der oben genannte Waschschrift wurde wiederholt. Die Entwicklung der Membran erfolgte mittels ECL-Plus-Lösung und Bandennachweis durch Filmauflage.

### **3.14 Lykopen-Supplementation**

#### **Material**

- Tomatenmark, 70 g, zweifach konzentriert 28-30 %, GIAGUARO S.p.A
- Filterzentrifugenröhrchen: Vivaspin 6, 30 kDa MWCO, Produktnummer: 28-9323-17 (GE Healthcare UK)

#### **Ethik-Rat-Zulassung**

- Ethik-Nummer: EA1/011/07

#### **Durchführung**

Bei acht gesunden, normalgewichtigen, nichtrauchenden Probanden (3 Frauen, Alter:  $26,7 \pm 2,3$  und 5 Männern, Alter:  $26,2 \pm 2,6$ ,  $\bar{X} = 26,4 \pm 2,3$  (MW und SD), Schwankungsbreite: 24-29, Median: 26,5) wurde aus einer peripheren Vene je 18 ml Vollblut in EDTA-Röhrchen á 9 ml abgenommen und hieraus durch Zentrifugation bei 4500 U/min für 15 Minuten bei 17 °C ca. 9-10 ml Plasma gewonnen. Von diesem Plasma wurden 2 x 1 ml Aliquots zur Bestimmung des basalen Lykopinspiegels via HPLC der Probanden abgenommen. Hieran schloss sich eine siebentägige Supplementationsphase mit einer Dose Tomatenmark á 70 g täglich an. Die Menge und das verwendete Tomatenmark orientierten sich an laborinterner Vorerfahrung aus einer vorangegangenen Studie.<sup>53</sup>

Das Tomatenmark wurde von den Probanden zum Frühstück gemeinsam mit einem Brötchen und ca. 10 g Butter eingenommen. Während der Supplementationsphase mussten die Probanden auf Vitaminzusatzpräparate verzichten, durften sich aber sonst ohne Einschränkungen ernähren.

Nach Abschluss der Supplementationsphase wurde den Probanden ca. 90 ml Vollblut in EDTA-Röhrchen aus einer peripheren Vene abgenommen. Hieraus wurde durch oben genannte Zentrifugation wiederum Plasma gewonnen und je Proband 2 x 1 ml Aliquots zur Bestimmung des Lykopinspiegels im Plasma mittels HPLC abgenommen. Aus dem Rest des Lykopin-substituiertem Plasmas wurde sukzessive durch Dichtegradientenultrazentrifugation LDL gewonnen.

Je Proband wurden von der so gewonnenen LDL-Fraktion je 2 x 100 µl Aliquots abgenommen und der Lykopingehalt in der HPLC bestimmt.

Nach Dialyse gegen PBS über Nacht und Sterilfiltrierung durch einen Spritzenfilter der Porengröße 0,45 µm wurde die LDL-Lösung in Filterzentrifugenröhrchen (MWCO 30000 kDa) gefüllt und bis auf ca. ein Fünftel des Ausgangsvolumens durch Zentrifugation bei 4000 x g und 17 °C aufkonzentriert. Alle Proben wurden bei -80 °C gelagert.

### **3.15 UV-HPLC-Bestimmung des Lykopingehalts im Plasma und LDL**

#### **Material**

- Vortexer (Scientific industries, Inc)
- Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Diode Array Detector L-7450 (Merck)
- Interface D-7000, Entgaser Merck L-7614 (Merck HITACHI, Darmstadt, Germany)
- Säulen-Thermostat Jetstream plus (JASCO, Groß-Umstadt, Germany)
- Vorsäulenhaltungssystem (Bischoff, Leonberg, Germany)
- Vorsäule: PRONTOSIL C<sub>18</sub> (20 x 4.0 mm, 5 µm), PEEK (Bischoff, Leonberg, Germany)
- HPLC Säule: C<sub>30</sub> Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm), Säule No. 5 (8971/100303168899) (YMC, Dinslaken, Germany)

#### **Lösungen**

- n-Hexan mit 0.1 % butyliertem Hydroxytoluen (BHT; 2,6-di-tert.-butyl-4-Methylphenol), Methyl-tert-butylether (MTBE), Methanol (Sigma)
- Standard-Karotinoid-Lösungen (Lagerung bei -30° C): Für die einmalige Quantifizierung bei jeder Messung wurden die folgenden Standardlösungen mit einer Mischung aus Methanol und MTBE (1/1, v/v) verdünnt. Verdünnung: 1:10, 1:50, 1:100, 1:250, 1:500:  
S1: Lutein, Zeaxanthin, S2: (all-E)-β-Karotin, (all-E)-Lycopin, S3: (all-E)-α-Karotin, (9Z)-β-Karotin, S4: (all-E)-Canthaxanthin, (15Z)-β-Karotin, S5: (all-E)-β-Cryptoxanthin, (13Z)-β-Karotin, 10-Standard Mixtur 1:50 (Als tägliche Referenz der Retentionszeiten):

(all-E)-Lutein, (all-E)-Zeaxanthin, (all-E)-Canthaxanthin, (all-E)- $\beta$ -Cryptoxanthin, (13Z)- $\beta$ -Karotin, (15Z)- $\beta$ -Karotin, (9Z)- $\beta$ -Karotin, (all-E)- $\beta$ -Karotin, (all-E)- $\alpha$ -Karotin, (all-E)-Lycopin, interne Standardlösung Echinenon in Ethanol 1:200

### **Durchführung**

Die nachfolgende Messung wurde von unserem Kooperationspartner, dem Institut für Ernährungswissenschaften – AG Bioaktive Pflanzenstoffe, an der Friedrich Schiller Universität Jena durchgeführt.

500  $\mu$ l Plasma oder 90  $\mu$ l LDL wurden mit 500  $\mu$ l interner Standardlösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß gemischt und für für 30 Sekunden gevortext. Nach Hinzugabe von 250  $\mu$ l n-Hexan mit 0,1 % BHT wurde das Gemisch erneut für 1 Minute gevortext. Es schloss sich eine Zentrifugation mit 1000 U/min für 2 Minuten zur Phasentrennung an.

Die oberste Schicht (Hexan-Schicht) wurde in ein zweites Reaktionsgefäß überführt und die dazu verwendeten Pipettenspitzen aufbewahrt. Der geschilderte Extraktionsvorgang wurde mit der Probe noch zwei weitere Male wiederholt, die oberste Schicht (Hexan-Schicht) jeweils abgenommen und ins zweite Reaktionsgefäß überführt.

Unter leichtem Stickstofffluss bei  $30 \pm 1$  °C wurde die Hexan-Fraktion bis zur Trockenheit eingedampft. Der im Reaktionsgefäß verbliebene Rückstand wurde mit 125  $\mu$ l (Plasma) bzw. 90  $\mu$ l (LDL) MTBE in Lösung gebracht und für 5 Sekunden gevortext. Nach Zugabe von 125  $\mu$ l (Plasma) und 90  $\mu$ l (LDL) Methanol wurde die Probe für erneute 5 Sekunden gevortext und anschließend für 4 Minuten bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Probengefäß überführt und per HPLC analysiert. Dabei wurden folgende Gradienten verwendet: 0 min 90 % Methanol und 10 % MTBE, 45 min 40 % Methanol und 60 % MTBE, 55 min 40 % Methanol und 60 % MTBE, 57 min 90 % Methanol und 10 % MTBE, 65 min 90 % Methanol und 10 % MTBE

Der Fluss betrug 1,3 ml/min bei einer Temperatur von  $17 \pm 1$  °C. Das injizierte Volumen belief sich auf 100  $\mu$ l. Die Detektionswellenlänge betrug 450 nm für die Bestimmung der generellen Karotinoid-Verteilung und 470 nm für die Detektion von Lycopin und seiner Isomere.

### 3.16 Reinheitsbestimmung von Lykopin-supplementiertem LDL

#### Material

- HYDRAGEL LIPO und Lp(a) K20, Artikelnummer: 3007 (Sebia)  
enthält: Gele, Filterpapier, Applikator, Pulver-Konzentrat für Elektrophoresepuffer, Waschlösung und Sudanschwarz-Färbelösung
- Netzteil: High Voltage Power Pack P30 (Biometra)
- Feuchte Kammer, Artikelnummer: 1270, Elektrophoresekammer K20, Artikelnummer: 1400, Behälter, Inkubationsboxen und Gel-Halter, HYDRAGEL Zubehörkit, Artikelnummer: 1420, Inkubator-Trockner IS 80, Artikelnummer: 1430 (Sebia)
- Flachbettscanner zum Einlesen von 82 x 51 mm Gelen bei 570 nm (Gelbfilter)
- PHORESIS-Software zur Auswertung (Sebia)

#### Lösungen

- Elektrophoresepuffer aus dem Sebia-Kit: Konzentrat in 1 l H<sub>2</sub>O auflösen, pH 8,2 ± 0,3
- Sudanschwarz-Färbelösung: 80 ml Ethanol (unvergällt, mind. 96 %), 1 ml Sudanschwarz-Konzentrat (66 g/l in Dimethylformamid) aus dem Sebia-Kit, 70 ml H<sub>2</sub>O
- Waschlösung: 16 ml Waschlösung-Konzentrat aus dem Sebia-Kit, 1 l H<sub>2</sub>O, pH 8.8 ± 0,3
- Entfärbelösung, mindestens 150 ml: 45 % Ethanol, 55 % H<sub>2</sub>O

#### Durchführung

Die nachfolgende Messung wurde durch das IFLb - Institut für Laboratoriumsmedizin Berlin durchgeführt.

Die Gele wurden entsprechend der Herstellerangaben pro Laufspur mit 10 µl Probenvolumen beladen. Danach wurde das Gel mit der Probenseite zur kathodischen Seite der Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammern der Elektrophoresezelle mit je 150 ml Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Migrationszeit betrug 90 Minuten bei 50 V und 11 ± 2 mA. Im Anschluss wurde das Gel bei 80 °C für mindestens 45 Minuten vollständig getrocknet. Für die Färbung wurde das Gel in den Gelhalter eingespannt, für 15 Minuten in der Färbelösung eingelegt und nach Ablauf der Zeit für 5 Minuten in die Entfärbelösung getaucht. Hierauf wurde das Gel für eine Minute in die Waschlösung gelegt und abschließend mit destilliertem Wasser gespült. Danach folgte die erneute vollständige Trocknung bei 80 °C. Die Auswertung der Gele erfolgte per Densitometrie. Dazu wurden die Gele mit einem Flachbettscanner mit Gelbfilter eingelesen und die Lipoproteinfraktionen durch die PHORESIS-Software ausgewertet.

### 3.17 Behandlung von HAEC mit Lykopen-FCS/-LDL

#### Material

- Vortexer (Jahnke & Kunkel)
- Spektralphotometer: DU 640 (Beckman)
- Quarzküvetten, 1 cm Schichtdicke: Typ No. 105.022B-QS (Hellma)
- Glasspritze 50 µl oder 250 µl, 1705RN bzw. 1725RN (Hamilton)
- Complete-Mini (Roche)
- Lichtgeschützte Glasfläschchen

#### Lösungen

- Accutase (PAA Laboratories GmbH)
- Lykopen (Conesa, Badajoz, Spain) in THF mit 0,0025 % BHT (Sigma-Aldrich)
- Hexan (Sigma-Aldrich)
- TRIzol Reagent (Gibco BRL)
- RIPA-Lysepuffer (siehe 3.7)
- 5 x SDS Probenpuffer (siehe 3.13)

#### Durchführung

Die Methode orientiert sich an Fröhlich und Lin et al. <sup>27,54</sup> Alle Arbeitsschritte wurden bei gedimmtem Licht durchgeführt.

Lichtgeschützte Glasflaschen mit der Lykopen-Stammlösung wurden im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Lykopen lag in der Stammlösung in THF mit 0,0025 % BHT gelöst vor. Zur Herstellung von Lykopen-FCS-Versuchsmedium wurde die Lykopen-Stammlösung für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur thermal äquilibriert. Die Konzentration der Lykopen-Stammlösung wurde photometrisch ermittelt. Dazu wurde die Stammlösung 1:2500 und 1:5000 mit Hexan verdünnt und die Extinktionen bei der spezifischen Wellenlänge des Absorptionsmaximums gemessen. Es wurden jeweils Doppelwerte bestimmt und der Mittelwert errechnet. Das verwendete Lösungsmittel, die spezifische Wellenlänge und  $E_{1\%, 1\text{cm}}$ -Werte waren wie folgt:

**Tabelle 3: Photometrische Eigenschaften von Lykopen** <sup>27</sup>

Karotinoid	Lösungsmittel	$\lambda_{\text{max}}$ [nm]	$E_{1\%, 1\text{cm}}$
(all-E)-Lykopen	n-Hexan	472	3450

Die Konzentration der Stammlösung ließ sich nach folgender Formel berechnen (Verdünnungsfaktor 2500):

$$\mathbf{c \text{ Lykopin Stammlösung [g/100ml]} = \frac{E \times [1g] / 100ml \times \text{Verdünnungsfaktor}}{E_{1\%,1cm}}}$$

$$\mathbf{c \text{ Lykopin Stammlösung [\mu g/ml]} = \frac{E \times 25000000}{E_{1\%,1cm}}}$$

Die Molarität der Lykopin-Stammlösung wurde wie folgt errechnet: M Lykopin: 536,85 g/mol bzw. 536,85  $\mu$ g/ml

$$\mathbf{mM \text{ Lykopin} = \frac{c \text{ Lykopin Stammlösung [\mu g/ml]}}{536,85 [\mu g/ml]}}$$

Anschließend wurde aus dieser Lykopin-Stammlösung jeweils frisch für die Behandlung der HAEC eine 1 mM Lykopin-FCS-Vorverdünnung hergestellt. Aus dieser 1 mM Lykopin-FCS-Vorverdünnung ließ sich durch Zugabe von ECG-Medium MV die gewünschte Lykopin-Endkonzentration von 5  $\mu$ M erreichen. Um eine 1  $\mu$ M Lykopin-Endkonzentration zu erhalten wurde das 5  $\mu$ M Medium weiterverdünnt.

Für die Behandlung mit Lykopin-LDL wurden direkt vor dem Versuch 6,01 ml der Lykopin-LDL-Lösung (Lykopinkonzentration 8,32  $\mu$ M) mit 44 ml ECG-Medium MV in einer lichtgeschützten Glasflasche vermischt.

HAEC wurden auf 10 cm Zellkulturschalen wie unter 3.5 beschrieben für vier Stunden mit siLDLR und siNegK 30 nM gegen den LDLR transfiziert. Nach 24 Stunden in ECG-Medium MV wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für weitere 48 Stunden mit je 10 bzw. 8 ml Versuchsmedium (ECG-Medium MV und Lykopin-supplementiertes FCS bzw. Lykopin-supplementiertes LDL) inkubiert. Die Endkonzentration Lykopins im Medium betrug 1 und 5  $\mu$ M bei der Behandlung mit Lykopin-FCS bzw. 1  $\mu$ M bei der Behandlung mit Lykopin-LDL.

Nach Behandlungsende wurden die Zellen von je drei 10 cm Zellkulturschalen eines gleichen Ansatz gepoolt (ca.  $6 \times 10^6$  Zellen). Dafür wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen, mit Accutase geerntet, in 5 ml ECG-Medium MV aufgenommen, die Lebendzellzahl bestimmt und für 5 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, 100  $\mu$ l wurden für Proteinbestimmung und weitere 50  $\mu$ l für evtl. spätere RNA-Isolation abgenommen. Der Rest der Zellsuspension von ca. 950  $\mu$ l diente für die Lykopinbestimmung per HPLC.

Alle Aliquots wurden für 7 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert, die Überstände anschließend abgenommen und die Aliquots auf Eis gelagert. 500  $\mu$ l TRIzol<sup>®</sup> wurden zum Aliquot für die RNA-Isolation hinzugegeben.

Die weitere Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80 °C. Die Aliquots für die Lykopinbestimmung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C bis zur HPLC (siehe 3.18) aufbewahrt. Die Proteinproben wurden mit 50 µl RIPA-Puffer und einer entsprechenden Menge Enzymaktivator (Complete mini) für 10 Minuten bei 4 °C und 14.000 U/min lysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit der Biuret-Methode nach 3.8 vermessen. Ein Volumenäquivalent von 25 µg Protein wurde mit 5 x SDS Probenpuffer vermischt und im Western Blot hinsichtlich der LDLR Expression untersucht (vgl. 3.13). Die Endkonzentration SDS in der Probe betrug 2 x. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **3.18 Bestimmung des Lykopingehalts in HAEC-Pellets**

#### **Material**

- Vortexer (Scientific industries, Inc)
- 10 ml Zentrifugen-Plastikröhrchen
- Dispergierer ULTRA-TURRAX® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG)
- HPLC-Probengefäß
- 2 Pumpen: Modell 580, Pulsationsdämpfer Art. 14.0177, Autosampler 540 ESA, Säulen-Thermostat Mistral, CoulArray Multi-channel Electrode Array Detector mit 8 Elektroden von 0 bis 700 mV in Stufen von 100 mV (ESA (jetzt Thermo Scientific), Chelmsford, MA, USA)
- Entgaser Degasys DG-1310 (Uniflows, Tokyo, Japan)
- Hochdruckmischkammer M800 (Kontron, Neufahrn, Germany)
- HPLC Säule: C<sub>18</sub> Säule Superspher® 100 RP-18 endcapped LiChroCART® 250-4 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

#### **Lösungen**

- Ethanol, Methanol (Sigma)
- n-Hexan mit 0.1 % BHT, Methyl-tert-butylether (MTBE) (Sigma-Aldrich)
- NaCl (saturiert in doppelt-destilliertem Wasser)
- Eluent A: Mischung (90/10, v/v) aus Methanol und Ammoniumacetat (0,2 M in Wasser, pH 4,4)
- Eluent B: Mischung (78/20/2, v/v/v) aus Methanol, 1-Propanol und Ammoniumacetat (1 M in Wasser, pH 4,4)
- Lykopinstandardlösung zur externen Kalibration

## Durchführung

Die nachfolgende Messung wurde durch Benno Zimmermann am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften – Lebensmittelchemie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn durchgeführt.

Zum Zellpellet (Behältnis A) wurden 200 µl Ethanol gegeben. Das Behältnis A wurde solange gevortext, bis die Zellen gelöst waren. 1000 µl gesättigte NaCl Lösung wurden hinzugegeben und wiederum alles für 30 Sekunden gevortext. Der komplette Inhalt des Behältnis A wurde in ein 10 ml Zentrifugen-Röhrchen (Behältnis B) überführt, das Behältnis A aufbewahrt. 1000 µl Ethanol wurden ins Behältnis A gegeben, 30 Sekunden gevortext und anschließend unter Verwendung der gleichen Pipettenspitze zum Behältnis B gegeben. 1000 µl n-Hexan (0,1 % BHT) wurden ins Behältnis A gegeben, 30 Sekunden gevortext und zum Behältnis B hinzugegeben.

Anschließend wurden 1000 µl n-Hexan (0,1 % BHT) in Behältnis A gegeben, kurz gevortext und in Behältnis B überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch zweimaliges Mixen mit ULTRA-TURRAX® bei 12000 U/min für 30 Sekunden auf Eis. Die Spitze des Dispergierers wurde mit 2 x 500 µl n-Hexan (0,1 % BHT) gespült und die Spüllösungen in Behältnis B aufgefangen. Das Behältnis B wurde für 3 Minuten bei 7000 U/min und 5 °C zentrifugiert. Der Überstand (Hexan-Phase) wurde in ein 2 ml-Tube (Behältnis C) überführt und unter leichtem Stickstofffluss wurde bei  $30 \pm 1$  °C die Hexan-Fraktion bis zur Trockenheit eingedampft. Zum Behältnis A wurden 1000 µl n-Hexane (0,1 % BHT) hinzugegeben und die Extraktionsschritte (ULTRA-TURRAX und Zentrifugation) wiederholt. Der Überstand wurde zum Behältnis C gegeben und alles bis zur Trockenheit eingedampft. Der im Behältnis C verbliebene Rückstand wurde mit 50 µl Methyl-tert-butylether versetzt und kurz gevortext. Anschließend wurden 50 µl Methanol hinzugegeben, alles kurz gevortext und anschließend für 3 Minuten bei 7000 U/min und 5 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein HPLC-Probengefäß überführt und in der HPLC vermessen. Dabei wurden folgende Gradienten verwendet: 0 min 40 % Eluent A und 60 % Eluent B, 5 min 40 % Eluent A und 60 % Eluent B, 10 min 20 % Eluent A und 80 % Eluent B, 15 min 10 % Eluent A und 90 % Eluent B, 20 min 0 % Eluent A und 100 % Eluent B, 30 min 0 % Eluent A und 100 % Eluent B, 40 min 60 % Eluent A und 40 % Eluent B, 45 min 60 % Eluent A und 40 % Eluent B.

Der Fluss betrug 0,7 ml/min bei einer Temperatur von 4 °C. Das injizierte Volumen belief sich auf 20 µl. Die HPLC-Säule und Elektroden wurden auf 30 °C gehalten.

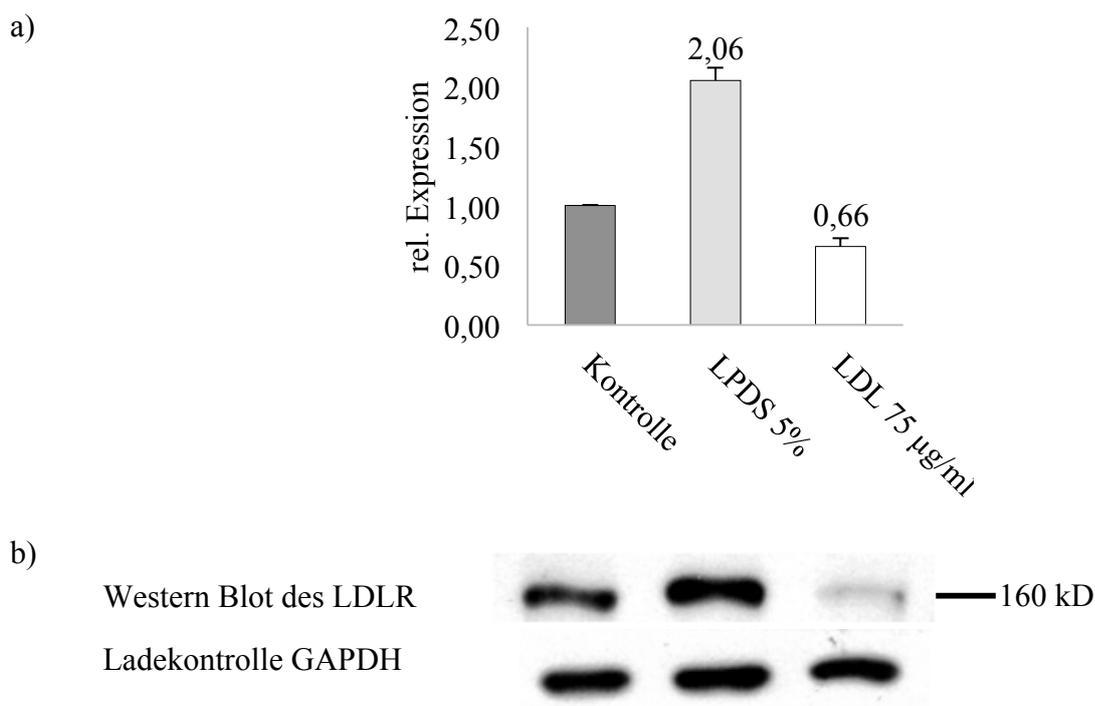
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Regulation des LDLR in HAEC nach LDL/LPDS-Stimulation

Unter der Annahme, dass die zelluläre Lykopinversorgung hauptsächlich über das LDL/LDLR-Rezeptor-Liganden-System abläuft, ist die Expression und Regulation des LDLR in HAEC Voraussetzung für weiterführende Untersuchungen zur Resorption von LDL und Lykopin. Der LDLR unterliegt normalerweise einer negativen Rückkopplung, die vom intrazellulären Cholesterolgehalt abhängig ist.

Abbildung 3 zeigt den Western Blot und die relative mRNA-Expression des LDLR nach Stimulation von HAEC mit 75 µg/ml LDL oder 5 % Lipoprotein-defizientem Serum (LPDS) über 48 Stunden. Da das (Kontroll-) Kulturmedium (ECG-Medium MV) nach Zugabe des SupplementMix standardmäßig 5 % FCS enthielt, supplementierten wir analog mit 5 % LPDS. Die Beobachtungszeiträume sowie verwendeten LDL-Konzentrationen orientierten sich an Versuchsanordnungen zur Untersuchung der Regulation des LDLR in Fibroblasten.<sup>55,56</sup>

Nach 48-stündiger Stimulation durch Lipoprotein-Depletion bzw. LDL-Supplementation ließ sich eine Zu- bzw. Abnahme der LDLR-Expression auf das 2,06 bzw. 0,66-fache im Vergleich zur Kontrolle erzielen. Der Western-Blot bestätigte die Ergebnisse der mRNA-Expression.



**Abbildung 3: Stimulation von HAEC für 48 Stunden mit 5 % LPDS oder 75 µg/ml LDL. Relative Expression der LDLR-mRNA, MW und SEM aus n = 4 Versuchen (a) und Western Blot (b)**

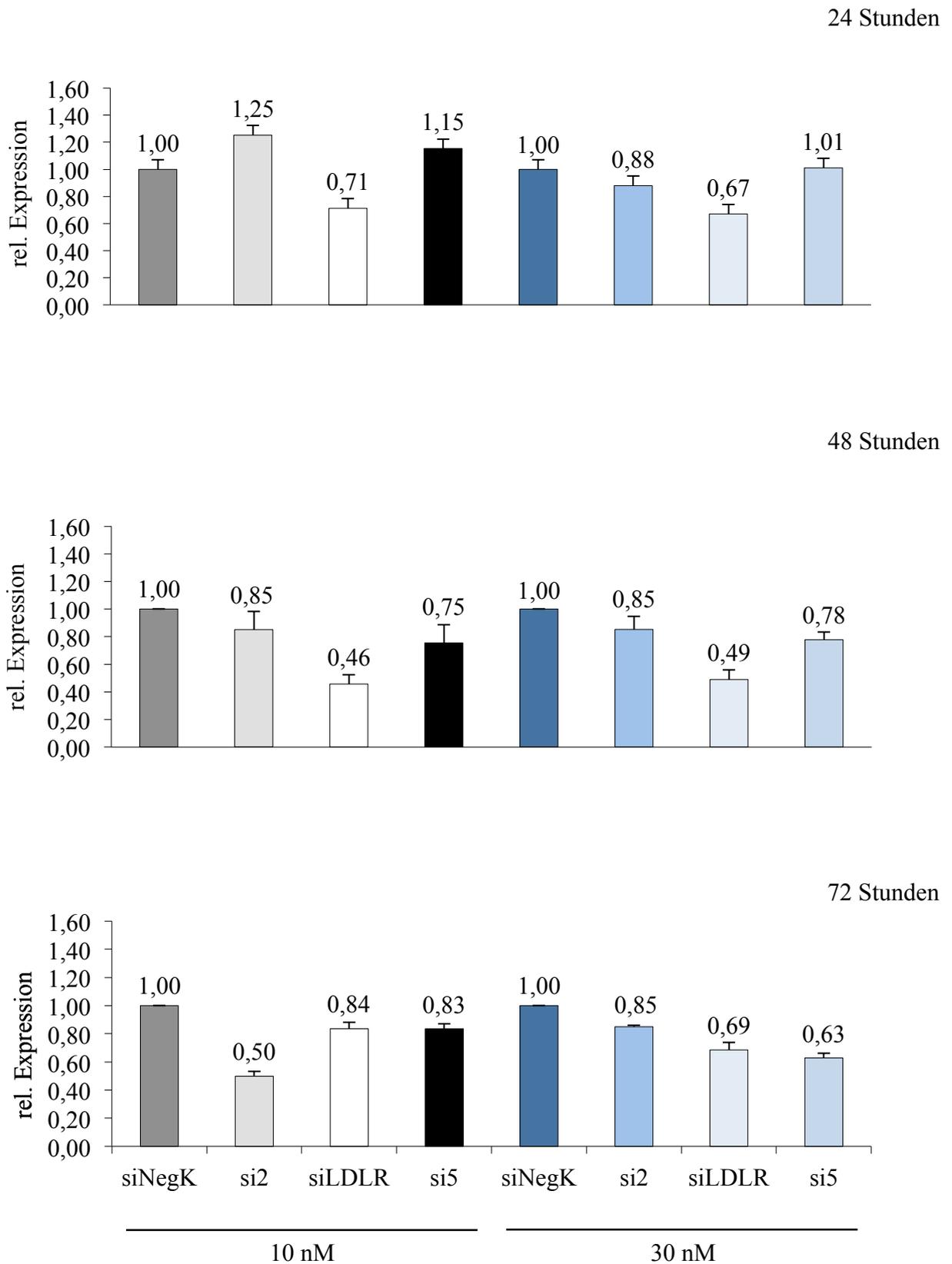
## 4.2 Bestimmung der Effektivität unterschiedlicher siRNAs

Eine erfolgreiche Transfektion ist von vielerlei Einflussfaktoren (Zelllinie, Transfektionsreagenz und -Technik, Halbwertszeit des Proteins, Zellteilungsgeschwindigkeit) abhängig.<sup>57-59</sup>

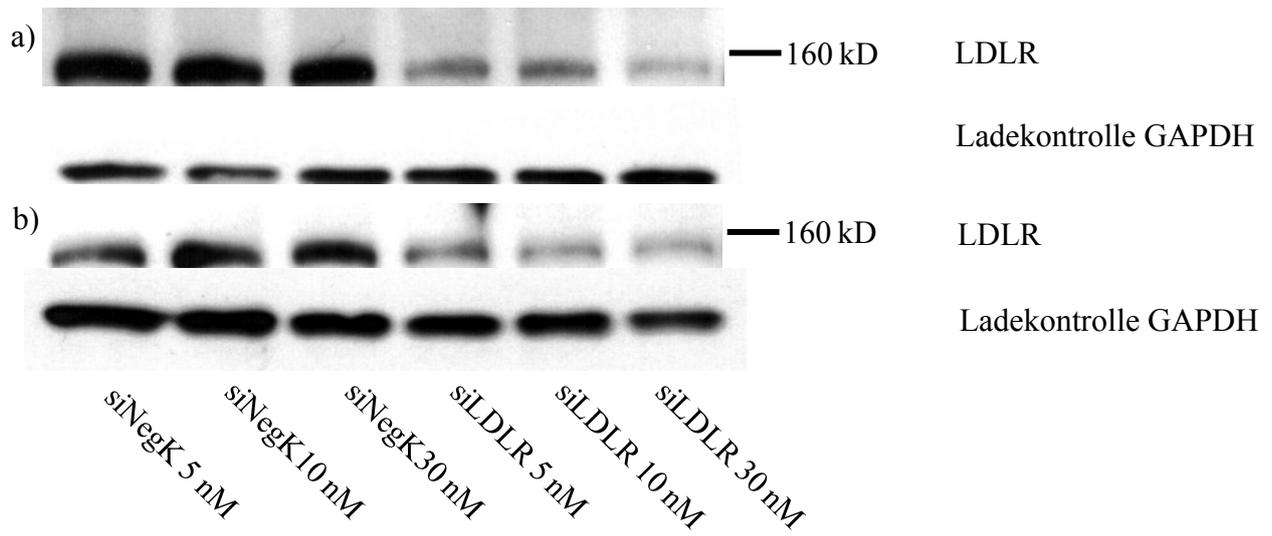
Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden zunächst HAEC mit drei verschiedenen siRNAs (si2, siLDLR und si5) gegen den LDLR in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 nM und 30 nM) transfiziert und 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion die relative LDLR-mRNA-Expression mittels Real-time RT-PCR ermittelt. Im Western Blot wurde der LDLR-Gehalt für die 48 und 72 Stunden-Werte untersucht.

24 Stunden nach Transfektion war bei mit siLDLR 30 nM transfizierten HAEC eine Reduktion der relativen LDLR-mRNA-Expression auf das 0,67-fache ( $\pm 0,07$ ), 48 Stunden nach Transfektion auf das 0,49-fache ( $\pm 0,07$ ) und 72 Stunden nach Transfektion auf das 0,69-fache ( $\pm 0,05$ ) nachzuweisen.

72 Stunden nach Transfektion zeigte si2 10 nM im Gegensatz zu siLDLR 30 nM mit einer Reduktion auf das 0,5-fache ( $\pm 0,03$ ) im Vergleich zum 0,69-fachen ( $\pm 0,05$ ) auf mRNA-Ebene einen besseren Effekt. Eine so späte Reduktion der LDLR-mRNA mit wahrscheinlich konsekutiv später Down-Regulation des LDLR war jedoch für den geplanten Versuchsablauf ungünstig. Die Folgen eines langen Beobachtungszeitraumes sind u.a. Zell-Alterungsprozesse mit möglicher Veränderung der Zellfunktion und die Gefahr der Verunreinigung der Zellkultur. Für weitere Versuche wählten wir daher siLDLR 30 nM (Abbildung 4 und 5).



**Abbildung 4: Relative LDLR-mRNA-Expression in HAEC 24, 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit drei unterschiedlichen siRNAs in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, MW und SEM aus n = 3 Versuchen**

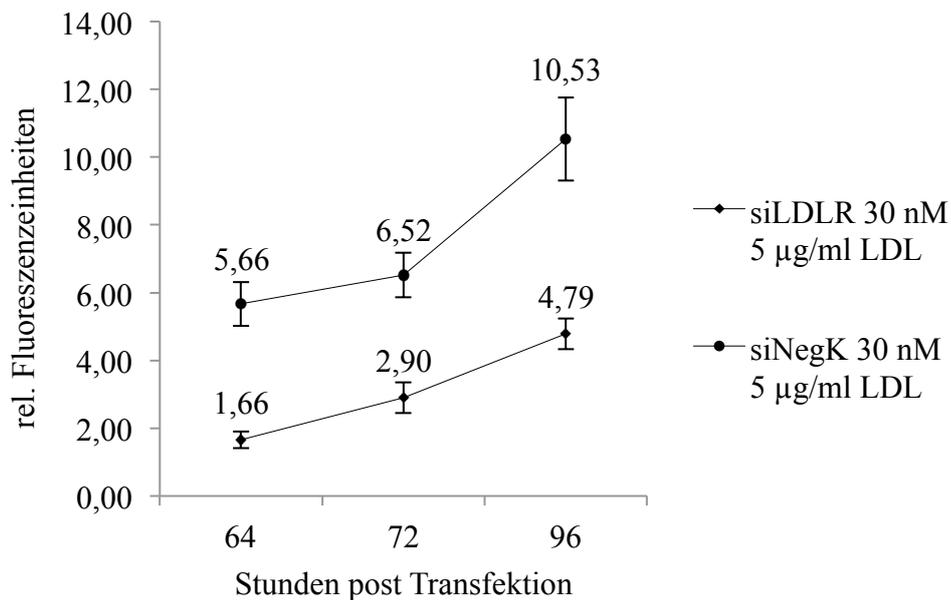


**Abbildung 5: Western Blot des LDLR in HAEC 48 (a) und 72 (b) Stunden nach Transfektion mit siRNA in den angegebenen Konzentrationen**

### 4.3 FACS-Analyse transfizierter HAEC nach Dil-LDL-Stimulation

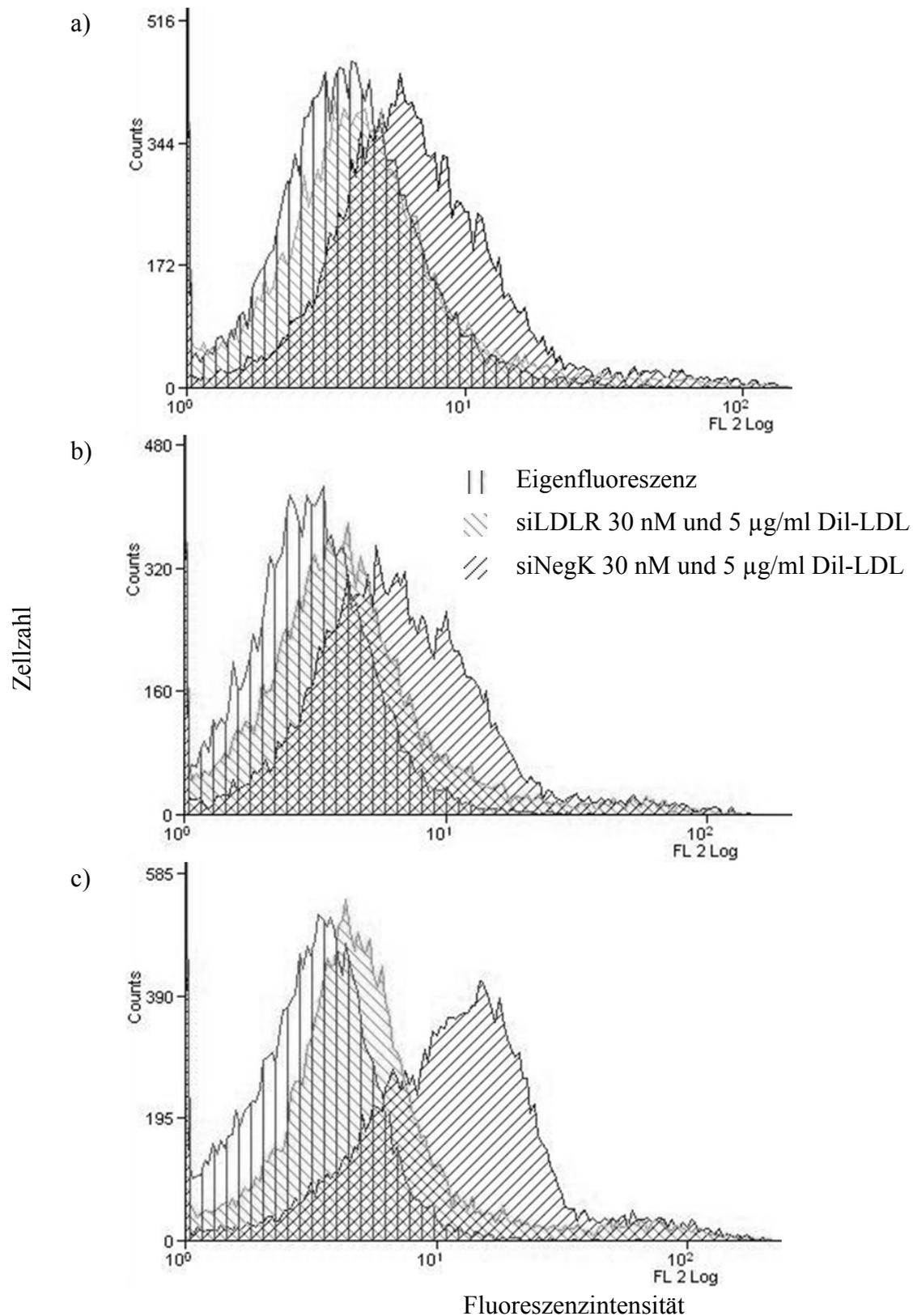
Nachdem sich durch siRNA-Transfektion auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Reduktion des LDLR nachweisen ließ, sollte durch den folgenden Versuch die funktionelle Auswirkung auf die LDL-Resorption untersucht werden.

Hierzu wurden HAEC 48 Stunden nach siRNA-Transfektion für drei unterschiedliche Zeiträume mit 5 µg/ml Dil-LDL inkubiert und anschließend der relative Fluoreszenzgehalt von Dil im FACS analysiert. (Abbildung 6)



**Abbildung 6: Stimulation von HAEC für 16, 24 und 48 Stunden mit 5 µg/ml Dil-LDL. 48 Stunden zuvor wurden die Zellen mit siLDLR 30 nM transfiziert. Darstellung der relativen Fluoreszenzeinheiten, MW und SEM aus n = 3 Versuchen**

Es zeigte sich eine von der Inkubationsdauer abhängige Zunahme der relativen Dil-Fluoreszenz sowie ein deutlicher Unterschied zu allen Zeitpunkten zwischen gegen den LDLR transfizierten HAEC und der Kontrolle. Abbildung 7 zeigt exemplarische FACS-Daten.



**Abbildung 7: Repräsentative Originaldarstellung der Dil-Fluoreszenzverteilung in transfizierten HAEC. 48 Stunden vor Inkubation mit Dil-LDL 5 µg/ml sind die HAEC mit siLDLR 30 nM bzw. siNegK 30 nM transfiziert worden. Die Behandlung mit Dil-LDL erfolgte für 16 (a), 24 (b) und 48 Stunden (c).**

#### 4.4 Plasma- und LDL-Lykopingehalt nach in-vivo Supplementation

Für die geplante Lykopin-Stimulation von HAEC mit humanem, in-vivo supplementiertem LDL wurde mittels HPLC der Gesamt-Lykopingehalt im Plasma vor und nach sowie in der LDL-Fraktion nach 7-tägiger Lykopinsupplementation mit 70 g Tomatenmark bei acht gesunden Probanden (3 Frauen, Alter:  $26,7 \pm 2,31$  und 5 Männern, Alter:  $26,2 \pm 2,59$ ) ermittelt.

Der Lykopin-Basalwert im Plasma lag bei  $0,94 \pm 0,34 \mu\text{M}$ , nach Abschluss der Lykopinsupplementation bei  $1,08 \pm 0,35 \mu\text{M}$ . Der Lykopingehalt in der durch Dichtegradientenultrazentrifugation gewonnenen LDL-Fraktion schwankte zwischen  $0,85 \pm 0,01$  und  $7,36 \pm 0,09 \mu\text{M}$ . Tabelle 4 fasst die erreichten Gesamt-Lykopinspiegel aller Probanden zusammen.

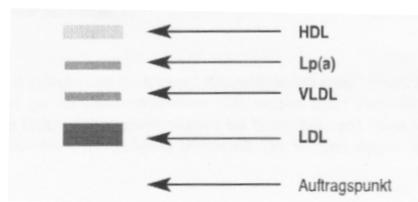
Nach Reinheitsbestimmung durch Lipophorese wurden die LDL-Fraktionen aller acht Probanden vereint und anschließend per Filterzentrifugenröhrchen auf ca. 1/5 des Ausgangsvolumens aufkonzentriert. Die Lykopinkonzentration in der gepoolten und konzentrierten LDL-Fraktion aller Probanden betrug  $8,32 \pm 0,59 \mu\text{M}$  bei einem Gesamtvolumen von ca. 13 ml.

**Tabelle 4: Lykopingehalte vor und nach in-vivo Supplementation (MW und SD)**

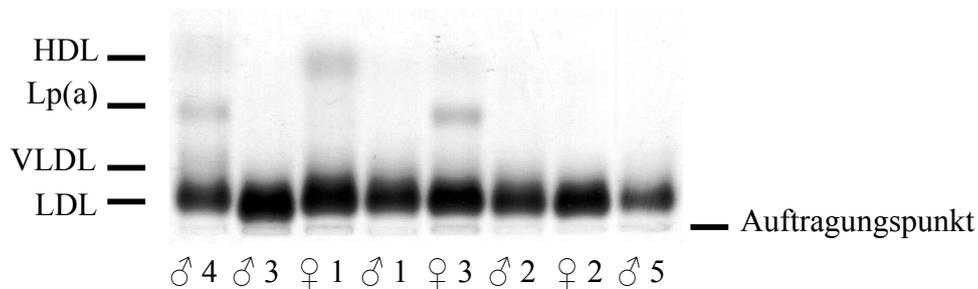
Proband	Plasma Basalwert	Plasma nach 7 Tagen Supplementation	LDL-Fraktion nach 7 Tagen Lykopin- Supplementation
♀ 1	$1,36 \pm 0,07$	$1,62 \pm 0,14$	$6,20 \pm 0,20$
♂ 1	$0,74 \pm 0,09$	$1,10 \pm 0,05$	$2,96 \pm 0,09$
♂ 2	$0,90 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,05$	$2,70 \pm 0,02$
♂ 3	$1,49 \pm 0,00$	$1,38 \pm 0,08$	$7,36 \pm 0,09$
♀ 2	$0,56 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,06$	$3,75 \pm 0,20$
♀ 3	$0,78 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,03$	$4,53 \pm 0,10$
♂ 4	$1,09 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,04$	$3,81 \pm 0,00$
♂ 5	$0,63 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,01$
MW und SD	$0,94 \pm 0,34$	$1,08 \pm 0,35$	$4,02 \pm 2,15$

#### 4.5 Analyse der Reinheit von in-vivo Lykopin supplementiertem LDL

Um sicherzustellen, dass das gewonnene LDL keine oder nur eine sehr geringe Verunreinigung mit anderen Lipoproteinklassen aufwies, wurde durch eine Lipophorese der prozentuale Anteil des LDL in der durch Dichtegradientenultrazentrifugation gewonnenen LDL-Fraktion bestimmt. Der photometrisch ermittelte, prozentuale Anteil des LDL in der LDL-Fraktion erreichte dabei Werte zwischen 90,6 % und 100 % (vgl. Tabelle 5). Aufgrund dieser Erkenntnisse konnten die LDL-Fraktionen aller acht Probanden verwendet werden. Die typischen Laufeigenschaften der Lipoproteine in der Gelelektrophorese zeigt die Abbildung 8. Abbildung 9 zeigt die Lipophorese aller acht Probanden.



**Abbildung 8: Schematische Bandenverteilung der Lipoprotein in der sebiam® Lipophorese**



**Abbildung 9: sebiam® Lipophorese der acht Probanden**

#### 4.6 Stimulation von HAEC mit in-vivo Lykopin supplementiertem LDL

Die siRNA-Transfektion gegen den LDLR bei  $n = 3$  Versuchen war mit einer Reduktion der mRNA-Expression auf  $0,80 \pm 0,02$  erfolgreich. Nach Zugabe der entsprechenden Menge von Lykopin-LDL zum Erreichen einer  $1 \mu\text{mol/l}$  Endkonzentration im Zellkulturmedium bildete sich ein Fettfilm. In der HPLC ließ sich in keinem der Zellpellets Lykopin nachweisen.

**Tabelle 5: Prozentuale Zusammensetzung der Lipoproteinfraktionen von acht Probanden**

Proband	LDL %	VLDL %	Lp(a) %	HDL %
♀ 1	90,9	0	0	9,1
♂ 1	97,4	0	1,5	1,1
♂ 2	97,2	0	1,7	1,1
♂ 3	99,6	0,4	0	0
♀ 2	98,0	2,0	0	0
♀ 3	93,3	0	5,5	1,2
♂ 4	90,6	0	6,5	2,9
♂ 5	100	0	0	0
MW und SD	95,88 ± 3,75	0,30 ± 0,70	1,90 ± 2,64	1,93 ± 3,06

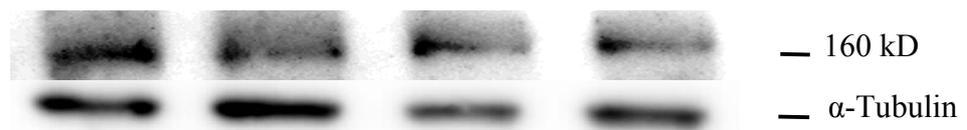
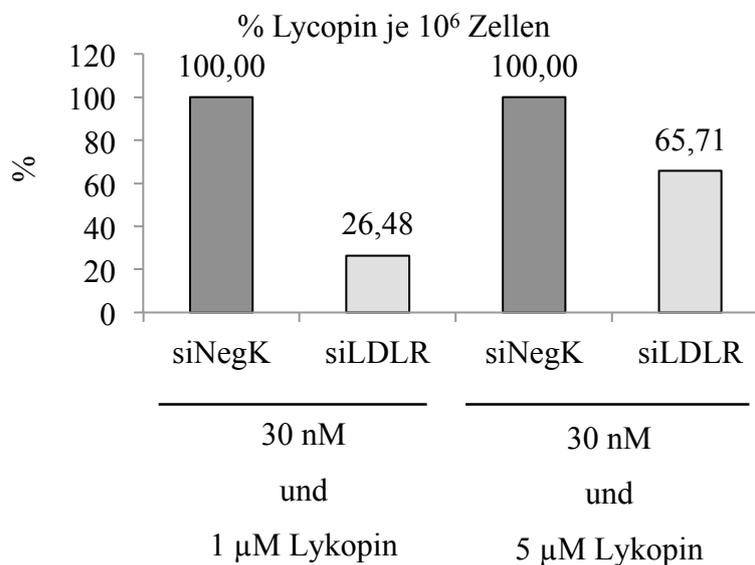
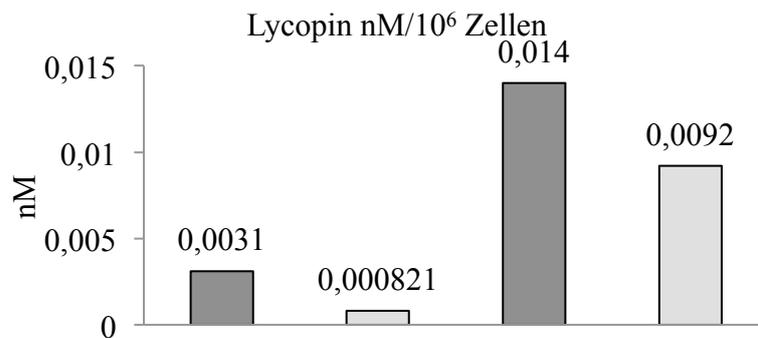
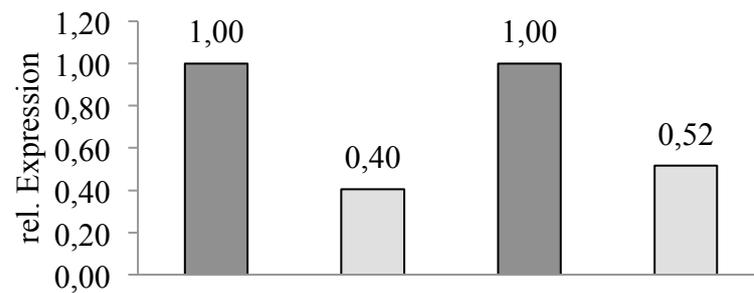
#### 4.7 Lykopingehalt in FCS-Lykopin supplementierten HAEC

Anders als bei der Stimulation mit in-vivo Lykopin supplementiertem LDL (Fettfilmbildung auf dem Kulturmedium) ergaben sich bei der Stimulation mit FCS-Lykopin keine Schwierigkeiten.

72 Stunden nach siRNA-Transfektion gegen den LDLR ließen sich bei der 1 bzw. 5 µM Lykopin-Supplementationsgruppe Reduktionen der LDLR-Expression auf  $69 \pm 31$  bzw.  $69 \pm 24$  % im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Hieraus resultierten bei Stimulation mit 1 bzw. 5 µM Lykopin Reduktionen des prozentualen Lykopingehalts je  $10^6$  Zellen auf  $55,64 \pm 27,76$  bzw.  $59,74 \pm 6,10$  % sowie des absoluten Lykopingehalts pro  $10^6$  Zellen von  $0,006 \pm 0,003$  auf  $0,004 \pm 0,003$  bzw. von  $0,025 \pm 0,01$  auf  $0,015 \pm 0,007$  nM/ $10^6$  Zellen. Eine Reduktion der Expression des LDLR im Western Blot ließ sich im Trend erkennen. Die Abbildungen 10 bis 13 zeigen die Einzel- und gemittelten Ergebnisse von n = 3 Versuchen für die LDLR Real-time RT-PCR, die LDLR-Expression im Western Blot sowie den prozentualen und absoluten Lykopingehalt in nM je  $10^6$  Zellen.

## Versuch 1

### LDLR-mRNA

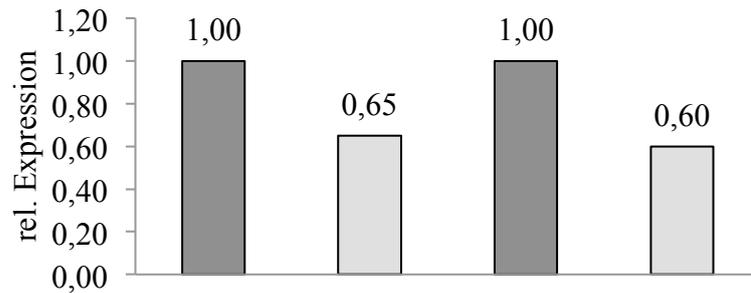


**Abbildung 10: Real-time RT-PCR und Western Blot des LDLR sowie prozentuale und absolute Werte des Lykopingehalts in siRNA transfizierten und mit FCS-Lycopin stimulierten HAEC. Die Bandenbelegung des Western Blots entspricht der Probenreihenfolge der vorstehenden Diagramme.**

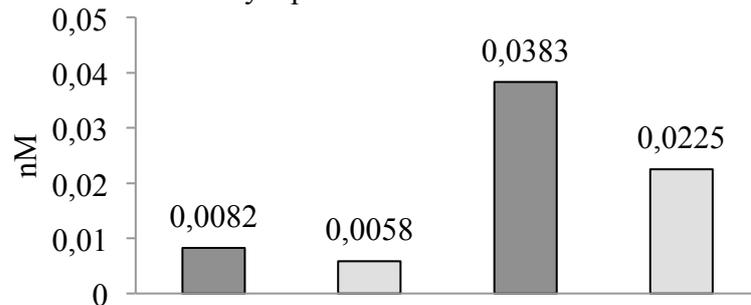


### Versuch 3

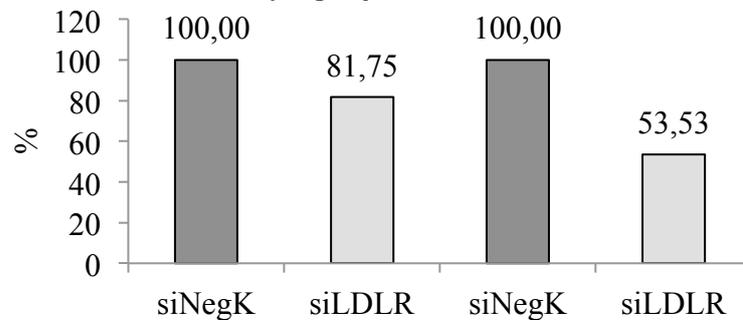
#### LDLR-mRNA



#### Lycopin nM/10<sup>6</sup> Zellen

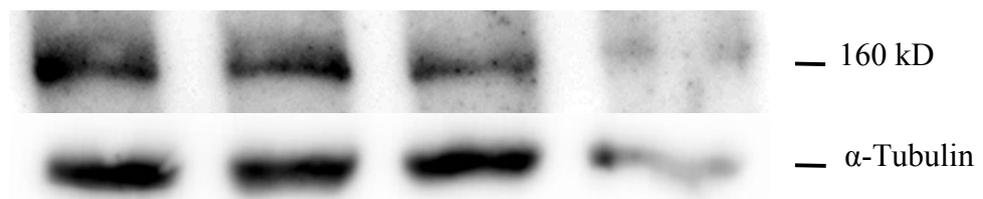


#### % Lycopin je 10<sup>6</sup> Zellen



30 nM  
und  
1 µM Lycopin

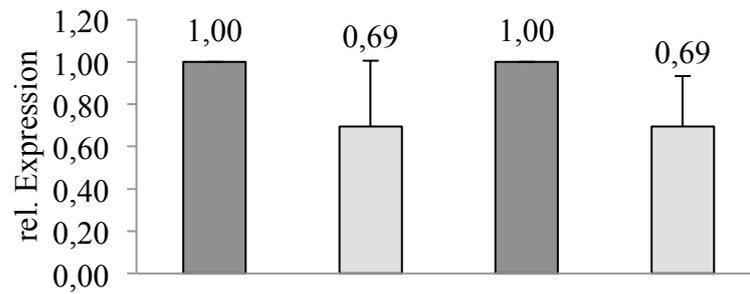
30 nM  
und  
5 µM Lycopin



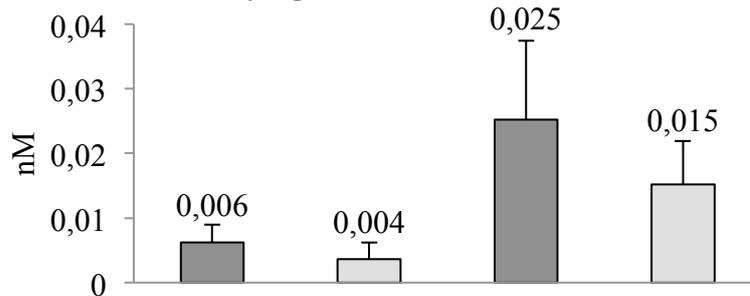
**Abbildung 12: Real-time RT-PCR und Western Blot des LDLR sowie prozentuale und absolute Werte des Lycopingehalts in siRNA transfizierten und mit FCS-Lycopin stimulierten HAEC. Die Bandenbelegung des Western Blots entspricht der Probenreihenfolge der vorstehenden Diagramme.**

### Versuche 1 bis 3

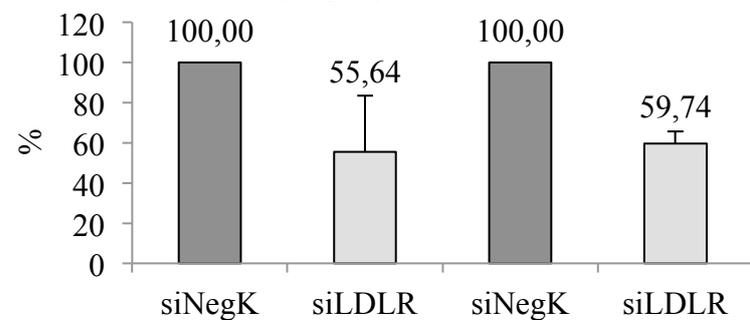
#### LDLR-mRNA



#### Lycopin nM/10<sup>6</sup> Zellen



#### % Lycopin je 10<sup>6</sup> Zellen



siNegK      siLDLR      siNegK      siLDLR  
 —————      —————  
 30 nM                      30 nM  
 und                              und  
 1 µM Lycopin                      5 µM Lycopin

**Abbildung 13: Real-time RT-PCR des LDLR sowie prozentuale und absolute Werte des Lykopingehalts in siRNA transfizierten und mit FCS-Lycopin stimulierten HAEC. MW und SEM aus n = 3 Versuchen**

## 5. Diskussion

An der Entstehung und Progression von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind vor allem oxidativ modifizierte Lipoproteine, allen voran modifiziertes LDL, beteiligt. Karotinoide, hierbei besonders Lycopin, wirken antioxidativ und haben einen positiven Effekt auf Mortalität, Morbidität, Progression und Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen.

Erkenntnisse über die enterale Resorption, Transport- und Ausscheidungswege sowie über die Verteilung in humanen und tierischen Geweben von Lycopin liegen vor. Der zelluläre Resorptionsmechanismus ist bisher jedoch nicht geklärt. Es deutet einiges darauf hin, dass die zelluläre Resorption über das LDL/LDLR-System läuft.

1.) LDL weist unter den Lipoproteinen den höchsten Anteil von Lycopin auf. 2.) Gewebe mit einer hohen LDLR-Expression weisen einen hohen Lycopinspiegel auf. 3.) Die LDL-Clearance hat einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung der Arteriosklerose bei Lycopinstimulation im Tierversuch. So weisen LDLR<sup>-/-</sup> Watanabe-Kaninchen trotz Lycopin-Supplementierung eine im Vergleich zum LDLR<sup>+/+</sup> New Zealand Kaninchen deutlich accelerierte Arteriosklerose auf.<sup>1,2</sup>

Die protektiven Eigenschaften des Lycopins auf zellulärer Ebene scheinen daher an ein funktionsfähiges LDL/LDLR-System gebunden zu sein.

Endothelzellen stellen hierbei die Schnittstelle zwischen LDL-gebundenem Transport von Lycopin im Blut und der zellulären Resorption sowie einer möglichen intrazellulären Wirkung dar. Sie sind darüber hinaus in der Krankheitsentstehung und Progression der Arteriosklerose und damit verbundener Pathologien involviert.

Als Modell für die Versuche fiel die Wahl daher auf HAEC. HAEC stellen ein in der Arterioskleroseforschung etabliertes Zellkulturmodell dar. Sie wurden bspw. bei Co-Kultivierungsversuchen zur Modifikation von Lipoproteinen verwendet und zeigten bei Stimulation durch Interleukin-1 (IL-1) und Karotinoide eine im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen.<sup>60-68</sup>

Zunächst musste als Grundvoraussetzung der Nachweis erbracht werden, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen HAEC über einen der Norm entsprechenden Lipidstoffwechsel verfügten.

Die Erhöhung bzw. Reduktion des LDL-Gehalts im Zellkulturmedium durch Supplementation mit LDL bzw. durch den Austausch von FCS durch LPDS im Kulturmedium stellt dafür ein geeignetes Verfahren dar. Die Regulation der Expression des LDLR und der LDLR-mRNA durch Cholesterolsupplementation bzw. -deprivation durch eine LDL- bzw. LPDS-Supplementation sind für unterschiedliche Zelltypen beschrieben, der zelluläre

Regulationsmechanismus ist bekannt. Die Expression von an der Cholesterolhomöostase involvierter Gene, wie die des LDLR, unterliegt einer durch den intrazellulären Cholesterolgehalt gesteuerten negativen Rückkopplung.<sup>55,56,69-74</sup> Es liegen Hinweise dafür vor, dass die Regulation des LDLR in Tumorzellen vom intrazellulären Cholesterospiegel entkoppelt ist.<sup>75</sup>

So ließen sich in Vorversuchen 48 Stunden nach Behandlung mit LDL bzw. LPDS im Zellkulturmedium sowohl im Western Blot als auch in der Real-time RT-PCR eine deutliche Reduktion bzw. Zunahme der LDLR-Proteinmenge und der relativen mRNA-Expression in HAEC nachweisen. Unter den angewandten Versuchsbedingungen zeigten die HAEC eine den Erwartungen entsprechende Regulation der LDLR-Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene.

Als nächster Schritt schloss sich die Untersuchung der Zytotoxizität und Effektivität unterschiedlicher siRNAs in Konzentrations- und Zeitreihen an.

Der Erfolg einer Transfektion ist abhängig von der verwendeten siRNA, der Transfektionstechnik, der Zelllinie sowie der Halbwertszeit des Proteins und korreliert mit der Geschwindigkeit der Zellteilung. Scheinbare Transfektionserfolge können durch unspezifische und sog. off-target Effekte vorgetäuscht werden.<sup>57-59</sup>

Als Transfektionsreagenz fiel die Wahl auf INTERFERin™. Es handelt sich hierbei um ein nicht-liposomales, kationisches, amphiphiles Molekül zum Transport von siRNA. In Studien, u.a. mit venösen Endothelzellen, gab es weniger unspezifische und zytotoxische Effekte als auf Liposomen basierende Transfektionsreagenzien (z.B. Lipofectamine™2000).<sup>59,76</sup>

In unseren Versuchen wiesen die HAEC während der vierstündigen Transfektion eine längliche Zellmorphologie auf. Nach Mediumwechsel zeigten die Zellen innerhalb weniger Stunden wieder die Ausgangsmorphologie. Zeichen für Zytotoxizität in Form von persistierenden Morphologie-Veränderungen, Zellablösungen oder einer Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu nicht transfizierten HAEC ließen sich nicht beobachten. Die Expression von Housekeeping-Genen (GAPDH und  $\alpha$ -Tubulin im Western Blot und  $\beta$ -Aktin in der RT-PCR) wurde durch die Transfektion mit Kontroll-siRNA oder Effektor-siRNA nicht differentiell beeinflusst. Von zytotoxischen oder Phänotyp verändernden Wirkungen des Transfektionsreagenz sowie der eingesetzten siRNAs in Konzentrationen bis 30 nM war daher nicht auszugehen. Bei einer verwendeten siRNA-Länge von 21 bp war keine Induktion des Interferonsystems zu erwarten. Die beobachteten temporären Morphologieänderungen sind in unserem Fall als unspezifische Stressantwort auf das Serum-

freie Medium (Opti-MEM® I) während der Transfektion zu werten. FCS- und Antibiotikum-freies Medium erhöht die Transfektionseffektivität und verringert zytotoxische Effekte während der Transfektion mit INTERFERin™. <sup>76</sup>

Von einer unspezifischen Beeinflussung der LDLR-Expression allein durch die Transfektion musste daher nicht ausgegangen werden.

Ein weiterer Aspekt bei der Auswahl der siRNA ist die Dauer der durch siRNA vermittelten mRNA-Expressionsreduktion sowie die Halbwertszeit des Ziel-Proteins.

Die Halbwertszeit des LDLR bei Fibroblasten in der Zellkultur in Medium mit 10 % FCS ohne bzw. mit 10 µg/ml zusätzlichem LDL beträgt 25 bzw. 21 Stunden. Fünf Stunden nach Pronase-induzierter Zerstörung membrangebundener LDLR in Fibroblasten sind 80 % der Rezeptoraktivität wiederhergestellt. Es besteht eine Induzierbarkeit des LDLR mit Re-Synthesegeschwindigkeiten oberhalb der im physiologischen Gleichgewichtszustand beobachteten. <sup>55,56</sup>

Bei einer geplanten FCS-Lycopin- bzw. LDL-Lycopin-Supplementationsdauer von 48 Stunden sollte die funktionelle Down-Regulation des LDLR im Idealfall über 72 Stunden post Transfektion anhalten, da erst ab ca. 24 Stunden nach Transfektion mit einer deutlichen Reduktion des LDLR zu rechnen war.

Zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48 und 72 Stunden post Transfektion) untersuchten wir daher die Reduktion der relativen LDLR-mRNA-Expression bei drei unterschiedlichen siRNAs (si2, siLDLR und si5) jeweils in zwei Konzentrationen (10 und 30 nM). Zusammen mit den Ergebnissen aus dem Western Blot erwies sich siLDLR 30 nM zu den o.g. Zeitpunkten mit einer relativen Reduktion der LDLR-mRNA-Expression auf 67 %, 49 % und 69 % im Vergleich zu si2 und si5 am effektivsten.

Für die Quantifizierung der funktionellen Auswirkungen der siRNA-Transfektion gegen den LDLR in HAEC supplementierten wir 48 Stunden nach erfolgter Transfektion für weitere 16, 24 bzw. 48 Stunden mit 5 µg/ml Dil-LDL. Endothelzellen nehmen das 7-15fache an Dil-ac-LDL auf als glatte Muskelzellen oder Perizyten und können anhand ihres hoch aktiven Dil-ac-LDL-Metabolismus von anderen Zelltypen unterschieden werden. <sup>77</sup> Die Inkorporation von Dil in LDL hat keine Auswirkungen auf dessen Rezeptorinteraktion und führt zu keinem Transfer des Farbstoffs aus markiertem auf nicht-markiertes LDL oder Zellmembranen. Dil beeinflusst nicht die Zellvitalität oder Physiologie, wird nicht verstoffwechselt und akkumuliert über Tage in Zellen. Die Intensität der Fluoreszenz ist ein verlässlicher Marker und proportional der aufgenommenen Menge an LDL. <sup>69,78,79</sup>

64, 72 bzw. 96 Stunden nach Transfektion betrug die Reduktion der Dil-LDL-Resorption ca. 70 %, 55,5 % bzw. 54,5 %.

Die funktionellen Auswirkungen des siRNA-induzierten LDLR-Knock-Downs waren größer und hielten bei Co-Stimulation mit 5 µg Dil-LDL länger an als die Reduktion der mRNA-Expression. Einmal induzierte LDL-Resorptionsminderungen wurden offensichtlich nicht durch eine spätere Mehraufnahme kompensiert. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine temporäre Verstoffwechslung cytosolischer Speicher (Endosomen) gewesen sein, die eine Substratdeprivation mit konsekutiver späterer Kompensation/Hyperresorption verhindert haben. Zum anderen wurde die Dil-LDL-Supplementation in ECG-Medium MV mit 5 % FCS durchgeführt. Ein zusätzlicher Stimulus zur Induktion des LDLR durch Cholesteroldeprivation durch LPDS statt FCS lag nicht vor.

Andere Gruppen erzielten beim Knock-Down des LDLR mit siRNA auch bei längeren Transfektionszeiträumen (bis 72 Stunden) in humanen und tierischen Zelllinien im Western Blot Reduktionen des LDLR um 68 % bzw. 60 %. Eine funktionelle Untersuchung fand nicht statt. Die daraus resultierende anzunehmende Restaktivität des LDLR würde zwischen ca. 30 und 40 % betragen und würde damit grob mit der von uns bestimmten Reduktion der Dil-LDL-Resorption/Fluoreszenz korrespondieren.<sup>80,81</sup> Die von uns erzielten Transfektionserfolge sind daher mit denen anderer Forschergruppen vergleichbar.

In den vorgeschalteten Versuchen hatte sich gezeigt, dass durch die siRNA-Transfektion gegen den LDLR eine funktionelle Reduktion der LDL-Aufnahme in HAEC erreicht werden konnte. Initial war geplant, transfizierte HAEC mit Lykopin in LDL aus einem humanen Supplementationsversuch zu behandeln und den Lykopingehalt in  $10^6$  Zellen per HPLC zu bestimmen. Aus Vorversuchen war bekannt, dass man sich bei einer 48-stündigen Behandlung von HAEC mit Lykopin-FCS supplementiertem Medium mit einer Endkonzentration von 1 µM knapp über der Nachweisgrenze der HPLC bewegte.

Die Lykopingehalte im Plasma vor und nach Supplementation mit Tomatenmark sowie im LDL wurden bei den Spendern bestimmt. Der Basalwert lag bei 0,94 µM, erreichte nach 7-tägiger Supplementation 1,08 µM im Plasma und lag in der LDL-Fraktion nach Supplementation bei 4,02 µM.

Um die durch LDL-Lycopin-Supplementation bedingte Veränderung des Zellkulturmediums (pH, bakterielle Verunreinigung, Konzentration von Salzen und Wachstumsfaktoren) so gering wie möglich zu halten, war eine hohe Lykopinkonzentration der LDL-Lycopin-Stammlösung notwendig. Durch Aufkonzentrierung mit 30 kDa MWCO Filterzentrifugenröhrchen ließ sich

eine LDL-Lycopin-Stammlösung mit einer Konzentration von 8,32  $\mu\text{M}$  gewinnen. Bei der Zugabe der entsprechenden Menge konzentrierten LDL zum Zellkulturmedium für eine Lycopin-Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  in 8 ml Gesamtvolumen pro Zellkulturschale bildete sich ein Fettfilm. Per HPLC ließ sich in keinem Zellpellet Lycopin nachweisen. Von einer Durchmischung des Zellkulturmediums mit dem konzentrierten LDL und einer ausreichenden zellulären Erreichbarkeit war daher nicht auszugehen. Es kann nicht aufgeklärt werden, ob sich die chemischen Eigenschaften des LDL durch die Aufkonzentrierung geändert hatten und es zur Aggregation gekommen war. Bei dieser eingeschränkten Machbarkeit musste auf weitere Versuche mit in-vivo Lycopin supplementiertem LDL verzichtet werden.

Die Supplementation mit Tomatenmark verlief erfolgreich und lieferte vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich des basalen Plasma-Lycopingehalts als auch der Zunahme nach einwöchiger oraler Supplementation.<sup>32,35,37,53,82,83</sup>

Mittels Lipophorese und anschließender densitometrischer Auswertung wurde der Reinheitsgrad der einzelnen isolierten LDL-Fractionen vor dem Poolen analysiert. Der Anteil von LDL schwankte zwischen 90.9 % und 100 % bei durchschnittlich 95,88 %. Prozentuale Angaben zur Reinheit der isolierten LDL-Fraktion durch Dichtegradientenultrazentrifugation bei anderen Forschergruppen lagen nicht vor. Abgebildete Lipophorese-Scans lassen aber auf eine ähnlich zuverlässige Isolation einzelner Lipoproteinklassen schließen.<sup>84-86</sup>

Prinzipiell stellt die in-vivo Lycopin-Supplementation ein geeignetes Verfahren für die Gewinnung von Lycopin-angereichertem LDL oder Plasma dar. Bei Anwendung in Zellkulturversuchen mit nachfolgender Bestimmung des Lycopingehalts ergibt sich jedoch zum einen das Problem der Sensitivität der Messmethode, zum anderen die nötige Menge an Plasma oder LDL, die notwendig wären, um physiologische, humane Lycopinspiegel zu reproduzieren. Humanes Plasma enthielt in keiner der oben zitierten Arbeiten deutlich mehr als 1  $\mu\text{M}$  Lycopin. Hier scheint bei oraler Supplementation eine Sättigungskinetik vorzuliegen. Unabhängig davon, ob man Plasma oder nur die LDL-Fraktion weiterverwendet, wird es durch Zellkulturmedium immer zu einer erheblichen Verdünnung kommen, die das Erreichen einer 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration fast unmöglich erscheinen lässt. Ein Versuchsaufbau mit Zellkultur, Stimulation mit Plasma oder LDL, mit oder ohne vorherige Lycopin-Supplementation, und nachfolgender Detektion von Lycopin in Zellen wird daher immer eine sehr sensitive Karotinoid-Detektion erfordern.

Nachdem sich durch die LDL-Lycopin-Stimulation oben genannte Probleme ergeben hatten, wurden die weiteren Versuche mit der in-vitro Lycopin-FCS-Stimulation vorgenommen. Fötales

Kälberserum (fetal calf bzw. bovine serum - FCS bzw. FBS) in Verbindung mit Tetrahydrofuran (THF) stellt ein akzeptiertes Modell für die Applikation von Lykopin in der Zellkultur dar.<sup>20,68</sup> In THF gelöstes Lykopin wird entweder mit FCS gemischt (THF/FCS-Lycopin) und dem Zellkulturmedium zugesetzt oder zu Zellkulturmedium mit bereits enthaltenem FCS hinzugefügt. Vorteile gegenüber anderen Methoden sind eine geringe Zytotoxizität, die gute Stabilisierung Lykopins, eine einfache Anwendbarkeit sowie das Erreichen von hohen Lykopinkonzentrationen im Zellkulturmedium bei geringem Volumenzusatz von THF/FCS-Lycopin. Endkonzentrationen von THF bis 1,25 % scheinen die Zellvitalität nicht zu beeinflussen. Wird statt FCS Lipoprotein defizientes Kälberserum (LPDS) bei der Solubilisierung von Lykopin verwendet, so resultierte eine ca. 50%ige Reduktion der Lykopin-Resorption in Prostatakarzinomzellen. Folglich spielt die Lipoproteinfraktion des FCS wie auch in-vivo eine wichtige Rolle beim Lykopintransport.<sup>54,87</sup>

Eine genaue Vorhersage über die prozentuale Inkorporation des Lykopins in die unterschiedlichen Lipoproteinklassen des FCS bei in-vitro Supplementation ist nicht möglich. Es ist anzunehmen, dass sich das in THF gelöste Lykopin entsprechend des Lipidgehalts der im FCS enthaltenen Lipoproteine löst und somit zu einem großen Teil in LDL enthalten ist. Sollte sich durch die siRNA-Transfektion gegen den LDLR ein Unterschied in der Lykopinmenge der Zellen ergeben, so muss dieser auf der reduzierten Resorption von LDL beruhen. Die LDLR-unabhängige Lykopin-Resorption in HAEC durch andere Lipoproteine und ggf. unspezifische Inkorporation von THF-Lycopin in Zellmembranen ist bei gleichen Versuchsbedingungen und der Abwesenheit von siRNA-induzierten off-target Effekten als konstant anzunehmen. Die THF-Endkonzentration in unseren Versuchen lag unter 1 %.

Die Untersuchung der zellulären Lykopin-Resorption in HAEC bei 1 bzw. 5  $\mu\text{M}$  Lykopinkonzentration im Zellkulturmedium erfolgte unter Orientierung an physiologischen Rahmenbedingungen. Lykopin-Plasmakonzentrationen von ca. 1  $\mu\text{M}$  wurden von unserem Probandenkollektiv erreicht. Andere Forschergruppen ermittelten Lykopin-Plasmakonzentrationen zwischen 0,3 und 0,8  $\mu\text{M}$ .<sup>53,82,83,88,89</sup>

72 Stunden nach siRNA-Transfektion gegen den LDLR ließ sich ein prozentualer bzw. absoluter Rückgang in der Lykopinmenge je  $10^6$  HAEC auf 55,64 % bei 1  $\mu\text{M}$  und 59,74 bei 5  $\mu\text{M}$  bzw. von 0,006 auf 0,004 bei 1  $\mu\text{M}$  und von 0,025 auf 0,015 nM/ $10^6$  Zellen bei 5  $\mu\text{M}$  Lykopin erzielen. Eine entsprechende Reduktion der LDLR-Expression ließ sich im Western Blot nachweisen.

Die Schwankungsbreite der zellulären Lykopinmenge spiegelt zum einen die bei  $n = 3$  Versuchen hohe Standardabweichung der LDLR-mRNA-Expression nach siRNA induziertem

Knock-Down wieder. Zum anderen lässt sich erkennen, dass eine Lykopin-Supplementation mit 5 statt 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration schwankungsärmere Nachweise der zellulären Lykopinmengen ergibt. Mögliche Gründe könnten die bei 1  $\mu\text{M}$  Lykopin-Supplementation nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze der HPLC erreichbare Lykopinmenge in  $10^6$  HAEC sowie stärker ins Gewicht fallende Pipettierungenauigkeiten und Degradationsvorgänge des Lykopins bei kleineren Lykopinmengen gewesen sein.

Bei zukünftigen Versuchen, bei denen auf einen physiologischen Lykopin-Spiegel verzichtet werden kann, erscheint es sinnvoll, eine größer als 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration Lykopin im Versuchsmedium zu verwenden. Durch die höher oberhalb der HPLC-Nachweisgrenze erreichbare zelluläre Lykopinmenge fallen zuvor genannte Faktoren weniger ins Gewicht, so dass evtl. bei kleinerer Probenanzahl schwankungsärmere Versuchsergebnisse erzielt werden könnten.

Der erzielte Rückgang der zellulären Lykopinmenge 72 Stunden nach siRNA-Transfektion war in beiden Supplementationsgruppen größer als der 31%ige Rückgang der LDLR-mRNA-Expression und lässt die Vermutung zu, dass der siRNA-induzierte LDLR-mRNA-Knock-Down während der 72 Stunden Behandlungszeit zeitweise größer als 31 % war. Dies deckt sich mit den Daten zur siRNA-Effizienz (vgl. 4.2) sowie den Ergebnissen aus der Dil-LDL-Stimulation transfizierter HAEC (vgl. 4.3).

Das Niveau der erzielten Reduktion der LDLR-mRNA-Expression entspricht dem des Vorversuchs zur siRNA Effizienz. Insgesamt kann von einem reproduzierbaren Versuchsaufbau gesprochen werden.

HAEC waren während der Behandlungszeit von 72 Stunden offensichtlich nicht in der Lage, den durch siRNA vermittelten LDLR-Knock-Down und die daraus resultierende verminderte Aufnahme von Lykopin über andere Resorptionswege zu kompensieren. Das Rezeptor-Liganden-System LDL/LDLR scheint bei HAEC in der Zellkultur der wichtigste Lykopin-Resorptionsmechanismus zu sein.

Der LDLR ist ubiquitär exprimiert und ist besonders in Geweben vorhanden, die einer hormonellen Regulation (Nebenniere, Hoden, Prostata) unterworfen sind. Goyal et al. stellten Versuche zur Aufnahme von Lykopin in Prostata-Karzinomzellen an und beschreiben, dass die LDLR-vermittelte Aufnahme von Lykopin in Zellkulturmodellen unwahrscheinlich ist und die Resorption von Lykopin wahrscheinlich durch die Äquilibrierung in Lipidmembranen und deren raschen und konstanten Turnover abläuft.<sup>90</sup> In dieser Arbeit wurde gelöstes Lykopin mit einem FCS-freien Medium gemischt. Eine Anreicherung von Lykopin in Lipoproteinen oder in

Mizellen und somit eine physiologische Applikationsform wurde nicht geschaffen. Anders als andere am Fett- und Karotinoidstoffwechsel beteiligte Rezeptoren wie SR-BI und CD36 kann der LDLR keine freien Fettsäuren oder Strukturhomologe binden. Die Annahme, dass Lykopin durch Diffusion in die Prostata-Karzinomzellen übergetreten ist, widerspricht unseren Ergebnissen in Endothelzellen und der generell hohen LDLR-Expression in Prostata-Gewebe.

Moussa et al. untersuchten die Aufnahme von Lykopin und Lutein in der Zellkultur an Adipozyten, CD36-transfizierten Cos-1 Zellen und Fettgewebe-Explantations-Kulturen aus Wildtyp- und CD36<sup>-/-</sup> Mäusen. Adipozyten wurden entweder mit dem CD36-Inhibitor Sulfosuccinimidyloleat oder mit 100 nM einer siRNA gegen den CD36 transfiziert. Die Stimulationen erfolgten in DMEM mit 2 µM Lutein oder Lykopin gelöst in THF. In jedem Versuch konnte in der HPLC eine im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Menge von Lutein und Lykopin in den Zellen nachgewiesen werden. Wie auch im Darm spielt der CD36-Rezeptor scheinbar eine Rolle bei der Karotinoid-Versorgung von Adipozyten. Eine wichtige Limitation dieser Arbeit stellt erneut die Tatsache dar, dass im für die Stimulationen verwendeten Zellkulturmedium (DMEM) keine Lipide oder Lipoproteine enthalten waren. Die Formierung von Mizellen oder die Internalisierung von Lykopin bzw. Lutein in Lipoproteinen war daher unmöglich. Der CD36-Rezeptor gehört zur Scavenger-Rezeptorfamilie und hat ein sehr breites Substratspektrum, zu dem u.a. oxidierte Lipoproteine als auch langkettige freie Fettsäuren gehören. Er wird stark in Adipozyten exprimiert. Die nur partielle Reduktion der Lykopin- bzw. Luteinmenge in den zuvor genannten Versuchen, weist laut Autoren auf andere an der Internalisierung von Lykopin beteiligte Resorptionswege wie passive Diffusion und andere Rezeptoren hin.<sup>91</sup>

Die unvollständige Inhibition der Lykopinresorption kann unter diesen Versuchsbedingungen, ähnlich wie Goyal et al. vermuteten, tatsächlich durch eine unspezifische und unphysiologische Interaktion von Lykopin mit Zellmembranen bedingt sein oder durch die Resorption über den SR-BI, der ebenfalls in Adipozyten exprimiert wird.<sup>92</sup> Ob der so propagierte Resorptionsweg in vivo jedoch überhaupt eine Rolle spielt, scheint fraglich, da freies Lykopin im Plasma auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften so gut wie nicht vorkommt.

Es ist aber folgendes vorstellbar: Die Aufgabe des Fettgewebes besteht in der Speicherung von Fetten und fettlöslichen Nährstoffen, die Funktion des Darmepithels unter anderem in der Resorption von Fetten und unterschiedlichen fettlöslichen Substanzen wie Karotinoiden. Am effektivsten ist dies durch einen Rezeptor mit breiter Substratspezifität möglich, der unter anderem langkettige freie Fettsäuren, (modifizierte) Lipoproteine als auch Karotinoide (gewisse Strukturhomologie mit Fettsäuren) binden kann, und daher in vielen Geweben exprimiert wird.

In vivo macht der oben genannte Resorptionsweg wahrscheinlich nur einen geringen Teil bei der Internalisierung von Lykopin und anderen Karotinoiden in Adipozyten aus. Vielmehr gelangen Lykopin und andere Karotinoide gebunden in Lipoproteinen und nicht in freier Form über den CD36 und andere am Lipoproteinstoffwechsel beteiligte Rezeptoren in Adipozyten.

Die Arbeit von Borel et al. stärkt diese Hypothese und zeigte in einem physiologischen Versuchsaufbau, dass die Resorption von Provitamin A Karotinoiden, gelöst in Mizellen bzw. in FCS, in einem Darmepithelzellmodell (Caco-2 clone TC-7 Zellen) bzw. in CD36 und SR-BI transfizierten HEK 293-T Zellen abhängig von CD36 und SR-BI ist. Darüber hinaus wiesen sie anhand von Assoziationsstudien nach, dass unterschiedliche genetische Variationen in den für diese Rezeptoren kodierenden Genen mit interindividuell unterschiedlichen Plasmakonzentrationen der untersuchten Karotinoide assoziiert sind.<sup>93</sup>

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Versorgung von humanen Endothelzellen mit Lykopin über das LDL/LDLR-System erfolgt. Die protektive Wirkung Lykopins scheint an ein funktionierendes Rezeptor-Liganden-System für die LDL-Clearance gekoppelt zu sein. Die beschleunigte Arteriosklerose bei familiärer Hypercholesterolämie könnte so teilweise einer zellulären antioxidativen Minderversorgung mit Lykopin geschuldet sein. Wegen der reduzierten LDL-Clearance zirkuliert LDL länger im Blutstrom und ist oxidativem Stress ausgesetzt. Dies reduziert den protektiven Anteil an Lykopin im LDL zusätzlich.

Es ist stark anzunehmen, dass die Lykopin- und Karotinoid-Versorgung humaner Zellen generell durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL und anderen Lipoproteinen über den LDLR und Scavenger-Rezeptoren (CD36 und SR-BI) erfolgt, da neben Lykopin auch andere Antioxidantien wie beispielsweise  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin größtenteils gebunden an LDL im Plasma transportiert werden.<sup>30-37</sup> Die Lipoproteinrezeptorexpression unterschiedlicher Gewebetypen kann differieren und scheint abhängig von deren Funktion zu sein (z.B. Resorption im Darm, Speicherfunktion in Adipozyten, Hormonstoffwechsel in der Nebenniere). Dass Lykopin und andere Karotinoide jedoch frei im Plasma vorkommen und in dieser Form von Zellen via CD36 oder SR-BI gebunden und resorbiert werden erscheint eher unplausibel. Ähnlich unseres Versuchsaufbaus könnte beispielsweise durch eine simultane siRNA-Transfektion gegen den LDLR, CD36 und SR-BI mit folgender FCS-Lycopin-Stimulation untersucht werden, ob hierdurch eine noch stärkere Reduktion der zellulären Lykopinmenge resultieren würde.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Frederiksen H, Rasmussen SE, Schroder M, et al. Dietary supplementation with an extract of lycopene-rich tomatoes does not reduce atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. *Br J Nutr.* 2007;97(1):6–10.
2. Hu MY, Li YL, Jiang CH, et al. Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition.* 2008;24(10):1030–1038.
3. Meyer K. Carotinoide - Bedeutung und technische Synthese: Farbenfrohe Antioxidantien. *Chemie unserer Zeit.* 2002;36(3):178–192.
4. Gartner C, Stahl W, Sies H. Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(1):116–122.
5. Bässler K-H, Golly I, Loew D, Pietrzik K.  $\beta$ -Carotin. In: *Vitamin-Lexikon.* 3rd ed. München: Urban & Fischer; 2002:312–356.
6. Kong KW, Khoo HE, Prasad KN, et al. Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules.* 2010;15(2):959–987.
7. Anon. *Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet N° 317.*; 2009. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Accessed January 24, 2012.
8. Weissberg, PL, Davies, JR, Rudd J. Atherosclerotic biology and epidemiology of disease. In: *Textbook of Cardiovascular Medicine. 2nd ed.* Vol 3. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2002.
9. Anon. *Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2013.* Wiesbaden; 2014. Available at: [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400137004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400137004.pdf?__blob=publicationFile).
10. Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1189–1196.
11. Ried K, Fakler P. Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: Meta-analyses of intervention trials. *Maturitas.* 2011;68(4):299–310.
12. Rissanen TH, Voutilainen S, Nyyssonen K, et al. Serum lycopene concentrations and carotid atherosclerosis: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Clin Nutr.* 2003;77(1):133–138.
13. Gleissner CA, Leitinger N, Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis. *Hypertension.* 2007;50(2):276–283.
14. Verhoye E, Langlois MR. Circulating oxidized low-density lipoprotein: a biomarker of atherosclerosis and cardiovascular risk? *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):128–137.
15. Böhm V. Lycopene and heart health. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(2):296–303.
16. Kim JY, Paik JK, Kim OY, et al. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis.* 2011;215(1):189–195.
17. Gillham B, Papachristodoulou DK, Thomas JH. Free radicals in health and disease. In: *Wills' biochemical basis of medicine - 3rd ed.* Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997:343–354.
18. Buettner GR. Molecular targets of photosensitization. 2011;2011(22.11.2011). Available at: <http://www.photobiology.info/Buettner.html>. Accessed November 22, 2011.
19. Lian F, Wang XD. Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells. *Int J Cancer.* 2008;123(6):1262–1268.
20. Livny O, Kaplan I, Reifen R, et al. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J Nutr.* 2002;132(12):3754–3759.
21. Bhuvanewari V, Nagini S. Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005;5(6):627–635.

22. Johnson EJ. The Role of Lycopene in Health and Disease. *Nutr Clin Care*. 2000;3(1):35–43.
23. Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, et al. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutrition*. 2003;19(9):794–799.
24. Coyne T, Ibiebele TI, Baade PD, et al. Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(3):685–693.
25. Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, et al. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2009;218(2):141–147.
26. Castenmiller JJ, West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr*. 1998;18:19–38.
27. Fröhlich K. Lycopin-Isomere in Lebensmitteln und Humanplasma - Strukturaufklärung, antioxidative Aktivität, Gehalte und relative (E)-(Z)-Verhältnisse. *Biol. Fak.* 2007;doctor rer:233. Available at: <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:gbv:27-20080317-114920-6>.
28. Moussa M, Landrier J-F, Reboul E, et al. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J Nutr*. 2008;138(8):1432–1436.
29. Drover VA, Nguyen D V, Bastie CC, et al. CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem*. 2008;283(19):13108–13115.
30. Clevidence BA, Bieri JG. Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. *Method Enzym*. 1993;214(1974):33–46.
31. Oshima S, Sakamoto H, Ishiguro Y, Terao J. Accumulation and clearance of capsanthin in blood plasma after the ingestion of paprika juice in men. *J Nutr*. 1997;127(8):1475–1479.
32. Paetau I, Khachik F, Brown ED, et al. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr*. 1998;68(6):1187–1195.
33. Krinsky NI, Cronwell DG, Oncley JL. The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Arch Biochem Biophys*. 1958;73(1):233–246.
34. Bub A, Watzl B, Abrahamse L, et al. Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men. *J Nutr*. 2000;130(9):2200–2206.
35. Romanchik JEOÛLLEE, Morel DW, Harrison EH. Distributions of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro. *J Nutr*. 1995;125(10):2610–2617.
36. Forman MR, Johnson EJ, Lanza E, et al. Effect of menstrual cycle phase on the concentration of individual carotenoids in lipoproteins of premenopausal women: a controlled dietary study. *Am J Clin Nutr*. 1998;67(1):81–87.
37. Perugini C, Bagnati M, Cau C, et al. Distribution of lipid-soluble antioxidants in lipoproteins from healthy subjects. I. Correlation with plasma antioxidant levels and composition of lipoproteins. *Pharmacol Res*. 2000;41(1):55–65.
38. Johs A, Hammel M, Waldner I, et al. Modular structure of solubilized human apolipoprotein B-100. Low resolution model revealed by small angle neutron scattering. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19732–19739.
39. Rudenko G, Henry L, Henderson K, et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 2002;298(5602):2353–2358.
40. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:535–562.
41. Innerarity TL. Structural biology. LDL receptor's beta-propeller displaces LDL. *Science*. 2002;298(5602):2337–2339.

42. Ford NA, Clinton SK, von Lintig J, Wyss A, Erdman Jr. JW. Loss of carotene-9',10'-monooxygenase expression increases serum and tissue lycopene concentrations in lycopene-fed mice. *J Nutr.* 2010;140(12):2134–2138.
43. Lindshield BL, Canene-Adams K, Erdman Jr. JW. Lycopene metabolites: are lycopene metabolites bioactive? *Arch Biochem Biophys.* 2007;458(2):136–140.
44. Zaripheh S, Boileau TW, Lila MA, Erdman Jr. JW. [14C]-lycopene and [14C]-labeled polar products are differentially distributed in tissues of F344 rats prefed lycopene. *J Nutr.* 2003;133(12):4189–4195.
45. Stahl W, Schwarz W, Sundquist AR, Sies H. cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys.* 1992;294(1):173–177.
46. Erdman Jr. JW. How do nutritional and hormonal status modify the bioavailability, uptake, and distribution of different isomers of lycopene? *J Nutr.* 2005;135(8):2046S–2047S.
47. Clinton SK, Emenhiser C, Schwartz SJ, et al. cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epide Biomar.* 1996;5(10):823–833.
48. Agarwal S, Rao A V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ.* 2000;163(6):739–744.
49. Kaplan LA, Lau JM, Stein EA. Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem.* 1990;8(1):1–10.
50. Liu A, Pajkovic N, Pang Y, et al. Absorption and subcellular localization of lycopene in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(11):2879–2885.
51. Rader DJ, Hobbs HH. Disorders of Lipoprotein Metabolism Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al., eds. *Harrison's Princ. Intern. Med. 17th Ed.* 2008;(15):2416–2418.
52. Schneider WJ, Basu SK, McPhaul MJ, Goldstein JL, Brown MS. Solubilization of the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979;76(11):5577–5581.
53. Stangl V, Kuhn C, Hentschel S, et al. Lack of effects of tomato products on endothelial function in human subjects: results of a randomised, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr.* 2011;105(2):263–267.
54. Lin C-Y, Huang C-S, Hu M-L. The use of fetal bovine serum as delivery vehicle to improve the uptake and stability of lycopene in cell culture studies. *Br J Nutr.* 2007;98(01):226–232.
55. Oram JF, Albers JJ, Bierman EL. Rapid regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor of cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1980;255(2):475–485.
56. Brown MS, Goldstein JL. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell.* 1975;6(3):307–316.
57. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411(6836):494–498.
58. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, et al. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(11):6347–6352.
59. Fedorov Y, King A, Anderson E, et al. Different delivery methods-different expression profiles. *Nat Methods.* 2005;2(4):241.
60. Antonov AS, Nikolaeva MA, Klueva TS, et al. Primary culture of endothelial cells from atherosclerotic human aorta. *Atherosclerosis.* 1986;59(1):1–19.
61. Farber HW, Antonov AS, Romanov YA, et al. Cytokine secretion by human aortic endothelial cells is related to degree of atherosclerosis. *Am J Physiol.* 1992;262(4 Pt 2):H1088–1095.
62. Vielma S, Virella G, Gorod AJ, Lopes-Virella MF. Chlamydomphila pneumoniae Infection of Human Aortic Endothelial Cells Induces the Expression of FC  $\gamma$  Receptor II (Fc $\gamma$ RII). *Clin Immunol.* 2002;104(3):265–273.
63. Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics.* 2002;9(1):27–41.

64. Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T-cell adhesion to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2002;161(2):365–374.
65. Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, et al. Reduced expression of adipose triglyceride lipase enhances tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in human aortic endothelial cells via protein kinase C-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32045–32053.
66. Navab M, Imes SS, Hama SY, et al. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest*. 1991;88(6):2039–2046.
67. Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1999;222(3):196–204.
68. Martin KRR, Wu D, Meydani M. The effect of carotenoids on the expression of cell surface adhesion molecules and binding of monocytes to human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2000;150(2):265–274.
69. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Plasma Lipoproteins Part B: Characterization, Cell Biology, and Metabolism. *Method Enzym*. 1986;129:542–565.
70. Srivastava R, Ito H, Hess M, Srivastava N, Schonfeld G. Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in HepG2 and Caco2 cells by palmitate, oleate, and 25-hydroxycholesterol. *J Lipid Res*. 1995;36(7):1434–1446.
71. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(20):11041–11048.
72. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, et al. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 1993;75(1):187–197.
73. Martini C, Pallottini V. Cholesterol: from feeding to gene regulation. *Genes Nutr*. 2007;2(2):181–193.
74. Applebaum-Bowden D, Haffner SM, Hartsook E, et al. Down-regulation of the low-density lipoprotein receptor by dietary cholesterol. *Am J Clin Nutr*. 1984;39(3):360–367.
75. Chen Y, Hughes-Fulford M. Human prostate cancer cells lack feedback regulation of low-density lipoprotein receptor and its regulator, SREBP2. *Int J Cancer*. 2001;91(1):41–45.
76. Nolte A, Raabe C, Walker T, et al. Optimized basic conditions are essential for successful siRNA transfection into primary endothelial cells. *Oligonucleotides*. 2009;19(2):141–150.
77. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol*. 1984;99(6):2034–2040.
78. Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, Mahley RW. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis*. 1(3):177–185.
79. Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol*. 1986;103(1):171–187.
80. Yang C, Gagnon C, Hou X, Hardy P. Low density lipoprotein receptor mediates anti-VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(5):448–456.
81. Kolmakova A, Wang J, Brogan R, Chaffin C, Rodriguez A. Deficiency of scavenger receptor class B type I negatively affects progesterone secretion in human granulosa cells. *Endocrinology*. 2010;151(11):5519–5527.
82. Walfisch Y, Walfisch S, Agbaria R, Levy J, Sharoni Y. Lycopene in serum, skin and adipose tissues after tomato-oleoresin supplementation in patients undergoing haemorrhoidectomy or peri-anal fistulotomy. *Brit J Nutr*. 2003;90(4):759–766.

83. Rock C, Swendseid M. Plasma carotenoid levels in human subjects fed a low carotenoid diet. *J Nutr.* 1992;122(1):96–100.
84. Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *J Lipid Res.* 1980;21(3):284–291.
85. Patsch JR, Sailer S, Kostner G, et al. Separation of the main lipoprotein density classes from human plasma by rate-zonal ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 1974;15(4):356–366.
86. Wilcox HG, Davis DC, Heimberg M. The isolation of lipoproteins from human plasma by ultracentrifugation in zonal rotors. *J Lipid Res.* 1971;12(2):160–172.
87. Boesch-Saadatmandi C, Rimbach G, Jungblut A, Frank J. Comparison of tetrahydrofuran, fetal calf serum, and Tween 40 for the delivery of astaxanthin and canthaxanthin to HepG2 cells. *Cytotechnology.* 2011;63(1):89–97.
88. Borel P, Moussa M, Reboul E, et al. Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J Nutr.* 2007;137(12):2653–2659.
89. Jansen MCJF, Van Kappel a L, Ocké MC, et al. Plasma carotenoid levels in Dutch men and women, and the relation with vegetable and fruit consumption. *Eur J Clin Nutr.* 2004;58(10):1386–1395.
90. Goyal A, Delves GH, Chopra M, Lwaleed B a, Cooper AJ. Prostate cells exposed to lycopene in vitro liberate lycopene-enriched exosomes. *BJU Int.* 2006;98(4):907–911.
91. Moussa M, Gouranton E, Gleize B, et al. CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55(4):578–584.
92. Fazio S, Linton MF. Unique pathway for cholesterol uptake in fat cells. *Arter. Thromb Vasc Biol.* 2004;24(9):1538–1539.
93. Borel P, Lietz G, Goncalves A, et al. CD36 and SR-BI are involved in cellular uptake of provitamin A carotenoids by Caco-2 and HEK cells, and some of their genetic variants are associated with plasma concentrations of these micronutrients in humans. *J Nutr.* 2013;143(4):448–456.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julian Stührk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Low-Density-Lipoprotein-Rezeptorsystems bei der Lykopin-Aufnahme in Endothelzellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

### Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Publikation in Vorbereitung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden

## **8. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## **9. Danksagung**

Dem gesamten Mitarbeiterteam des Kardiologischen Forschungslabors der Charité danke ich herzlich für die schöne gemeinsame Zeit, gewonnenen persönlichen Erfahrungen und mentale Unterstützung bei Höhen und Tiefen des Laboralltags.

Besonderer Dank gilt Frau Minoo Moobed für ihre Unterstützung und Expertise im Bereich der Zellkultur, siRNA-Transfektion und Real-time RT-PCR.

Frau Prof. Stangl danke ich für das Überlassen des interessanten Forschungsthemas und der zur Verfügungstellung sämtlichen Forschungsequipments und finanzieller Mittel für diese Arbeit.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Lorenz möchte ich für seine kontinuierliche, fachliche Begleitung, Planung und den äußerst gründlich supervidierten Prozess der Dissertationsschreibung danken.