

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und  
Pathobiochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zum ABCA1-/ABCG1-vermittelten Cholesterin-Efflux in  
humanen Kontroll- und Tangier-Fibroblasten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nina Brüggmann

aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 05.03.2021



# Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>13</b>
1.1 Regulation der Cholesterin-Homöostase .....	13
1.2 Protektive Effekte der High Density Lipoproteine (HDL) .....	14
1.3 Reverser Cholesterin-Transport .....	15
1.4 ABCA1 und Cholesterin-Homöostase.....	16
1.5 ABCG1 und Cholesterin-Homöostase.....	17
1.6 Regulation der ABCA1- und ABCG1-Expression .....	18
1.7 Tangier-Krankheit.....	20
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	21
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
2.1 Material.....	23
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Zellen .....	26
2.2.2 Zellkultur.....	26
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)- Assay.....	29
2.2.4 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot .....	30
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
3.1 Tangier-Zelllinien .....	35
3.2 Expression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten .....	35
3.2.1 mRNA-Expression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten.....	35
3.2.2 Proteinexpression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten.....	37
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
4.1 Methodisches Vorgehen .....	47
4.2 Cholesterin-Homöostase in Tangier-Fibroblasten.....	47

---

4.3	Expression von ABCA1- und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten .....	50
4.4	Regulation von ABCA1- und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten .....	50
4.5	Relevanz der Ergebnisse für Modelle zur HDL-Formation .....	52
4.6	Ausblick .....	53
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>67</b>

## Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Tabelle 1:</b> Reagenzien .....	23
<b>Tabelle 2:</b> Materialien .....	24
<b>Tabelle 3:</b> Geräte .....	25
<b>Tabelle 4:</b> Beschreibung der verwendeten Kontrollzelllinien und Tangier-Zelllinien .....	26
<b>Tabelle 5:</b> Größe der Zellkulturflasche mit Dulbecco`s Phosphate-Buffered Solution (DPBS) bzw. Medium-Volumina .....	28
<b>Tabelle 6:</b> Größe der Zellkulturflasche mit Volumen der Trypsin/EDTA-Lösung .....	28
<b>Tabelle 7:</b> Gegenüberstellung der Merkmale der Tangier-Familie 1 (=Tangier-Typ 1, TT1) (82) versus Tangier-Familie 2 (=Tangier-Typ 2, TT2) (83).....	35
<b>Tabelle 8:</b> Hydroxysterol-Konzentrationen in Tangier-Serum (88).....	48



## Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>Abbildung 1:</b> ABCA1-mRNA-Expression.....	36
<b>Abbildung 2:</b> ABCG1-mRNA-Expression.....	37
<b>Abbildung 3:</b> ABCA1-Proteinexpression (Western-Blots).....	38
<b>Abbildung 4:</b> ABCG1-Proteinexpression (Western-Blots).....	39
<b>Abbildung 5:</b> ABCA1-Proteinexpression in nicht mit Cholesterin beladenen Tangier-Fibroblasten.....	40
<b>Abbildung 6:</b> ABCA1-Proteinexpression in Cholesterin-beladenen Tangier-Fibroblasten.....	41
<b>Abbildung 7:</b> ABCA1-Proteinexpression in unbehandelten (Chol-) und mit Cholesterin (Chol+) beladenen Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2).....	42
<b>Abbildung 8:</b> ABCG1-Proteinexpression in nicht mit Cholesterin beladenen Tangier-Fibroblasten.....	43
<b>Abbildung 9:</b> ABCG1-Proteinexpression in Cholesterin beladenen Tangier-Fibroblasten.....	44
<b>Abbildung 10:</b> ABCG1-Proteinexpression in unbehandelten (Chol-) und mit Cholesterin (Chol+) beladenen Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2).....	45
<b>Abbildung 11:</b> mRNA-Expression von Sterol response element-binding protein 1c (SREBP-1c), der Fettsäure-Synthase (FAS) und Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) in Kontroll- (CT1–CT3) und Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2) (88)...	49





## Abkürzungsverzeichnis

9-cis-RA	9-cis Retinsäure
ABCA1	ABC-Transporter A1
ABCG1	ABC-Transporter G1
ApoA-I	Apolipoprotein AI
APS	Ammoniumperoxodisulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HDL-C	High Density Lipoprotein -Cholesterin
HMG-CoA Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LXR $\alpha/\beta$	Liver-X-Rezeptor $\alpha$ und $\beta$
microRNA	Micro-Ribonukleinsäure
miR-33a	microRNA (Nebenprodukt bei der Transkription von SREBP-2)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PPARs	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RXR	Retinoic-X-Rezeptor
SCAP	SREBP-cleavage-activating protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SREBP	Sterol response element-binding protein

---

TBS	Tris-buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

**ABSTRACT**

(deutsch)

Die Bildung der High Density Lipoproteine (HDL) und der reverse Cholesterin-Transport sind von immenser klinischer Bedeutung. Eine niedrige HDL-Plasmakonzentration fördert die Atherogenese und gehört daher zu den wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren. Bei der HDL-Bildung spielen die ABC-Transporter A1 und G1 (ABCA1- und ABCG1), die den Cholesterin-Efflux aus der Zelle zu den HDL vermitteln, eine essentielle Rolle. Die ABCA1- und ABCG1-Expression, -Funktion und -Regulation sind daher für das Verständnis der verschiedenen Formen von HDL-Defiziten und ihrer möglichen Atherogenität unverzichtbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ABCA1 und ABCG1 in humanen Kontrollfibroblasten und Tangier-Fibroblasten verglichen. Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte mittels Real-Time-PCR, die Bestimmung der Proteinexpression mittels Western-Blot. Bei der Tangier-Krankheit liegen verschiedene Mutationen im ABCA1-Gen vor. In dieser Arbeit diente die Tangier-Krankheit als Modellerkrankung für eine schwere Form des HDL-Mangels.

In Tangier-Fibroblasten mit einer geringen ABCA1-Restaktivität (Punktmutation im Exon 19, klinisch milder Phänotyp mit geringer Arteriosklerose) kam es zu einer gesteigerten ABCA1- und ABCG1-Expression. Dagegen zeigten Tangier-Fibroblasten mit einem funktionalen ABCA1-Knockout (Nonsense-Mutation in Exon 13, klinisch schwerer Phänotyp mit schwerer Arteriosklerose) eine verminderte Expression beider Transporter. Eine verstärkte ABCA1- und ABCG1-Expression in Tangier-Fibroblasten scheint eine verminderte ABCA1-Aktivität zumindest teilweise auszugleichen und den milderen Phänotyp (geringe Arteriosklerose) in betroffenen Patienten erklären zu können. Zudem zeigen die Ergebnisse einen regulatorischen Zusammenhang in der Art, dass beide Transporter in Tangier-Fibroblasten gleichzeitig hoch oder runter reguliert werden. Die parallel erhöhten oder erniedrigten Transporterkonzentrationen in Tangier-Fibroblasten wiederum deuten auf eine koordinierte Regulation der Expression der Proteine hin.

**ABSTRACT**

(english)

The formation of high density lipoproteins (HDL) and the reverse cholesterol transport are of immense clinical importance. A low HDL plasma concentration promotes atherogenesis and therefore is one of the most important cardiovascular risk factors. The ABC transporters A1 and G1 (ABCA1 and ABCG1), which mediate the cholesterol efflux from the cell to the HDL, play an essential role in HDL formation. Therefore, ABCA1 and ABCG1 expression, function and regulation are essential for understanding the various forms of HDL deficits and their possible atherogenicity. In the present thesis the expression of ABCA1 and ABCG1 in human control fibroblasts and Tangier fibroblasts was compared. The mRNA expression was analyzed through real-time PCR, the protein expression via Western blotting. Tangier disease is characterized by various mutations in the ABCA1 gene. In this thesis Tangier disease served as a model disease for a severe form of HDL deficiency.

In Tangier fibroblasts with low residual ABCA1 activity (point mutation in exon 19, clinically mild phenotype with low arteriosclerosis) an increased ABCA1 and ABCG1 expression was found. In contrast, Tangier fibroblasts with a functional ABCA1 knockout (nonsense mutation in Exon 13, clinically severe phenotype with severe arteriosclerosis) showed a reduced expression of both transporters. An increased ABCA1 and ABCG1 expression in Tangier fibroblasts seems to at least partially compensate for decreased ABCA1 activity and to explain the milder phenotype (low arteriosclerosis) in affected patients. In addition, the results show a regulatory relationship in that both transporters in Tangier fibroblasts are regulated up or down at the same time. The parallel occurrence of increased or decreased levels of both transporters points to a coordinated regulation of the expression of the two proteins.

# 1 Einleitung

## 1.1 Regulation der Cholesterin-Homöostase

Die Cholesterin-Homöostase wird durch die intestinale Resorption, die zelluläre de-novo-Synthese und die biliäre Ausscheidung bestimmt (1). Eine erhöhte Cholesterin-Plasmakonzentration zählt zu den kardiovaskulären Risikofaktoren (1).

An der Cholesterin-Homöostase ist eine Vielzahl von Proteinen (Rezeptoren, Transporter, Enzyme) beteiligt (2). Hierzu gehören Rezeptoren, die für die Aufnahme von Cholesterin-beladenen Lipoproteinen in die Zelle zuständig sind, wie der Low Density Lipoprotein-(LDL)-Rezeptor (2, 3), der Apolipoprotein-E-(ApoE-)-Rezeptor und der Scavenger-Rezeptor A (SR-A) (2, 4). Der Cholesterin-Efflux aus den Makrophagen, die Adhäsion von Cholesterin an extrazelluläre Lipoproteine sowie die Aufnahme von Cholesterin-Ester über High Density Lipoproteine (HDL) in die Hepatozyten wird durch den Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) vermittelt (2, 5). ABC-Transporter (ABCA1, ABCG1, ABCG4, ABCG5, ABCG8) transportieren Cholesterin und Phospholipide durch die Plasmamembranen (2, 6, 7, 8). Der Sterol-Transporter Niemann-Pick C 1-like 1 (NPC1L1) fördert einerseits die Aufnahme von Cholesterin aus dem Jejunum in die Enterozyten, andererseits die Resorption von Cholesterin aus der Galle zurück in die Hepatozyten (2, 9). Das Schlüsselenzym der Cholesterin-Biosynthese ist die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA Reduktase) (2).

Maßgeblich für die Regulation der „Schlüsselgene“ der Cholesterin-Homöostase ist die zelluläre Konzentration von Oxysterolen und Cholesterin (2). Beide Moleküle aktivieren Sterol-sensitive Transkriptionsfaktoren. Diese Sterol response element-binding proteins (SREBP) fördern die Expression von verschiedenen, für die Cholesterin-Homöostase wichtigen Genen (2, 10, 11). SREBP-2 bindet an das Sterol-Sensor SREBP-cleavage-activating protein (SCAP), das sich überwiegend im endoplasmatischen Retikulum befindet (2, 12). Bei einem Abfall der Oxysterol-Konzentration im endoplasmatischen Retikulum wird der SCAP-SREBP-2 Komplex zum Golgi-Apparat transportiert, wo er gespalten und das aktive SREBP-2-Fragment freigesetzt wird (2). Dieses Fragment bindet im Nukleus an Sterol response-elements (SRE) der Zielgene und aktiviert so deren Transkription. Zu den Zielgenen gehören essentielle Gene der Cholesterin-Biosynthese und Homöostase (z. B. LDL-Rezeptor, SREBP-2, HMG-CoA Reduktase) (2).

Daneben greifen Micro-Ribonukleinsäuren (microRNA) regulierend in die Cholesterin-Homöostase ein. Die microRNA miR-33a entsteht als Nebenprodukt bei der Transkription von SREBP-2 (2, 14, 15, 16). Daher erhöht eine geringe Oxysterol-Konzentration neben der SREBP-

2 messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Konzentration auch die miR-33-Konzentration. Die Bindung der microRNA miR-33a an komplementäre Sequenzen in den mRNAs von ABCA1 und ABCG1 führt zum Abbau dieser mRNAs und damit zu geringeren Proteinkonzentrationen von ABCA1 und ABCG1 (2, 17). Damit bewirkt eine geringe Oxysterol-Konzentration über einen Anstieg von SREBP-2 eine vermehrte Transkription von Genen, die die Cholesterin-Biosynthese und die Aufnahme von Cholesterin in die Zellen fördern. Gleichzeitig wird über eine niedrigere Expression von ABCA1 und ABCG1 der Efflux von Cholesterin aus den Zellen verringert (2, 17).

Da die HDL-Bildung eng mit dem Cholesterin-Efflux gekoppelt ist, beeinflusst die Konzentration von ABCA1 in Leber und Dünndarm auch die HDL-Konzentration im Plasma. So lässt sich erklären, dass Konzentrationsveränderungen der microRNA miR-33a in der Leber die HDL-Konzentration im Plasma modulieren. Der aus einer Überexpression von miR-33a resultierende Abbau der ABCA1-mRNA führt zu einem geringeren Cholesterin-Efflux und somit zu geringeren HDL-Plasmakonzentrationen (2, 18).

Bereits der Funktionsverlust eines der beschriebenen Proteine stört die komplexe Cholesterin-Homöostase und hat spezifische Erkrankungen beziehungsweise Phänotypen zur Folge (2). Ein Beispiel ist die Tangier-Krankheit (2, 19), die im Folgenden detaillierter beschrieben wird.

## **1.2 Protektive Effekte der High Density Lipoproteine (HDL)**

Die HDL werden umgangssprachlich als das „gute“ Cholesterin bezeichnet. Eine niedrige Konzentration von HDL-Cholesterin (HDL-C) im Plasma ist mit einem hohen Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert (20, 21, 22, 23, 25). Umgekehrt schützt eine hohe HDL-C-Plasmakonzentration vor dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (20, 21, 22, 23, 25). Diese Assoziation ist unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren (z. B. erhöhte Triglyceride-Konzentration) (24, 25) bzw. dem Geschlecht (23, 25). und zeigt sich bei Personen mit und ohne kardiovaskulären Vorerkrankungen (23, 25).

Verschiedene positive Eigenschaften der HDL verringern das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (25).

Der reverse Cholesterin-Transport ist der am besten verstandene protektive Effekt von HDL (25, 26). HDL fördert den Abtransport von zellulärem Cholesterin aus extrahepatischem Gewebe (z. B. der Arterienwand) zur Leber, wo das Cholesterin über die Galle ausgeschieden wird. Über

diesen Mechanismus wird eine Anreicherung von Cholesterin in peripheren Zellen, insbesondere in Makrophagen, verhindert (25).

Weiterhin wirken HDL und Apolipoprotein AI (ApoA-I) anti-inflammatorisch. Sie hemmen die Produktion von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen und verhindern so die Ansammlung von Leukozyten bei Endothelverletzungen (25, 27). Zusätzlich wird die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in Makrophagen gehemmt (25, 28).

HDL unterstützt auch die Produktion von Stickstoffmonoxid in Endothelzellen (25, 29). Erhöhte Stickstoffmonoxid-Konzentrationen fördern Reparaturmechanismen und die Proliferation der Endothelzellen (25 30). Zudem verringern sie die Blutplättchen-Aggregation durch Hemmung der Produktion des Plättchenaktivierenden Faktors. Über diesen Mechanismus wirken erhöhte Stickstoffmonoxid-Konzentrationen anti-thrombotisch (25, 31).

Aufgrund der variablen protektiven Effekte spielen HDL eine Schlüsselrolle bei der Risikominimierung kardiovaskulärer Ereignisse (25).

### **1.3 Reverser Cholesterin-Transport**

Der reverse Cholesterin-Transport ist ein Schlüsselmechanismus der Cholesterin-Homöostase. Da Cholesterin vom menschlichen Körper nicht abgebaut werden kann, ist die Eliminierung von Cholesterin über die Galle unverzichtbar. Über den reversen Cholesterin-Transport wird überschüssiges Cholesterin aus den peripheren Zellen zurück zur Leber gebracht (32).

Im Folgenden wird der Ablauf des reversen Cholesterin-Transports beschrieben: Der Membran-Lipid-Transporter ABCA1 transportiert Phospholipide und Cholesterin aus dem Zellinneren zum lipidfreien, membrangebundenen ApoA-I (32, 33), wo zunächst scheibenförmiges HDL entsteht. Das scheibenförmige HDL nimmt weiter Cholesterin und Phospholipide auf (32, 34). Ferner bindet es die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Dieses Enzym verestert das freie Cholesterin in den HDL. Auf diese Weise reichert das scheibenförmige HDL zunehmend Cholesterin und Cholesterin-Ester an. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Cholesterin-Ester wandern diese von der HDL-Oberfläche in den HDL-Kern, wodurch das kugelförmige HDL entsteht (32, 35). Kugelförmiges HDL nimmt durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten von der Zell- zur HDL-Oberfläche und mittels eines zweiten ABC-Lipidtransporters (ABCG1) weiteres Cholesterin auf (32 36).

Beim Rücktransport von HDL-C wird der direkte und indirekte Transportweg unterschieden (32). Beim direkten Transport werden HDL-C und HDL-Cholesterin-Ester direkt zur Leber

transportiert. Der hepatische Scavenger-Rezeptor B1 (SR-BI) bindet HDL-C und HDL-Cholesterin-Ester und führt sie dem Gallensäureweg zu (32). Bei dem indirekten Weg werden die HDL-Cholesterin-Ester durch das Cholesterin-Ester-Transferprotein gegen Triglyceride aus ApoB-haltigen Lipoproteinen (Chylomikronen, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Intermediate Density Lipoprotein (IDL)) ausgetauscht. Die Triglyceride werden durch die hepatische Lipase hydrolysiert, so dass kleine HDL-Partikel und lipidfreies ApoA-I gebildet werden (32).

Insgesamt verhindert daher der reverse Cholesterin-Transport eine Kumulation von Cholesterin in den peripheren Zellen und verringert durch die Bildung von HDL das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse entscheidend.

#### **1.4 ABCA1 und Cholesterin-Homöostase**

Wie oben beschrieben, spielt ABCA1 eine essentielle Rolle bei der Bildung von HDL und dem reversen Cholesterin-Transport (32, 37).

Der Transporter ABCA1 wird nahezu in allen Geweben exprimiert. Eine erhöhte Expression findet sich in der Leber, im Magen-Darm-Trakt, den Nebennieren, in der Lunge, dem Gehirn und in Makrophagen (37). Hepatisches und peripheres ABCA1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der HDL-Plasmakonzentration (37, 38). Das hepatische ABCA1 bewirkt die Lipidanreicherung an neu gebildetem ApoA-I (37, 38). Extrahepatisches ABCA1 ist entscheidend für den Cholesterin-Efflux aus peripheren Zellen und vermittelt den Transport von Cholesterin und Phospholipiden zu lipidarmen ApoA-I und HDL (37,38).

In der Literatur werden aktuell zwei Modelle für den Mechanismus der Übertragung von Cholesterin auf ApoA-I durch ABCA1 beschrieben (37).

Laut dem ersten Modell findet der ABCA1-vermittelte Cholesterin-Übertragung an der Zelloberfläche statt (37). ABCA1 fördert die Bildung von Mikrodomänen an der äußeren Seite der Plasmamembran, in denen sich Cholesterin und Phospholipide anreichern (37, 39, 40). Beim Fehlen von Lipoproteinen bewirkt eine vermehrte ABCA1-Expression einen Anstieg der lipidreichen Mikrodomänen an der Zelloberfläche (37, 39). ApoA-I bindet über hochaffine Bindungsstellen an die ABCA1-abhängigen lipidreichen Mikrodomänen. ABCA1 erleichtert somit das Andocken von ApoA-I und die Lipidabgabe (37, 40). Eine direkte Interaktion zwischen ABCA1 und ApoA-I wird für den Lipidtransport nicht benötigt (37, 39).



Nach dem zweiten Modell erfolgt die Übertragung von Cholesterin auf ApoA-I durch ABCA1 über Retroendozytose (37, 40, 41). Dabei bindet ABCA1 an der Zelloberfläche an ApoA-I und vermittelt somit die Aufnahme von ApoA-I durch rezeptorvermittelte Endozytose. Das aufgenommene ApoA-I interagiert mit dem intrazellulären Cholesterin und reichert so Lipide an. Schließlich gelangt das Lipid-angereicherte ApoA-I via Exozytose aus der Zelle hinaus (37, 40, 41).

Die beiden Mechanismen schließen sich gegenseitig nicht aus. Die meisten Befunde sprechen dafür, dass die Cholesterin-Übertragung auf ApoA-I sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär stattfindet (37, 41).

Mutationen im ABCA1-Gen führen zur Tangier-Krankheit, die sich durch extrem niedrige HDL-Plasmakonzentrationen auszeichnet (37, 43).

## 1.5 ABCG1 und Cholesterin-Homöostase

Auch ABCG1 scheint für die Bildung von HDL sowie den reversen Cholesterin-Transport eine große Bedeutung zu haben (37). Laut Literatur führt eine ABCG1-Überexpression zu einem vermehrten Cholesterin-Efflux aus peripheren Zellen zum extrazellulären HDL (37, 44, 45, 46).

Als extrazelluläre Akzeptor-Moleküle für den ABCG1-abhängigen Cholesterin-Efflux gelten lipidreiche Komplexe (z. B. kugelförmiges HDL) (37, 47, 48). Dagegen eignen sich hier lipidarme Apolipoproteine (z. B. ApoA-I) anders als beim ABCA1-abhängigen Cholesterin-Efflux (37, 38) nicht als extrazelluläre Akzeptor-Moleküle (37, 47, 48).

Der genaue Mechanismus des ABCG1-vermittelten Cholesterin-Transports über die Membran ist unbekannt (37). Das ABCG1-Protein durchspannt beide Lipidschichten der Membran (37). ABCG1 scheint Cholesterin zur äußeren Schicht der Plasmamembran zu transportieren, wo das Cholesterin vom kugelförmigen HDL aufgenommen wird (37, 49). Ein weiterer möglicher Mechanismus des ABCG1-abhängigen Cholesterin-Efflux ist die Bildung intrazellulärer lipidreicher Vesikel durch ABCG1 (als intrazellulärer Cholesterin-Transporter), die schließlich mit der Plasmamembran verschmelzen und das zelluläre Cholesterin abgeben (37, 50).

Zusammenfassend lassen die Befunde vermuten, dass ABCA1 und ABCG1 den zellulären Cholesterin-Efflux synergistisch fördern (37, 51). ABCA1 vermittelt den Efflux von Cholesterin und Phospholipiden zum lipidarmen ApoA-I. Es bildet sich zunächst das scheibenförmige, dann das kugelförmige HDL (32, 37, 38). Das kugelförmige HDL dient dann als Akzeptor für den ABCG1-vermittelten Cholesterin-Efflux (37, 47, 48).

## 1.6 Regulation der ABCA1- und ABCG1-Expression

Im Folgenden wird die Regulation der für die Bildung von HDL und den reversen Cholesterin-Transport bedeutenden ABCA1- und ABCG1-Expression (32, 37) beschrieben.

Die Transkription der Sterol-sensitiven ABCA1- und ABCG1-Gene (52, 53, 54) wird durch verschiedene natürliche und synthetische Substrate beeinflusst. Die wichtigsten Regulatoren beider Transporter sind die nukleären Rezeptoren Liver-X-Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$  (LXR $\alpha/\beta$ ) (52). Sie bilden mit dem Retinoic-X-Rezeptor (RXR) Heterodimere (52, 55), die an Promoter-Sequenzen der ABCA1- und ABCG1-Gene binden und so die Transkription beider Gene aktivieren (52,56).

LXR $\alpha$  wird gewebsspezifisch exprimiert mit hohen Expressionsraten in Makrophagen und in der Leber. In Gegensatz dazu wird LXR $\beta$  ubiquitär exprimiert (52, 57).

Als Liganden des LXR spielen Oxysterole eine wichtige Rolle. Weder Cholesterin-Ester noch freies Cholesterin können LXR aktivieren. Für die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren scheint daher die Umwandlung von Cholesterin und Cholesterin-Estern in Oxysterole notwendig zu sein (52, 58).

Die Induktion der ABCA1- und ABCG1-Expression erfolgt parallel. Nach der Bindung von 9-cis Retinsäure (9-cis-RA) an den RXR und von Oxysterolen (z. B. 20-Hydroxycholesterin, 22-Hydroxycholesterin, 24-Hydroxycholesterin, 24,25-Epoxycholesterin, 27-Hydroxycholesterin) an den LXR (52, 59-64) kommt es zur Heterodimerbildung von RXR und LXR und Aktivierung der Transkription (52, 55). Als dominierendes Oxysterol im Blutkreislauf sowie in Makrophagen scheint 27-Hydroxycholesterin eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Cholesterin-Homöostase und der Atherogenese zu spielen (52, 65).

Neben den physiologischen Liganden des LXR (Oxysterole) existieren weitere natürliche und synthetische Substrate, die die ABCA1- und ABCG1-Expression über eine Aktivierung des LXR, aber auch LXR-unabhängig beeinflussen (52). Aufgrund der starken ABCA1- und ABCG1- Expressionssteigerung durch Oxysterole wird diskutiert, ob synthetisch hergestellte LXR-Agonisten als Pharmaka zur therapeutischen Aktivierung des zellulären Cholesterin-Efflux aus Makrophagen geeignet sind (52).

Nachfolgend werden einige mögliche Mechanismen zur Steigerung der Transkription der ABCA1- und ABCG1-Gene beschrieben.

Zu den Mechanismen, über die Vitamin A und dessen Derivate den Triglycerid- und Cholesterin-Stoffwechsel beeinflussen, gehört die Steigerung der Expression von ABC-Transportern (52,

66, 67). Im Plasma ist Vitamin A an das Retinol-bindende Protein gebunden. Nach der Aufnahme in die Zelle wird Vitamin A durch die Retinol-Dehydrogenase in all-trans Retinsäure und 9-cis-RA umgewandelt (52, 68). Der RXR wird primär durch 9-cis-RA aktiviert, der Retinsäure-Rezeptor (RAR) bindet dagegen 9-cis-RA und all-trans Retinsäure (52, 69). Nach Aktivierung können beide Rezeptoren nach Heterodimer-Bildung an „retinoic acid responsive elements“ (RAREs) binden (52, 70) und so die Expression verschiedener Gene des Lipid-Stoffwechsels (z. B. ABCA1-, ABCG1- und LXR $\alpha$ -Gene) steigern (52, 70). Ferner bindet das RAR/RXR-Heterodimer an das DR4-Element des ABCA1-Promotors, was einen zusätzlichen (LXR-unabhängigen) Aktivierungsmechanismus darstellen könnte (52).

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) sind nukleäre Rezeptoren, die den Lipid- und Glukose-Stoffwechsel regulieren (52, 71). Von klinischer Bedeutung sind PPAR $\alpha$  und PPAR $\gamma$ , da sie als Transkriptionsfaktoren die lipidsenkenden Eigenschaften der Fibrate und die anti-diabetischen Effekte der Thiazolidindione vermitteln (52). In der Literatur wird eine vermehrte Transkription des ABCA1-Gens in humanen und murinen Makrophagen durch den PPAR $\alpha$ -Aktivator GW7845, den PPAR $\gamma$ -Agonisten WY14643 und Rosiglitazon beschrieben (52, 71, 72). PPARs scheinen somit die Bildung von HDL und den reversen Cholesterin-Transport zu fördern (52, 71, 72).

Daneben beeinflussen vermutlich auch Fettsäuren den ABCA1-vermittelten Cholesterin-Efflux und somit die Cholesterin-Homöostase (52, 73). Oleat, Linoleat und Arachidonat verringern den ApoA-I abhängigen Phospholipid- und Cholesterin-Efflux aus den Zellen. Diese Fettsäuren verstärken durch Stimulation von proteolytischen Prozessen den ABCA1-Abbau (52, 74). Obwohl die meisten inhibitorischen Effekte ungesättigter Fettsäuren post-transkriptionell ansetzen, sind auch Effekte auf die ABCA1-Expression vorstellbar. Ein potentieller Mechanismus beschreibt die antagonistische Wirkung von ungesättigten Fettsäuren auf die Oxysterol-abhängige LXR $\alpha$ -Aktivierung (52, 75). Zusätzlich zur Verdrängung der Oxysterol-Liganden vom LXR fördern ungesättigte Fettsäuren die Bindung von LXR in inaktiven PPAR $\alpha$ /LXR-Heterodimeren in Hepatozyten (52, 76). Damit könnte die erhöhte Aktivität des ABCA1-Promotors in Hepatozyten und Lipid-beladenden Makrophagen durch hohe Konzentrationen ungesättigter Fettsäuren abgeschwächt werden (52).

Pro-inflammatorische Zytokine und Lipopolysaccharide (LPS) spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen (52, 77, 78). LPS und die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1, Interferon- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  führen zu

einer verminderten ABCA1-Expression in Makrophagen (52, 79, 80). Diese Befunde unterstützen die These, dass Entzündungsmediatoren die HDL-Bildung und den reversen Cholesterin-Transport negativ beeinflussen (52, 79, 80).

Zudem sind verschiedene Medikamente bekannt, die zu einer vermehrten ABCA1- und ABCG1-Expression führen. Dazu zählen Adenosin, Nikotinsäure, Verapamil und die Bisphosphonate (52).

Insgesamt ist die komplexe Regulation der ABCA1- und ABCG1-Expression noch nicht ausreichend verstanden. Zahlreiche Substrate, nukleäre Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren scheinen diese Expression zu beeinflussen. Die beschriebenen Mechanismen liefern erste Hinweise für die Möglichkeit einer therapeutischen Beeinflussung der HDL-Bildung und des reversen Cholesterin-Transports über die Modulation der ABC-Transporter-Expression.

## 1.7 Tangier-Krankheit

Die Tangier-Krankheit ist ein seltenes, autosomal rezessiv vererbtes HDL-Defizienz-Syndrom (19, 81). Aktuell sind weltweit circa 100 Fälle bekannt (81). Die betroffenen Patienten weisen HDL-Konzentrationen von  $< 5$  mg/dl auf (81). Diese extrem reduzierte HDL-Konzentration führt aufgrund des gestörten reversen Cholesterin-Transports zu einer Kumulation von Cholesterin-Estern in verschiedenen Geweben. Klinisch präsentieren sich betroffene Patienten mit vergrößerten orange-gelben Tonsillen, einer vergrößerten Leber und Milz, vergrößerten Lymphknoten, einer peripheren Neuropathie, einer Kornea-Trübung und einer Arteriosklerose, die mit kardiovaskulären Ereignissen einhergeht (19, 81). Aktuell gibt es keine kausale Behandlungsmöglichkeit. Es wird die Einhaltung einer fettarmen Diät empfohlen (81).

Patienten, die an der Tangier-Krankheit leiden, zeigen aufgrund von Mutationen im ABCA1-Gen eine Dysfunktion des reversen Cholesterin-Transports (19, 81). ABCA1 gehört zu der „ATP-binding transporter superfamily“, deren Mitglieder verschiedene Moleküle über extra- und intrazelluläre Membranen transportieren (37). ABCA1 ist am zellulären Efflux von Phospholipiden und Cholesterin und an der Bildung von kugelförmigem HDL beteiligt. HDL transportiert Cholesterin von peripheren Zellen zurück zur Leber, wo überschüssiges Cholesterin biliär ausgeschieden wird (32). Dieser Mechanismus schützt die peripheren Zellen vor der Akkumulation von Cholesterin und der Ausbildung einer Arteriosklerose (32). Eine Akkumulation von Cholesterin in den extrahepatischen Zellen aufgrund eines dysfunktionalen ABCA1-Proteins führt daher zur Entwicklung einer Arteriosklerose. Aus ungeklärten Gründen variiert der

klinische Phänotyp der Tangier-Krankheit in den betroffenen Familien in Abhängigkeit von der Mutation deutlich (19, 32, 37, 81).

## **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Expression, Funktion und Regulation der ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1. Dabei dienen Fibroblasten von Patienten mit einer Tangier-Krankheit als Modellzellen für eine schwere Form des HDL-Mangels. Eine niedrige HDL-Plasmakonzentration gehört epidemiologisch zu den wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren. Aus unbekanntem Gründen wirkt nicht jeder HDL-Mangel per se atherogen. Durch ein besseres Verständnis der Patho- und Regulationsmechanismen schwerer Formen des HDL-Defizits wie der Tangier-Krankheit besteht die Chance, mildere und verbreitete Formen des HDL-Defizits besser zu verstehen sowie ihre mögliche Atherogenität besser einschätzen und gegebenenfalls behandeln zu können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Die folgende Tabelle 1 listet die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Reagenzien.

**Tabelle 1:** Reagenzien

Reagenz	Artikelnummer	Firma
2-Propanol	11361000	Chemosolute
ABCA1-Antikörper	MAB 8772	Abnova
ABCG1-Antikörper	NB 400-132	Novus Biologicals
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	9592.1	Carl Roth
Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific
Bromphenolblau	T116	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994	Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + 4,5 g Glucose/+L-Glutamin/- Pyruvate	41965-039	Gibco
Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS) - Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )/- Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	14190-094	Gibco
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Titriplex III)	1084211000	Merck
Ethanol absolut	1009862500	Merck
Fetales Kälberserum	10270	Invitrogen
Glycerin wasserfrei	3783.1	Carl Roth
Glycin	39.03.3	Carl Roth
Goat anti-mouse (Gt*Ms) Ig G (H+L) horseradish peroxidase (HRP)	2058974	Merck Millipore
Goat anti-rabbit (Gt*Rb) Ig G (H+L) horseradish peroxidase (HRP)	7028516	Merck Millipore
Wasserstoffperoxid 30 %	31.676-3	Sigma-Aldrich
Salzsäure 4 N	N0761	Carl Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure- (HEPES)-Puffer	9105.2	Carl Roth
Luminol	4203	Carl Roth
Magermilchpulver	leicht löslich	Sucofin
Methanol	7342.1	Carl Roth
Page Ruler Prestained Protein Ladder	26619	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin	15140-122	Gibco
Rotiphorese Gel 30	3029.1	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	811030	MP Biomedicals
Sucrose	1076511000	Merck

Reagenz	Artikelnummer	Firma
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	1610801	Bio-Rad
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Ultra Qualität	54293	Carl Roth
Trypsin/EDTA	10779413	Gibco
Tween 20	MKB60511V	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Aktin-Antikörper	A5441	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol	15433	Merck

Die folgende Tabelle 2 listet die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien.

**Tabelle 2:** Materialien

Artikel	Artikelnummer	Firma
Amersham Hybond-P 0,3 x 3 m	RPN 303 F	GE Healthcare
Amersham Hyperfilm ECL 180 x 240 mm	28-9068-37	GE Healthcare
Einmalpipette steril 2 ml/5 ml/10 ml/25 ml	357507/357543/357551/357525	Falcon
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	J-298-2	Brand
Eppendorf-Gefäße 2,0 ml	11227	Eppendorf
Falcon-Röhrchen 15 ml/50 ml	352096/352070	Falcon
Mikroliter-Spritzen 50 $\mu$ l	705N	Hamilton
Nitril Handschuhe	REF 9209825	B. Braun
Nunc-Immuno module 80/bag	640965	Nalge Nunc International
Pasteur-Pipetten	612-1702	VWR
Pipettenspitzen 200 $\mu$ l	REF 70.760.002	Sarstedt
Pipettenspitzen ep T.I.P.S. Standard 50–1000 $\mu$ l	03114287	Eppendorf
Sterilfilter 0,22 $\mu$ m	SLGPM33RS	Millex-GP
Sterilspritze	09J03	Falcon
Zellkulturflasche T175/T75	353028/137787	Falcon
Zellkulturflasche T25	90026	TPP Schweiz



Die folgende Tabelle 3 listet die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte.

**Tabelle 3:** Geräte

Gerät	Artikelnummer	Firma
Bechergläser	niedrige Form mit Teilung und Ausguss 25 ml/50 ml/100 ml/250 ml/400 ml/600 ml/1000 ml	Ilmabor
Brutschrank	Typ BB 6220	Heraeus
Dichtungsgummi	MVE-0510	Expedeon
Douncer	RW 18	IKA-Labortechnik
Entwicklermaschine	Optimax TR	MS-Laborgeräte
Sicherheitsbunsenbrenner Fireboy plus	144000	Integra Biosciences
Gelelektrophorese-Kammer	MGV-202	Expedeon
Glasplatten	MGP-200 R	Expedeon
Hypercassette	RPN 13642 18 x 24 cm	Amersham Biosciences
Kamm	MVC-2010	Expedeon
Klemmen	GPC-0002	Expedeon
Laborwecker	SKT 338N	Huger
Magnetrührer	RCT basic	IKA-Labortechnik
Gefrierbehälter Mr. Frosty-Nalgene	5100 0001	Thermo Fisher Scientific
Messzylinder niedrige Form Kl. B 200 ml/500 ml/1000 ml/2000 ml	213963601, 213964409, 213945403, 213906301	Duran
Sicherheitswerkbank Microflow biological safety cabinet - Nunc	Typ 5143413	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
pH-Meter	InLab Routine	Mettler-Toledo
Pipette Eppendorf research plus 0,5–10 µl/10–1000 µl	VB-0750, VB-0754	Eppendorf
Pipette pipetman 0,2–2 µl/100–1000 µl	FA10001M, FA10006M	Gilson
Pipettierhelfer	accu-jet pro	Brand
Power Supply	Power-Pac	Bio-Rad
Power Supply	EV261	Consort
Präzisionswaage	Ablesbarkeit 10 mg, max. 1500 g	Sartorius
Schüttler	KS Basic	IKA-Labortechnik
Spacer	MVS-0510R	Expedeon
Stickstofftank	MVExc 34/18	MVE Cryo Systems
Thermomixer	5436	Eppendorf
Vortex	Genie 2	Scientific Industrie

Gerät	Artikelnummer	Firma
Wasserbad	WNE 10	Memmert
Wipptisch	Rocky	Fröbel Labortechnik

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellen

Für die Experimente wurden humane Fibroblasten-Zelllinien von drei gesunden Spendern und zwei Tangier-Patienten verwendet. Alle Zelllinien waren mit der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) immortalisiert.

In Tabelle 4 sind die Charakteristika der verwendeten Zelllinien aufgeführt.

**Tabelle 4:** Beschreibung der verwendeten Kontrollzelllinien und Tangier-Zelllinien

Proben-name	Alter bei Biopsie	Beschreibung der Spender
<b>Kontrollzelllinien</b>		
CT1	5 Monate, 8 Tage	weiblich, gesund, verstorben an plötzlichem Kindstod, genetisch gesund
CT2	45 Jahre	weiblich, gesund
CT3	42 Jahre	männlich, gesund
<b>Tangier-Zelllinien</b>		
TT1	63 Jahre	weiblich, homozygoter Träger einer Punktmutation in Exon 19 mit Austausch der Aminosäure Asparagin gegen Serin, Expression eines defekten vollständigen ABCA1-Proteins, klinisch: HDL-Defizit, Splenomegalie, keine schwere Arteriosklerose (82)
TT 2	60 Jahre	männlich, homozygoter Träger einer Deletion (ein Basenpaar) in Exon 13, Deletion induziert Stopp-Codon an Position 575 (Nonsense-Mutation), keine Expression des vollständigen ABCA1-Proteins, (Proteinsequenz ¼ der normalen Proteingröße) klinisch: HDL-Defizit, schwere Arteriosklerose und koronare Herzkrankheit (KHK) (83)

### 2.2.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank. Die Zellen wurden bei 37 °C bei einem Kohlenstoffdioxid-(CO<sub>2</sub>)-Gehalt von 5 % im Brutschrank inkubiert. Zur Kultivierung der Zellen wurde DMEM – high Glucose verwendet.

Das Nährmedium setzte sich folgendermaßen zusammen:

DMEM (4,5 g Glucose, L-Glutamin)	500,0 ml
Fetales Kälberserum	50,0 ml (10 %)
Penicillin-Streptomycin	5,5 ml (1 %)

### **Auftauen der Zellen**

Die zu kultivierenden Zellen befanden sich als Zellsuspension in Kryogefäßen in flüssigem Stickstoff. Zur Kultivierung wurden die benötigten Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und auf Eis so schnell wie möglich in die Zellkulturräume transportiert. Dort wurde die Zellsuspension in einem 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen mit 9 ml vorgewärmtem Medium (37 °C) überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine T25 Zellkulturflasche (25 cm<sup>3</sup>) mit 9 ml warmem Medium (37 °C) gegeben. Die Zellkulturflasche wurde anschließend zur Inkubation in den Brutschrank überführt.

Beim Auftauen der Zellsuspensionen wurde stets darauf geachtet, schnell zu arbeiten, da die Zellen zur Kryokonservierung in Nährmedium mit 10 % DMSO-Zusatz suspendiert worden waren. DMSO gilt als zelltoxisch und sollte daher beim Auftauen so kurz wie möglich auf die Zellen einwirken.

### **Mediumwechsel**

Ein Mediumwechsel erfolgte routinemäßig einmal wöchentlich. Zusätzlich wurde das Medium gewechselt, wenn ein Farbumschlag eine Anreicherung mit Zellfragmenten (Mikroskop) erkennbar war. Für den Mediumwechsel wurde das alte Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS (ohne CaCl<sub>2</sub>, ohne MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und neues Medium in die Zellkulturflasche gegeben. Die Mengen von DPBS und Medium richteten sich nach der Größe der Zellkulturflaschen (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Größe der Zellkulturflasche mit Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS) bzw. Medium-Volumina

Größe der Zellkulturflasche	Volumen an DPBS und Medium
T25 (25 cm <sup>3</sup> )	5 ml
T75 (75 cm <sup>3</sup> )	15 ml
T175 (175 cm <sup>3</sup> )	35 ml

### Subkultivierung der Zellen

Bei einer lückenlosen Bedeckung des Bodens der Zellkulturflasche (100 % Konfluenz) wurden die Zellen passagiert. Die Vermehrung der Zellen erfolgte – ausgehend von einer T25-Zellkulturflasche (25 cm<sup>3</sup>) – so lange, bis vier T175-Zellkulturflaschen (175 cm<sup>3</sup>) zur Verfügung standen. Für den Splittvorgang wurde bei konfluenten Platten das alte Medium abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS/EDTA (0,05 %) gewaschen. Danach wurde Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Durch Schwenken der Zellkulturflasche wurde sichergestellt, dass alle Zellen mit der Trypsin/EDTA-Lösung benetzt waren. Durch weiteres Schwenken und leichtes Klopfen an die Zellkulturflasche wurde die Zellen abgelöst. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Abgelöste Zellen waren an ihrer sphärischen Form erkennbar. Die Menge der verwendeten Trypsin/EDTA-Lösung richtete sich nach der Größe der Zellkulturflasche (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Größe der Zellkulturflasche mit Volumen der Trypsin/EDTA-Lösung

Größe der Zellkulturflasche	Volumen an Trypsin/EDTA-Lösung
T25 (25 cm <sup>3</sup> )	250 µl
T75 (75 cm <sup>3</sup> )	750 µl
T175 (175 cm <sup>3</sup> )	1500 µl

Nach Ablösung aller Zellen wurden die Zellen in 10 ml Nährmedium suspendiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Zellkulturflasche mit warmem Medium (Menge siehe Tabelle 5) überführt. Die Zellkulturflasche wurde zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

### Einfrieren der Zellen

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde analog zur Subkultivierung durchgeführt (siehe oben). Das

nach dem Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Nährmedium mit 10 % DMSO resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 24 h in einem Mr. Frosty Freezing Container bei  $-80^{\circ}\text{C}$  langsam abgekühlt (Abkühlung ca.  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). Anschließend wurde das Kryogefäß in den Stickstofftank überführt.

### **Ernten und Aufarbeitung der Zellen für den Western-Blot**

Das Ernten der Zellen erfolgt wie der oben beschriebene Splittvorgang der Zellen. Das nach dem Zentrifugieren sichtbare Zellpellet wurde in  $200\ \mu\text{l}$  Sucrose-2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-(HEPES)-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Douncers aufgeschlossen. Das Zellysate wurde aliquotiert ( $15\ \mu\text{l}/\text{Aliquot}$ ) und für die Versuche bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Beim Aufschluss der Zellen wurde darauf geachtet auf Eis zu arbeiten, um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden.

### **Cholesterin-Beladung der Zellen**

Die Cholesterin-Endkonzentration im Medium zur Cholesterin-Anreicherung in den Zellen sollte  $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$  betragen. Dazu wurden  $10\ \mu\text{g}$  Cholesterin in 1 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurde eine 1/500 Verdünnung mit dem Zellmedium hergestellt und als Nährmedium auf die Zellen geben. Die Inkubation der Zellen mit dem Cholesterin-haltigen Medium erfolgte für 24 h. Die Cholesterin-Anreicherung wurde unter dem Mikroskop überprüft. Dabei waren dunkle, kleine Lipid-Tröpfchen in den Zellen sichtbar. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Die Experimente mit den Cholesterin-angereicherten Zellen dienen der Überprüfung der Frage, ob die Expression der zu untersuchenden ABC-Transporter bei hohem Cholesterin-Gehalt in den Zellen induziert wird.

#### **2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay**

Zu Beginn des Versuches wurde eine Standardreihe (S1–S8) mit Proteinkonzentrationen von  $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $125\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $250\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $500\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $750\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1500\ \mu\text{g}/\text{ml}$  und  $2000\ \mu\text{g}/\text{ml}$  in DPBS-Puffer hergestellt. Für die Arbeitslösung wurden 50 Teile Protein Assay Reagenz A und ein Teil Protein Assay Reagenz B gemischt. Anschließend wurden die Standardreihe sowie die Proben auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Pro Vertiefung wurden  $10\ \mu\text{l}$  Probe bzw. Standardlösung und  $200\ \mu\text{l}$  Arbeitslösung verwendet. Für jede Standardkonzentration und Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 s auf ein Schwenkbrett gestellt und anschließend für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte mittels Plattenreader bei einer Wellenlänge von  $562\ \text{nm}$ .

## 2.2.4 SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot

### SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese handelt es sich um ein elektrophoretisches Verfahren zur Auftrennung von Proteinen. Das als Trägermedium verwendete, porenhaltige Polyacrylamidgel wirkt wie ein Sieb und trennt die Proteine nach ihrer Größe auf. Im elektrischen Feld wandern kleinere Proteine schneller durch das Polyacrylamidgel als große und legen daher eine größere Strecke zurück. Die Porengröße wird durch Polyacrylamid-Konzentration bestimmt – je höher die Konzentration, desto kleiner sind die Poren (84).

Das anionische Tensid SDS wirkt als Denaturierungsmittel. Es zerstört die nicht-kovalenten Bindungen der Proteine und somit deren Tertiär- und Quartärstruktur. Ferner bewirkt die Beladung der Proteine mit SDS, dass alle Proteine die gleiche negative Ladungsdichte besitzen, so dass die Auftrennung im Gel ausschließlich nach ihrer molekularen Masse erfolgt. Die ursprüngliche Ladung der Proteine spielt keine Rolle (84).

Die molekularen Massen der Transporter ABCA1 und ABCG1 betragen 220 kDa und 76 kDa. Aufgrund der hohen molekularen Masse der Proteine wurde zur Auftrennung der Zelllysate ein 7,5%-iges Trenngel mit einem 4,5%-igen Sammelgel verwendet. Die Trenngele wurden folgendermaßen hergestellt:

#### Trenngel (7,5 %):

3 x 708 µl	destilliertes Wasser	
2 x 531 µl	Trenngelpuffer	Herstellung Trenngelpuffer:
2 x 531 µl	Acrylamid 30%	1,5 M Tris
30 µl	APS	0,4 % SDS
3 µl	TEMED	pH-Wert 8,8

#### Sammelgel (4,5 %):

720 µl	destilliertes Wasser	
300 µl	Sammelgelpuffer	Herstellung Sammelgelpuffer:
180 µl	Acrylamid 30%	0,5 M Tris
10 µl	APS	0,6 % SDS
3 µl	TEMED	pH-Wert 6,8

**Laufpuffer:**

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin
1%	SDS
pH-Wert	8,6

Für das Trenngel wurden 4 x 1000 µl in die Gelelektrophorese-Kammer pipettiert und mit 2-Propanol vorsichtig überschichtet, um eine gerade Trennschicht-Kante zu erhalten. Nach der Polymerisation wurde das 2-Propanol entfernt und das Sammelgel (2 x 560 µl) in die Kammer pipettiert. Für die Probenaschen wurde ein Kamm (10 Zähne) in das Sammelgel gesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt.

Von jeder Probe wurden 15 µg Zellysat aufgetragen. Eine Anpassung der Menge erfolgte anhand der oben beschriebenen Proteinbestimmung. Die Proben wurden mit deionisiertem Reinstwasser auf 15 µl Gesamtmenge aufgefüllt. Die verdünnte Probe wurde mit 3,75 µl 4 x SDS-Probenpuffer beschwert. Die Proben wurden ausführlich auf einem Vortexer durchmischt, anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Beurteilung der Trennung und der molekularen Masse der Proteine wurde in die erste Probenasche 5 µl eines Größenmarkers (PageRuler Prestained Protein Ladder) gegeben. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 30 mA für ca. 30 min (bei zwei Gelen parallel in einer Kammer: 60 mA, 30 min) in der Gelelektrophorese-Kammer durchgeführt. Danach schloss sich ein Western-Blot an.

**Western-Blot**

Der Western-Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen („Blotting“), auf der die zu detektierenden Proteine direkt oder indirekt mittels Immundetektion nachgewiesen werden. Die Immundetektion erfolgt mit Hilfe von Antikörpern. Bei der gebräuchlicheren indirekten Variante wird zunächst ein Primärantikörper auf die Membran gegeben, der spezifisch das gesuchte Protein bindet. Nach einem Waschvorgang zur Entfernung überschüssiger Antikörper wird ein Enzym-gekoppelter Sekundärantikörper zugegeben, der an den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird ein Substrat zugefügt, das durch das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym umgesetzt wird. Das bei der enzymatischen Reaktion entstehende Produkt emittiert ein Lichtsignal, das auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann (84).

Der Western-Blot wurde in der vorliegenden Arbeit als Nass-Blot durchgeführt. Dabei wurden die Proteine mittels Elektrophorese von dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran übertragen. Die Membran wurde vorher für ca. 5 s in Methanol aktiviert. Das Gel und die Membran wurden zwischen Filterpapieren in der Blotting-Kassette positioniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran befanden. Anschließend wurde die Kassette in eine mit Nass-Blot-Puffer (1,2g 25mM Tris, 5,7g 192mM Glycin, 40 ml 10% Ethanol, destilliertes Wasser ad 400 ml) gefüllte Nass-Blot-Kammer gestellt. Der Nass-Blot wurde bei 50 V für 55 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 30 min mit Blocking-Puffer (5% Magermilchpulver in 1xTBS/0,1% Tween (100µl/100ml)) inkubiert, um die nicht mit Protein beladenen Stellen auf der Membran zu blockieren und somit eine unspezifische Adsorption der Antikörper an der Membran zu verhindern und das Hintergrundsignal zu minimieren.

Anschließend wurde der Primärantikörper auf die Membran gegeben. Von den ABCA1- und ABCG1-Antikörpern wurden 1/500 Verdünnungen in Blocking-Puffer hergestellt. Der  $\beta$ -Aktin-Antikörper wurde 1/5000 verdünnt. Von den Verdünnungen wurden jeweils 5 ml auf die Membran geben. Die Membranen wurden entweder über Nacht (ABCA1- und ABCG1-Antikörper) oder 1 h ( $\beta$ -Aktin-Antikörper) mit den Primärantikörpern inkubiert. Danach wurde die Membran 3 x 10 min mit Waschpuffer (1xTBS/0,1% Tween (100µl/100ml)) gewaschen. Als Sekundärantikörper wurden zur Detektion von ABCA1 und  $\beta$ -Aktin polyklonales anti-Maus Ziegen-Immunglobulin sowie zur Detektion von ABCG1 polyklonales Anti-Kaninchen Ziegen-Immunglobulin in einer Verdünnung von 1/5000 verwendet. Beide Antikörper waren mit dem Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Die Membran wurde mit 5 ml der Sekundärantikörper-Verdünnung 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Wasch-Puffer für 3 x 10 min gewaschen.

Die Detektion des markierten Proteins erfolgte mittels Enhanced chemiluminescence (ECL). Unter Lumineszenz versteht man die optische Strahlung, die bei Übergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand entsteht. Bei der Chemilumineszenz erfolgt die Anregung durch eine chemische Reaktion. Bei der ECL-Methode resultiert die Lichtemission aus der durch die Horseradish-Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol mit Wasserstoffperoxid. Die Lichtemission wurde mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht. Da das ECL-Signal mit der Zeit schnell nachlässt, war ein rasches Arbeiten erforderlich.



**Quantifizierung**

Die Auswertung der Western-Blots erfolgte mit der Bildbearbeitungs-Software (ImageJ® open source 2016) (85). Dazu wurde eine semiquantitative Vermessung der einzelnen Banden als Flächenmessung vorgenommen. Hierbei wird aus der Fläche und Intensität der Banden die Proteinmenge bestimmt (relative Proteinmenge).

**Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware R Version 3.5.1 und RStudio Version 1.1.456 (86). Für Gruppenvergleich wurde der Zweistichproben-t-Test (zweiseitig; homoskedastisch) angewendet. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt. Die graphische Darstellung der Werte erfolgte mit Microsoft Excel (2016).



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Tangier-Zelllinien

In der vorliegenden Dissertation wurden die Phänotypen von Tangier-Hautfibroblasten aus zwei Familien mit unterschiedlichen molekularen Defekten und differenten klinischen Symptomen verglichen. Beide Familien wiesen HDL-Konzentrationen nahe Null und einen stark reduzierten HDL-induzierten Lipid-Efflux auf (siehe Tabelle 7).

Der Defekt in Familie 1 ist charakterisiert durch eine Punktmutation in Exon 19. Daraus resultiert ein funktionell defektes, aber vollständiges ABCA1-Protein. In dieser Familie treten keine Anzeichen einer frühen Arteriosklerose auf (82).

Der Defekt in Familie 2 besteht aus einer Deletion eines Basenpaares in Exon 13, wodurch ein Stopp-Codon generiert wird. Von dieser Mutation betroffene Patienten exprimieren kein vollständiges ABCA1-Protein (Proteinsequenz  $\frac{1}{4}$  der normalen Proteingröße). Diese Familie leidet an einer frühzeitigen Entwicklung von Arteriosklerose (83).

**Tabelle 7:** Gegenüberstellung der Merkmale der Tangier-Familie 1 (=Tangier-Typ 1, TT1) (82) versus Tangier-Familie 2 (=Tangier-Typ 2, TT2) (83)  
ABCA1 = ABC-Transporter A1

Familie 1 (TT 1)	Familie 2 (TT 2)
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Punktmutation im ABCA1-Gen</li> <li>– Expression des vollständigen (mutierten) ABCA1-Proteins</li> <li>– keine Anzeichen einer frühzeitigen Arteriosklerose</li> <li>– HDL-Konzentrationen nahe Null</li> <li>– stark reduzierter, spezifischer HDL-induzierter Efflux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Nonsense-Mutation im ABCA1-Gen</li> <li>– keine Expression des vollständigen ABCA1-Proteins (Proteinsequenz <math>\frac{1}{4}</math> der normalen Proteingröße)</li> <li>– frühzeitige, schwere Arteriosklerose</li> <li>– HDL-Konzentrationen nahe Null</li> <li>– fast kein spezifischer HDL-induzierter Efflux</li> </ul>

#### 3.2 Expression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten

Da neben ABCA1 auch ABCG1 eine wichtige Rolle im Cholesterin-Metabolismus spielt, wurde die Expression beider Transporter analysiert.

##### 3.2.1 mRNA-Expression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten

Bei den mRNA-Ergebnissen handelt es sich um unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe Walter. Diese wurden mir von Prof. Michael Walter zur Gegenüberstellung der ABCA1- und ABCG1-Expressionsdaten auf mRNA- und Proteinebene zur Verfügung gestellt.

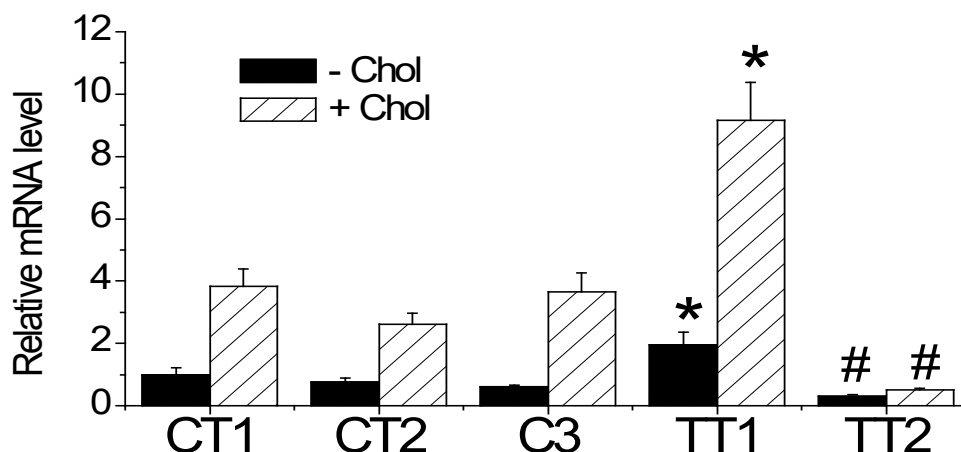
Bei den mRNA-Untersuchungen wurden zwei Tangier-Zelllinien mit drei gesunden Kontrollzelllinien (siehe Tabelle 4) verglichen. Die relative mRNA-Menge wurde mittels Real Time-PCR bestimmt. Alle Untersuchungen wurden mit Cholesterin-beladenen und unbehandelten Zellen (basale Expression) durchgeführt.

### Basale mRNA-Expression von ABCA1

Die basale mRNA-Expression von ABCA1 war in Tangier-Typ 1 Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien (CT1–CT3) deutlich erhöht (siehe Abbildung 1). Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Expressionsniveaus der Kontrollzelllinie 1 (CT1) und den Tangier-Typ 1 Zellen ( $p < 0,05$ ). Dagegen zeigten Tangier-Typ 2 Zellen eine signifikant geringere mRNA-Expression von ABCA1 im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 1 (CT1) ( $p < 0,05$ ) (87).

### mRNA-Expression von ABCA1 bei Cholesterin-Beladung

Die mRNA-Expression von ABCA1 war in den Ansätzen mit Cholesterin-Beladung sowohl bei den Kontroll- als auch Tangier-Zelllinien im Vergleich zum Basalwert erhöht (siehe Abbildung 1). Analog zur basalen mRNA-Expression war die mRNA-Expression von ABCA1 in Tangier-Typ 1 Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie 1 (CT1) auch bei einer Cholesterin-Beladung der Zellen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). In Tangier-Typ 2 Zellen war hingegen im Vergleich zur Kontrollzelllinie 1 eine signifikante Abnahme der Expression festzustellen ( $p < 0,05$ ) (87).



**Abbildung 1:** ABCA1-mRNA-Expression mRNA-Expression in Kontroll- (CT1–CT3) und Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2) ohne Cholesterin-Beladung (-Chol, basale Expression) und mit Cholesterin-Beladung (+Chol). Relative Werte in Bezug zur basalen Expression in CT1 (100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.

\*  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte mRNA-Expression von ABCA1 im Vergleich zu CT1,

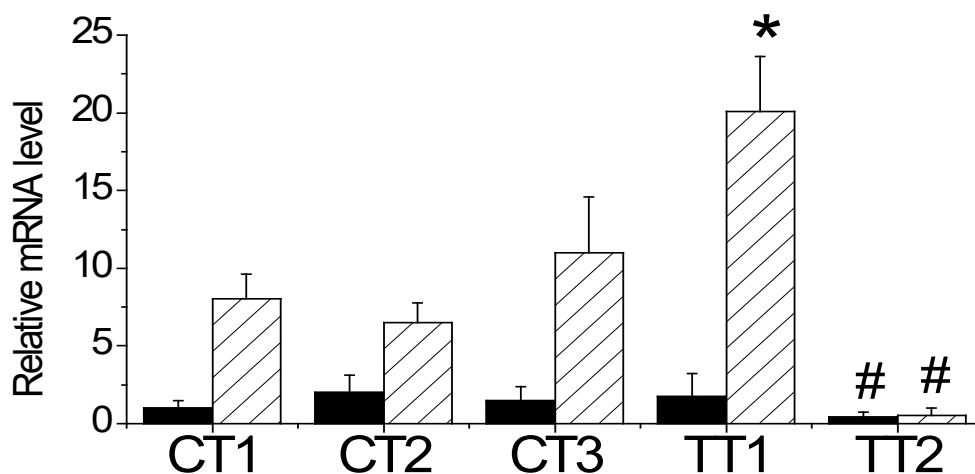
#  $p < 0,05$ , signifikant verminderte mRNA-Expression von ABCA1 im Vergleich zu CT1 (87).

### Basale mRNA-Expression von ABCG1

Die basale mRNA-Expression von ABCG1 in Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) war im Vergleich zu der Expression in der Kontrollzelllinie 1 (CT1) nicht signifikant erhöht ( $p > 0,05$ ). In Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) lag die mRNA-Expression von ABCG1 verglichen mit der Kontrollzelllinie 1 (CT1) dagegen signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) (siehe Abbildung 2).

### mRNA-Expression von ABCG1 mit Cholesterin-Beladung

Vergleichbar mit den ABCA1-Befunden zeigte sich auch für ABCG1 eine erhöhte mRNA-Expression in Cholesterin-beladenen Zellen vs. nicht mit Cholesterin beladenen Zellen (siehe Abbildung 2). In Cholesterin-beladenen Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) war die mRNA-Expression von ABCG1 im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 1 (CT1) signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Dagegen zeigten Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) im Vergleich zur Kontrollzelllinie 1 (CT1) unter Cholesterin-Beladung eine signifikant verminderte mRNA-Expression von ABCG1 ( $p < 0,05$ ).

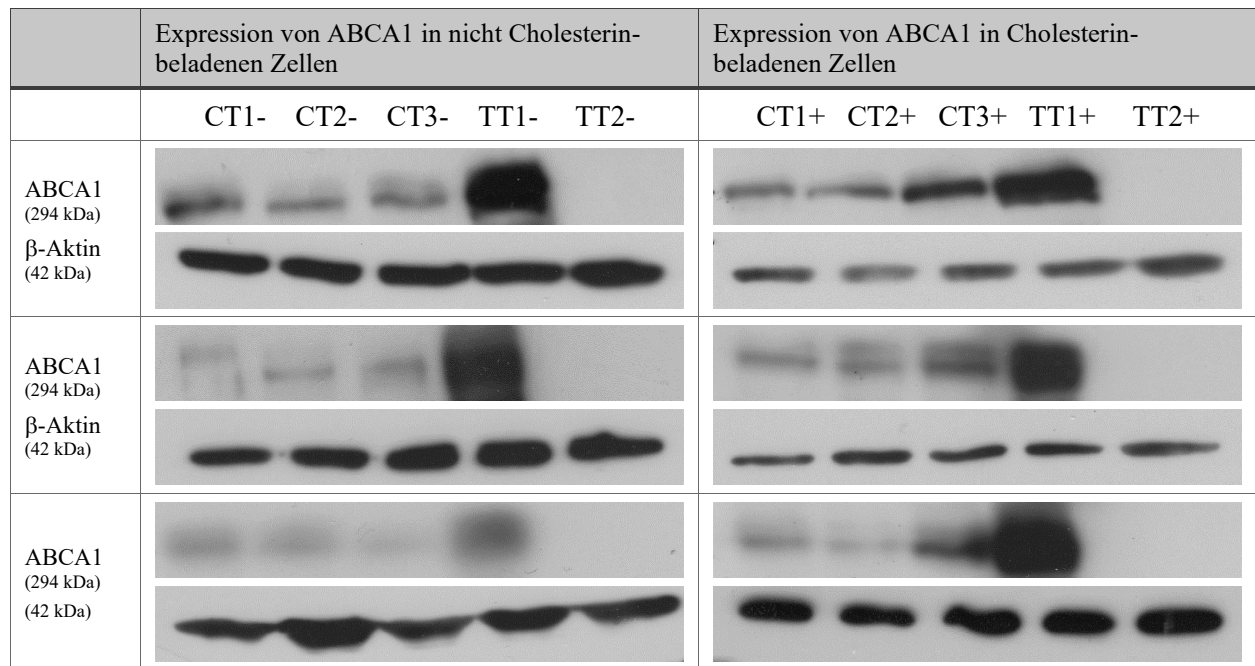


**Abbildung 2:** ABCG1-mRNA-Expression mRNA-Expression in Kontroll- (CT1–CT3) und Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2) ohne Cholesterin-Beladung (-Chol, basale Expression) und mit Cholesterin-Beladung (+Chol). Die Werte sind relativ zu Kontrollen dargestellt, CT1 – entspricht 100%. Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen der Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.  
\*  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte mRNA-Expression von ABCG1 im Vergleich zu CT1,  
#  $p < 0,05$ , signifikant verminderte mRNA-Expression von ABCG1 im Vergleich zu CT1 (87).

### 3.2.2 Proteinexpression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten

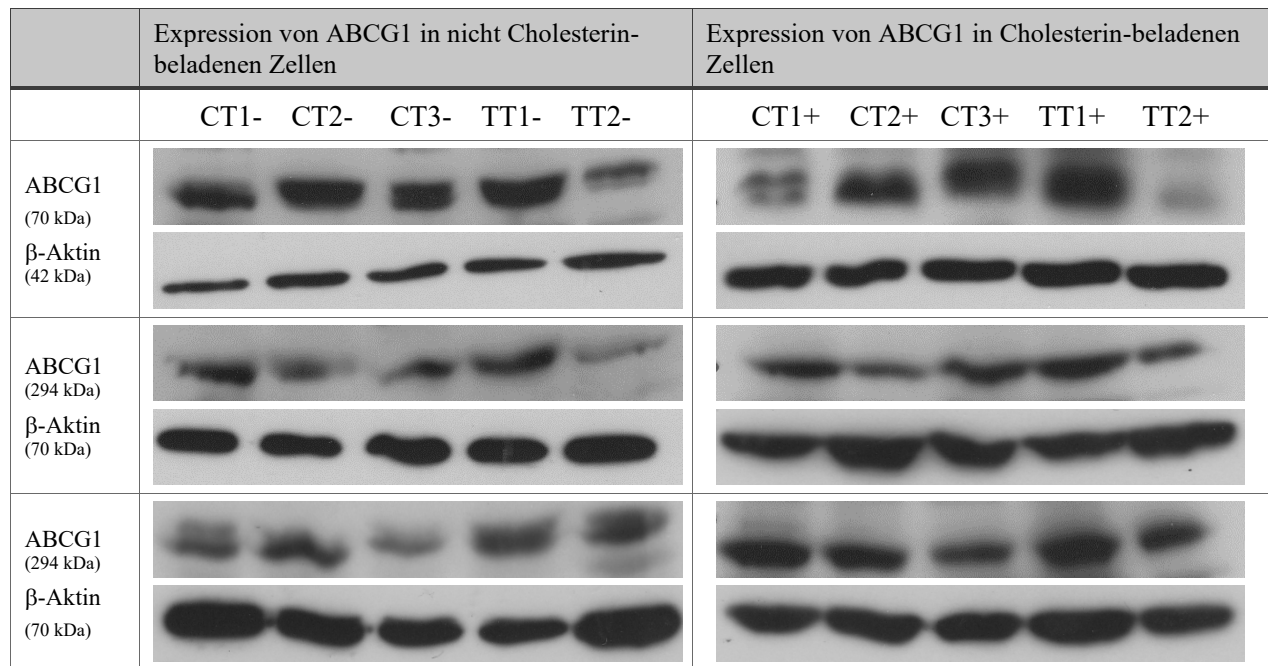
Anschließend erfolgte eine Untersuchung der Expression von ABCA1 und ABCG1 auf Proteinebene. Wiederum wurden die zwei Tangier-Zelllinien (TT1, TT2) mit Kontrollzelllinien dreier gesunder Probanden (CT1–CT3) verglichen. Alle Untersuchungen wurden mit Cholesterin-beladenen und unbehandelten Zellen durchgeführt. Für die Analyse der Proteinexpression von ABCA1 und ABCG1 wurden Western-Blots durchgeführt (siehe Kapitel 2.4).

Die Western-Blots zeigten eine deutliche Erhöhung der ABCA1-Proteinexpression in Tangier-Typ 1 Zellen (TT1, siehe Abbildung 3). In Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) war das ABCA1-Protein nicht nachweisbar. Auch unter Cholesterin-Beladung zeigten Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) eine erhöhte und Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) eine fehlende Expression. Optisch war kein Unterschied zwischen Cholesterin-beladenen und unbehandelten Zellen zu erkennen.



**Abbildung 3:** ABCA1-Proteinexpression (Western-Blots)  
Proteinexpression in Kontroll- (CT1–CT3) und Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2) ohne Cholesterin-Beladung (-Chol, basale Expression) und mit Cholesterin-Beladung (+Chol).  
β-Aktin fungiert als Ladekontrolle.

In den Western-Blot-Experimenten zur Untersuchung der ABCG1-Proteinexpression variierten die Ergebnisse von Experiment zu Experiment. Dennoch war ein ähnlicher Trend wie zuvor bei der mRNA erkennbar. Die ABCG1-Proteinexpression schien in Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) erhöht und in Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) vermindert zu sein. Diese Beobachtungen in waren sowohl in Cholesterin beladenen als auch in unbehandelten Zellen erkennbar. Optisch bestand kein Unterschied zwischen Cholesterin beladenen und unbehandelten Zellen erkennbar (siehe Abbildung 4).

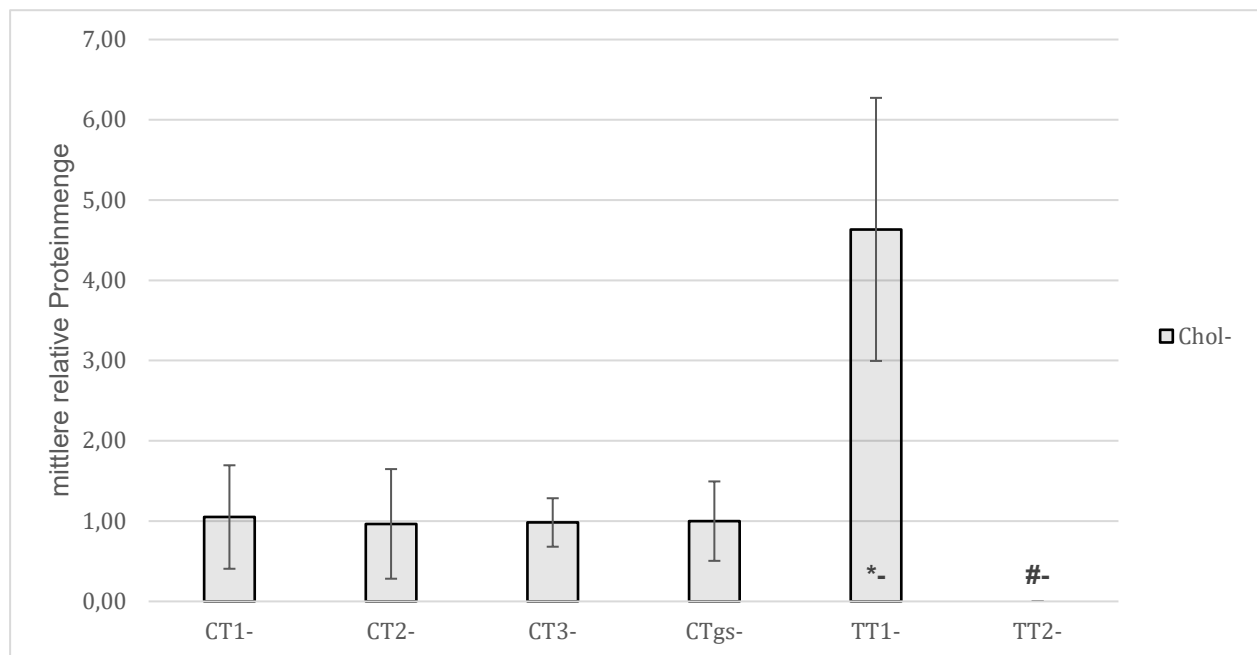


**Abbildung 4:** ABCG1-Proteinexpression (Western-Blots)  
 Proteinexpression in Kontroll- (CT1–CT3) und Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2) ohne Cholesterin-Beladung (-Chol, basale Expression) und mit Cholesterin-Beladung (+Chol).  
 β-Aktin fungiert als Ladekontrolle.

Anschließend wurden die Western-Blots statistisch ausgewertet. Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse auf den Mittelwert der Ergebnisse der drei Kontrollzelllinien normiert (CTgs = 100 %). Durch dieses Vorgehen sollte der verwendete ABCA1- und ABCG1-Normwert einem möglichst breiten Bevölkerungsdurchschnitt entsprechen.

### Basale Proteinexpression ABCA1

Die basale Proteinexpression von ABCA1 war in Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) im Vergleich zu den drei Kontrollzelllinien (CT1-, CT2-, CT3-) sowie zur Kontrollgruppe (CTgs-) signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Bei Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) bestand dagegen eine signifikant verminderte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien bzw. zur zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs-) ( $p < 0,05$ ). Eine ABCA1-Proteinexpression war nicht nachweisbar (siehe Abbildung 5).

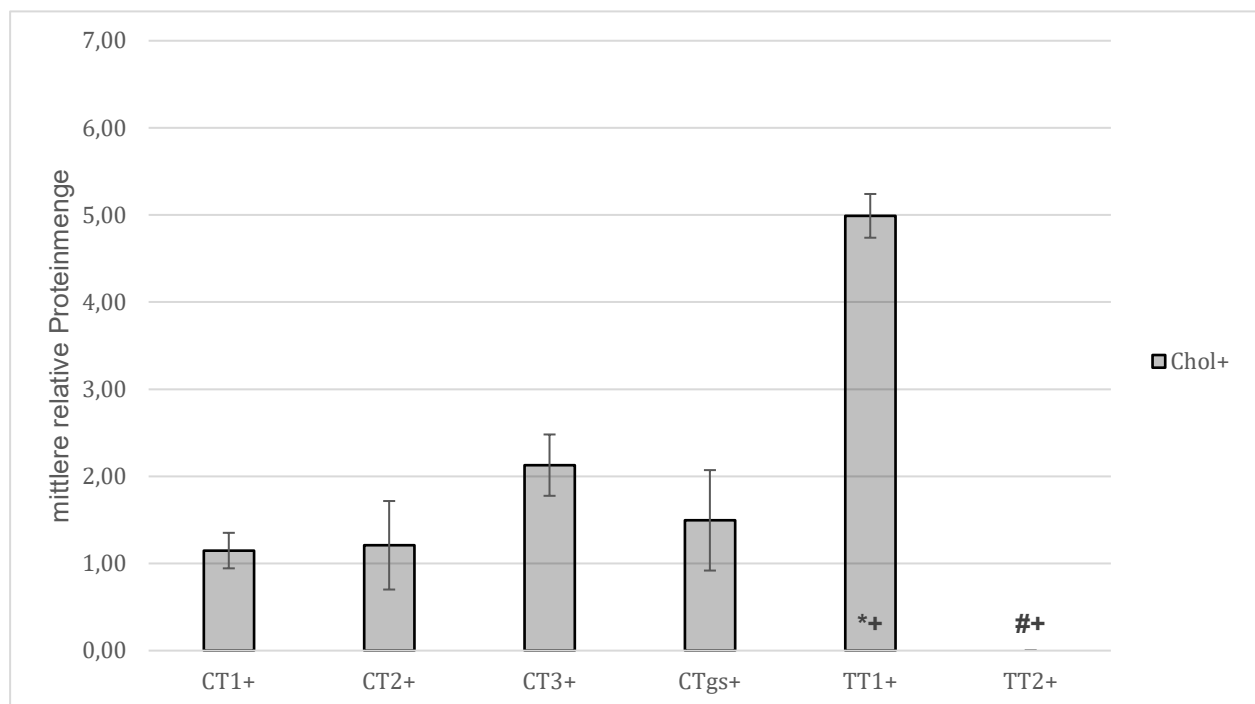


**Abbildung 5:** ABCA1-Proteinexpression in nicht mit Cholesterin beladenen Tangier-Fibroblasten  
Mittlere relative Proteinkonzentration in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Relative Werte in Bezug zur Gesamtexpression (CTgs- = 100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.  
\*-  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1-, CT2- CT3-, CTgs-  
#-  $p < 0,05$ , signifikant verminderte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1-, CT3-, CTgs-.



### Proteinexpression von ABCA1 mit Cholesterin-Beladung

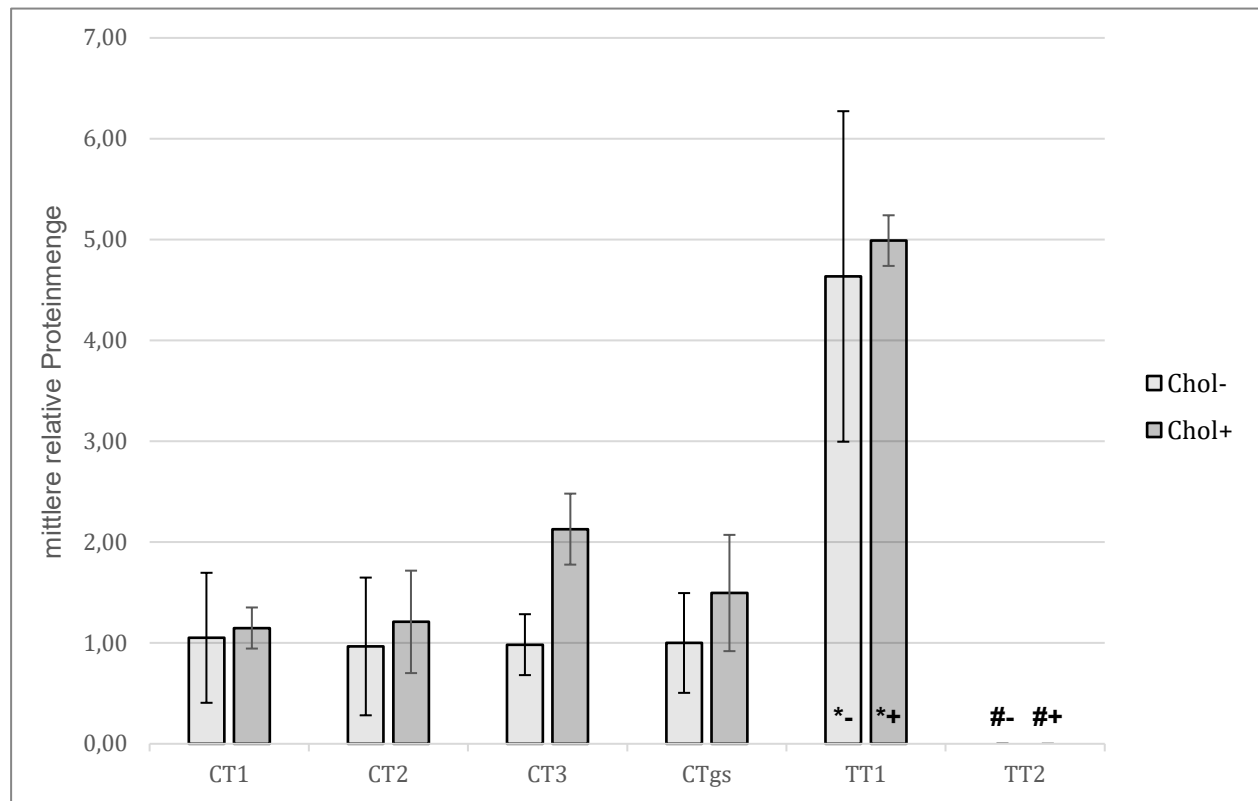
Wie bei der basalen Proteinexpression von ABCA1 war die Proteinexpression von ABCA1 in mit Cholesterin beladenen Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) im Vergleich zu allen mit Cholesterin beladenen Kontrollzelllinien (CT1+, CT2+, CT3+) sowie zur zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs+) signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). In Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) war auch unter Cholesterin-Beladung im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 1, 2, 3 und zur zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs+) eine signifikante Verminderung der ABCA1-Proteinexpression feststellbar ( $p < 0,05$ , siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** ABCA1-Proteinexpression in Cholesterin-beladenen Tangier-Fibroblasten  
Mittlere relative Proteinkonzentration in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Relative Werte in Bezug zur Gesamtexpression (CTgs+ = 100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.  
\*+  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1+, CT2+, CT3+, CTgs+  
#+  $p < 0,05$ , signifikant verminderte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1+, CT2+, CT3+, CTgs+.

### Vergleich der ABCA1-Expression in unbehandelten versus Cholesterin-beladenen Zellen

Die Proteinexpression von ABCA1 war unter Cholesterin-Beladung in allen Zelllinien (sowohl Kontroll- (CT1–CT3) als auch Tangier-Zelllinien (TT1, TT2)) geringfügig höher als im Basalzustand (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7:** ABCA1-Proteinexpression in unbehandelten (Chol-) und mit Cholesterin (Chol+) beladenen Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2)

Mittlere relative Proteinkonzentration in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Relative Werte in Bezug zur Gesamtexpression (CTgs = 100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.

\*-  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1-, CT2-, CT3- und CTgs-

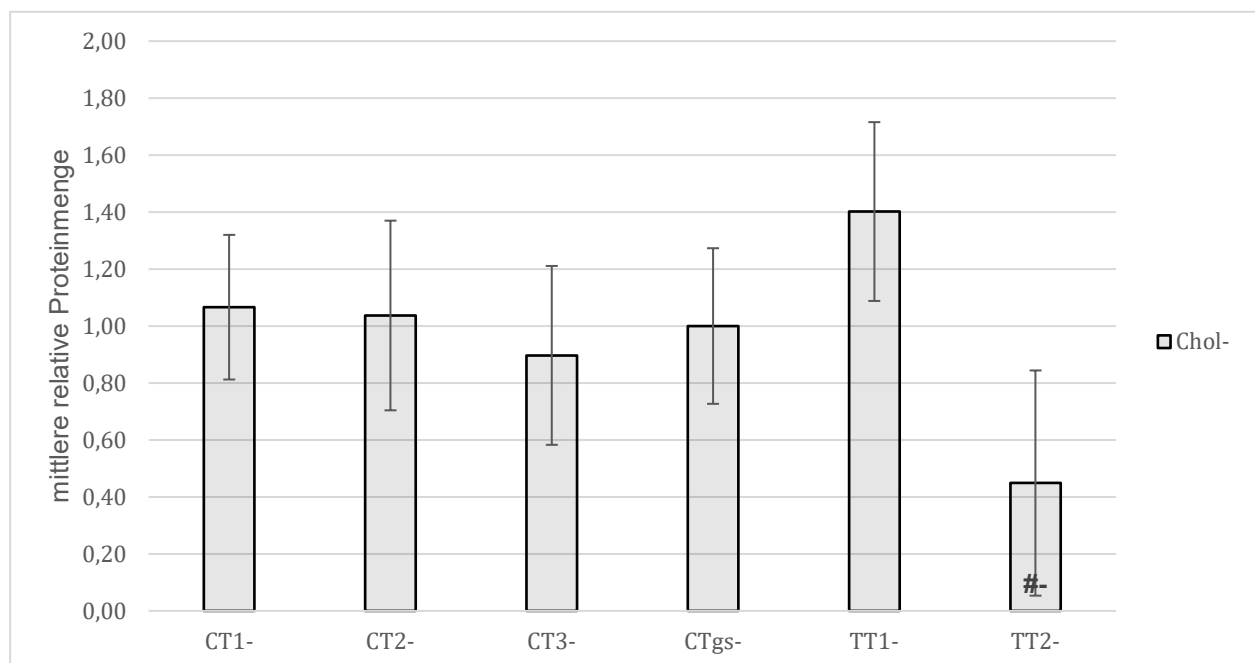
\*+  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1+, CT2+, CT3+ und CTgs+

#-  $p < 0,05$  signifikant verminderte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1-, CT3- und CTgs-

#+  $p < 0,05$ , signifikant verminderte Proteinexpression von ABCA1 im Vergleich zu CT1+, CT2+, CT3+ und CTgs+.

### Basale Proteinexpression ABCG1

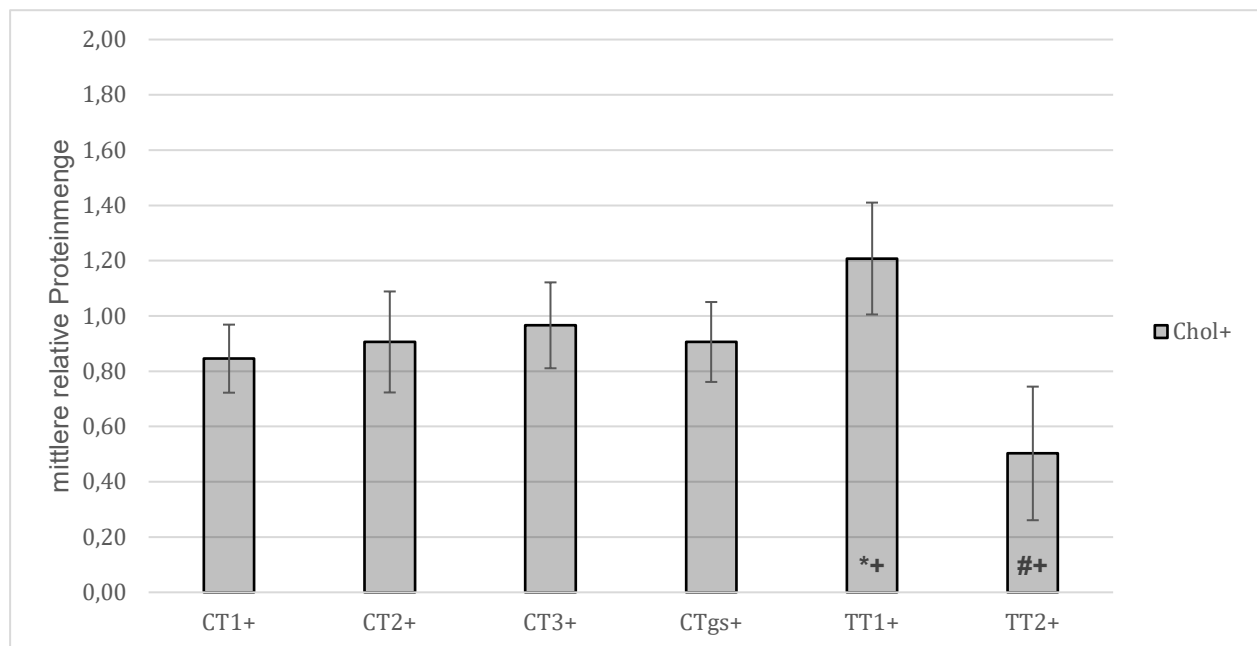
Die basale Proteinexpression von ABCG1 in den Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) war im Vergleich zu allen drei Kontrollzelllinien (CT1-, CT2-, CT3-) sowie zur zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs-) nicht signifikant erhöht ( $p > 0,05$ ). Auch in Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) war die Abnahme der Proteinexpression von ABCG1 verglichen mit den Kontrollzelllinien 1, 2 und 3 nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied bestand lediglich zwischen der Proteinexpression in Tangier Zelltyp 2 (TT2) und der zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs-). Die graphische Darstellung ließ auf eine vermehrte Proteinexpression in Tangier-Typ 1 Zellen und eine verminderte Proteinexpression von Tangier-Typ 2 Zellen schließen (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8:** ABCG1-Proteinexpression in nicht mit Cholesterin beladenen Tangier-Fibroblasten  
Mittlere relative Proteinkonzentration in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Relative Werte in Bezug zur Gesamtexpression (CTgs- = 100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.  
#-  $p < 0,05$ , signifikant verminderte Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu CTgs-.

### Proteinexpression von ABCG1 mit Cholesterin-Beladung

In mit Cholesterin beladenen Tangier-Typ 1 Zellen (TT1) zeigte sich die Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 1, 2 und 3 (CT1–CT3) als nicht signifikant erhöht ( $p > 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied bestand lediglich zur zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs+) ( $p < 0,05$ ). In Tangier-Typ 2 Zellen (TT2) war die Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu der Kontrollzelllinie 3 (CT3) sowie zur zusammengefassten Kontrollgruppe (CTgs+) signifikant vermindert (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** ABCG1-Proteinexpression in Cholesterin beladenen Tangier-Fibroblasten

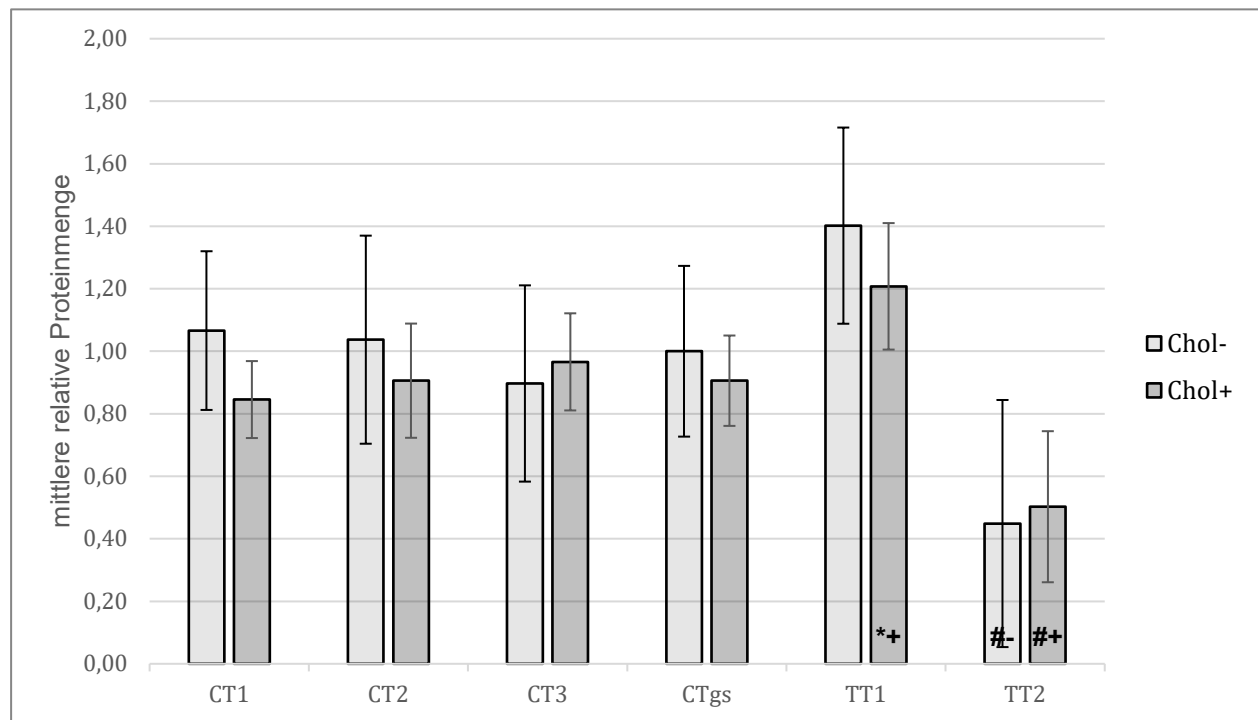
Mittlere relative Proteinkonzentration in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Relative Werte in Bezug zur Gesamtexpression (CTgs- = 100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar

\*+  $p < 0,05$  signifikant erhöhte Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu CTgs+

#+  $p < 0,05$  signifikant verminderte Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu CT3+ und CTgs+.

### Vergleich der ABCG1-Expression in unbehandelten Zellen versus mit Cholesterin beladenen Zellen

Die Proteinexpression von ABCG1 war in allen Zellenlinien (sowohl Kontroll- als auch Tangier-Zelllinien) im mit Cholesterin beladenen Zustand im Vergleich zum unbehandelten Zustand nicht signifikant erhöht (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10:** ABCG1-Proteinexpression in unbehandelten (Chol-) und mit Cholesterin (Chol+) beladenen Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2)

Mittlere relative Proteinkonzentration in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Relative Werte in Bezug zur Gesamtexpression (CTgs- = 100 %). Die Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar.

#-  $p < 0,05$ , signifikant verminderte Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu CTgs-.

\*+  $p < 0,05$ , signifikant erhöhte Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu CTgs+

#+  $p < 0,05$ , signifikant verminderte Proteinexpression von ABCG1 im Vergleich zu CT3+ und CTgs+.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Untersuchungen daraufhin, dass die ABCA1- und ABCG1-Expression in Tangier-Typ 1 Zellen erhöht war.

In Tangier-Typ 2 Zellen war dagegen keine ABCA1-Expression auf Proteinebene nachweisbar. Darüber hinaus kam es in Tangier-Typ 2 Zellen vermutlich zu einer verminderten ABCG1-Expression.



## 4 Diskussion

### 4.1 Methodisches Vorgehen

In der vorliegenden Arbeit wurde die ABCA1- und ABCG1-Expression auf Proteinebene mittels Western-Blot untersucht. Der Western-Blot ist eine etablierte Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinen. Die Bestimmung der relativen Proteinmenge erfolgte über die Messung der Fläche und Intensität der Banden (84).

Die Versuchsreihen zum Nachweis der ABCA1- und ABCG1-Expression beinhalteten jeweils drei Western-Blots von unbehandelten und mit Cholesterin beladenen Zellen. Es wurden drei verschiedene Zelllysate aufgetragen. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung (siehe Kapitel 2.2.4). Die Ergebnisse der Western-Blots erwiesen sich als reproduzierbar, so dass Schlussfolgerungen bezüglich der ABCA1- und ABCG1-Expression möglich waren. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings die geringe Stichprobengröße (drei Parallelversuche) beachtet werden. Da aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht von einer Varianzgleichheit ausgegangen werden kann, kann diskutiert werden, ob es sinnvoller gewesen wäre die Signifikanzberechnung mit dem Welch-Test (zweiseitig; heteroskedastisch) statt dem t-Test (zweiseitig; homoskedastisch) durchzuführen.

### 4.2 Cholesterin-Homöostase in Tangier-Fibroblasten

Um die Ergebnisse dieser Arbeit in den Kontext der Cholesterin-Homöostase in Tangier-Fibroblasten einzuordnen, werden zunächst die bekannten Regulationsmechanismen des zellulären Cholesterin-Stoffwechsels in Tangier-Fibroblasten besprochen.

In früheren Untersuchungen wurden die Cholesterin- sowie die Oxysterol-Konzentrationen in Kontroll- und Tangier-Fibroblasten bestimmt (siehe Tabelle 8). Es zeigte sich, dass Zellen mit einer Punktmutation und einer geringen ABCA1-Restaktivität (Tangier-Zelltyp 1) nur einen moderaten Anstieg der Oxysterole aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen mit einer Nonsense-Mutation (Tangier-Zelltyp 2) einen extremen Anstieg von Oxysterolen. Die Cholesterin-Konzentration war in beiden Zelltypen vergleichbar (88). Damit scheinen differente Oxysterol-Konzentrationen der entscheidende Unterschied zwischen Tangier-Typ 1- und Tangier-Typ 2-Zellen zu sein. Aus den Befunden lässt sich ableiten, dass Oxysterole eine essentielle Rolle bei der Regulation der Cholesterin-Homöostase und für potentielle protektive Mechanismen spielen. Die erhöhte Oxysterol-Konzentration könnte auch den klinischen

Unterschied (Schweregrad der Arteriosklerose) zwischen Tangier 1 und Tangier 2 erklären, da Oxysterole atherogen wirken. (88).

**Tabelle 8:** Hydroxysterol-Konzentrationen in Tangier-Serum (88)

	24-Hydroxy- Cholesterol [ng/ml]	25-Hydroxy- Cholesterol [ng/ml]	27-Hydroxy- Cholesterol [ng/ml]
Con	64 ± 20	3.0 ± 2.0	135 ± 46
Tangier 1	55 ± 6.0	5.0 ± 2.0	185 ± 16
Tangier 2	546 ± 61 **	124 ± 19 **	1473 ± 225 **

\*\* P<0.01; TT vs. Con

Con: Kontrolle, Cholesterol (Cholesterin)

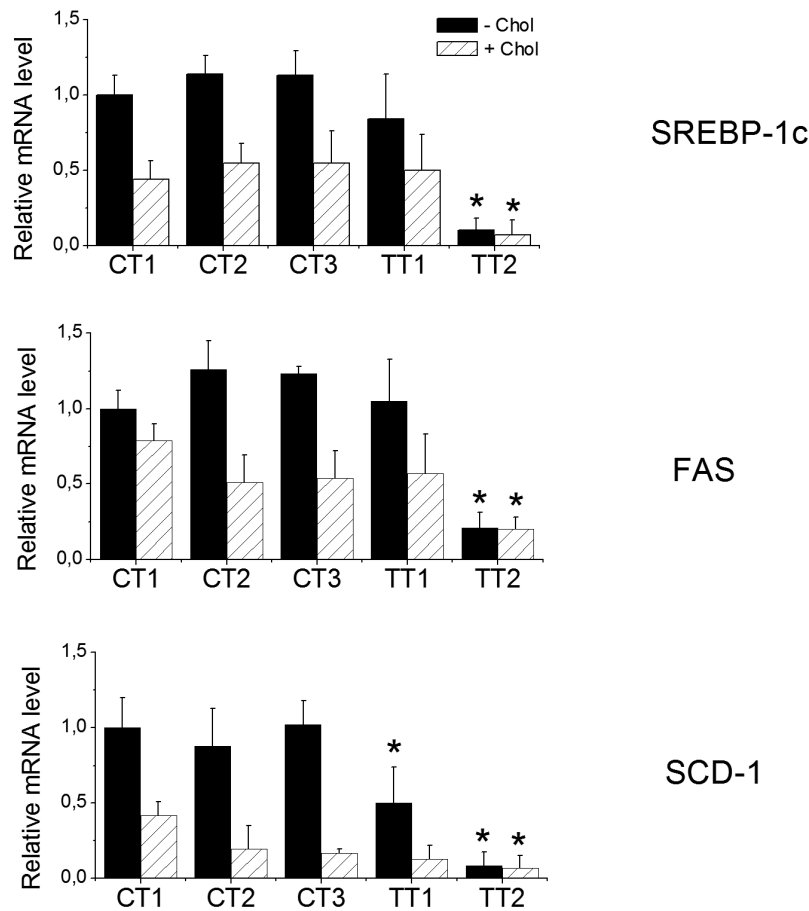
Ein durch die Oxysterole induzierbarer, potentiell protektiver Effekt ist die Suppression der Cholesterin-Biosynthese. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.1) kommt es beim Fehlen von Oxysterolen zu einer SREBP-2 induzierten Transkription von Genen (z. B. LDL-Rezeptor und die HMG-CoA Reduktase), die für die Cholesterin-Biosynthese notwendig sind (2).

Untersuchungen belegen, dass die Cholesterin-Biosynthese in Tangier-Typ 1 Zellen nur geringfügig, hingegen in Tangier-Typ 2 Zellen deutlich reduziert ist (88). Gleichzeitig stehen in Tangier-Typ 2 Zellen aufgrund des erhöhten Oxysterol-Aufkommens weniger SREBP-2-Spaltprodukte als Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung der Gene der Cholesterin-Biosynthese zur Verfügung (88).

An einem weiteren potentiell protektiven Mechanismus vor der Cholesterin-Toxizität ist SREBP1c beteiligt. SREBP1c erhöht über eine vermehrte Expression der Fettsäure-Synthase (FAS) und der Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) die Synthese von Fettsäuren. Auf diese Weise werden freie Oxysterole gebunden und die Zelle vor der Cholesterin-Toxizität geschützt. Der Regulationsmechanismus von SREBP1c ist bislang noch nicht vollständig verstanden. Es ist beschrieben, dass die Expression von SREBP1c durch Oxysterole über den oben beschriebenen LXR/RXR-Mechanismus aktiviert wird (89, 90). Allerdings wurde in Fibroblasten nach Beladung mit Cholesterin eine Reduktion der mRNA-Expression von SREBP1c beobachtet (91, 92). Diese Befunde deuten auf einen zusätzlichen, LXR-unabhängigen Regulationsmechanismus hin.



Untersuchungen belegen, dass die Expression von SREBP-1c sowie von downstream-Genen in Tangier-Typ 1 Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen keine signifikante Veränderung aufweist. Hingegen kommt es in Tangier-Typ 2 Zellen zu einer starken Suppression dieser Gene (siehe Abbildung 11) (88).



**Abbildung 11:** mRNA-Expression von Sterol response element-binding protein 1c (SREBP-1c), der Fettsäure-Synthase (FAS) und Stearyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) in Kontroll- (CT1–CT3) und Tangier-Fibroblasten (TT1, TT2) (88)  
-Chol: unbeladene Zellen +Chol: mit Cholesterin beladene Zellen, \*  $p < 0,05$ , signifikant verminderte mRNA-Expression von SREBP-1c, FAS, SCD-1

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hohe Konzentration von Oxysterolen in Zellen mit einer Nonsense-Mutation (Tangier-Typ 2 Zellen) eine starke Suppression der Cholesterin-Biosynthese bewirkt. Zudem lässt die aktuelle Datenlage vermuten, dass eine erhöhte Oxysterol-Konzentration den potentiell protektiven SREBP1c-Mechanismus inhibiert. Diese Inhibition scheint LXR/RXR-unabhängig zu sein.

### 4.3 Expression von ABCA1- und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten

ABCA1 und ABCG1 spielen eine wichtige Rolle beim Cholesterin-Efflux und sind für die Bildung von HDL und den reversen Cholesterin-Transport unverzichtbar (32, 37).

Tangier-Typ 1 Zellen zeigten eine erhöhte ABCA1-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen auf mRNA- und Proteinebene (siehe Abbildung 1 und 3). Diese Expressionssteigerung trat sowohl in unbehandelten Zellen als auch in Cholesterin-beladenen Zellen auf. Dagegen war die ABCG1-Expression in Tangier-Typ 1 Zellen auf mRNA-Ebene lediglich unter einer Cholesterin-Beladung signifikant erhöht. Auf Proteinebene zeigte die ABCG1-Expression in Tangier-Typ 1 Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen in nicht-beladenem Zustand ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. In Cholesterin-beladenen Zellen traten teilweise signifikante Steigerungen auf. Trotz der fehlenden Signifikanz war in den grafischen Darstellungen (siehe Abbildung 8 und 9) aber eine ABCG1-Expressionssteigerung erkennbar.

Tangier-Typ 2 Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine verminderte ABCA1-Expression auf mRNA- und Proteinebene (siehe Abbildung 1 und 3). Diese Expressionsabnahme trat sowohl in unbehandelten Zellen als auch in Cholesterin-beladenen Zellen auf. Die ABCG1-Expression war in Tangier-Typ 2 Zellen auf mRNA- und Proteinebene unabhängig von der Beladung mit Cholesterin signifikant geringer.

Zusammenfassend war in Tangier-Typ 1 Zellen eine erhöhte und in Tangier-Typ 2 Zellen eine verminderte Expression beider ABC-Transporter zu beobachten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass die erhöhte Expression beider ABC-Transporter in Tangier-Typ 1 Zellen den Defekt im ABCA1-Protein (funktionelle Einschränkung durch eine Punktmutation) teilweise ausgleicht und den Cholesterin-Efflux aufrecht erhält. Dieser Mechanismus verhindert zumindest teilweise eine Cholesterin-Anreicherung und trägt vermutlich zum milden Phänotyp (geringere Arteriosklerose) bei. Zusammenfassend scheint sich eine erhöhte ABCA1- und ABCG1-Expression durch eine Steigerung des Cholesterin-Efflux positiv auf die Entwicklung von Arteriosklerose und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse auszuwirken.

### 4.4 Regulation von ABCA1- und ABCG1 in Tangier-Fibroblasten

Ein bekannter Mechanismus der Regulation der ABCA1- und ABCG1-Expression beinhaltet die Transkriptionsfaktorenkomplex LXR/RXR. Der durch Oxysterole aktivierte LXR bildet mit dem

9-cis-RA beladenen RXR ein Heterodimer, das die Transkription der ABCA1- und ABCG1-Gene aktiviert (52-58).

Bei Tangier-Typ 1 Fibroblasten erhöhte sich auf mRNA-Ebene die ABCA1- und ABCG1-Expression bei Beladung der Zellen mit Cholesterin. Auf Proteinebene ließ sich dieser Effekt nicht eindeutig bestätigen. Diese Befunde lassen vermuten, dass die Oxysterol-Konzentration die Expression der beiden ABC-Transporter modulieren kann. Der Effekt der Beladung mit Cholesterin in Tangier-Typ 1 Zellen lässt sich durch den LXR/RXR-Signalweg erklären. Eine erhöhte Cholesterin-Konzentration in der Zelle steigert die Oxysterol-Synthese. Oxysterole aktivieren den LXR, wodurch die Transkription der ABCA1- und ABCG1-Gene gefördert wird (52-58).

Bei Tangier-Typ 2 Fibroblasten widersprachen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen dem Wissen über die Regulation der ABCA1- und ABCG1-Expression durch den LXR/RXR-Signalweg. Aufgrund der Aktivierung des LXR durch Oxysterole und der anschließenden Steigerung der Expression der beiden ABC-Transporter (52-58) wäre bei einer beschriebenen erhöhten Oxysterol-Konzentration in Tangier-Typ 2 Zellen eine ABCA1- und ABCG1-Expressionssteigerung zu erwarten gewesen (88).

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten aber im Gegenteil eine Suppression der Expression von ABCA1 und ABCG1 in Tangier-Typ 2 Zellen. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass in Abhängigkeit vom molekularen Defekt regulatorische Unterschiede bei Tangier-Zellreihen bestehen. In Tangier-Typ 2 Zellen sind somit mindestens zwei protektive Effekte nicht oder nur eingeschränkt wirksam: Zum einen funktioniert der Schutzmechanismus vor der Cholesterin-Toxizität über SREBP 1c nur begrenzt (88). Zum anderen kommt es durch die verminderte ABCA1- und ABCG1-Expression vermutlich zu einem stark reduzierten Cholesterin-Efflux. Die beobachtete deutlich reduzierte Cholesterin-Biosynthese in Tangier-Typ 2 Zellen (88) kann offenbar die beiden fehlenden protektiven Mechanismen nicht ausgleichen.

Aufgrund der komplexen nicht vollständig erforschten Transkriptionsregulation scheint eine parallele Aktivierung aller protektiven Signalwege nicht möglich. Möglicherweise spielt in diesem Kontext die Konzentration der Oxysterole eine entscheidende Rolle. Beim Überschreiten eines gewissen Konzentrationsniveaus scheinen wichtige protektive Signalwege nicht mehr aktiviert zu werden, wodurch es zur Entwicklung eines Phänotyps mit frühzeitig schwerer Arteriosklerose kommt (88).

Neben der bekannten Regulation (über LXR) scheint es auf Transkriptionsebene weitere Regulationsmöglichkeiten zu geben, die möglicherweise ebenfalls von der Oxysterol-Konzentration abhängen. Zur Abklärung sind weitere Untersuchungen erforderlich. Extrem hohe und moderat erhöhte Oxysterol-Konzentrationen könnten differente Effekte haben. Dabei spielen möglicherweise die Promotorbereiche der ABCA1-, ABCG1- und SREBP1c-Gene eine Rolle.

Derzeit ist die komplexe Regulation der Expression der ABC-Transporter noch nicht vollständig verstanden. Vermutlich führen stark erhöhte Oxysterol-Konzentrationen zu einer verminderten ABCA1- und ABCG1-Expression, zu einer Inhibition des SREBP1c-Signalwegs und zu einer eingeschränkten Cholesterin-Biosynthese. Dieser Regulationsmechanismus scheint unabhängig vom LXR/RXR-Signalweg zu sein.

#### **4.5 Relevanz der Ergebnisse für Modelle zur HDL-Formation**

Eine niedrige Konzentration von HDL-C im Plasma begünstigt das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (20, 21, 22, 23, 25). Umgekehrt schützt eine hohe HDL-C-Plasmakonzentration vor solchen Erkrankungen (20, 21, 22, 23, 25). Daher ist die Aufklärung der Schritte der HDL-Bildung und der beteiligten Transporter auch klinisch von großem Interesse.

In Tangier-Typ 1 Zellen besitzt ABCA1 aufgrund der beschriebenen Punktmutation eine geringe Restaktivität (82). Parallel dazu zeigen, wie die vorliegende Untersuchung belegt, Tangier-Typ 1 Zellen eine vermehrte Expression beider ABC-Transporter. Möglicherweise kann insbesondere die vermehrte ABCG1-Expression die eingeschränkte ABCA1-Funktion teilweise ausgleichen, so dass es zu einer weniger deutlichen Einschränkung des Cholesterin-Efflux, der HDL-Bildung und des reversen Cholesterin-Transports in betroffenen Patienten kommt. Zusammen mit den oben beschriebenen protektiven Mechanismen wäre dies eine mögliche Erklärung für den milderen Phänotyp (geringe Arteriosklerose-Entwicklung) der betroffenen Patienten.

Weiterhin unterstützen die vorliegenden Ergebnisse die Annahme, dass ABCA1 und ABCG1 koordiniert reguliert werden. Tangier-Typ 1 Zellen zeigen eine vermehrte Expression beider ABC-Transporter, während in Tangier-Typ 2 Zellen eine verminderte Expression beider ABC-Transporter beobachtet wird. Dieser Befund könnte auf einen synergistischen Effekt beider Transporter hindeuten. Ein solcher synergistischer Effekt wurde bereits in der Literatur beschrieben (93). ABCA1 vermittelt den Cholesterin-Efflux zum lipidarmen Apo-A1, wodurch das lipidreiche, kugelförmige HDL gebildet wird. Dieses kugelförmige HDL ist wiederum das Ziel des durch ABCG1 vermittelten Cholesterin-Transports, wodurch es zu einer weiteren

Lipidaufnahme in das HDL kommt (32, 37, 92). Das HDL-C wird entweder direkt zur Leber transportiert oder auf andere Lipoproteine übertragen (32).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass ABCA1 und ABCG1 eine essentielle Rolle bei der Bildung von HDL spielen. Bei der Beladung von HDL mit Cholesterin scheint eine synergistische Arbeitsweise beider ABC-Transporter wahrscheinlich, so dass auch eine koordinierte Regulation sinnvoll erscheint. Inwieweit einer der beiden Transporter einen Funktionsverlust des anderen ausgleichen kann, ist noch nicht vollständig verstanden.

#### **4.6 Ausblick**

Eine Stärkung des reversen Cholesterin-Transports über eine erhöhte Expression der ABC-Transporter ist eine vielversprechende Alternative zu den aktuellen Therapieoptionen von Dyslipidämien. Derzeitige Therapien basieren auf der Reduktion der Cholesterin-Biosynthese durch Statine, der Hemmung der intestinalen Cholesterin-Resorption durch Ezetimib, der Aktivitätssteigerung der Lipoprotein-Lipase durch Fibrate und der Regulation der LDL-Cholesterin-Spiegel durch den Proprotein-Convertase-Subtilisin/Kexin-9-(PCSK9-)Hemmer Evolocumab (94).

Medikamente, die den reversen Cholesterin-Transport aktivieren, könnten nicht nur in der Behandlung von schweren HDL-Defiziten, wie der Tangier Krankheit, eingesetzt werden, sondern wären auch zur Behandlung anderer HDL-Mangelformen geeignet.



## 5 Literaturverzeichnis

- (1) Dtsch Arztebl 2005; 102: A 516–519 [Heft 8], (Abgerufen 30.07.2020) <https://www.aerzteblatt.de/archiv/45608/Neu-entschlueselte-Mechanismen-der-Cholesterinhomoeostase>
- (2) Tarling EJ, Edwards PA (2012). Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.*, 386-95.
- (3) Goldstein JL, Brown MS, Anderson RGW, Russell DW (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1, 1-39
- (4) Stephen SL, Freestone K, Dunn S, Twigg MW, Homer-Vanniasinkam S, Walker HJ, Wheatcroft SB, Ponnambalam S (2010). Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int. J. Hypertens.*, 2010.
- (5) Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M (2010). Scavenger receptors and their potential as therapeutic targets in the treatment of cardiovascular disease. *Int. J. Hypertens.*, 2010.
- (6) Vaughan AM, Oram JF (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47, 2433–2443.
- (7) Cavelier C, Lorenzi I, Roherer L, van Eckhardstein A (2006). Lipid efflux by ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Bio. Lipids* 1761, 655-666.
- (8) Wang J, Zhang D, Lei Y, Xu F, Cohen JC, Hobbs HH, Xie XS (2008). Purification and reconstitution of sterol transfer by native mouse ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* 8, 5194–5204.
- (9) Betters JL, Yu L (2010). NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett.* 584, 2740–2747.
- (10) Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russel DW (2007). Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 5, 73-79.
- (11) Radhkrishnan A, Goldstein JL, Mc Donald JG, Brown MS (2008). Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER holesterol: a delicate balance. *Cell Metab.* 8, 512-521.
- (12) Radhkrishnan A, Ikeda Y, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL (2004). Direct binding of cholesterol to purified membrane region SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol. Cell* 15, 259-268.
- (13) Brown MS, Goldstein JL (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer’s bottle to Scap’s MELADL. *J. Lipid Res.* 50, 15-27.

- (14) Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, Leclercq IA, MacDougall OA, Bommer GT (2010). Expression of miR-33 from SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J. Biol. Chem.* 285, 33652-33661.
- (15) Horie T, Ono K, Horiguchi M, Nishi H, Nakamura T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Marusawa H, Iwanaga Y, Hasegawa K, Yokode M, Kimura T, Kita T (2010). MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) regulates HDL in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 17321-17326.
- (16) Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán A (2010). miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12228-12232.
- (17) Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Näär AM (2010). MicroRNA-33 and SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 328, 1566–1569.
- (18) Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 328, 1570.1573.
- (19) Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozcürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* 22, 347-351.
- (20) Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR (1977). High density lipoprotein as protective factor against coronary heart disease. *Am. J. Med.* 62, 965-968.
- (21) Jacobs Jr. DR, Mebane IL, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HA (1990). High density lipoprotein cholesterol as predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am. J. Epidemiol.*, 32-47.
- (22) Assmann G, Schulte H (1986). Prospective Cardiovascular Muenster Trail. *Pascienta Verlag, Heidelberg*.
- (23) Rubins HB, Robins SJ, Iwane MK, Boden WE, Elam MB, Fye CL, Gordon DJ, Schaefer EJ, Schectman G, Wittes JT. (1993). Rationale and design of the Department of Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trail (HIT) for secondary prevention of coronary artery disease in men with low high-density lipoprotein cholesterol and desirable low-density lipoprotein cholesterol. *Am. J. Cardiol.*, 45-52.
- (24) Castelli WP, Doyle JT, Gordon T, Hames CG, Hjortland MC, Hulley SB, Kagan A, Zukel WJ (1977). HDL cholesterol and other lipids in the coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. *Circulation* 55, 767-772.
- (25) Francis GA (2010). The complexity of HDL. *Biochim Biophys Acta.*, 1286-93.
- (26) Lewis GF, Rader DJ (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* 96, 1221–1232.



- (27) Nicholls SJ, Dusting GJ, Cutri B, Bao S, Drummond GR, Rye KA, Barter PJ (2005). Reconstituted high-density lipoproteins inhibit the acute pro-oxidant and proinflammatory vascular changes induced by a periarterial collar in normocholesterolemic rabbits. *Circulation* 111, 1543–1550.
- (28) Tang C, Liu Y, Kessler PS, Vaughan AM, Oram JF (2009). The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 284, 32333-32343.
- (29) Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* 7, 853-857.
- (30) Tso C, Martinic G, Fan WH, Rogers C, Rye KA, Barter PJ (2006). High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arteriosclero. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1144–1149.
- (31) Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S (1996). High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 13, 73-88.
- (32) Tosheska Trajkovska K, Topuzovska S (2017). High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol.*, 149-154.
- (33) Oram JF, Vaughan AM (2000). ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 11, 253–60.
- (34) Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42, 1007–17.
- (35) Jonas A (1991). Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1084, 205–20.
- (36) Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.* 271, 29427–35.
- (37) Li G, Gu HM, Zhang DW (2013). ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation *IUBMB Life.* 65(6), 505-12.
- (38) Singaraja RR, Van Eck M, Bissada N, Zimetti F, Collins HL, et al. (2006). Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation* 114, 1301– 1309.
- (39) Vaughan A.M, Oram JF (2003). ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. *J. Lipid Res.* 44, 1373– 1380.

- (40) Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, et al. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 282, 25123–25130.
- (41) Takahashi Y, Smith JD (1999). Cholesterol efflux to apolipoprotein A-I involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11358-11363.
- (42) Chen W, Sun Y, Welch C, Gorelik A, Leventhal AR, Tabas I, Tall AR (2001). Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J. Biol. Chem.* 276, 43564–43569.
- (43) Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 4 336-345.
- (44) Baldan A, Tarr P, Vales CS, Frank J, Shimotake TK, Hawgood S, Edwards PA (2006). Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidoses. *J. Biol. Chem.* 281, 29401-29410.
- (45) Tarr PT, Edwards PA (2008). ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2.. *J Lipid Res.* 49, 169-182.
- (46) Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest.* 117, 2216–2224.
- (47) Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 534-540
- (48) Sankaranarayanan S, Oram JF, Asztalos BF, Vaughan AM, Lund-Katz S, Adorni MP, Phillips MC, Rothblat GH (2009). Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J. Lipid. Res.* 50, 275-284.
- (49) Vaughan AM, Oram JF (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 280, 30150–30157.
- (50) Tarling EJ, Edwards PA (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19719-19724.
- (51) Sturek JM, Castle JD, Trace AP, Page LC, Castle AM, Evans-Molina C, Parks JS, Mirmira RG, Hedrick CC (2010). An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J. Clin. Invest.* 120, 2575–2589.

- (52) Schmitz G, Langmann T (2005). Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta*, 1735(1), 1-19.
- (53) Klucken J, Büchler C, Orsó E, Kaminski WE, Porsch-Ozcürümez M, Liebisch G, Kapinsky M, Diederich W, Drobnik W, Dean M, Allikmets R, Schmitz G (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 817-822.
- (54) Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 29-33.
- (55) Song C, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S (1994). Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10809-10813.
- (56) Edwards PA, Kast HR, Anisfeld AM (2002). BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J. Lipid. Res.* 43, 2-12.
- (57) Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes. Dev.* 9, 1033-1045.
- (58) Ory DS (2004). Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? *Circ. Res.* 95, 660-670.
- (59) Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 28240-28245.
- (60) Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA (2001). Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J. Biol. Chem.* 276, 39438-30447.
- (61) Koldamova RP, Lefterov IM, Ikonomovic MD, Skoko J, Lefterov PI, Isanski BA, DeKosky ST, Lazo JS (2003). 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J. Biol. Chem.* 278, 13244-13256.
- (62) Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ (2002). LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in CaCo-2 cells. *J. Lipid. Res.* 43, 1054-1064.
- (63) Schwartz K, Lawn RM, Wade DP (2000). ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 794-802.
- (64) Mascres B, Ghyselinck NB, Watanabe M, Annicotte JS, Chambon P, Auwerx J, Mark M (2004). Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep.* 3, 285-290.

- (65) Brown AJ, Watts GF, Burnett JR, Dean RT, Jessup W (2000). Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *J. Bio. Chem.* 275, 27627-27633
- (66) Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free. Radic. Biol. Med.* 13, 341-390.
- (67) Witztum JL, Steinberg D (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88, 1785-1792.
- (68) Giguere V (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr. Rev.* 15, 61-79.
- (69) Allenby G, Bocquel MT, Saunders M, Kazmer S, Speck J, Rosenberger M, Lovey A, Kastner P, Grippo JF, Chambon P (1993). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 30-4.
- (70) Langmann T, Liebisch G, Moehle C, Schifferer R, Dayoub R, Heiduczek S, Grandl M, Dada A, Schmitz G (2005). Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochim. Biophys. Acta.* 1740, 155-161.
- (71) Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart JC, Glineur C, Staels B (2002). Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 717-726.
- (72) Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell.* 7, 161-171.
- (72) Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49, 497-505.
- (73) Wang Y, Oram JF (2002). Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Biol. Chem.* 277, 5692-5697.
- (74) Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR (2003). Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. *J. Lipid. Res.* 44, 1728-1736.
- (75) Wang Y, Oram JF (2002). Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. *J. Biol. Chem.* 277, 5692-5697.
- (76) Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS (2001). Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 98, 6027-6032.

- (77) Hansson GK, (2003). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1876–1890.
- (78) Glass CK, Witztum JL (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 104, 503-516.
- (79) Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR (2003). Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. *J. Lipid. Res.* 44, 1728–1736.
- (80) Paunosis CG, Zuckerman SH (2000). Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1565–1571.
- (81) Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, Sampietro T (2012). Tangier Disease Epidemiology, Pathophysiology, and Management. *Am J Cardiovasc Drugs.* 12(5), 303-11.
- (82) Walter M, Kerber S, Fechtrup C, Seedorf U, Breithardt G, Assmann G (1994). Characterization of atherosclerosis in a patient with familial high-density lipoprotein deficiency. *Atherosclerosis.* 110(2), 203-8.
- (83) Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* (4), 352-5.
- (84) Jensen EC (2012). The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken).* 295(3), 369-71.
- (85) Rueden, C., Dietz, C., Horn, M., Schindelin, J., Northan, B., Berthold, M. & Eliceiri, K. (2016). ImageJ Ops [Software]. <https://imagej.net/Ops>.
- (86) R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- (87) Unveröffentliche Daten aus der AG Walter, mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Michael Walter
- (88) Kannenberg F, Gorzelniak K, Jäger K, Fobker M, Rust S, Repa J, Roth M, Björkhem I, Walter M (2013). Characterization of Cholesterol Homeostasis in Telomerase-immortalized Tangier Disease Fibroblasts Reveals Marked Phenotype Variability. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 36936-369447.
- (89) Repa JJ, Liang G., Ou J, Bashmakov Y, Loaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf, DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14(22), 2819–2830.
- (90) Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 14(22), 2831-2838.
- (91) Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG (2001) 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J Biol Chem* 276(42), 38378-38387.

- 
- (92) Niehaus J (2006). Untersuchungen zur Cholesterin-Homöostase in Telomerase-immortalisierten Tangier-Fibroblasten. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.
- (93) Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab. 1*, 121–131.
- (94) ESC/EAS Pocket Guidelines zur Diagnostik und Therapie von Dyslipidämien, Version 2016, abgerufen am 16.08.2020, [https://leitlinien.dgk.org/files/Dyslip\\_Netzseite\\_DGK\\_neu.pdf](https://leitlinien.dgk.org/files/Dyslip_Netzseite_DGK_neu.pdf)

## 6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nina Brüggmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zum ABCA1-/ABCG1-vermittelten Cholesterin-Efflux in humanen Kontroll- und Tangier-Fibroblasten/ Investigations on ABCA1-/ABCG1-mediated cholesterol efflux in human control and Tangier fibroblasts 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

---

Datum

Unterschrift





## **7 Lebenslauf**

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



## 8 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Michael Walter angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Walter für die Vergabe des interessanten Themas und die stetige Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation. Für meine Anliegen hatte er stets ein offenes Ohr. Insbesondere danke ich ihm für die Zurverfügungstellung der Daten bezüglich der mRNA-Expression in Tangier-Fibroblasten.

Brigitte Köttgen danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Mit ihrer Erfahrung und Kompetenz stand sie mir stets im Laboralltag zur Seite.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für die Aufnahme in das Team, das gute Arbeitsklima sowie die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein großer Dank gilt auch meiner Familie, die mich stets motiviert und aufgebaut haben. Ganz besonders danke ich meinem Vater für die wertvollen Ratschläge und das Korrekturlesen dieser Arbeit, meinem Ehemann und meiner Schwester für die Einführung in die Programme R und Excel und meiner Mutter für die Betreuung meiner Tochter während des Schreibens.