

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Arterioskleroseforschung  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Gerd Assmann-

## Die Regulation der Adipophilin-Expression

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Eisenberg, Monika

aus Münster

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Paul Cullen

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Roland M. Schaefer

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Arterioskleroseforschung  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. Gerd Assmann-  
Referent: Prof. Dr. med. P. Cullen  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. R. M. Schaefer

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Die Regulation der Adipophilin-Expression  
Monika Eisenberg

Adipophilin ist ein Protein des zellulären Lipid-Stoffwechsels, das an dem Transport und der Lagerung von Lipiden in der Zelle in Lipid-Tropfen beteiligt ist. Vorversuche in unserem Labor hatten gezeigt, dass Adipophilin möglicherweise an der Schaumzellbildung humaner Makrohagen und damit an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt ist.

In dieser Arbeit wurde an THP1-Makrophagen untersucht, welche Transkriptionsfaktoren die Expression von Adipophilin-mRNA regulieren. Alle untersuchten Transkriptionsfaktoren bilden Heterodimere mit dem Transkriptionsfaktor RXR. Von den neun möglichen Bindungspartnern für RXR wurden durch PPAR $\gamma$  – welches bekanntermaßen Adipophilin reguliert – durch RAR, und durch RXR selber Änderungen in der Expression des Adipophilin-Gens verursacht.

Die Gabe der entsprechenden Liganden zeigte, dass die Regulation der Adipophilin-Expression sowohl durch RXR wie auch durch RAR konzentrationsabhängig und somit möglicherweise physiologisch relevant war. Zudem wurde in dieser Arbeit die zelluläre Lokalisation von Adipophilin untersucht. Hierzu wurden die Techniken der indirekten Immunfluoreszenz sowie der elektronenmikroskopischen Gefrierbruch-Immunzytochemie verwendet. Dabei wurde ersichtlich, dass Adipophilin nicht nur wie bisher angenommen an der äußeren Schicht der Lipid-Tropfen lokalisiert ist, sondern auch im Inneren dieser Tropfen vorkommt. Ausblick: Zur weiteren Untersuchung der physiologischen Bedeutung von Adipophilin wird in Zukunft von unserer Arbeitsgruppe untersucht, ob Liganden der Transkriptionsfaktoren RXR und RAR die Adipophilin-Expression auch auf Proteinebene beeinflussen. Ferner sind Versuche mit Adipophilin-Defektzellen vorgesehen.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2005

# I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Die Arteriosklerose .....	1
1.1.1	Die Pathogenese der Arteriosklerose .....	1
1.1.2	Risikofaktoren der Arteriosklerose .....	3
1.1.3	Bedeutung und Folgen der Arteriosklerose .....	4
1.1.4	Lipoproteine .....	5
1.2	Der Makrophage .....	7
1.2.1	Die Aufgaben des Makrophagen .....	7
1.2.2	Die Bedeutung des Makrophagen für die Arteriosklerose .....	8
1.3	Adipophilin .....	11
1.3.1	Größe und Vorkommen .....	11
1.3.2	Bedeutung für den Zellstoffwechsel .....	11
1.3.3	Differentielle Genexpression .....	13
1.4	Lipid-Tropfen .....	19
2	Zielsetzung .....	20
3	Material und Methoden .....	21
3.1	Materialien .....	21
3.2	Geräte .....	26
3.3	Zellkultur .....	27
3.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	27
3.3.2	Zusammensetzung des verwendeten Mediums .....	28
3.3.3	Bestimmung der Zellzahl .....	28
3.3.4	Kultivierung proliferierender Zellen .....	29
3.3.4.1	Auftauen von eukaryotischen Zellen .....	29
3.3.4.2	Subkultivierung von Suspensionszellen .....	29
3.3.4.3	Ausdifferenzierung von THP1-Zellen .....	29

---

3.3.4.4	Lagerung von eukaryotischen Zellen .....	30
3.3.5	Inkubationsversuche .....	30
3.4	Arbeiten mit Lipoproteinen .....	31
3.4.1	Isolierung von Lipoproteinen.....	31
3.4.2	Herstellung von acetylierten LDL.....	33
3.4.3	Lipoproteinelektrophorese .....	33
3.5	Proteinbestimmung .....	34
3.6	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	34
3.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA und DNase-Verdau .....	34
3.6.2	Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen .....	36
3.6.3	Agarosegelelektrophorese.....	36
3.6.4	cDNA-Synthesen für Standardanwendungen.....	37
3.6.5	Echtzeit-RT-PCR .....	38
3.7	Zytochemische Markierung mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	40
3.8	Elektronenmikroskopie .....	41
3.8.1	Elektronenmikroskopie .....	41
3.8.2	SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie.....	42
4	Ergebnisse .....	43
4.1	Zellkultur.....	43
4.2	Isolierung der Lipoproteine und Herstellung von AcLDL .....	43
4.3	Regulation der Adipophilin-Expression auf RNA-Ebene .....	45
4.3.1	Konzentrationsabhängigkeit der Adipophilin-Expression unter dem Einfluss von RAR- und PPAR $\gamma$ -Liganden (Normalisierung mit SRP14).....	50
4.3.2	Konzentrationsabhängigkeit der Adipophilin-Expression unter dem Einfluss von RAR- und PPAR $\gamma$ -Liganden (Normalisierung mit GAPDH).....	53

---

4.4	Immunfluoreszenz .....	57
4.5	Gefrierbruch-Immunzytochemie .....	60
5	Diskussion .....	63
5.1	Etablierung der Zellkulturmodelle .....	63
5.2	Etablierung der Echtzeit-RT-PCR .....	64
5.3	Auswahl der Heterodimerpartner von RXR .....	65
5.4	RAR/RXR, eine viel versprechende Kombination? .....	66
5.5	Lipid-Tropfen .....	68
5.6	Zelluläre Lokalisation von Adipophilin .....	68
5.7	Fazit .....	69
5.8	Ausblick .....	70
6	Literatur .....	71
7	Curriculum Vitae .....	81
8	Veröffentlichungen .....	83
9	Danksagung .....	84

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Stadien arteriosklerotischer Läsionen .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Schematischer Lipoproteinstoffwechsel .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner Primärmakrophagen .....	9
<b>Abbildung 4:</b> Funktion eines Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktors .....	13
<b>Abbildung 5:</b> Domänenstruktur eines Transkriptionsfaktors .....	14
<b>Abbildung 6:</b> Prinzip der RXR/RAR-Heterodimer vermittelten Aktivierung der Genexpression .....	15
<b>Abbildung 7:</b> Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von THP1-Zellen .....	43
<b>Abbildung 8:</b> Darstellung einer repräsentativen Lipoproteinelektrophorese .....	44
<b>Abbildung 9:</b> Analyse der PCR-Produkte einer SYBR <sup>®</sup> Green-RT-PCR in einem Agarosegel .....	45
<b>Abbildung 10:</b> Schmelzkurven der PCR-Produkte für Adipophilin, SRP14 und GAPDH .....	47
<b>Abbildung 11:</b> $\Delta R_n$ /PCR-Zyklus-Diagramme einer SYBR <sup>®</sup> Green-RT-PCR der Negativkontrollen .....	48
<b>Abbildung 12:</b> $\Delta R_n$ /PCR-Zyklus-Diagramme einer SYBR <sup>®</sup> Green-RT-PCR der Proben .....	49
<b>Abbildung 13:</b> Relative Expressionsunterschiede zwischen mit RAR- oder RXR- Liganden inkubierten THP1-Zellen und Kontrollzellen, Normalisierung mit SRP14 .....	51
<b>Abbildung 14:</b> Relative Expressionsunterschiede zwischen mit PPAR $\gamma$ - oder RXR-Liganden inkubierten THP1-Zellen und Kontrollzellen, Normalisierung mit SRP14 .....	51
<b>Abbildung 15:</b> Relative Expressionsunterschiede zwischen THP1-Zellen, die mit RAR- und RXR-Liganden inkubiert wurden und Kontrollzellen, Normalisierung mit SRP14 .....	52



<b>Abbildung 16:</b> Relative Expressionsunterschiede zwischen THP1-Zellen, die mit PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden inkubiert wurden und Kontrollzellen, Normalisierung mit SRP14 .....	53
<b>Abbildung 17:</b> Relative Expressionsänderung zwischen THP1-Zellen, die mit RAR- und RXR-Liganden inkubiert wurden und Kontrollzellen, Normalisierung mit GAPDH.....	54
<b>Abbildung 18:</b> Relative Expressionsänderung zwischen THP1-Zellen, die mit PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden inkubiert wurden und Kontrollzellen, Normalisierung mit GAPDH.....	55
<b>Abbildung 19:</b> Relative Expressionsänderungen zwischen THP1-Zellen, die mit RAR- und RXR-Liganden inkubiert wurden und Kontrollzellen, Normalisierung mit GAPDH.....	56
<b>Abbildung 20:</b> Relative Expressionsänderung zwischen THP1-Zellen, die mit PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden inkubiert wurden und Kontrollzellen, Normalisierung mit GAPDH.....	57
<b>Abbildung 21:</b> Indirekte Immunfluoreszenz von THP1-Zellen im Fluoreszenzmikroskop .....	59
<b>Abbildung 22:</b> Indirekte Immunfluoreszenz eines THP1-Makrophagen im konfokalen Mikroskop.....	59
<b>Abbildung 23:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts einer unbehandelten THP1-Zelle .....	60
<b>Abbildung 24:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts einer mit AcLDL behandelten THP1-Zelle.....	62

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Dimerpartner von RXR und ihre Liganden.....	16
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht der verwendeten Materialien .....	21
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht der verwendeten Geräte.....	26
<b>Tabelle 4:</b> Zusammensetzung von Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640).....	28
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht über die Zahl der ausgesäten THP1-Zellen.....	29
<b>Tabelle 6:</b> Substanzen für die Inkubationsversuche.....	30
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht über die für Lipoproteinisolierung notwendigen Daten.....	32
<b>Tabelle 8:</b> modifizierte Mengen des Lysepuffers bei der Isolierung der Gesamt-RNA.....	35
<b>Tabelle 9:</b> Konzentrationsangaben für Agarosegele für bestimmte Trennbereiche .....	37

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Arteriosklerose

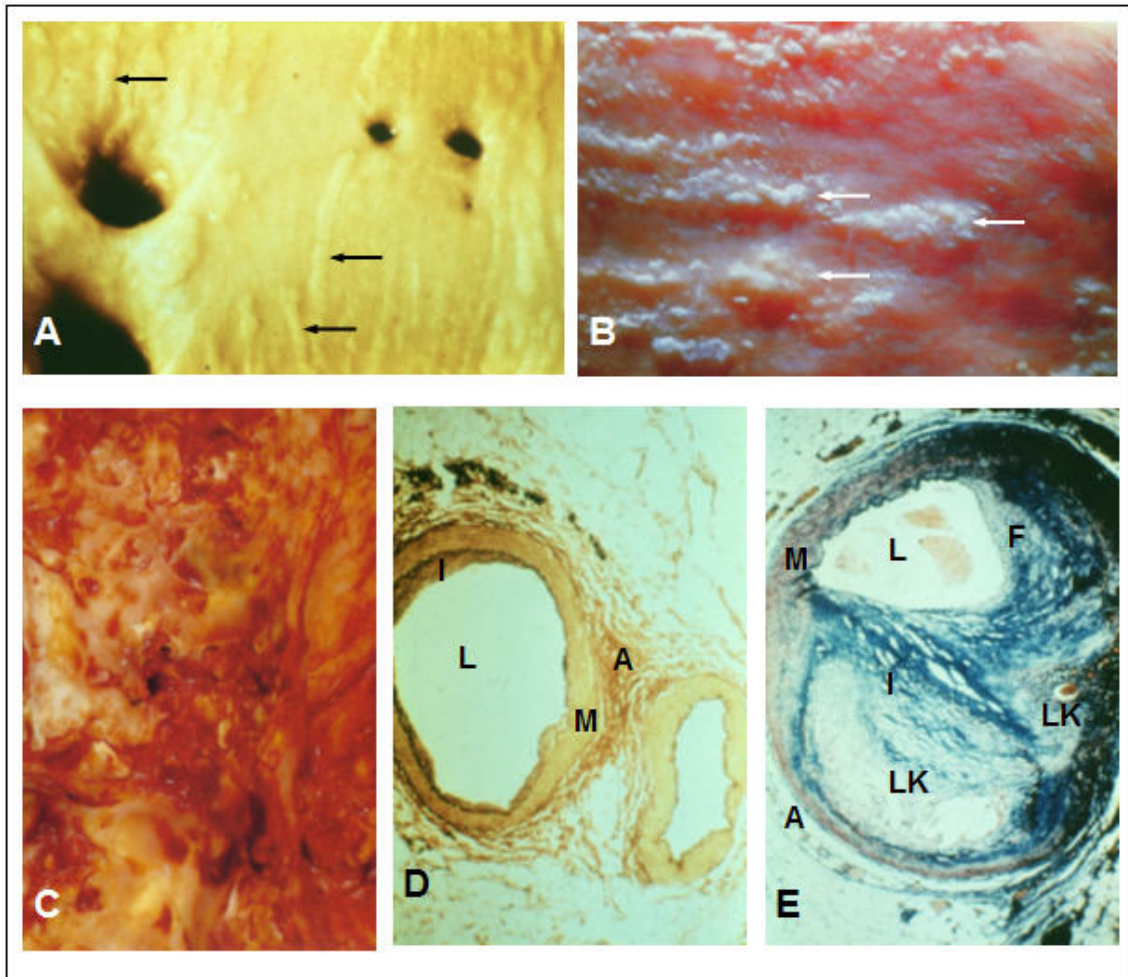
Bei der Arteriosklerose (griechisch: athera = Weizenmehlbrei, scleros = hart) handelt es sich um eine chronische, sich über viele Jahre entwickelnde, entzündlich-proliferative Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien. Sie ist durch eine Wandverdickung der Arterien charakterisiert, die auf der Proliferation von glatten Muskelzellen, der Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten in den Subendothelialraum und einer Ansammlung von Lipiden – hauptsächlich Cholesterinestern – beruht. In einigen Fällen besteht die Gefahr des Verschlusses des betroffenen oder eines stromabwärts liegenden Gefäßes, was zu einer Hypoxie und somit Schädigung des entsprechenden Gewebes führen kann.

Die wichtigsten Komplikationen der Arteriosklerose sind Schlaganfälle, periphere Durchblutungsstörungen und vor allem koronare Herzkrankheiten, auf die etwa 50% aller Todesfälle in Deutschland zurückzuführen sind. Damit stellt die Arteriosklerose die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar (Glass & Witztum, 2001).

### 1.1.1 Die Pathogenese der Arteriosklerose

Die genauen Ursachen für die Entstehung der Arteriosklerose, die bereits in der frühen Kindheit entstehen kann, sind trotz langjähriger, intensivster Forschungsarbeiten nach wie vor nur unvollständig geklärt. Das "response to injury"-Modell, das erstmals von Rokitansky Mitte des 19. Jahrhunderts formuliert hat (von Rokitansky, 1852) und später von Ross und Glomset wieder aufgegriffen wurde (Ross & Glomset, 1973), liefert einen allgemein anerkannten Erklärungsansatz für die Pathogenese der Arteriosklerose (Ross, 1993). In diesem Modell beginnt der arteriosklerotische Prozess mit einer Verletzung des Endothels. Die Endothelschicht, die das Gefäß zum Lumen hin auskleidet, bildet die Intima, die innerste der drei Zellschichten der Arterienwand. Eine Schädigung kann verschiedene Ursachen haben. Wichtige Faktoren sind unter anderem Toxine (die z.B. durch das Rauchen entstehen), mechanische Verletzungen (z.B. durch Hypertonie bedingt) und entzündliche Prozesse (z.B. durch Chlamydien-Infektionen). Die Schädigung des Endothels führt zur Expression zahlreicher Adhäsionsmoleküle, so dass sich T-Lymphozyten und Makrophagen anheften und in die Intima einwandern (Initialläsion). Dort sezernieren die Makrophagen chemotaktisch

wirksame Stoffe, die unter anderem die Proliferation von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima bewirken. Durch die Fähigkeit der Makrophagen und Muskelzellen, Lipide aufzunehmen und als Schaumzellen zu speichern, entwickelt sich die Arteriosklerose weiter zu den sogenannten Fettstreifen (engl.: fatty streaks), die bereits mit dem bloßen Auge erkennbar sind (vgl. Abbildung 1A).



**Abbildung 1:** Verschiedene Stadien arteriosklerotischer Läsionen. **A:** Initialläsionen und Fettstreifen (engl.: fatty streaks); letztere sind mit schwarzen Pfeilen markiert. **B:** Fibröse Läsionen, mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. **C:** Komplizierte Läsion bzw. fibröse Plaque einer Arterienwand (gelbliche Verfärbungen durch Lipideinlagerungen; deutlich erkennbare Unebenheiten in der Oberfläche). **D:** Querschnitt durch eine Arterie mit nur geringfügiger Verdickung der Intima (links) und eine arteriosklerotisch unveränderte Arterie (rechts). **E:** Querschnitt durch eine stark arteriosklerotisch veränderte Arterie mit ausgeprägten Lipidkernen (LK) und darüber liegender fibröser Kappe (FK). Das Gefäßlumen ist mit L, die Adventitia mit A, die Media mit M und die Intima mit I gekennzeichnet (Akkerman et al., 1987; Davis & Woolf, 1990).

Wahrscheinlich sind die arteriosklerotischen Veränderungen bis zur Ausbildung der Fettstreifen noch reversibel. Durch die Proliferation der Muskelzellen, die mit der Synthese von Matrixproteinen (z.B. Kollagenen) einhergeht, und die schichtartige

Akkumulation von lipidhaltigen Makrophagen, zusätzlichem extrazellulärem Lipidmaterial, T-Lymphozyten und ebenfalls lipidhaltigen Muskelzellen kommt es zu einer fortschreitenden Verdickung der Arterienwand (fibröse Läsion; vgl. Abbildung 1B). Daraus entsteht nach Jahren ein kapselartiges, von einer dichten Bindegewebsmatrix umgebenes Gebilde, in dessen Kern die Zellen nekrotisch werden. In diesem Stadium bezeichnet man die Veränderung als fibröse Plaque bzw. komplizierte Läsion (vgl. Abbildung 1C und Abbildung 1E). Die Stabilität der Plaque ist von vielen Faktoren (vor allem dem Lipid- und Kollagen-Gehalt) abhängig und hat entscheidenden Einfluss auf den weiteren Verlauf der Erkrankung. Je mehr Lipide sich im Zentrum der Plaque befinden, desto weicher und instabiler ist die Plaque, so dass ein Aufreißen der Kapsel – besonders im Bereich vieler Schaumzellen – begünstigt wird (Falk, 1992). Eine Plaqueruptur führt zur Aktivierung der Gerinnungskaskade. Es bildet sich ein Thrombus, der die Verengung des betroffenen Gefäßes bzw. den Verschluss eines stromabwärts liegenden Gefäßes bewirken kann. Zudem kann ein Thrombus losgerissen und als Embolus mit dem Blutstrom verschleppt werden und einen Verschluss in anderen Gefäßen zur Folge haben. Besonders gefährlich sind thrombotische Verschlüsse in Endarterien, die zu ischämischen Nekrosen führen können. Wichtigstes Beispiel hierfür ist der Verschluss einer Koronararterie, der die häufigste Ursache für einen Herzinfarkt darstellt.

### **1.1.2 Risikofaktoren der Arteriosklerose**

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Entstehung der Arteriosklerose nicht auf eine einzelne Ursache zurückzuführen ist, sondern dass ihr mehrere Risikofaktoren zugrunde liegen. Bei gleichzeitigem Vorliegen mehrerer Faktoren wächst das Risiko, eine Arteriosklerose zu entwickeln und damit an einem Infarkt zu erkranken, in der Regel exponentiell an. In der PROCAM-Studie (Prospective Cardiovascular Münster-Study) wurden bei Männern, die bei Aufnahme in die Studie zwischen 36 und 65 Jahre alt waren, nach einem Beobachtungszeitraum von acht Jahren folgende neun Variablen identifiziert, die zum Risiko der koronaren Herzkrankheit unabhängig beitragen (Cullen *et al.*, 1998): Alter, Rauchen, Auftreten von Angina pectoris, familiäre Disposition für frühzeitigen Myokardinfarkt (vor dem 60. Lebensjahr), Diabetes mellitus, Bluthochdruck, LDL-Cholesterin-, HDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Konzentrationen. Während die LDL-Cholesterin- und Triglyzerid-Plasmaspiegel möglichst niedrig sein sollten, sind hohe HDL-Cholesterin-Konzentrationen mit einem niedrigen koronaren Risiko assoziiert. Zudem ist bekannt,

dass sich sowohl bestimmte Plasmafaktoren (hohe Fibrinogen- oder Homocystein-Spiegel sowie Hyperurikämie) und genetische Faktoren (wie das Vorhandensein des Apo E-Allels  $\epsilon_4$ ) als auch entsprechende Lebensumstände (Bewegungsmangel, eine Ernährung, die reich an gesättigten Fettsäuren ist, Adipositas, Alkoholabusus, Stress, Depressionen, niedriger sozialer Status) und Infektionen (z.B. durch Chlamydien oder Viren) nachteilig auf die Pathogenese der Arteriosklerose auswirken (Keil & Spelsberg, 1995). Männer unterliegen einem etwa vierfach höheren Erkrankungsrisiko als Frauen (Lerner & Kannel, 1986; Assmann *et al.*, 2002), die möglicherweise durch Östrogene geschützt sind (St Clair, 1997). Diese These wird durch die höhere Prävalenz von koronaren Herzkrankheiten bei Frauen in der Postmenopause unterstützt (Godsland *et al.*, 1987).

### **1.1.3 Bedeutung und Folgen der Arteriosklerose**

Wie bereits erwähnt, stellen die Folgeerscheinungen der Herz-Kreislauf-Erkrankungen, zu denen die Arteriosklerose gehört, die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar (WHO, 2002).

Die klinisch bedeutendste und am häufigsten letal verlaufende Manifestation der Arteriosklerose betrifft das arterielle Gefäßsystem des Herzens. Die koronare Herzkrankheit ist die häufigste Form der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland und verursacht in Form von Herzinfarkten und ischämischen Herzerkrankungen etwa 30% aller Todesfälle pro Jahr (Keil & Spelsberg, 1995).

Ein häufiges Erscheinungsbild der koronaren Herzkrankheit, die durch starke Schmerzen im Brustkorb und Atemnot gekennzeichnet ist, wird als Angina pectoris bezeichnet. Sie wird durch starke Verengungen von Koronargefäßen hervorgerufen, die zu einer verminderten Durchblutung der Herzmuskulatur führen.

Die arteriosklerotische Veränderung gehirnversorgender Arterien resultiert in zerebrovaskulären Erkrankungen. Die Durchblutungsstörungen im Gehirn manifestieren sich häufig in Form von transitorischen ischämischen Attacken, bei denen die Durchblutung des Gehirns vorübergehend unterbrochen ist, und vor allem in Schlaganfällen, die durch Nekrotisierung der ischämischen Bereiche im Gehirn gekennzeichnet sind. Zerebrovaskuläre Erkrankungen waren mit rund 11% an den im Jahr 1995 verzeichneten Todesfällen in Deutschland beteiligt (Statistisches Bundesamt, 1998).

Auf Arteriosklerose zurückzuführende, periphere Durchblutungsstörungen treten meist

in den unteren Extremitäten auf. Sie verursachen belastungsabhängige Schmerzen (Claudicatio intermittens) und können im fortgeschrittenen Stadium sogar das Absterben der Extremitäten (Gangrän) bewirken.

### 1.1.4 Lipoproteine

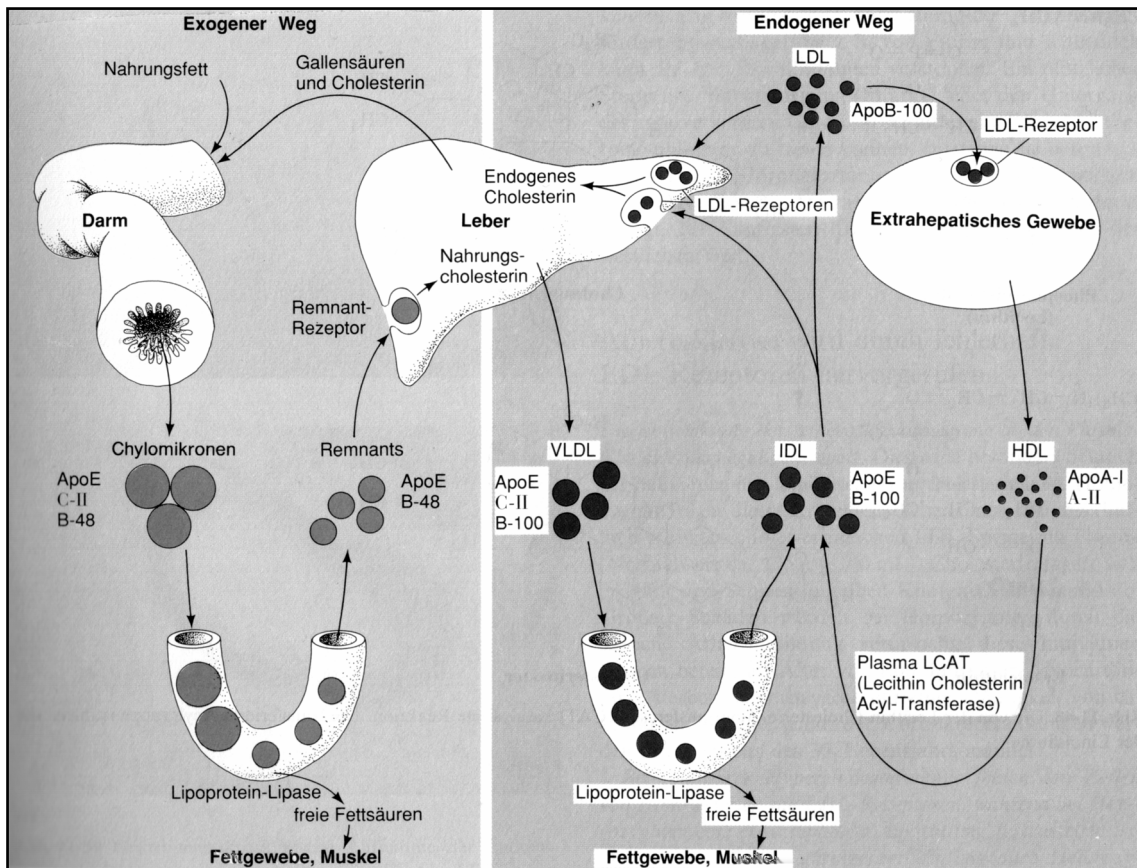
Störungen des Lipoproteinstoffwechsels sind eng mit der Arteriosklerose verbunden. Daher wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die verschiedenen Lipoproteine gegeben.

Die Funktion der Lipoproteine ist der Transport wasserunlöslicher Fette im wässrigen Milieu des Blutes. Sie stellen hochmolekulare, wasserlösliche Aggregate von Lipiden (Cholesterin, Cholesterinester, Triglyzeride, Phospholipide und freie Fettsäuren) und Proteinen (den sogenannten Apolipoproteinen) dar. Im Plasma finden sich fünf Dichteklassen von Lipoproteinen, die sich in ihrer Zusammensetzung unterscheiden und an verschiedenen Wegen für den Transport von Lipiden beteiligt sind. Je nach Protein- und Lipid-Gehalt werden sie in folgende fünf Dichteklassen unterteilt (Havel *et al.*, 1955; Assmann, 1982):

- Chylomikronen ( $d < 0,95$  mg/mL)
- VLDL = very low density lipoprotein = Lipoproteine sehr geringer Dichte ( $d = 0,95 - 1,006$  mg/mL)
- IDL = intermediate density lipoprotein = Lipoproteine mittlerer Dichte ( $d = 1,006 - 1,019$  mg/mL)
- LDL = low density lipoprotein = Lipoproteine geringer Dichte ( $d = 1,019 - 1,063$  mg/mL)
- HDL = high density lipoprotein = Lipoproteine hoher Dichte ( $d = 1,063 - 1,21$  mg/mL)

Der Lipoproteinstoffwechsel ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Die Chylomikronen entstehen bei der Fettabsorption aus der Nahrung in der Darmwand und sind Reich an Triglyzeriden. Sie geben Fettsäuren, die aus der Spaltung der Triglyzeride durch die Lipoproteinlipase hervorgegangen sind, an das Fettgewebe und die Muskulatur ab. Die Überreste der Chylomikronen (Chylomikronen-Remnants), die einen hohen Gehalt an Cholesterinestern aufweisen, werden von der Leber über Remnant-Rezeptoren aufgenommen. Dort wird das Cholesterin zum Teil in Gallensäuren umgewandelt und zum Teil zusammen mit Apolipoproteinen, Phospholipiden und Triglyzeriden in Form von VLDL wieder ins Plasma abgegeben.

Durch Abspaltung von Fettsäuren entstehen aus den VLDL IDL. Ein Teil der IDL wird über LDL-Rezeptoren wieder von der Leber aufgenommen, ein anderer Teil geht durch Abspaltung von Triglyzeriden in LDL über, die ebenfalls über LDL-Rezeptoren von der Leber und anderen Geweben aufgenommen werden können (Mutschler *et al.*, 2001).



**Abbildung 2:** Schematischer Lipoprotein-Stoffwechsel (modifiziert nach Voet & Voet, 1994). Die über die Nahrung aufgenommenen Lipide werden zum Teil nach der Resorption im Darm an Fettgewebe und Muskulatur abgegeben und zum Teil von der Leber in Form von Chylomikronen-Remnants aufgenommen. In der Leber wird ein Teil des Cholesterins in Gallensäuren umgewandelt und ein Teil wird mit Triglyzeriden und Apolipoproteinen in Form von VLDL ans Plasma abgegeben. Aus den VLDL gehen durch Abspaltung von Fettsäuren IDL und letztlich LDL hervor, die über LDL-Rezeptoren von der Leber und extrahepatischem Gewebe aufgenommen werden. HDL hingegen nehmen Cholesterin aus dem Gewebe auf und transportieren es zurück zur Leber (reverser Cholesterin-Transport).

Im Gegensatz zu den LDL, die für den Transport von Cholesterin zum Gewebe sorgen, transportieren die HDL Cholesterin aus der Peripherie zur Leber zurück (reverser Cholesterin-Transport). Neben der Synthese von HDL in der Leber (Castle *et al.*, 1991) und in der Darmschleimhaut (Danielsen *et al.*, 1993) werden zusätzlich naszierende HDL im Plasma durch Interaktion mit anderen Lipoproteinen gebildet (Barrans *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1994). Das Cholesterin der HDL wird entweder nach Veresterung auf IDL übertragen, oder die reifen HDL werden als ganze Partikel von der Leber



aufgenommen.

Patienten mit hohen LDL-Cholesterin-Spiegeln weisen ein erhöhtes Risiko auf, an Arteriosklerose zu erkranken (proatherogene Wirkung der LDL). Dies beruht auf der Funktion der LDL, Cholesterin zu extrahepatischen Geweben zu transportieren, wo es teilweise in den Arterienwänden abgelagert wird und dadurch zu Gefäßwandverdickungen beiträgt. Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass sich ein hoher HDL-Cholesterin-Spiegel antiatherogen auswirkt (Akkerman *et al.*, 1987). Die Ursache hierfür liegt vermutlich im HDL-vermittelten reversen Cholesterin-Transport, der erstmals 1968 von Glomset formuliert wurde. Hierbei wird das überschüssige Cholesterin über die HDL aus extrahepatischen Geweben und Gefäßen zurück zur Leber transportiert, wo es verstoffwechselt wird.

## **1.2 Der Makrophage**

Bei den Makrophagen handelt es sich um mononukleäre, phagozytäre „Fresszellen“ des zellulären Immunsystems. Sie stammen von mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark ab und durchlaufen dort die Stadien des Monoblasten und des teilungsfähigen Promonozyten. Nach der Ausreifung im Knochenmark zirkulieren sie ein bis zwei Tage im Blut, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern und sich dort zu ortsständigen, gewebetypischen Makrophagen differenzieren (Vincent *et al.*, 1992; Pschyrembel, 2001).

### **1.2.1 Die Aufgaben des Makrophagen**

Die Hauptfunktion der Makrophagen besteht in der Phagozytose von Mikroorganismen, Zelltrümmern und sonstigen Fremdpartikeln, die mit Hilfe lysosomaler Enzyme intrazellulär abgebaut und eliminiert werden. Somit wirken die Makrophagen mikrobizid und weisen zudem eine ausgeprägte Zytotoxizität gegenüber Krebszellen auf (Pschyrembel, 2001).

Eine ähnlich wichtige Aufgabe der Makrophagen beruht auf ihrer zentralen Bedeutung für die zellvermittelte Immunität, da sie als Entzündungszellen mit B- und T-Lymphozyten in der Anfangsphase der Immunantwort interagieren und sowohl für die Antigenprozessierung als auch für die Antigenpräsentation verantwortlich sind (Mutschler *et al.*, 2001).

Makrophagen weisen außerdem einen sehr aktiven Fettstoffwechsel auf. Sie sind zur Speicherung von großen Mengen an Cholesterinestern befähigt, worauf in Kapitel 1.2.2

näher eingegangen wird (Goldstein *et al.*, 1979; Schwartz *et al.*, 1991).

Darüber hinaus bilden Makrophagen eine ganze Reihe von Sekretionsprodukten (Schwartz *et al.*, 1991; Lewis & McGee, 1992; Ross, 1995 und 1999):

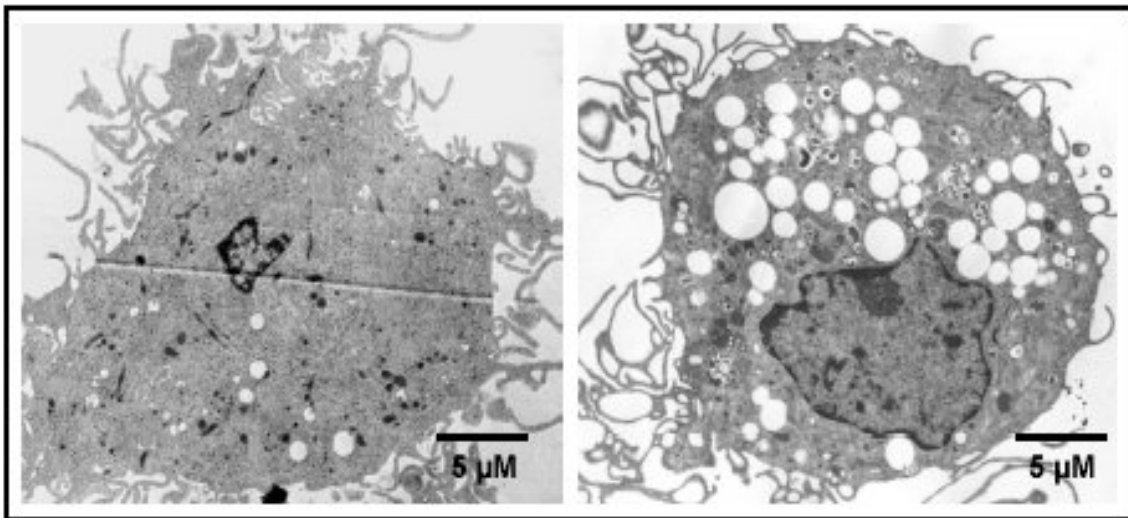
- Enzyme (z.B. Kollagenasen zur Neustrukturierung (engl.: remodelling) verletzter Gewebe, lysosomale Proteasen),
- an Entzündungen beteiligte Immunmediatoren und chemotaktische Faktoren (z.B. Interleukin-1 (IL-1), Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (M-CSF), Granulozyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)),
- parakrin wirkende Faktoren, die die Funktionen anderer Zellen in der unmittelbaren Umgebung modulieren (z.B. koloniestimulierender Faktor (CSF), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF $\beta$ )),
- Gewebefaktor (setzt die intrinsische Gerinnungskaskade in Gang),
- Kollagen Typ VIII und wahrscheinlich auch andere Kollagene.

Makrophagen bilden neben den Sekretionsprodukten wichtige Proteine des Lipid-Stoffwechsels (Fu & Borensztajn, 2002; Kisilevsky & Tam, 2003; Laffitte *et al.*, 2001; Liang & Burgess, 2001; Wågsäter *et al.*, 2003):

- ATP-Bindungskassetten-Transporter (z.B. ABCA1 und ABCG1)
- Apolipoprotein E (ApoE)
- Acyl-CoA-Cholesterin-Acyl-Transferase (ACAT)
- Adipophilin (siehe auch Kapitel 1.3).

### **1.2.2 Die Bedeutung des Makrophagen für die Arteriosklerose**

Den Makrophagen kommt im Hinblick auf die Entstehung der Arteriosklerose eine zentrale Bedeutung zu. Dies ist einerseits auf ihre Fähigkeit zur Schaumzellbildung, andererseits auf die Sekretion chemotaktisch wirksamer Stoffe durch Makrophagen in frühen und auch späten Stadien der Arteriosklerose zurückzuführen. Ein auffälliges Merkmal arteriosklerotischer Läsionen sind Schaumzellen, die durch eine ausgeprägte Speicherung von Cholesterinestern charakterisiert sind.



**Abbildung 3:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen humaner Primärmakrophagen. Links: 14 Tage alter Makrophage nach 48-stündiger Inkubation in serumfreiem Medium. Rechts: Schaumzelliger, 14 Tage alter Makrophage nach 48-stündiger Inkubation mit 80 µg acetyliertem LDL pro mL Medium. Cholesterinester-Speicherungen sind als weiße Tröpfchen zu erkennen. Anfertigung der Aufnahmen: Oliver Hofnagel, Institut für Arterioskleroseforschung, Münster.

Der Name Schaumzelle beruht darauf, dass die gespeicherten Cholesterinester in Form von Lipid-Tröpfchen akkumulieren und den Zellen dadurch ein schaumartiges Aussehen verleihen (vgl. Abbildung 3).

Lange Zeit wurden nur glatte Muskelzellen für die Schaumzellbildung verantwortlich gemacht (Wissler, 1968). Jedoch konnten Schaffner *et al.* (1980) in den durch Diät induzierten Intimaplaques von Kaninchen nachweisen, dass 80 bis 90% der Schaumzellen keinen morphologischen Hinweis auf glatte Muskelzellen lieferten, sondern dass ursprünglich Makrophagen die Vorläufer dieser Schaumzellen waren. Spätere elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen bestätigten diese Beobachtung (Aqel *et al.*, 1984 und 1985).

Die Aufnahme von Cholesterin erfolgt bei den meisten Zellen durch LDL-Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL, die einem negativen Rückkopplungsmechanismus unterliegt (Brown *et al.*, 1981). Bei hohen Cholesterin-Gehalten in der Zelle wird die Aufnahme von weiteren LDL durch Verringerung der LDL-Rezeptor-Expression unterbunden (Goldstein *et al.*, 1985; Tabas, 1995). Makrophagen sind im Gegensatz zu anderen Zellen zur übermäßigen Speicherung von Cholesterinestern und deshalb zur Umwandlung zu Schaumzellen befähigt, weil sie zusätzlich modifizierte Lipoproteine (oxidierte LDL = OxLDL, Malondialdehyd-modifizierte LDL, *in vitro* auch acetylierte LDL = AcLDL) über die so genannten Scavenger-Rezeptoren aufnehmen können. Diese Rezeptoren sind keiner negativen Rückkopplung durch Cholesterin-

Beladung unterworfen, so dass es zu einem ungehemmten Cholesterin-Einstrom kommen kann. Diese Eigenschaft könnte für die Pathogenese der Arteriosklerose von großer Bedeutung sein (Krieger & Herz, 1994; Ross, 1993; Schwartz *et al.*, 1991). Bislang ist unklar, ob die Schaumzellbildung insgesamt als proatherogen oder antiatherogen einzustufen ist. Proatherogen kann sie im Hinblick darauf betrachtet werden, dass die Schaumzellen nach übermäßiger Cholesterin-Speicherung nekrotisch werden und unter anderem zur Plaquentstehung beitragen. Andererseits nehmen die Makrophagen überschüssiges Plasma-Cholesterin auf, welches einen unabhängigen Risikofaktor für die Arteriosklerose darstellt, so dass die Makrophagen auch eine antiatherogene Wirkung ausüben könnten.

Zudem sind Makrophagen, wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, gemäß des "response to injury"-Modells bereits am ersten Schritt der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt. Sie wandern nach der Verletzung des Endothels in den subintimalen Raum ein. Dort sezernieren sie chemotaktisch wirksame Stoffe, die die Proliferation von Monozyten (GM-CSF, M-CSF), glatten Muskelzellen (TGF- $\beta$ ) und Endothelzellen (TNF- $\alpha$ , VEGF) induzieren (Ross *et al.*, 1995). Die Proliferation dieser Zellen und die Einwanderung der Monozyten in den Subintimalraum sind an der Verdickung der Arterienwand beteiligt. In späteren Stadien der Läsion bilden Makrophagen den gerinnungsaktivierenden Gewebefaktor, der die Bildung von gefäßverschießenden Thromben auslöst (Schwartz *et al.*, 1991). Durch die Sekretion von Kollagenasen und Matrix-Metalloproteinasen sind Makrophagen ferner am Abbau von Bindegewebsmatrizes, die sich stabilisierend auf arteriosklerotische Plaques auswirken, beteiligt (Galis *et al.*, 1994; Carmeliet, 2000). Dadurch kann es zum Aufreißen der Plaque, Gerinnselbildung und möglicherweise zum Infarkt kommen. Hingegen konnte gezeigt werden, dass Makrophagen Kollagen bilden (Weitkamp *et al.*, 1999), das zur Stabilisierung der Plaque beitragen könnte. Somit kommt dem Makrophagen bei der Entstehung und Entwicklung der arteriosklerotischen Plaque eine komplexe Rolle zu. Ob diese Zelle eher protektiv oder schädlich wirkt, hängt also von ihrem Aktivierungszustand und ihrer Beeinflussung durch die sie umgebenden Zellen ab.

## **1.3 Adipophilin**

### **1.3.1 Größe und Vorkommen**

Adipophilin (ADRP = adipose differentiation related protein) ist ein 50 kDa großes membranassoziiertes Protein, welches durch ein Gen auf Chromosom 9p21.3 kodiert wird (GeneCards<sup>TM</sup>, 2003). Die Adipophilin-mRNA ist 1,7 kb lang (Jiang *et al.*, 1992). Obwohl Adipophilin membranassoziiert ist, haben Sequenzanalysen überraschenderweise gezeigt, dass das Protein keine Transmembrandomäne enthält. Adipophilin ist hauptsächlich an der inneren Zellwand und an intrazellulären Membranen lokalisiert (Jiang & Serrero, 1992). Die Expression von Adipophilin wurde bisher in Fett speichernden Zellen wie humanen Adipozyten und Makrophagen, in Steroid produzierenden Zellen der Testes, Ovarien und Nebennierenrinde und in Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Hepatozyten und Muskelzellen beobachtet. Adipophilin ist in kleinen Lipid-Tropfen von Präadipozyten lokalisiert, wurde im Gegensatz dazu aber nicht in reifen Adipozyten gefunden (Brasaemle *et al.*, 1997). Adipophilin, welches man aus dem endoplasmatischen Retikulum isoliert, ist in der Regel 5 kDa kleiner, als solches, das mit Lipid-Tropfen assoziiert ist. Die Ursache dafür ist bisher unbekannt. Imamura *et al.* (2002) konnten mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie zeigen, dass Adipophilin an der Oberfläche von Lipid-Tropfen ringförmig lokalisiert ist.

### **1.3.2 Bedeutung für den Zellstoffwechsel**

Adipophilin stimuliert carrier-vermittelt die Aufnahmegeschwindigkeit und -menge von langkettigen freien Fettsäuren (z.B. Arachidonat, Oleat oder Palmitat) in die Zelle. Der Mechanismus ist noch unbekannt. Die Aufnahme von langkettigen, gesättigten und einfach bzw. mehrfach ungesättigten Fettsäuren in die Zelle wird erhöht. Hierbei spielt der Grad der Sättigung keine Rolle. Im Gegensatz dazu werden die Aufnahme und der intrazelluläre Transport von mittel- und kurzkettigen Fettsäuren nicht beeinflusst. Es ist noch nicht sicher, ob Adipophilin alleine als Fettsäure-Mediator wirkt, ob es in einem Transportsystem zusammen mit anderen zellulären Proteinen des Fettstoffwechsels involviert ist, oder ob es eine andere regulatorische Rolle spielt. (Gao & Serrero, 1999).

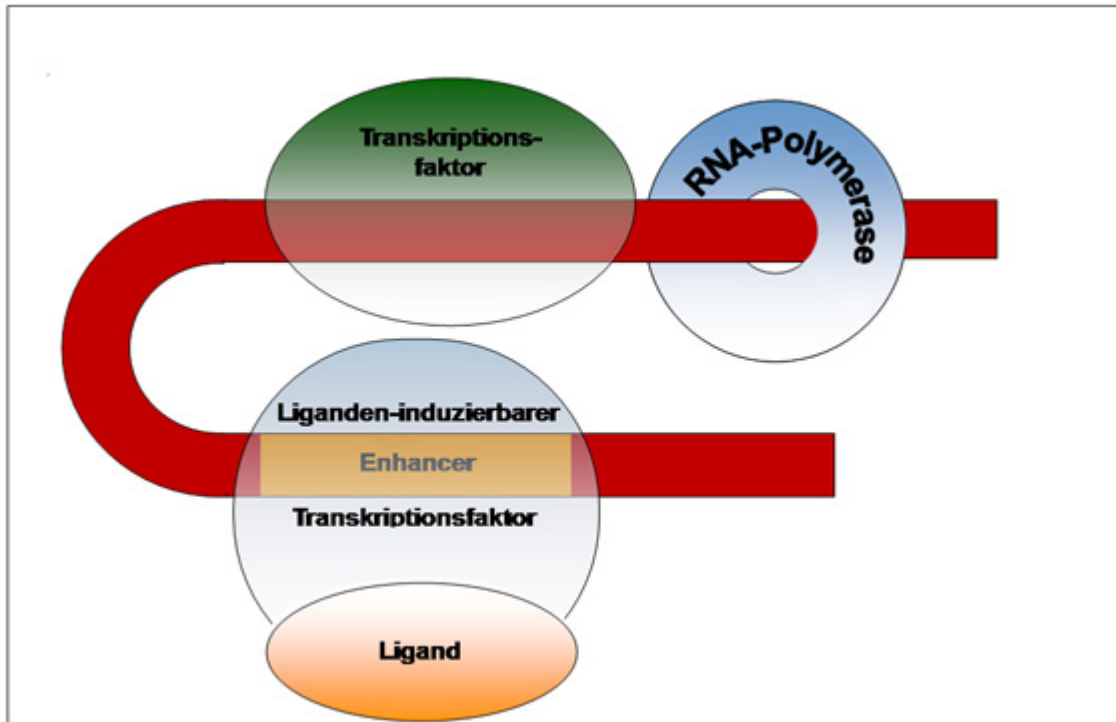
Adipophilin beteiligt sich in der Zelle an der Bildung, Lagerung und dem Transport von Lipid-Tropfen und ist eng mit ihnen assoziiert. Es wird in Adipozytenkulturen von Fettsäuren zeit- und dosisabhängig aktiviert, wenn Präadipozyten zu Adipozyten

heranreifen. TNF- $\alpha$ , ILs, IFN- $\gamma$  oder Serum beeinflussen die Expression nicht (Wang *et al.*, 1999). Die Stimulation des Adipophilin-Proteins durch Fettsäuren ist deutlicher als die der mRNA-Expression. Dieses könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Protein von Fettsäuren stabilisiert wird oder eine posttranslationale Regulation durch kovalente Bindung von Fettsäuren vorliegt (Gao *et al.*, 1999).

Die *in vivo* Expression von Adipophilin korreliert nach Buechler *et al.* (2001) im Gegensatz zu den *in vitro*-Ergebnissen nicht mit dem Gehalt an freien Fettsäuren, Cholesterinestern oder freiem Cholesterin im Plasma.

Neben Adipophilin existieren noch andere Lipid-Tropfen assoziierte Proteine, die eine enge Verwandtschaft mit Adipophilin aufweisen, die Perilipine. Adipophilin und Perilipin können in steroidogenen Zellen gleichzeitig vorkommen, jedoch nicht in Adipozyten. Dort ist eine Änderung der Oberflächenzusammensetzung der Lipid-Tropfen zu beobachten, wenn eine starke Erhöhung der Triglyzerid-Lagerung stattfindet. Ein Mechanismus ist noch unbekannt. Der Austausch von Adipophilin durch Perilipin an den Lipid-Tropfen impliziert, dass Perilipin eine ergänzende Funktion zu Adipophilin erfüllt. Perilipine wurden in kleinen und großen Lipid-Tropfen und in späten Differenzierungsstadien der Makrophagen gefunden (Brasaemle *et al.*, 1997).

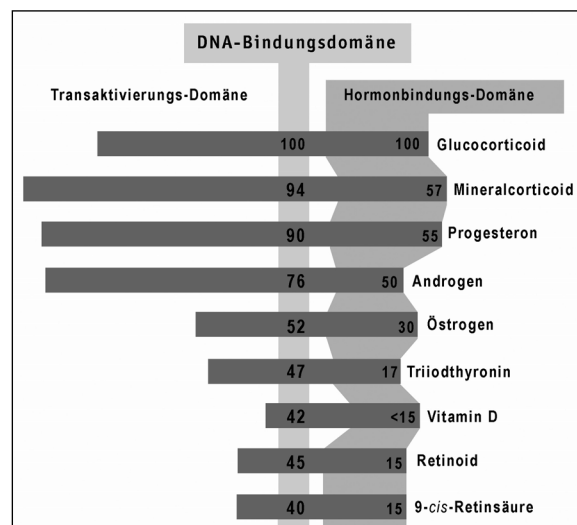
### 1.3.3 Differentielle Genexpression



**Abbildung 4:** Funktion eines Liganden-induzierbaren Transkriptionsfaktors. Zusätzlich zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren können Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren die RNA-Synthese beeinflussen, indem sie zusammen mit ihrem Liganden an eine spezielle DNA-Sequenz binden, die oberhalb der Promotorregion zu finden ist. Diese Sequenz wird als Verstärker (engl.: enhancer) bezeichnet.

Die Expression von Adipophilin kann durch Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren, z.B. PPAR $\gamma$ , beeinflusst werden. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die eukaryotische RNA-Polymerase benötigt, um an DNA zu binden und die Transkription einzuleiten. Die Faktoren bilden zusammen mit der RNA-Polymerase den Initiationskomplex, der für die korrekte Bindung der Polymerase an der Startstelle der Transkription verantwortlich ist. Zusätzlich zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren gibt es auch spezielle Faktoren, die an Verstärker-Elemente (engl.: enhancer) binden, die bis zu tausend Basenpaare oberhalb der Promotorregion liegen können. Die Regulation der Transkription findet dann statt, wenn die DNA-bindenden Proteine mit ihren Liganden an die Verstärker-Elemente binden (vgl. Abbildung 4). Der entstehende Komplex wirkt als zusätzlicher Transkriptionsfaktor.

Ein besonderes Augenmerk gilt in dieser Arbeit den Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Steroidhormonrezeptoren (vgl. Abbildung 5). Sie bestehen in der Regel aus wenigstens drei Domänen. N-terminal finden sich Domänen, die die Aktivierung der Transkription vermitteln können. Daran anschließend kommt eine relativ kurze DNA-Bindungsdomäne gefolgt von der C-terminalen Hormonbindungsdomäne. Diese enthält außerdem Signale für die Dimerisierung, die bei sämtlichen Rezeptoren dieses Typus vorkommt (Löffler & Petrides, 1998).

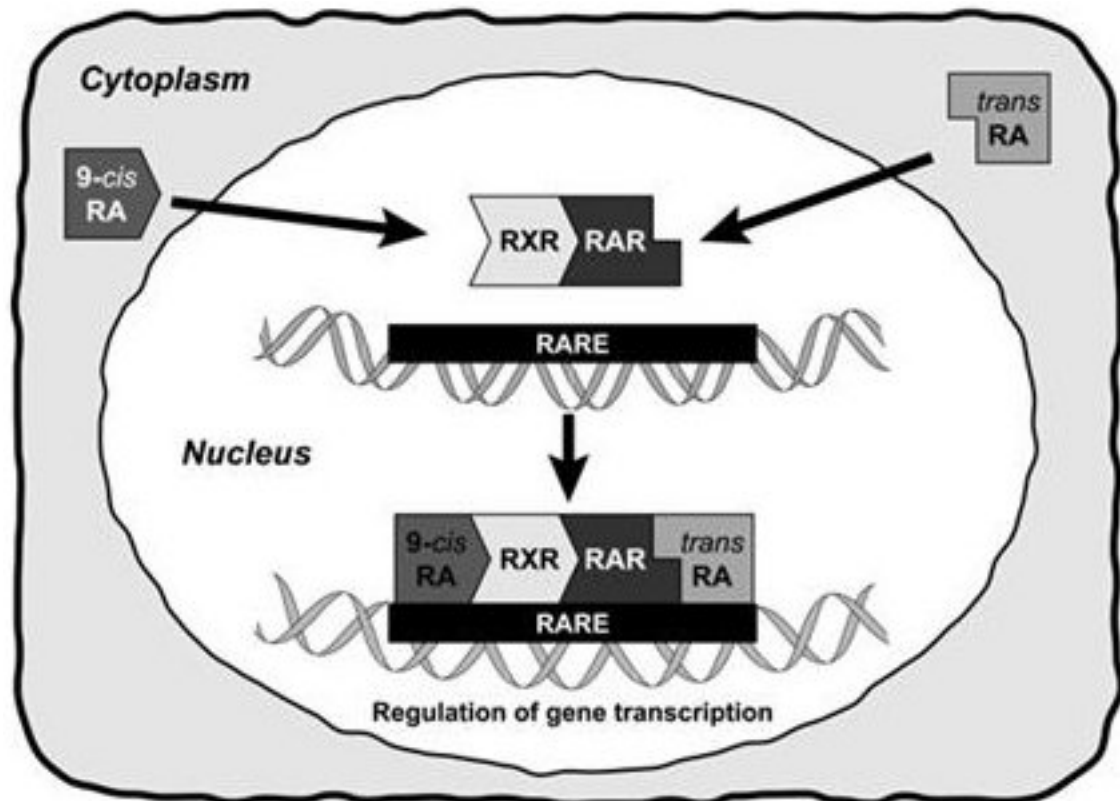


**Abbildung 5:** Darstellung der Domänenstruktur eines durch Steroide regulierbaren Transkriptionsfaktors mit dem typischen modulatorischen Aufbau aus drei Domänen. Die N-terminale Transaktivierungsdomäne vermittelt die Aktivierung der Transkription; mittig ist die DNA-Bindungsdomäne zu finden; C-terminal liegt die Hormonbindungs-Domäne, die auch die Signale für die Dimerisierung enthält.

Zusätzlich zu dem Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  haben chemisch modifizierte LDL einen Einfluss auf die Expression von Adipophilin. Wang *et al.* (1999) beschrieb, dass acetylierte, oxidierte und enzymatisch modifizierte LDL, nicht aber natives LDL, die Hochregulation der Adipophilin-mRNA bewirken. Auch zeigte diese Gruppe, dass die Expression der mRNA in stenosierten Koronararterien mit Plaques, die lipidreiche Makrophagen enthalten, wesentlich höher ist, als in gesunden Koronargefäßen. Daher kann man Adipophilin als spezifischen Marker für die Lipid-Akkumulation ansehen. Außer Adipophilin gibt es noch zahlreiche andere Gene, die bei der Schaumzellbildung hoch reguliert werden und mit Arteriosklerose assoziiert sind, wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, LDL- und OxLDL-Rezeptoren. OxLDL und AcLDL aktivieren die Adipophilin-Expression in Makrophagen indirekt durch den Kernrezeptor PPAR $\gamma$ .



PPARs haben im Organismus viele Aufgaben. PPAR-Bindungsstellen sind in vielen verschiedenen Genen zu finden (Ikeda *et al.*, 2000). Sie regulieren die Entwicklung von Adipozyten, den Lipid- und Glukose-Stoffwechsel und sind somit an metabolischen Funktionsstörungen wie Hypertriglyzeridämie und Diabetes mellitus Typ II beteiligt (Wang *et al.*, 1999). Zusätzlich regulieren PPARs antiinflammatorische Prozesse und gelten als Hauptregulatoren für die Zelldifferenzierung (Saluja *et al.*, 2001). Sie sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und Mitglieder der Kernrezeptor-Familie.



**Abbildung 6:** Prinzip der RXR/RAR-Heterodimer vermittelten Aktivierung der Genexpression. All-*trans* Retinsäure (*atRS*) und 9-*cis*-Retinsäure (*9cisRS*) werden zum Zellkern transportiert. Dort werden sie an Liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren gebunden. *AtRS* bindet an RAR und *9cisRS* an RXR. Zusammen bilden sie das RAR/RXR-Heterodimer. Dieses bindet an das Verstärker-Element, auch retinoic acid response element (RARE) genannt (leicht modifiziert nach [www.orst.edu/dept/lpi/infocenter/vitamins/vitaminA/rxr.html](http://www.orst.edu/dept/lpi/infocenter/vitamins/vitaminA/rxr.html)).

Es existieren drei Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  und  $\gamma$ ), die untereinander hohe Ähnlichkeiten aufweisen (Gorla-Bajszczak *et al.*, 1998). Ibuprofen, Indomethacin und andere nicht-steroidale entzündungshemmende Mittel binden direkt an den PPAR $\gamma$ -Rezeptor als Agonisten und wirken auf diesem Weg sekundär stimulierend auf die Adipophilin-Expression (Ye & Serrero, 1998). PPARs können sowohl mit dem Kernrezeptor retinoid X receptor (RXR), als auch mit liver X receptor (LXR) Heterodimere bilden. LXR wirkt dabei inhibitorisch, weil es keinen DNA-Bindungskomplex mit PPARs bildet und die

Bindung von PPAR/RXR-Heterodimeren an die DNA *in vitro* verhindert. *In vivo* antagonisiert LXR die Aktivierung der Transkription durch PPARs (Kenji *et al.*, 1996). RXR ist zusammen mit PPAR $\gamma$  in der Lage, die Adipophilin-Expression durch die Liganden Prostaglandin J<sub>2</sub> und 9-*cis* Retinsäure zu stimulieren.

Es ist bekannt, dass RXR nach dem Modell in Abbildung 6 Dimere bildet (Joyeux *et al.*, 1996). Es kann Homodimere oder Heterodimere mit anderen Transkriptionsfaktoren formen (vgl. Tabelle 1), die im Folgenden beschrieben werden, weil sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

**Tabelle 1:** Dimerpartner von RXR und ihre Liganden.

Kernrezeptor	Bezeichnung	Ligand
Heterodimere von RXR		
CAR $\beta$	Konstitutiv Androstan Rezeptor (engl.: constitutive androstane receptor beta)	Phenobarbital Picrotoxin
ER	Östrogen-Rezeptor (engl.: estrogen receptor)	17-beta-Estradiol (E2)
FXR	Farnesoid X Rezeptor (engl.: farnesoid X receptor)	chenodeoxycholic acid (CDCA)
LXR $\alpha, \beta$	Leber X Rezeptor alpha, beta (engl.: liver X receptor alpha, beta)	22r-Hydroxycholesterol (22r-Hc)
PPAR $\alpha$	Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor alpha (engl.: peroxisome proliferator-activated receptor alpha)	Fenofibrat Ciprofibrat
PPAR $\gamma$	Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor gamma (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)	15d-Prostaglandin J <sub>2</sub> (15d-Pg J <sub>2</sub> )
PXR	Pregnan X Rezeptor (pregnane X receptor)	Rifampicin
RAR $\alpha, \beta, \gamma$	Retinsäure-Rezeptor alpha, beta, gamma	all- <i>trans</i> Retinsäure ( <i>atRS</i> )

	(engl.: retinoic acid receptor alpha, beta, gamma)	
TR (THR) $\alpha, \beta, \gamma$	Thyroidhormon Kernrezeptor alpha, beta, gamma (engl.: thyroid hormone nuclear receptor alpha, beta, gamma)	Triiodthyronin (T3)
VDR	Vitamin D3 Rezeptor (engl.: vitamin D3 receptor)	1,25-dihydroxy Vitamin D3 [1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ]
Homodimer		
RXR $\alpha, \beta, \gamma$	Retinoid X Rezeptor alpha, beta, gamma (engl.: retinoid X receptor alpha, beta, gamma)	9- <i>cis</i> -Retinsäure (9cRS)

Die Aktivierung von RXR erfolgt durch ein Retinoid (fettlösliches Vitamin A-Derivat). Es handelt sich um den Liganden 9-*cis*-Retinsäure. 9-*cis*-Retinsäure ist nicht spezifisch für den Rezeptor RXR, sondern aktiviert gleichermaßen den retinoic acid receptor (RAR). Spezifische Liganden für RXR können synthetisch hergestellt werden und sind nicht nativ vorhanden (Boehm *et al.*, 1995; Beard *et al.*; 1995). Sie führen zu einer Suppression der Hyperglykämie bei Diabetes mellitus Typ II und der Leberhyperplasie, sie erhöhen die Fettsäureoxidation und verhindern die intestinale Cholesterin-Aufnahme (Standeven *et al.*, 2001). Retinsäuren modulieren die Proliferation und Differenzierung von Zellen in einer Vielzahl von Geweben (Kaiser *et al.*, 1999) und spielen bei Entzündungen, Karzinomen und Arteriosklerose eine Rolle (Wågsäter *et al.*, 2002). Therapeutisch werden Retinoide bei dermatologischen Störungen und verschiedenen Karzinomen eingesetzt. Ein Nebeneffekt ist dabei eine Dyslipidämie mit erhöhten Triglyzeriden, erhöhtem Gesamt-Cholesterin und erniedrigtem HDL. Diese Konstellation führt zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit (KHK), wobei das KHK-Risiko proportional zur Triglyzerid-Konzentration unabhängig von der Höhe des LDL-Spiegels verläuft (Staels, 2001). Retinsäuren wirken aufgrund der Konkurrenz zwischen den Kernrezeptoren estrogen receptor (ER), RAR und RXR auf DNA-Ebene antiöstrogen (Joyeux *et al.*, 1996), da 9-*cis*-Retinsäure eine höhere Affinität zu RXR aufweist als die anderen Liganden zu ihren Rezeptoren.

Das führt dazu, dass RXR von der heterodimeren in die homodimere Form überführt wird. Das gleiche Prinzip gilt für die Liganden T3 und Vitamin D3 (Lee *et al.*, 1955).

Der Kernrezeptor RAR bildet wie die PPARs mit RXR Heterodimere und wird wie RXR von Vitamin A-Derivaten aktiviert. Im Gegensatz zu 9-*cis*-Retinsäure, die sowohl RXR als auch RAR aktiviert, ist all-*trans*-Retinsäure spezifisch für RAR (Staels, 2001).

Ein weiteres Heterodimer zu RXR ist der Kernrezeptor farnesoid X receptor (FXR). Dieser Gallensäure-Rezeptor wird vor allem in der Leber exprimiert (Bramlett *et al.*, 2000). *In vivo* wird die Konversion von Cholesterin zu Gallensäuren in der Leber durch die Cholesterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase reguliert, einem Enzym des Gallensäure-Biosyntheseweges. Die Transkription dieses Enzyms wird von Hormonen, Diätfaktoren und diurnal rhythmisch reguliert. Die Rückkopplungs-Repression durch Gallensäuren ist ein wichtiger physiologischer Mechanismus in der Gallensäure- und Cholesterin-Homöostase.

Der Vitamin D-Rezeptor (VDR) spielt beim Prostatakarzinom eine wichtige Rolle. Es wurde festgestellt, dass das Prostatakarzinom durch einen Mangel an Vitamin D gefördert werden kann. Der Mechanismus ist unklar. Es wurde auch gezeigt, dass Vitamin D3 in malignen Zellen einen antiproliferativen Effekt hat (Skowronski *et al.*, 1995).

Der pregnane X receptor (PXR) ist ein Steroid-Rezeptor, der eine Schlüsselrolle in der Expression von Mitgliedern der Cytochrom P450 Familie 3 Subfamilie A (Cyp3A) spielt und ebenso die molekulare Basis für Speziesunterschiede in der Induktion von CYP3A durch Xenobiotika darstellt. Cytochrom P450-Isoenzyme spielen, je nach ihrer Substratspezifität, eine wichtige Rolle beim Abbau von Arzneimitteln und Fremdstoffen, bei der Biosynthese von Steroidhormonen oder bei der Bildung von physiologisch aktiven Eicosanoiden. PXR wird hauptsächlich in Leber und Dünndarm, aber auch weniger ausgeprägt in Nieren und Lunge exprimiert (LeCluyse, 2001). Ein Ligand von PXR ist Rifampicin, ein Antituberkulotikum, welches die RNA-Polymerase in proliferierenden Bakterien hemmt (Scholz & Schwabe, 2000).

Der constitutive androstane receptor (CAR) induziert genau wie PXR die Transkription von Cytochrom P450 (Moore *et al.*, 2000). Die Expression von CAR ist in der Leber am höchsten, aber auch im Dünndarm detektierbar (Tzamelis & Moore, 2001). Das Barbiturat Phenobarbital und das Glycosid Picrotoxin (Newland & Cull-Candy, 1992) sind wirksame Liganden von CAR (Fujisaki *et al.*, 1993; Muangmoonchai *et al.*, 2001).

Weitere Kernrezeptoren, die als Heterodimere an DNA binden, sind ER und der thyroid receptor (TR) (Lee *et al.*, 1998). Genau wie Retinoide beeinflussen auch das Steroid-Hormon Estradiol (Ligand für ER) und das Schilddrüsenhormon T3 (Ligand für TR) das Wachstum von Bronchialkarzinomen. Der Mechanismus ist noch nicht geklärt (Shao *et al.*, 1995; Klinge *et al.*, 1997).

### **1.4 Lipid-Tropfen**

Lipid-Tropfen sind subzelluläre Organellen im Zytosol zahlreicher Zellen. Sie dienen als Depot für Triglyzeride und Cholesterinester (Wolins *et al.*, 2001). Große triglyzeridreiche Lipid-Tropfen in Adipozyten stellen die Hauptenergieserve des Körpers dar, wohingegen kleinere cholesterinesterreiche Tropfen in steroidogenen Zellen der Nebennierenrinde, Testes und Ovarien als Cholesterinquelle für die Steroidhormonsynthese und Membranbiogenese dienen (Brasaemle *et al.*, 1997).

Lipid-Tropfen sind zusammengesetzt aus einem Kern, bestehend aus Triglyzeriden und Cholesterinestern, umgeben von einer Phospholipid-Monoschicht. Diese Schicht ist wiederum umgeben von Proteinen wie Adipophilin, Perilipin und TIP 47. Dies sind Proteine der so genannten PAT Familie (P: Perilipin, A: Adipophilin, T: TIP47 (tail interacting protein von 47 kDa Größe)) (Robenek *et al.*, 2004).

Lipid-Tropfen entstehen vermutlich in eukaryotischen Zellen am Endoplasmatischen Retikulum. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Zweytick *et al.* mittels der Gefrierbruchmethode zeigen, dass während der Genese von Lipid-Tropfen zwischen ihrer Oberfläche und dem äußeren Blatt des Endoplasmatischen Retikulums fortbestehende Flächen existieren (Zweytick *et al.*, 2000).

Außerdem existieren neben den Lipid-Tropfen in Makrophagen lipidhaltige große, bisher nur wenig beschriebene flächenförmige Organellen, die deskriptiv als Lipid-Segel bezeichnet werden. Zusammenfassend werden Lipid-Segel und Lipid-Tropfen als Lipid-Körper einer Zelle bezeichnet (Robenek *et al.*, 2004).

Adipophilin ist aufgrund seiner Funktion im Fettstoffwechsel als Transportprotein von Fettsäuren für die Bildung und Funktion von Lipid-Tropfen wichtig. Die genaue molekulare Verbindung von Adipophilin zur Matrix der Lipid-Tropfen ist noch unbekannt (McManaman *et al.*, 2003). Nach neusten Erkenntnissen ist Adipophilin eine Komponente von Lipid-Tropfen und -Segeln, das diese Organellen nicht nur umgibt, sondern auch in ihrem Inneren vorkommt (Robenek *et al.*, 2004).

## 2 Zielsetzung

Adipophilin spielt eine wichtige Rolle im Lipid-Stoffwechsel der Zelle. Es ist mit Lipid-Tropfen assoziiert und am Transport von freien Fettsäuren, freiem Cholesterin und Cholesterinestern in der Zelle beteiligt. Trotz vieler Untersuchungen ist die genaue Funktion des Adipophilins noch nicht im Detail bekannt. In unserer Arbeitsgruppe wurde Adipophilin als eines von vielen für die Schaumzellbildung wichtiges Protein durch Mikroarrays identifiziert. Dabei sahen wir Adipophilin durch RXR reguliert und begannen uns näher dafür zu interessieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der Adipophilin-Expression näher zu charakterisieren um somit einen wichtigen Schritt der Schaumzellbildung besser zu verstehen.

Es gibt Kernrezeptoren, von denen man weiß, dass sie über ihre Liganden an der Regulation der Adipophilin-Expression beteiligt sind. Einer davon ist PPAR $\gamma$ . Es ist bekannt, dass er die Adipophilin-Expression differentiell reguliert. PPAR $\gamma$  bildet mit RXR Heterodimere. RXR wiederum bildet sowohl Homodimere als auch, wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben, zahlreiche Heterodimere mit anderen Kernrezeptoren. Im Rahmen der Arbeit sollten weitere Faktoren identifiziert werden, die die Expression von Adipophilin alleine oder im Zusammenhang mit RXR modulieren, und in welcher Weise das geschieht. Dazu wurden acht Heterodimere von RXR jeweils einzeln und in Kombination mit RXR untersucht. Zusätzlich wurde die Abhängigkeit der Adipophilin-Expression von der Dauer der Inkubation mit den Liganden der Rezeptoren und deren Konzentration untersucht.

Die intrazelluläre Lokalisation von Adipophilin sollte näher beleuchtet werden. Mit Hilfe der Immunhistochemie und der Gefrierbruch-Immunzytochemie sollte die genaue Lage und die Verbindung zu Lipid-Tropfen dargestellt werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

Die folgende Liste enthält sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien, mit Ausnahme der Bestandteile der im experimentellen Teil aufgeführten kommerziell erhältlichen Kits.

**Tabelle 2:** Übersicht der verwendeten Materialien

Chemikalien:	Bezugsquelle:
Aceton	Mallinckrodt Baker BV, Deventer, NL
Acetonitril	Mallinckrodt Baker BV
Agarose für DNA/RNA Elektrophorese	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarosegel	Helena Laboratories, Sunderland, Großbritannien
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Barbital-Natriumbarbitalpuffer	Helena Laboratories
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Inc., Rockford, IL, USA
BSA (Rinderserumalbumin), Fraktion V	Carl Roth GmbH
Chloroform	Mallinckrodt Baker BV
Cholesterin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cholesterinheptadecanoat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Diethylether	E. Merck KGaA, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat	E. Merck KGaA
DNA-Größenstandard: 1 Kb Plus DNA Ladder <sup>TM</sup>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> EDTA, Dihydrat	Carl Roth GmbH

---

Eisessig	Carl Roth GmbH
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromidlösung, 1% (w/v)	Carl Roth GmbH
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Fettrot 7B	Chroma Gesellschaft GmbH, Münster
Fuorescent Mounting Medium	Synaptic Systems GmbH, Göttingen
Flüssigstickstoff	Westfalen AG, Münster
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA
L -Glutamin	Invitrogen GmbH
Glyzerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Harnstoff	Carl Roth GmbH
Hoechst Dye	Hoechst AG, Frankfurt am Main
HPLC-Wasser	Mallinckrodt Baker BV
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumbromid	E. Merck KGaA
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA
Kalumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA
Kaliumhydroxid	E. Merck KGaA
Kochsalzlösung, isoton, 0,9% (w/v)	B. Braun Melsungen AG
Kohlendioxid	Westfalen AG
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
2-Mercaptoethanol	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg



---

Methanol (HPLC-Qualität)	Labscan Ltd., Dublin, Irland
Natriumacetat	E. Merck KGaA
Natriumazid	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	Invitrogen GmbH
Natriumpyruvat, 100 mM	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Natronlauge, 2 N	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NP-40 (Nonidet P 40)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> -Primer	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
QuantiTect SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNasin <sup>®</sup> Ribonukleaseinhibitor	Promega GmbH, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH
Saccharose (Sucrose)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure, 2 N	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure, 36,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SuperScript <sup>™</sup> II	Gibco BRL Life Technologies GmbH
SYBR <sup>®</sup> Green RT-PCR-Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
1 x TBS (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween <sup>®</sup> -20, pH 7,5)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Tween®-20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
<b>Antikörper und Detektionsreagenzien:</b>	<b>Bezugsquelle:</b>
Anti-Adipophilin-Antikörper aus Maus	Progen Immuno-Diagnostika, Heidelberg
Anti-Maus-IgG-Antikörper, mit Peroxidase markiert, aus Ziege	Bio-Rad Laboratories GmbH
Anti-Maus-IgG-Antikörper, mit 12 nm kolloidalem Gold gekoppelt, aus Ziege	Dianova, Hamburg
Anti-Maus –Cy3 Antikörper	Dianova
<b>Zellkultur:</b>	<b>Bezugsquelle:</b>
100x Natriumpyruvat	Invitrogen GmbH
Aminosäuren, nichtessentiell, 100 mM	Invitrogen GmbH
CasyClean Kapillar- und Systemreiniger	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casyton-Lösung	Schärfe System GmbH
Dextran T-500, 3% (w/v) in 0,9% (w/v) NaCl-Lösung	Apotheke der Universitätsklinik, Münster
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Einwegkanülen, 20 G	B. Braun Melsungen AG; Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Einwegspritzen	B. Braun Melsungen AG
Fötale Kälberserum	Biochrom KG, Berlin
Kryoröhrchen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz; Greiner GmbH, Solingen
Kulturplatten, 6, 12, 24, 96 Vertiefungen	Techno Plastic Products AG
Lab-Tec® Chamber slides	NUNC, Wiesbaden
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung	Invitrogen GmbH
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

RPMI-1640	Invitrogen GmbH
Schraubdeckelgefäße, 15 mL, 50 mL	Greiner GmbH
THP1-Zellen	ATCC, Manassas, Virginia, USA
Zählkammer, Neubauer	E. Merck KGaA
Zellkulturflaschen, 15 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup>	Techno Plastic Products AG
<b>Weiteres Zubehör:</b>	<b>Bezugsquelle:</b>
Dialyseschläuche Spectra/Por Membran (MWCO 12000-14000)	Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, Kalifornien, USA
Einweghandschuhe SafeSkin <sup>®</sup> Satin Plus <sup>®</sup>	Safeskin GmbH, Neufahrn
Einweghandschuhe SafeGrip <sup>®</sup> Nitril	Südlaborbedarf, Gauting
Filtertips ART <sup>®</sup> 10 Reach	Molecular BioProducts, San Diego, Kalifornien, USA
MicroAmp <sup>®</sup> Optical 386-Well Reaction Plates	Applied Biosystems
Objektträger	Engelbracht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde
Papiertücher	SCA Hygiene Paper, Bedfordshire, GB
Phosphor Imaging Plate BAS-IIIS	Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
Reaktionsgefäße, 500 µL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Saran <sup>™</sup> -Folie	Dow Deutschland, Inc., Schwalbach
Standardpipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments GmbH, Palo Alto, Kalifornien, USA

### 3.2 Geräte

**Tabelle 3:** Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät:	Bezugsquelle:
ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Axioskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
BioPhotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
Brutschrank (Heraeus HeraCell)	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
CASY®1-Gerät zur Zellzahlbestimmung	Schärfe System GmbH
CCD-Kamera	Sony Deutschland GmbH, Köln
Diaflo Ultrafiltrations Membran	Amicon, Beverly, Massachusetts, USA
Elektronenmikroskop EM 201 bzw. 410	Philips, Amsterdam, Niederlande
ELISA-Reader Fusion™	Packard BioScience Company, Meriden, USA
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
Filmplatten 4489	Kodak, Stuttgart
Gefrierätzanlage BA 300	Balzers AG, Liechtenstein
GeneAmp PCR System 9600 oder 9700	Applied Biosystems
Horizontale Gelelektrophoresekammern:	
Mini Sub® Cell GT Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini Sub® DNA Cell Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Heizblock Techne Dri-Block® DB-2A	Thermo-Dux Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim
Heraeus Labofuge 400e	Heraeus Instruments GmbH
Lichtmikroskop Wilovert S Typ h500	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
pH-Meter Beckman $\Phi$ 10 pH Meter mit Beckman Elektrode 39535	Beckman Instruments GmbH

Photometer Pharmacia Ultrospec III	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH
Polaroid-Kamera MP4+ Modell 44-16	Polaroid GmbH, Offenbach, BRD
Quarzglasküvette Suprasil 105.210-QS, Schichtdicke 10 mm	Hellma GmbH Glastechnische-Optische Werke, Müllheim
Soniprep 150 Sonikator (UW 70)	Bandelin electronic, Berlin
Spannungsgeber Bio-Rad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH
SpeedVac Concentrator SVC 100H mit Refrigerated Condensation Trap	Savant Instruments, Inc., Farmingdale, New York, USA
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir® HB 2448	Heraeus Instruments GmbH
Stickstofftank L'Air Liquide Modell GT 140	L'Air Liquide, Champigny sur Marne, Frankreich
Ultrafiltrationszelle Amicon (Modell 8010)	Amicon
Ultraschallwasserbad Laboson 200	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Beckman L 8-70-Ultrazentrifuge	Beckman Instruments GmbH
UV-Detektor Kontron 440-Diodenarraydetektor	Bio-Tek Kontron Instruments

### **3.3 Zellkultur**

#### **3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Die eukaryotischen Zellen wurden in Brutschränken unter sterilen Bedingungen bei 37°C mit einem Kohlendioxidgehalt von 5% (v/v) in Kultur gehalten. Alle Medien für die Zellkultur wurden vor dem Gebrauch auf 37°C erwärmt (Phelan, 1996; Schmitz *et al.*, 1990).

### 3.3.2 Zusammensetzung des verwendeten Mediums

**Tabelle 4:** Zusammensetzung von Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), laut Firmenkatalog Invitrogen GmbH, 2001 (Moore *et al.*, 1967).

Komponente	Gehalt [mg/l]	Komponente	Gehalt [mg/l]
<b>Aminosäuren</b>			
L-Arginin	200,00	L-Leucin	50,00
L-Asparagin	50,00	L-Lysin · HCl	40,00
L-Asparaginsäure	20,00	L-Methionin	15,00
L-Cystin	50,00	L-Phenylalanin	15,00
L-Glutamin	300,00	L-Prolin	20,00
L-Glutaminsäure	20,00	L-Serin	30,00
L-Glycin	10,00	L-Threonin	20,00
L-Histidin	15,00	L-Tryptophan	5,00
L-Hydroxyprolin	20,00	L-Tyrosin	20,00
L-Isoleucin	50,00	L-Valin	20,00
<b>Anorganische Salze</b>			
CaCl <sub>2</sub>	200,00	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	100,00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	100,00	NaCl	6000,00
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	0,10	NaHCO <sub>3</sub>	2000,00
KCl	400,00	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	800,00
<b>Vitamine</b>			
p-Aminobenzoesäure	1,00	D-Calcium-	0,30
D-Biotin	0,20	Pyridoxal · HCl	1,00
Cholinchlorid	3,00	Riboflavin	0,20
Folsäure	1,00	Thiamin · HCl	1,00
i-Inositol	35,00	Vitamin B <sub>12</sub>	0,005
Nikotinamid	1,00		
<b>Weitere Komponenten</b>			
D-Glukose	2000,00	Phenolrot	5,00
Glutathion (reduziert)	1,00		

### 3.3.3 Bestimmung der Zellzahl

In der Regel wurde die Zelldichte für das Passagieren von Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zur Aussaat der THP1-Makrophagen für Inkubationsversuche wurde ein CASY<sup>®</sup>1-Gerät mit folgenden Einstellungen nach Anleitung des Herstellers verwendet: Verdünnung 1:2000 in 10 mL Casyton-Lösung, 400 µL Probenvolumen, 3 Messzyklen, x-Achse 0 - 30 µm, Messbereich 7,5 - 30 µm (bei einer Größe < 7,5 µm handelt es sich um tote Zellen bzw. Zellbruchstücke).

### 3.3.4 Kultivierung proliferierender Zellen

Für die Kultivierung teilungsfähiger eukaryotischer Zellen wurde nachfolgendes Medium verwendet.

#### Komplettiertes RPMI-1640:

RPMI-1640	500 mL
Fötale Kälberserum	10% (v/v)
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL
L-Glutamin	2 mM

#### 3.3.4.1 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Die in Flüssigstickstoff eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen pipettiert, mit 5 mL komplettiertem Medium versetzt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu entfernen.

**Tabelle 5:** Übersicht über die Zahl der ausgesäten THP1-Zellen.

4er chamber slide	24-well	6-well	25 cm <sup>2</sup>	75 cm <sup>2</sup>	150 cm <sup>2</sup>
0,3 · 10 <sup>6</sup>	0,38 · 10 <sup>6</sup>	1,5 · 10 <sup>6</sup>	3,3 · 10 <sup>6</sup>	1 · 10 <sup>7</sup>	2 · 10 <sup>7</sup>

#### 3.3.4.2 Subkultivierung von Suspensionszellen

Bei THP1-Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, deren Zelldichte regelmäßig im Lichtmikroskop kontrolliert wurde. War die Zelldichte ausreichend, so wurden die Zellen für 10 min mit 1200 × g bei RT zentrifugiert. Nachdem sie in komplettiertem Medium resuspendiert worden waren, wurde die Zellzahl mittels der Neubauer-Kammer oder des CASY<sup>®</sup>1-Geräts bestimmt.

Die THP-1-Zellen wurden in der Regel gemäß Tabelle 5 in Kulturflaschen überführt, mit komplettiertem Medium versetzt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium durch Abzentrifugation der Zellen und Resuspension des Pellets mit frischem Medium erneuert.

#### 3.3.4.3 Ausdifferenzierung von THP1-Zellen

Für Experimente mit THP1-Makrophagen mussten die in Suspension vorliegenden

THP1-Monozyten zu adhärennten Makrophagen ausdifferenziert werden. Dies wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  2-Mercaptoethanol und 100 ng/mL Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zum Kulturmedium und anschließender Kultivierung im Brutschrank bei 37°C für vier Tage bewirkt (Dory, 1993).

### 3.3.4.4 Lagerung von eukaryotischen Zellen

#### Einfriermedium:

RPMI-1640	500 mL
Fötale Kälberserum	10% (v/v)
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 $\mu\text{g/mL}$
L-Glutamin	2 mM
Dimethylsulfoxid	10% (v/v)

Die THP1-Zellen wurden 10 min mit 1200  $\times$  g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur Bestimmung der Zellzahl in 10 mL Medium aufgenommen. Danach wurde erneut zentrifugiert und die Zellzahl durch Zugabe von Einfriermedium auf  $1 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt. Je 1 mL dieser Zellsuspension wurde in vorbereitete Gewebekulturröhrchen pipettiert und anschließend in mehrere Lagen Papiertücher gewickelt, um ein langsames Abkühlen der Proben zu ermöglichen. Die so eingepackten Röhrchen wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

### 3.3.5 Inkubationsversuche

Für alle Inkubationsversuche wurden ausdifferenzierte, vier Tage alte THP1-Makrophagen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit serumfreiem, komplettiertem RPMI-1640 gewaschen und mit folgenden Substanzen inkubiert:

**Tabelle 6:** Substanzen für die Inkubationsversuche

Kern-rezeptor	Substanz	Lösungsmittel	Inkubationszeit	Endkonzentration
RXR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	9- <i>cis</i> -Retinsäure (9cRS)	Ethanol absolut	2 - 72 h	0,1 - 200 $\mu\text{M}$
CAR $\beta$	Phenobarbital	Wasser	24 h	100 $\mu\text{M}$
CAR $\beta$	Picrotoxin	Ethanol absolut	24 h	100 $\mu\text{M}$



ER	17- $\beta$ -Estradiol (E2)	Ethanol absolut	24 h	1 $\mu$ M
FXR	Chenodeoxycholsäure (engl.: chenodeoxycholic acid) (CDCA)	Wasser	24 h	100 $\mu$ M
PPAR $\alpha$	Fenofibrat	Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	24 h	100 $\mu$ M
PPAR $\alpha$	Ciprofibrat	Methanol absolut	24 h	250 $\mu$ M
PPAR $\gamma$	15d-Prostaglandin J <sub>2</sub> (15d-Pg J <sub>2</sub> )	Ethanol absolut	24 h	10 $\mu$ M
PXR	Rifampicin	Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	24 h	10 $\mu$ M
RAR $\alpha, \beta, \gamma$	all- <i>trans</i> Retinsäure (atRS)	Ethanol absolut	2 - 72 h	0,1 - 200 $\mu$ M
TR (THR) $\alpha, \beta, \gamma$	Triiodthyronin (T3)	Salzsäure 1M + Ethanol 1:4	24 h	1 $\mu$ M
VDR	1,25-Dihydroxyvitamin D3 [1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ]	Ethanol absolut	24 h	1 $\mu$ M
	AcLDL	Plasma	48 h	80 $\mu$ g/mL

Die AcLDL-Inkubation diente zur Transformation der THP1-Makrophagen zu Schaumzellen. Als Kontrollen für alle Versuche wurden die Zellen in serumfreiem komplettiertem Medium für jeweils denselben Zeitraum ohne Zusatz inkubiert.

### 3.4 Arbeiten mit Lipoproteinen

#### 3.4.1 Isolierung von Lipoproteinen

Dialysepuffer:                      Dialysepuffer mit EDTA:

NaCl 0,9 % (w/v)                      NaCl 0,9 % (w/v)

pH 7,4                                      EDTA 5,4 mM

pH 7,4

Lipoproteine wurden aus frischen, gepoolten Blutplasmen freiwilliger Spender (Elektrolyteigendichte: 1,006 g/mL) durch isopyknische sequentielle Ultrazentrifugation nach der Methode von Havel (1955) isoliert. Zur Gewinnung der LDL- und HDL-Fraktionen wurde das Serum mit Kaliumbromid auf eine Dichte von 1,019 g/mL nach

der folgenden Formel:

$$\text{g KBr/ml} = \frac{\text{Volumen [ml]} \times (\text{Dichte}_{\text{neu}} - \text{Dichte}_{\text{alt}})}{1 - (0,312 \times \text{Dichte}_{\text{neu}})}$$

eingestellt und 20 bis 24 h bei 4°C mit 100.000 × g in einer Beckman L 8-70-Ultrazentrifuge mit einem 70 Ti-Titanrotor zentrifugiert (vgl. Tabelle 7).

Durch die Zentrifugation erhielt man eine dreiphasige Auftrennung. Im Überstand befanden sich Chylomikronen, VLDL und IDL (Dichte: < 1,019 g/mL), im Unterstand LDL, HDL und Albumin (Dichte: > 1,019 g/mL). Diese beiden Phasen waren durch eine klare Zone voneinander getrennt, so dass an dieser Stelle das Zentrifugenröhrchen geschnitten und der Überstand verworfen werden konnte. Der Unterstand wurde zur weiteren Isolierung der einzelnen Lipoproteine eingesetzt, indem die Dichte mit der entsprechenden Menge Kaliumbromid (vgl. Tabelle 7) eingestellt wurde und dann erneut zentrifugiert wurde.

**Tabelle 7:** Übersicht über die für Lipoproteinisolierung notwendigen Daten.

Lipoproteinfraktion	Dichtebereich [g/ml]	Faktor [g KBr/ml]	Zentrifugationsdauer [h]
Chylomikronen/VLDL	< 1,006	-	18
Serum	1,006	-	-
IDL	1,006-1,019	0,01906	24
LDL	1,019-1,063	0,06583	24
Gesamt-HDL	1,063-1,210	0,2362	48
HDL <sub>1</sub>	1,063-1,075	0,01806	36
HDL <sub>2</sub>	1,075-1,125	0,09553	36
HDL <sub>3</sub>	1,125-1,210	0,1366	48
Alle Lipoproteine	1,006-1,210	0,3277	48

Im Anschluss daran wurden die Lipoproteinpräparationen zur Entfernung des Kaliumbromids in Dialyseschläuche gefüllt und bei 4°C in 5 L Dialysepuffer mit EDTA 24 h lang dialysiert. Danach wurde noch zweimal über 24 h in Dialysepuffer ohne

EDTA dialysiert. Die Proben wurden sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

### 3.4.2 Herstellung von acetylierten LDL

Die Herstellung von acetylierten LDL (AcLDL) erfolgte nach einer modifizierten Methode von Basu *et al.* (1976). Zunächst wurden frisch isolierte LDL bei 4°C in einer Ultrafiltrationszelle mit einer XM-300 Membran unter Stickstoffdruck (1,5 - 2 bar) auf einen Proteingehalt von  $\geq 16$  mg/mL eingengt. Danach wurde die LDL-Lösung auf Eis gekühlt und im Verhältnis 1:1 mit gesättigter Natriumacetatlösung versetzt. Die freien Hydroxylreste der LDL wurden durch Zugabe von kleinen Aliquots Essigsäureanhydrid (insgesamt die 1,5-fache Menge bezogen auf den Proteingehalt der Lösung) unter Rühren und Kühlung innerhalb von 1 h acetyliert. Der pH-Wert durfte während der Veresterung nicht unter 7,4 fallen, so dass gegebenenfalls 2 N NaOH-Lösung zugegeben werden musste. Nach der letzten Zugabe von Acetanhydrid wurden die AcLDL weitere 30 min auf Eis gerührt.

Anschließend wurde die AcLDL-Lösung einmal bei 4°C über 24 h gegen Dialysepuffer mit EDTA und danach zweimal über 24 h in Dialysepuffer ohne EDTA dialysiert. Die erhaltene leicht opaleszierende, dunkelgelb bis orange gefärbte AcLDL-Lösung wurde mit einem 0,22  $\mu$ m-Filter sterilfiltriert und maximal vier Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### 3.4.3 Lipoproteinelektrophorese

Als Kontrolle für die erfolgreiche Acetylierung der LDL wurde eine Lipoproteinelektrophorese durchgeführt. Im Agarosegel wurden die Lipoproteine anhand ihres Molekulargewichts und ihrer Nettoladung getrennt. Durch eine Acetylierung wird die negative Ladung der LDL Partikel vergrößert, wodurch die Beweglichkeit der AcLDL im elektrischen Feld im Vergleich zu den LDL gesteigert ist. Jede LDL-Isolierung und jede daraus hergestellte AcLDL-Präparation wurde mit Hilfe einer Lipoproteinelektrophorese mit einem Helena Titan Gel-System analysiert (vgl. Abbildung 8). Dazu wurden die Proben auf einem kommerziellen Agarosegel (0,6% (w/v) Agarose, 5% (w/v) Saccharose, 0,01% (w/v) Natriumazid, 0,02% (w/v) Thiomersal) aufgetragen und in einem Barbitol-Natriumbarbitolpuffer (mit 0,1% (w/v) Natriumazid und 0,1% (w/v) Thiomersal, pH 8,4-8,8) gemäß ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität aufgetrennt. Nachdem das Gel bei 60°C getrocknet worden war, wurden die verschiedenen Lipoproteinbanden mit einer Lösung von 0,1% (w/v) Fettrot 7B in 95%igem (v/v) Methanol für 2 min angefärbt. Danach wurde das Gel

mehrmals je 15 - 30 s lang mit 75%igem Methanol gewaschen und erneut bei 60 bis 70°C getrocknet.

### **3.5 Proteinbestimmung**

Sämtliche Proteinbestimmungen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Smith *et al.*, 1985) durchgeführt. Bei der dem Kit zugrunde liegenden Biuretreaktion wird  $\text{Cu}^{2+}$  durch die Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Tryptophan und durch Peptidbindungen in alkalischer Lösung zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Das entstandene  $\text{Cu}^{1+}$  geht mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex ein, der bei 562 nm quantitativ erfasst werden kann und dessen Farbintensität von der Temperatur abhängig ist. Daher kann die Sensitivität des Assays über die Temperatur variiert werden (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Zur Herstellung einer Kalibrationskurve wurden aus einer BSA-Stammlösung BSA-Verdünnungen von 1 mg/mL bis 7 mg/mL (in 1 mg/mL Schritten) in jeweils 0,9%iger (w/v) NaCl-Lösung frisch angesetzt. In einem Dreifachansatz wurde je 1  $\mu\text{L}$  der zu quantifizierenden Proben in eine 96-well Platte pipettiert. Als Blindwert diente 1  $\mu\text{L}$  der 0,9%igen (w/v) NaCl-Lösung.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Reagenzlösung durch Mischen der beiden im Kit mitgelieferten Lösungen A und B im Verhältnis 50:1 hergestellt. Die verdünnten Proben und der Blindwert wurden mit je 200  $\mu\text{L}$  dieser Reagenzlösung versetzt. Anschließend wurde die Platte mit einem Deckel verschlossen und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Absorptionen der Proben fotometrisch bei 562 nm gegen den Blindwert vermessen.

### **3.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

#### **3.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA und DNase-Verdau**

Alle verwendeten Puffer sind Komponenten des RNeasy Mini Kits.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach einem leicht modifizierten Herstellerprotokoll (vgl. Tabelle 8). Das verwendete System nutzt die Eigenschaft von Silikamembranen, Nukleinsäuren mit mehr als 200 Bp unter geeigneten Pufferbedingungen (hohen Salzgehalten) selektiv zu binden und diese in Puffern mit niedrigen Salzgehalten wieder eluieren zu können.

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden Zellen bei Raumtemperatur zweimal mit

kaltem 1 x PBS gewaschen. Durch Zugabe des Lysepuffers (Puffer RLT plus 10  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Mercaptoethanol pro mL Puffer) wurden die Zellen lysiert.

**Tabelle 8:** modifizierte Mengen des Lysepuffers bei der Isolierung der Gesamt-RNA

Flaschengröße	25 cm <sup>2</sup>	75 cm <sup>2</sup>	150 cm <sup>2</sup>
Menge des Lysepuffers	0,7 mL	2 mL	4 mL

Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde das visköse Lysat aufgenommen und direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Eingefrorene Proben wurden nach dem Auftauen 10 min bei 37°C inkubiert, um ein vollständiges Lösen aller Pufferbestandteile zu gewährleisten. Die Proben wurden homogenisiert und die genomische DNA geschert, indem das Lysat 15- bis 20-mal durch eine 20 G Nadel aufgezogen wurde. Anschließend wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 70%igen (v/v) Ethanol gut gemischt. Die Zugabe von Ethanol erhöht die Neigung der RNA-Moleküle an die Silikamembran der Isolierungssäulen zu binden.

700  $\mu\text{L}$ -Aliquots der Probenlösung wurden sukzessive auf die Isolierungssäulen des Kits gegeben und 15 s mit 10 000  $\times$  g bei RT zentrifugiert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis das entsprechende Probenvolumen durch die Säule zentrifugiert worden ist. Jede Säule wurde maximal mit 2 mL Probenvolumen versetzt (entspricht etwa 100  $\mu\text{g}$  RNA pro Säule). Der Durchfluss wurde verworfen.

Zum Entfernen von Verunreinigungen wurden die Säulen mit 350  $\mu\text{L}$  Puffer RW1 gewaschen (Zentrifugation wie oben). Zur DNase-Behandlung wurden pro Probe 10  $\mu\text{L}$  DNase Stock Solution mit 70  $\mu\text{L}$  Puffer RDD vorsichtig gemischt, auf die Säule gegeben und bei RT 15 min inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 350  $\mu\text{L}$  Puffer RW1 und Zentrifugation (wie oben) wurde der Durchfluss verworfen und ein neues Sammelgefäß unter die Säule gestellt. Mit 500  $\mu\text{L}$  Puffer RPE (mit dem vierfachen Volumen Ethanol laut Hersteller verdünnt) wurden die Säulen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und ein zweites Mal mit 500  $\mu\text{L}$  Puffer RPE gewaschen. Zum Entfernen aller Ethanolreste erfolgte abschließend eine Zentrifugation der Säulen für 2 min mit 10 000  $\times$  g bei RT.

Die Säulen wurden abschließend in ein RNase-freies 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und die Elution der RNA erfolgte mit dreimal 30  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser (1 min Inkubation bei RT und anschließende Zentrifugation bei RT mit 10 000  $\times$  g für 1 min).

### 3.6.2 Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäureproben wurde fotometrisch in wässriger Lösung mit einem Biofotometer bestimmt. Als Berechnungsgrundlage diente nachfolgende Formel:

$$\text{RNA - Konzentration } [\mu\text{g/mL}] = \frac{A_{260 \text{ nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{XNA - Faktor}}{1\ 000}$$

mit dem XNA-Faktor für:

ssDNA	37,0
dsDNA	50,0
RNA	40,0

Die Reinheit der Nukleinsäuren ergab sich aus dem Quotienten  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  und lag bei allen verwendeten Proben zwischen 1,8 und 2,0.

### 3.6.3 Agarosegelelektrophorese

#### 50 x TAE-Puffer:

Tris/HCl	2 M
EDTA	50 mM
Eisessig	5,71% (v/v)
DEPC	0,05% (v/v)

Aqua bidest.<sub>DEPC</sub>

#### 5 x Nukleinsäure-Dye:

Glyzerin	50% (v/v)
SDS	0,2% (w/v)
Bromphenolblau	0,05% (w/v)
Xylencyanol FF	0,05% (w/v)

Die Qualität der Nukleinsäureproben wurde mittels TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft (Ogden *et al.*, 1987; Voytas, 1988). Da es eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der elektrophoretischen Mobilität der DNA und der Gelkonzentration gibt, werden kleinere DNA-Fragmente in einem höher konzentrierten Gel besser aufgetrennt als große Nukleinsäuremoleküle (vgl. Tabelle 9). Gesamt-RNA wurde in einem 0,8%igen (w/v) Agarosegel überprüft.

**Tabelle 9:** Konzentrationsangaben für Agarosegele für bestimmte Trennbereiche (Maniatis *et al.*, 1989).

Größe der zu separierenden Nukleinsäuren	Menge der verwendeten Agarose
5 – 60 Bp	0,3% (w/v)
1 – 20 Bp	0,6% (w/v)
0,8 – 10 Bp	0,7% (w/v)
0,5 – 7 Bp	0,9% (w/v)
0,4 – 6 Bp	1,2% (w/v)
0,2 – 3 Bp	1,5% (w/v)
0,1 – 2 Bp	2,0% (w/v)

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer in einem Mikrowellengerät geschmolzen und mit 2 µL einer 1%igen (w/v) Ethidiumbromidlösung vermischt (Lunn & Sansone, 1987). Zum Aushärten wurde die heiße Agaroselösung in einen Gelschlitten mit geeignetem Probenkamm gegossen.

Zum Auftragen auf das Agarosegel wurden Proben mit einem Nukleinsäuregehalt von ca. 1 µg verwendet. Die Proben wurden mit Aqua bidest.<sub>DEPC</sub> verdünnt und dann mit einem Fünftel des Volumens 5 x Nukleinsäure-Dye versetzt. Vor dem Auftragen wurden sie 5 min bei 68°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. Die Gelelektrophorese wurde in 1 x TAE-Puffer (versetzt mit 180 µL 1%iger (w/v) Ethidiumbromidlösung pro 5 L) mit ca. 10 V/cm in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei RT durchgeführt. Die Qualität der Nukleinsäuren wurde nach der Elektrophorese im UV-Licht bei 312 nm kontrolliert.

### 3.6.4 cDNA-Synthesen für Standardanwendungen

In einem 200 µL-PCR-Reaktionsgefäß wurden 1 µL Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer und 1 bis 5 µg mit DNase behandelte Gesamt-RNA vorgelegt.

Diese Proben wurden mit *Aqua ad injectabilia* auf 11 µL aufgefüllt, 10 min bei 70°C in einem PCR-Gerät denaturiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nach der

Zugabe von vorgekühlten 4  $\mu\text{L}$  5 x First Strand-Puffer, 2  $\mu\text{L}$  0,1 M DTT, 1  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP-Mix und 1  $\mu\text{L}$  RNasin<sup>®</sup> Ribonukleaseinhibitor (40 U/ $\mu\text{L}$ ) wurden die Proben vorsichtig durchmischt und 2 min bei 42°C im PCR-Gerät inkubiert. In die derart vorgewärmten Proben wurde jeweils 1  $\mu\text{L}$  SuperScript<sup>™</sup> II (200 U/ $\mu\text{L}$ ) pipettiert. Die Reverse Transkription wurde nach dem vorsichtigen Durchmischen bei 42°C für 50 min in einem PCR-Gerät durchgeführt. Nach der Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 70°C für 15 min wurden die cDNA-Proben nach Bedarf verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 3.6.5 Echtzeit-RT-PCR

Die Echtzeit-RT-PCR stellt eine Möglichkeit dar, PCR-Produkte während ihrer Bildung in den Reaktionsgefäßen quantitativ zu erfassen. Die Echtzeit-Quantifizierung von PCR-Produkten kann zum einen als 5'-Nukleaseassay erfolgen (Heid *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1991; Livak *et al.*, 1995). Hierbei wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase zur Generierung eines messbaren Signals während der PCR ausgenutzt. Andererseits kann die Echtzeit-RT-PCR auch mit Farbstoffen durchgeführt werden, die an DNA-Doppelstränge binden (Higuchi *et al.*, 1992 und 1993; Lorenz, 1998). Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität für Doppelstrang-DNA (dsDNA) ist der Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green I für diese Anwendung besser geeignet als beispielsweise Ethidiumbromid. Der Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green I bindet nicht kovalent und ohne Sequenzspezifität an die kleine Furche einer Doppelstrang-DNA. Diese Bindung führt zu einer erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zum Fluoreszenzsignal des ungebundenen SYBR<sup>®</sup>Green I. Da die Kinetik der PCR durch Bindung von SYBR<sup>®</sup>Green I an die DNA nicht beeinflusst wird, kann das Fluoreszenzsignal des gebundenen SYBR<sup>®</sup>Green I zur Quantifizierung der in der PCR gebildeten DNA verwendet werden.

Die Synthese der cDNA, die für die Echtzeit-RT-PCR verwendet wurde, erfolgte wie unter Kapitel 3.6.4 beschrieben mit 5  $\mu\text{g}$  DNase-behandelter Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial und 200 ng Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern. Die Messungen wurden jeweils mit drei unabhängig voneinander hergestellten Proben durchgeführt. Die cDNA wurde für die Verwendung in der PCR mit *Aqua ad injectabilia* 1:10 verdünnt und die PCR nach dem Handbuch des SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR-Kits mittels des ABI PRISM<sup>®</sup> 7900 Sequence Detection Systems durchgeführt. Jede Probe wurde im Duplikat für Adipophilin und für die internen Standards (GAPDH und SRP14) angesetzt und gemessen. Zusätzlich wurden während jeder PCR Negativkontrollen ohne cDNA



mitgemessen.

Die Reaktionen wurden in MicroAmp<sup>®</sup> Optical 384-Well Reaction Plates angesetzt, die mit Folie verschlossen wurden.

SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR-Mix:

QuantiTect SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen)	10 µL
Primer-Mix (Forward- und Reverseprimer je 5 µM)	0,8 µL
Template (5 µg)	je nach Konzentration
Aqua ad injectabilia	ad 20 µL

SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR-Profil:

1. Vorabdenaturierung	95°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	15 s
3. Annealing/Extension	72°C	60 s

Die Schritte zwei und drei wurden 49mal wiederholt.

Nach der Amplifikation wurden die Proben langsam von 60°C auf 95°C erhitzt, um die PCR-Produkte zu schmelzen und die Homogenität des amplifizierten Produkts zu überprüfen.

Das Design der Primer erfolgte vorab mit der PrimerExpress<sup>®</sup>-Software Version 1.0 (Applied Biosystems). Als Primer für die SYBR<sup>®</sup> Green RT-PCR wurden verwendet:

Adipophilin: Forward-Primer: 5'-ACC CCC ATG TGC TTG GCT T-3'  
Reverse-Primer: 5'-TGC TGA GCA CAT TGA GTC ACG-3'

SRP14: Forward-Primer: 5'-AGC ACT GTG GTG AGC TCC AAG-3'  
Reverse-Primer: 5'-TCA GCC CAT CCA TGT TAG CTC TA-3'

GAPDH: Forward-Primer: 5'-CAA CAG CGA CAC CCA CTC CT-3'  
Reverse-Primer: 5'-CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA-3'

Nach der PCR wurden die Proben zusätzlich in einem 2%igen (w/v) Agarosegel (vgl. Kapitel 3.6.3) auf Nebenprodukte kontrolliert.

Die Analyse der SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCRs erfolgt mit der Sequence Detection System Software V2.1 der Firma Applied Biosystems. Für die Berechnung der Expressionsunterschiede (FC = *fold change*) sind der normierte Reportertermesswert  $R_n$

und der  $\Delta R_n$ -Wert von Bedeutung. Der normalisierte Reportermesswert  $R_n$  wird aus dem Quotienten des Reportersignals  $R$  (Fluoreszenzsignal des mit den in den PCRs gebildeten doppelsträngigen DNA-Molekülen wechselwirkenden SYBR<sup>®</sup>Green-Farbstoffs) und dem Signal der passiven Referenz (Fluoreszenzfarbstoff ROX im PCR-Puffer, dessen Fluoreszenzsignalintensität durch die PCR nicht beeinflusst wird) im PCR-Puffer gebildet (Schild, 1999; Applied Biosystems, 1999). Die Differenz zwischen dem normalisierten Reportersignal  $R_n$  und dem Reportersignal vor der PCR ergibt den so genannten  $\Delta R_n$ -Wert.

Zur Analyse einer Echtzeit-RT-PCR werden dann die ermittelten  $\Delta R_n$ -Werte gegen die Zahl der PCR-Zyklen aufgetragen. Diese Auftragung ergibt den typischen sigmoiden Verlauf einer PCR mit einer langsam verlaufenden Startphase, einem exponentiellen Anstieg, der in einen linearen Verlauf übergeht, allmählich abflacht und sich allmählich einem Sättigungswert annähert. Aus den ermittelten  $\Delta R_n$ (PCR-Zyklus)-Diagrammen ermittelt die Auswertungs-Software eine Grundlinie aus den Signalen der PCR-Zyklen 3 bis 15 und berechnet den Mittelwert dieser Signale. Durch die Multiplikation des Mittelwertes mit seiner zehnfachen Standardabweichung wird der so genannte  $C_T$ -Wert (engl.: *threshold cycle*) berechnet. Der  $C_T$ -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Fluoreszenz des Reporters (hier SYBR<sup>®</sup>Green) über den Threshold hinaus erfasst wird. Der Schnittpunkt der Horizontalen mit der Messkurve ergibt dann die Zykluszahl, die zur relativen Quantifizierung aller Proben verwendet wird. Der  $C_T$ -Wert wird normiert. Dies ergibt den  $\Delta C_T$ -Wert. Die Differenz der so ermittelten  $\Delta C_T$ -Werte zweier Proben ergibt den relativen Unterschied  $\Delta \Delta C_T$  zwischen den zu bestimmenden RNA-Mengen. Danach werden die Proben auf die Expression der internen Standards, hier GAPDH bzw. SRP14, normalisiert. In den nachfolgenden Expressionsanalysen werden auf diese Weise die relativen mRNA-Expressionsunterschiede zwischen den vermessenen Proben ermittelt.

### **3.7 Zytochemische Markierung mittels indirekter**

#### ***Immunfluoreszenz***

##### 4% Paraformaldehyd in 1 x PBS:

Paraformaldehyd      4% (w/v)

1 x PBS

Lösen bei 70°C, pH auf 7,4 einstellen

Für immunzytochemische Untersuchungen wurden 200 000 bis 500 000 Zellen pro

Kammer eines chamber-slides mit vier Kammern ausplattiert und wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben kultiviert. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden 500 µL einer 4%igen (w/v) Paraformaldehyd in 1 x PBS-Lösung zum Fixieren auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C wurden die Zellen sechsmal mit Waschpuffer (1 x PBS + 0,05% Tween®-20) gewaschen. Dann wurden die Zellen 1 h bei RT mit 1% BSA in Waschpuffer geblockt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Anti-Adipophilin) 1:5 verdünnt in 1% BSA in Waschpuffer für 1 h bei RT.

Zur Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurden die Zellen sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h mit Cy3 gelabeltem Anti-Maus Sekundärantikörper 1:50 verdünnt in 1% BSA in Waschpuffer im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden erneut sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Die Kammern wurden von den chamber slides abgezogen und die Objektträger in eine dunkle Küvette gestellt und mit Hoechst Dye in Waschpuffer verdünnt für 10 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Waschpuffer gewaschen. Deckgläschen wurden mit Fluorescent Mounting Medium auf den Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden bei Bedarf im Dunkeln bei 4°C gelagert. Analyse und Dokumentation der Proben erfolgte mit einem Axioskop, das mit einer CCD-Kamera und der Auswertesoftware KS-300 Version 3.0 (Carl Zeiss Jena GmbH) ausgestattet war.

### **3.8 Elektronenmikroskopie**

#### **3.8.1 Elektronenmikroskopie**

##### Na-Cacodylatpuffer:

Na-Cacodylat	21,4 g
Aqua bidest.	ad250 mL
pH 7,4 mit HCl einstellen	
Aqua bidest.	ad500 mL

##### Fixierlösung:

Glutaraldehyd	2,5 %
Na-Cacodylat-Puffer (pH 7,4)	0,1 M
Tannin	2 %

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen in 24-well Platten ausgesät und ausdifferenziert wie in Kapitel 3.3.4.3 beschrieben. Im Anschluss wurden die Zellen zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min in die Fixierlösung getaucht, um die Morphologie von Kollagenfibrillen, Zellorganellen und Matrixvesikeln sichtbar zu machen. Nach erneutem drei- bis viermaligem Waschen wurden die Zellen

mit 0,5%iger OsO<sub>4</sub>-Lösung für 20 min nachfixiert. Auf fünfmaliges Spülen mit *Aqua dest.* folgte zur Entwässerung eine aufsteigende Reihe mit 30, 50, 70, 90 und 100%igem Ethanol für je 5 min, der letzte Schritt wurde einmal wiederholt. Um die Zellen völlig zu entwässern folgte eine ganz kurze Einwirkung von Propylenoxid. Die Einbettung gliederte sich in vier Schritte. Im ersten Schritt müssen die Zellen 30 min in einem Teil Epon (P12) mit drei Teilen Propylenoxid einwirken. Im zweiten Schritt folgt eine Einwirkung von 1:1 Epon/Propylenoxid für 1,5 h. Anschließend folgt ein Gemisch von 3:1 Epon/Propylenoxid für 1,5 h und im letzten Schritt reines Epon für 30 min. Das Aushärten fand im Backofen bei 67°C über Nacht statt.

Die eingebetteten Zellen wurden aus den 24-well Platten genommen und in 3 mm<sup>2</sup> große Stücke zurechtgeschnitten. Diese wurden in Gummiplatten erneut fixiert und eingebettet wie oben.

### 3.8.2 SDS-Gefrierbruch-Immunzytochemie

THP1-Zellen wurden wie in Kapitel 3.3.4.3 beschrieben ausdifferenziert und anschließend mit Hilfe von Zellschabern abgekratzt. Dann wurden die Zellen abweichend von der Originalmethode (Fujimoto, 1995) für 2 bis 3 min in 30%igem Glycerin zentrifugiert, bevor sie auf die Gold-Objektträger montiert wurden. Hierbei werden die Zellen im Gegensatz zur herkömmlichen Gefrierbruchtechnik nicht fixiert.

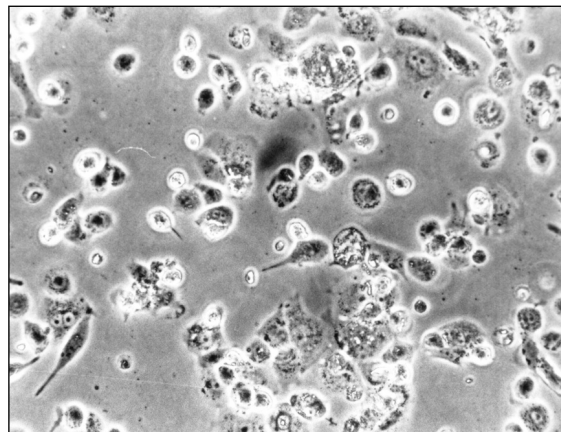
Nach der Montage wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in der Gefrierätzanlage BA 300 gebrochen. Die freigelegten Membranoberflächen wurden mit Platin in einem Winkel von 38° und mit Kohlenstoff in einem Winkel von 45° bedampft. Die Schichtdicken wurden mit einem Schwingquarz gemessen. Sie betragen für Platin 2 nm und für Kohle 20 nm. Nach dem Auftauen der Zellen wurde das Replika für 24 bis 48 h mit Hilfe von SDS von den Zellresten befreit und gereinigt.

Die Immunzytochemie erfolgte in den nächsten Schritten. Die Proben wurden dreimal 10 min in *Aqua dest.* gespült und im Anschluss mit dem Primärantikörper (anti-Adipophilin) in 1% BSA in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Darauf erfolgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang in *Aqua dest.* um die Inkubation mit dem goldmarkierten sekundären Antikörper (Anti-Maus aus Ziege-IgG) in 1% BSA in PBS für 1 h bei RT durchzuführen. Darauf folgte ein erneuter Waschvorgang wie zuvor. Dann erfolgte eine Aufnahme der markierten Replikas auf unbefilmte Kupfernetze und die Elektronenmikroskopie.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellkultur

Die THP1-Zellen wurden gemäß Kapitel 3.3 kultiviert und ausdifferenziert. Die Qualität der Zellen wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops beurteilt. Hierbei ist es nicht möglich, behandelte THP1-Zellen, z.B. mit AcLDL oder RAR-Ligand, von nativen Zellen zu unterscheiden.

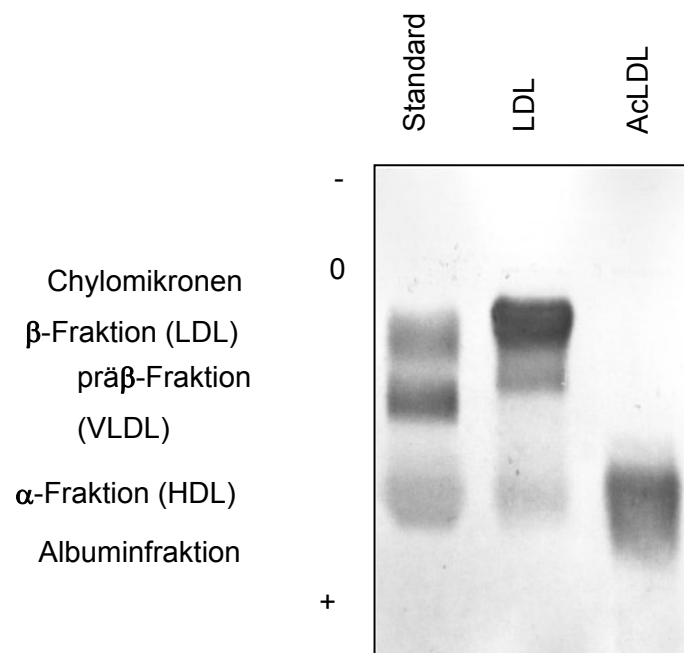


**Abbildung 7:** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von THP1-Zellen nach vier Tagen Differenzierung.

### 4.2 Isolierung der Lipoproteine und Herstellung von AcLDL

Die Qualität der gemäß Kapitel 3.4 isolierten Lipoproteine wurde in einer Agarosegelelektrophorese überprüft. In dieser Gelelektrophorese werden Lipoproteine nach ihrer Nettoladung und ihrem Molekulargewicht getrennt. Da die Lipoproteine unterschiedliche Anteile an Proteinen enthalten, tragen sie aufgrund ihrer spezifischen Aminosäuren Zusammensetzung unterschiedlich große Ladungen. HDL enthalten beispielsweise den größten Proteinanteil und weisen somit die größte negative Ladung auf. HDL-Partikel wandern daher weiter zur positiv geladenen Anode als andere Lipoproteine.

In den verwendeten Gelen trennen sich die Lipoproteine in folgender Reihenfolge auf: Chylomikronen bleiben an der Auftragsstelle liegen. Als nächstes folgen die Partikel der  $\beta$ -Fraktion (LDL) und der prä $\beta$ -Fraktion (VLDL). Anschließend kommen die Partikel der  $\alpha$ -Fraktion (HDL) gefolgt von Albumin. Durch die Acetylierung erhalten die LDL-Partikel eine höhere Elektronendichte, die die Mobilität im Gel erhöht. In Abbildung 8 ist das Elektropherogramm einer typischen LDL- bzw. AcLDL-Elektrophorese abgebildet. Als Standard ist Normalserum aufgetragen, dessen drei prominente Banden durch die Bestandteile LDL, VLDL und HDL gebildet werden. Deutlich ist der Mobilitätsunterschied zwischen aus Serum isoliertem LDL und daraus hergestelltem AcLDL zu erkennen.

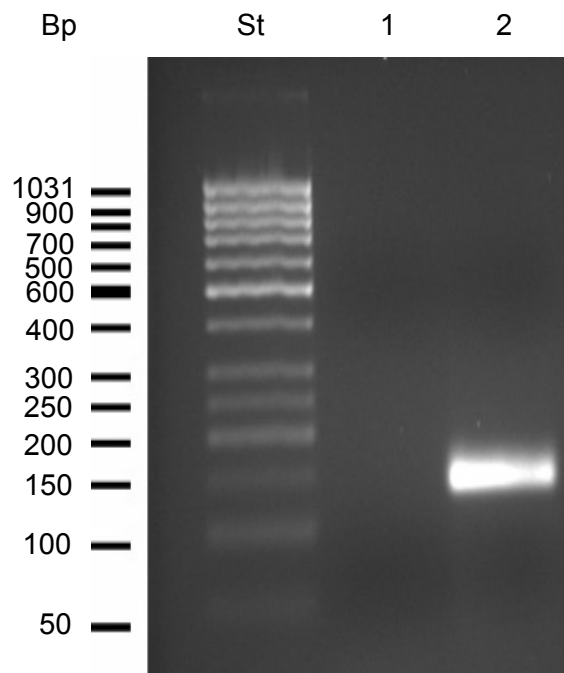


**Abbildung 8:** Darstellung einer repräsentativen Lipoproteinelektrophorese. Das LDL ist weitestgehend frei von anderen Lipoproteinen. Durch die Acetylierung erhöht sich die Elektronendichte der LDL-Partikel und es erfolgt ein Mobilitätsshift des AcLDL in den  $\alpha$ -Bereich hinein. Als Kontrolle wurde Normalserum verwendet (Standard).

### 4.3 Regulation der Adipophilin-Expression auf RNA-Ebene

Die Änderungen der mRNA-Expression von Adipophilin in THP1-Zellen unter dem Einfluss von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wurden mittels Echtzeit-RT-PCR untersucht.

Bei jeder Messung wurden die Adipophilin-Proben im Vergleich zu GAPDH und SRP14 gemessen, die konstant exprimiert werden und keine Regulation durch die Inkubation mit Substanzen aufweisen. Daher können diese mRNAs als Haushaltsgene zur Normalisierung herangezogen werden. Es wurden zwei Haushaltsgene als Kontrollen ausgewählt, um eventuelle Schwankungen in der mRNA-Expression eines der beiden Gene aufdecken zu können. Nach Versuchen mit den Rezeptoren RXR, LXR, CAR, ER, FXR, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PXR, RAR, TR (THR) und VDR (vgl. Tabelle 6) werden deutlich, dass außer RXR hauptsächlich RAR zu einer Regulation der Expression führt (Daten nicht gezeigt). RXR bildet mit PPAR $\gamma$  ein Heterodimer. Daher ist diese Regulation nicht unerwartet, da die Expression meist durch beide Liganden eines Heterodimers aktiviert wird.



**Abbildung 9:** Analyse der PCR-Produkte einer SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR in einem 2%igen Agarosegel. Spur St: 50 Basenpaar-Marker als Standard. Spur 1: Adipophilin-Negativkontrolle. Spur 2: Adipophilin-RT-PCR mit 138 Basenpaar großem Fragment. Es sind keinerlei Nebenprodukte zu erkennen, die die Ergebnisse der SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR verfälschen würden.

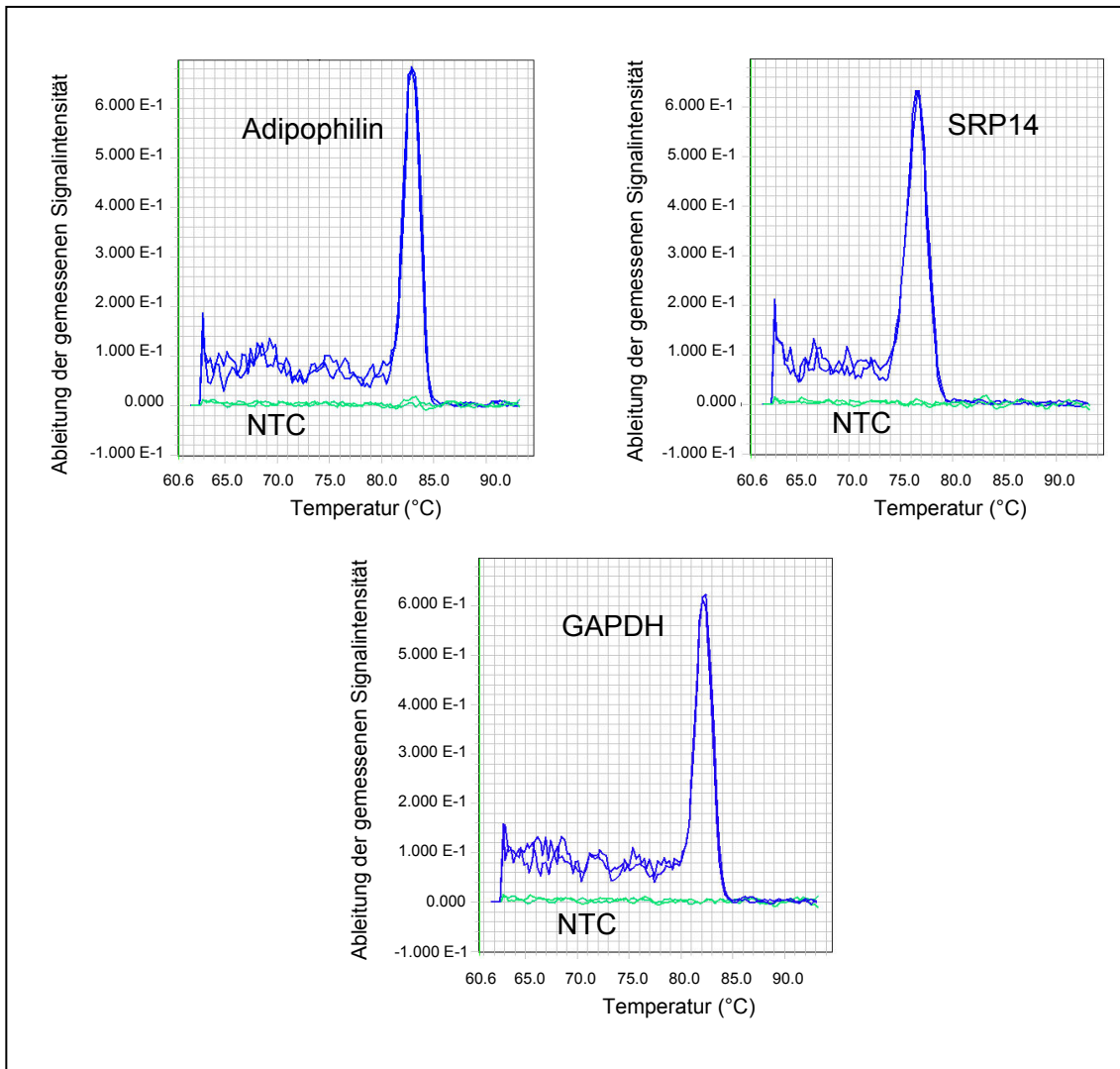
In Abbildung 9 ist ein typisches Agarosegel einer SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR für Adipophilin gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die PCR hochspezifisch ist. Diese Spezifität ist wichtig, da im SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR-Assay nur bedingt zwischen zwei verschiedenen PCR-Produkten in einem Reaktionsgefäß differenziert werden kann, da der Farbstoff SYBR<sup>®</sup>Green ohne Sequenzspezifität an doppelsträngige DNA bindet. Ferner wurden entsprechende Negativkontrollen (PCR-Proben ohne cDNA) in jedem Versuchsansatz gemessen. Die Negativkontrollen werden NTC (englisch: no template control) genannt. Es traten ferner keine Kreuzkontaminationen oder Primerdimere auf (vgl. Abbildung 9). Die PCR-Produkte wurden zusätzlich sequenziert, um ihre Identität zu verifizieren. Das Ergebnis ergab eine 99%ige Übereinstimmung mit den entsprechenden Sequenziereinträgen der Genbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD).

In Abbildung 10 sind Schmelzkurven typischer Proben von Adipophilin, SRP14 und GAPDH mit ihren jeweiligen Negativkontrollen abgebildet. Sie zeigen ebenfalls, dass bei den Negativkontrollen keine Nebenprodukte oder Primerdimere entstanden sind. Die Proben weisen jeweils nur ein Signal für das PCR-Produkt auf. Die Beurteilung der Schmelzkurven dient neben dem Anfertigen des Agarosegels zur Kontrolle der Spezifität der Reaktion. Primerdimere würden in den Negativkontrollen als kleine Signale auftreten. Bei Verunreinigungen würden Signale mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen auftreten.

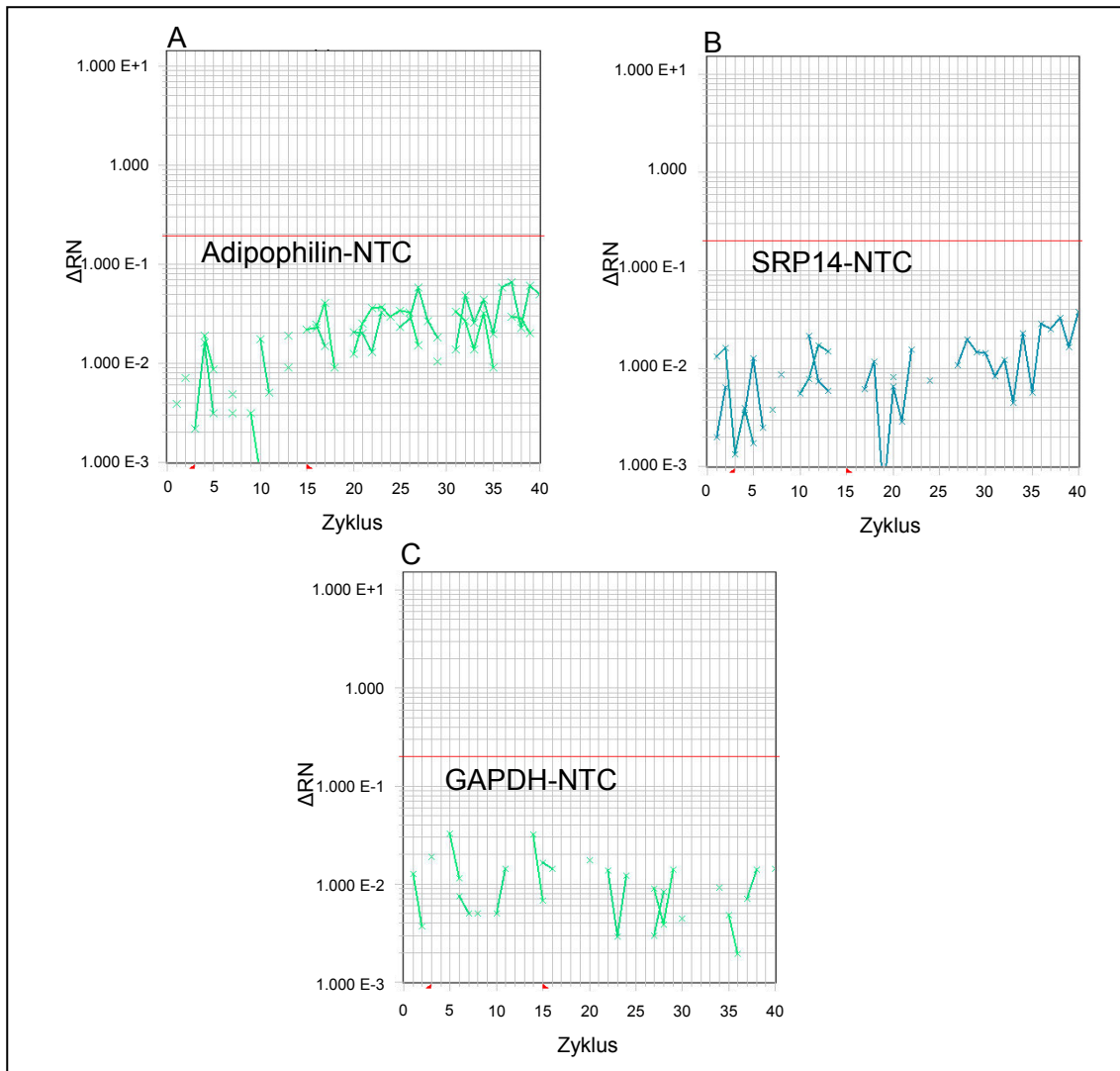
In Abbildung 11 sind SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR Messungen von Proben ohne cDNA gezeigt, die als Negativkontrollen zur Identifizierung der Stärke der Amplifikation von Primerdimeren dienen. Der Versuch wurde gemäß Kapitel 3.6.5 durchgeführt.

In Abbildung 12 sind typische  $\Delta R_n$ /PCR-Zyklus-Diagramme von cDNA-Proben, die die nachzuweisenden mRNAs von Adipophilin, SRP14 und GAPDH enthalten, abgebildet. Die Messungen dienen zur Ermittlung von Expressionsunterschieden der RNA von Adipophilin in Kontrollzellen (unbeladen) und Zellen, die mit Liganden für Transkriptionsfaktoren inkubiert wurden. Nähere Erläuterungen befinden sich in der Abbildungslegende.

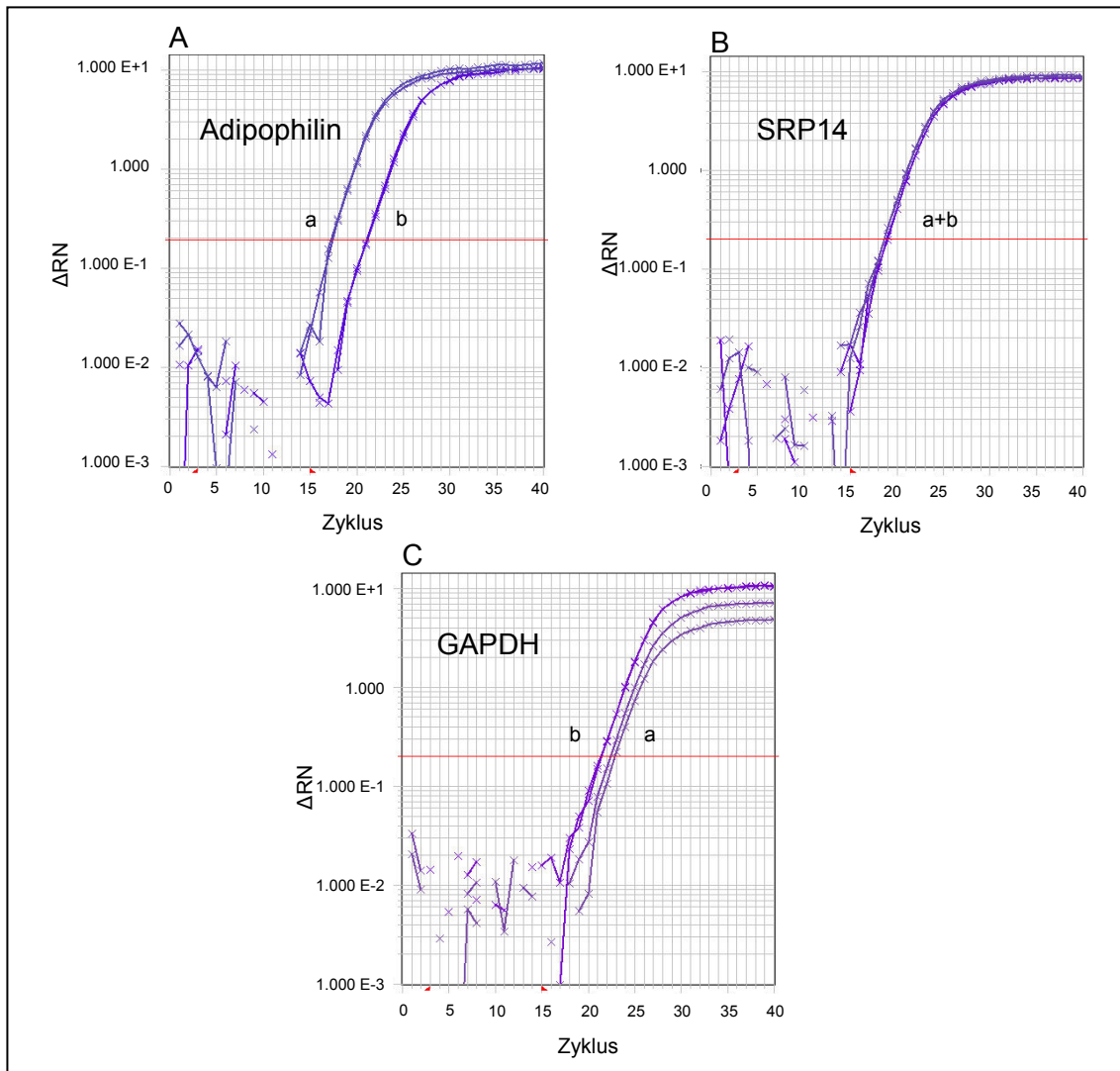




**Abbildung 10:** Schmelzkurven der PCR-Produkte für Adipophilin, SRP14 und GAPDH. Die Negativkontrolle ist jeweils mit angegeben (NTC). In allen drei Abbildungen sind nur in den Proben Signale zu erkennen, nicht bei den Negativkontrollen.



**Abbildung 11:** Darstellung typischer  $\Delta R_n$ /PCR-Zyklus-Diagramme einer SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR der Negativkontrollen für **A:** Adipophilin, **B:** SRP14 und **C:** GAPDH. **A:** Die Primer für die Amplifikation der Adipophilin-cDNA bilden keine Primerdimere oder andere PCR-Produkte, so dass auch in niedrigen Bereichen problemlos analysiert werden konnte. **B:** Die Primer für die Amplifikation der SRP14-cDNA bilden ebenfalls keine Primerdimere oder andere PCR-Produkte. **C:** Die Primer für die Messung von GAPDH-cDNA konnten ebenfalls problemlos verwendet werden, da keine Primerdimere oder andere Verunreinigungen auftraten.



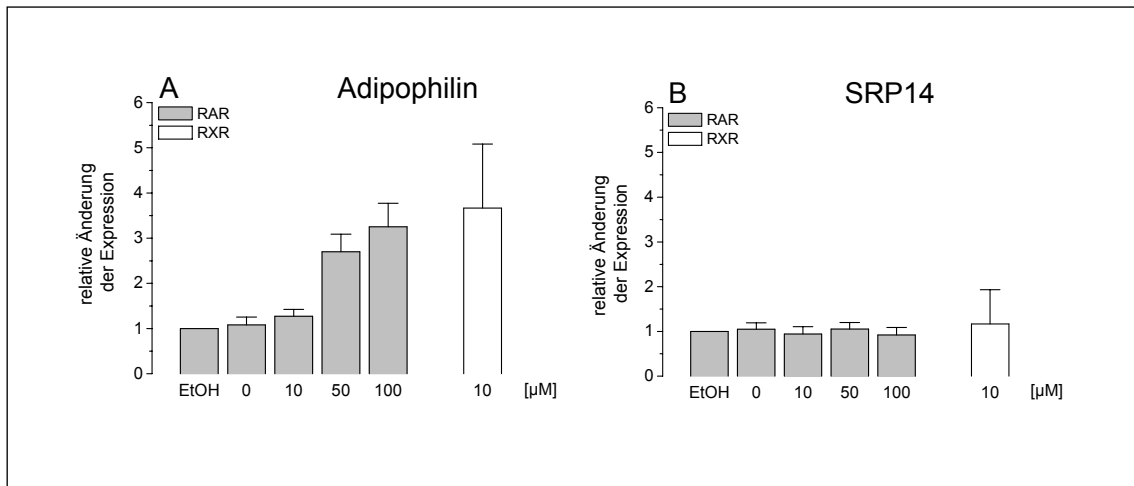
**Abbildung 12:** Darstellung typischer  $\Delta Rn$ /PCR-Zyklus-Diagramme eines SYBR<sup>®</sup>Green-RT-PCR-Assays von einer typischen Messung von **A:** Adipophilin, **B:** SRP14 und **C:** GAPDH. **A:** Amplifikation der Adipophilin-cDNA aus THP1-Zellen, die a) unbeladen oder b) 6h mit 50  $\mu M$  RAR-Ligand kultiviert wurden. Man erkennt eine Verschiebung im CT-Wert von vier Zyklen. **B:** In denselben Proben wurde die Menge an SRP14-RNA relativ zueinander ermittelt und diente zur Normalisierung der anderen Messungen. Deutlich ist zu sehen, dass in den Proben keine nennenswerten Unterschiede auftreten, d.h. dass die gleichen Mengen an SRP14-cDNA eingesetzt worden sind. **C:** In denselben Proben wurde ebenfalls die Menge an GAPDH-cDNA relativ zueinander gemessen.

### **4.3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Adipophilin-Expression unter dem Einfluss von RAR- und PPAR $\gamma$ -Liganden (Normalisierung mit SRP14)**

Um die Konzentrationsabhängigkeit der mRNA-Expression von Adipophilin in THP1-Zellen genauer zu untersuchen, wurden Inkubationsversuche mit verschiedenen Konzentrationen der Liganden der Transkriptionsfaktoren RXR und RAR durchgeführt. Im Vergleich dazu wurde der Einfluss von PPAR $\gamma$ -Liganden auf die mRNA-Expression von Adipophilin untersucht. Die differentielle Expression von Adipophilin unter dem Einfluss von PPAR $\gamma$ -Liganden ist in der Literatur beschrieben und diente als Vergleichsmessung.

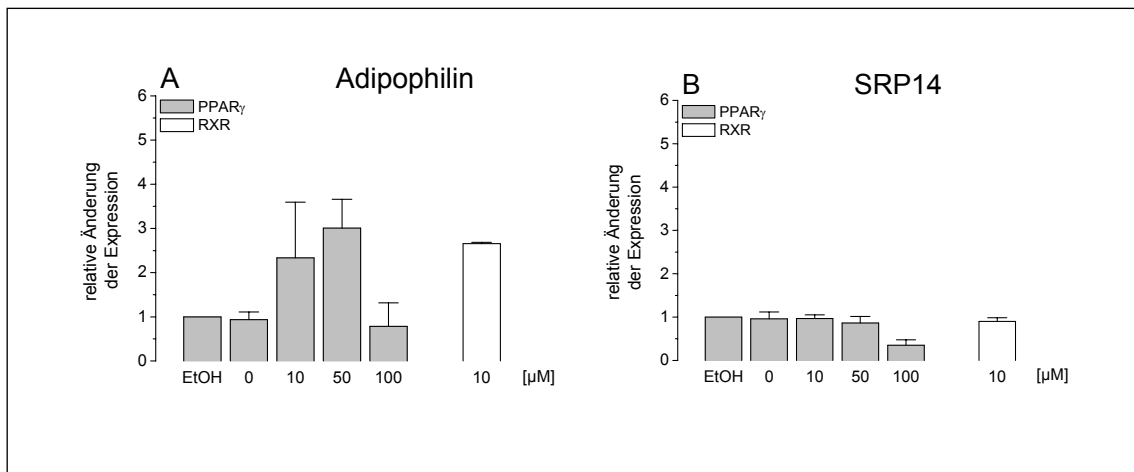
In Abbildung 13 ist die Abhängigkeit der Adipophilin-mRNA-Expression in THP1-Zellen von der Konzentration der RAR- und RXR-Liganden dargestellt. Als Kontrolle ist die mRNA-Expression des Haushalts-Gens SRP14 gezeigt, das unter diesen Bedingungen eine stabile Expression aufwies. Die Zellen wurden nach vier Tagen für 24 h mit den jeweiligen Liganden in Abwesenheit von Serum inkubiert. Aus dem Zell-Lysat wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Adipophilin-Expression wurde mittels Echtzeit-RT-PCR gemessen. Die relativen Expressionsunterschiede sind hier grafisch dargestellt.

In allen Versuchen wurde die Expressionsänderung nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von RAR-Liganden im Vergleich zu RXR-Liganden (immer 10  $\mu$ M) gemessen. Die Konzentration des RAR-Liganden betrug 0, 10, 50 und 100  $\mu$ M. Als Kontrolle wurden Zellen für 24 h mit 96%igem Ethanol inkubiert, um zu zeigen, dass das Lösungsmittel der Liganden keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Adipophilin hat. In Abbildung 13A ist zu erkennen, dass die Adipophilin-mRNA-Expression in den mit Lösungsmittel inkubierten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nicht verändert ist. Die Expression stieg jedoch mit Erhöhung der RAR-Liganden Konzentration an ( $2,7 \pm 0,4$  bei 10  $\mu$ M;  $3,3 \pm 0,5$  bei 100  $\mu$ M). Wie erwartet stieg auch die Adipophilin-mRNA-Expression bei Inkubation der Zellen mit RXR-Liganden ( $3,7 \pm 1,4$ ). Die mRNA-Expression nach Inkubation mit RAR-Ligand überstieg die mRNA-Expression nach Inkubation mit RXR-Ligand nicht. Abbildung 13B zeigt die SRP14-mRNA-Expression unter den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 13A. Hier sieht man, dass auch nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Liganden die mRNA-Expression unverändert blieb.



**Abbildung 13:** Relative Expressionsunterschiede zwischen mit RAR- oder RXR-Liganden inkubierten THP1-Zellen und Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-Expression unter RAR stieg konzentrationsabhängig an. **B:** Die SRP14-Expression blieb auch bei Beladung konstant. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienten als Bezugsgröße.

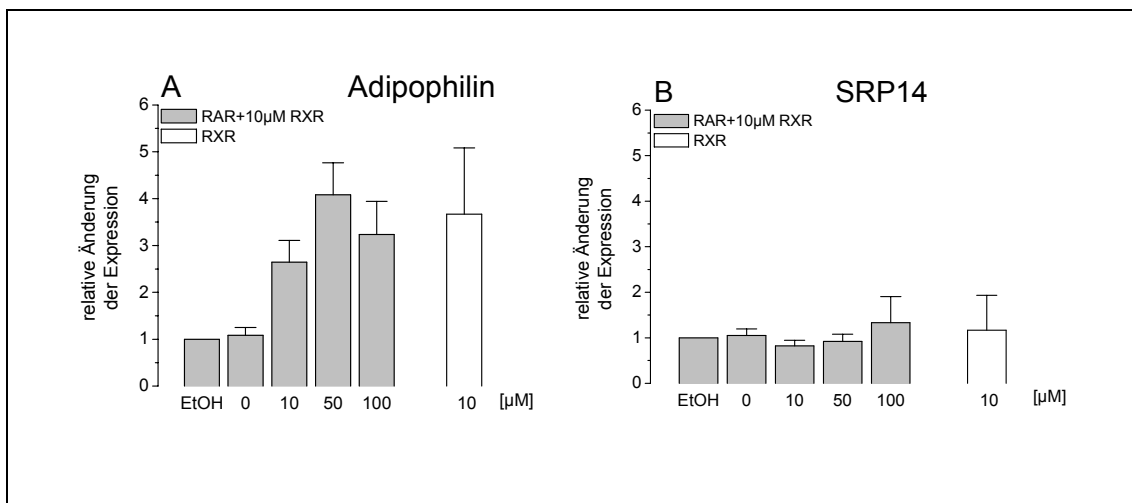
Im Vergleich dazu ist in Abbildung 14 der Versuch dargestellt, in dem THP1-Zellen konzentrationsabhängig mit  $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden inkubiert wurden. Hier sieht man einen Anstieg der Adipophilin-Expression ( $2,3 \pm 1,3$  bei 10  $\mu\text{M}$ ;  $3,0 \pm 0,7$  bei 50  $\mu\text{M}$ ). Bis 50  $\mu\text{M}$  Konzentration der Liganden lag eine konstante SRP14-mRNA-Expression vor. Bei höherer Konzentration sank sowohl die Adipophilin-mRNA-Expression ( $0,8 \pm 0,5$ ) als auch die SRP14-mRNA-Expression ( $0,4 \pm 0,1$ ).



**Abbildung 14:** Relative Expressionsunterschiede zwischen mit  $\text{PPAR}\gamma$ - oder RXR-Liganden inkubierten THP1-Zellen und Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-Expression unter Einfluss des  $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden stieg konzentrationsabhängig an. Bei Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  sank die Expression ab. **B:** Die SRP14-Expression blieb auch bei Beladung bis 50  $\mu\text{M}$  konstant, bei 100  $\mu\text{M}$  sank sie ab. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienten als Bezugsgröße.

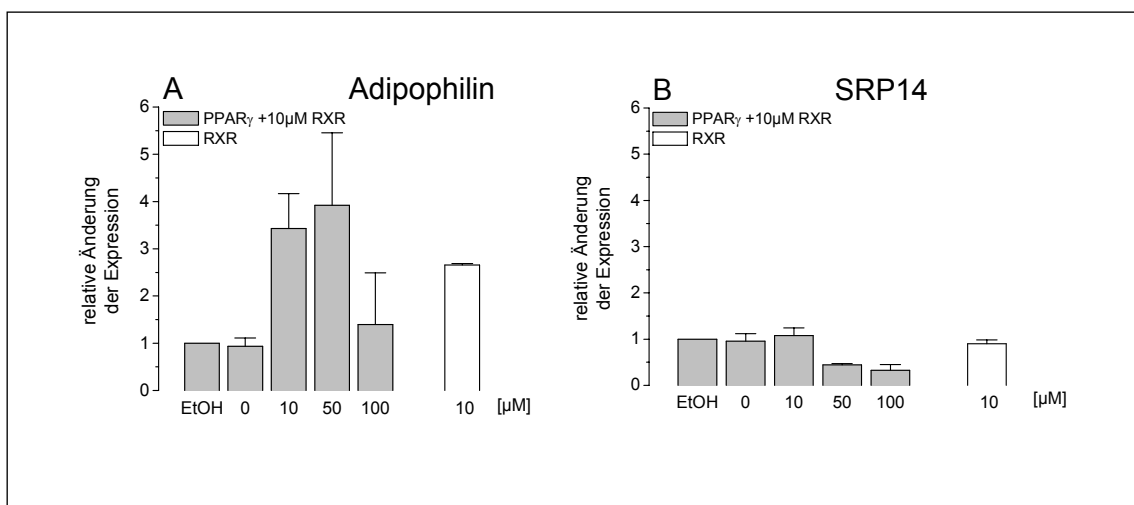
In Abbildung 15 sind die Änderungen der Adipophilin-mRNA-Expression unter dem gemeinsamen Einfluss von RAR- und RXR-Liganden dargestellt. Als Kontrolle ist die

SRP14-mRNA-Expression unter den gleichen Bedingungen gezeigt. In Abbildung 15A sieht man, dass die mRNA-Expression sowohl in unbehandelten Zellen als auch in mit 96%igem Ethanol inkubierten Zellen, gleich blieb. Unter dem Einfluss von 10  $\mu\text{M}$  RAR-Ligand plus der gleichen Konzentration RXR-Ligand stieg die mRNA-Expression an ( $2,6 \pm 0,5$ ). Der Anstieg scheint aber nicht auf einen additiven oder gar exponentiellen Effekt der Substanzen zurückzuführen zu sein. Noch höher wurde sie nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  RAR-Ligand plus 10  $\mu\text{M}$  RXR-Ligand ( $4,1 \pm 0,7$ ). Bei höheren Konzentrationen sank die Expression wieder ab ( $3,2 \pm 0,7$ ). Dies ist möglicherweise auf eine Intoxikation durch zu hohe Ligandenkonzentrationen zurückzuführen. In Abbildung 15B ist die stabil bleibende SRP14-mRNA-Expression dargestellt. Sowohl in den Kontrollzellen als auch unter Beladung änderte sich die Expression nur unwesentlich.



**Abbildung 15:** Relative Expressionsunterschiede zwischen THP1-Zellen, die mit RAR- und RXR-Liganden inkubiert wurden und entsprechenden Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-Expression unter dem Einfluss des RAR-Liganden steigt bis zu einer Ligandenkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  an und fällt danach wieder ab. **B:** Die SRP14-Expression bleibt auch nach Inkubation mit Liganden konstant. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienen als Bezugsgröße.

Abbildung 16 zeigt die Änderungen in der Adipophilin-mRNA-Expression unter dem gemeinsamen Einfluss von PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden. Als Kontrolle ist die SRP14-mRNA-Expression unter den gleichen Bedingungen gezeigt. Hier ist, wie aus der Literatur bekannt, ein Anstieg der Adipophilin-mRNA-Expression zu sehen ( $3,4 \pm 0,7$  bei  $10 \mu\text{M}$ ;  $3,9 \pm 1,5$  bei  $50 \mu\text{M}$ ). Der Abfall der Adipophilin-mRNA-Expression nach der Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  PPAR $\gamma$ -Ligand ( $1,4 \pm 1,1$ ) kann auf eine zu hohe Wirkstoffkonzentration zurückzuführen sein, die die Zellen geschädigt hat. Dies lässt sich aus dem Abfall der SRP14-mRNA-Expression schließen, der bei  $50 \mu\text{M}$  ( $0,44 \pm 0,03$ ) und  $100 \mu\text{M}$  ( $0,3 \pm 0,1$ ) Liganden-Konzentration auftrat.



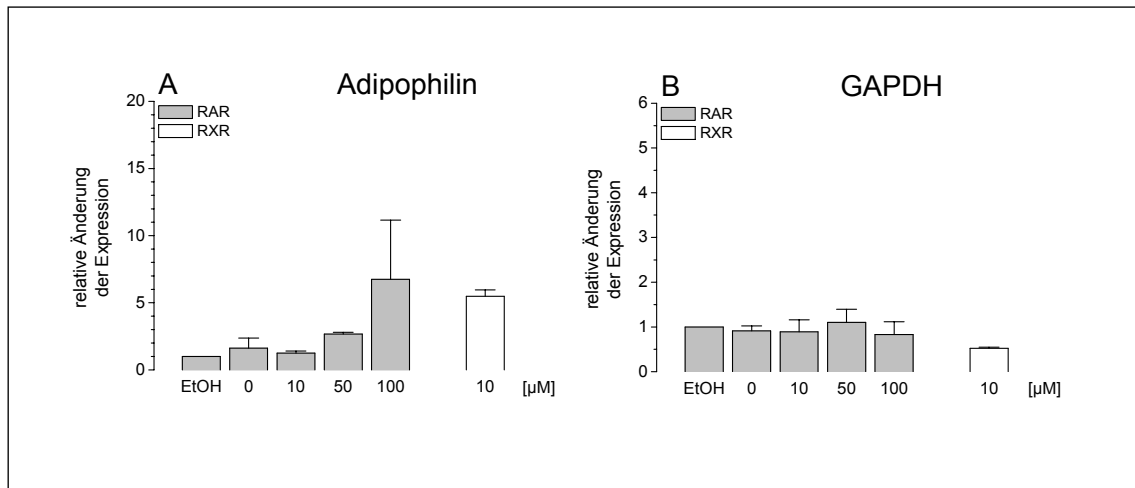
**Abbildung 16:** Relative Expressionsunterschiede zwischen THP1-Zellen, die mit PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden inkubiert wurden und entsprechenden Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-Expression unter PPAR $\gamma$ -Ligand steigt bis  $50 \mu\text{M}$  an und fällt danach wieder ab. **B:** Die SRP14-Expression fällt nach Inkubation mit  $50 \mu\text{M}$  und  $100 \mu\text{M}$  Liganden Konzentration ab. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienen als Bezugsgröße.

#### 4.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Adipophilin-Expression unter dem Einfluss von RAR- und PPAR $\gamma$ -Liganden (Normalisierung mit GAPDH)

In Abbildung 17 ist die Abhängigkeit der Adipophilin-mRNA-Expression in THP1-Zellen von der Konzentration der RAR- und RXR-Liganden dargestellt. Als Kontrolle wird die mRNA-Expression des Haushalts-Gens GAPDH gezeigt. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben inkubiert und aufbereitet.

In Abbildung 17A sieht man, dass es sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den unbeladenen und den mit  $10 \mu\text{M}$  RAR-Ligand beladenen Zellen keinen Adipophilin-mRNA-Expressionsanstieg gibt. Ab einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  war eine Erhöhung

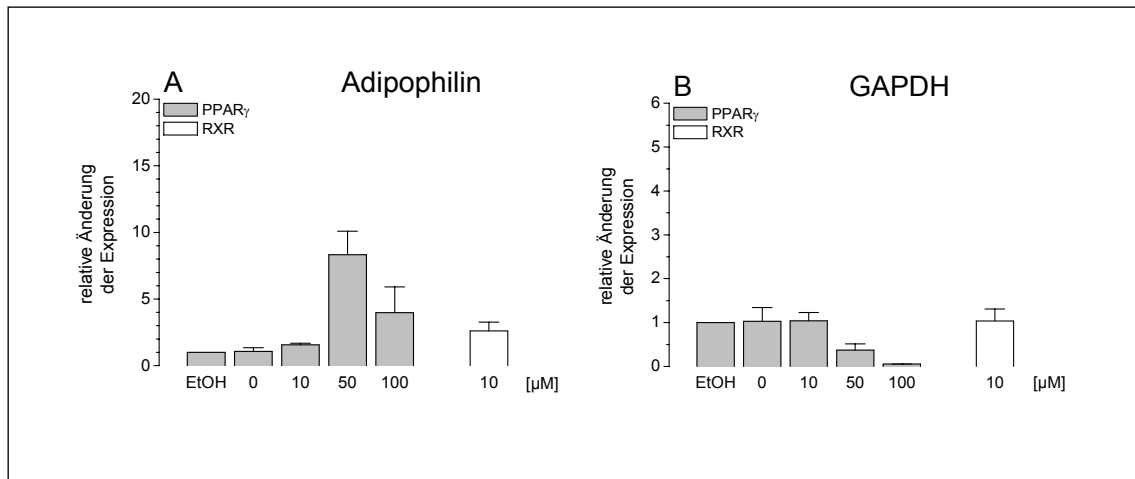
der Expression zu sehen ( $2,7 \pm 0,1$ ). Bei der Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  RAR-Ligand traten stärkere Schwankungen zwischen den Einzelmessungen auf ( $6,7 \pm 4,4$ ). Die Expression unter Einfluss von RXR-Liganden war gegenüber der Kontrolle erhöht ( $5,5 \pm 0,5$ ). In Abbildung 17B ist die Expression von GAPDH als Kontrolle dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in gleicher Weise wie die in Abbildung 17A. Die Expression des Haushalts-Gens GAPDH blieb auch bei Inkubation mit verschiedenen Liganden stabil.



**Abbildung 17:** Relative Expressionsänderung zwischen THP1-Zellen, die mit RAR- und RXR-Liganden inkubiert wurden und entsprechenden Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-mRNA-Expression unter dem Einfluss eines RAR-Liganden steigt deutlich an. **B:** Die GAPDH-mRNA-Expression bleibt auch nach Inkubation konstant. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen sind als eins gesetzt und dienen als Bezugsgröße.

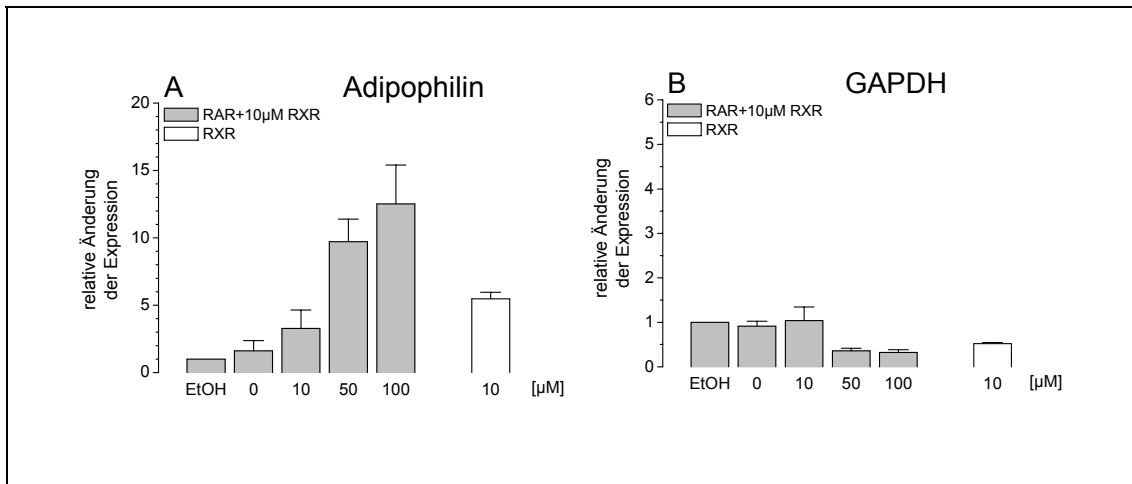
Abbildung 18 zeigt die Adipophilin-mRNA-Expression und die GAPDH-mRNA-Expression unter dem Einfluss von  $\text{PPAR}\gamma$ -Liganden. In Abbildung 18A ist zu sehen, dass die Adipophilin-mRNA-Expression bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  ( $8,3 \pm 1,8$ ) deutlich höher war als bei der Kontrolle ( $1,1 \pm 0,3$ ) und einer Liganden Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  ( $1,6 \pm 0,1$ ). Bei  $100 \mu\text{M}$  fiel sie auf die Hälfte wieder ab ( $4,0 \pm 1,9$ ). Die GAPDH-mRNA-Expression sank ab einer Liganden Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  ab ( $0,4 \pm 0,1$  bei  $50 \mu\text{M}$ ;  $0,1 \pm 0,0$  bei  $100 \mu\text{M}$ , Abbildung 18B).





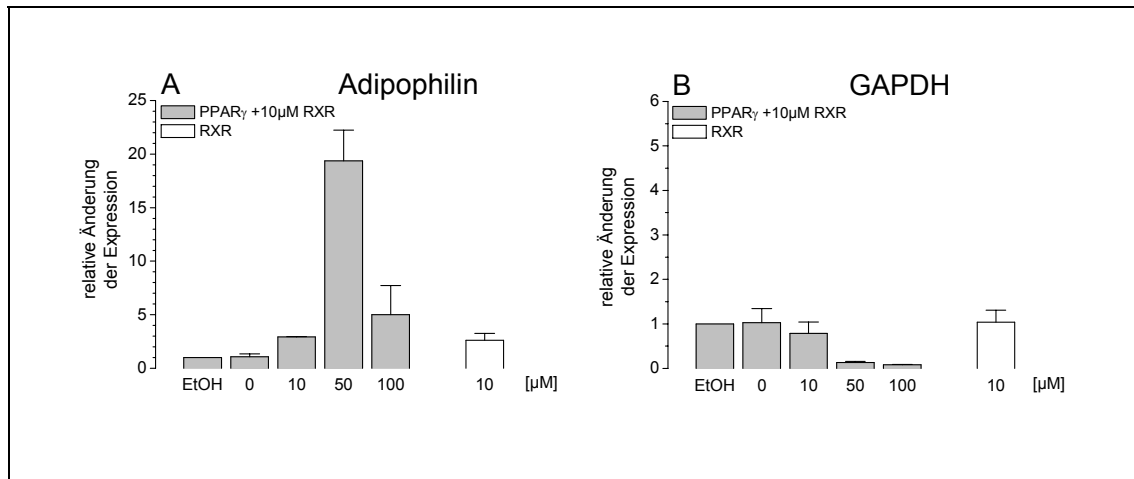
**Abbildung 18:** Relative Expressionsänderung zwischen THP1-Zellen, die mit PPAR<sub>γ</sub>- und RXR-Liganden inkubiert wurden und entsprechenden Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-mRNA-Expression steigt unter dem Einfluss des PPAR<sub>γ</sub>-Liganden deutlich an. **B:** Die GAPDH-mRNA-Expression bleibt nach Inkubation mit bis zu 10 μM Ligand konstant und sinkt unter Einfluss von 50 und 100 μM Ligandenkonzentration stark ab. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienen als Bezugsgröße.

In Abbildung 19 sind die Unterschiede in der mRNA-Expression von Adipophilin unter dem Einfluss der Kombination aus RAR- und RXR-Liganden dargestellt. Als Kontrolle diente die GAPDH-mRNA-Expression unter den gleichen Bedingungen. In Abbildung 19A ist der Anstieg der Adipophilin-Expression bei RAR-Liganden-Konzentrationen von 10 μM ( $3,3 \pm 1,4$ ), 50 μM ( $9,7 \pm 1,7$ ) und 100 μM ( $12,5 \pm 2,9$ ) in Kombination mit 10 μM RXR-Ligand dargestellt. In der Lösungsmittel-Kontrolle und den unbehandelten Zellen war keine Veränderung sichtbar. In den mit RXR-Liganden inkubierten Zellen war ein mRNA-Expressionsanstieg sichtbar. Abbildung 19B zeigt die GAPDH-mRNA-Expression von THP1-Zellen. Hier ist zu erkennen, dass die Expression auch unter Beladung mit RAR- und RXR-Liganden stabil blieb bzw. die GAPDH-mRNA-Expression bei den mit 50 μM ( $0,4 \pm 0,1$ ) und 100 μM ( $0,3 \pm 0,1$ ) RAR-Liganden plus je 10 μM RXR-Ligand inkubierten Zellen sank. Das Absterben ist möglicherweise auf einen Toxizitätseffekt bei den höheren Konzentrationen zurückzuführen. Die Expression nach Beladung mit 10 μM RXR-Ligand ( $0,5 \pm 0,02$ ) war ebenfalls niedriger als die der Lösungsmittel-Kontrolle und der unbeladenen Zellen.



**Abbildung 19:** Relative Expressionsänderungen zwischen THP1-Zellen, die mit RAR- und RXR-Liganden inkubiert wurden und entsprechenden Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-mRNA-Expression unter dem Einfluss von RAR steigt an. **B:** Die GAPDH-mRNA-Expression fällt nach Inkubation mit RAR- und RXR-Liganden ab einer Konzentration von 50 µM ab. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienen als Bezugsgröße.

In Abbildung 20 sind die Expressionsänderungen unter dem Einfluss von PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden dargestellt. Diese Untersuchung diente als Vergleich zu der in Abbildung 19 dargestellten. In Abbildung 20A ist zu sehen, dass die Adipophilin-mRNA-Expression ab einer Liganden-Konzentration von 50 µM stieg ( $19,4 \pm 2,9$ ). Im Vergleich dazu war die Expression bei einer Konzentration von 100 µM weniger erhöht ( $5,0 \pm 2,7$ ). Abbildung 20B zeigt die GAPDH-mRNA-Expression unter Einfluss von PPAR $\gamma$ -Liganden. Hier sank die Expression der Haushaltsgene ab einer Ligandenkonzentration von 50 µM ab ( $0,1 \pm 0,03$  bei 50 µM;  $0,1 \pm 0,01$  bei 100 µM).



**Abbildung 20:** Relative Expressionsänderung zwischen THP1-Zellen, die mit PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden inkubiert wurden und entsprechenden Kontrollzellen. **A:** Die Adipophilin-mRNA-Expression unter PPAR $\gamma$  steigt nach Inkubation mit 50  $\mu$ M Ligand an und fällt dann wieder ab. **B:** Die GAPDH-mRNA-Expression fällt nach Inkubation mit PPAR $\gamma$ - und RXR-Liganden ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M ab. Mit Ethanol (EtOH) inkubierte Zellen dienen als Bezugsgröße.

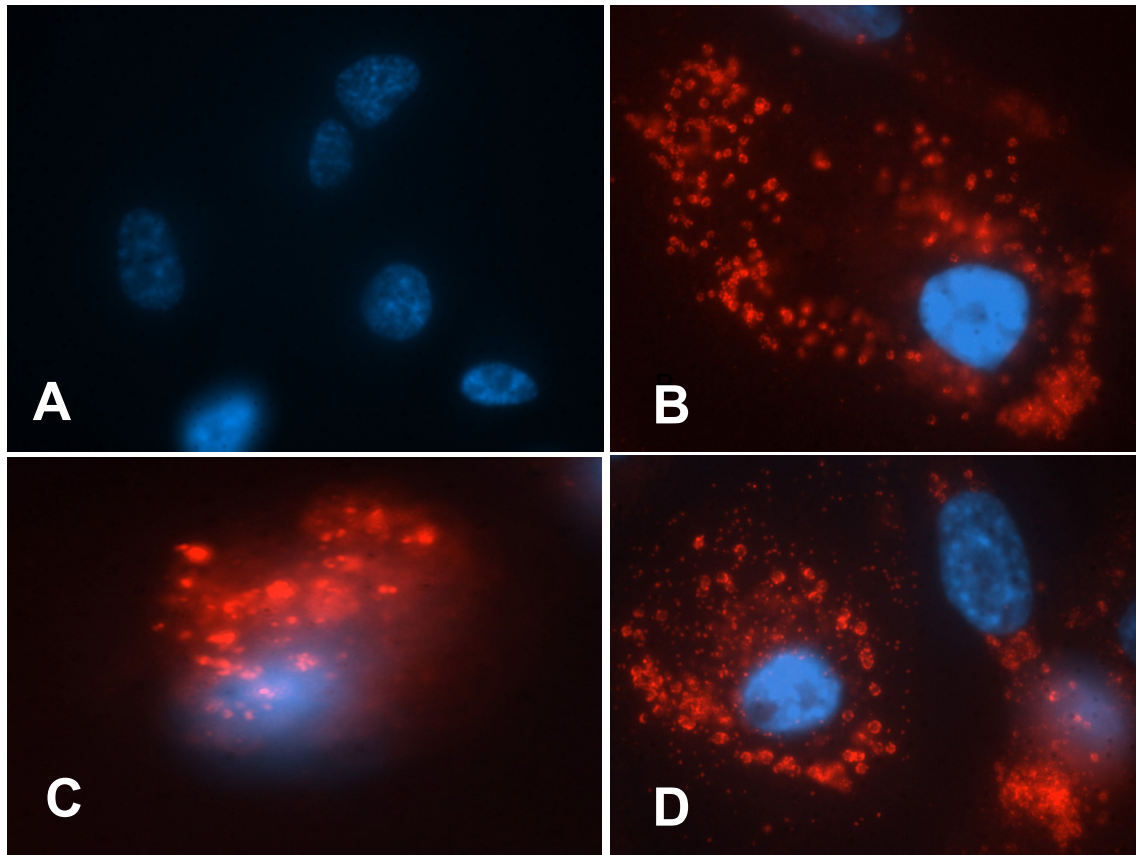
#### 4.4 Immunfluoreszenz

Die Lokalisation von Adipophilin in der Zelle wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz überprüft. Dazu wurden vier Tage alte THP1-Zellen für 48 h mit AcLDL und RAR-Liganden inkubiert. Die Markierung erfolgte mit einem monoklonalen Adipophilin-Antikörper und die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (vgl. Kapitel 3.7). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

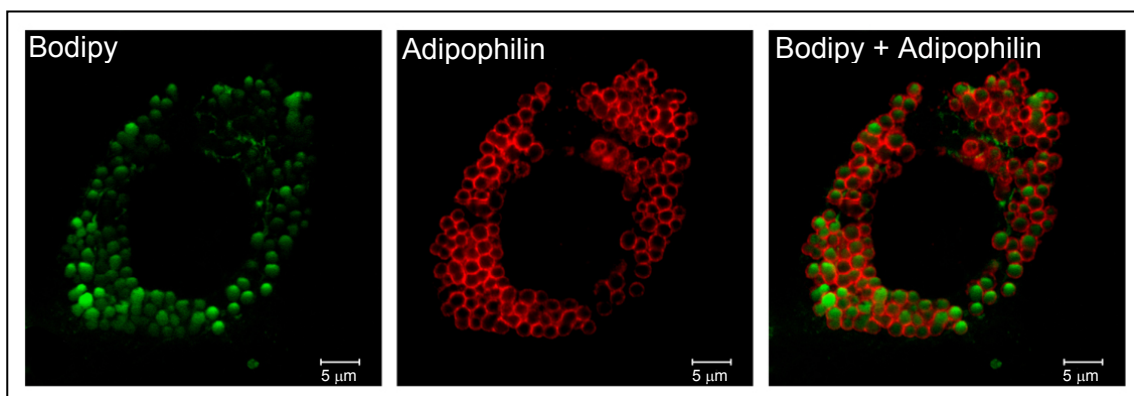
In Abbildung 21 sind diese Färbungen dargestellt. In allen Bildern ist zu sehen, dass die mit Adipophilin markierten Lipid-Tropfen in der Fluoreszenzmikroskopie als Ringe zu erkennen waren, die in der Intensität variierten. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Adipophilin vorwiegend an der Oberfläche von Lipid-Tropfen lokalisiert ist. Ob Adipophilin aber auch im Inneren vorkommt, kann mit dieser Technik nicht nachgewiesen werden. Abbildung 21A zeigt Zellen, die nur mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert worden sind und als Negativkontrollen dienten. Es ist nur die blaue Färbung des Zellkerns zu erkennen. Abbildung 21B zeigt Zellen, die mit AcLDL inkubiert wurden. Hier erkennt man die Verteilung von Adipophilin in der Zelle, das mit Lipid-Tropfen assoziiert ist und sich ringförmig darstellt. Die Lipid-Tropfen sind unregelmäßig in der Zelle verteilt. In Abbildung 21C ist eine Zelle dargestellt, die mit 10  $\mu$ M RAR-Liganden inkubiert wurde. Die Verteilung des markierten Adipophilin scheint ähnlich der in AcLDL behandelten Zellen. Es sind weniger Fett-Tropfen in der Zelle zu sehen. Die Zellen in Abbildung 21D

sind mit AcLDL und RAR-Liganden behandelt. Auch hier ist kein Unterschied in der Größe oder dem Verteilungsmuster in der Zelle zu sehen. Es sind ähnlich viele Fett-Tropfen wie in Abbildung 21B vorhanden.

In Abbildung 22 ist eine 24 h mit AcLDL inkubierte THP1-Zelle gezeigt. Die Aufnahme wurde in einem konfokalen Mikroskop angefertigt. Die Adipophilin-Markierung erfolgte mit einem monoklonalen Anti-Adipophilin-Antikörper und die Detektion mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Die Markierung von Lipiden erfolgte mit dem Farbstoff Bodipy. Der Zellkern wurde nicht angefärbt. Links im Bild sind die Lipid-Tropfen als grüne Färbung zu sehen. Sie sind ungleichmäßig um den Zellkern angeordnet, der sich hier als Aussparung darstellt. In der Mitte ist Adipophilin als rote ringförmige Färbung zu sehen. Die Verteilung ist gleichmäßiger als im linken Bild. Das rechte Bild zeigt die Mischung aus beiden Färbungen. Hier erkennt man eindeutig die Adipophilin-Ringe, die die Lipid-Kerne umgeben.

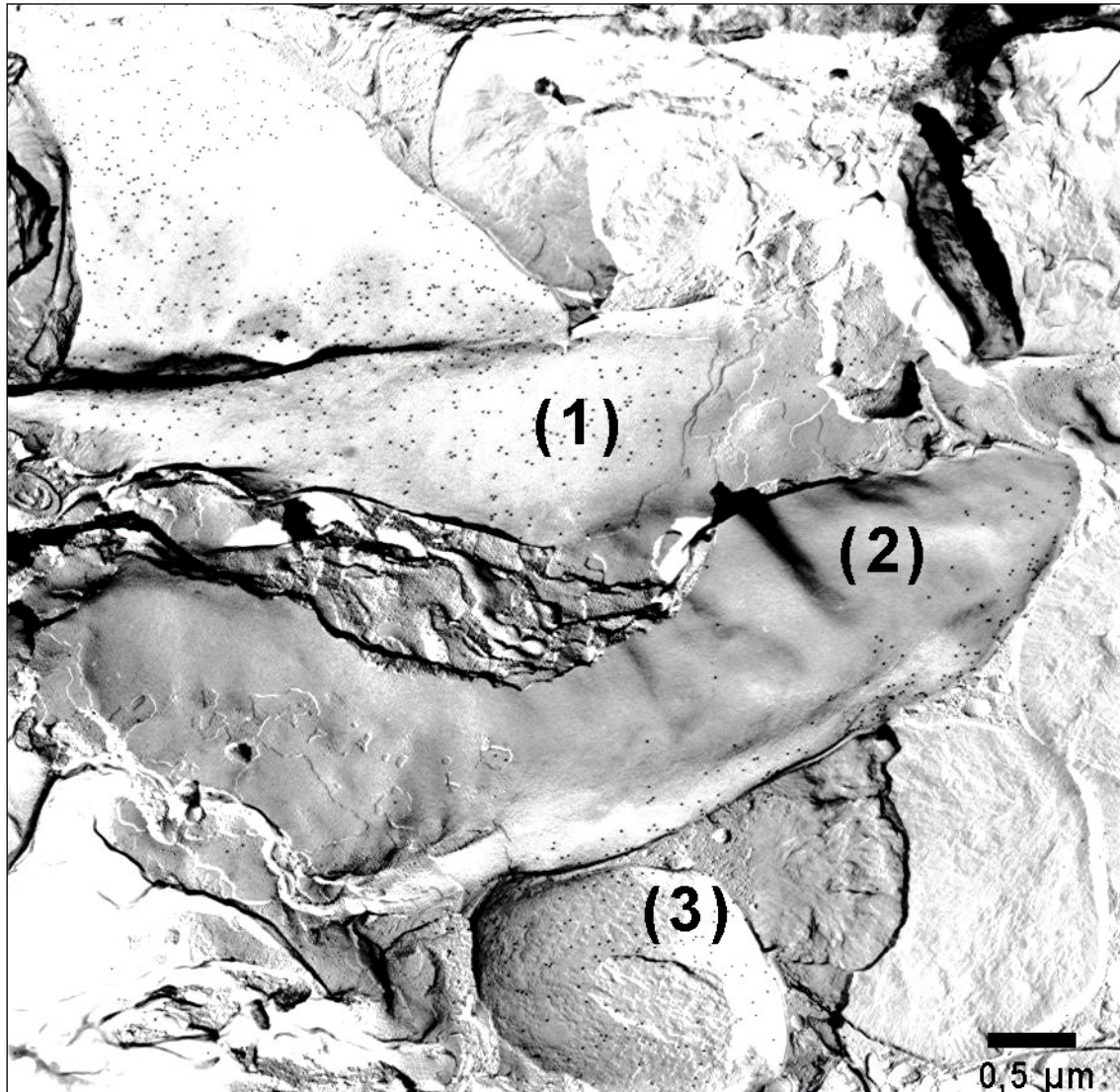


**Abbildung 21:** Indirekte Immunfluoreszenz von THP1-Zellen zum Nachweis von Adipophilin. **A:** Negativkontrolle von unbehandelten Zellen ohne Anti-Adipophilin-Antikörper. Blaue Anfärbung der Zellkerne. **B:** AcLDL-behandelte THP1-Zellen, die mit dem Anti-Adipophilin-Antikörper inkubiert wurden, zeigen eine ringförmige Lokalisation im Bereich der Lipid-Tropfen. Rote Anfärbung des Adipophilins. **C:** THP1-Zellen, die mit 10  $\mu$ M RAR-Liganden behandelt wurden und die mit dem Adipophilin-Antikörper inkubiert wurden zeigen ebenfalls eine Färbung an Lipid-Tropfen **D:** Zellen mit AcLDL und RAR-Liganden behandelt weisen in der Färbung kaum einen Unterschied zu den in B dargestellten Zellen auf.



**Abbildung 22:** Indirekte Immunfluoreszenz eines THP1-Makrophagen mit einem monoklonalen Anti-Adipophilin-Antikörper und Bodipy. Links: Grüne Anfärbung der kugelförmigen Lipid-Tropfen mit Bodipy. Mitte: Rote, ringförmige Darstellung von Adipophilin. Rechts: Mischung aus beiden Darstellungen. Hier sieht man deutlich die ringförmige Anordnung von Adipophilin um den Lipid-Kern der Tropfen. Die Aufnahme erfolgte in einem konfokalen Mikroskop.

#### 4.5 Gefrierbruch-Immunzytochemie



**Abbildung 23:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts einer unbehandelten THP1-Zelle nach immunzytochemischer Behandlung und Gefrierbruch. Goldmarkierte Sekundärantikörper detektieren Adipophilin als schwarze Punkte innerhalb der Lipid-Segel und -Tropfen.

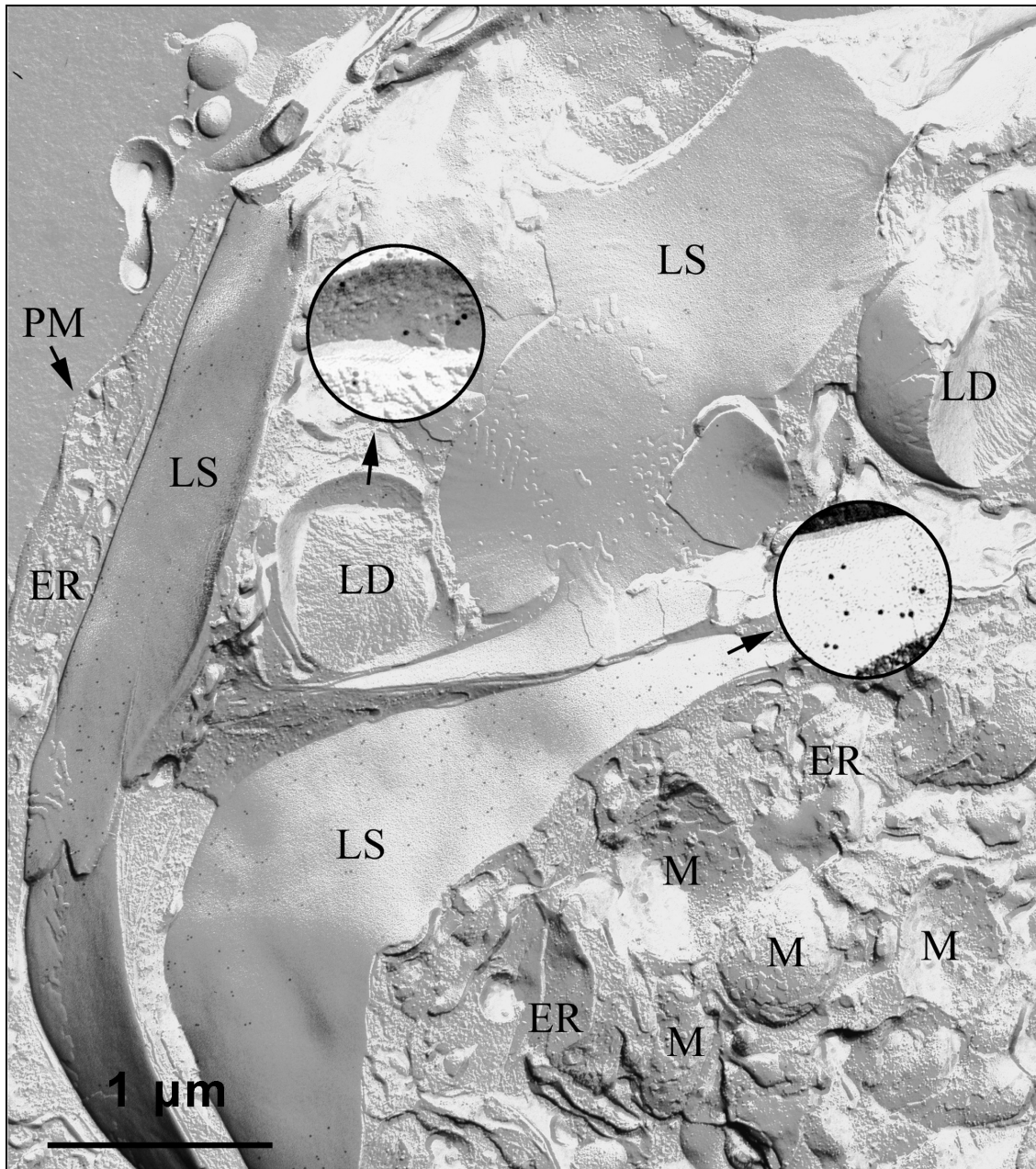
Mit Hilfe der Gefrierbruch-Immunzytochemie ist eine exakte intrazelluläre Lokalisation von Proteinen (hier Adipophilin) möglich. Dazu wurden mit AcLDL inkubierte THP1-Zellen mit einem Adipophilin-Antikörper und anschließend mit einem goldmarkierten Sekundärantikörper inkubiert.

Ein Gefrierbruch kann grundsätzlich zu verschiedenen Ansichten von Zelle und Zellorganellen führen. Folgt der Bruch zum Beispiel der Plasmamembran einer Zelle, ist keine Sicht auf das Zytoplasma möglich. In den meisten Fällen verläuft der Bruch jedoch in einer Weise, in der Membranflächen der Zellorganellen zu sehen sind. Bei

Doppelmembranen unterscheidet man zwei Seiten. Es gibt die E-Seite, welche die dem extrazellulären Raum zugewandte Membranseite darstellt (englisch: EF = exoplasmic face) und die P-Seite, die zum Zytoplasma zeigt (englisch: PF = protoplasmic face). Verläuft der Bruch quer zu Membranen, nennt man das Ergebnis einen Querbruch und viele Anschnitte von Membranen sind zu sehen. Wird das Zellorganell jedoch heraus gebrochen, dann bleiben die Membranen stehen (= Membranbruch) und man erhält als Resultat eine konkave Ansicht von ihnen. Dabei werden die E-Seite der inneren und die P-Seite der äußeren Membran sichtbar. Verläuft der Bruch oberhalb eines Organells, stellt sich eine konvexe Ansicht dar. Dies entspricht ebenfalls einem Membranbruch. Hier werden die E-Seite der äußeren und die P-Seite der inneren Membran sichtbar.

In Abbildung 23 ist ein Ausschnitt des Gefrierbruchs einer THP1-Zelle mit Anschnitten von zwei Lipid-Segeln und einem Lipid-Tropfen zu sehen. Adipophilin, das mit Gold markierten Sekundäntikörpern detektiert wurde, liegt in Form von schwarzen Punkten vor. Innerhalb der Zelle wurde Adipophilin innerhalb von Lipid-Tropfen und in der sie umgebenden Schicht gefunden. Daneben war Adipophilin an vielen Oberflächen von Lipid-Segeln detektierbar. Es ist sowohl an der Oberfläche, als auch innerhalb des Kerns eines Lipid-Tropfens lokalisiert. Dort ist es an der äußersten Lipidschicht lokalisiert. Gewöhnlich findet man kein Adipophilin tief innerhalb der Kerne der Lipid-Tropfen. Bei Struktur (1) handelt es sich um ein Lipid-Segel mit dem Membranbruch entlang der Membran. Man erhält somit eine konkave Ansicht. Es sind zahlreiche Goldpartikel an der äußeren Oberfläche zu erkennen. Die Partikel sind unregelmäßig entlang der Membran verteilt. Am unteren rechten Rand des Lipid-Segels sind noch mehrere Anschnitte von Membranen vorhanden. Hier sieht man, dass sich die Goldpartikel nicht auf allen Membranen finden lassen. Der Bruch des Lipid-Segels (2) ist so erfolgt, dass man eine konvexe Ansicht erhält. Überwiegend ist die innere Oberfläche der Membran zu sehen und kleine Bereiche der P-Seite der Membran. Auf der äußeren Seite sind die Goldpartikel hauptsächlich am Rand des Tropfens zu finden. In den Bereichen der inneren Seite sind kaum Partikel erkennbar. Bei Struktur (3) handelt es sich um den Querbruch eines Lipid-Tropfens, in dem mehrere Membranen angeschnitten sind. Hier ist Adipophilin auf mehreren Ebenen zu finden und scheinbar gleichmäßig verteilt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adipophilin sich sowohl auf konkaven als auch auf konvexen Brüchen und der Phospholipid-Monoschicht von Lipid-Tropfen befindet. Dies bedeutet, dass Adipophilin sich sowohl auf der nach Außen als auch auf der nach Innen zeigenden Oberfläche der

Lipid-Tropfen-Außenschicht finden lässt.



**Abbildung 24:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts einer THP1-Zelle nach immunzytochemischer Behandlung und Gefrierbruch. Die Zellen wurden für 12 h mit AcLDL inkubiert. Adipophilin, das mit einem goldmarkierten Sekundärantikörper detektiert wurde, stellt sich als schwarze Punkte in Lipid-Tropfen (LD) und -Segeln (LS) dar. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und in den Mitochondrien (M) ist keine Markierung vorhanden.

Es konnte gezeigt werden, dass Adipophilin nicht im Zytosol einer Zelle vorkommt, sondern spezifisch an Lipid-Körper, (Lipid-Tropfen und -Segel) gebunden ist. Abbildung 24 zeigt, dass Adipophilin nicht in Mitochondrien, im Endoplasmatischen Retikulum, in der Plasmamembran oder im Zytoplasma vorkommt.



## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung der Zellkulturmodelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adipophilin-Expression in THP1-Makrophagen unter dem Einfluss von Liganden verschiedener Transkriptionsfaktoren untersucht. Dazu musste zuerst ein geeignetes Zellkulturmodell etabliert werden. Es wurde die weltweit verwendete THP1-Zell-Linie ausgewählt (Venkateswaran *et al.*, 2000; Zweytick *et al.*, 2000), da sie Adipophilin exprimiert und dieser Zelltyp im menschlichen Körper eine wichtige Rolle bei der Bildung und Speicherung von Lipid-Tropfen spielt. Dies ist ein Prozess, an dem Adipophilin beteiligt zu sein scheint (Brasaemle *et al.*, 1997). Andere Arbeitsgruppen haben das Expressionsprofil von Adipophilin in Primärzellen (humane Makrophagen und Adipozyten) und in Zell-Linien (COS7-Zellen, CHO-Zellen, Fibroblasten oder HepG2-Zellen) untersucht (Imamura *et al.*, 2002; McManaman *et al.*, 2003). Allen diesen Zellen ist gemein, dass sie Adipophilin bilden. Alle, bis auf humane Makrophagen, sind Zell-Linien, die man vermehren kann, wobei Adipozyten und Fibroblasten lange Zeit dazu benötigen und so nur eingeschränkt für diese Arbeit geeignet waren (Wang *et al.*, 1999).

Aus der Literatur ist bekannt, dass PPAR $\gamma$  die Expression von Adipophilin in Makrophagen hoch reguliert (siehe Kapitel 5.3) und dass es mit RXR Heterodimere bildet (Skowronski *et al.*, 1995). Die Regulation der Adipophilin-mRNA unter dem Einfluss der PPAR $\gamma$ -Liganden konnte ich in eigenen Versuchen bestätigen (siehe Kapitel 4.3.1). Daher habe ich PPAR $\gamma$  als positive Kontrolle für eine Regulation der mRNA-Expression von Adipophilin verwendet. PPAR $\gamma$  ist einer von vielen bekannten Heterodimerpartnern für RXR. Von RXR ist bislang noch nicht bekannt, inwiefern es die mRNA-Expression von Adipophilin beeinflusst. Aus diesem Grund habe ich dies in dieser Arbeit untersucht. Ferner habe ich weitere Transkriptionsfaktoren aus der Literatur ausgesucht, die Heterodimere mit RXR bilden können (LeCluyse, 2001; Lee *et al.*, 1998). Ich habe dann versucht herauszufinden, welche davon außer PPAR $\gamma$  die Expression von Adipophilin regulieren (Teruel *et al.*, 2000; Tzamelis & Moore, 2001). Dabei war vor allem von Interesse, ob die Regulation zusammen mit RXR additiv, multiplikativ oder keinem besonderen Muster folgend verläuft.

Im Anschluss habe ich Versuche mit Konzentrationsreihen der Liganden dieser Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Die Konzentrationen wurden aus der Literatur entnommen (Ikeda *et al.*, 2000; Kaiser *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2002). Die Zellen wurden

mit Konzentration der Liganden zwischen 0 und 200  $\mu\text{M}$  (0, 10, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) inkubiert (siehe Kapitel 3.3.5). Ich habe auch jeweils einmal in allen Fällen einen Versuch mit 500  $\mu\text{M}$  des Liganden durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass diese Konzentration bei allen Substanzen toxisch wirkt. Dies war schon lichtmikroskopisch daran zu erkennen, dass kranke oder tote Zellen im Medium schwammen. Die Versuche mit Konzentrationen der Liganden von 200  $\mu\text{M}$  sind im Ergebnisteil nicht gezeigt, da hier zwar lichtmikroskopisch die Zellen intakt aussahen, trotzdem aber mehr Zellen als bei niedrigeren Konzentrationen im Medium schwammen. Ferner war bei diesen Konzentration zu erkennen, dass die Haushaltsgene SRP14 und GAPDH nicht mehr konstant exprimiert wurden. Darüber hinaus wurde die optimale Dauer der Inkubation mit den Liganden für die Konzentrationsreihen aus der Literatur (Ye & Serrero, 1998) entnommen und in eigenen Vorversuchen evaluiert. Dabei stellten sich 24 Stunden als geeignete Zeit heraus (Daten nicht gezeigt).

## **5.2 Etablierung der Echtzeit-RT-PCR**

Zur Etablierung der Echtzeit-RT-PCR wurden zunächst die optimalen Haushaltsgene ermittelt. Sie dienen der Normalisierung der Proben, da sie gleich bleibend exprimiert werden (siehe Kapitel 3.6.5). Wenn die Expression eines Haushaltsgens sinkt, kann die Ursache entweder sein, dass die Zellen sterben, nicht die gleiche Menge cDNA verwendet wurde, oder dass diese Gene nicht stabil exprimiert werden. Es wurden die beiden Haushaltsgene SRP14 und GAPDH verwendet, die unter den in der Arbeit gegebenen Bedingungen stabil exprimiert werden. Es wurde auch die 18S-RNA als Haushalts-Gen getestet, das sich jedoch aufgrund starker Expressionsschwankungen als ungeeignet herausstellte.

Die Expression sowohl von SRP14 als auch von GAPDH nimmt bei Liganden-Konzentrationen von 200  $\mu\text{M}$  rapide ab. Hier wird die Grenze deutlich, ab der die Konzentration von Liganden im toxischen Bereich für die Zellen liegt und die Versuche aufgrund der Belastung der Zellen nicht mehr auswertbar sind. Diese Ergebnisse stimmen mit meinen Beobachtungen in der Zellkultur überein. Die Ergebnisse der Inkubationsversuche mit Liganden-Konzentrationen von 200  $\mu\text{M}$  sind daher in dieser Arbeit nicht ausgewertet worden, da sie ein falsches Bild vom Einfluss der Liganden auf die Adipophilin-Expression liefern würden.

Die Expression von SRP14 ist in allen Versuchen konstant. GAPDH als Kontrollgen ist in den meisten Versuchen konstant exprimiert. In Abbildung 19 ist jedoch zu sehen,

dass die Expression von GAPDH ab einer RAR-Liganden Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zusammen mit einer RXR-Liganden Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sinkt. Da die Expression von SRP14 in denselben Zellen konstant bleibt, ist davon auszugehen, dass die GAPDH-Expression in diesem Fall durch die Inkubation mit den Liganden verändert wurde. Damit wird die Qualität von GAPDH als Haushalts-Gen in Frage gestellt. Das bedeutet, dass man bei der Auswertung der Regulation von Adipophilin immer sowohl die Expression von SRP14 als auch GAPDH als Haushalts-Gene bestimmen sollte (vergleiche Abbildungen 13-20).

### **5.3 Auswahl der Heterodimerpartner von RXR**

Die Bedingung für die ausgewählten Transkriptionsfaktoren war, dass sie Heterodimere mit RXR bilden. RXR reguliert als Heterodimer zusammen mit PPAR $\gamma$  die Expression von Adipophilin (siehe Kapitel 5.1). Eine weitere Voraussetzung für die Auswahl der Transkriptionsfaktoren war, dass sie von den untersuchten Zellen exprimiert werden. Bei der Auswahl der Heterodimerpartner für RXR fiel die Wahl auf die folgenden Rezeptoren: CAR $\beta$ , ER, FXR, LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PXR, RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , TR $\alpha$ , TR $\beta$ , TR $\gamma$  und VDR. Dazu kamen noch RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  und RXR $\gamma$ , da sie Homodimere miteinander bilden können (siehe Kapitel 1.3.3).

Es ist bekannt, dass PPAR $\gamma$  durch seine natürlichen Liganden, zum Beispiel 15 $d$ -PG J $_2$ , und synthetische Liganden, zum Beispiel Ciglitazone, direkt über das Verstärkerelement PPRE (englisch: peroxisome proliferator response element) an der DNA zu einer Erhöhung der Adipophilin-Expression führt (siehe Abbildung 6; Buechler *et al.*, 2001; Ye & Serrero, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch PPAR $\gamma$ -Liganden die Adipophilin-Expression erhöhen. PPAR $\gamma$  ist an vielen Prozessen des Lipid-Metabolismus beteiligt. Zum Beispiel ist es verantwortlich für erniedrigte Triglyzeride und Cholesterin im Plasma, sowie für eine Erhöhung der Insulin-Sensitivität (Verreth *et al.*, 2004). Die PPAR $\gamma$ -Liganden Troglitazone und Ciglitazone werden daher als antidiabetische Medikamente eingesetzt. Sie erhöhen die Sensitivität der Zellen für die Aufnahme von Glukose (Mutschler *et al.*, 2001; Teruel *et al.*, 2000). Die Regulation von PPAR $\gamma$  zusammen mit RXR als Heterodimer erfolgte in den Versuchen nicht additiv, obwohl dies eigentlich zu erwarten ist, da beide Transkriptionsfaktoren interaktiv wirken. Möglicherweise wird der Kern-Rezeptor PPAR $\gamma$  durch den starken Aktivator 15 $d$ -PG J $_2$  abgesättigt und dadurch ist die Expression von Adipophilin ist durch Inkubation mit beiden Liganden gleichzeitig nicht

höher als mit den einzelnen Liganden.

Die Expression von Adipophilin wird durch die ebenfalls untersuchten Liganden für CAR, ER, FXR, LXR, PXR und TR nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich haben diese Transkriptionsfaktoren keinen Einfluss auf die Expression von Adipophilin.

#### **5.4 RAR/RXR, eine viel versprechende Kombination?**

Retinoide (Vitamin-A-Derivate), die natürlichen Liganden der Rezeptoren RAR und RXR, werden therapeutisch bei Vitamin-A-Mangel, dermatologischen und onkologischen Erkrankungen eingesetzt. Zu den einer Therapie zugänglichen Krankheitsbildern gehören die akute Promyelozytenleukämie, das Plattenepithel-Karzinom und entzündliche Hauterkrankungen mit gestörter epidermaler Differenzierung (z.B. Psoriasis, atopische Dermatitis und Erkrankungen der Talgdrüsen; Staels *et al.*, 2001). Der breit gefächerte Einsatz zeigt, dass Retinoide vielfältige Wirkungen im menschlichen Körper haben. Sie beeinflussen viele metabolische Prozesse, z.B. die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten, sowie die Endothelfunktion. Unerwünschte Wirkungen sind eine Erhöhung der Triglyzeride und des Gesamt-Cholesterins im Plasma, sowie eine Senkung des HDL-Cholesterins. Diese Konstellation ist mit einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose assoziiert. Die Hypertriglyzeridämie bei einer Retinoid-Therapie wird möglicherweise durch ApoCIII vermittelt, da die Expression von ApoCIII durch Retinoide induziert wird. Dieses verhindert die Bindung von triglyzeridreichen Partikeln an das Endothel von Gefäßen und die Lipolyse durch die Lipoproteinlipase. Die Expression von ApoE hingegen wird nicht beeinflusst (Le *et al.*, 2002; Schmuth *et al.*, 2003).

Der RXR-Ligand 9-*cis*-Retinsäure ist nicht spezifisch für RXR, sondern aktiviert sowohl RXR als auch RAR. Der RAR-Ligand *all-trans* Retinsäure hingegen aktiviert ausschließlich RAR. Für RXR gibt es synthetisch hergestellte, spezifische Liganden, die jedoch nicht kommerziell erhältlich sind. So musste auf Versuche mit spezifischen Liganden verzichtet werden. Daher kann keine Aussage gemacht werden, ob es mit einem spezifischen RAR- und einem spezifischen RXR-Agonisten in Kombination andere Effekte auf die Adipophilin-Expression gibt. Es ist nicht bekannt, ob die Affinität des synthetischen Liganden zu RXR höher ist als die des natürlichen Liganden 9-*cis*-Retinsäure. Wenn die Affinität vom synthetischen Liganden zu RXR nicht höher ist als die der anderen Liganden zu ihren Transkriptionsfaktoren, dann wird RXR nicht in ein Homodimer konvertiert (Staels *et al.*, 2001). Somit wären additive oder potenzierende

Wirkungen auszumachen. Anhand der Versuchsergebnisse mit dem Transkriptionsfaktor RAR ist ersichtlich, dass er die Expression von Adipophilin ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  hochreguliert. Die Kombination von RAR und RXR zeigt eine Expressionssteigerung in Form einer additiven Regulation. Hier ist die Steigerung der Adipophilin-Expression höher als in den Untersuchungen mit alleiniger Inkubation der THP1-Zellen mit RAR- oder RXR-Liganden. Der Effekt ist dennoch nicht multiplikativ, das heißt, der Anstieg der Expression folgt nicht einem exponentiellen Verlauf. Daher kann nicht beantwortet werden, ob eine Isomerisierung von all-*trans* Retinsäure zu seinem *cis*-Isomer 9-*cis*-Retinsäure stattfindet.

Spezifische Agonisten für RXR setzen die intestinale Cholesterin-Absorption durch eine Senkung der Gallensäure-Produktion und eine Erhöhung der ABCA1-Expression herab. Normalerweise vermittelt ABCA1 den Efflux von Phospholipiden und Cholesterin aus der Zelle zu lipidarmen Apolipoproteinen, wie ApoA1 und ApoE. Hierdurch kommt es zur Bildung von HDL-Partikeln. Dieser Efflux wird von LXR/RXR induziert. Costet *et al.* (2003) fanden heraus, dass auch RAR diese Funktion erfüllt. Mit der Hochregulation von ABCA1 unter dem Einfluss von RAR steigt der Efflux von Cholesterin aus der Zelle. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird ein direkter Effekt von RAR/RXR auf den ABCA1-Promotor vermutet. Möglicherweise gibt es auch noch einen indirekten Effekt über die LXR-Bindungsstelle im ABCA1-Promotor. Manche LXR-Zielgene werden auch von RAR-Liganden mäßig induziert. Für LXRs und ABCA1 wird zudem eine antiatherogene Funktion postuliert, da diese Moleküle den Cholesterin-Efflux in Makrophagen stimulieren, die Gallensäure-Produktion in der Leber fördern und die intestinale Cholesterin-Absorption hemmen. Obwohl sie auch proatherogen wirken, indem sie die Lipogenese steigern und eine Hypertriglyzeridämie hervorrufen, überwiegen vermutlich jedoch die stärker ausgeprägten antiatherogenen Effekte (Joseph *et al.*, 2002).

Im Gegensatz dazu stehen die durch Adipophilin geförderte Triglyzerid- und Cholesterinester-Akkumulation in mit AcLDL inkubierten Makrophagen und ein reduzierter Cholesterin-Efflux, die sich proatherogen auswirken. Zusätzlich stellten Larigauderie *et al.* (2004) fest, dass Adipophilin wahrscheinlich fördernd auf die Lipid-Akkumulation in der Intima der Arterienwand wirkt. Die Expression der Adipophilin-mRNA war in arteriosklerotischen Plaques einer Arterie höher als in gesunden Abschnitten desselben Gefäßes (Larigauderie *et al.*, 2004).

Aus diesen Erkenntnissen folgt zusammen mit den Ergebnissen aus meiner Arbeit

(siehe Kapitel 4.3.1), dass Personen, die einer Retinoid-Therapie zugeführt werden, ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose haben. Da Retinoide die Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand stimulieren, entstehen vermehrt arteriosklerotische Plaques und die Expression von Adipophilin wird aktiviert. Diese Tatsache stellt eine weitere möglicherweise gravierende Nebenwirkung der Retinoid-Therapie dar.

### **5.5 Lipid-Tropfen**

Lipid-Tropfen sind in ihrer Funktion mehr als nur Depots für überflüssige Neutralfette. Neben ihrer Beteiligung an der Lipid-Homöostase scheinen sie auch an intrazellulären Signalwegen und an der Entstehung von Krankheiten beteiligt zu sein (Umlauf *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass die Expression der Adipophilin-mRNA in stenosierten Koronararterien mit Plaques, die lipidreiche Makrophagen enthalten, wesentlich höher ist, als in gesunden Koronargefäßen (Larigauderie *et al.*, 2004). Sowohl die mRNA von Adipophilin als auch das Protein sind sensitive Indikatoren für die Lipid-Akkumulation von monozytären Zellen. Daher kann Adipophilin als spezifischer Marker für die Lipid-Akkumulation angesehen werden (Buechler *et al.*, 2001). Zur Überprüfung dieser Aussagen wurden die THP1-Zellen mit AcLDL und mit RAR-Liganden inkubiert (vgl. Kapitel 3.3.5). Dies sollte zeigen, ob eine Veränderung in Größe oder Anzahl der Lipid-Tropfen im Vergleich zu unbehandelten Zellen stattgefunden hat. Der Beweis durch die Immunmarkierungen konnte durch sehr geringe Unterschiede in Größe und Anfärbung der Lipid-Tropfen nicht eindeutig erbracht werden. Die Differenz in der Größe der Lipid-Tropfen war im einfachen Fluoreszenzmikroskop schwach zu erkennen. Unterschiede zwischen Schaumzellen und Kontrollzellen waren jedoch im konfokalen Mikroskop deutlich sichtbar (vergleiche Abbildung 22). Die Stimulation der Adipophilin-Expression durch AcLDL wurde in den Immunmarkierungen, die im Rahmen meiner Arbeit durchgeführt wurden, nachgewiesen. Man kann die ringförmige Anordnung von Adipophilin an den Lipid-Tropfen verschiedener Größe erkennen. THP1-Makrophagen bilden also, wie humane Primärmakrophagen (siehe Abbildung 3) Schaumzellen, die durch eine ausgeprägte Speicherung von Cholesterin charakterisiert sind und ein Merkmal von arteriosklerotischen Läsionen sind.

### **5.6 Zelluläre Lokalisation von Adipophilin**

Zur Aufklärung der genauen Lokalisation von Adipophilin in der Zelle wurde die Gefrierbruch-Immunzytochemie auf elektronenmikroskopischer Ebene verwendet. Bisher war aus der Literatur bekannt, dass Adipophilin in der Phospholipid-Schicht der

Lipid-Tropfen zu finden ist (McManaman *et al.*, 2003). Mit der Gefrierbruch-Immunzytochemie kann genau nachgewiesen werden, an welchem Teil dieser Schichten sich Adipophilin befindet.

Es sind mehrere Modelle zur Biogenese von intrazellulären Lipid-Tropfen denkbar. Zweytick *et al.* (2000) konnten mittels der Gefrierbruchelektronenmikroskopie zeigen, dass eine Kontinuität zwischen der Oberfläche von Lipid-Tropfen und dem äußeren Blatt des Endoplasmatischen Retikulums besteht. Bisher ist dieses Modell am wahrscheinlichsten. In diesem Modell werden Tropfen von Neutralfetten zwischen den zwei Blättern des doppellagigen Endoplasmatischen Retikulums geformt. Diese entstehenden Lipid-Tropfen scheinen mit einer Phospholipid-Einzelschicht ummantelt zu werden. Diese Einzelschicht stammt von dem Endoplasmatischen Retikulum ab und enthält unter anderem Proteine ohne Transmembrandomäne, wie z.B. das Adipophilin (Zweytick *et al.*, 2000).

Auf Abbildung 23 und Abbildung 24 kann man erkennen, dass ein Lipid-Tropfen nicht nur aus einer umgebenden Schicht besteht, sondern auch innerhalb der Tropfen viele Schichten vorhanden sind. Die Abbildung zeigt, dass Adipophilin nicht nur an der den Lipid-Tropfen umgebenden Schicht lokalisiert, sondern auch an den inneren Schichten zu finden ist. Robenek *et al.* (2004) stellten die These auf, dass Adipophilin nicht im Endoplasmatischen Retikulum entsteht, sondern ein zytosolischer Ursprung der Lipid-Tropfen denkbar ist. Weder Adipophilin, noch ein anderes Protein der PAT-Familie (siehe Kapitel 1.4) konnte jedoch in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert werden. Damit ist ein wahrscheinlich neues Modell zur Biogenese von intrazellulären Lipid-Tropfen und zur zellulären Lokalisation von Adipophilin gezeigt worden. Damit hat Adipophilin möglicherweise nicht nur eine Funktion im Transport von Lipiden, sondern auch in der Entstehung der Tropfen und der Speicherung innerhalb der Lipid-Tropfen.

## **5.7 Fazit**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Adipophilin möglicherweise eine Funktion in der Bildung von arteriosklerotischen Plaques aufweist. Es ist im Lipidstoffwechsel an Transport und Lagerung von Lipiden beteiligt und vor allem in Schaumzellen zu finden, die ein Merkmal arteriosklerotischer Läsionen sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Expression der Adipophilin-mRNA durch Retinoide über den Transkriptionsfaktor RAR gesteigert wird. Die anderen untersuchten Transkriptionsfaktoren weisen lediglich schwache Effekte auf. Diese Wirkung könnte

eine weitere gravierende Nebenwirkung der Retinoid-Therapie darstellen. Durch Untersuchungen der Lokalisation von Adipophilin konnte gezeigt werden, dass es nicht nur an der Außenseite von Lipid-Tropfen, sondern auch in ihrem Inneren zu finden ist, wo es nicht nur an der zellulären Lipidhomöostase sondern auch an intrazellulären Signalwegen beteiligt sein könnte. Ob eine vermehrte Adipophilin-Expression in der Summe pro- oder anti-atherogen wirkt ist derzeit nicht bekannt. Dennoch deuten viele Befunde einschließlich derjenigen aus der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Adipophilin ein interessantes Zielmolekül für die pharmakologische Beeinflussung der Atherogenese darstellen könnte.

## **5.8 Ausblick**

In dieser Arbeit habe ich untersucht, welche Transkriptionsfaktoren konzentrationsabhängig einen Einfluss auf die mRNA-Expression von Adipophilin haben. Weiterhin wurde die genaue Lokalisation von Adipophilin in der Zelle untersucht. Daraus ergeben sich neue Fragestellungen, die erforscht werden sollten. So sind Untersuchungen über die Adipophilin-Expression nach zeitabhängiger Inkubation mit RAR- und RXR-Liganden mit Hilfe der Echtzeit-RT-PCR interessant, um eine Aussage darüber zu erhalten, ob die Stimulation einmalig oder permanent erfolgt.

Weiterhin sind zeit- und konzentrationsabhängige Untersuchungen auf Protein-Ebene mit Hilfe von Western-Blot-Analysen notwendig, um den Einfluss der Liganden auf die Translation zu bestimmen. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für eine physiologische Relevanz der hier dargestellten Befunde.

Ebenso interessant wären weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen an Zellen, die mit Liganden der Kernrezeptoren inkubiert wurden, um mögliche strukturelle Veränderungen in Bezug auf die Lokalisation von Adipophilin und die Genese von Lipid-Tropfen zu untersuchen.

Darüber hinaus sollten auch die Effekte von Inhibitoren der Expression von Adipophilin mit Hilfe von Echtzeit-RT-PCR und Western-Blot-Analysen untersucht werden.

Alle bisher besprochenen Untersuchungen sollten auch an anderen Zelltypen untersucht werden, die ebenfalls Adipophilin exprimieren. Das könnten Adipozyten oder Fibroblasten sein. Damit können mögliche Unterschiede im Verhalten der einzelnen Zelltypen erfasst werden. Weiterhin könnte mit Hilfe der RNA-Interferenz die Adipophilin-Expression inhibiert werden, um zusätzliche Informationen zur Funktion von Adipophilin zu gewinnen.



## 6 Literatur

1. Akkerman, J. W. N., Nieuwenhuis, H. K., und Sixma, J. J. In: Thrombose und Arteriosklerose. Hrsg. Akkerman, J. W. N., Nieuwenhuis, H. K., und Sixma, J. J., Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss, 1987.
2. Aqel, N. M., Ball, R. Y., Waldmann, H., and Mitchinson, M. J. Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *Journal of Pathology* 1985; 146:197-204.
3. Aqel, N. M., Ball, R. Y., Waldmann, H., and Mitchinson, M. J. Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 1984; 53:265-271.
4. Assmann, G. In: Lipid metabolism and atherosclerosis. Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1982.
5. Assmann, G., Cullen, P., and Schulte, H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Münster (PROCAM) study. *Circulation* 2002; 105:310-315.
6. Barrans, A., Collet, X., Barbaras, R., Jaspard, B., Manent, J., Vieu, C., Chap, H., and Perret, B. Hepatic lipase induces the formation of pre- $\beta$ -1-high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:11572-11577.
7. Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. W. G., and Brown, M. S. Degradation of cationized low density lipoproteins and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemic fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1976; 73:3178-3182.
8. Beard, R. L., Chandraratna, R. A. S., Colon, D. F., Gillett, S. J., Henry, E., Marler, D. K., Song, T., Denys, L., Garst, M. E., Arefieg, T., Klein, E., Gil, D. W., Wheeler, L., Kochhar, D. M. and Davies, P. J. A. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Stilbene Retinoid Analogs Substituted with Heteroaromatic Carboxylic Acids. *Journal of medicinal chemistry* 1995; 38:2820-2829.
9. Boehm, M. F., Zhang, L., Zhi, L., McClurg, M. R., Berger, E., Wagoner, M., Mais, D. E., Suto, C. M., Davies, P. J. A., Heyman, R. A. and Nadzan, A. M. Design and Synthesis of Potent Retinoid X Receptor Selective Ligands That Induce Apoptosis in Leukemia Cells. *Journal of medicinal chemistry* 1995; 38:3146-3155.
10. Bramlett, K. S., Yao, S. and Burris, T. P. Correlation of Farnesoid X Receptor Coactivator Recruitment and Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene Repression by Bile Acids. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 71:609-615.

11. Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J. and Londos, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of Lipid Research* 1997; 38:2249-2263.
12. Brown, M. S., Kovanen, P. T., and Goldstein, J. L. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 1981; 212:628-635.
13. Buechler, C., Ritter, M., Duong, C. Q., Orso, E., Kapinsky, M. and Schmitz G. Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1532:97-104.
14. Carmeliet, P. Proteins in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105:1519-1520.
15. Castle, C. K., Pape, M. E., Marotti, K. R., and Melchior, G. W. Secretion of pre-beta-migrating apo A-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *Journal of Lipid Research* 1991; 32:439-447.
16. Chiang, J. Y. L., Kimmel, R., Weinberger, C. and Stroup, D. Farnesoid X Receptor Responds to Bile Acids and Represses Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene (CYP7A1) Transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(15):10918-10924.
17. Costet, P., Lalanne, F., Gerbod-Giannone, M. C., Molina, J. R., Fu X., Lund, E. G., Gudas, L. J. and Tall, A. R. Retinoic Acid Receptor-Mediated Induction of ABCA1 in Macrophages. *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23(21):7756-7766.
18. Cullen, P., Fobker, M., Tegelkamp, K., Meyer, K., Kannenberg, F., Cignarella, A., Benninghoven, A., and Assmann, G. An improved method for quantification of cholesterol and cholesteryl esters in human monocyte-derived macrophages by high performance liquid chromatography with identification of unassigned cholesteryl ester species by means of secondary ion mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 1997; 38:401-409.
19. Cullen, P., von Eckardstein, A., and Assmann, G. Diagnosis and management of new cardiovascular risk factors. *European Heart Journal* 1998; 19 (Supplement 0), O13-O19.
20. Danielsen, E. M., Hansen, G. H., and Poulsen, M. D. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *Journal of Cell Biology* 1993; 120:1347-1356.
21. Davies, M. J., and Woolf, N. In: *Atheroma. Atherosclerosis in ischaemic heart disease: the mechanisms*. Ed. Wong, S., Science Press Limited, London 1990.
22. Dory, L. Post-transcriptional regulation of apolipoprotein E expression in mouse macrophages by phorbol ester. *Biochemical Journal* 1993; 292(Pt 1):105-

111.

23. Falk, E. Why do plaques rupture? *Circulation* 1992; 86:III30-III42.
24. Fu, T. and Borensztajn, J. Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochemical Journal* 2002; 366(Pt 1):195-201.
25. Fujimoto, K. Freeze-fracture replica electron microscopy combined with SDS digestion for cytochemical labeling of integral membrane proteins. Application to the immunogold labeling of intercellular junctional complexes. *Journal of Cell Science* 1995; 108:3443-3449.
26. Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W., and Libby, P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 94:2493-2503.
27. Gao, J. and Serrero, G. Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) Expressed in Transfected COS-7 Cells Selectively Stimulates Long Chain Fatty Acid Uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(24):16825-16830.
28. Gao, J., YE, H. and Serrero, G. Stimulation of Adipose Differentiation Related Protein (ADRP) Expression in Adipocyte Precursors by Long-Chain Fatty Acids. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 182:297-302.
29. GeneCards™ 2003;  
<http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/genecards/carddisp?ADFP>
30. Glass, C. K., and Witztum, J. L. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104:503-516.
31. Godsland, I. F., Wynn, V., Crook, D., and Miller, N. E. Sex, plasma lipoproteins, and atherosclerosis – Prevailing assumptions and outstanding questions. *American Heart Journal* 1987; 114:1467-1503.
32. Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russel, D. W., and Schneider, W. J. Receptor-mediated endocytosis. *Annual Review of Cell Biology* 1985; 1:1-39.
33. Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., and Brown, M. S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1979; 76:333-337.
34. Gorla-Bajszczak, A., Juge-Aubry, C., Pernin, A., Burger, A. G. and Meier, C. A. Conserved amino acids in the ligand-binding and  $\alpha$  domains of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  are necessary for heterodimerization with RXR. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1999;

147:37-47.

35. Havel, R. J., Eder, A., and Bragdon, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation* 1955; 34:1345-1353.
36. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., and Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 1996; 6(10):986-994.
37. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 1992; 10(4):413-417.
38. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11(9):1026-1030.
39. Holland, P. M., Abramsin, R. D., Watson, R., and Gelfand, D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'<sup>3'</sup> exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1991; 88(16):7276-7280.
40. Hong, Y. E. and Serrero, G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression by ibuprofen and indomethacin in adipocyte precursors and in adipocytes. *Biochemical Journal* 1998; 330:803-809.
41. Ikeda, Y., Sugawara, A., Taniyama, Y., Uruno, A., Igarashi, K., Arima, S., Ito, S. and Takeuchi, K. Suppression of Rat Thromboxane Synthase Gene Transcription by Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  in Macrophages via an Interaction with NRF2. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(42):33142-33150.
42. Imamura, M., Inoguchi, T., Ikuyama, S., Taniguchi, S., Kobayashi, K., Nakashima, N. and Nawata, H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *American Journal of physiological Endocrinology and Metabolism* 2002; 283:775-783.
43. Iwata, M., Eshima, Y. and Kagechika, H. Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *International Immunology* 2003; 15(8):1017-1025.
44. Jiang, H. P. and Serrero, G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1992; 89:7856-7860.
45. Jiang, H. P., Harris, S. E. and Serrero, G. Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246. *Cell Growth & Differ* 1992; 3:21-30.
46. Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G. N., Tran, J., Tippin, T. K.,

- Wang, X., Lusic, A. J., Hsueh, W. A., Law, R. E., Collins, J. L., Timothy, M., W. and Tontonoz, P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *PNAS* 2002; 99(11):7604-7609.
47. Joyeux, A., Balaguer, P., Gagne, D. and Nicolas, J. C. In Vitro and In Vivo Interactions Between Nuclear Receptors at Estrogen Response Elements. *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 1996; 58(5/6):507-515.
  48. Kaiser, A., Brembeck, F. H., Marschall v, Z., Riecken, E.-O., Wiedenmann, B. and Rosewicz, S. Fra-1: a novel target for retinoid action. *FEBS Letters* 1999; 448:45-48.
  49. Keil, U. und Spelsberg, A. Epidemiologie der Atheroskleroserisiken. In: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Hrsg. Schwandt, P. und Richter, W. O., Schattauer-Verlag, Stuttgart, 1995.
  50. Kisilevsky, R. and Tam, S. P. Macrophage cholesterol efflux and the active domains of serum amyloid A2.1. *Journal of Lipid Research* 2003; Sep 1 [Epub ahead of print].
  51. Klinge, C. M., Bodenner, D. L., Desai, D., Niles, R. M. and Traish, A. M. Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro. *Nucleic Acids Research* 1997; 25(10):1903-1912.
  52. Krieger, M., and Herz, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annual Review of Biochemistry* 1994; 63:601-637.
  53. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(259):680-685.
  54. Laffitte, B. A., Repa, J. J., Joseph, S. B., Wilpitz, D. C., Kast, H. R., Mangelsdorf, D. J. and Tontonoz, P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *PNAS* 2001; 98(2):507-512.
  55. Larigauderie, G., Furman, C., Jaye, M., Lasselien, C., Copin, C., Fruchart, J.-C., Castro, G. and Rouis, M. Adipophilin Enhances Lipid Accumulation and Prevents Lipid Efflux From THP-1 Macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24:504.
  56. Le, Q., Soprano, D. R. and Soprano, K. J. Profiling of Retinoid Mediated Gene Expression in Synchronized Human SCC Cells Using Atlas™ Human cDNA Expression Arrays. *Journal of Cellular Physiology* 2002; 190:345-355.
  57. LeCluyse, E. L., Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions* 2001; 134:283-289.

58. Lee, C.-H., Chawla, A., Urbiztondo, N., Liao, D., Boisvert, W. A. and Evans, R. M. Transcriptional Repression of Atherogenic Inflammation: Modulation by PPAR $\delta$ . *Scienceexpress* 2003; [www.sciencexpress.org/10.1126/science.1087344](http://www.sciencexpress.org/10.1126/science.1087344).
59. Lee, M.-O., Liu, Y. and Zhang, X.-K. A Retinoic Acid Response Element That Overlaps an Estrogen Response Element Mediates Multihormonal Sensitivity in Transcriptional Activation of the Lactoferrin Gene. *Molecular and Cellular Biology* 1995; 15(8):4194-4207.
60. Lee, S.-K., Choi, H.-S., Song, M.-R., Lee, M.-O. and Lee, J. W. Estrogen Receptor, a Common Interaction Partner for a Subset of Nuclear Receptors. *Molecular Endocrinology* 1998; 12(8):1184-1192.
61. Lerner, D. J., and Kannel, W. B. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes. A 26-year follow-up of the Framingham population. *American Heart Journal* 1986; 111:383-390.
62. Lewis, C. E., and McGee, J. O. In: *The macrophage*. Oxford University Press, New York, 1992.
63. Liang, H. Q., Rye, K. A., and Barter, P. J. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *Journal of Lipid Reseach* 1994; 35:1187-1199.
64. Liang, P. and Burgess, J. W. Characterization of macrophage cell (THP-1) surface apoE and it's role in metabolism of cell lipids. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2001; 23(4):337-40.
65. Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods and Applications* 1995; 4(6):357-362.
66. Löffler, G. Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA in: *Biochemie und Pathobiochemie*. Hrsg. Löffler, G. & Petrides, P. E., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998.
67. Lorenz, W. Real-Time PCR-Quantifizierung von Nukleinsäuren. *BIOforum* 1998; 21(10):586-589.
68. Lottspeich, F. und Zorbass, H. Proteinanalytik und Funktionsanalytik. In: *Bioanalytik*. Hrsg. Lottspeich, F. und Zorbass, H., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.
69. Lunn, G., and Sansone, E. B. Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions. *Analytical Biochemistry* 1987; 162(2):453-458.
70. Maniatis, T., Fritsch, E. F., und Sambrook, J. *Molecular Cloning*. In: *A Laboratory Manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New

York, 1989.

71. McManaman, J. L., Zabaronick, W., Schaack, J. and Orlicky, D. J. Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *Journal of Lipid Research* 2003; 44:668-673.
72. Moore, G. E., Gerner, R. E., and Franklin, H. A. Culture of normal human leukocytes. *Journal of the American Medical Association* 1967; 199(8):519-524.
73. Moore, L. B., Parks, D. J., Jones, S. A., Bledsoe, R. K., Consler, T. G., Stimmel, J. B., Goodwin, B., Liddle, C., Blanchard, S. G., Willson, T. M., Collins, J. L. and Kliewer, S. A. Orphan Nuclear Receptors Constitutive Androstane Receptor and Pregnane X Receptor Share Xenobiotic and Steroid Ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(20):15122-15127.
74. Mungmoonchai, R., Smirlis, D., Wong, S.-C., Edwards, M., Phillips, I. R. and Shephard, E. A. Xenobiotic induction of cytochrome P450 2B1 (CYP2B1) is mediated by the orphan nuclear receptor constitutive androstane receptor (CAR) and requires steroid co-activator 1 (SRC-1) and the transcription factor Sp1. *Biochemical Journal* 2001; 355:71-78.
75. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. und Schäfer-Korting, M. In: *Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. und Schäfer-Korting, M., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001.
76. Newland, C. F. and Cull-Candy, S. G. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *Journal of Physiology* 1992; 447:191-213.
77. Ogden, R. C. and Adams, D. A. Electrophoresis in agarose and acrylamid gels. *Methods in Enzymology* 1987; 152:61-87.
78. Phelan, M. C. Techniques for mammalian cell tissue culture. In: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., Editors) S. A.3F.1-A.3F.14. John Wiley & Sons, New York 1996.
79. Prattes, S., Hörl, G., Hammer, A., Blaschitz, A., Graier, W. F., Sattler, W., Zechner, R. and Steyrer, E. Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *Journal of Cell Science* 2000; 113: 2977-2989.
80. Pschyrembel, W. *Klinisches Wörterbuch*. Hrsg. Pschyrembel, W. und Dornblüth, O. de Gruyter, Berlin, 2001.
81. Robenek, H., Lorkowski, S., Schnoor, M. and Troyer, D. Spatial integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies. *The Journal of Biological Chemistry*, Nov 2004; 10.1074/JBC.M407194200 epub ahead of print.

82. Ross, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999; 340(2):115-126.
83. Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annual Reviews of Physiology* 1995; 57:791-804.
84. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
85. Ross, R., and Glomset, J. A. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science* 1973; 180:1332-1340.
86. Saluja, I., Ganneman, J. G. and Skoff, R. P. PPAR $\delta$  Agonists Stimulate Oligodendrocyte Differentiation in Tissue Culture. *GLIA* 2001; 33:191-204.
87. Schaffner, T., Taylor, K., Bartucci, E. J., Fischer Dzoga, K., Beeson, J. H., Glagov, S., and Wissler, R. W. Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *American Journal of Pathology* 1980; 100:57-80.
88. Schmitz, G., Fischer, H., Beuck, M., Hoecker, K. P., and Robenek, H. Dysregulation of lipid metabolism in Tangier monocyte-derived macrophages. *Arteriosclerosis* 1990; 10:1010-1019.
89. Schmuth, M., Elias, P. M. und Feingold, K. R. Nukleäre Hormonrezeptoren: Interventionsmöglichkeiten jenseits von Glukokortikoiden, Retinoiden und Vitamin D. *JDDG* 2003; 5(1):352-362.
90. Scholz, H. und Schwabe, U. In: *Taschenbuch der Arzneibehandlung*. Urban & Fischer 2000.
91. Schwartz, C. J., Valente, A. J., Sprague, E. A., Kelley, J. L., and Nerem, R. M. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clinical Cardiology* 1991; 14:1-1-1-16.
92. Shao, Z. M., Sheikh, M. S., Rishil, A. K., Dawson, M. I., Li, X. S., Wilber, J. F., Feng, P. and Fontana, J. A. Thyroid hormone enhancement of estradiol stimulation of breast carcinoma proliferation. *Experimental Cell Research* 1995; 218(1):1-8.
93. Skowronski, R. J., Peehl, D. M. and Feldmann, D. Actions of vitamin D<sub>3</sub>, analogs on human prostate cancer cell lines: comparison with 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology* 1995; 136(1):20-26.
94. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenl, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985; 150(1):76-85.
95. St Clair, R. W. Effects of estrogens on macrophage foam cells: a potential target for the protective effects of estrogens on atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 1997; 8:281-286.



96. Staels, B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by retinoids. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2001; 45(5):158-167.
97. Standeven, A. M., Thatcher, S. M., Yuan, Y.-D., Escobar, M., Vuligonda, V., Beard, R. L. and Chandraratna, R. A. S. Retinoid X receptor agonist elevation of serum triglycerides in rats by potentiation of retinoic acid receptor agonist induction or by action as single agents. *Biochemical Pharmacology* 2001; 62:1501-1509.
98. Statistisches Bundesamt. Gesundheitsbericht für Deutschland 1998 (<http://www.gbe-bund.de>). Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 1998.
99. Tabas, I. The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Current Opinion in Lipidology* 1995; 6(5):260-268.
100. Tzameli, I. and Moore, D. D. Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2001; 12(1):7-10.
101. Umlauf, E., Csasazar, E., Moertelmaier, M., Schuetz, G., Parton, R. G. and Prohaska, R. Association of stomatin with lipid bodies. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:23699-23709.
102. Venkateswaran, A., Repa, J. J., Lobaccaro, J.-M., A., Bronson, A., Mangelsdorf, D. J. and Edwards, P. A. Human White/Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-loaded Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(19):14700-14707.
103. Verreth, W., De Keyzer, D., Pelat, M., Verhamme, P., Ganame, J., Bielicki, J. K., Mertens, A., Quarck, R., Benhabiles, N., Marguerie, G., Mackness, B., Machness, M., Ninio, E., Herregods, M., C., Balligand, J. L. and Holvoet, P. Weight loss-associated induction of peroxisome proliferators-activated receptor-alpha and peroxisome proliferators-activated receptor-gamma correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation* 2004; 110(20):3259-3269.
104. Vincent, F., Eischen, A., Bergerat, J. P., Faradij, A., Bohbot, A., and Oberling, F. Human blood-derived macrophages: differentiation in vitro of a large quantity of cells in serum-free medium. *Experimental Hematology* 1992; 20:17-23.
105. Voet, D. und Voet, J. G. Proteinabbau. In: *Biochemie*. Hrsg. Voet, D. und Voet, J. G., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994.
106. Von Rokitsansky, C. In: *Über einige der wichtigsten Krankheiten der Arterien*. K. K. Hof- und Staatsdruckereien, Wien, 1852.
107. Voytas, D. 1988. Agarose gel electrophoresis. In: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman,

- J. G., Smith, J. A., und Struhl, K., Hrsg.) S. 2.5.1-2.5.9. JOHN WILEY & Sons, New York.
108. Wågsäter, D., Dimberg, J. and Sirsjo, A. Induction of ATP-binding cassette A1 by all-*trans* retinoic acid: Possible role of liver X receptor  $\alpha$ . International Journal of Molecular Medicine 2003; 11:419-423.
  109. Wang, X., Reape, T. J., Li, X., Rayner, K., Webb, C. L., Burnard, K. G. and Lysko, P. G. Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions. FEBS Letters 1999; 462:145-150.
  110. Weitkamp, B., Cullen, P., Plenz, G., Robenek, H., and Rauterberg, J. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. FASEB Journal 1999; 13:1445-1457.
  111. WHO: The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. World Health Organization, Geneva, 2002; ([http://www.who.int/whr/2002/en/Overview\\_E.pdf](http://www.who.int/whr/2002/en/Overview_E.pdf))
  112. Wissler, R. W. The arterial medial cell, smooth muscle cell or multifunctional mesenchym? Journal of Atherosclerosis Research 1968; 8:201-213.
  113. Wolins, N. E., Rubin, B. and Brasaemle, D. L. TIP 47 Associates with Lipid Droplets. The Journal of Biological Chemistry 2001; 276(7):5101-5108.
  114. Yamada, H., Fujisaki, H., Kaneko, H., Ishii, Y., Hamaguchi, T. and Oguri, K. Picrotoxin as a potent inducer of rat hepatic cytochrome P450, CYP2B1 and CYP2B2. Biochemical Pharmacology 1993; 45(9):1783-1789.
  115. Zweytick, D., Athenstaedt, K. and Daum, G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. Biochimica et Biophysica Acta 2000; 1469:101-120.

## 7 Curriculum Vitae

Monika Eisenberg

Geburtstag: 20.01.1975

Geburtsort: Münster

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Medizinstudium:

SS 1998 bis WS 04/05

Westfälische Wilhelms-Universität, Münster  
Ärztliche Vorprüfung 2000  
Erster Teil der ärztlichen Prüfung 2001  
Zweiter Teil der ärztlichen Prüfung 2003  
Dritter Teil der ärztlichen Prüfung 2004  
Datum der Approbation: 06.12.2004

Praktisches Jahr:

10/2003 bis 01/2004

Chirurgie, Kantonsspital Luzern, Schweiz

02/2004 bis 05/2004

Innere Medizin, Tribhuvan University Teaching  
Hospital, Kathmandu, Nepal

06/2004 bis 09/2004

Anästhesie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
und operative Intensivmedizin, Universitätsklinik  
Münster

Famulaturen:

07/2000

Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der  
Universitätsklinik Münster

09/2000

Klinik für Anästhesie des Klinikums Nürnberg

09/2001

Bernhardt Nocht-Institut für Tropenmedizin,  
Hamburg

03/2002

Kindernephrologische Ambulanz und Kinderdialyse  
der Klinik und Poliklinik für Pädiatrie,  
Universitätsklinik Münster und Internistisch-  
nephrologische Praxis, Münster

Ausbildung:

1994-1997

Schule für medizinisch technische  
Laboratoriumsassistenten, Münster

1985-1994

Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasium, Münster

1981-1985                      Grundschule Havixbeck

Anstellungen:

01/2001 bis heute	Dissertation am Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster (AG Makrophagenstoffwechsel)
04/1998 bis 12/2000	studentische Hilfskraft am Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster
11/1997 bis 03/1998	MTA am Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster
12/1998 bis 11/2004	Werkstudentin der Deutschen Stiftung Organtransplantation Telefon- und Perfusionsdienst im Transplantationszentrum der Universität Münster

## 8 Veröffentlichungen

### Buchbeiträge:

Lorkowski, S., Fuellen, G., Spitzer, M., Böking, T., Engel, T., Lueken, A., **Eisenberg, M.**, Schnoor, M., Stolle, K., and Cullen, P. Expression alternativ gespleißter ABCG1-Transcripte in humanen Makrophagen. *In: Geschlechtsspezifische Mechanismen der Arteriosklerose.* Heinle, H., Schulte, H., and Hahmann, H., eds. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen 2002:141-145.

Schnoor, M., Weitkamp, B., Rauterberg, J., Kummer, S., Böking, T., Wenner, C., Stolle, K., **Eisenberg, M.**, Galla, H.-J., Cullen, P., and Lorkowski, S. Expression von Kollagen Typ VI in humanen Makrophagen. *In: Geschlechtsspezifische Mechanismen der Arteriosklerose.* Heinle, H., Schulte, H., and Hahmann, H., eds. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung, Tübingen 2002:146-150.

### Abstracts:

Lorkowski, S., Böking, T., **Eisenberg, M.**, Schnoor, M., Stolle, K., Wenner, C., Weitkamp, B., Rauterberg, J., and Cullen, P. Expression of alternatively spliced ABCG1 transcripts in human monocyte-derived macrophages. *Perfusion* 2002; 15(2):83.

Schnoor, M., Lorkowski, S., Weitkamp, B., Rauterberg, J., Kummer, S., Böking, T., Wenner, C., Stolle, K., **Eisenberg, M.**, Galla, H.-J., and Cullen, P. Collagen expression in human monocyte-derived macrophages. *Perfusion* 2002; 15(2):83.

Wenner, C., **Eisenberg, M.**, Engel, T., Cullen, P. Regulation of the proteasomal degradation of apolipoprotein E in macrophages. ELC-Meeting, Tutzingen, 2001; Tagungsband.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Paul Cullen danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Überlassung dieses interessanten Themas. Dadurch bot sich die Gelegenheit über den Tellerrand der Medizin zu schauen.

Ich danke dem Direktor des Instituts für Arterioskleroseforschung an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Herrn Univ.-Prof. Dr. Gerd Assmann für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in den verschiedenen Laboren und Arbeitsgruppen.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Stefan Lorkowski, mit dem ich seit dem ersten Tag an zusammen gearbeitet habe. Keiner hat die Arbeit so gründlich gelesen wie er.

Ferner bedanke ich mich bei allen ehemaligen, alten, zurückgekehrten und neuen Kollegen in der Arbeitsgruppe und im ganzen Institut, die mich häufig in allen Lebenslagen und Fragen zur Dissertation unterstützt und beraten haben. Sie haben die Zeit im Labor interessant und lustig gemacht.

Zuletzt danke ich noch Carsten Paukert, der mich immer geduldig im Umgang mit dem Computer und dessen Programmen und den dazugehörigen Abstürzen beraten und mir wertvolle Tips gegeben hat.

Nicht zu vergessen Familie und Freunde, die immer an der Entstehung dieses Werkes Anteil genommen haben, ob sie wollten oder nicht.