

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Expression und Regulation
der ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1
in Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progerie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Esmira Bakhshaliyeva
aus Baku, Aserbaidshan

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung.....	VIII
Abstract	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Atherosklerose	1
1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose	1
1.1.2 Struktur normaler Arterien	2
1.1.3 Atherosklerotische Plaques	2
1.2 Cholesterin-Metabolismus.....	5
1.2.1 Zelluläre Cholesterinhomöostase	5
1.2.2 Reverser Cholesterintransport	8
1.2.3 Die Rolle der ABC-Transporter A1 und G1 beim reversen Cholesterintransport.....	9
1.2.4 Die Rolle von MicroRNAs beim Cholesterinmetabolismus	12
1.3 HDL als protektiver Faktor bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen	13
1.4 Alterungsabhängige Krankheiten	15
1.4.1 Zelluläre Seneszenz und Krankheiten mit vorzeitiger Alterung	16
1.4.2 Das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom als Beispiel einer Krankheit mit vorzeitiger Alterung	18
2 Ziele dieser Doktorarbeit.....	21
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Chemikalien, Lösungen und Kits.....	23
3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	25
3.3 Zelllinien und Kulturbedingungen	28
3.3.1 Immortalisierung der Zellen	29
3.3.2 Auftauen der Zellen	29
3.3.3 Einfrieren der Zellen	30
3.3.4 Zellkultur.....	30
3.4 Ernten der Zellen	33
3.5 Biochemische Methoden	34
3.5.1 Protein-Extraktion	34
3.5.2 BCA-Protein-Assay.....	34
3.5.3 Gelelektrophorese.....	36
3.5.4 Western Blot (Nassblot)	37
3.5.5 Immunologischer Proteinnachweis.....	37
3.5.6 Strippen der PVDF-Membran.....	38
3.6 Molekularbiologische Methoden: Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction.....	39
3.6.1 Isolierung der RNA	39
3.6.2 Messung der RNA-Konzentration.....	39
3.7 Auswertung und Statistik.....	41
4 Ergebnisse.....	42

4.1	Expression der ABC-Transporter A1 und G1 auf mRNA-Ebene	43
4.1.1	ABCA1-Expression auf mRNA-Ebene	43
4.1.2	ABCG1-Expression auf mRNA-Ebene	45
4.2	Expression der ABC-Transporter A1 und G1 auf Proteinebene	47
4.2.1	ABCA1-Expression auf Proteinebene.....	48
4.2.2	ABCG1-Expression auf Proteinebene	50
5	Diskussion	52
5.1	Diskussion der Methodik	52
5.2	Atherosklerose bei HGPS-Patienten und im physiologischen Alter	53
5.3	Expression von ABCA1 und ABCG1 in Kontroll- und HGP-Fibroblasten	55
5.4	Mögliche Rolle eines Telomer-Positions-Effektes (TPE-OLD).....	57
5.5	Ausblick	58
6	Literaturverzeichnis	59
	Eidesstattliche Versicherung.....	71
	Lebenslauf.....	72
	Danksagung.....	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung der Entwicklung von Atherosklerose (19)	4
Abbildung 2. Hauptbestandteile des Cholesterinstoffwechsels in einer polarisierten Zelle (20)	7
Abbildung 3. Mechanismen des Cholesterin-Effluxes aus der Zelle (modifiziert nach (53))	10
Abbildung 4. ABCA1- und ABCG1-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene in Fibroblasten von Patienten mit Tangier-Krankheit (166)	22
Abbildung 5. Arbeitsschema des Zellsplittens (T25: 25 cm ² ; T75: 75 cm ² ; T175: 175 cm ² , 10 cm P: 10-cm-Zellkulturschale)	32
Abbildung 6. Hautfibroblasten ohne Cholesterinbeladung (A) und Hautfibroblasten nach Cholesterinbeladung (B). Die schwarzen Punkte zeigen die von den Zellen aufgenommenen Cholesterinkristalle.	33
Abbildung 7. Proteinbestimmung der Standardreihe. Die Signalexktinction von Proben der Standardreihe steigt mit der Proteinkonzentration linear an.	35
Abbildung 8. Zusammenfassende Darstellung der ABCA1-mRNA-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (-,: Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+,: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- bzw. HGP-Fibroblasten; n.s.: nicht signifikant)	44
Abbildung 9. ABCA1-mRNA-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (-,: Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+,: Zellen mit Cholesterinbeladung; CON: primäre Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; */**/**: signifikanter Unterschied der cholesterinbeladenen Fibroblasten gegenüber den entsprechenden nicht cholesterinbeladenen Fibroblasten (*: p < 0,05; **: p < 0,01; *** oder ###: p < 0,001))	44
Abbildung 10. Zusammenfassende Darstellung der ABCG1-mRNA-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (-,: Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+,: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ***: p < 0,001)	46
Abbildung 11. ABCG1-mRNA-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (-,: Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+,: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; */**: signifikanter Unterschied der cholesterinbeladenen Fibroblasten gegenüber den nicht cholesterinbeladenen Fibroblasten (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ###: p < 0,001); n.s.: nicht signifikant)	46
Abbildung 12. Western-Blot-Bilder der ABCA1- und ABCG1-Protein-Expression aus drei unterschiedlichen Versuchen (CON: primäre Kontrollfibroblasten; CONT: hTERT-immortalisierte Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; HGPT:	

<i>hTERT-immortalisierte HGP-Fibroblasten; ,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung)</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 13. Zusammenfassende Darstellung der ABCA1-Protein-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten)</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 14. ABCA1-Protein-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ***: $p < 0,001$).....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 15. Zusammenfassende Darstellung der ABCG1-Protein-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; n.s.: nicht signifikant)</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 16. ABCG1-Protein-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; *: signifikanter Unterschied der cholesterinbeladenen Fibroblasten gegenüber den entsprechenden nicht cholesterinbeladenen Fibroblasten (* oder #: $p < 0,05$); n.s.: nicht signifikant)</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 17. Cholesterin-Efflux in Kontroll- und Progeriezellen (168)</i>	<i>55</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Chemikalien	24
Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Kits	24
Tabelle 3. Übersicht über die verwendete Software und die genutzte Internetseite	25
Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten Antikörper	25
Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 6. Übersicht über die Herstellung der Lösungen	28
Tabelle 7. Beschreibung der Kontrollzelllinien	28
Tabelle 8. Beschreibung der HGP-Zelllinien	29
Tabelle 9. Zugaben und deren Anteile im DMEM	30
Tabelle 10. Volumina des Nährmediums für den Mediumwechsel (T25: 25 cm ² ; T75: 75 cm ² ; T175: 175 cm ²)	30
Tabelle 11. Volumina von Lösungen für das Zellsplitten (T25: 25 cm ² ; T75: 75 cm ² ; T175: 175 cm ²)	31
Tabelle 12. Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe. Eine Ampulle enthält Albumin in einer Konzentration von 2 mg/ml. S1 bis S7 stellen die Verdünnungen der Standardreihe mit unterschiedlicher Albuminkonzentration dar	34
Tabelle 13. Proteinbestimmung der Proben	36
Tabelle 14. Zusammensetzung des 7,5%igen Trenngels und des 4,5%igen Sammelgels	37
Tabelle 15. Verdünnung der primären und sekundären Antikörper gegen ABCA1, ABCG1 und β -Aktin-Gene mit Blocking-Puffer	38
Tabelle 16. Zusammensetzung des DNase-Reaktionsgemisches für jede RNA-Isolierung	39
Tabelle 17. Zusammensetzung des Mastermix pro Reaktion für die cDNA-Synthese	40
Tabelle 18. Zusammensetzung des Mastermix für die Genexpressionsanalyse von ABCA1, ABCG1 und Cyclophilin	41
Tabelle 19. Temperaturprofil für die Genexpressionsanalyse von ABCA1, ABCG1 und Cyclophilin	41
Tabelle 20. mRNA-Expression von ABCA1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: primäre Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; CONT: hTERT-immortalisierte Kontrollfibroblasten; HGPT: hTERT-immortalisierte HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung)	43
Tabelle 21. mRNA-Expression von ABCG1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: primäre Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung)	45
Tabelle 22. Protein-Expression von ABCA1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit den entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: Kontrollfibroblasten; HGP: HGP-Fibroblasten; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung)	48

Tabelle 23. Protein-Expression von ABCG1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit den entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: Kontrollfibroblasten; HGP: HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten)50

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'-untranslatierte Region
ABCA1	<i>ATP-binding cassette transporter subfamily A member 1</i>
ABCG1/ABCG5/ABCG8	<i>ATP-binding cassette transporter subfamily G member 1/5/8</i>
ACAT1/ACAT2	Acyl-Coenzym A:Cholesterin-Acyltransferase Typ 1/Typ 2
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA Protein Assay	<i>bicinchoninic acid protein assay</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CE	Cholesterinester
CRP	C-reaktives Protein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDR	<i>DNA damage response</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC	freies Cholesterin
FKS	fetales Kälberserum
G	Glycin
H/S/C	Hepes/Sucrose/Complete
HDL	High-Density-Lipoprotein
HDL-C	HDL-Cholesterin
Hepes	2-Ethansulfonsäure
HGP	Hutchinson-Gilford-Progerie
HGPS	Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom

HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HSP	<i>heat shock protein</i>
hTERT	<i>human telomerase reverse transkriptase</i>
IgG	Immunglobulin G
Insig-1	<i>insulin-induced gene 1</i>
LAP2 α	<i>lamina-associated polypeptide 2α</i>
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LDLR	LDL-Rezeptor
LXR	<i>liver X receptor</i>
MDB	Membrane Desalting Buffer
miR-122	MicroRNA-122
miR-33	MicroRNA-33
miRNA	MicroRNA
MITF	<i>microphthalmia-associated transcription factor</i>
M-MLV RT	<i>M-MLV reverse transkriptase</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
OS	Oxysterol
p16	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p53	Tumorsupressor-Protein 53
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>population doubling</i>
PM	Proteinmarker
PP	Probenpuffer
pRB	Retinoblastom-Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RA3	<i>Wash Buffer RA3</i>
RAW2	<i>Wash Buffer RAW2</i>
RCT	reverser Cholesterintransport
rDNAse	<i>recombinant DNAse</i>
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
RXR	retinoid X receptor
SASP	Seneszenz-Assoziierter-Sekretorischer-Phänotyp
SA- β -Gal	<i>senescence-associated beta-galactosidase</i>
SCAP	<i>SREBP-cleavage-activating protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SM	Squalen-Monooxygenase
SR-BI	<i>scavenger receptor BI</i>
SRE	<i>sterol response element</i>
SREBP (SREBF)	<i>sterol regulatory element-binding protein/factor</i>
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
START	<i>StAR-related lipid transfer</i>
T175	Kulturflasche mit einer Fläche von 175 cm ²
T25	Kulturflasche mit einer Fläche von 25 cm ²
T75	Kulturflasche mit einer Fläche von 75 cm ²
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	<i>telomerase reverse transkriptase</i>
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TPE	<i>telomere position effect</i>
TPE-OLD	<i>TPE over long distances</i>
VLDL	Very-Low-Density-Lipoprotein

Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Folge einer Atherosklerose zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit und sind stark altersabhängig.

High-Density-Lipoprotein (HDL) ist ein Lipoprotein, das überschüssiges Cholesterin aus atherosklerotischen peripheren Zellen, u.a. auch aus an der Plaquebildung beteiligten Zellen zurück zur Leber transportieren kann. Dieser Transportmechanismus wird ‚reverser Cholesterintransport‘ genannt und gilt als einer von mehreren atheroprotektiven Effekten der HDL. Beim Cholesterin-Efflux aus den Zellen spielen unter anderem zwei ATP-binding cassette (ABC)-Transporter, ABCA1 und ABCG1, eine wichtige Rolle. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass ABCA1 Cholesterin und Phospholipide aus Zellen auf lipidfreies Apolipoprotein A-I (ApoA-I) transportiert, während ABCG1 vermutlich beim Cholesterintransport zu bereits lipidangereicherten HDL-Partikeln (HDL3 oder HDL2) beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurden ABCA1- und ABCG1 in Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS) auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. Patienten mit HGPS altern vorzeitig, entwickeln frühzeitig Atherosklerose einhergehend mit einem schweren HDL-Mangel und versterben zumeist an Komplikationen der Atherosklerose. Somit kann das HGPS als eine Modellkrankheit sowohl für den Alterungsprozess per se, als auch für stark altersabhängige Atherosklerose dienen. Die Zellen von Patienten mit HGPS weisen deutlich verkürzte Telomere auf und zeichnen sich durch eine beschleunigte und verstärkte zelluläre Seneszenz aus.

Die Expression von ABCA1 war in HGP-Fibroblasten im Vergleich zu Kontrollzellen supprimiert. Bei Expression des ABCG1-Gens zeigten die primären HGP-Fibroblasten eine verstärkte Induktion auf mRNA-Ebene, was auf eine kompensatorische Regulation hindeuten könnte. Auf Proteinebene waren jedoch mittels Western Blot keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Cholesterin induzierte die Expression sowohl von ABCA1 als auch ABCG1 in primären nicht immortalisierten Zellen.

Eine Suppression von ABCG1 auf mRNA-Ebene nach Telomerverlängerung mit Telomerase könnte auf einen durch eine defekte Telomerstruktur bei HGPS verursachte Störung hindeuten, was für Therapiekonzepte mit hTERT bedeutsam sein könnte. Die Untersuchung der zwei Gene, die beim reversen Cholesterintransport eine

wichtige Rolle spielen, ist wichtig, um den Cholesterintransport besser zu verstehen. Damit können in Zukunft Therapiemöglichkeiten entwickelt werden, die die Effektivität des Cholesterin-Effluxes aus Schaumzellen als Ziel haben und somit die atherosklerotische Plaquebildung verhindern bzw. verzögern können.

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and are more common with age. The uptake of lipoproteins and lipids by monocytes is at least in part compensated by high density lipoproteins (HDL).

HDL is a lipoprotein that may transport excess cholesterol from peripheral cells back to the liver. This so-called reverse cholesterol transport (RCT) is potentially atheroprotective. Two ATP-binding cassette (ABC) transporters, ABCA1 and ABCG1, play an important role in this process. ABCA1 shuttles cholesterol and phospholipids from cells to lipid-free apolipoprotein A-I (ApoA-I) in the extracellular compartment, while ABCG1 is probably involved in the efflux of cholesterol from cells to lipid-enriched HDL particles, HDL3 or HDL2.

ABCA1 and ABCG1 were investigated in fibroblasts of patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Patients with HGPS suffer from accelerated aging, develop premature atherosclerosis and have HDL deficiency. Patients die from complications of atherosclerosis. HGPS is a model for the aging process and plays an important role in the study of aging diseases, such as atherosclerosis. The disease is associated with accelerated telomere attrition and enhanced cellular senescence.

Expression of ABCA1 was suppressed in primary HGPS fibroblasts in comparison to control cells. ABCG1 expression was upregulated on mRNA level as possible compensatory mechanism. Cholesterol induced the expression of ABCA1 and ABCG1 mRNA in primary cell lines. By contrast, ABCG1 mRNA was rather suppressed in hTERT immortalized HGPS cells, suggesting a potentially detrimental effect by immortalization procedures.

ABCA1 and ABCG1 play an essential role in RCT. It is therefore important to a better understanding of cholesterol metabolism. This research may lead to the development of therapeutic options in HGPS and in aging per se, that improve the effectiveness of the cholesterol efflux.

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Die absolute Zahl der kardiovaskulären Todesfälle hat aufgrund des Bevölkerungsalterns sowie relevanter Änderungen des Lebensstils und des Lebensmittelsystems zugenommen (1). Obwohl die kardiovaskuläre Mortalitätsrate von 1990 bis 2010 weltweit zurückging (1), sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen weiterhin die häufigste Todesursache, wobei der Hauptfaktor dieser Krankheiten die Atherosklerose der Gefäße bleibt (2). Es gibt heute genügend experimentelle und klinische Beweise dafür, dass Atherosklerose eine chronische, entzündliche Krankheit ist, bei der sich die Arterienwand infolge der Ansammlung von Cholesterin, Makrophagen und glatten Muskelzellen verdickt. Studien haben gezeigt, dass sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem Atherosklerose beschleunigen, aber auch eindämmen können (3). Bei dieser multifaktoriellen und komplexen Krankheit beeinträchtigt die Bildung einer atherosklerotischen Plaque in der Gefäßwand mittelgroßer oder großer elastischer oder muskulärer Arterien die arterielle Funktion (4). Dabei führt der chronische Aufbau von Plaques in der subendothelialen Intimaschicht der Arterien zu einer signifikanten Stenose der Gefäße, die den Blutfluss beeinträchtigt und eine kritische Gewebehypoxie verursacht (5).

1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Homöostase im kardiovaskulären System wird durch verschiedene interagierende genetische und epigenetische Prozesse aufrechterhalten (6). Das Fehlen dieser Homöostase führt zur Entstehung komplexer Krankheitsprozesse wie Atherosklerose und ihrer lebensbedrohlichen Komplikationen. Atherosklerose entwickelt sich beginnend im frühen Jugendalter im Laufe von mehr als 50 Jahren (7). Wichtigste klinische Manifestationen der Atherosklerose sind ischämische Herzkrankheiten, der ischämische Schlaganfall und periphere arterielle Erkrankungen (8). Die häufigsten Komplikationen (Myokardinfarkt und Schlaganfall) werden durch spontane thrombotische Gefäßverschlüsse verursacht (8).

Bei der Atherosklerose wird die Funktion und Struktur aller drei Schichten der Arterienwand beeinflusst (9). Das Gefäßendothel ist ein wichtiger Ort für kritische regulatorische Prozesse (6). Ein intaktes Endothel ist die innere Zellauskleidung des Herz-Kreislauf-Systems und als ‚natürlicher Blutbehälter‘ bedeutsam für die Funktion der verschiedenen Gewebe und Organe des Körpers (10). Eine Dysfunktion der endothelialen Zellen ist einer der ersten Schritte der Entstehung von Atherosklerose (9).

1.1.2 Struktur normaler Arterien

Die Arterienwand besteht bei Säugetieren aus drei histologischen Schichten. Die Intima oder Tunica intima ist die innerste Schicht und setzt sich aus langen, flachen Endothelzellen, die sich an der Längsachse des Gefäßes orientieren, einer subendothelialen Bindegewebsschicht sowie einer extrazellulären Matrix (ECM) zusammen (11, 12). Die zweite Schicht, die Tunica media, enthält hauptsächlich glatte Muskelzellen sowie ECM-Komponenten wie Elastin, Kollagen und Proteoglykane (11). Die Dicke der Tunica media korreliert mit dem Durchmesser der Arterien. Die äußerste Schicht der Arterie ist die Adventitia (auch ‚Tunica adventitia‘) und besteht aus Fibroblasten und einem lockeren Bindegewebe, in dem sich die eigenen Gefäße (Vasa vasorum) befinden. Normalerweise werden die Intima und das innere Drittel der Media durch Diffusion aus dem Gefäßlumen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, die übrigen Schichten der Arterie durch die Vasa vasorum. Die Tunica media wird von der Intima und der Adventitia jeweils durch die innere bzw. äußere elastische Schicht getrennt (11).

1.1.3 Atherosklerotische Plaques

Atherosklerotische Plaques bestehen aus mit Cholesterinester angereicherten Schaumzellen (2). Diese bilden je nach histologischem Typ den cholesterinreichen Kern, auch ‚Atherom‘ genannt, der von einer aus ECM-Proteinen bestehenden, fibrösen Kappe umgeben ist. Die atherosklerotischen Läsionen werden histologisch in sechs Untergruppen klassifiziert, wobei Typ I und II mit sogenannten ‚Fettstreifen‘ die frühen Läsionen darstellen und Läsionen vom Typ III bis VI die fortgeschrittenen Läsionen sind (13).

Das Endothel reagiert auf verschiedene Reize, z. B. neurale, humorale sowie hämodynamische Reize. Die Thrombozytenfunktion, Entzündungsreaktionen, das Wachstum und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Gefäßtonusmodulation werden durch Synthese und Freisetzen bestimmter vasoaktiver Substanzen durch das Endothel reguliert (12). Studien und Beobachtungen zeigen, dass Atherosklerose durch eine Immunreaktion gegen Autoantigene auf Endothelzebene verursacht werden könnte. Wichtige Autoantigene dabei sind oxidierte Low Density Lipoproteine (LDL) und Hitzeschockproteine (HSP) 60/65 (14).

Im früheren Stadium aktiviert der turbulente Blutfluss, der hämodynamische Stress, die Endothelzellen in zu Atherosklerose neigenden Arterienstellen, z. B. in bifurkationsnahen Bereichen, was zu einer erhöhten Permeabilität führt. Dadurch kann die Plasmakomponente in den subendothelialen Bereich gelangen (15). Das aktivierte Endothel exprimiert außerdem verschiedene entzündliche Adhäsionsproteine und Chemokine, die die Rekrutierung von Leukozyten fördern (16). Der hohe LDL-Spiegel führt im Blut zu einem Anstieg des Eintritts von mit Cholesterin beladenen LDL-Partikeln in die Arterienwand über eine ‚beschädigte‘ Endothelstelle, die sich dort sammeln (17). Dort kann LDL unterschiedlich modifiziert werden, z. B. kann durch die Produktion freier Sauerstoffspezies (ROS) oxidiert werden. Oxidiertes LDL spielt im Vergleich zu nativem LDL eine wichtigere Rolle bei der Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose, denn diese Eigenschaften des oxidierten LDL verschlimmern kumulativ die Atherothrombose (18). Monozyten nehmen modifizierte Lipoproteine und Lipide auf und werden dadurch in Schaumzellen umgewandelt, die frühe Läsionen der Atherosklerose (sogenannte ‚Fettstreifen‘) bilden (16) (Abbildung 1).

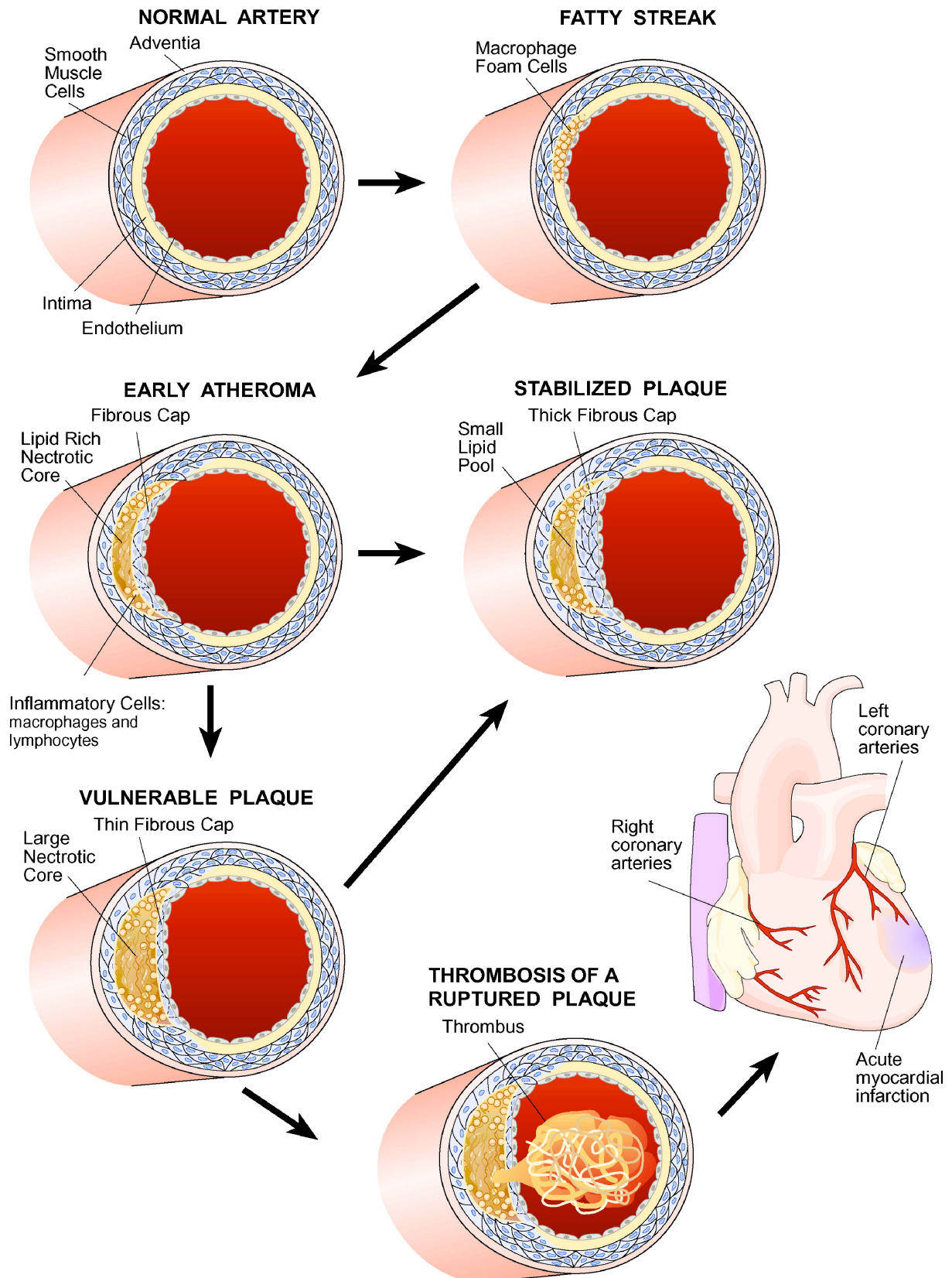


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung der Entwicklung von Atherosklerose (19)

1.2 Cholesterin-Metabolismus

Die Cholesterinhomöostase ist für normale zelluläre, aber auch für normale systemische Funktionen von entscheidender Bedeutung (20). Cholesterin ist weitgehend hydrophob, wird in allen Zellen von Säugetieren, hauptsächlich den Leber- und Darmzellen, synthetisiert, ist ein wesentlicher Zellmembranbestandteil und sorgt unter anderem zusammen mit anderen Lipiden für die Regulation der Steifheit, Fließfähigkeit und Permeabilität der doppelschichtigen Plasmamembran (20, 21). Es wird angenommen, dass ca. 60 % bis 80 % des gesamten zellulären Cholesterins in der Plasmamembran enthalten sind und sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) lediglich 0,5 % bis 1 % des Cholesterins befinden (22). Obwohl das ER cholesterinarm ist, ist dies der primäre Ort für die Cholesterinsynthese sowie -veresterung. Neuere Studien zeigen, dass die zytotoxischen Wirkungen des überschüssigen freien Cholesterins über das ER ausgeübt werden können (23).

1.2.1 Zelluläre Cholesterinhomöostase

Wegweisenden Entdeckungen über den Cholesterinstoffwechsel zufolge wird der zelluläre Spiegel von Cholesterin durch neue Biosynthese, externe zelluläre Aufnahme, Speicherung in der Zelle und Exkretion des Cholesterins von der Zelle reguliert (24). Es besteht eine umgekehrte Beziehung zwischen Cholesterinabsorption und -synthese, wobei eine niedrige intestinale Cholesterinabsorption durch eine Hochregulierung der Cholesterinsynthese kompensiert wird und umgekehrt (25). Der zelluläre Cholesterinspiegel wird durch einen homöostatischen Mechanismus über Transkriptionsfaktoren, die *sterol regulatory element-binding proteins* (SREBP bzw. SREBF), reguliert, durch die eine negative Rückkopplung auf die Cholesterinsynthese ausgeübt wird (26). Bei Wirbeltieren gibt es zwei SREBP-Gene (SREBP1 und SREBP2), wobei von SREBP1 zwei unterschiedliche Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) SREBP1a und SREBP1c transkribiert werden können, von denen SREBP1a die aktivste Form ist (27, 28).

SREBPs werden als inaktive ER-Transmembranproteine synthetisiert. Wenn in der Zelle ausreichend Cholesterin vorhanden ist, verbleiben SREBPs im ER, wobei ein *insulin-induced gene 1* (Insig-1) genanntes ER-Protein das Sterol-Sensor des *SREBP-cleavage-activating proteins* (SCAP) bindet, wodurch der SREBP-SCAP-Komplex im

ER bleibt (29). Ein niedriger Cholesterinspiegel verursacht eine Konformationsänderung im Sterol-Sensor des SCAP, wobei sich Insig-1 vom SREBP-SCAP-Komplex dissoziiert und der SREBP-SCAP-Komplex den Golgi-Apparat erreichen kann, wo das SREBP proteolytisch verarbeitet und dadurch aktiviert wird. Danach bewegen sich die aktiven SREBP in den Nukleus und binden an ein *sterol response element* (SRE) in der Enhancer- bzw. Promoter-Region vieler Zielgene und aktivieren deren Transkription (26, 30). Insig-1 scheint eine wesentliche Rolle bei der Sterol-vermittelten Regulation zu spielen, sodass auch der Abbau der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR oder HMG-CoA-Reduktase) durch die Bindung ihrer Sterol-Sensor-Domäne an Insig-1 beschleunigt wird, die einen geschwindigkeitskontrollierenden Schritt in der Cholesterinbiosynthese katalysiert (31).

Die Squalen-Monooxygenase (SM) katalysiert den ersten Oxygenierungsschritt in der Cholesterinsynthese, deren Regulation als ein weiteres geschwindigkeitsbestimmendes Enzym bei der Cholesterinbiosynthese erkannt wurde (32). Wie HMGCR wird SM sowohl auf Transkriptionsebene über SREBP als auch auf Posttranslationsebene kontrolliert (33).

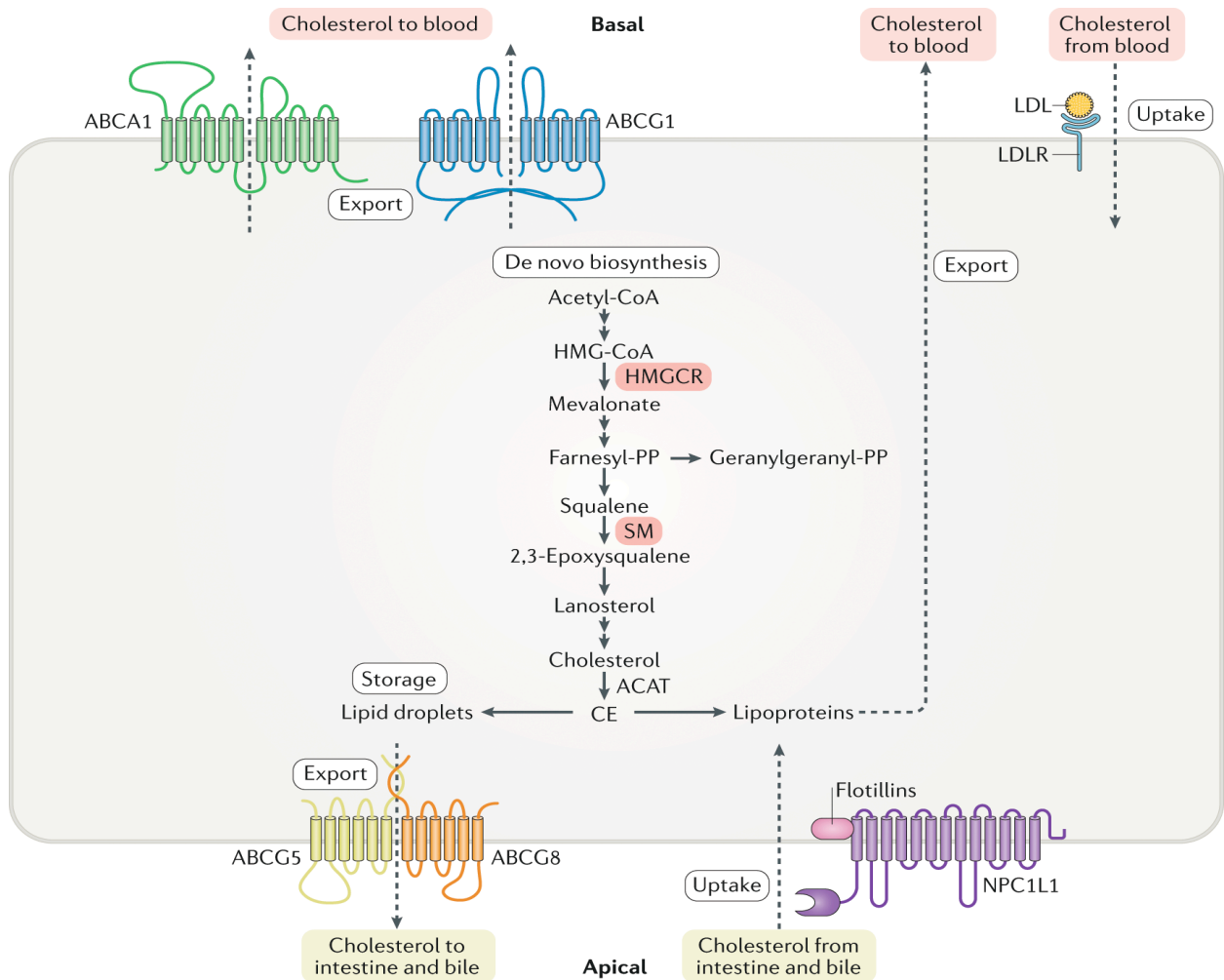


Abbildung 2. Hauptbestandteile des Cholesterinstoffwechsels in einer polarisierten Zelle (20)

Wie in Abbildung 2 beschrieben, beginnt die Cholesterinsynthese mit Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), wobei mehr als zwanzig Enzyme beteiligt sind. Die meisten dieser Enzyme befinden sich in der Membran des ER (34). Viele Nahrungsquellen enthalten auch Cholesterin, sodass Menschen über Nahrung Cholesterin aufnehmen und die Absorption von Cholesterin mit der aufgenommenen Cholesterinmenge zunimmt (35). Dabei nehmen sogenannte ‚Niemann-Pick-C1-Like-1(NPC1L1)-Proteine‘ auf der apikalen (zum Darmlumen gerichteten) Enterozytenoberfläche Cholesterin auf (36). Dieses Cholesterin wird danach in Form von Chylomikronen aus den Enterozyten freigesetzt und von der Leber aufgenommen. Die Chylomikronen sind vom Darm produzierte, triglyceridreiche Lipidpartikel im Blut und in der Lymphe, die Lipide an die Leber sowie die anderen Gewebe liefern. Nachdem Chylomikronen ihre Triglyceride abgegeben haben, werden sie zu Chylomikronresten und von der Leber entfernt (20).

Die Leber liefert Cholesterin in Form von Lipoprotein mit geringer Dichte Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL) an den Blutkreislauf (37). Nach der Verarbeitung im Blutkreislauf erzeugen die VLDL zirkulierende Lipoproteine niedriger Dichte (LDL), die von peripheren Zellen über eine LDL-Rezeptor(LDLR)-vermittelte Endozytose aufgenommen werden (37). Cholesterin wird in der Zelle durch verschiedene Mechanismen zwischen den Organellen transportiert und erfüllt vielfältige Funktionen (38). Da Cholesterin ein stark hydrophobes Lipid ist, erfordert sein Transport im Cytosol spezielle vesikuläre und nichtvesikuläre Mechanismen. Der nichtvesikuläre Transport beinhaltet hydrophobe Hohlraumtransporter, z. B. Steroidogenic-Acute-Regulatory(*StAR*)-related-lipid-transfer(*START*)-Proteine (39).

1.2.2 Reverser Cholesterintransport

Überschüssiges Cholesterin wird zur Entsorgung von der Peripherie zur Leber und zum Darm transportiert und schließlich über den Kot ausgeschieden. Dieser Weg wird als ‚reverser Cholesterintransport‘ (RCT) oder ‚zentripetaler Cholesterinfluss‘ bezeichnet (40). Die ersten Schritte des RCT umfassen das Ausschleusen von Cholesterin aus peripheren Zellen in die Plasma-Lipoproteine, die anschließend an die Leber abgegeben werden (41).

In den letzten Jahren hat sich der Fokus auf den zellulären Cholesterin-Efflux und den Rücktransport in die Leber verlagert, denn aus klinischer Sicht kann die Fähigkeit von Makrophagen, Cholesterin effizient in den RCT-Weg abzuleiten, eine wesentliche Rolle bei der Prävention von Atherosklerose spielen (42). Es wurde festgestellt, dass eine negative Rückkopplung von Cholesterin auf cholesterogene Enzyme und LDL-Rezeptoren über SREBP-Transkriptionsfaktoren stattfindet (37). Oxysterol(OS)-Derivate des Cholesterins sind Liganden für den Transkriptionsfaktor Liver-X-Rezeptor (LXR), der ABC-Transporter wie ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 sowie andere am RCT beteiligte Gene stimuliert (43, 44). Dabei bildet LXR wie andere nukleäre Hormonrezeptoren Heterodimere mit Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), die von RXR-Agonisten wie Retinoiden oder Oxysterolen aktiviert werden (45, 46). Das ABCA1-Gen kann durch ungesättigte Fettsäuren, verschiedene Transkriptionsfaktoren wie Schilddrüsenhormonrezeptoren oder Glukokortikoidhormonrezeptoren sowie Interferon- γ , Oncostatin und Angiotensin II supprimiert werden (47, 48). Überschüssiges

Cholesterin wird in der Zelle durch zwei Acyl-Coenzym A:Cholesterin-Acyltransferase Typ 1 und Typ 2 (ACAT1 und ACAT2) zu Cholesterylethern verestert (44). Die Cholesterinester (CE) werden entweder als Cholesterinreservoir in zytosolischen Lipidtröpfchen gespeichert oder als Hauptbestandteil von Plasma-Lipoproteinen freigesetzt (20).

1.2.3 Die Rolle der ABC-Transporter A1 und G1 beim reversen

Cholesterintransport

Insgesamt sind drei Mechanismen des Cholesterintransports aus der Zelle bekannt (Abbildung 3). Der einfachste Mechanismus für den zellulären Cholesterin-Efflux ist der Prozess, bei dem einzelne Cholesterinmoleküle von der Plasmamembran aufgenommen werden. Anschließend diffundieren diese die hydrophile Phase und werden dann in die phospholipidhaltigen Akzeptorpartikel eingebaut (49). Dieser Transportmechanismus durch Diffusion ist bei hydrophobem Cholesterin ein relativ ineffizienter Weg (50). Der zweite Mechanismus des Cholesterin-Effluxes ist über den *scavenger receptor BI* (SR-BI) vermittelt, wobei die Bewegung des Cholesterins wie beim Diffusionsmechanismus bidirektional ist, was bedeutet, dass die Nettobewegung von der Richtung des Cholesteringradienten abhängig ist (51). Der dritte bekannte Cholesterin-Efflux-Mechanismus ist über ABC-Transporter vermittelt (52). Überschüssiges Cholesterin wird vom ABC-Transporter A1 und G1 (ABCA1 und ABCG1) für die HDL-Bildung über verschiedene Mechanismen in das Blut zum Apolipoprotein A-I (Apo A-I) oder vom ABCG5 und ABCG8 in das Darmlumen und die Gallengänge exportiert (20, 50).

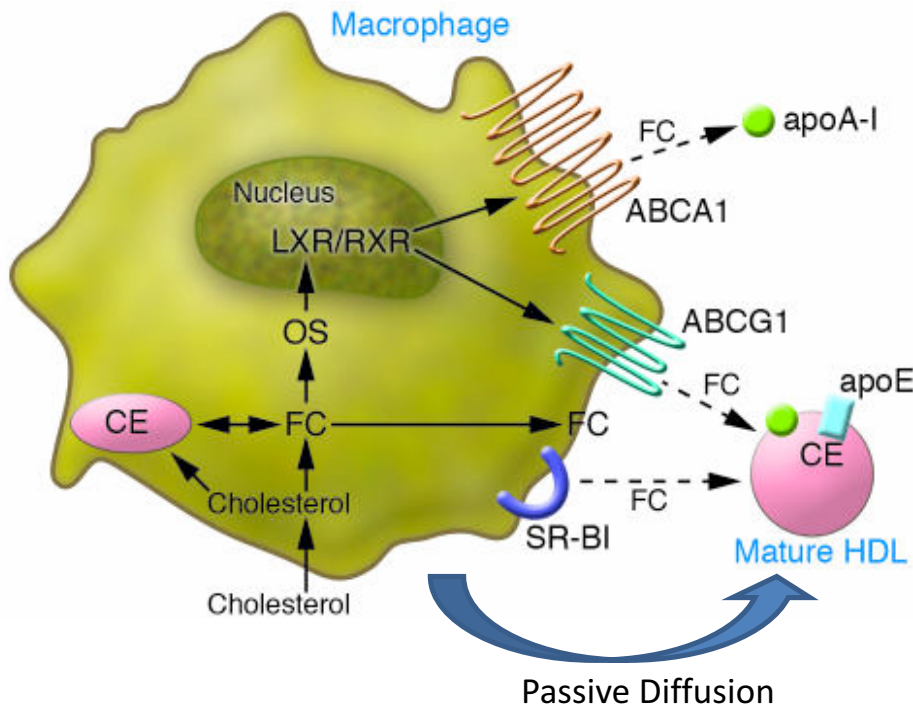


Abbildung 3. Mechanismen des Cholesterin-Effluxes aus der Zelle (modifiziert nach (53))

ABCA1 ist eines der 48 beim Menschen bekannten Mitglieder der ABC-Transporter-Familie (54). Das menschliche ABCA1-Gen befindet sich im Chromosom 9q31, besteht aus 2261 Aminosäure-kodierenden 50 Exonen und hat ein Molekulargewicht von 254 kDa (55, 56). Im ABCA1-Gen wurden ungefähr 50 Mutationen und viele Polymorphismen der Einzelnukleotide beschrieben (57).

Bodzioch et al. konnten 1999 durch genetische Untersuchung von Patienten mit Tangier-Krankheit zeigen, dass ABCA1 bei dieser Krankheit mutiert ist und der ABCA1-Transporter ein kritischer Modulator des Lipidmetabolismus und des Cholesterin- und Phospholipid-Effluxes ist (58). Die Tangier-Krankheit wird autosomal rezessiv vererbt und ist im homozygoten Zustand durch das Fehlen von HDL-Cholesterin (HDL-C) im Plasma, die Ablagerung von CE im retikuloendothelialen System mit Splenomegalie und der Vergrößerung von Tonsillen und Lymphknoten, periphere Neuropathie und häufig vorzeitige Koronararterienerkrankung gekennzeichnet (58, 59). Bei den Zellen von Patienten mit Tangier-Krankheit ist der Transport von Cholesterin und Phospholipiden zu den Apolipoproteinen defekt, sodass die Unfähigkeit zur

Lipidaufnahme des entstehenden ApoA-I zum schweren HDL-Mangel führt und somit ApoA-I schnell katabolisiert wird (60, 61).

Der HDL-Metabolismus beginnt mit der Apo-A-I-Synthese in Leber und Darm, wobei für die HDL-Bildung jedoch eine Interaktion zwischen Apo A-I und ABCA1 erforderlich ist (52). In Studien wurde gezeigt, dass ABCA1 in direkter Wechselwirkung mit Apo A-I steht (62-64). Die Deletion des intestinalen ABCA1-Gens in Mäusen führte zu einer Verringerung des Plasma-HDL um ungefähr 30 %, die Deletion von sowohl hepatischem als auch intestinale ABCA1 zu einer ungefähr 90%igen Abnahme des Plasma-HDL-Spiegels (65). Zusätzlich konnte anhand von Experimenten mit Mäusen gezeigt werden, dass die Überexpression von hepatischem ABCA1 nicht nur eine Erhöhung des HDL-Spiegels im Blut zur Folge hat, sondern die Mäuse, die ABCA1 überexprimierten, im Vergleich zu anderen Mäusen weniger atherosklerotische Läsionen entwickelten (66, 67). Eine andere Studie zeigte, dass eine ABCA1-Überexpression in Monozyten bzw. Makrophagen ebenso zu einer HDL-Erhöhung im Blut führt, dieser Effekt jedoch im Vergleich zu dem in Leberzellen schwächer ausgeprägt ist (68). Obwohl in Makrophagen exprimierte ABCA1 keine relevante HDL-Erhöhung zur Folge hat, konnte gezeigt werden, dass die selektive Abschaltung des ABCA1-Gens in Makrophagen von Apolipoprotein(Apo)-E- oder LDLR-Knockout-Mäusen unabhängig vom HDL-Blutspiegel zu einer verstärkten Atherosklerose-Entwicklung beigetragen hat (69). Die Aktivität von ABCA1 wird unter anderem durch Metaboliten wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und OS stimuliert (70-72).

Frühere Studien belegen, dass eine Überexpression von ABCG1 zu einem erhöhten Cholesterin-Efflux zu exogen hinzugefügtem HDL führt, weshalb davon ausgegangen wurde, dass auch ABCG1 im ersten Schritt des RCT für den Cholesterin-Efflux aus den lipidbeladenen Makrophagen wichtig sein könnte (73). Durch Experimente mit ABCG1-Knockout-Mäusen wurde nachgewiesen, dass Cholesterin-Efflux bei diesen Mäusen zu HDL verringert war, wobei kein Einfluss auf den Cholesterin-Efflux auf Apo A-I beobachtet wurde (73). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ABCG1 zu einem Anstieg des Cholesterin-Effluxes aus der Zelle führt (74). Mittlerweile ist bekannt, dass ABCA1 Cholesterine und Phospholipide auf lipidfreie bzw. -arme Apolipoproteine exportiert, während ABCG1 und SR-BI Cholesterin auf

phospholipidhaltige Partikel (z. B. auf durch ABCA1 mit Cholesterin angereicherten Apo A-I und auf HDL-Partikeln HDL2 und HDL3) exportiert (41, 74).

Außerdem wird diskutiert, dass Apo A-I entweder über direkte Vermittlung durch ABCA1 oder durch ABCA1-induzierte, andere Signalwege internalisiert wird und dadurch mit verschiedenen intrazellulären Lipidtröpfchen interagiert, um freies Cholesterin (FC) sowie Phospholipide zu erhalten (75, 76). So werden größere, aus HDL-3-Partikeln durch Lipidlagerung entstandene HDL-2-Partikel später durch Reendozytose wieder an die Zelloberfläche abgegeben (77).

1.2.4 Die Rolle von MicroRNAs beim Cholesterinmetabolismus

MicroRNA (miRNA) sind kleine, ca. 22 Nukleotid lange, nicht kodierende Ribonukleinsäure (RNA), die die Expression komplementärer mRNA regulieren (78). Durch Basenpaarung an mRNAs vermitteln miRNAs den Abbau von mRNA (79). Es wurde gezeigt, dass ein einziges miRNA in mehreren mRNAs Zielstellen haben kann und umgekehrt der mRNA-Umsatz und die Translation von mehreren miRNAs reguliert werden kann (80, 81). Somit stellen miRNAs bei der intrazellulären Cholesterinhomöostase neben anderen komplexen regulatorischen Prozessen über Transkriptionsfaktoren und Co-Aktivatoren ein weiteres komplexes regulatorisches Netzwerk dar (82).

Im Genom von Säugetieren sind mittlerweile ca. 500 miRNA-Gene bekannt, von denen ca. 50 % aus nicht proteinischen Transkripten exprimiert werden, während sich die andere Hälfte in den Introns der kodierenden Gene befindet und zufällig mit den zugehörigen Genen transkribiert wird (83, 84). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein wichtiger Anteil der intergenen miRNAs eigenständige 5'- und 3'-Grenzen in ihren Transkripten aufweist, was darauf hindeutet, dass diese unabhängig von einem anderen Gen transkribiert werden können (83).

Die Genexpression von miRNAs wird über verschiedene Transkriptionsfaktoren, z. B. den *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF), sowie über epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen, reguliert (85). Eine der den Cholesterin-Metabolismus regulierenden miRNAs ist die MicroRNA-122 (miR-122),

die hauptsächlich in der Leber exprimiert wird. Studien haben gezeigt, dass die Injektion von Antisense-Oligonukleotiden die Cholesterinbiosynthese herunterreguliert, wodurch auch der zirkulierende Cholesterinspiegel im Plasma verringert wird, aber da neben LDL- auch HDL-Cholesterin durch den miR-122-Antagonismus gesenkt wird, kann sie als therapeutisches Ziel bei der Behandlung von cholesterinassoziierten Krankheiten nicht genutzt werden (86-89). Eine andere miRNA, die MicroRNA-33 (miR-33), befindet sich innerhalb des SREBF2/SREBP2-Gens (eines Cholesterinsynthese regulierenden Transkriptionsfaktors) und wird im Gegensatz zu miR-122 in verschiedenen Zelltypen und Geweben exprimiert, wodurch sie eine umfassendere Wirkung auf die Cholesterinhomöostase hat (90, 91). Es wurde gezeigt, dass nach der Cholesterinbeladung die Expression von miR-33 und SREBF2 zusammenhängend herunterreguliert wurde, während die Expression von miR-33 umgekehrt mit der Expression des ABCA1-Gens korreliert. Daraus folgt, dass miR-33 über negative Rückkopplungsmechanismen funktioniert, die durch den Cholesteringehalt der Zelle reguliert werden. Bei niedrigem Cholesterinspiegel koordiniert die gleichzeitige Transkription von SREBF2 und miR-33 die zelluläre Cholesterinhomöostase, indem gleichzeitig die Transkription der Cholesterinaufnahme- und -synthesewege initiiert und die am zellulären Cholesterinexport beteiligten Gene posttranskriptionell supprimiert werden (90, 91).

Die Regulation von ABCA1 erfolgt durch die Bindung von miR-33 an die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der ABCA1-mRNA, was bestätigt, dass ABCA1 ein direktes Ziel der miRNA ist (90). Es wurde berichtet, dass außer der genannten miR-33 auch andere miRNA (wie miR-26, miR-106b, miR-758 sowie miR-144) direkt auf ABCA1 abzielen, was darauf hindeutet, dass die Regulation dieses Gens komplex ist (92, 93).

1.3 HDL als protektiver Faktor bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Wie schon erwähnt, ist Cholesterin ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembranen von Säugetieren und ein gestörtes Cholesteringleichgewicht trägt zu verschiedenen Krankheiten bei; unter anderem spielt es bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine wichtige Rolle (20, 39). Zuerst wurde im Rahmen der Framingham-Herzstudie in den 1960er Jahren über signifikante Zusammenhänge zwischen dem kardiovaskulären Risiko und

dem Plasma-Lipoproteinspiegel berichtet (94). Demnach sind das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu HDL-C sowie HDL- und LDL-Cholesterine unabhängig voneinander deutlich mit koronaren Herzkrankheiten assoziiert, wobei bei HDL eine stärkere Assoziation mit der Inzidenz beobachtet wurde (94, 95). Zwölf Jahre lang wurden dieselben Studienteilnehmer beobachtet, wobei eine erneute Messung von HDL-C nach acht Jahren zeigte, dass selbst nach Anpassung der anderen Risikofaktoren (wie Rauchen, Alkoholkonsum, Übergewicht, Blutzucker und Blutdruck) der HDL- und der Gesamtcholesterinspiegel im Plasma, unabhängig von anderen Risikofaktoren, bei der Entwicklung von koronaren Herzkrankheiten eine wesentliche Rolle spielen (96). Die Schutzwirkung von HDL ist mindestens so stark wie die atherogene Wirkung von LDL, wobei bei jedem Gesamtcholesterinspiegel das Risiko abhängig von dem Verhältnis variiert (97). Es wurde beobachtet, dass ein Anstieg des HDL-Cholesterins um 1 mg/dl zu einer signifikanten Verringerung des Risikos für koronare Herzerkrankungen, bei Männern um 2 % und bei Frauen um 3 %, und zusätzlich zu einer signifikanten Abnahme der Sterblichkeitsrate bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen um 3,7 % (Männer) bzw. 4,7 % (Frauen) führt (98).

Die Rolle von HDL-C als unabhängigem und veränderbarem Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Es gibt mehrere gut dokumentierte HDL-Funktionen, wie den bereits beschriebenen RCT, die Hemmung der Entzündung oder die Hemmung der Thrombozytenaktivierung, die für die atheroprotektiven Wirkungen des HDLs verantwortlich sein können (99). In neueren Studien wurde weiterhin eine umgekehrte Beziehung zwischen HDL-C und Herz-Kreislauf-Erkrankungen belegt, jedoch ebenso darauf hingewiesen, dass HDL-C grundsätzlich als Hinweis auf eine schlechte allgemeine Gesundheit und weniger als unabhängiger, veränderbarer Risikofaktor betrachtet werden sollte (100).

HDL-Partikel transportieren Cholesterin aus den Schaumzellen zurück zur Leber. Das ist der erste Schritt des RCT, der möglicherweise eine vielversprechende antiatherogene Strategie ist. Die Manipulation des RCT könnte therapeutisches Potenzial zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen haben (41). Es gibt Krankheiten, bei denen eine beeinträchtigte HDL-Funktion oder die Beeinträchtigung des RCT zu Gefäßerkrankungen beiträgt. Aktuelle Ergebnisse sprechen für weitere Forschungen, um besser zu verstehen, wie die HDL-Funktion zum RCT beiträgt, damit

neue Präventions- und Behandlungsstrategien zur Verringerung des Risikos von Herz-Kreislauf-Erkrankungen entwickelt werden können (2).

1.4 Alterungsabhängige Krankheiten

Biologische Alterung ist ein irreversibler physiologischer Prozess, bei dem sich die physiologischen Funktionen zunehmend verschlechtern und der schließlich zu altersbedingten Krankheiten, wie Herz-Kreislauf-Krankheiten, Erkrankungen des Bewegungsapparates, neurodegenerativen Krankheiten sowie Krebs, führt (101). Neben der zellulären Seneszenz, d. h. der Abnutzung der Telomere, sind heute weitere Kennzeichen des Alterns bekannt: die genomische Instabilität, epigenetische Veränderungen, der Verlust der Proteostase, die deregulierte Nährstoffmessung, die mitochondriale Dysfunktion, die Stammzellenererschöpfung sowie die veränderte interzelluläre Kommunikation (102).

Studien haben gezeigt, dass Telomere und Telomer-assoziierte Proteine eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen spielen und eine beschleunigte Telomerabnutzung mit altersabhängigen Stoffwechsel- und Entzündungsreaktionen assoziiert ist (103). Zudem wurde eine inverse Korrelation zwischen der Telomerlänge und Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Atherosklerose beobachtet (104). Die Mitoserate in vaskulären glatten Muskelzellen ist in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu frühen Läsionen niedriger (105). Darüber hinaus können in den Plaques befindliche ROS sowohl zu einer beschleunigten Telomerverkürzung führen als auch unabhängig von der Telomerlänge eine vorzeitige Seneszenz auslösen (106-108). Aus fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques kultivierte glatte Muskelzellen weisen Merkmale der Seneszenz auf, z. B. haben sie deutlich kürzere Telomere und exprimieren Seneszenzmarker wie SA- β -Gal, p16 und p21 (109).

Anhand von Telomersyndromen kann eine Gruppe nicht verwandter Krankheiten mit vorzeitigem Alterungsphänomen zusammengefasst werden, die verkürzte Telomerpathologien sowie überlappende phänotypische Merkmale zeigen (110). Das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom (HGPS), Dyskeratosis congenita, Ataxie-Teleangiektasie, das Hoyeraal-Hreidarsson-Syndrom sowie das Revesz-Syndrom gehören zu diesen Krankheiten, wobei sehr kurze Telomere und eine vorzeitige replikative Seneszenz mit einer niedrigen Hayflick-Grenze zu erkennen sind (111-114).

Da Prelamin A und das für HGPS typische Protein Progerin in physiologisch alternden Individuen exprimiert werden und die meisten Merkmale des physiologischen Alterns bei Patienten mit HGPS auftreten, kann die Forschung zu dieser seltenen Krankheit das Verständnis der dem physiologischen Altern zugrunde liegenden Mechanismen verbessern (115).

1.4.1 Zelluläre Seneszenz und Krankheiten mit vorzeitiger Alterung

Zellen sind einem ständigen exogenen sowie endogenen Stress ausgesetzt, wobei ihre Reaktionen von der vollständigen Reparatur bis zum Zelltod reichen. Darüber hinaus können proliferierende Zellen einen Zustand des permanenten Zellzyklusstillstands annehmen, der als ‚zelluläre Seneszenz‘ bezeichnet wird (116). Seneszenz ist ein zellulärer Abwehrmechanismus, der dazu führen soll, dass Zellen keine unnötigen Schäden erleiden (117), eine der Ursachen für das Altern und zudem verantwortlich für altersbedingte Krankheiten. Neben diesen negativen Aspekten spielen seneszierende Zellen eine positive Rolle bei der Embryogenese und der Gewebereparatur sowie als Barriere bei der Tumorgenese (117, 118). Es wurde berichtet, dass die Eliminierung seneszierender Zellen durch vorübergehende Hemmung des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF- β) zu Entwicklungsstörungen bei Organogenese führt (119).

Zellen können durch unterschiedliche Mechanismen zur Seneszenz gebracht werden, wobei die schadensinduzierte von der entwicklungsbedingten, programmierten Seneszenz unterschieden wird. Zur schadensinduzierten Seneszenz gehören neben der Telomerverkürzung auch die Einwirkung von Sauerstoffradikalen, DNA-Schäden aber auch Onkogenen (120). Einer der Faktoren, durch die Sauerstoffradikale kontrolliert werden können und damit die zelluläre Seneszenz reguliert werden kann, sind die miRNA (121).

In seneszenten Zellen werden verschiedene lösliche sowie unlösliche Faktoren produziert und ausgeschieden, die zusammen als ‚Seneszenz-Assoziierter-Sekretorischer-Phänotyp‘ (SASP) bezeichnet werden. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Chemokine, Zytokine, Proteasen sowie Wachstumsfaktoren, wobei deren Kombination von den Zelltypen und den Seneszenz-induzierenden Faktoren abhängig ist (122-124). Darüber hinaus hängen die Funktionen von SASP-Mitgliedern

von der genetischen Konstellation der seneszenten Zellen und deren Umgebungsfaktoren ab (122). Es konnte gezeigt werden, dass SASP unter vielen anderen Krankheiten auch mit Atherosklerose assoziiert ist, sodass seneszierende vaskuläre glatte Muskelzellen durch SASP, die durch Interleukin-1 α gesteuert werden, aktiv zur chronischen Entzündung bei Atherosklerose beitragen können (125).

Hayflick und Moorhead konnten erstmals zeigen, dass sich normale menschliche Fibroblasten in Kultur nicht unendlich teilen (126). Ab einer bestimmten Zellpopulationsverdopplungszahl werden sie seneszent. Dieses Phänomen ist heute als Hayflick-Grenze bekannt (116). Mit jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere, wodurch die Anzahl der Zellteilungen begrenzt wird (127). Die fortschreitende Abnutzung von telomerer DNA führt zum Verlust der Telomerkappenproteinen, wodurch DNA-Strangbrüche entstehen, die den Stillstand und die Seneszenz des Zellzyklus auslösen (128).

Telomere sind DNA-Protein-Strukturen, bestehen aus 4 bis 12 kb Tandemwiederholungen der TTAGGG-Sequenz, befinden sich in den Chromosomenden der eukariotischen Zellen, wo sie das Genom vor Abbau und Fusion schützen, und gehen mit jeder Zellteilungsrunde zunehmend verloren (129-131). Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit katalytischer Untereinheit (*telomerase reverse transcriptase*, TERT, bei Menschen hTERT), die die Telomere verlängert (132, 133). Aufgrund der starken Suppression des TERT-Gens ist die Aktivität der Telomerase in den meisten differenzierten menschlichen Körperzellen insuffizient und deswegen für die Kompensation der zunehmenden Telomerlängenverkürzung nicht ausreichend (132, 134). Nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen werden Telomere so kurz, dass sie von den Zellen als DNA-Schaden wahrgenommen werden, weshalb eine DNA-Schadensantwort (DDR) ausgelöst wird, die Ähnlichkeiten mit der bei extrinsischem DNA-Schaden entstehenden DDR zeigt (135). Dadurch werden über verschiedene Mediatoren die Tumorsuppressorgene p53 und Retinoblastom-Protein (pRB) aktiviert und der Verlauf des Zellzyklus wird blockiert (116). Wenn in diesen Zellen keine genetischen Veränderungen vorliegen, sterben sie nicht ab, unterscheiden sich aber in ihrer Proteinkonstellation von jungen Zellen (136). Es gibt verschiedene Biomarker für

zelluläre Seneszenz, wobei die lysosomale Hydrolase der Seneszenz-assoziierten Beta-Galaktosidase (SA- β -Gal) der am häufigsten verwendete Biomarker ist (118, 137).

1.4.2 Das Hutchinson-Gilford-Progerie-Syndrom als Beispiel einer Krankheit mit vorzeitiger Alterung

Lamin A und C sind Produkte des LMNA-Gens und wichtige Komponenten eines proteinhaltigen Netzes, das unter der inneren Kernmembran liegt und für eine ordnungsgemäße Kernstruktur sorgt (138). Darüber hinaus ist Lamin A an der DNA-Reparatur, -Replikation sowie -Transkription beteiligt (139). Mehr als 14 bekannte Krankheiten entstehen durch Mutationen in Laminen, werden als ‚Laminopathien‘ bezeichnet und reichen von Muskeldystrophie bis zu beschleunigtem Altern, wie bei Hutchinson-Gilford-Progerie (HGP) und beim atypischen Werner-Syndrom (140, 141).

HGPS ist eine seltene genetische Störung, die ursprünglich 1886 von Jonathan Hutchinson berichtet und 1904 von Hastings Gilford weiter beschrieben wurde (142, 143). Die sporadische, autosomal dominante, tödlich verlaufende Krankheit gehört zu den Progeroid-Syndromen (144). Etwa 90 % der Personen mit HGPS weisen an Position 1824 im Codon 608 (G608G) innerhalb von Exon 11 De-novo-Punktmutationen im LMNA-Gen auf, die Cytosin durch Thymin ersetzen. Dabei aktiviert diese Mutation eine kryptische Spleißstelle und produziert das Protein Progerin, das eine farnesylierte, mutierte Form von Lamin A darstellt und 50 Aminosäuren weniger als normales Lamin A hat (145). Neben diesem klassischen HGPS-Genotyp gibt es einen nichtklassischen HGPS-Genotyp, bei dem Personen zwar charakteristische klinische Merkmale von HGPS zeigen, aber heterozygot für eine andere pathogene Variante in Exon 11 bzw. Intron 11 sind und aus dieser Mutation wird wieder Progerin produziert (146). Progerin sammelt sich in den Zellkernen an und führt zur Instabilität der Kernmembran (147). Die Progerie-Fibroblasten haben sehr kurze Telomere und proliferieren sich langsam, wobei beobachtet wurde, dass die Zellen nach Transfektion der HGPS-Zellen mit hTERT-mRNA längere Telomere, eine längere Lebensdauer sowie eine höhere Proliferationskapazität aufweisen (148-150). Außerdem wurde die Expression von Telomer-assoziierten Proteinen erhöht (148).

Bei der Geburt kann HGPS nicht diagnostiziert werden, aber innerhalb der ersten zwei Lebensjahre können auffällige Symptome, z. B. deutliche Hautmanifestationen, beobachtet werden (151). Im Jugendalter leiden HGPS-Patienten bereits an typischen Alterungserscheinungen wie Osteoporose, Arthropathien sowie schweren Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Darüber hinaus haben Patienten mit HGPS einen Mangel an subkutanem Fett, Alopezie, geschwollene Venen, Altersflecken sowie eine Wachstumsverzögerung (152). Wenige Progerie-Patienten erreichen das Alter von Anfang 20, durchschnittlich sterben sie bereits im Alter von 14 bis 15 Jahren, in ca. 90 % der Fälle an Komplikationen der Atherosklerose wie Schlaganfall oder Myokardinfarkt (153, 154). Im Rahmen einer Studie konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass die Expression von Progerin, das spezifisch für glatte Muskelzellen ist, die LDL in der Media-Schicht der Aorta erhöht und wahrscheinlich dadurch die Atherosklerose beschleunigt (155). HGPS wird normalerweise nicht vererbt, da die Patienten meistens vor dem Alter der Reproduktion sterben (156).

Es wurde nachgewiesen, dass Progerin-mRNA sowie Protein auch in den Zellen von gesunden Menschen vorkommen und der Spiegel von Progerin-Transkript in den Zellen von HGPS-Patienten und deren Eltern mit höheren Populationsverdopplungszahlen ansteigt (157-159). Die Zellen von gesunden Personen, die Progerin synthetisieren, weisen Ähnlichkeiten mit HGPS-Zellen auf, was nahelegt, dass die Progerinexpression auch in normalen Zellen zur Seneszenz beitragen kann (160, 161). Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Progerin-produzierende Spleißstelle nur in telomerabhängigen seneszenten Zellen aktiviert wird und es eine umgekehrte Korrelation zwischen Zellimmortalisierung und Progerintranskription gibt (161). Diese bei Telomerverkürzung auftretenden Änderungen beim alternativen Spleißen mehrerer Gene, einschließlich LMNA, deuten darauf hin, dass die Telomerschädigung und die Progerinproduktion zusammen die zelluläre Seneszenz induzieren können (161). Es wurde herausgefunden, dass das mit Telomeren assoziierte Protein LAP2 α , das normalerweise mit Lamin A im Wechselspiel steht und die Zellproliferation reguliert, in HGPS-Zellen weniger mit Progerin interagiert und die Erhöhung der Menge von LAP2 α DNA-Schäden sowie Seneszenz verhindert, sodass die Zellen sich weiter teilen können (162).

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören zu den typischen Krankheiten sowohl des physiologischen Alterungsprozesses als auch des HGPS (163). Eine Studie zeigte, dass HDL-Cholesterin und Adinopektin bei HGPS-Patienten mit dem Alter signifikant abnehmen, wobei andere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie das C-reaktive Protein (CRP), Gesamtcholesterin sowie LDL-Cholesterin nicht erhöht sind (164).

2 Ziele dieser Doktorarbeit

In dieser Arbeit sollte die Expression der ABCA1- und ABCG1-Gene in Fibroblasten von Patienten mit HGPS, sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene, untersucht werden.

Wie in Kapitel 1.7 beschrieben, sind ABCA1 und ABCG1 wichtige Komponenten beim Cholesterintransport aus Zellen. Somit spielen sie eine bedeutende Rolle beim reversen Cholesterintransport, einem protektiven Prozess bei der Atherosklerose. Funktionelle Änderungen bzw. Konzentrationsänderungen dieser Gene können zu Krankheiten führen wie z. B. die Tangier-Krankheit, bei der Patienten mit ABCA1-Mutation aufgrund eines gestörten Cholesterin-Effluxes einen schweren HDL-Mangel mit zumeist vorzeitiger Atherosklerose haben. Es wurde auch gezeigt, dass Zellen von Patienten mit Tangier-Krankheit Merkmale der zellulären Seneszenz und, im Vergleich zu Kontrollzellen, kürzere Telomere aufweisen (165). Eine beschleunigte Telomerverkürzung, HDL-Mangel und eine vorzeitige Atherosklerose sind somit - wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung - Merkmale der Tangier-Krankheit und des HGPS. Da die Cholesterinhomöostase bei diesen Krankheiten beeinträchtigt ist, ist es wichtig, die Schlüsselgene zu untersuchen, die eine Rolle beim Cholesterinstoffwechsel spielen.

Es wird angenommen, dass ABCA1 und ABCG1 bei der Vermittlung des zellulären Cholesterineffluxes zusammenwirken und Cholesterin bei Cholesterin-abhängiger Induktion durch den Transkriptionsfaktor LXR aus Zellen mobilisieren kann. Die Arbeitsgruppe hatte bei früheren Experimenten mit Tangier-Fibroblasten beobachtet, dass in Zellen mit teilweise defektem ABCA1 (Zelltyp 1) ABCA1 und ABCG1 auf Protein- und mRNA-Ebene kompensatorisch hochreguliert wurden (166). Bei kompletter ABCA1-Defizienz war diese Kompensation nicht zu beobachten (Abbildung 4). Daher sollten diese Untersuchungen vergleichend jetzt an HGPS-Fibroblasten durchgeführt werden.

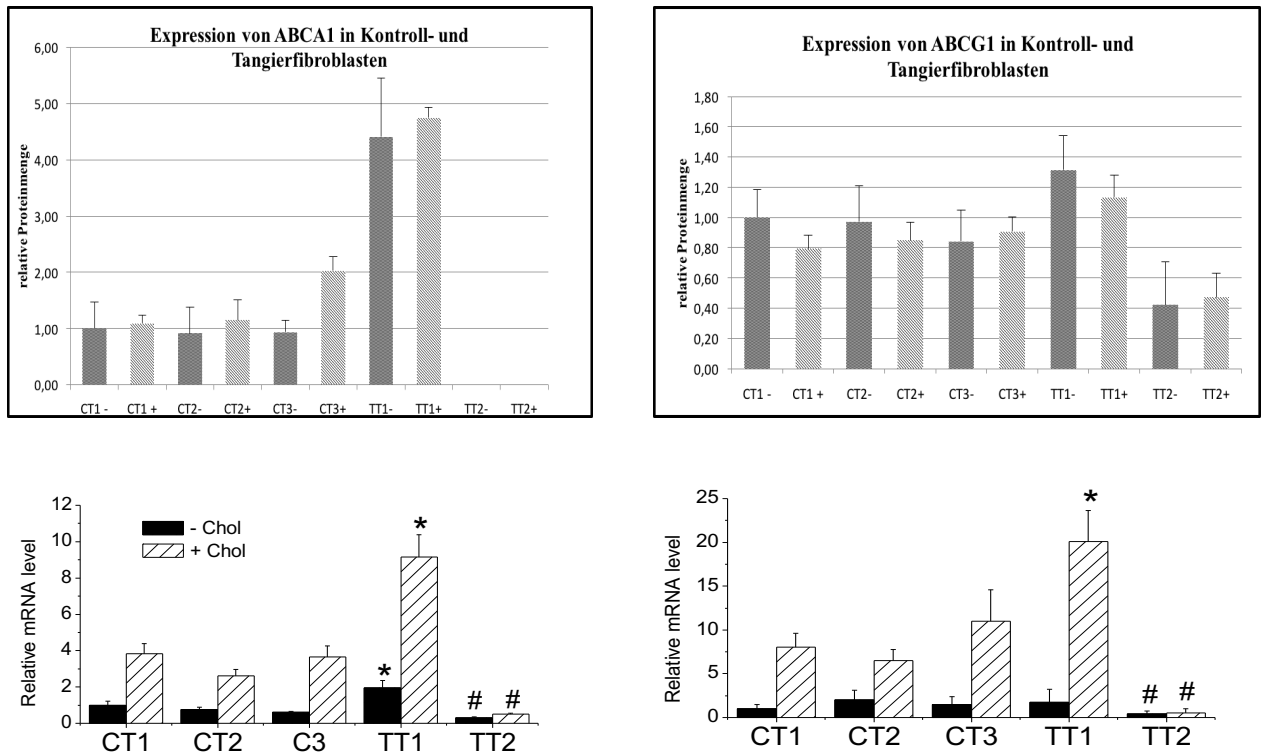


Abbildung 4. ABCA1- und ABCG1-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene in Fibroblasten von Patienten mit Tangier-Krankheit (166)

Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Expression von ABCA1 und ABCG1 abhängig von der Telomerlänge reguliert wird. Die Ergebnisse sollten durch Western Blot und quantitative PCR (qPCR) miteinander verglichen werden, um die Funktion dieser Transporter beim Lipidmetabolismus, der Entstehung von Atherosklerose und somit indirekt dem Alterungsprozess besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

Die Versuche wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Bei den Experimenten und der Erstellung der Dissertation wurde die ‚Satzung der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ eingehalten.

3.1 Chemikalien, Lösungen und Kits

In den Tabelle 1 und Tabelle 2 werden die wichtigsten Chemikalien, Kits und ihre Hersteller aufgeführt. In Tabelle 3 sind die verwendete Software und die herangezogenen Internetseiten zusammengestellt, in Tabelle 4 die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

Chemikalien	Firma
2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH
Acrylamid	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
β-Mercaptoethanol	G-Biosciences
Bovines Serumalbumin (BSA)	SIGMA
Bromphenolblau	SIGMA
cComplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free	Roche
Cholesterin	Carl Roth GmbH
DMEM-Medium	Gibco
dNTP	Thermo Fisher
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
Glycerol	Merck
Glycin	Carl Roth GmbH
Human Cyclophilin A 200 Rxn	Life Technologies GmbH
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich

Isopropanol	Merck
Luminol	SIGMA
Methanol	Roth
Milchpulver	Carl Roth GmbH
M-MLV 5x Reaktionspuffer	Promega GmbH
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH
Para-Cumarinsäure	SIGMA
phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Plus prestained Protein Ladder	Thermo Fisher
Ponceau S	SIGMA
Puromycin	Gibco
Random Primer	Promega
RNase Out	Invitrogen™
Saccharose	SIGMA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad
Tris	Merck
Trypsin	SIGMA
Tween 20	AppliChem

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Kits	Firma
BCA-Assay	Thermo Fisher
NucleoSpin RNA Kit	Macherey-Nagel
SuperSignal West Femto Maximum	Thermo Fisher

Tabelle 2. Übersicht über die verwendeten Kits

Internetseiten und Software	Firma
CFX Manager 3.1	Bio-Rad

Image Studio Lite-5	Licor
Magellan	Tecan
NanoDrop-1000 V3.2.1	Thermo Fisher
NCBI	

Tabelle 3. Übersicht über die verwendete Software und die genutzte Internetseite

Antikörper	Firma
Anti-ABCA1	Novus Biologicals
Anti-ABCG1	Abcam
Anti- β -Aktin	Sigma
Anti-mouse	Bio-Rad
Anti-rabbit	Bio-Rad

Tabelle 4. Übersicht über die verwendeten Antikörper

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 5 sind die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet. Gängige Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen sowie Eppendorf- oder Reaktionsgefäße sind nicht aufgeführt.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Firma
Axiovert 25	Zeiss
Centrifuge 5417R	Eppendorf
CFX 384 Touch™ Real-Time System	Bio-Rad
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	MS Laborgeräte
Feinwaage	Sartorius
GS-800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad
Heidolph MR3001	SIGMA
HeraCell Brutschrank	Heraeus
HeraSafe Clean Bench	Thermo Fisher
Mini-Shaking Hybridisierungsofen OV 3	Biometra
Infinite M200	Tecan
Megafuge 2.0R	Heraeus
Mini-Trans Blot Cell	Bio-Rad
MS1 Minishaker IKA®	SIGMA

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB
pH-Meter	WTW pH 330i
Pipetboy	INTEGRA Biosciences
PowerPac 200/300	Bio-Rad
Röntgenfilmkassette	AppliGene
SDS-PAGE-Apparatur	Bio-Rad
Stickstofftank MVExc 34/18	MVE
ThermoMixer 5436	Eppendorf
ThermoMixer C	Eppendorf
Varifuge 3.0	Heraeus
Wasserbad	Memmert
10-cm-Zellkulturschalen	Corning
15-mL-Zentrifugenröhrchen	Falcon Brand
384-Well-Platten, klar	Bio-Rad
50-mL-Zentrifugenröhrchen	Falcon Brand
96-Well-Platte, klar und durchsichtig	Thermo Fisher
Freezing-Container ‚Mr. Frosty‘	Nalgene
Insulinspritzen	Terumo
Kryoröhrchen	Sarstedt
Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Millipore
Röntgenfilme	Thermo Fisher
T25	Falcon Brand
T75	Falcon Brand
T175	Falcon-Brand
Whatman-Papier	GE Healthcare
Zellschaber	Biochrom AG

Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle 6 ist die Herstellung der benutzten Lösungen zusammengefasst.

Trenngel-Puffer	1,5 M Tris, pH 8,8 in ddH ₂ O
-----------------	--

(Lagerung bei 4 °C)	
Sammelgel-Puffer (Lagerung bei 4 °C)	0,5 M Tris, pH 6,8 in ddH ₂ O
10%-SDS (Lagerung bei Raumtemperatur, RT)	10 g in 100 ml
10%-APS (Lagerung in Aliquots bei -20 °C)	0,1 g in 1 ml
10x SDS-Laufpuffer (Lagerung bei RT)	1,9 M Glycin 250 mM Tris 1 % SDS (w/v) in ddH ₂ O
Nassblotpuffer (Lagerung im Kühlraum)	25 mM Tris 192 mM Glycin 10 % Ethanol (v/v) in ddH ₂ O
ECL-Solution A (Lagerung im Kühlschrank)	50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris (pH 8,6)
ECL-Solution B (Lagerung bei RT im Dunkeln)	11 mg Para-Cumarinsäure in 10 ml DMSO
10x TBS (Lagerung bei RT)	200 mM Tris 1,5 M NaCl in ddH ₂ O (pH 7,5)
1x TBS-T (Waschpuffer) (Lagerung bei RT)	0,1 % Tween 20 in 1x TBS
Sucrose-Hepes-Puffer (bei -20 °C einfrieren)	0,2 M Sucrose: 3,423 g / 50 ml 0,02 M Hepes: 0,238 g / 50 ml pH auf 7,3 einstellen (ca. 200 µl 2 M NaOH) → steril filtrieren
Sucrose-Hepes + Complete (Aliquots bei -20 °C einfrieren; nur drei Monate haltbar)	1 Tablette Complete Ultra in 10 ml Sucrose-Hepes lösen
Glycin-Stripping-Puffer	0,1 M Glycin

(Lagerung bei RT)	1,1 % HCl in ddH ₂ O
2x-SDS-Probenpuffer (2x-SDS-PP)	0,1 M Tris (pH 6,8) 8 % (w/v) SDS 40 % (w/v) Glycerin 0,2 mg/mL Bromphenolblau 20 % β -Mercaptoethanol
Ponceau-Lösung	0,1 % Ponceau S (w/v) 5 % Essigsäure (v/v) in ddH ₂ O
Blockierlösung	5 % Trockenmilch in 1x TBS-T
Antikörper-Verdünnungslösung	Antikörper mit entsprechender Verdünnung in Blockierlösung
EDTA/PBS	0,1 % EDTA (w/v) in 1x PBS

Tabelle 6. Übersicht über die Herstellung der Lösungen

3.3 Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die Experimente wurden humane Hautfibroblasten verwendet. Die Zellen stammen von gesunden Spendern sowie Patienten mit HGPS. Bei den Versuchen wurden auch die jeweiligen durch hTERT immortalisierten Zelllinien untersucht (siehe Kapitel 3.3.1). Die untersuchten Fibroblastenzelllinien sind in den Tabelle 7 und Tabelle 8 dargestellt.

Kontrollzelllinien		Beschreibung	Herkunft
CON1	731	männlich, fünf Monate alt bei Biopsieaufnahme	Kinderklinik, Münster
CONT1	731 TERT		
CON2	811	weiblich, einen Monat alt bei Biopsieaufnahme	Kinderklinik, Münster
CONT2	811 TERT		

Tabelle 7. Beschreibung der Kontrollzelllinien

HGP-Zelllinien		Beschreibung	Herkunft
HGP1	FN127	weiblich, fünf Jahre, Mutation in Exon 11: C → T, klinisch auffällig	Progeria Research Foundation, USA
HGPT 1	FN127 TERT		
HGP2	HGP178	weiblich, sechs Jahre und elf Monate, Mutation in Exon 11: C → T, klinisch auffällig	Progeria Research Foundation, USA
HGPT 2	FN178 TERT		
HGP3	HGP003	männlich, zwei Jahre, Mutation in Exon 11: C → T, klinisch auffällig	Progeria Research Foundation, USA
HGPT3	FN003TERT		

Tabelle 8. Beschreibung der HGP-Zelllinien

3.3.1 Immortalisierung der Zellen

Die Zellen wurden durch Brigitte Köttgen (Arbeitsgruppe Walter) immortalisiert. Dabei wurden Fibroblasten mit retroviralen Überständen von einer Verpackungszelllinie (PA317-TERT) infiziert, die menschliche Telomerase exprimieren. Danach wurden die Zellen innerhalb von zwei Wochen mit Pyromycin selektiert. Die erfolgreiche Infektion der Zellen mit hTERT wurde mittels *telomerase repeat amplification protocol* (TRAP)-Assay und qPCR überprüft. Mittels TRAP-Assay wurde die Telomerase-Aktivität, mittels qPCR die Expression von hTERT bestimmt.

3.3.2 Auftauen der Zellen

Die Zellen waren in einem Stickstofftank kryokonserviert und wurden daher zunächst kurz im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend tropfenweise in 15-ml-Falcons überführt, in denen sich 9 ml warmes Medium befanden. Danach wurden die Falcons für 5 min bei 1200 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml warmem Medium aufgenommen und in eine T25-Kulturflasche überführt, die frisches warmes Medium enthielt.

3.3.3 Einfrieren der Zellen

Als Reserve wurden einige Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen wie beim Splittvorgang (siehe Kapitel 3.3.4.2) bis zum Trypsinieren behandelt und mit frischem Medium aufgenommen. Danach wurde das Zellpellet für 5 min bei 1200 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in 1 ml 10%-DMSO/DMEM-Lösung resuspendiert, in beschriftete Kryoröhrchen gegeben und in einer mit Isopropanol gefüllten Kryobox 24 h lang langsam auf -80 °C gekühlt. Danach wurden die Kryoröhrchen in einem Stickstofftank eingelagert.

3.3.4 Zellkultur

3.3.4.1 Mediumwechsel

Die Zellen wurden in DMEM, in einem 95 % befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert. Die endgültige Zusammensetzung des DMEM-Nährmediums ist in der folgenden Tabelle 9 beschrieben.

Supplement	Anteil in der fertigen DMEM-Lösung
Fetales Kälberserum (FKS)	10 % (v/v) für Kontrollzellen
	15 % (v/v) für Progerie-Zellen
Penicillin und Streptomycin	1 % (v/v)

Tabelle 9. Zugaben und deren Anteile im DMEM

Bei den Zellen wurde alle vier oder fünf Tage das Medium gewechselt. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und neues Medium wurde hinzugefügt (siehe Tabelle 10).

Zellkulturflasche	PBS-Volumen [ml]	Medium-Volumen [ml]
T25	4	4
T75	10	12
T175	18	22
10-cm-Zellkulturschale	8	10

Tabelle 10. Volumina des Nährmediums für den Mediumwechsel (T25: 25 cm²; T75: 75 cm²; T175: 175 cm²)

3.3.4.2 Subkultivierung der Zellen

Wenn die Zellen zu 100 % konfluent waren, wurden sie gesplittet. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 0,1%iger EDTA/PBS-Lösung gewaschen, woraufhin diese Lösung erneut abgesaugt wurde. Danach wurde Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, je nach Größe der Zellkulturflasche (wie in Tabelle 11 aufgeführt).

Zellkulturflasche	EDTA/PBS 01%ig [ml]	Trypsin/EDTA [µl]	für Aufnahme [ml]
T25	4	300	3,5
T75	10	500	9,5
T175	18	1000	17
10-cm- Zellkulturschale	8	400	7,5

Tabelle 11. Volumina von Lösungen für das Zellsplitten (T25: 25 cm²; T75: 75 cm²; T175: 175 cm²)

Anschließend wurden die Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C für ca. 10 min inkubiert. Dadurch wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mit frischem Medium aufgenommen, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Die Zellen wurden entweder auf mindestens zwei gleich große Kulturflaschen gesplittet oder in eine große Kulturflasche und eine 10-cm-Kulturschale überführt (siehe Abbildung 5). Die Zellen wurden täglich überprüft und bei Erreichen einer 100%-Konfluenz erneut gesplittet. Die Populationsverdopplungszahl (PD-Zahl) wurde folgendermaßen berechnet:

$$PD_{\text{neu}} = PD_{\text{alt}} + \frac{\log \frac{S_2}{S_1}}{\log 2}$$

S2: Fläche der neuen Zellkulturflasche

S1: Fläche der alten Zellkulturflasche

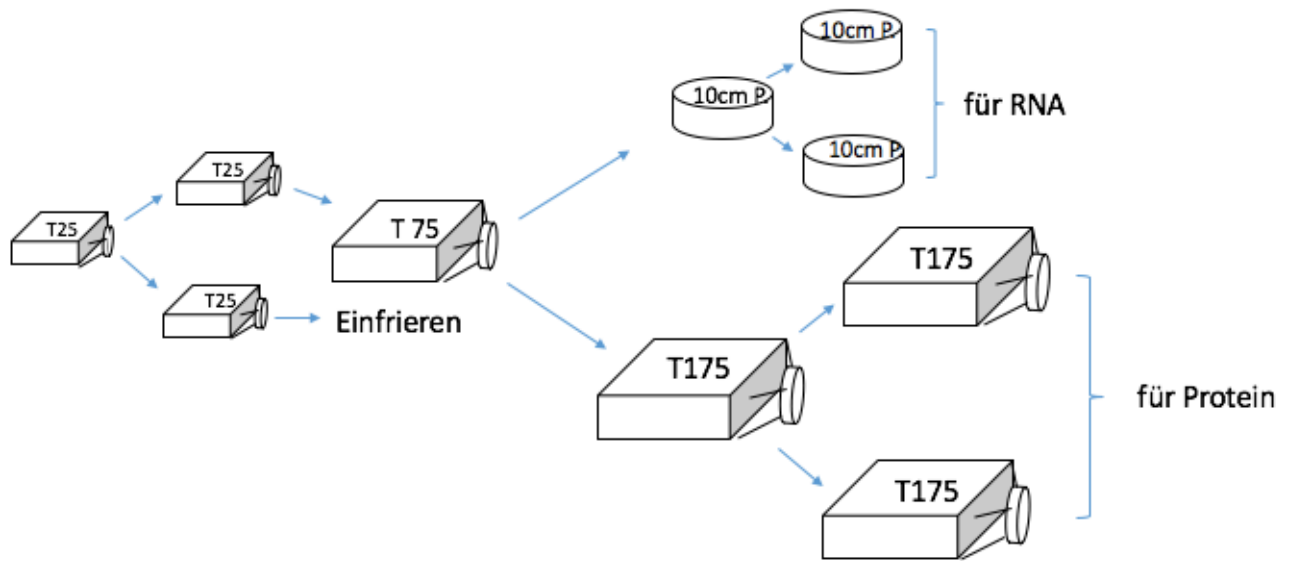


Abbildung 5. Arbeitsschema des Zellsplittens (T25: 25 cm²; T75: 75 cm²; T175: 175 cm², 10 cm P: 10-cm-Zellkulturschale)

3.3.4.3 Cholesterinbeladung der Zellen

Für die Experimente wurden die Zellen jeweils ohne und mit Cholesterinbeladung vorbereitet. Um die Zellen mit Cholesterin zu beladen, wurde das Cholesterin zunächst in 100%-EtOH gelöst und ein Medium mit Cholesterin mit einer Endkonzentration von 20 µg/ml vorbereitet. Das mit Cholesterin angereicherte Medium wurde auf die Zellen gegeben, woraufhin die Zellen für 24 Stunden weiter inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde die Beladung unter dem Mikroskop kontrolliert, wobei bei cholesterinbeladenen Zellen schwarze Kristalle sichtbar wurden (siehe Abbildung 6).

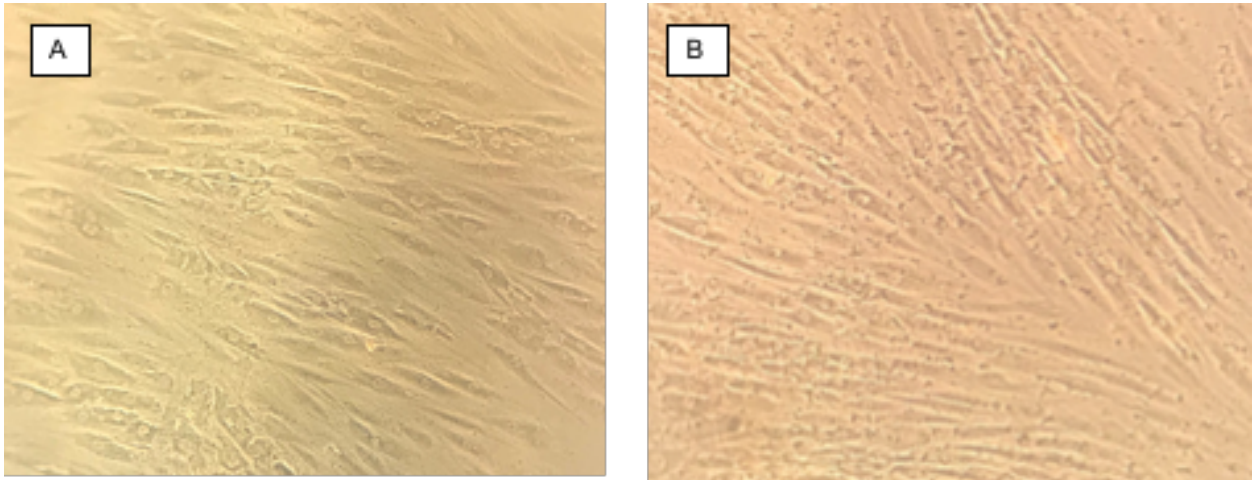


Abbildung 6. Hautfibroblasten ohne Cholesterinbeladung (A) und Hautfibroblasten nach Cholesterinbeladung (B). Die schwarzen Punkte zeigen die von den Zellen aufgenommenen Cholesterinkristalle.

3.4 Ernten der Zellen

Wenn genug Zellen für die Experimente gesammelt wurden, wurden diese für Protein- und RNA-Proben geerntet. Für RNA-Proben wurden in einem 1-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß für jede Zellkulturschale 350 µl Reagenz A (RA1-Lysispuffer) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol zusammengemischt. Es wurde versucht, schnell zu arbeiten, da diese Lösung irreversibel kristallisieren kann. Das Medium wurde von der 10-cm-Kulturschale abgesaugt und die Zellen wurden gründlich mit PBS gewaschen, wobei dieses auch abgesaugt wurde. Alle Reste des Mediums und PBS müssen gründlich abgesaugt werden, um später bei der RNA-Extraktion die Kontamination zu vermeiden. Nachdem jeweils 350 µl der beschriebenen Lösung auf die Zellen gegeben wurden, wurde die Kulturschale so lange geschwenkt, bis die Viskosität der Suspension abnahm und die Zellen sich gelartig vom Boden lösten. Dann wurde diese gelartige Masse mittels Zellschaber vom Boden der Petrischale abgekratzt, mit einer Pipette in das vorher beschriebene Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und schnell in einem -80 °C kalten Gefrierschrank bis zur RNA-Extraktion eingefroren.

Zur Erstellung von Proteinproben wurden die Zellen wie beim Splittvorgang (siehe Kapitel 3.3.4.2) behandelt und mit 10 ml kaltem PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei RT und 1200 rpm abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, woraufhin das Pellet mit ebenfalls kaltem

Hepes/Sucrose/Complete(H/S/C)-Puffer aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurde.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Protein-Extraktion

Die für Proteinproben eingefrorene Zellsuspension wurde im Eis aufgetaut. Danach wurde mithilfe einer Insulinspritze die Zellmembran zerstört, indem diese zehnmal auf- und abgezogen wurde. Es wurde darauf geachtet, dabei möglichst auf Eis zu arbeiten. Dann wurde die Lösung in $10\text{ }\mu\text{l}$ Aliquots aliquotiert. Die Aliquots wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Danach erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration.

3.5.2 BCA-Protein-Assay

Die Proteinkonzentration der Zellsuspension wurde mittels BCA-Protein-Assay im 96-Well-Format bestimmt. Dafür wurde zuerst die Standardreihe angesetzt (siehe Tabelle 12).

Name	Albuminkonzentration	Zusammensetzung
S1	25 $\mu\text{g/ml}$	200 μl S2 + 800 μl PBS
S2	125 $\mu\text{g/ml}$	500 μl S3 + 500 μl PBS
S3	250 $\mu\text{g/ml}$	500 μl S4 + 500 μl PBS
S4	500 $\mu\text{g/ml}$	250 μl S8 + 750 μl PBS
S5	750 $\mu\text{g/ml}$	500 μl S7 + 500 μl PBS
S6	1000 $\mu\text{g/ml}$	500 μl S8 + 500 μl PBS
S7	1500 $\mu\text{g/ml}$	750 μl S8 + 250 μl PBS
S8	2000 $\mu\text{g/ml}$	1 ml aus Ampulle

Tabelle 12. Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe. Eine Ampulle enthält Albumin in einer Konzentration von 2 mg/ml . S1 bis S7 stellen die Verdünnungen der Standardreihe mit unterschiedlicher Albuminkonzentration dar.

Danach wurde die BCA-Arbeitslösung angesetzt. Hierzu wurden 50 Teile von Reagenz A mit einem Teil von Reagenz B gemischt. Die Proteinproben wurden 1:10 mit PBS

verdünnt und pro Well wurden 10 µl der Standard- oder Proteinprobe aufgetragen. Daraufhin wurden 200 µl der BCA-Arbeitslösung hinzugefügt und die Platte wurde geschwenkt. Anschließend wurde die Platte für 30 min bei 37 °C in den Brutschrank gestellt und die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Magellans mit dem Infinite M200 bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die gemessenen Werte wurden in Excel ausgewertet (siehe Abbildung 7, Tabelle 13).

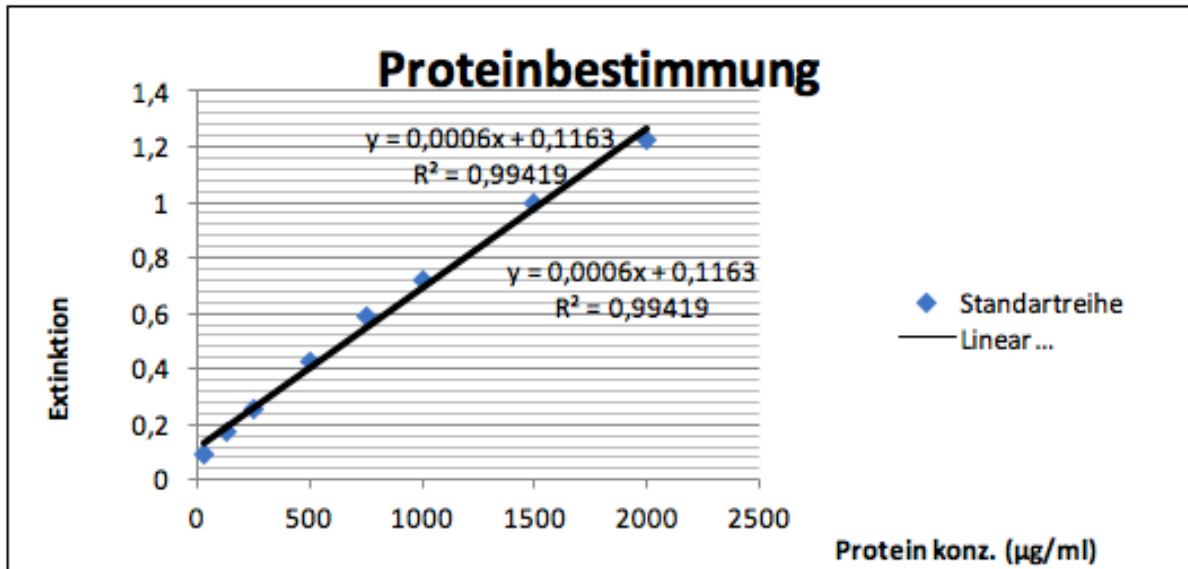


Abbildung 7. Proteinbestimmung der Standardreihe. Die Signalextinktion von Proben der Standardreihe steigt mit der Proteinkonzentration linear an.

Zelllinie	gemessene Extinktion	gemessene Proteinkonz. (µg/ml)	Probe verdünnt 1/10	Proteinkonzentration/ 1 µl	für 10 µg	H/S/ C	2x P P
731	0,3177	386,9444	3869,444	3,869444	2,58	7,42	10
731+chol	0,3417	426,9444	4269,444	4,269444	2,34	7,66	10
811	0,5983	854,7222	8547,222	8,547222	1,17	8,83	10
811+chol	0,5835	830	8300	8,3	1,20	8,80	10
FN127	0,286	334,1667	3341,667	3,341667	2,99	7,01	10
FN127+chol	0,244	264,1667	2641,667	2,641667	3,79	6,21	10
HGP178	0,2597	290,2778	2902,778	2,902778	3,44	6,56	10

HGP178+chol	0,375	482,5	4825	4,825	2,07	7,93	10
HGP003	0,3627	461,9444	4619,444	4,619444	2,16	7,84	10
HGP003+chol	0,3567	451,9444	4519,444	4,519444	2,21	7,79	10
731TERT	0,392	510,8333	5108,333	5,108333	1,96	8,04	10
731TERT+chol	0,411	542,5	5425	5,425	1,84	8,16	10
811TERT	0,397	519,1667	5191,667	5,191667	1,93	8,07	10
811TERT+chol	0,4605	625	6250	6,25	1,60	8,40	10
FN127TERT	0,32167	393,6111	3936,111	3,936111	2,54	7,46	10
FN127TERT+chol	0,3087	371,9444	3719,444	3,719444	2,69	7,31	10
HGP178TERT	0,3373	419,7222	4197,222	4,197222	2,38	7,62	10
HGP178TERT+chol	0,3437	430,2778	4302,778	4,302778	2,32	7,68	10
HGP003TERT	0,5197	723,6111	7236,111	7,236111	1,38	8,62	10
HGP003TERT+chol	0,5163	718,0556	7180,556	7,180556	1,39	8,61	10

Tabelle 13. Proteinbestimmung der Proben

3.5.3 Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gele für die Aufteilung der Proteingemische werden als diskontinuierliche Gele, bestehend aus Sammel- und Trenngel, gegossen. Die Komponenten für die beiden Gele wurden getrennt voneinander zusammengemischt. Dafür wurde zunächst 7,5%iges Trenngel mit einer Schichtdicke von 1,0 mm gegossen. Bei Zusammenmischen der Gelkomponente wurden Temed und APS als letztes zugefügt. Sobald das APS hinzugegeben wurde, sollte zügig gearbeitet werden, weil das APS die Polymerisierungsreaktion einleitet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das 4,5%ige Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm in das Gel gesteckt, um Taschen für die Probenauftragung zu erzeugen. Die Zusammensetzung der Gele ist in der folgenden Tabelle 14 zusammengefasst.

Trenngel	7,5 % Acrylamid Stock (v/v) 375 mM Trenngel-Puffer 0,1 % SDS (w/v) 0,1 % APS (w/v) 0,01 % TEMED (v/v) in ddH ₂ O	Sammelgel	4,5 % Acrylamid Stock (v/v) 167 mM Sammelgel-Puffer 0,1 % SDS (w/v) 0,1 % APS (w/v) 0,01 TEMED (v/v) in ddH ₂ O
----------	--	-----------	---

Tabelle 14. Zusammensetzung des 7,5%igen Trenngels und des 4,5%igen Sammelgels

Als nächstes wurden die Proteinproben für die Gelelektrophorese zubereitet. Dafür wurde von jeder Probe das für 10 µg geeignete Volumen pipettiert, auf 10 µl mit H/S/C-Puffer verdünnt und mit 2x-SDS-PP beschwert (siehe Tabelle 13). Anschließend wurden die Zellysate bei 60 °C für 10 min denaturiert und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei als Proteinmarker (PM) 5 µl Prestained-Protein-Ladder eingesetzt wurden. Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA für rund 100 min mit 1x-SDS-Laufpuffer.

3.5.4 Western Blot (Nassblot)

Um die Proteine vom SDS-PAGE-Trenngel auf eine Membran zu transferieren, wurde das Nassblot-Verfahren verwendet. Dazu wurden eine PVDF-Membran und vier Whatman-Papiere zurechtgeschnitten, wobei die PVDF-Membran zuerst für 5 min in Methanol aktiviert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die PVDF-Membran und das Whatman-Papier in Nassblotpuffer gelagert. Anschließend wurden die Proteine vom Trenngel bei 350 mA für 35 min auf die PVDF-Membran transferiert. Die Reihenfolge von Membran und Gel in der Nassblotkammer war wie folgt: Anode, zwei Whatman-Papiere, PVDF-Membran, Trenngel, zwei Whatman-Papiere, Kathode. Um den Proteintransfer zu überprüfen, wurde die Membran für 5 min mit einer Ponceau-Lösung eingefärbt, anschließend 2 min mit ddH₂O differenziert, wieder mit ddH₂O entfärbt und für den immunologischen Proteinnachweis verwendet.

3.5.5 Immunologischer Proteinnachweis

Für den Proteinnachweis wurde die PVDF-Membran zunächst für eine Stunde bei RT in Blockierlösung inkubiert, damit die freien Bindeplätze auf der Membran abgesättigt

werden. Anschließend wurde die PVDF-Membran bei 4 °C über Nacht mit einer primären Antikörper-Verdünnungslösung gegen ABCA1 bzw. ABCG1 durch Schütteln inkubiert (siehe Tabelle 15). Am folgenden Tag wurde die PVDF-Membran nach drei jeweils zehninütigen Waschvorgängen mit einem sekundären Antikörper bei RT für eine Stunde durch Schütteln inkubiert (siehe Tabelle 15). Danach erfolgten wieder drei Waschvorgänge von jeweils 10 min. Anschließend wurde auf die PVDF-Membran jeweils 1 ml (0,5 ml Lösung A und 0,5 ml Lösung B) der frisch angesetzten SuperSignal-West-Femto-Maximum-ECL-Lösung pipettiert. Nach 5 min Einwirkzeit wurde die PVDF-Membran entwickelt. Der ECL-Hyperfilm wurde im Fall von ABCA1 ca. 1 min und im Fall von ABCG1 ca. 10 sec belichtet.

3.5.6 Strippen der PVDF-Membran

Um sicherzustellen, dass auf das Gel die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde, wurde das Housekeeping-Protein β -Aktin detektiert (siehe Tabelle 15). Dazu wurde die Membran nach der Detektion von ABCG1 und ABCA1 für die weitere Benutzung gestrippt. Zunächst wurden die gebundenen Antikörper durch Inkubation der Membran mit Glycin-Stripping-Lösung für 30 min bei 60 °C durch Schütteln von der Membran entfernt. Nach den drei anschließenden, jeweils fünfminütigen Waschvorgängen mit 1x-TBST-T-Lösung wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei RT blockiert und mit primärem β -Aktin-Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die nächsten Schritte stimmen, bis auf die Verwendung der ECL-Lösung, mit den Schritten der ABCG1- und ABCA1-Detektion überein. Für β -Aktin wurde die selbsthergestellte ECL-Lösung verwendet. Die Einwirkzeit für diese ECL-Lösung betrug 2 min und der Film wurde 1 min belichtet.

Antikörper	ABCA1	ABCG1	β -Aktin
primärer Antikörper	1:1000	1:10 000	1 :40 000
sekundärer Antikörper	Anti-mouse IgG 1:5000	Anti-rabbit 1:10 000	Anti-mouse IgG 1:20 000

Tabelle 15. Verdünnung der primären und sekundären Antikörper gegen ABCA1, ABCG1 und β -Aktin-Gene mit Blocking-Puffer

3.6 Molekularbiologische Methoden: Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction

3.6.1 Isolierung der RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels Nucleospin-RNA-Kit. Dafür wurde RNA-Lysat durch einen Nucleo-Spin-Filter mit violetterem Ring für 1 min bei 11000 xg abzentrifugiert. Anschließend wurden 350 µl 70%iger Ethanol zu dem Filtrat hinzugefügt und sieben Mal hoch- und herunterpipettiert. Dieses Gemisch wurde durch einen neuen Filter mit hellblauem Ring für 30 sec bei 11000 xg zentrifugiert, wodurch RNA auf dem Filter abgefangen wurde. Darauf wurden 350 µl von Membran-Desalting-Buffer (MDB) addiert und bei 11000 xg für 1 min zentrifugiert. Auf das Zentrum der Silica-Membran wurden 95 µl des DNase-Reaktionsgemisches gegeben und die Membran wurde 15 min bei RT inkubiert (siehe Tabelle 16).

Reagenz	Volumen [µl]
reconstituted rDNase	10
reaction buffer for rDNase	90

Tabelle 16. Zusammensetzung des DNase-Reaktionsgemisches für jede RNA-Isolierung

Danach erfolgte die Reinigung der RNA. Hierzu wurden 200 µl RAW2-Puffer auf die Silica-Membran gegeben und 30 sec bei 11000 xg zentrifugiert. Danach wurde die Membran mit 600 µl RA3-Puffer ebenfalls für 30 sec bei 11000 xg zentrifugiert, danach erneut mit 250 µl RA3-Puffer für 2 min bei 11000 xg. Zuletzt wurde die RNA eluiert, indem auf die Silica-Membran 60 µl RNase-freies Wasser addiert und bei 11000 xg für 1 min zentrifugiert wurden. Bei den nächsten Schritten wurde auf Eis gearbeitet.

3.6.2 Messung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte am NanoDrop-ND-1000-Spectrophotometer. Dafür wurde die RNA-Proben unverdünnt bei 260 nm Wellenlänge gemessen. Die Reinheit der Proben wurde durch die Quotienten von 260 nm und 280 nm sowie 260 nm und 230 nm bestimmt, die ungefähr 2,0 betragen sollten. Der

Quotient von 260 nm und 280 nm weist die Reinheit gegenüber Proteinen und Alkoholen nach, der von 260 nm und 230 nm die gegenüber Kohlenhydraten. Die isolierte RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6.2.1 Synthese der Complementary DNA

Als Erstes wurden die Proben auf 1 µg RNA pro 17 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Dann wurden zu jeder Verdünnungsprobe 0,5 µl Random Primer hinzugegeben, die Proben wurden gevortext und für die Denaturierung sowie Bindung des Random Primer bei 70 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Danach wurden zu jeder Probe 7,5 µl Mastermix für die Elongation der Complementary DNA (cDNA) addiert und die Proben wurden 1 h bei 37 °C inkubiert (siehe Tabelle 17). Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Reagenz	pro Reaktion [µl]
MMLV 5x Buffer	5,00
dNTPs (jedes 10µM)	1,25
RNase out	0,75
M-MLV RT	0,50
gesamt	7,50

Tabelle 17. Zusammensetzung des Mastermix pro Reaktion für die cDNA-Synthese

3.6.2.2 Durchführung der Real-Time-PCR

Die cDNA-Proben wurden mit Milli-Q-Wasser auf 20 ng verdünnt und der in Tabelle 18 dargestellte Mastermix wurde für die untersuchten ABCA1- und ABCG1-Gene sowie das Housekeeping-Gen Cyclophilin auf Eis zusammenpipettiert.

Reagenz	pro Reaktion [µl]	Endkonzentration
TaqMan Gene Expression Assays, 20x	0,5	1x
TaqMan Universal Master Mix II 2x	5,0	1x
MQ	1,5	
Gesamtvolumen Mastermix/Well	7,0	

cDNA/Well	3,0	
-----------	-----	--

Tabelle 18. Zusammensetzung des Mastermix für die Genexpressionsanalyse von ABCA1, ABCG1 und Cyclophilin

Dann wurden für jedes Gen 3 µl von jeder cDNA-Verdünnung als Dreifach-Ansatz auf eine 384-Well-Platte aufgebracht. Die Platte wurde kurz zentrifugiert. Anschließend wurden zu jedem Well 7 µl des geeigneten Mastermix pipettiert. Die Platte wurde erneut kurz zentrifugiert und in den Plattenreader des CFX384-Real-Time-Systems gestellt. Das Thermoprofil für die Amplifizierung ist in der folgenden Tabelle 19 dargestellt.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
initiale Denaturierung	95	10:00	
Denaturierung	95	00:15	} 50 Zyklen
Annealing	60	01:00	
Kühlung und Lagerung	4	∞	

Tabelle 19. Temperaturprofil für die Genexpressionsanalyse von ABCA1, ABCG1 und Cyclophilin

3.7 Auswertung und Statistik

Die Werte der Genexpressionsanalyse wurden mithilfe des CFX Manager 3.1 von Bio-Rad und der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode in Excel ausgewertet. Die semiquantitative Auswertung des Western Blots erfolgte mittels Image Studio Lite-5 von Licor und Excel. Bei beiden Untersuchungen wurde die Signifikanz der veränderten Genexpression und Proteinbiosynthese mittels t-Test (Grenzwert $p < 0,05$) berechnet.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurde HGPS als Modellkrankheit für Alterungsprozesse ausgewählt. Obwohl Patienten mit HGPS nicht alle Merkmale und Risikofaktoren des physiologischen Alterns aufweisen, da z. B. bei Kindern mit HGPS trotz vorzeitiger Multisystemalterung keine kognitive Verschlechterung und kein erhöhtes Krebsrisiko vorzuliegen scheint, so ähneln die kardiovaskulären Befunde bei Progerie doch in vielerlei Hinsicht den altersbedingten Veränderungen (154, 156). Dazu gehören ausgeprägte Atherosklerose, Verkalkung der Aorten- und Mitralklappe sowie der Koronararterien und der Aorta, wobei diese Phänomene bei HGPS-Patienten nicht ausreichend durch bekannte Risikofaktoren von Atherosklerose erklärt werden können (154). Deswegen sind Untersuchungen von HGPS für das Verständnis von Pathomechanismen der Atherosklerose, auch im Rahmen des physiologischen Alterns, essenziell.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die beiden wesentlichen Komponenten beim reversen Cholesterintransport, einem protektiven Prozess bei der Atherosklerose, zu analysieren, um die Funktion dieser Transporter beim Lipidmetabolismus, der Entstehung von Atherosklerose und somit indirekt dem Alterungsprozess besser zu verstehen.

Da sowohl ABCA1 als auch ABCG1 eine bedeutende Rolle im Cholesterin-Metabolismus einnehmen, wurde in der vorliegenden Dissertation die Expression beider Transporter auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Dazu wurden die drei HGP-Zelllinien (HGP1, HGP2, HGP3) mit den Kontrollzelllinien zweier gesunder Probanden (CON1, CON2) verglichen. Alle Analysen erfolgten mit Cholesterin-beladenen sowie unbehandelten Zellen. Um den Einfluss der Telomerlänge auf die Expression der Transporter ABCA1 und ABCG1 zu ermitteln, wurden die Experimente sowohl mit basalen Zellen (CON1, CON2, HGP1, HGP2, HGP3) als auch mit Zellen nach hTERT-Immortalisierung (CONT1, CONT2, HGPT1, HGPT2, HGPT3) durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Bei den mRNA-Untersuchungen wurde die relative mRNA-Menge mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die Expression von ABCA1 und ABCG1 auf Proteinebene wurde durch Western-Blots analysiert und anschließend quantifiziert. Bei der Auswertung wurden die

Ergebnisse auf den Wert einer Kontrollzelllinie mit niedrigerer Protein- und mRNA-Menge (CON2) ohne Cholesterinbeladung normiert (jeweils relative mRNA-Menge und Proteinmenge von CON2 = 1).

4.1 Expression der ABC-Transporter A1 und G1 auf mRNA-Ebene

4.1.1 ABCA1-Expression auf mRNA-Ebene

Die Expression des ABCA1-Transporters ist in primären, ohne Cholesterin beladenen HGP-Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten auf mRNA-Ebene signifikant auf 44 ± 9 % reduziert ($p < 0,001$). Nach Cholesterinbeladung der primären Zellen zeigten sowohl Kontroll- als auch HGP-Fibroblasten eine signifikant höhere mRNA-Expression für das ABCA1-Gen, wobei der relative Anstieg bei HGP-Fibroblasten (ca. 2,9-fach) höher als bei Kontrollfibroblasten (ca. 1,6-fach) war, aber das Niveau der Kontrollzellen nicht erreichte (siehe Abbildung 9).

hTERT immortalisierte Kontrollfibroblasten wiesen unter Basalbedingungen eine 1,7-fach erhöhte Expression auf ($p < 0,001$). hTERT immortalisierte HGP-Fibroblasten wiesen unter Cholesterinbeladung einen geringen, aufgrund großer Streuungen über nicht signifikanten Anstieg auf. Die Immortalisierung konnte ABCA1 unter Basalbedingungen nicht „normalisieren“ (siehe Abbildung 8 und Abbildung 9).

In der folgenden Tabelle 20 sind die p-Werte zusammengefasst.

a)	Vergleichsgruppe	p-Werte	b)	Vergleichsgruppe	p-Werte
	CON- vs. CONT-	0,0009		CON1-/CON1+	0,0235
	CON+ vs. CONT+	0,0009		CON2-/CON2+	0,0267
	HGP- vs. HGPT-	0,3202		HGP1-/HGP1+	0,0027
	HGP+ vs. HGPT+	0,4898		HGP2-/HGP2+	0,0044
				HGP3-/HGP3+	0,0007
	CON- vs. HGP-	$5,316 \times 10^{-07}$			
	CON+ vs. HGP+	0,0133		CONT1-/CONT1+	0,0042
	CONT- vs. HGPT-	$1,389 \times 10^{-05}$		CONT2-/CONT2+	0,0125
	CONT+ vs. HGPT+	0,3887		HGPT1-/HGPT1+	0,0053
				HGPT2-/HGPT2+	0,0003
				HGPT3-/HGPT3+	0,0005

Tabelle 20. mRNA-Expression von ABCA1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: primäre Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; CONT: hTERT-immortalisierte

Kontrollfibroblasten; HGPT: hTERT-immortalisierte HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung)

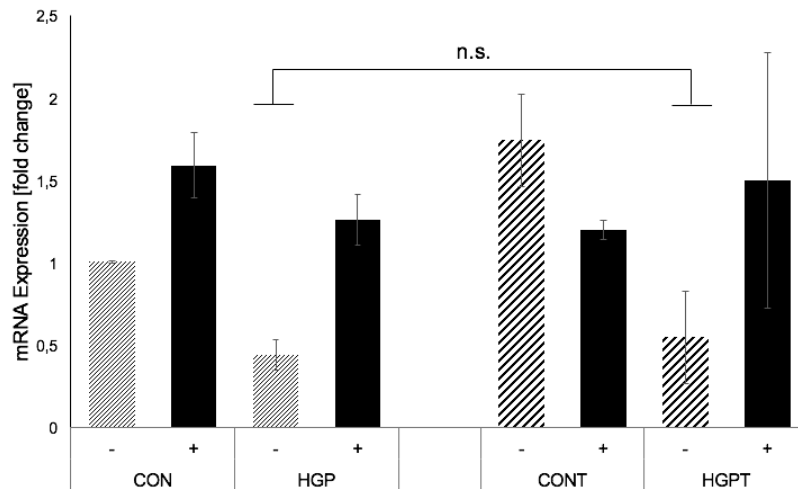


Abbildung 8. Zusammenfassende Darstellung der ABCA1-mRNA-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- bzw. HGP-Fibroblasten; n.s.: nicht signifikant)

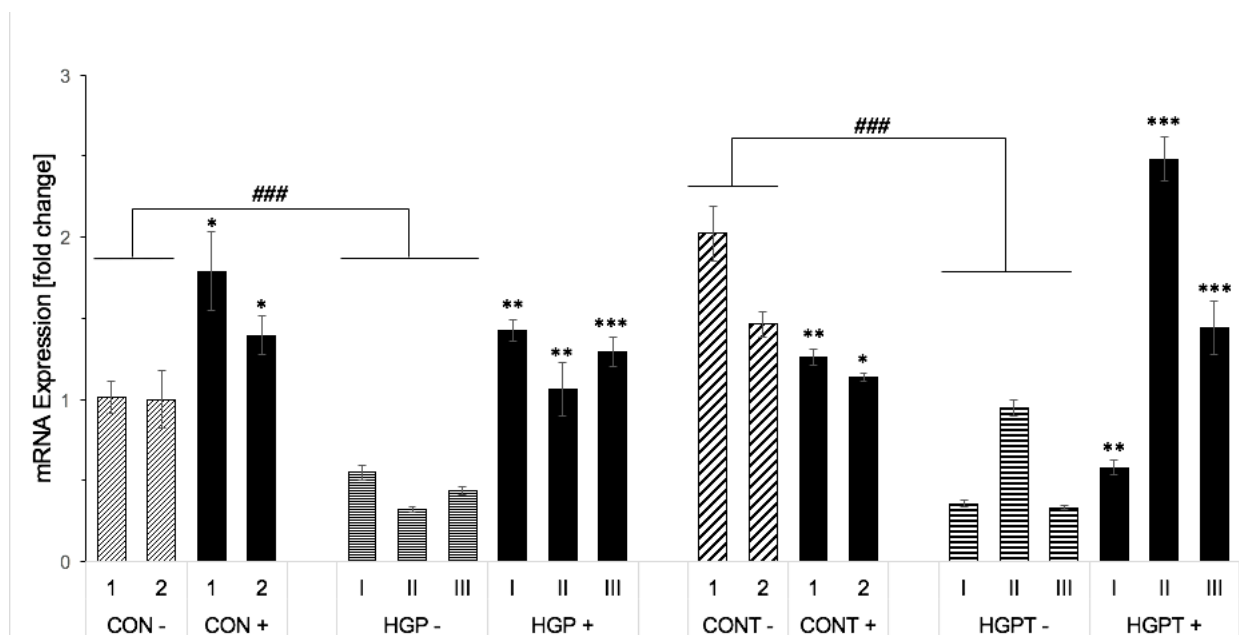


Abbildung 9. ABCA1-mRNA-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (,-' : Zellen ohne Cholesterinbeladung; ,+' : Zellen mit Cholesterinbeladung; CON: primäre Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; */**/***: signifikanter Unterschied der cholesterinbeladenen Fibroblasten gegenüber den entsprechenden nicht cholesterinbeladenen Fibroblasten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** oder ###: $p < 0,001$))

4.1.2 ABCG1-Expression auf mRNA-Ebene

Die Genexpressionanalyse für ABCG1 zeigte bei den primären HGP-Fibroblasten mit einer Ausnahme (HGP2) eine höhere Expression als bei den Kontrollfibroblasten (im Durchschnitt 2,5-fach). Cholesterinbeladung führte zu einer Verdopplung der ABCG1 mRNA sowohl bei Kontrollzellen als auch bei HGP-Zellen (siehe Abbildung 11).

HGP-Fibroblasten exprimierten nach hTERT-Infektion sowohl in den nicht cholesterinbeladenen als auch in den cholesterinbeladenen Zellen signifikant weniger ABCG1-mRNA als primäre HGP-Fibroblasten (Reduktion um 56-97 %) (siehe Abbildung 10). Nur HGP-Fibroblasten zeigten nach Immortalisierung eine höhere Genexpression für ABCG1 nach Cholesterinbeladung. Die Cholesterinbeladung der Kontrollzellen führte nach Immortalisierung zu einer geringeren Expression des ABCG1 (siehe Abbildung 11).

a)	Vergleichsgruppe	p-Werte	b)	Vergleichsgruppe	p-Werte
	CON- vs. CONT-	0,023		CON1-/CON1+	0,0407
	CON+ vs. CONT+	0,0024		CON2-/CON2+	0,0304
	HGP- vs. HGPT-	8,092 x 10 ⁻⁰⁵		HGP1-/HGP1+	0,0035
	HGP+ vs. HGPT+	0,0004		HGP2-/HGP2+	0,0159
				HGP3-/HGP3+	0,0035
	CON- vs. HGP-	0,0743			
	CON+ vs. HGP+	0,0003		CONT1-/CONT1+	0,0372
	CONT- vs. HGPT-	2,729 x 10 ⁻⁰⁶		CONT2-/CONT2+	0,0073
	CONT+ vs. HGPT+	0,0653		HGPT1-/HGPT1+	0,3816
				HGPT2-/HGPT2+	0,0048
				HGPT3-/HGPT3+	0,0093

Tabelle 21. mRNA-Expression von ABCG1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: primäre Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung)

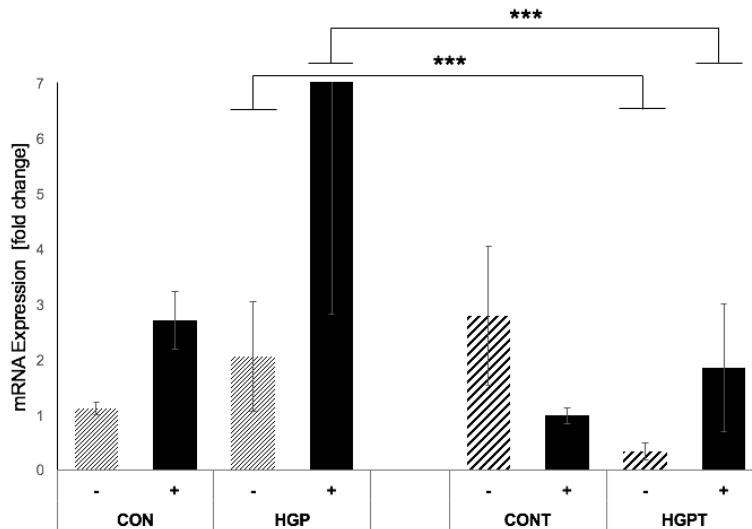


Abbildung 10. Zusammenfassende Darstellung der ABCG1-mRNA-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (-, +: Zellen ohne Cholesterinbeladung; -, +: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ***: $p < 0,001$)

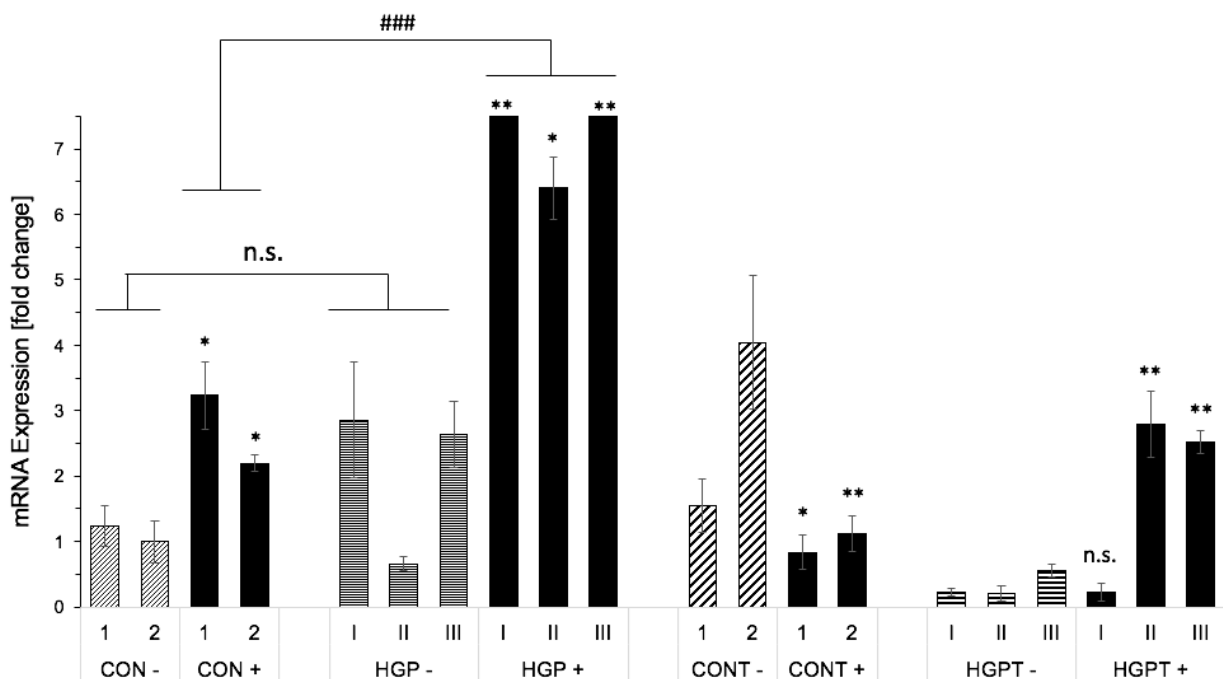


Abbildung 11. ABCG1-mRNA-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (-, +: Zellen ohne Cholesterinbeladung; -, +: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; */**: signifikanter Unterschied der cholesterinbeladenen Fibroblasten gegenüber den nicht cholesterinbeladenen Fibroblasten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$); n.s.: nicht signifikant)

4.2 Expression der ABC-Transporter A1 und G1 auf Proteinebene

Die Untersuchungen zum ABCA1 und ABCG1 auf Proteinebene wurden drei Mal durchgeführt und anschließend statistisch ausgewertet (siehe Abbildung 12).

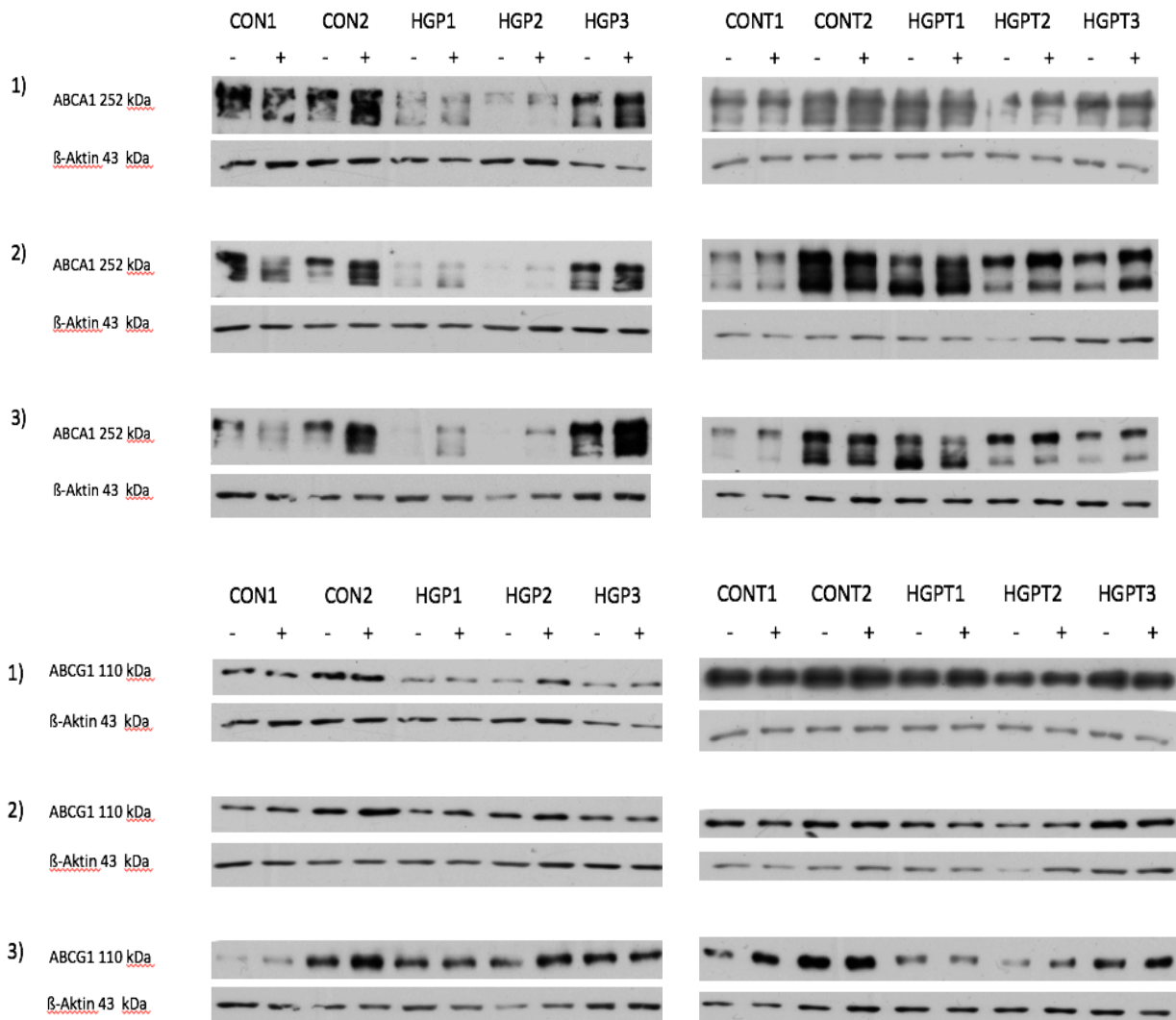


Abbildung 12. Western-Blot-Bilder der ABCA1- und ABCG1-Protein-Expression aus drei unterschiedlichen Versuchen (CON: primäre Kontrollfibroblasten; CONT: hTERT-immortalisierte Kontrollfibroblasten; HGP: primäre HGP-Fibroblasten; HGPT: hTERT-immortalisierte HGP-Fibroblasten; '-': Zellen ohne Cholesterinbeladung; '+': Zellen mit Cholesterinbeladung)

4.2.1 ABCA1-Expression auf Proteinebene

In primären HGP-Fibroblasten ist die ABCA1-Protein-Expression im Vergleich zu Kontrollfibroblasten, mit einer Ausnahme (HGP3), signifikant niedriger (Reduktion im Mittel auf $54 \pm 56\%$). Nach Cholesterinbeladung wird die Protein-Expression in HGP-Fibroblasten deutlich induziert auf nahezu Normal-Level, mit allerdings großer Streuung zwischen den Zelllinien. Nach hTERT-Immortalisierung der Zellen ist die ABCA1-Protein-Expression in den HGP-Fibroblasten, HGPT3 ausgenommen, sowohl mit als auch ohne Cholesterinbeladung angestiegen (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14).

a)	Vergleichsgruppe	p-Werte	b)	Vergleichsgruppe	p-Werte
	CON- vs. CONT-	0,1659		CON1-/CON1+	0,1543
	CON+ vs. CONT+	0,2425		CON2-/CON2+	0,0177
	HGP- vs. HGPT-	0,0647		HGP1-/HGP1+	0,0304
	HGP+ vs. HGPT+	0,0978		HGP2-/HGP2+	0,0942
				HGP3-/HGP3+	0,1102
	CON- vs. HGP-	0,0541		CONT1-/CONT1+	0,1669
	CON+ vs. HGP+	0,2992		CONT2-/CONT2+	0,1888
	CONT- vs. HGPT-	0,4216		HGPT1-/HGPT1+	0,2332
	CONT+ vs. HGPT+	0,3700		HGPT2-/HGPT2+	0,2656
				HGPT3-/HGPT3+	0,0590

Tabelle 22. Protein-Expression von ABCA1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit den entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: Kontrollfibroblasten; HGP: HGP-Fibroblasten; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ‚-‘: ohne Cholesterinbeladung; ‚+‘: mit Cholesterinbeladung)

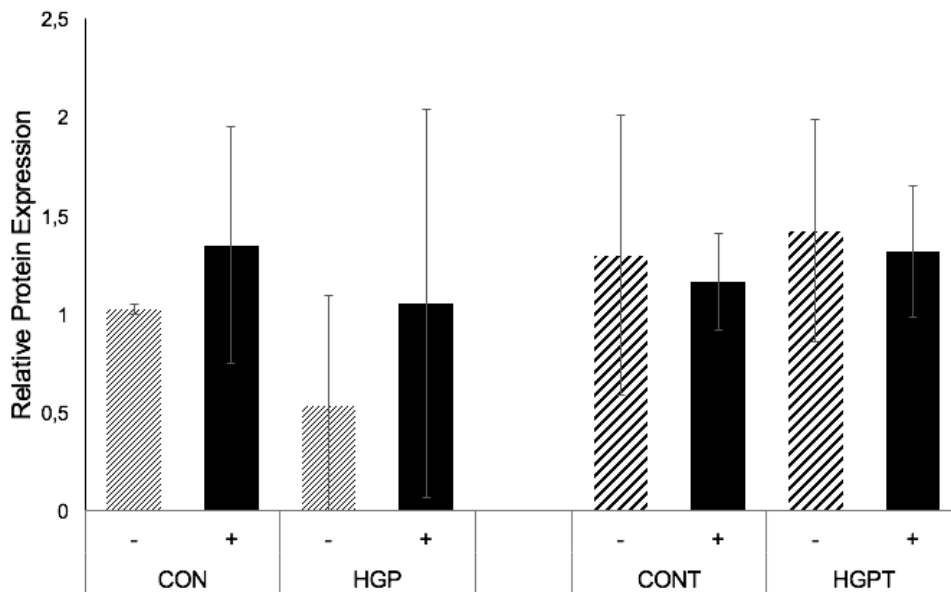


Abbildung 13. Zusammenfassende Darstellung der ABCA1-Protein-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (-: Zellen ohne Cholesterinbeladung; +: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten)

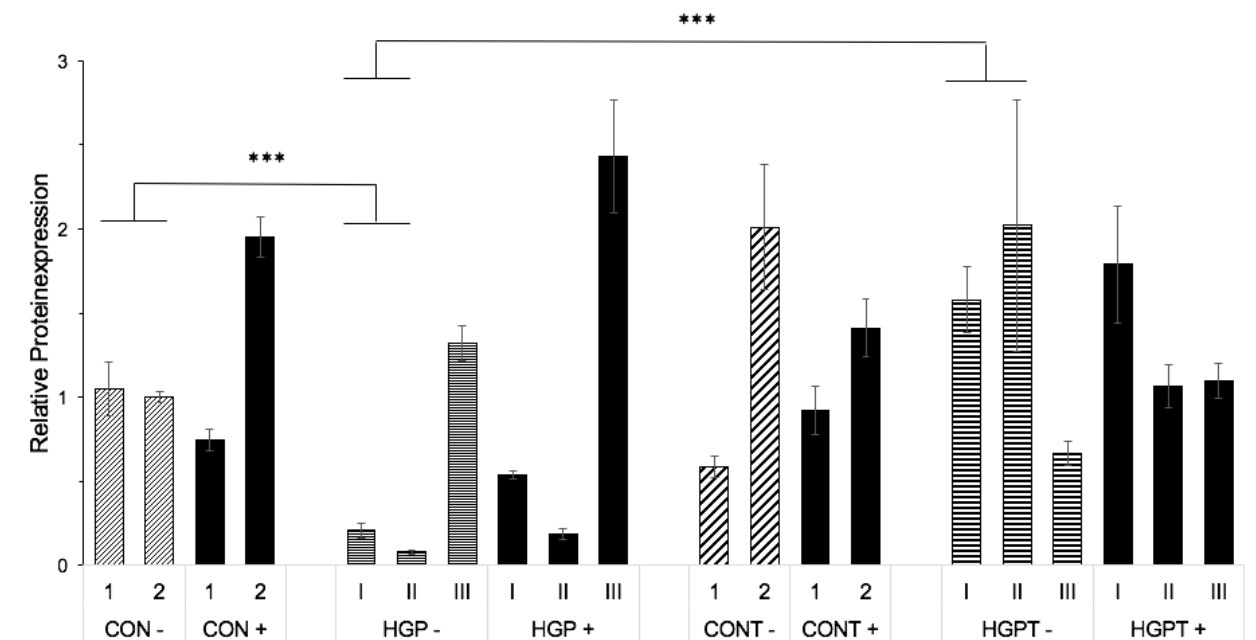


Abbildung 14. ABCA1-Protein-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (-: Zellen ohne Cholesterinbeladung; +: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; ***: $p < 0,001$)

4.2.2 ABCG1-Expression auf Proteinebene

Primäre HGP-Fibroblasten unterscheiden sich bei der ABCG1-Protein-Expression kaum von den Kontrollfibroblasten. Die Cholesterinbeladung der Zellen führte nicht zu einem wesentlichen Unterschied, sowohl in den Kontroll- als auch in den HGP-Fibroblasten bei der ABCG1-Protein-Menge. Bei den hTERT-immortalisierten Fibroblasten waren im Vergleich zu den primären Zellen signifikant höhere zelluläre Proteinkonzentrationen zu beobachten. Diese Tendenz zeigte sich sowohl in den HGP-Fibroblasten als auch in den Kontrollzellen. Aus der Cholesterinbeladung resultierte bei allen immortalisierten Zellen kein relevanter Unterschied bei der ABCG1-Protein-Expression (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

a)	Vergleichsgruppe	p-Werte	b)	Vergleichsgruppe	p-Werte
	CON- vs. CONT-	0,0225		CON1-/CON1+	0,3353
	CON+ vs. CONT+	0,0595		CON2-/CON2+	0,1121
	HGP- vs. HGPT-	0,0269		HGP1-/HGP1+	0,0737
	HGP+ vs. HGPT+	0,0528		HGP2-/HGP2+	0,2224
				HGP3-/HGP3+	0,3543
	CON- vs. HGP-	0,3125			
	CON+ vs. HGP+	0,3009		CONT1-/CONT1+	0,0347
	CONT- vs. HGPT-	0,3609		CONT2-/CONT2+	0,0855
	CONT+ vs. HGPT+	0,3986		HGPT1-/HGPT1+	0,2190
				HGPT2-/HGPT2+	0,3118
				HGPT3-/HGPT3+	0,2560

Tabelle 23. Protein-Expression von ABCG1 (zusammenfassender Vergleich von jeweils zwei Gruppen (a) und Vergleich der einzelnen cholesterinbeladenen Zelllinien mit den entsprechenden basalen Zelllinien anhand der p-Werte (b) (CON: Kontrollfibroblasten; HGP: HGP-Fibroblasten; ,-' : ohne Cholesterinbeladung; ,+' : mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten)

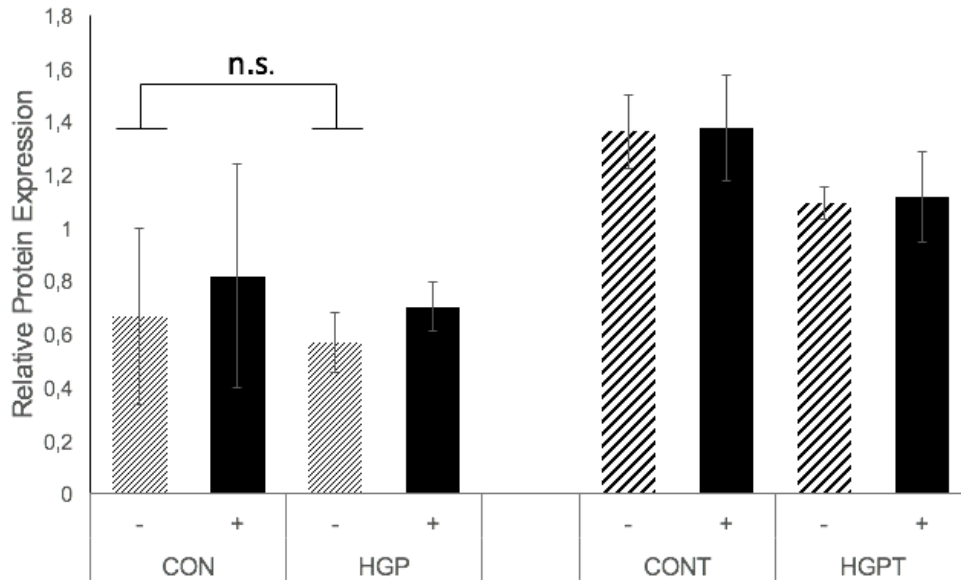


Abbildung 15. Zusammenfassende Darstellung der ABCG1-Protein-Expression in Kontroll- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen die Mittelwerte für alle Kontrollfibroblasten (CON) und HGP-Fibroblasten (HGP) mit zweiseitiger Standardabweichung dar. (-, +: Zellen ohne Cholesterinbeladung; -, +: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; n.s.: nicht signifikant)

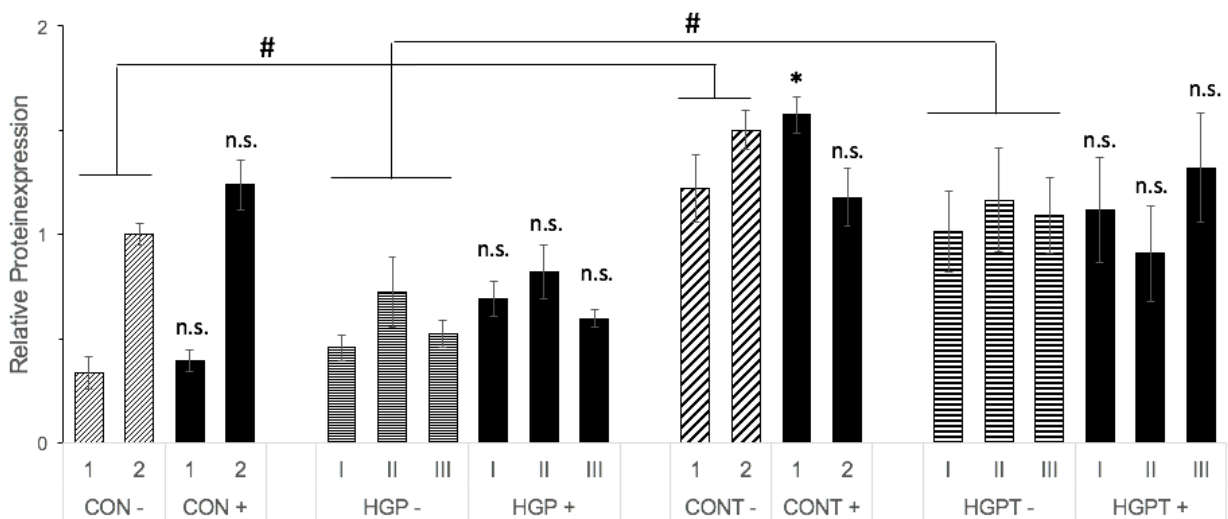


Abbildung 16. ABCG1-Protein-Expression der Kontroll(CON)- und HGP-Fibroblasten. Die Werte stellen Mittelwerte mit zweiseitiger Standardabweichung dar und beziehen sich auf den Wert von CON2 ohne Cholesterinbeladung. (-, +: Zellen ohne Cholesterinbeladung; -, +: Zellen mit Cholesterinbeladung; CONT/HGPT: durch hTERT immortalisierte Kontroll- oder HGP-Fibroblasten; *: signifikanter Unterschied der cholesterinbeladenen Fibroblasten gegenüber den entsprechenden nicht cholesterinbeladenen Fibroblasten (* oder #: $p < 0,05$); n.s.: nicht signifikant)

5 Diskussion

Für normale zelluläre und systemische Funktionen ist die Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase von sehr großer Bedeutung, da Cholesterin als wesentlicher Zellmembranbestandteil, gemeinsam mit anderen Lipiden, die Steifheit, Fließfähigkeit und Permeabilität der Plasmamembran reguliert (20, 21).

Überschüssiges Cholesterin kann von peripheren Zellen HDL-vermittelt in die Leber transportiert werden, wobei die ersten Schritte des RCT den funktionsfähigen ABCA1-abhängigen Cholesterin-Efflux aus peripheren Zellen in die Plasma-Lipoproteine und deren anschließenden Transport zur Leber umfassen (40, 41).

Cholesterin-Efflux und Rücktransport in die Leber sind relevante Forschungsaspekte, weil die Fähigkeit von Makrophagen, Cholesterin effizient in den RCT-Weg abzuleiten, eine wesentliche Rolle bei der Prävention von Atherosklerose einnehmen kann (42).

5.1 Diskussion der Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hautfibroblasten von Patienten mit HGP-Syndrom untersucht, wobei Hautfibroblasten von gesunden Kindern als Kontrolle dienten. Alle Experimente wurden *in vitro* durchgeführt, weshalb die Ergebnisse nur eingeschränkt auf den menschlichen Organismus übertragbar sind.

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung standen für die Analysen nur wenige Patientenzelllinien zur Verfügung. Darüber hinaus wiesen die Fibroblasten in der Zellkultur ein langsames Wachstum auf, weswegen die Experimente in kleinen Stichproben durchgeführt wurden. Die Streuung einzelner Ergebnisse schränkt die Aussagekraft daher ein.

Es erfolgten jeweils drei Western-Blots von primären Fibroblasten ohne jegliche Behandlung sowie Fibroblasten mit Cholesterinbeladung. Um den Einfluss der Telomerlänge auf die Expression von ABCA1 und ABCG1 zu untersuchen, wurden die gleichen Experimente auch an mittels hTERT immortalisierten Zellen durchgeführt.

Die Analysen erfolgten bei den Zellen mit primärer Telomerlänge und den mittels hTERT immortalisierten Zellen in unterschiedlichen Western-Blots, weshalb trotz gleicher Versuchsschritte geringe Unterschiede hinsichtlich der Versuchsbedingungen nicht auszuschließen waren. Dadurch wird jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wiederum einschränkt. Die Ergebnisse der Western-Blots waren dennoch reproduzierbar, sodass Schlussfolgerungen bezüglich der Proteinexpression von ABCA1- und ABCG1-Genen möglich waren.

Da nur eine begrenzte Menge an Zellen zur Verfügung stand, konnte eine qPCR für jede Zelllinie einmalig ohne Wiederholung durchgeführt werden.

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mittels t-Test. Aufgrund der kleinen Stichprobengröße ist die Aussagekraft der statistischen Auswertungen nicht mit der anderer, größerer Studien vergleichbar.

Es ist außerdem zu diskutieren, ob Hautfibroblasten ein geeignetes Modell für eine hauptsächlich in Gefäßzellen stattfindende Krankheit wie die Atherosklerose darstellen. Da sich die Zelltypen, die auf die Erfüllung einer bestimmten Funktion spezialisiert sind, voneinander unterscheiden, kann auch die Expression der untersuchten ABCA1- und ABCG1-Gene in Hautfibroblasten und Gefäßzellen unterschiedlich sein.

5.2 Atherosklerose bei HGPS-Patienten und im physiologischen Alter

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen Atherosklerose bei HGPS-Patienten und Atherosklerose im Alter sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede festzustellen sind.

Die Ähnlichkeiten bestehen darin, dass z. B. Kinder mit HGPS mit zunehmendem Alter ebenfalls koronare atherosklerotische Plaques im frühen bis späten Stadium entwickeln, mit ähnlichen phänotypischen Merkmalen wie geriatrische Patienten, ebenso wie eine Atherosklerose der Aorta mit Verkalkungen sowie linksventrikuläre Hypertrophie und Myokardinfarkt (167).

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Progerin-mRNA und Protein auch in den Zellen gesunder Menschen vorkommen und diese Progerin-synthetisierenden Zellen Übereinstimmungen mit HGPS-Zellen aufweisen, was darauf hindeutet, dass die Progerinexpression auch bei der Seneszenz normaler Zellen eine Rolle spielen kann (160, 161). Zusätzlich fanden sich Belege für eine umgekehrte Korrelation zwischen Zellimmortalisierung und Progerintranskription (161).

Allerdings sind auch Unterschiede zwischen Atherosklerose bei HGPS-Patienten und Atherosklerose im physiologischen Alter entdeckt worden. Während HDL-Cholesterin und Adiponectin auch bei HGPS-Patienten mit zunehmendem Alter, ähnlich wie beim physiologischen Alterungsprozess, signifikant abnehmen, sind bei Patienten mit HGPS jedoch andere kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie CRP, Gesamtcholesterin sowie LDL-Cholesterin, nicht erhöht (164).

Zudem könnte Atherosklerose bei HGPS-Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit der vaskulären glatten Muskelzellen zusammenhängen (167). So konnten bei zwei HGPS-Patienten in der Intima- und der Mediaschicht der Gefäße ungewöhnliche Kollagenfibrillen mit geringerem Durchmesser beobachtet werden, die mit einer deutlichen Abnahme der vaskulären glatten Muskelzellen, insbesondere in der Mediaschicht der Aorta, einhergehen. Diese werden möglicherweise durch die Akkumulation von Progerin verursacht und erscheinen anfälliger für hämodynamischen und ischämischen Stress (53, 58, 167).

Im Gegensatz zu Kindern mit HGPS entwickeln nicht alle HGPS-Mausmodelle eine Atherosklerose oder kardiovaskuläre Veränderungen. Im Rahmen einer Studie konnte im Mausmodell, bei dem Apolipoprotein-E-Gene inaktiviert und dadurch der Fettstoffwechsel verändert wurde, nachgewiesen werden, dass Progerin die Entwicklung einer Atherosklerose beschleunigt. Neben einer verstärkten Atherom-Plaue-Bildung wiesen diese Mäuse auch einen relevanten Verlust an vaskulären Glattmuskelzellen in der Media und eine ausgeprägte Adventitiaverdickung sowie Fibrose auf. Diese Veränderungen zeigten jedoch lediglich die Tiere, die entweder eine fettreiche Ernährung erhalten hatten oder genetisch so verändert worden waren, dass Progerin nur in vaskulären Glattmuskelzellen der Media und nicht in Makrophagen exprimiert wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass vaskuläre Glattmuskeln bei

der Entwicklung der Atherosklerose von HPGS-Patienten eine wesentliche Rolle einnehmen (155).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde HGPS als Modellkrankheit zur Untersuchung der beiden bei der Pathogenese der alterungsbedingten Atherosklerose relevanten Gene ABCA1 und ABCG1 ausgewählt und somit indirekt als Modellkrankheit für den Alterungsprozess. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente lassen sich daher nur eingeschränkt auf die physiologische Atherosklerose und den Alterungsprozess übertragen.

5.3 Expression von ABCA1 und ABCG1 in Kontroll- und HGP-Fibroblasten

Patienten mit HGP-Syndrom weisen erniedrigte HDL-Spiegel (164). In früheren Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der HDL-induzierte Cholesterin-Efflux bei HGP-Fibroblasten sowie neonatalem progeroidem Wiedemann-Rautenstrauch-Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen verringert ist (168) (siehe Abbildung 17).

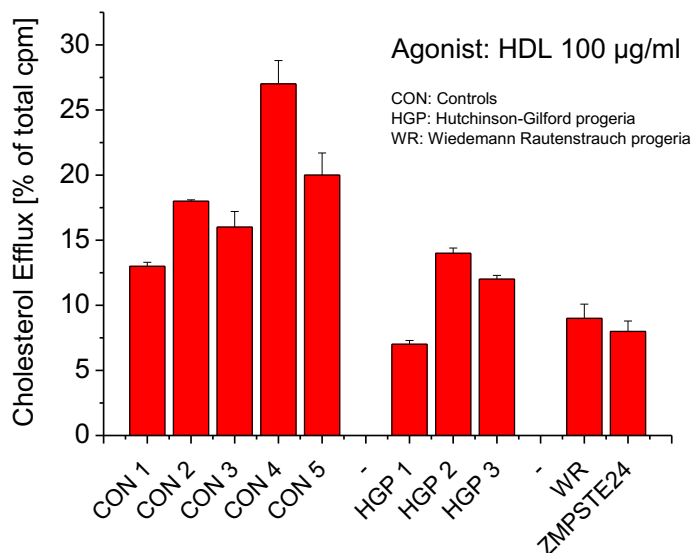


Abbildung 17. Cholesterin-Efflux in Kontroll- und Progeriezellen (168)

Dies kann auf die in der vorliegenden Arbeit beobachtete erniedrigte ABCA1-Expression zurückzuführen sein.

In gealterten Organen wurden dysfunktionelle Mitochondrien mit geringer ATP-Produktion nachgewiesen (169). Zudem konnte im Rahmen einer Studie gezeigt werden, dass die Plasma-ATP- und die Pyrophosphat-Konzentrationen bei LMNA-mutierten (Progeroid-ähnlichen) Mäusen deutlich niedriger sind als bei Wildtyp-Mäusen (um ca. 92 %) (170). Dabei war zu beobachten, dass Progerin-Expression bei Progeroid-ähnlichen Mäusen eine übermäßige Gefäßverkalkung verursacht, die mit Anomalien in glatten Muskelzellen verbunden ist. Diese führen zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion sowie der ATP-Produktion und einer reduzierten Synthese von extrazellulärem anorganischen Pyrophosphat, einem bedeutenden Inhibitor der Calciumphosphatablagerung. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Fortschreiten der HGPS durch eine kombinierte Therapie mit Bisphosphonaten und Statinen verlangsamt werden kann (170, 171)

Somit könnte ATP-Mangel in seneszenten HGP-Zellen eine Ursache für die in dieser Arbeit beobachtete reduzierte ABCA1-Expression sowohl auf mRNA- als auch, mit einer Ausnahme, auf Proteinebene sein.

Beim Cholesterin-Efflux nimmt ABCG1 ebenfalls eine bedeutende Rolle ein, weshalb die ABCA1- und ABCG1-Expression in den Zellen vermutlich koordiniert reguliert wird (172, 173).

In anderen Studien wurde beobachtet, dass ABCA1 und ABCG1 beim Cholesterintransport aus der Zelle synergistisch agieren (174, 175). Die ABCG1-Expression ist bei HGPS jedoch nicht gestört, wobei bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zwei von drei basalen HGP-Fibroblasten ABCG1-mRNA im Vergleich zu Kontrollzellen sogar verstärkt exprimierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die HGP-Zellen den gestörten Cholesterin-Efflux durch kompensatorische Hochregulation des ABCG1-Gens partiell kompensieren.

Studien belegen, dass Oxysterole (oxygenierte Derivate des Cholesterins) LXR aktivieren, wodurch die Expression von Cholesterin-Efflux-Genen, wie ABCA1- und ABCG1-Transporter, induziert wird (176). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass Cholesterin sowohl bei HGP- als auch bei Kontrollzellen die ABCA1-Expression induziert, sowohl auf mRNA- als auch (etwas weniger stark) auf Proteinebene. Allerdings ist aufgrund der relativ großen Streubreite der Zelllinien nicht

zu klären, warum ABCA1 (auf mRNA-Ebene) nur bei immortalisierten HGP-Fibroblasten hochreguliert wird. Aufgrund der stärkeren Proliferation von immortalisierten Zellen könnte es in einzelnen Experimenten zu Konfluenz und Wachstumsarrest mit dadurch bereits basal (ohne Cholesterin) erhöhten Expressionswerten gekommen sein.

Auch die Expression von ABCG1 wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch Cholesterin induziert. Zudem wurde nur bei immortalisierten HPG-Zellen ebenfalls eine Steigerung durch Cholesterin (auf mRNA-Ebene) erzielt. Die Werte waren im Vergleich zu nicht cholesterinbeladenen Zellen zwar höher, aber insgesamt geringer als bei primären (nicht immortalisierten) Zellen. Auch hier könnten unterschiedlich konfluente Zell-Dishes eine Ursache sein, da auch die Konfluenz einen Stimulus für den Cholesterin-Efflux darstellt (177).

5.4 Mögliche Rolle eines Telomer-Positions-Effektes (TPE-OLD)

Das ABCA1-Gen ist am langen Arm des Chromosoms 9 in der Region 31.1 lokalisiert, wohingegen sich ABCG1 auf dem Chromosom 21q22.3 befindet (178, 179). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass die zunächst bei Hefezellen beschriebene, von der Telomerlänge abhängige Expression benachbarter Gene (der sogenannte ‚Telomer-Positions-Effekt‘ TPE) auch beim Menschen existiert (180, 181). Demnach wird die Expression einzelner Gene durch die Telomerlänge beeinflusst, sodass telomernah gelegene Gene bei Telomerverkürzung stärker exprimiert werden (182). Da dieser Effekt beim Menschen – anders als beim klonischen TPE der Hefe – auch bei relativ weit vom Telomerende entfernt liegenden Genen zu beobachten war, wurde dieser Mechanismus *telomere position effect over long distances* (TPE-OLD) genannt (183, 184).

Auf mRNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene, zeigte sich bei fast allen Experimenten mit HGP-Zellen eine supprimierte Expression von ABCG1 nach Immortalisierung. Bei Kontrollzellen war dieser Effekt hingegen nicht sichtbar. Eine mögliche Erklärung hierfür besteht darin, dass es nur bei HGP-Zellen aufgrund einer veränderten/verkürzten Telomerstruktur zu einem TPE-Effekt kommt, wie bereits bei einer anderen Krankheit beschrieben, der fazio-skapulo-humeralen Dystrophie SORBS2 (185). Auch wenn sich dieser Effekt auf Proteinebene nicht zu manifestieren

scheint, so könnte er im Rahmen möglicher Therapiekonzepte mit Telomerase insofern von Bedeutung sein, dass eine alleinige Telomerverlängerung nicht ausreicht, um den Telomerschaden zu beheben, sondern lediglich die kompensatorische Induktion von ABCG1 unterbunden wird.

5.5 Ausblick

Die Erforschung von Alterungsprozessen sowie der im Alter häufig auftretenden Atherosklerose ist vor dem Hintergrund des demografischen Wandels von besonderer Bedeutung. Bei der Entwicklung von Medikamenten, die heute zur Therapie kardiovaskulärer Krankheiten verwendet werden, haben frühere Studien zum Cholesterinstoffwechsel eine entscheidende Rolle gespielt. Durch neue Medikamente, die auf eine ABCA1-Erhöhung abzielen, könnte der Cholesterin-Efflux verbessert werden, sodass eine atheroprotektive Wirkung vorliegen würde. Trotz einiger Unterschiede zwischen der Atherosklerose bei HGPS-Patienten und der Atherosklerose im physiologischen Alter hat die Erforschung von HGPS das Potenzial, nicht nur neue Therapien gegen HGPS zu entwickeln, sondern auch die dem physiologischen Alterungsprozess zugrundeliegenden Mechanismen zu identifizieren.

In dieser Arbeit konnte am Beispiel der HGP-Fibroblasten gezeigt werden, dass das beim Cholesterin-Efflux essenzielle ABCA1 in diesen Zellen supprimiert und ABCG1, möglicherweise kompensatorisch bedingt, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene verstärkt induziert wird. Darüber hinaus konnten Hinweise auf einen möglichen Telomer-Positions-Effekt für ABCG1 bei HGP-Zellen gefunden werden. In zukünftigen Studien sollte deshalb die telomerabhängige Regulation von ABCG1 näher untersucht werden, um die Funktion des ABCG1 besser zu verstehen. Darüber hinaus sollten die Ursachen für die ABCA1-Suppression in HGP-Zellen weiter erforscht werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, Moran AE. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res.* 2015;46(5):328-38.
2. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res.* 2019;124(10):1505-18.
3. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2019;124(2):315-27.
4. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. *Circ Res.* 2018;123(10):1118-20.
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.
6. Gimbrone MA, Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;118(4):620-36.
7. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med.* 2009;122(1 Suppl):S3-s14.
8. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 2016;118(4):535-46.
9. Milutinović A, Šuput D, Zorc-Pleskovič R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020;20(1):21-30.
10. Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium: nature's blood-compatible container. *Ann N Y Acad Sci.* 1987;516:5-11.
11. Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol.* 2017;12:18-34.
12. Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis.* 2016;248:97-109.
13. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92(5):1355-74.
14. Blasi C. The autoimmune origin of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2008;201(1):17-32.
15. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-9.
16. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-41.
17. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
18. Mitra S, Goyal T, Mehta JL. Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011;25(5):419-29.

19. Lusis AJ. Genetics of atherosclerosis. *Trends Genet.* 2012;28(6):267-75.
20. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):225-45.
21. Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, Ramos MJ, Fernandes PA. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry.* 2016;55(39):5483-506.
22. Maxfield FR, Wüstner D. Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest.* 2002;110(7):891-8.
23. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol.* 2003;5(9):781-92.
24. Alphonse PA, Jones PJ. Revisiting Human Cholesterol Synthesis and Absorption: The Reciprocity Paradigm and its Key Regulators. *Lipids.* 2016;51(5):519-36.
25. Cohen DE. Balancing cholesterol synthesis and absorption in the gastrointestinal tract. *J Clin Lipidol.* 2008;2(2):S1-3.
26. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1125-31.
27. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.* 1997;99(5):838-45.
28. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest.* 1997;99(5):846-54.
29. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell.* 2002;110(4):489-500.
30. Brown AJ, Sun L, Feramisco JD, Brown MS, Goldstein JL. Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol Cell.* 2002;10(2):237-45.
31. Sever N, Yang T, Brown MS, Goldstein JL, DeBose-Boyd RA. Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol Cell.* 2003;11(1):25-33.
32. Gill S, Stevenson J, Kristiana I, Brown Andrew J. Cholesterol-Dependent Degradation of Squalene Monooxygenase, a Control Point in Cholesterol Synthesis beyond HMG-CoA Reductase. *Cell Metabolism.* 2011;13(3):260-73.
33. Howe V, Sharpe LJ, Prabhu AV, Brown AJ. New insights into cellular cholesterol acquisition: promoter analysis of human HMGCR and SQLE, two key control enzymes in cholesterol synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2017;1862(7):647-57.
34. van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;368(1-2):1-16.

35. Quintão E, Grundy SM, Ahrens EH, Jr. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *J Lipid Res.* 1971;12(2):233-47.
36. Altmann SW, Davis HR, Zhu L-j, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SPN, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science.* 2004;303(5661):1201-4.
37. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(4):431-8.
38. Maxfield FR, van Meer G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(4):422-9.
39. Soccio RE, Breslow JL. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(7):1150-60.
40. van der Velde AE. Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights. *World J Gastroenterol.* 2010;16(47):5908-15.
41. Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol.* 2006;17(3):247-57.
42. Zhao Y, Van Berkel TJ, Van Eck M. Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(5):441-53.
43. Siddiqi HK, Kiss D, Rader D. HDL-cholesterol and cardiovascular disease: rethinking our approach. *Curr Opin Cardiol.* 2015;30(5):536-42.
44. Rudel LL, Lee RG, Cockman TL. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(2):121-7.
45. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000;289(5484):1524-9.
46. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000;275(36):28240-5.
47. Schmitz G, Langmann T. Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1735(1):1-19.
48. Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. 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.* 2001;98(11):6027-32.
49. Rothblat GH, de la Llera-Moya M, Atger V, Kellner-Weibel G, Williams DL, Phillips MC. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of Lipid Research.* 1999;40(5):781-96.
50. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):712-9.

51. de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Connelly MA, Kellner-Weibel G, Sakr SW, Phillips MC, Williams DL. Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J Lipid Res.* 1999;40(3):575-80.
52. Wang S, Smith JD. ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors.* 2014;40(6):547-54.
53. Rader DJ. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest.* 2006;116(12):3090-100.
54. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001;11(7):1156-66.
55. Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng J-F, Osorio J, Remaley A, Yang X-P, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, Brewer HB. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(14):7987-92.
56. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(1):29-33.
57. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJ, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(8):1322-32.
58. Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozcurümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22(4):347-51.
59. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 1999;22(4):352-5.
60. Horowitz BS, Goldberg IJ, Merab J, Vanni TM, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Increased plasma and renal clearance of an exchangeable pool of apolipoprotein A-I in subjects with low levels of high density lipoprotein cholesterol. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1743-52.
61. Francis GA, Knopp RH, Oram JF. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest.* 1995;96(1):78-87.
62. Fitzgerald ML, Okuhira K, Short GF, 3rd, Manning JJ, Bell SA, Freeman MW. ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities. *J Biol Chem.* 2004;279(46):48477-85.
63. Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 2002;277(36):33178-87.
64. Chroni A, Liu T, Fitzgerald ML, Freeman MW, Zannis VI. Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry.* 2004;43(7):2126-39.

65. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1052-62.
66. Singaraja RR, Fievet C, Castro G, James ER, Hennuyer N, Clee SM, Bissada N, Choy JC, Fruchart JC, McManus BM, Staels B, Hayden MR. Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2002;110(1):35-42.
67. Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB, Jr., Santamarina-Fojo S. ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest.* 2001;108(2):303-9.
68. Haghpassand M, Bourassa PA, Francone OL, Aiello RJ. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest.* 2001;108(9):1315-20.
69. Aiello RJ, Brees D, Bourassa PA, Royer L, Lindsey S, Coskran T, Haghpassand M, Francone OL. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):630-7.
70. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, Tontonoz P. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(22):12097-102.
71. Panousis CG, Zuckerman SH. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1565-71.
72. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34508-11.
73. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1(2):121-31.
74. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9774-9.
75. Schmitz G, Robenek H, Lohmann U, Assmann G. Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *Embo j.* 1985;4(3):613-22.
76. Cavellier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(7):655-66.
77. Alam R, Yatsu FM, Tsui L, Alam S. Receptor-mediated uptake and 'retroendocytosis' of high-density lipoproteins by cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages: possible role in enhancing reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 1989;1004(3):292-9.
78. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.

79. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):102-14.
80. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet.* 2011;12(2):99-110.
81. Hon LS, Zhang Z. The roles of binding site arrangement and combinatorial targeting in microRNA repression of gene expression. *Genome Biol.* 2007;8(8):R166.
82. Jeon TI, Osborne TF. miRNA and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(12 Pt B):2041-6.
83. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(45):17719-24.
84. Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol.* 2010;222(3):540-5.
85. Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 2008;22(22):3172-83.
86. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature.* 2005;438(7068):685-9.
87. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006;3(2):87-98.
88. Elmén J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjærn M, Hansen JB, Hansen HF, Straarup EM, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(4):1153-62.
89. Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjærn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008;452(7189):896-9.
90. Gerin I, Clerboux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, Leclercq IA, MacDougald OA, Bommer GT. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem.* 2010;285(44):33652-61.
91. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Fisher EA, Moore KJ, Fernández-Hernando C. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010;328(5985):1570-3.
92. Vickers KC, Rader DJ. Nuclear receptors and microRNA-144 coordinately regulate cholesterol efflux. *Circ Res.* 2013;112(12):1529-31.
93. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):239-50.
94. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease: The Framingham study. *The American Journal of Medicine.* 1977;62(5):707-14.

95. Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, McNamara PM, Kannel WB. Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterols. *Am J Cardiol.* 1980;46(4):649-54.
96. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of Coronary Heart Disease and Lipoprotein Cholesterol Levels. The Framingham Study. *JAMA.* 1986;256(20):2835-8.
97. Kannel WB. High-density lipoproteins: Epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology.* 1983;52(4):B9-B12.
98. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Jr., Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation.* 1989;79(1):8-15.
99. Nofer JR. Signal transduction by HDL: agonists, receptors, and signaling cascades. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;224:229-56.
100. Wijeyesundera HC, Koh M, Alter DA, Austin PC, Jackevicius CA, Tu JV, Ko DT. Association of high-density lipoprotein cholesterol with non-fatal cardiac and non-cardiac events: a CANHEART substudy. *Open Heart.* 2017;4(2):e000731.
101. Li Z, Zhang Z, Ren Y, Wang Y, Fang J, Yue H, Ma S, Guan F. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology.* 2021:1-23.
102. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153(6):1194-217.
103. Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *Febs j.* 2013;280(14):3180-93.
104. Edo MD, Andrés V. Aging, telomeres, and atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2005;66(2):213-21.
105. Lutgens E, de Muinck ED, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Wellens HJ, Daemen MJ. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res.* 1999;41(2):473-9.
106. von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res.* 1995;220(1):186-93.
107. Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2001;265(2):294-303.
108. Hathaway CA, Heistad DD, Piegors DJ, Miller FJ, Jr. Regression of atherosclerosis in monkeys reduces vascular superoxide levels. *Circ Res.* 2002;90(3):277-83.
109. Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, Goddard M, Bennett M. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circulation research.* 2006;99(2):156-64.
110. Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet.* 2012;13(10):693-704.

111. Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Haughton MF, Wallis C, Wynford-Thomas D, Faragher RG, Kipling D. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat Genet.* 2000;24(1):16-7.
112. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature.* 1999;402(6761):551-5.
113. Bernadotte A, Mikhelson VM, Spivak IM. Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging (Albany NY).* 2016;8(1):3-11.
114. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Greschner S, Stavrides G, Pai GS, Lestringant G, Varma N, Mason PJ, Dokal I, Poustka A. X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene. *Am J Hum Genet.* 1999;65(1):50-8.
115. Hamczyk MR, del Campo L, Andrés V. Aging in the Cardiovascular System: Lessons from Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:27-48.
116. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):729-40.
117. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1047-78.
118. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(20):9363-7.
119. Davaapil H, Brockes JP, Yun MH. Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development.* 2017;144(1):106-14.
120. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(7):482-96.
121. Bu H, Wedel S, Cavinato M, Jansen-Dürr P. MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:2398696.
122. Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest.* 2018;128(4):1238-46.
123. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:99-118.
124. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-68.
125. Gardner SE, Humphry M, Bennett MR, Clarke MC. Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1 α -Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(9):1963-74.
126. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res.* 1965;37:614-36.

127. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998;279(5349):349-52.
128. Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol*. 1996;31(4):443-8.
129. Martínez P, Blasco MA. Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(3):161-76.
130. Kaul Z, Cesare AJ, Huschtscha LI, Neumann AA, Reddel RR. Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells. *EMBO Rep*. 2011;13(1):52-9.
131. Blackburn EH. Telomeres and telomerase: the means to the end (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(41):7405-21.
132. Yuan X, Xu D. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) in Action: Cross-Talking with Epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
133. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13.
134. Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene*. 2002;21(4):564-79.
135. Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobрева M, Matti V, Beausejour CM, Herbig U, Longhese MP, d'Adda di Fagagna F. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol*. 2012;14(4):355-65.
136. Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2011;21(6):349-53.
137. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, Kleijer WJ, DiMaio D, Hwang ES. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 2006;5(2):187-95.
138. Gonzalo S, Kreienkamp R, Askjaer P. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev*. 2017;33:18-29.
139. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev*. 2008;22(7):832-53.
140. Gruenbaum Y, Medalia O. Lamins: the structure and protein complexes. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:7-12.
141. Gruenbaum Y, Foisner R. Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu Rev Biochem*. 2015;84:131-64.
142. Pollex RL, Hegele RA. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet*. 2004;66(5):375-81.
143. Badame AJ. Progeria. *Arch Dermatol*. 1989;125(4):540-4.
144. Wu Z, Zhang W, Song M, Wang W, Wei G, Li W, Lei J, Huang Y, Sang Y, Chan P, Chen C, Qu J, Suzuki K, Belmonte JCI, Liu GH. Differential stem cell aging kinetics

in Hutchinson-Gilford progeria syndrome and Werner syndrome. *Protein Cell*. 2018;9(4):333-50.

145. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2003;423(6937):293-8.

146. Hennekam RC. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2006;140(23):2603-24.

147. Sharma V, Shukla R. Progeria: A Rare Genetic Syndrome. *Indian J Clin Biochem*. 2020;35(1):3-7.

148. Li Y, Zhou G, Bruno IG, Zhang N, Sho S, Tedone E, Lai TP, Cooke JP, Shay JW. Transient introduction of human telomerase mRNA improves hallmarks of progeria cells. *Aging Cell*. 2019;18(4):e12979.

149. Zou Y, Yi X, Wright WE, Shay JW. Human telomerase can immortalize Indian muntjac cells. *Exp Cell Res*. 2002;281(1):63-76.

150. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*. 1998;8(5):279-82.

151. Rork JF, Huang JT, Gordon LB, Kleinman M, Kieran MW, Liang MG. Initial cutaneous manifestations of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Pediatr Dermatol*. 2014;31(2):196-202.

152. Piekarowicz K, Machowska M, Dzianisava V, Rzepecki R. Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome-Current Status and Prospects for Gene Therapy Treatment. *Cells*. 2019;8(2).

153. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith ACM, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M, Collins FS, Nabel EG, Cannon RO, Gahl WA, Introne WJ. Premature aging syndromes: From patients to mechanism. *Journal of Dermatological Science*. 2019;96(2):58-65.

154. Baker PB, Baba N, Boesel CP. Cardiovascular abnormalities in progeria. Case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*. 1981;105(7):384-6.

155. Hamczyk MR, Villa-Bellosta R, Gonzalo P, Andrés-Manzano MJ, Nogales P, Bentzon JF, López-Otín C, Andrés V. Vascular Smooth Muscle-Specific Progerin Expression Accelerates Atherosclerosis and Death in a Mouse Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation*. 2018;138(3):266-82.

156. Ullrich NJ, Gordon LB. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Handb Clin Neurol*. 2015;132:249-64.

157. Scaffidi P, Misteli T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 2006;312(5776):1059-63.

158. Rodriguez S, Coppedè F, Sagelius H, Eriksson M. Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(7):928-37.

159. McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, Djabali K. The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One*. 2007;2(12):e1269.
160. Cao K, Capell BC, Erdos MR, Djabali K, Collins FS. A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):4949-54.
161. Cao K, Blair CD, Faddah DA, Kieckhafer JE, Olive M, Erdos MR, Nabel EG, Collins FS. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2833-44.
162. Chojnowski A, Ong PF, Wong ES, Lim JS, Mutalif RA, Navasankari R, Dutta B, Yang H, Liow YY, Sze SK, Boudier T, Wright GD, Colman A, Burke B, Stewart CL, Dreesen O. Progerin reduces LAP2 α -telomere association in Hutchinson-Gilford progeria. *Elife*. 2015;4.
163. Ashapkin VV, Kutueva LI, Kurchashova SY, Kireev, II. Are There Common Mechanisms Between the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Natural Aging? *Front Genet*. 2019;10:455.
164. Gordon LB, Harten IA, Patti ME, Lichtenstein AH. Reduced adiponectin and HDL cholesterol without elevated C-reactive protein: clues to the biology of premature atherosclerosis in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *J Pediatr*. 2005;146(3):336-41.
165. Matsuura F, Hirano K, Ikegami C, Sandoval JC, Oku H, Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Koseki M, Masuda D, Tsujii K, Ishigami M, Nishida M, Shimomura I, Hori M, Yamashita S. Senescent phenotypes of skin fibroblasts from patients with Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(2):493-8.
166. Brüggmann N. Untersuchungen zum ABCA1-/ABCG1-vermittelten Cholesterin-Efflux in humanen Kontroll- und Tangier-Fibroblasten. Dissertation. Charité – Universitätsmedizin Berlin. 2021.
167. Trigueros-Motos L, Gonzalez JM, Rivera J, Andres V. Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3(4):1285-97.
168. Scheel M. Veränderungen des zellulären HDL- Stoffwechsels bei Stressinduzierter Seneszenz. Dissertation. Universitätsklinikum Münster. 2009.
169. Boengler K, Kosiol M, Mayr M, Schulz R, Rohrbach S. Mitochondria and ageing: role in heart, skeletal muscle and adipose tissue. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(3):349-69.
170. Villa-Bellosta R. ATP-based therapy prevents vascular calcification and extends longevity in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(47):23698-704.
171. Tiemann J, Lindenkamp C, Plümers R, Faust I, Knabbe C, Hendig D. Statins as a Therapeutic Approach for the Treatment of Pseudoxanthoma Elasticum Patients: Evaluation of the Spectrum Efficacy of Atorvastatin In Vitro. *Cells*. 2021;10(2).
172. Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, Rothblat GH. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res*. 2007;48(11):2453-62.

173. Favari E, Chroni A, Tietge UJ, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:181-206.
174. Liu XH, Tang CK. The research progress of ATP binding cassette transporter G1. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2009;40(3):229-33.
175. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(3):534-40.
176. Zhang L, Reue K, Fong LG, Young SG, Tontonoz P. Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(11):2541-6.
177. Gal D, MacDonald PC, Porter JC, Smith JW, Simpson ER. Effect of cell density and confluency on cholesterol metabolism in cancer cells in monolayer culture. *Cancer Res*. 1981;41(2):473-7.
178. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of Two Novel ABC Transporters Mapping on Human Chromosome 9. *Genomics*. 1994;21(1):150-9.
179. Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N, Edwards PA. 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*. 2001;276(42):39438-47.
180. Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*. 1990;63(4):751-62.
181. Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science*. 2001;292(5524):2075-7.
182. Kueng S, Oppikofer M, Gasser SM. SIR proteins and the assembly of silent chromatin in budding yeast. *Annu Rev Genet*. 2013;47:275-306.
183. Lou Z, Wei J, Riethman H, Baur JA, Voglauer R, Shay JW, Wright WE. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(7):608-21.
184. Kim W, Shay JW. Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD). *Differentiation*. 2018;99:1-9.
185. Robin JD, Ludlow AT, Batten K, Gaillard MC, Stadler G, Magdinier F, Wright WE, Shay JW. SORBS2 transcription is activated by telomere position effect-over long distance upon telomere shortening in muscle cells from patients with facioscapulohumeral dystrophy. *Genome Res*. 2015;25(12):1781-90.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Esmira Bakhshaliyeva, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchungen zur Expression und Regulation der ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1 in Fibroblasten von Patienten mit Hutchinson-Gilford-Progerie (Investigations on expression and regulation of the ABC transporters ABCA1 and ABCG1 in fibroblasts of patients with Hutchinson-Gilford progeria) 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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) 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

Lebenslauf

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Michael Walter, für die Betreuung dieser Arbeit sowie der freundlichen Hilfe und Unterstützung. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich stets positiv beeinflusst und ermutigt.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Brigitte Köttgen, Frau Katharina Binder und Frau Juliane Mensch für ihre sehr nützlichen Tipps.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders herzlich danken für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung während dem Verfassen dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums.