

AUS DEM INSTITUT
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
PROF. DR. med. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***DIE ROLLE DES ZNF202 IM LIPIDSTOFFWECHSEL
-UNTERSUCHUNGEN AM ZNF202-KNOCKOUT-MAUSMODELL-***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andrea Julia Seemann

2008

AUS DEM INSTITUT
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
PROF. DR. med. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***DIE ROLLE DES ZNF202 IM LIPIDSTOFFWECHSEL
-UNTERSUCHUNGEN AM ZNF202-KNOCKOUT-MAUSMODELL-***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andrea Julia Seemann

2008

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gerd Schmitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler
Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009

Curriculum Vitae

Name: Andrea Julia Seemann
Geburtsdatum: 15.09.1981
Geburtsort: Regen
Anschrift: Theresienthaler Str.14
94227 Zwiesel

Schulbildung:

1987-1991 Grundschule Zwiesel
1991-2001 Gymnasium Zwiesel
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

Ab 2001 Studium der Humanmedizin,
Universität Regensburg
2004 Physikum (Alte AO)
2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Neue AO)

Approbation: 11.2007

Beruflicher Werdegang:

Seit 01.01.2008 Tätigkeit als Assistenzärztin für Pädiatrie am
Klinikum Deggendorf

**Meinen Eltern
für die jahrelange Unterstützung ohne Wenn und Aber**

Gliederung

1 Einleitung

- 1.1 Ziel der Studie
- 1.2 Lipidmetabolismus
 - 1.2.1 *Einleitung*
 - 1.2.2 *Rolle von ABC-Transportern im Lipid- und reversen Cholesterintransport*
 - 1.2.3 *Pathogenese der Arteriosklerose*
 - 1.2.4 *Transkriptionelle Regulation des Lipidmetabolismus*
 - 1.2.4.1 *Nukleäre Hormonrezeptoren*
 - 1.2.4.2 *ZNF202 als transkriptioneller Rezeptoren*
- 1.3 ZNF202
 - 1.3.1 *Struktur*
 - 1.3.2 *Regulation der Expression von ZNF202*
 - 1.3.3 *Modulation der ZNF202 Funktion durch Protein/Protein-Interaktion*
 - 1.3.4 *ZNF202 Zielgene*
- 1.4 Fragestellung

2 Material und Methoden

- 2.1 Versuchsanordnung
- 2.2 RNA-Präparation
 - 2.2.1 *Probengewinnung und Asservierung*
 - 2.2.2 *Homogenisierung des Gewebes*
 - 2.2.3 *RNA-Isolation*
 - 2.2.4 *Qualitätsprüfung und RNA-Konzentrationsbestimmung*
- 2.3 Reverse Transkription
- 2.4 Real-time RT-PCR (TaqMan)
- 2.5 Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

3 Ergebnisse

- 3.1 Expression des ZNF202 in Wildtypmäusen
 - 3.1.1 *Basale Expression des ZNF202 in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen*

- 3.1.2 *Basale Expression verschiedener putativer ZNF202-Zielgene in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen*
- 3.2 Vergleich der Genexpression von ZNF202-Zielgenen in ZNF202 Knockout-Mäusen versus Wildtypmäusen
 - 3.2.1 *Genexpression des ABCA1*
 - 3.2.2 *Genexpression des ABCG1*
 - 3.2.3 *Genexpression des PPAR delta*
 - 3.2.4 *Genexpression des ApoB*
 - 3.2.5 *Genexpression des MTP*
- 3.3 Veränderungen im Lipidprofil (Serum) bei ZNF202 Knockoutmäusen versus Wildtypmäusen
 - 3.3.1 *Analyse des Lipidprofils: Cholesterin*
 - 3.3.2 *Analyse des Lipidprofils: Triglyzeride*
- 4 Diskussion**
- 4.1 Basale Genexpression in C57/BL6 Ntac Wildtypmäusen
 - 4.1.1 *Basale Expression des ZNF202 in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen*
 - 4.1.2 *Basale Expression verschiedener putativer ZNF202-Zielgene in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen*
- 4.2 Vergleich der Genexpression der ZNF202-Zielgene in ZNF202 Knockout-Mäusen versus Wildtypmäusen
 - 4.2.1 *Genexpression von ABCA1 und ABCG1*
 - 4.2.2 *Genexpression von PPAR delta*
 - 4.2.3 *Genexpression von MTP und ApoB*
- 4.3 Veränderungen im Lipidprofil (Serum) von ZNF202 Knockout-Mäusen versus Wildtypmäusen
- 5 Zusammenfassung**
- 6 Literatur**
- 7 Abkürzungsverzeichnis**

1. Einleitung

1.1 Ziel der Studie

Störungen des Lipidstoffwechsels spielen bei der Entstehung von Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung eine zentrale Rolle. Wie bereits in einigen *in-vitro* Studien gezeigt werden konnte, stellt der transkriptionelle Repressor ZNF202 einen potentiellen Schlüsselregulator im HDL-Cholesterin- und Triglyzeridstoffwechsel dar. Ausgehend von diesen Beobachtungen, sollte in der folgenden Studie die Funktion von ZNF202 *in-vivo* am Knockout-Mausmodell weiter charakterisiert werden.

1.2 Lipidmetabolismus

1.2.1 Einführung

Entscheidender Faktor für den Transport von Lipiden in der Zirkulation sind Apolipoproteine. Mindestens 10 Apolipoproteine liegen eingebettet in die Oberfläche von sphärischen Lipoproteinpartikeln, die die Lipide im Blut transportieren, und werden durch die auf den Chromosomen 1,2,6,11 und 19 liegenden Gene kodiert. Aminosäuresequenzhomologien zwischen diesen verschiedenen Apolipoproteine lassen die Abstammung von einem gemeinsamen Urgen vermuten. Als Hauptaufgaben der Apolipoproteine werden drei Bereiche gesehen: als Liganden für die Reaktion mit zellulären Rezeptoren zu Lipoproteinpartikeln, als Kofaktoren für am Fettstoffwechsel beteiligte Enzyme und als strukturelle Komponente von Lipoproteinen[82].

Täglich werden mit der Nahrung etwa 100g Triglyzeride und ca. 1g Cholesterin aufgenommen. Diese Lipide werden in den Epithelzellen des Darms in große Lipoproteinpartikel, so genannte Chylomikronen, aufgenommen, in die Lymphe sezerniert und gelangen schließlich in den Blutkreislauf. Mit der Zirkulation werden diese Partikel zu den Muskeln und Fettgewebkapillaren transportiert, wo sie an entsprechenden Bindungsstellen haften bleiben. Ein Bestandteil dieser Partikel, das Apolipoprotein CII, aktiviert ein endotheliales Enzym (Lipoproteinlipase), das freie Fettsäuren und Monoglyzeride freisetzt[82]. Die Fettsäuren können die Endothelzellen passieren und werden in den Verbraucherzellen wieder zu Triglyzeriden verestert oder oxidiert. Durch diesen Vorgang entstehen aus den Chylomikronen Remnant-Partikel, die reich an Cholesterinestern, Apo B-48 und Apo E sind und dafür an Triglyzeriden verarmen. Die Remnants werden zur Leber transportiert und dort über spezifische rezeptorvermittelte Endozytose in Hepatozyten aufgenommen und in Lysosomen abgebaut[82]. Daraus resultiert der Transport von Triglyzeriden aus der Nahrung ins Fettgewebe und von Cholesterin in die Leber.

In der Leber gebildete Triglyzeride und Cholesterin werden, an VLDL (very low density lipoprotein) gebunden, zu extrahepatischen Geweben transportiert. Sie enthalten Apolipoprotein B100 und erhalten im Plasma zusätzlich Apolipoprotein C und E aus den HDL-Cholesterinpartikeln. Durch weiteren Lipoproteinlipase-vermittelten Abbau der Triglyzeride aus VLDL-Cholesterin entsteht zunächst IDL-Cholesterin und als Endprodukt LDL-Cholesterin, das besonders cholesterinreich ist[85]. LDL-Cholesterin vermittelt den Cholesterintransport von der Leber zu extrahepatischen Geweben.

HDL-Cholesterin stellt eine wesentliche Komponente für den so genannten reversen Fetttransport dar. Wesentliche Apolipoproteinkomponenten des reifen HDL-Cholesterin-Partikel sind Apolipoprotein AIV (ApoAIV) gemeinsam mit Apolipoprotein AI (ApoAI) und Apolipoprotein E. Der reverse Cholesterintransport (RCT) stellt eine wichtige Möglichkeit dar, überschüssiges Cholesterin und Phospholipide aus Zellen der Peripherie, insbesondere auch aus Schaumzellen, zur Verstoffwechslung zurück zur Leber zu transportieren. HDL wird im Darm und der Leber gebildet und bindet im Blut an die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) (Abbildung 1).

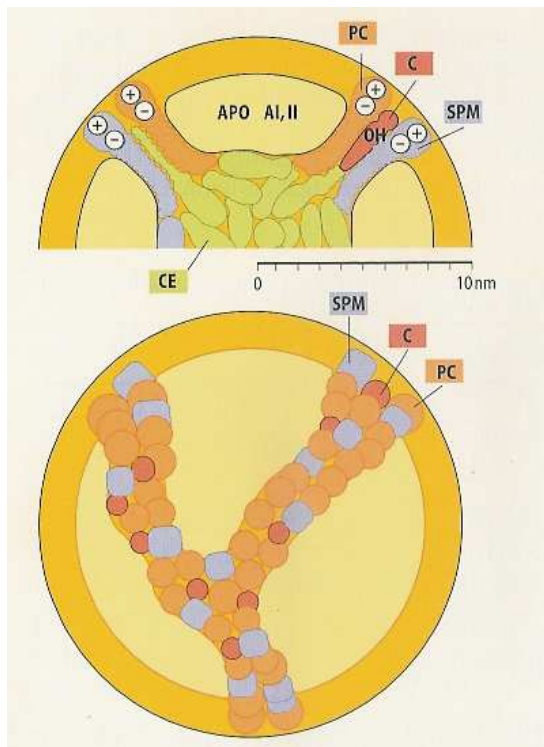


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines HDL-Partikels. C-Cholesterin, CE-Cholesterinester, PC-Phosphatidylcholin, SPM-Sphingomyelin, A1-Apolipoprotein 1, A2-Apolipoprotein 2.[85].

Dieses Enzym vermittelt die Veresterung von Cholesterin unter Bildung von Lysophosphatidylcholin, wodurch es in den HDL-Cholesterin-Partikeln zu einer Zunahme an Cholesterinestern und einer Abnahme von Phosphoglyceriden (Abdiffusion von Lysophosphatidylcholin) kommt[85]. Die freie Kapazität kann nun weiter mit Cholesterin aus den Membranen der extrahepatischen Gewebe gefüllt werden. Der Transport aus den Membranen wird vor allem durch ABCA1[30;31] vermittelt. Dabei wird zunächst migrierendes HDL3-Cholesterin[29] mit seinem Bestandteil Apolipoprotein A gebildet. Ein Abwandern des hydrophoberen Cholesterinesters ermöglicht die erneute Aufnahme freien Cholesterins. Durch weitere LCAT-vermittelte Cholesterinaufnahme und Addition der zusätzlichen Apolipoproteine C und E sowie Phospholipiden aus VLDL-Cholesterin-Partikeln wird HDL3-Cholesterin in HDL2-Cholesterin umgewandelt[34]. Dieses wird rezeptorvermittelt in die Leber aufgenommen; SR-B1 stimuliert das Einschleusen der HDL-Cholesterin-Partikel durch reversible Bindung und ermöglicht dadurch den Transfer in den zellulären Pool[35]. Dort wird das Cholesterin mit Unterstützung der mikrosomalen Cholesterin-7- α -hydroxyse[41] zu Gallensäuren (Chenodeoxycholsäure und Cholsäure) metabolisiert und schließlich über die Galle ausgeschieden[85] (Abbildung 2).

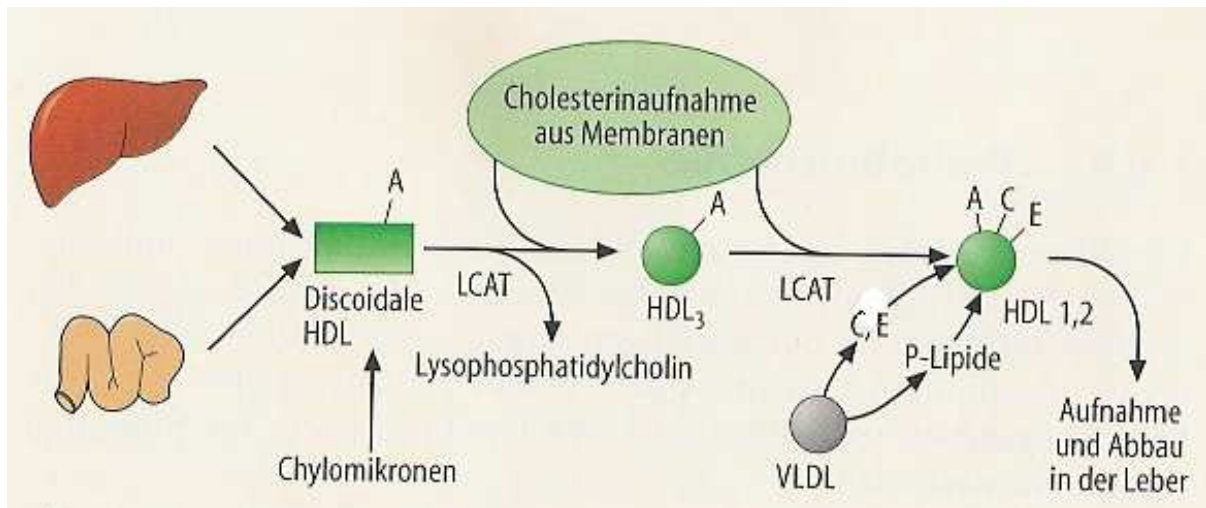


Abb.2: Schematische Darstellung der Rolle des HDL-Cholesterins im reversen Cholesterintransport, LCAT-Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase, A-Apolipoprotein A, C-Apolipoprotein C, E-Apolipoprotein E, P-Lipid-Phospholipide [85]

Im Darm verarbeiten bakterielle Enzyme die primären Gallensäuren in sekundäre und ermöglichen damit eine Wiederaufnahme in den Recyclezyklus des Gallensäurepools. Limitierend für diesen Schritt ist die Aktivität der hepatischen 7- α -Hydroxylase. Dieses Enzym bietet so einen Regulationsmechanismus für die hepatische Cholesterinentfernung [36,41]

1.2.2 Die Rolle der ABC-Transporter im Lipidtransport

Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose stellen die Verringerung des Serum- HDL-Cholesterinwertes und die Erhöhung des LDL-Cholesterinspiegels dar. Der protektive Effekt des HDL-Cholesterinanteils gründet sich vor allem auf die Vermittlung des reversen Cholesterintransportes, bei dem überschüssiges Cholesterin aus peripheren Geweben zur Leber transportiert wird. Sowohl der Serum-HDL-Cholesterinspiegel als auch der intrazelluläre Cholesteringehalt in Leber und anderen peripheren Organen werden maßgeblich durch ATP binding Cassette (=ABC)-Transporter beeinflusst.

Die ABC-Transporter sind eine Familie von 49 Integralmembranproteinen, die den Transport von vielfältigen Substraten, wie Lipiden, Zucker oder Chlorid, durch die Zellmembran vermitteln. Die Energie für diesen Vorgang wird durch die ATP-Hydrolyse bereitgestellt. Sie werden aufgrund von Sequenzhomologien in sieben Unterfamilien (von ABCA bis ABCG) unterteilt[79-81].

ABC-Transporter besitzen eine ATP-binding Cassette (ABC), das heißt eine nukleotidbindende Domäne. Diese liegt intrazellulär, enthält Walker A und B-Motive[83], die typisch für alle ATP-bindenden Proteine sind, und eine weitere Peptidsequenz (Signatur- oder C-Motiv), die spezifisch für die jeweilige Unterfamilie ist. Die meisten ABC-Proteine besitzen außerdem Transmembrandomänen (TMDs) aus 6-12 α -Helices. Funktionelle ABC-Transporter bestehen aus zwei ABC- und zwei TMD-Einheiten; diese können in Form einer (=full size-Transporter) oder von zwei Polypeptidketten (half size-Transporter) vorliegen. Daher müssen sich half size-Transporter zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern, um funktionieren zu können.

ABCA1 ist entscheidend für den Efflux von zellulärem Cholesterin zu Apolipoproteinen wie ApoA1. Dieser Transporter ist ein full-size-Transporter aus jeweils sechs Transmembrandomänen und einer ATP-binding cassette. Entscheidend in der Aufklärung des Zusammenhanges zwischen HDL-Stoffwechsel und ABC-Transportern war die Gewinnung von Erkenntnissen über Patienten, die an der seltenen Tangier- Krankheit litten. Verschiedene Mutationen im ABCA1-Gen [18-20] führen bei diesen Patienten zu einem nahezu vollständigen Fehlen von HDL, niedrigen Serumcholesterinspiegeln und einem deutlich verminderten zellulären Efflux von Cholesterin und Phospholipiden[21,22], der eine Akkumulation von Cholesterinestern in retikuloendothelialen Zellen peripherer Gewebe wie Tonsillen, Milz und Lymphknoten zur Folge hat. Besondere Bedeutung hat dieser Schutz vor Lipidübersättigung in Makrophagen, da diese durch ihre physiologische Funktion hohen Mengen an freiem Cholesterin in Serum und Nahrung ausgesetzt sind[27]. Eine der Auswirkungen ist, unter anderem, die verstärkte Schaumzellbildung aus mit Cholesterin beladenen Makrophagen, die zur Bildung atheroskleröser Plaques führt und dadurch ein frühzeitiges Auftreten von zum Beispiel koronaren Herzerkrankungen begünstigt.

Die transkriptionelle Regulation von ABCA1 ist bereits gut untersucht.

ABCG1, ein half size-Transporter, ist ebenso in den Cholesterin- und Phospholipidefflux im Makrophagen involviert[55]. Sowohl bei Promotoren für ABCA1 als auch für ABCG1 konnten spezifische ZNF202-Bindungsstellen und eine dosisabhängige Hemmung der Promotoraktivität für ZNF202 gezeigt werden[6].

ABCG5/8 sind weitere so genannte half size-Transporter, die ausschließlich in der Leber und im Darm exprimiert werden. Mutationen in diesen Transportern führen zur Sitosterolämie, in deren Folge es zu einer Hyperabsorption von Cholesterin und toxischen Pflanzensterolen sowie einer verminderten biliären Sterolsekretion kommt[50].

1.2.3 *Pathogenese der Arteriosklerose*

Ihren Ursprung hat die Arteriosklerose in einem Missverhältnis aus zirkulierenden Lipoproteinen, hämodynamischen Faktoren, Gefäßstrukturveränderungen und dem Immunsystem. Zu Beginn steht der so genannte „fatty streak“, der hauptsächlich aus sogenannten Schaumzellen besteht. Bei ihnen handelt es sich um aus Monozyten differenzierte Makrophagen, die mit Cholesterin beladen sind. „Fatty streaks“ entstehen durch die Anlagerung von zirkulierenden Monozyten an Läsionen in größeren Arterien mit nachfolgender Aktivierung des Endothels[12]. Durch die lokale Ausschüttung von Zytokinen kommt es zur Migration von Monozyten in den subendothelialen Raum und ihrer Differenzierung zu Makrophagen, wobei es zu einer Hochregulation der so genannten Scavenger-Rezeptoren kommt, die für die Erkennung und Internalisierung von Pathogenen zuständig sind[13]. Diese Rezeptoren vermitteln vor allem die Aufnahme von oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL), die im Gegensatz zur Cholesterinaufnahme über den LDL-Rezeptor nicht durch einen Feed-back-Mechanismus reguliert ist und zur Bildung von Schaumzellen führt. Die Makrophagen ihrerseits sind wiederum in die Entstehung von oxLDL-Cholesterin involviert, welches die Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen, wie dem

vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und chemotaktischen Faktoren, wie macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1), fördert; daraus folgt eine weitere Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten[14].

„Fatty streaks“ finden sich vor allem in den westlichen Ländern- vereinzelt bereits in der frühen Adoleszenz und im Erwachsenenalter und besitzen noch keine signifikante klinische Relevanz, können sich jedoch zu komplexeren Läsionen weiterentwickeln. Hierbei kommt es zu einem T-Zelleinstrom, der Zytokine initiiert, welche die Funktion des umliegenden Endothels, glatter Muskelzellen sowie der Makrophagen beeinflusst[15,16].

Im weiteren Verlauf wandern vermehrt glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima ein, reichern dort Cholesterin an und werden dadurch zu Schaumzellen. Der Untergang dieser lipid-beladenen Zellen führt zur Bildung eines nekrotischen Areals, das schließlich durch eine fibröse Kappe aus extrazellulären Matrixproteinen abgeschlossen wird.

Neben bekannten Risikofaktoren, wie Hypercholesterinämie, Rauchen und männlichem Geschlecht, tragen auch Missverhältnisse der Stoffwechsellage wie sie beim metabolischen Syndrom mit Hypertonie, Insulinresistenz, Adipositas, hohen Triglyzeriden und niedrigem HDL-Cholesterin auftreten, zu einer Beschleunigung der Arteriosklerose bei. Hierbei spielen aber auch genetische Faktoren wie z. B. der ApoE-Phänotyp eine Rolle. Das ApoE-Gen befindet sich auf Chromosom 19. Bisher wurden drei Allele beschrieben, die für drei verschiedene Isoformen, ApoE2, ApoE3 und ApoE4 kodieren. ApoE2-homozygote Individuen zeigen eine verminderte Clearance von VLDL und Chylomikronen aus dem Blut, was mit vorzeitiger Atherosklerose und Xanthomen einhergehen kann[82]. Der Phänotyp E3/E3 hingegen zeigt eine höhere Aktivität der Lipoproteinlipase und geht daher, verglichen mit anderen Phänotypen, mit einem niedrigeren VLDL-Cholesterin und einem höheren LDL-Cholesterin einher. Apo E4 wurde als potentieller Einflussfaktor bei der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung identifiziert. Vor allem bei der familiären Form zeigt es eine hohe Prävalenz, kann in den Plaques histochemisch nachgewiesen werden und soll mit der Phosphorylierung des τ -Proteins[82], das die Fibrillenbildung fördert, interagieren.

Bei der Ruptur einer Plaqueformation kann es nun zum Auftreten von Herzinfarkten sowie in seltenen Fällen zu Embolien kommen. Zur Vulnerabilität der Plaques sollen auch lokale Entzündungsprozesse beitragen[16].

Neueren Erkenntnissen zu Folge spielen auch PPARs, LXRs und andere nukleäre Hormonrezeptoren in der Regulation des Lipidmetabolismus und in der Lipidhomöostase und Entzündungsreaktion in Makrophagen, Muskelzellen und Endothelzellen der Arterienwand eine Rolle.

1.2.4 *Transkriptionelle Regulation des Lipidmetabolismus*

1.2.4.1 *Nukleäre Hormonrezeptoren*

Nukleäre Hormonrezeptoren sind liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die in eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen involviert sind. Im Lipidstoffwechsel spielen vor allem LXR, FXR und PPAR eine wichtige Rolle.

Vertreter der nukleären Hormonrezeptoren sind Liver X receptors (**LXRs**). Eine Reihe von Studien konnte während der letzten Jahre LXR als Schlüsselregulator des intrazellulären Sterolgehaltes identifizieren. Zwei LXR-Isoformen, LXR α (NR1H3, vorkommend in Geweben mit hohem Fettstoffwechsel, z.B. der Leber) und LXR β (NR1H2, ubiquitär vorkommend), sind bekannt. Beide bilden obligate Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR, aktiviert durch 9-cis-Retinoidsäure), die an ein LXRE (LXR responding element) binden, welches häufig aus zwei Hexanukleotid-Repeats mit vier dazwischen liegenden Nukleotiden (i.e. DR4) besteht[23]. Als LXR-Liganden wurden 22(R)-Hydroxycholesterol, 24(S),25- Epoxycholesterol sowie das endogene 27-Hydroxycholesterol, das unter anderem in cholesterinbeladenen humanen Makrophagen vorkommt, identifiziert[43].

Ein direktes Zielgen von LXR ist CYP7A1, welches die Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren katalysiert[47]. Zusätzlich greift LXR in die Fettsäurebiosynthese und damit regulierend in die Veresterung und Speicherung von Cholesterin ein. Hohe Cholesterinspiegel führen, vermittelt über LXR, zu einer erhöhten Transkription von

SREBPs1c (sterol regulatory element-binding protein 1c)[48] und damit zu einer vermehrten Expression von Enzymen der Fettsäurebiosynthese, wodurch mehr Phospholipide für den Lipoproteintransport des überschüssigen Cholesterins zur Verfügung stehen. Durch die LXR-gesteuerte Induktion verschiedener ABC-Transporter, besonders ABCA1 und ABCG1 in Makrophagen und zusätzlich ABCG5 und ABCG8 im Dünndarm, wird eine Überakkumulation von Cholesterin und Pflanzensterolen verhindert[49,50].

Zu einer starken Expressionssteigerung von ABCA1 und damit zu einem erhöhtem zellulären Lipidefflux, führt insbesondere eine oxysterolabhängige Regulation (vor allem durch 27-OH-Cholesterin). Sie wird durch die nukleären Hormonrezeptoren Liver X receptor (LXR) und Retinoid X receptor (RXR), die als Heterodimer an ein DR4- Element des ABCA1-Promotor binden[24,25], vermittelt. Diese durch LXR vermittelte Induktion kann auch indirekt über Peroxisome proliferator-activated receptor α oder γ (PPAR α oder γ) und weitere nukleäre Hormonrezeptoren erfolgen. So führen PPAR α - und PPAR γ -Agonisten zu einer Expressionssteigerung von LXR α , worauf wiederum eine Induktion der Transkription von ABCA1 erfolgt, wie Chinetti et al.[26] zeigen konnten.

Die Bindung von Sp1/Sp3 an GC-Boxen sowie die Bindung von Hepatic nuclear factor 1 (HNF1) bzw. Upstream factor 1/2 (USF1/2) an eine E-Box innerhalb des ABCA1 Promotors werden von Cholesterin und/oder cAMP gefördert; daraus resultiert eine starke Induktion des ABCA1-Gens[32].

ABCG1 wird wie ABCA1 durch LXR/RXR-Liganden reguliert. Es konnten verschiedene alternative ABCG1-Promotoren, die putative Bindestellen für das Heterodimer LXR/RXR und für SP-1 aufweisen, identifiziert werden[56]. Auch ABCG5/8 werden als direkte Zielgene des LXRs gesehen[27].

Ähnlich wie ABCA1 und ABCG1 wird Apolipoprotein E durch Oxysterole via LXR in Makrophagen induziert[61], in Hepatozyten wird ApoE durch FXR induziert[62]. Als weiteres regulatorisches Element wurde im proximalen ApoE-Promotor Upstream stimulatory factor (USF) 1 identifiziert[63], der an eine E-Box bindet.

Farnesoid X Rezeptor (**FXR**) bildet ebenfalls obligate Heterodimere mit RXR und bindet an IR1-Elemente[44]. FXR reguliert die Gallensäurebiosynthese. Ein erhöhter Gallensäure-Pool führt dabei zu einer Repression von CYP7A1[47], das durch Induktion durch FXR und dem gallensäureabhängig exprimierten SHP (small heterodimer partner), einem Zielgen des FXR[52], vermittelt wird. Teil des CYP7A1-Promoter ist eine LRH1(liver receptor homologue-1)-Bindungsstelle, die für die leberspezifische Expression verantwortlich ist[51]. SHP bildet mit LRH-1 ein inaktivierendes Heterodimer, das wiederum Zielgene von LRH-1, wie SHP und CYP7A1 inhibiert[52] und damit eine verminderte Bildung von Gallensäuren bedingt. Ein weiterer nukleärer Rezeptor ist der bereits erwähnte Small Heterodimer Partner (**SHP**), der mit verschiedenen Partnern heterodimerisieren kann. Es handelt sich um einen atypischen nukleären Rezeptor, der zwar über eine Liganden-, aber keine DNA-Bindungsstelle verfügt[46].

Ein weiterer Vertreter ist Liver-Receptor-Homolog-1 (**LRH-1**), zu dessen Zielgenen SHP und CYP7A1[45] zählen.

Die Peroxisome Proliferator-activated Receptors (**PPARs**), bestehen aus den Isoformen PPAR α , PPAR γ und PPAR δ , bilden ebenfalls Heterodimere mit RXR und binden an DR1-Elemente. Sind keine Liganden vorhanden, so rekrutieren die PPAR/RXR-Heterodimere Co-Repressoren und assoziierte Histon-Deacetylasen, die zu einer aktiven Repression führen[66-68]. Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung des PPAR/RXR-Komplexes, im Austausch gegen Repressoren werden Koaktivatoren freigesetzt, die wiederum zu einer erhöhten Genexpression führt[69]. PPAR α wird vor allem in Endothelzellen, Makrophagen sowie glatten Muskelzellen exprimiert[53]. Unter anderem aktiviert PPAR α die Transkription von Fettsäuretransportproteinen in der Leber[54]. Auch wurde gezeigt, dass PPAR α zu einer Expressionsinduktion von LXRA führt, die wiederum- wie bereits beschrieben- die Expression von ABCA1 steigert[26].

PPAR γ wird vor allem im Fettgewebe und in geringerem Ausmaß auch in Makrophagen, in Muskeln und in der Leber exprimiert. Es kann durch eine Vielzahl natürlich auftretender Fettsäuremetaboliten aktiviert werden[64] und erlangte Bedeutung als molekulares Ziel einiger insulinsensitivierenden, antidiabetischen Medikamente wie den Thiazoliden [70,71].

PPAR δ wird nahezu ubiquitär exprimiert[72]. Mögliche Liganden sind verschiedene 14- bis 18-Carbon gesättigte Fettsäuren[73], Eicosanoide wie Prostaglandin A1 oder Carboprostacyclin[74] oder VLDL-Cholesterinpartikel-Derivate wie bestimmte Fettsäuren[75]. Seine Rolle im Lipoproteinstoffwechsel konnte hier auch am Beispiel von insulinresistenten, adipösen Rhesusaffen, die medikamentös mit dem selektiven PPAR δ -Agonisten GW501516 behandelt wurden, untersucht werden. Unter dieser Therapie kam es zu einem Anstieg des HDL-Cholesterins um 79%, einem Abfall der Triglyzeride um 56% und des LDL-Cholesterins um 29%[76]. Die Zunahme des HDL-Cholesterins äußerte sich nicht durch eine Größenzunahme der einzelnen Partikel, sondern in einer Vermehrung der Gesamt-HDL-Cholesterinpartikel sowie der HDL-Cholesterin-assoziierten Apolipoproteine ApoAI, ApoAII und ApoCIII[76]. Der genaue Wirkmechanismus konnte bisher nicht geklärt werden, beobachtet werden konnte jedoch eine Erhöhung von ABCA1 in Darmzellen und Fibroblasten unter einer Behandlung mit PPAR δ -Agonisten[76]. Für die Wirkung von PPAR δ im Fettgewebe konnte mit Hilfe eines transgenen VP16- PPAR δ -Mausmodells gezeigt werden, dass PPAR δ -Agonisten vor Adipositas schützen, die intrazelluläre Triglyzeridakkumulation im braunen Fettgewebe senken, zirkulierende freie Fettsäuren reduzieren und damit vor Hypertriglyzeridämie schützen können[77]. Eine bisher fragliche Rolle spielt PPAR δ in der Cholesterin-Homöostase im Makrophagen. In der humanen Makrophagenzelllinie THP-1 konnte nach einer GW501516-Applikation eine Erhöhung der Expression von ABCA1 und eine Verdoppelung des Apolipoprotein AI-spezifischen Cholesterinefflux [76] gezeigt werden. Andererseits liefern Vosper et al. Hinweise dafür, dass PPAR δ -Agonisten eine Lipidakkumulation in humanen Makrophagen bei oxLDL-Cholesterinexposition bzw. in THP-1 bei Serum-Exposition fördern[78]. Damit wird zwar der Apolipoprotein AI-vermittelte Cholesterinefflux erhöht, der Gesamtefflux aber erniedrigt[78]. Zusätzlich zu oben genannten Veränderungen kommt es zu einer Expressionssteigerung von CD36 und ABCA1 [78] sowie zu einer Repression von Apolipoprotein E [78]. Eine Übersicht der organspezifischen Wirkungen zeigt Abbildung 3.

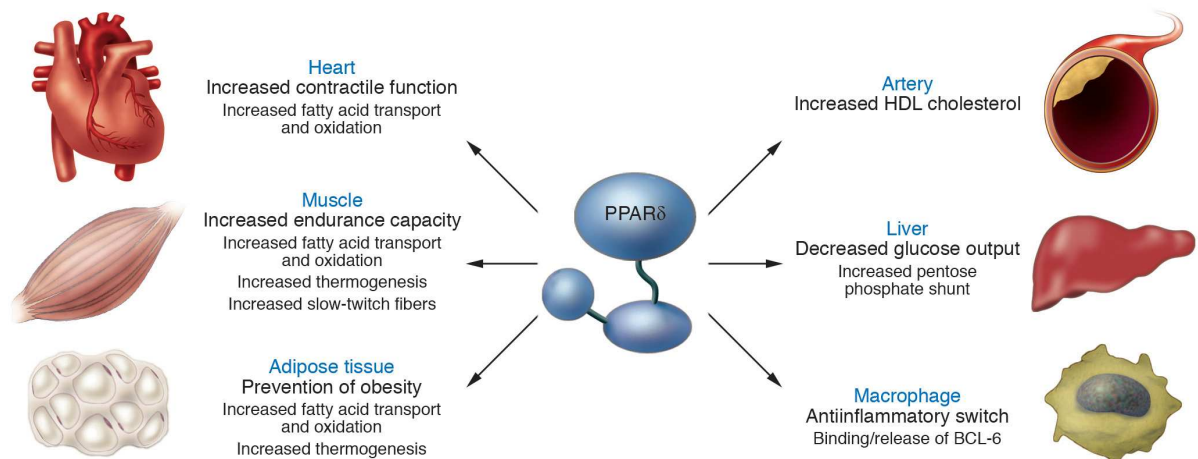


Abb.3: Verschiedene spezifische Effekte durch die PPAR delta-Aktivierung. Im Skelettmuskel reguliert PPAR den Fettsäuretransport und deren Oxidation sowie die Thermogenese. Ebenso soll es im Fettgewebe den Fettsäuretransport und deren Transport aktivieren und damit zu einer verlangsamten Gewichtszunahme führen. PPAR reguliert die Verfügbarkeit des BCL-6, einem Inflammatory-suppressor-protein, das durch eine Ligandenbindung an PPAR freigesetzt wird und der makrophagenvermittelte Atherogenese entgegenwirken kann. In der Leber unterdrückt PPAR die Glukoseproduktion. Über bisher unklare Mechanismen verbessert PPAR die atherogenetische Dyslipidämie durch Anheben des Serum HDL-Cholesterins.[84]

1.2.4.2 ZNF202 als transkriptioneller Repressor

ZNF 202, das auf dem Chromosom 11q23 lokalisiert ist, ist ein transkriptioneller Repressor. Putative ZNF202-Bindungsstellen finden sich in zahlreichen Genen, die mit dem Lipidmetabolismus assoziiert sind. Weitere Hinweise für eine funktionelle Verbindung zwischen ZNF202 und einer Hypoalphalipoproteinämie ergaben sich aus einer Studie von Porsch-Özcürümez et al., die die Auswirkungen einer ZNF202-Expression auf ABCA1 und ABCG1 untersuchte. Sie konnte zeigen, dass ZNF202 an ein repetitives G_nT-Motiv innerhalb des ABCA1-Promotors (-229/-210) und des ABCG1-Promotors (-572/-552) bindet. In HepG2-Zellen wurde die Promotoraktivität von ABCA1 und ABCG1 durch eine ZNF202-Expression dosisabhängig reprimiert. Dieser transkriptionelle Effekt erfordert die Anwesenheit einer SCAN-Domäne in ZNF202 sowie die funktionelle Integrität der TATA-Box an Position -24 von ABCA1. Der Oligomerisierungszustand der SCAN-Domäne von ZNF202 beeinflusst die Fähigkeit der KAB-Domäne von ZNF202, den transkriptionellen Korepressor KAP1 zu rekrutieren.

Eine Überexpression von ZNF202m1 in RAW264.7 Makrophagen verhinderte eine Induktion der ABCA1-Genexpression durch 20(S)-OH-Cholesterin und 9-cis-Retinsäure. Schließlich war der HDL- und ApoA1-medierte Lipidefflux in diesen Zellen signifikant verringert[42].

1.3 ZNF202

ZNF202 wurde aufgrund seiner hohen mRNA Expression im Hoden ursprünglich als Testis-spezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben[1]. Inzwischen ist bekannt, dass ZNF202 auch in zahlreichen weiteren Geweben, unter anderem in Leber, Darm, Niere, Herzmuskel und Leukozyten, insbesondere in Makrophagen, exprimiert wird[6]. (Abbildung 4)

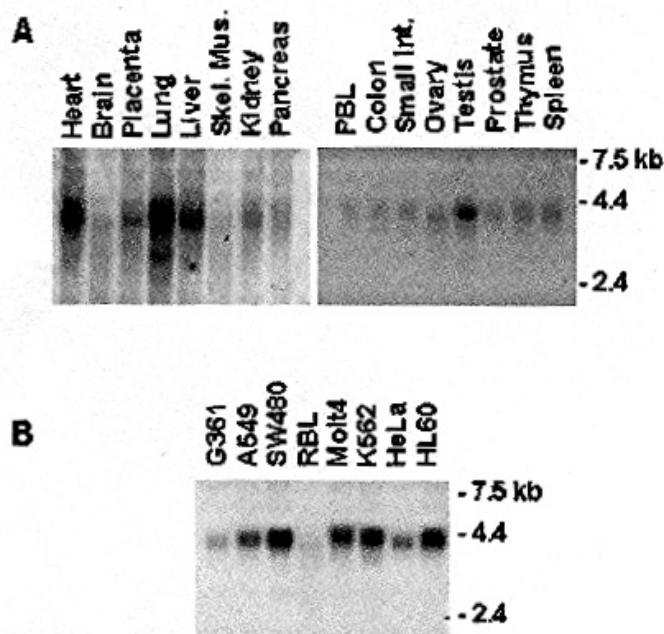


Abb.4: Expressionsmuster von ZNF202.

A) zeigt einen mit ZNF202-DNS bestückten multi-tissue Northern Blot. Die Membranen wurden von CLONTECH bezogen und mit cDNA-Proben hybridisiert, die die Nukleotide 219-969 von ZNF202 enthielten. Molekulare Größenmarker werden in Kilobasen angegeben. Die unterschiedliche Expressionsverteilung in den Geweben ist deutlich sichtbar.

B) Blot mit verschiedenen Tumorzellenlinien.(PBL- peripheral blood leukocytes) [2].

1.3.1. Struktur

Das ZNF202- Gen besteht aus 10 Exons, die für eine 4kb mRNA codieren (Abbildung 5). Bislang sind zwei Isoformen dieses Gens, bezeichnet mit ZNF202m1 und ZNF202m3, bekannt, die durch alternatives Splicing zwischen Exon 5 und 6 entstehen[1;2]. Die vollständige ZNF202m1-Isoform besteht aus einem 648 Aminosäuren langen Protein. Dieses besteht aus einer N-terminal lokalisierten SCAN- Domäne, einer Krüppel-assoziierten Box (KRAB) und acht C-terminalen Cys2-His2-Zinkfingern. Die ZNF202m3-Isoform ist im Gegensatz dazu ein 142 Aminosäuren langes Protein, das allein aus einer SCAN-Domäne besteht[2].

Die KRAB- Domäne, die sich in circa einem Drittel der bekannten Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren findet, vermittelt die transkriptionelle Repression. Diese Domäne besteht wahrscheinlich aus 75 Aminosäuren (AS) einschließlich zwei amphipatischen α -helicalen Anteilen[3], wovon für eine suffiziente Repression ein 45 AS-Segment erforderlich ist, das in einer der Helices beinhaltet ist. Die Blockade der Transkription wird durch die Rekrutierung des universellen Korepressor KRAB-associated protein 1 (KAP1), der über seine RING- B box-coiled coil Domäne an die KRAB- Domäne bindet, herbeigeführt. KAP1 wiederum rekrutiert non-histon Chromatinproteine der Heterochromatin- Proteinfamilie 1[5] und verhindert somit die Promotoraktivierung und die Transkription.

Die acht konsekutiven Cys2- His2-Zinkfinger-Motive schließlich ermöglichen die spezifische Bindung von ZNF202 an Promotorsequenzen. Die Konsensusbindungssequenz für ZNF202 besteht aus einem GnT (5' - GGGGT- 3') Motiv, das sich in den Promotoren einer Vielzahl von Genen findet, die im HDL-Cholesterin- und Triglyzeridmetabolismus eine entscheidende Rolle spielen[2].

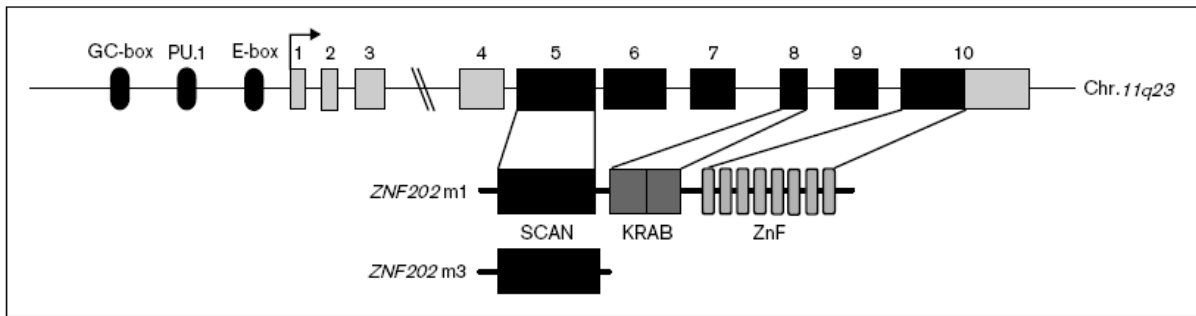


Abb.5: Struktur des ZNF202-Gens auf dem Chromosom 11q23; ZNF202 besteht aus 10 Exons. Die 5' Promotorregion enthält eine GC-Box, eine PU.1-Bindungsstelle und eine E-Box(1-3) . Durch alternatives Spleißen entstehen die beiden Isoformen ZNF202m1 und ZNF202m3. Bei ZNF202m1 handelt es sich um die vollständige Form, bestehend aus SCAN, KRAB und ZNF-Domäne, während die Isoform ZNF202m3 von oben genannten Komponenten nur die SCAN-Domäne enthält. Nach [57].

1.3.2 Regulation der Expression von ZNF202

ZNF202 ist nicht nur im Hoden hoch exprimiert, sondern spielt auch in vielen anderen Geweben und Prozessen, unter anderem auch in der Makrophagendifferenzierung und Schaumzellentstehung eine wesentliche Rolle. Besonders die inverse Regulation von ZNF202 zu seinen Targets ApoE und ABCA1 spielt bei der Atherogenese eine wichtige Rolle. Bei diesem Vorgang erfolgt eine Induktion der beiden Zielgene, die von einer simultanen Herabregulation der mRNA beider ZNF202 – Isoformen begleitet wird. Andererseits führt eine Entladung der Schaumzellen mit HDL₃-Cholesterin zu einer Hochregulation der ZNF202-mRNA. Des Weiteren zeigen Reporter-gen-Assays in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 eine höchst aktive ZNF202-Promotorregion, die während der Makrophagendifferenzierung an Aktivität verliert. Sowohl eine GC-Box, als auch ein Ets- Motiv mit PU.1- Bindung konnten als elementare Regulatoren identifiziert werden[8].

1.3.3 *Modulation der ZNF202 Funktion durch Protein-Protein Interaktion*

Abgesehen von der Kontrolle von ZNF202 über seine Genexpression kann eine Funktionsmodulation auch über eine Interaktion mit weiteren SCAN-Domänen-Proteinen erfolgen. ZNF191, SDP1 und auch die ZNF202 m3-Isoform wurden in Yeast-two-Studien als interagierende Proteine identifiziert[4].

Von oben genannten identifizierten Proteinen, scheint besonders SDP1 eine wichtige Rolle zu spielen. So kann SDP1 über eine Interaktion mit der ZNF202 SCAN-Domäne die Bindung des universellen Korepressors Krüppel-associated protein (KAP1) an ZNF202 verhindern. Da eine Kopplung dieser beiden Komponenten für eine effektive Repression des Transkriptionskomplexes notwendig ist, kommt es somit zur Aufhebung der Hemmung durch ZNF202[6]. SDP1, das eine hohe Homologie der Aminosäuresequenz zum PPAR-gamma-Coaktivator 2 (PGC-2) besitzt[65], führt analog zum murinen PGC-2 zu einer Induktion von PPAR γ und damit zu einer sterolabhängigen Regulation. Diese wird durch die nukleären Hormonrezeptoren LXR und RXR vermittelt, die als Heterodimer an ein DR4-Element des ABCA1-Promotors binden[24,25]. So führen PPAR α und PPAR γ Agonisten zu einer Expressionssteigerung von LXR α , worauf wiederum eine Induktion der Transkription von ABCA1 erfolgt[26].

Auch in anderen Cys2-His2-Zinkfinger- Transkriptionsfaktoren, wie ZNF191, und dem SCAN domain protein 1 (SDP-1), wurden N-terminal gelegene SCAN-Domänen identifiziert[3]. Eine Modulation sowohl der DNA- Bindungsfähigkeit, als auch der transkriptionellen Aktivität solcher SCAN- Domänen-Transkriptionsfaktoren kann durch eine, wie Yeast-two-Hybrid Studien zeigen, selektive Assoziation der SCAN-Domänen miteinander erreicht werden[4]. Abbildung 6 gibt eine Übersicht über die Proteininteraktionen.

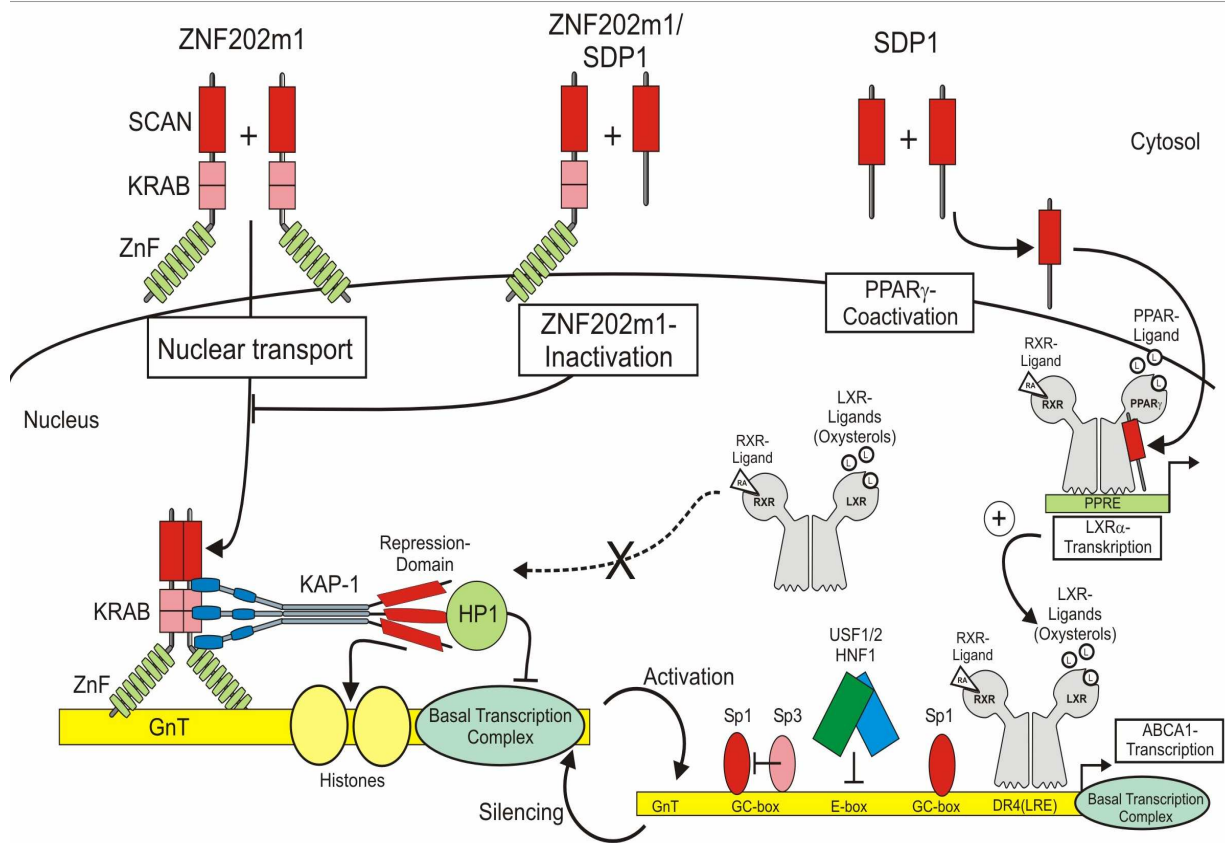


Abb.6: ZNF202 Protein/Protein-Interaktion: ZNF202-Homodimere treten in den Nucleus und initiieren die Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein-1 (KAP-1) medierte transkriptionelle Repression, die sogar die LXR medierte Geninduktion aufhebt. Im Gegensatz dazu, inhibiert das SCAN domain protein 1 (SDP1) die repressive Aktivität des ZNF202 und transaktiviert die ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-Genexpression via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)γ Aktivierung und im Gegenzug die Induktion der LXR-Expression. ZnF= Zinkfinger; RXR, Retinoid X receptor. Gerd Schmitz, Susanne Heimerl and Thomas Langmann; Curr. Opin Lipidol 2004; 15,199–208[57].

1.3.4 ZNF202-Zielgene

Neben den bereits gut charakterisierten ZNF202 Zielgenen ABCA1 und ABCG1 konnten Wagner et al. in einem bioinformatischen Ansatz bereits ein Reihe putativer ZNF202 Zielgene ermitteln. Darüber hinaus konnten sie für einige der ermittelten ZNF202-Zielgene- überwiegend Gene, die in den Lipidstoffwechsel eingreifen- eine experimentelle Promotorbindung und Repression durch ZNF202 zeigen[2,6]. Dazu charakterisierten sie zunächst die biochemische Funktion von ZNF202 und konnten anschließend die transkriptionelle Repression durch Bindung an ein GnT-Motiv in der regulatorischen Region vieler Gene zeigen.

Die ermittelten Gene lassen sich in drei Klassen aufteilen. Der ersten Gruppe wurden Gene zugerechnet, die für strukturelle Komponenten von Lipoproteinpartikeln kodieren: ApoAIV, ApoCIII und ApoE. Das ApoAII/IV/V/CIII Gencluster befindet sich wie ZNF 202 auf Chromosom 11 (11q23-q24).

Jedes dieser Gene wird über spezifische Transkriptionsfaktoren gesteuert[57-59]. Die distale Regulierungsregion des Apolipoprotein CIII funktioniert als gemeinsamer Enhancer für das gesamte Gencluster[58]. G_nT-Motive innerhalb der Apolipoprotein AIV-Promotorregion und im Enhancer des Apolipoproteins CIII[2] fungieren als ZNF202 Bindungsstellen. *In-vitro* konnte eine Bindung an beide Promotoren und auch die transkriptionelle Repression bestätigt werden[2,6]. Der Apolipoprotein AIV-Promoter und der Apolipoprotein CIII-Enhancer werden durch hepatic nuclear factor (HNF)-4, ein weiteres ZNF202-Zielgen, induziert, zusätzlich bindet der Apolipoprotein CIII-Enhancer Sp-1 und RAR (retinoid acid receptor)/RXR-Heterodimere[58].

Die zweite Gruppe umfasst Enzyme, die in die Lipidverwertung involviert sind: Lipoproteinlipase (LPL), Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und die hepatische Triglyzeridlipase. Die Mitglieder dieser ersten zwei Gruppen sind für die Aufrechterhaltung der Lipid- und Cholesterinhomöostase unerlässlich. Zur dritten Gruppe wurden Gene gezählt, von denen bereits vermutet wurde, dass sie eine wichtige Rolle in metabolischen Prozessen spielen: HNF4, Insulinoma-associated gene 1 (IA1), β -3 adrenergic receptor(AGR3b) und vascular endothelial growth factor (VEGFA)[2].

1.4 Fragestellung

In dieser Studie sollten die bereits bekannten *in-vitro* Daten über die Rolle von ZNF202 als potentiellem Schlüsselrepressor im Lipidstoffwechsel *in-vivo* in einem Knockout-Mausmodell verifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsanordnung

Der Versuch erfolgte an ZNF202 defizienten Mäusen auf einem C57/BL6Ntac-Hintergrund, die in Kooperation mit Christoph Schumacher (Norvartis Pharmaceuticals) und dem Institut für Klinischen Chemie der Universitätsklinik Regensburg durch Rückzucht generiert wurden. Die Genotypisierung dieser Mäuse erfolgte mittels genomischer PCR. Die Tiere wurden im angegliederten Tierstall gehalten und entsprechende Nullmutanten, Wildtypen und Heterozygote bezüglich Alter und Geschlecht aus der Zucht ausgewählt.

Die Versuchsanordnung bestand aus insgesamt sechs Gruppen von Geschwistertieren (Tabelle1). Die Knockout-Gruppen wurden in männlich und weiblich aufgeteilt. Diesen standen entsprechende Gruppen von Wildtyp- bzw. heterozygoten Mäusen gegenüber. Die Gruppenstärke betrug 5 bis 7 Mäuse. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet und mit einer Chow diet mit 1% Fettanteil gefüttert. Nach Ablauf der sechs Monate wurden die Tiere nach retrobulbärer Blutentnahme in Isoflurannarkose getötet und die Organe entnommen.

Gruppe	Geschlecht	Anzahl
ZNF202 -/-	Weiblich	5
	Männlich	5
Wildtyp	Weiblich	7
	Männlich	5
Heterozygot	Weiblich	6
	Männlich	7

Tabelle1: Tabelle zur Gruppeneinteilung der Mäuse während des Versuchs.

2.2. RNA – Präparation

2.2.1. *Probengewinnung und Asservierung*

Nach sechs Monaten wurden die Tiere zunächst für circa 3 Stunden nüchtern gelassen, dann erfolgte in Isofluranbetäubung eine retrobulbäre Blutentnahme. Folgende Gewebe wurden entnommen: Herz, Skelettmuskel, Fettgewebe, Leber, Gallenblase, Pankreas, Ösophagus, Milz, Nieren, Nebennieren, Magen, Duodenum, Jejunum, terminales Ileum, Colon ascendens, Colon descendens, Caecum, Gehirn und zusätzlich bei den weiblichen Mäusen Ovarien und Uterus sowie bei den Männchen Hoden, Nebenhoden und Samenblasendrüse.

Die Gewebe wurden unverzüglich in 4ml *RNA/later* (Quiagen GmbH, Deutschland) überführt. Dieses Reagenz durchdringt sehr rasch das Gewebe, schützt die Probe vor spezifischer und unspezifischer RNA-Degradierung und stabilisiert das ursprüngliche Genexpressionsmuster, indem es die Induktion weiterer Transkription weitgehend verhindert. Um eine verlässliche Genexpressionsanalyse zu ermöglichen, ist die sofortige Einbettung in das Reagenz sowie eine Schichtdicke von höchstens 0,5cm nötig[17]. Die so geschützten Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2 *Homogenisierung des Gewebes*

Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und bis zu ihrer Verarbeitung auf Eis gelagert. Von dem in *RNA/later* (Quiagen) gelagerten Gewebe wurden, mit Hilfe eines sterilen Einmalskalpells, vergleichbare Gewebemengen von den einzelnen Proben abgetrennt. Diese wurden mit möglichst wenig anhaftender Flüssigkeit in ein nukleasefreies Eppendorf-Cup überführt und das Gewicht mittels einer Waage (Sartorius) ermittelt, wobei das jeweilige Leergewicht des Cups abgezogen wurde.

Für die Proben aus Mäuseleber wurde ein eingesetztes Zielgewicht von etwa 130 mg festgesetzt. Für Colon ascendens betrug das durchschnittliche Gewicht 46 mg, für Colon descendens 25 mg und für Ileum 55mg.

Nach dem Wiegen erfolgt die Homogenisierung des Gewebestückes; hier kamen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz.

Zunächst wurde mit einem Homogenisator (ULTRA Turrox T8) gearbeitet. Bei dieser Technik kommt es durch eine Kombination aus turbulenter Strömung und mechanischer Scherkraft zugleich zum Aufbrechen der Zellen mit Freisetzung der enthaltenen RNA und einer Homogenisierung des Zelllysates. Dazu wurden die gewogenen Proben in ein nucleasefreies 15ml Tube mit 4ml β - Mercaptoethanol und RLT-Puffer (Quiagen) gegeben. Das Gerät, besonders der Zerkleinerungsmechanismus, wurde gründlich mit RNase ZAP (Ambion) gereinigt und anschließend zweimal mit 2-Propanol nachgespült. Dieser Reinigungsschritt erfolgte nach jeder Probe.

Mit der ersten Geschwindigkeitsstufe wurde das Gewebe grob zerkleinert, danach wurde auf höchster Stufe in 5-10 min ein klares Homogenisat erzeugt. Dieses wurde mit einer 22 G Einmalnadel und einer 5ml Einmalspritze durch kräftiges Aufziehen und Ausstoßen nochmals homogenisiert, um die hochmolekulare DNA sowie andere Komponenten zu zerbrechen und später eine optimale Bindung der RNA an die Gelmembran zu ermöglichen[7]. Dieser Vorgang wurde zwanzig Mal wiederholt.

Die zweite Methode bestand aus der Zerkleinerung mit Mörser und Pistill. Auch hier wurden die Gerätschaften mit RNase ZAP und zweimal mit 2-Propanol gereinigt bevor sie zur Anwendung kamen. Dieser Schritt wurde vor Verarbeitung der nächsten Probe jeweils wiederholt.

Hierbei wurde das jeweilige Gewebestück, mit flüssigem Stickstoff übergossen und in gefrorenem Zustand mit dem Pistill zerkleinert. Durch das zwei- bis dreimalige Wiederholen dieses Vorgangs wurde eine Pulverisierung der Probe erzielt. Im Folgenden wurde diese mittels eines sterilen Skalpell in einem 15ml Tube mit RLT-Puffer/ β - Mercaptoethanol unter Verwendung eines Vortex (Heidolph REAX 2000) gelöst.

Da bisher nur ein Aufbrechen der Zellen erreicht wurde, erfolgte die Homogenisierung des Lysats analog zum oben beschriebenen Prozedere mit Kanüle und Spritze.

Im Verlauf des Versuches kamen beide Verfahren zum Einsatz, wobei sich das Verfahren mit Mörser und Pistill als geeigneter erwies. Mit dieser Methode konnte sowohl eine bessere Isolierung der RNA als auch eine höhere Qualität des Isolats erreicht werden. Aus diesem Grund wurde mit dem Rest der Proben derart verfahren.

2.2.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte aus lysiertem und homogenisiertem Gewebe mittels RNeasy Midi – Kits (Quiagen GmbH, Hilden).

Das Prinzip dieses Systems basiert zum einen auf der selektiven KVA-Bindungsfähigkeit einer auf Silikatgel-basierender Membran und zum anderen auf einer Zentrifugationskomponente. Durch diese Methode, bei der ein Ausschluss von RNA-Anteilen unter 200 Nukleotiden wie tRNA und rRNA erfolgt, wird die Anreicherung der mRNA gewährleistet.

In einem ersten Schritt werden die Proben in Gegenwart eines denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-Puffers, der durch eine umgehende Inaktivierung den Schutz der RNA bedingt, lysiert und homogenisiert.

Danach wird Ethanol, der die nötigen Bindungsbedingungen schafft, zugegeben und die Probe auf die RNeasy- Säule übertragen.

Dort bindet die komplette RNA an die Membran während Verunreinigungen durch die Waschschriffe entfernt werden. Mit reinem RNase-freiem Wasser wird die RNA in einem letzten Zentrifugationsschritt eluiert.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 22°C und 4000 rpm. Die anderen Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem mit RNase –ZAP und 2-Propanol gereinigten Arbeitsplatz, mit nucleasefreien Arbeitsmaterialien sowie Handschuhen ausgeführt, um die Probe vor Degradierung durch RNAsen zu schützen.

Die Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers Quiagen [7].

Die homogenisierte Probe wurde mit 4,0ml 70%igen Ethanol versetzt und durch kräftiges Schütteln gemischt. 4,0ml der Probe wurden auf eine Säule übertragen, welche in ein 15ml Tube gesetzt und bei 4000 x rpm 7 min in einer Zentrifuge abzentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde bis zur vollständigen Verwertung der Probe wiederholt.

Der erste Waschschrift erfolgte mit 4,0ml RW1-Puffer und wurde bei 4000 x rpm für 5min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen.

Im Weiteren folgten nun die Waschschriffe mit 2,5ml RPE-Puffer. Zunächst wurde der Puffer aufgebracht und die Probe 3min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde erneut verworfen. Dann wurden erneut 2,5ml RPE aufgebracht und für 7 min zentrifugiert, um die Membran zu trocknen und sicherzustellen, dass kein Ethanol in die Probe verschleppt wurde und mit nachfolgenden Reaktionen interagieren konnte.

Zur Eluierung der RNA wurde die Säule in ein neues 15ml Tube übertragen.

200 µl RNA-freies Wasser wurden direkt auf die Membran pipettiert und nach 1min für 3min zentrifugiert. Um die RNA-Konzentration im Durchfluss zu erhöhen, wurde dieser Vorgang wiederholt.

Die Säule wurde verworfen und die so gewonnene RNA in RNase-freie Eppendorf-Cups überführt und bei -80°C gelagert.

2.2.4 Qualitätsprüfung und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA-Proben erfolgte mit RNA 6000 Nano Assays (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn).

Basierend auf einer Elektrophorese erfolgt bei diesem System die Auftrennung und Analyse der Nukleinsäurefragmente nach deren Größe mit Hilfe eines RNA LapChip®, welcher mit Mikrokanälen durchsetzt ist und an den eine Spannung angelegt wird.

Zur Auswertung der Probe wurde als Maßstab ein standardisiertes Gemisch unterschiedlicher definierter Fragmentlängen (RNA 6000 ladder der Ambion Inc.) herangezogen. Das Elektropherogramm zeigt sechs Peaks, die die verschiedenen langen Stücke widerspiegeln, und einen weiteren Peak zu Beginn des Diagramms, welcher den restlichen ungebundenen Marker darstellt.

Die nötigen Schritte folgten nun dem Protokoll für RNA 6000 Nano Assay der Firma Agilent Technologies.

Alle benötigten Substanzen wurden für dreißig Minuten bei Raumtemperatur belassen, um ausreichend zu äquilibrieren.

550µl der Gelmatrix wurden auf einen Zentrifugationsfilter gegeben und zehn Minuten bei 1500 g zentrifugiert (Heraeus Biofuge 15). Das gefilterte Gel wurde zu Mengen von 32,5 µl aliquotiert.

Zu einem der Aliquots wurden 0,5 µl des gevortexten und vor Licht geschützten Dye-Konzentrats pipettiert. Die beiden Komponenten wurden gründlich gevortext und anschließend für zehn Minuten bei 13000 g zentrifugiert (Heraeus Biofuge 15).

Der Gel-Dye-Mix wurde in das gekennzeichnete Well des Agilentchips gegeben, durch 30 Sekunden dauernden Druck mit der zugehörigen Priming-Station in den Mikrokanälen des Chips verteilt, je 9µl des restlichen Gemisches in die anderen vorgesehenen Wells pipettiert und der Chip beladen.

Hierzu wurden zunächst 1 µl Ladder und 5 µl Marker 2 Minuten in einem Tischheizblock bei 70°C denaturiert, um Sekundärstrukturen weitgehend zu verringern.

Anschließend wurde in alle Wells 1 µl der jeweiligen Probe sowie 5 µl des Markers eingebracht. In die nicht zur Analyse benötigten Wells wurden nur 6 µl Marker pipettiert.

Der fertige Chip wurde eine Minute bei 2400 rpm auf dem IKA-Vortex belassen, in den mit je 350 µl RNase ZAP (1min) und nucleasefreiem Wasser(10sec) gereinigten Agilent 2100 bioanalyser eingesetzt und sofort analysiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Für die Messungen wurde je eine Menge von 7 µl der RNA- Probe eingesetzt. Abhängig von der erwarteten Quantität aus der Qualitätskontrolle erfolgte eine Verdünnung (meist 1:20). Es kam eine Messküvette (Quartz Ultramicro, von Biochrom) mit 5 mm Schichtdicke zum Einsatz, welche vor Gebrauch mit 2-Propanol gereinigt und dann zweimal mit RNase-freiem Wasser gespült wurde, um eine mögliche Degradation durch RNasen zu verhindern. Die Extinktion wurde bei 260 nm, 280nm und 320nm, ermittelt. Der 260 nm-Wert gibt eine Aussage über den Gehalt an Nukleotiden, während bei 280 nm der Anteil an Proteinen in der Probe bestimmt wurde. Die 260/280 Ratio, bei der die Werte zwischen 1,5 bis 2 liegen sollten, ermöglicht eine Abschätzung der Qualität der Probe. Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen.

2.3 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde 2 µg RNA eingesetzt.

Alle benötigten Reagenzien wurden sowohl auf Eis aufgetaut als auch während der Verarbeitung darauf gelagert.

Der RT-Ansatz beinhaltet als Enzyme 1,2 µl AMV-RT und 1,0 µl RNasin, des weiteren als Zusätze 4,0 µl dNTP, 4,0 µl Puffer, 1,0 µl Randomhexamer und 8,0 µl MgCl₂. Alle Reagenzien wurden von der Firma Promega bezogen.

Der Ansatz wurde in einem Heizblock für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion 5 min bei 95°C durch Denaturierung der Enzyme gestoppt.

Die Proben wurden auf Eis abgekühlt. Die hergestellte cDNA wurde mit 160 µl nuklease-freiem Wasser auf ein Verhältnis von 1:5 verdünnt.

Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurde die cDNA bei – 20°C gelagert.

2.4 Real-time RT-PCR (TaqMan™)

Für die PCR wurden die cDNA in Mengen von 5 µl eingesetzt.

Der PCR-Ansatz setzt sich aus 10µl 2-fach TaqMan-Universal PCR- Mastermix, 1 µl 20-fach Mix Assay-on-demand (bestehend aus den jeweiligen forward und reverse-Primern und der Sonde) und 4 µl Aqua dest. zusammen. Alle notwendigen Reagenzien wurden von der Firma PE Applied Biosystems bezogen und gemäß den Herstellerinstruktionen behandelt.

Die analysierten Gene sind in unten stehender Tabelle zusammengefasst [Tabelle2].

ID-Nummer	Genbezeichnung	Abkürzung	Exonübergang
Mm00437569_m1	Apolipoprotein A-I	ApoA1	Exon 3/4
Mm00448202_m1	Phospholipid transfer protein	PLTP	Exon 8/9
Mm00442669_m1	Adrenergic receptor, beta 3	ADRB3	Exon 1/2
Mm00431814_m1	Apolipoprotein A-IV	Apo A4	Exon 2/3
Mm00433975_m1	Lipase, hepatic	LIPC	Exon 2/3
Mm00437304_m1	Vascular endothelial growth factor A	VEGFA	Exon 1/2
Mm00475480_m1	Apolipoprotein A-V	Apo A5	Exon 2/3
Mm00434764_m1	Lipoproteinlipase	LPL	Exon 2/3
Mm00801461_m1	Calbindin 2	CALB2	Exon 4/5
Mm00437571_m1	Apolipoprotein C-II	Apo C2	Exon 4/5
Mm00500505_m1	Lecithincholesterol acyltransferase	LCAT	Exon 1/2
Mm00493071_m1	Lymphocyte-activation gene 3	LAG3	Exon 3/4
Mm00445670_m1	Apolipoprotein C-III	Apo C3	Exon 3/4
Mm00839436_m1	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	PEMT	Exon 4/5
Mm00516979_m1	Early growth response 3	EGR3	Exon 1/2
Mm00545713_m1	Apolipoprotein C-IV	Apo C4	Exon 1/2
Mm00456892_m1	Proteolipid protein (myelin)	PLP	Exon 3/4
Mm00457144_m1	Zinc finger protein 36	ZFP 36	Exon 1/2
Mm00442646_m1	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1	ABCA1	Exon 30/31
Mm00801691_m1	Cellular retinoic acid binding protein II	CRABP2	Exon 1/2
Mm00437390_m1	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 1	ABCG1	Exon 1/2
Mm00433964_m1	Hepatic nuclear factor 4	HNF4	Exon 8/9
Mm00437573_m1	Apolipoprotein E	Apo E	Exon 3/4
Mm00459517_m1	Zinc finger protein 202	ZNF 202	Exon 1/2
Mm00803186_g1	Peroxisome Proliferator-activated Receptors	PPARδ	Exon 5/6 6/7
Mm00435015_m1	Microsomal triglyceride transfer protein	MTP	Exon 16/17
Mm00470430_m1	Cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1	Cyp 27a1	Exon 2/3
Mm00507250_m1	ATP-binding-cassette, subfamily G, member 4	ABCG4	Exon 9/10
Mm00443919_m1	Cyclin C	CCnC	Exon 9/10
Mm00486752_m1	Catenin alpha 1	Catna 1	Exon 10/11
Mm00515399_m1	Catenin alpha 2	Catna 2	Exon 5/6 3/4
Mm00617137_m1	Catenin alpha 3	Catna 3	Exon 14/15
Mm00483033_m1	Catenin beta	Catnb	Exon 7/8

Tabelle2: Aufstellung der analysierten Gene

Die PCR-Reaktion nutzt hierbei die 5'- Nuklease Aktivität der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, um die Sonde, welche aus Reporter Dye(FAM) am 5'-Ende und Quencher Dye (Non-flourescent quencher) am 3'-Ende besteht, während der PCR zu spalten.

Solange die Sonde intakt ist, resultiert aus der Nachbarschaft von Reporter und Quencher eine Suppression des Reportersignals. Ist in einer Probe die gesuchte Targetsequenz enthalten, so lagert sich die Sonde spezifisch zwischen den Forward- und Reward-Primer Sites an und wird, durch die nukleolytische Wirkung der 5'-3'-DNA-Polymerase, nach der Anlagerung an die Zielregion zwischen Reporter und Quencher gespalten. Nach Entfernen der Fragmente läuft die Amplifizierung des Stranges regelrecht weiter.

Durch die Wiederholung dieses Vorgangs bei jedem Zyklus, werden nur targetspezifische Fluoreszenz-Zunahmen ermittelt und unspezifische Amplifizierung weitgehend außen vor gelassen. Dies erklärt sich durch die spezifische Anlagerung der Sonde an komplementäre Strukturen des Zielstranges und einem nur durch ausreichende Amplifizierung sichtbaren Fluoreszenzanstieg.

Die PCR wurde im Sinne einer real-time PCR mit relativer Quantifizierung im ABI7700 der Firma PE Biosystems durchgeführt. Die Zyklenzahl wurde auf 45 festgesetzt.

Die Analyse erfolgte in einer 384 Well-Mikrotiterplatte, pro Well wurden 5 µl cDNA sowie 15 µl Mastermix zugegeben. Die Messungen erfolgten jeweils als Dubletten, die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und bis zur Analyse innerhalb von 12h bei 4°C und lichtgeschützt aufbewahrt.

Folgendes Protokoll wurde zur cDNA- Amplifizierung und Quantifizierung gewählt:

Nach dem Einfahren der Platte in den TaqMan, erfolgte die Erhitzung für 2min bei 50°C und 10min bei 95°C. Im weiteren Verlauf der 45 Zyklen lief eine Folge mit je 15sec bei 95°C zum Schmelzen der DNA und 1min bei 60°C zur Zweistrangsynthese und Primerbindung ab.

Die Analyse der Daten wurde mit ABI Sequence Detector Software (SDS 2.1) durchgeführt.

2.5. Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)

Für diese Form der Lipoproteintrennung wurden die Tiere der verschiedenen Gruppen zunächst über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet und einheitlich mit einer Chow diet mit 1% Fettanteil gefüttert. Nach Ablauf der sechs Monate wurde den Mäusen retrobulbär Blut zur Untersuchung mittels FPLC entnommen. Bei dieser Methode werden die im Plasma vorhandenen Lipide anhand ihrer hydrophoben Eigenschaften beim Durchlauf durch eine Säule mit einer stationären lipophilen Phase aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Messung von Cholesterin und Triglyzeriden in den einzelnen Fraktionen. Aus dem Serum der Mäuse wurden die Serumlipoproteine isoliert. Es kamen Superose 6 PC 3.2/30 Säulen aus dem Pharmacia Smart System-FPLC-Kit zum Einsatz. Die Eluierung erfolgte mit PBS (Duclobeco) gemischt mit 1mM EDTA als Puffer. Nach dem Befüllen mit 50l Serum, wurde ein konstanter Fluß von 40 l/min aufrechterhalten und nach 18 Minuten die Fraktionierung mit 40 l/min gestartet.

Die Fraktionen 1-36, welche die Serumlipoproteine enthielten, wurden zur weiteren Analyse in einem Cobas Integra 400 (Roche Diagnostic, Penzberg) herangezogen; dort wurden die Cholesterin- und Triglyzeridlevel jeder Faktion bestimmt. Zur Bestimmung des Cholesterin und der Triglyzeride wurden standardisierte enzymatische colorimetrische Verfahren eingesetzt, die auch in der Routinediagnostik (Roche Diagnostics) verwendet werden[Modifiziert nach 100].

3. Ergebnisse

3.1 Basale Genexpression in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen

3.1.1 *Basale Expression des ZNF202 in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen*

Zu Beginn der Untersuchung wurde zunächst die basale ZNF202-Expression für die beiden Isoformen ZNF202m1 und ZNF202m3 in verschiedenen Geweben von Wildtypmäusen ermittelt, um einen Überblick über die natürliche Verteilung der Expression des Repressionsfaktors ZNF202 zu erhalten.

Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Wildtyptiere aus dem Bestand ausgewählt und Gewebeproben entnommen. Die Aufbereitung der Proben folgte dem oben beschriebenen Ablauf. Zunächst erfolgte die RNA-Präparation mit Homogenisierung der Proben, Isolation der RNA, Qualitätsprüfung sowie die RNA-Konzentrationsbestimmung. Die derart gewonnene RNA wurde anschließend in cDNA überführt und die Expression der ZNF202-Isoformen in den Geweben mittels real-time PCR (TaqMan) bestimmt. Untersucht wurden Proben aus Leber, Ileum, Jejunum, Colon ascendens, Colon descendens, Hoden, Milz, Niere, Fettgewebe, Herz, Muskel und Lunge. Die Auswertung der Expressionsdaten erfolgte nach der Δ Ct-Methode. Dazu wurden mit Hilfe der ABI sequence detector Software (SDS 2.1) die Ct-Werte für die jeweilige gewebstypische Expression der ZNF202-Isoformen und für den in jedem TaqMan-Lauf mit untersuchten Housekeeper 18s rRNA (Nager), auf den die Ergebnisse normalisiert wurden, ermittelt. Als Ct (threshold cycle) bezeichnet man die Anzahl der PCR-Zyklen, bei der die gemessene Expression erstmals das Hintergrundrauschen übersteigt. Da es sich bei genannter Untersuchung um eine relative Quantifizierungsmethode handelt, wird dabei die Expression des Kalibrators gleich 1 gesetzt und alle anderen Expressionswerte auf diesen Wert bezogen. Das bedeutet, dass die Ct-Werte der gemessenen Gene und der 18S rRNA in jeder Probe zur Berechnung der Δ Ct-Werte herangezogen werden: $(Ct_{\text{vermessene Gene}} - Ct_{18s \text{ rRNA}})$.

Um die Expression von ZNF202 in den verschiedenen Geweben übersichtlicher darstellen zu können, wurden die relativen Ct-Werte in eine Punkteskala

umgewandelt. Hierfür wurde die Spannweite zwischen dem niedrigsten ΔCt -Wert und einem ΔCt -Wert von 25 linear in fünf Gruppen aufgeteilt, Gene mit ΔCt -Werten über 25 wurden als nicht exprimiert betrachtet. Dabei wurde dem am wenigsten exprimierenden Gewebe ein Punkt (●) und dem höchst exprimierenden Gewebe fünf Punkte (●●●●●) zugeordnet.

Die Punktetabelle (Tabelle3) zeigt die Expression der Isoformen ZNF202m1 und ZNF202m3 bei weiblichen und männlichen Wildtypmäusen. Weibliche und männliche Mäuse zeigten ein nahezu identisches Expressionsmuster von ZNF202 in den verschiedenen Geweben, nur vereinzelt kam es zu leichten Abweichungen, wie bei Proben aus Jejunum und Ileum. Auch die Ausprägung der Expression der beiden Isoformen des ZNF202 zeigte nur geringe Abweichungen (z.B. Jejunum, male ZNF202m1; Ileum male ZNF202m3). Eine mittlere bis hohe Expression zeigte sich für ZNF202 für beide Isoformen in Hoden, Fettgewebe und Lunge. Die geringste Expression wurde in Leber, Ileum und Jejunum gefunden.

Gewebe	Male-Wildtyp ZNF202 m1	Female-Wildtyp ZNF202 m1	Male-Wildtyp ZNF202 m3	Female-Wildtyp ZNF202 m3
Leber	●	●	●	●
Ileum	●	●	●●	●
Jejunum	●	●●	●●	●●
Colon ascendens	●●	●●	●●	●●
Colon descendens	●●	●●	●●	●●
Hoden	●●●●●		●●●●●	
Milz	●●	●●	●●	●●
Niere	●●	●●	●●	●●●
Fettgewebe	●●●	●●●	●●●	●●●
Herz	●●	●●	●●	●●
Muskel	●●	●●	●●	●●
Lunge	●●●	●●●	●●●	●●●

Tabelle 3: Punktetabelle zur Expressionsausprägung der Isoformen ZNF202m1 und ZNF202m3 bei männlichen und weiblichen Wildtypmäusen; die Kriterien der Punktevergabe entnehmen Sie bitte dem laufenden Text.

Nachdem durch diese erste Untersuchung zunächst ein Überblick über die ZNF202-Expression bei Wildtypmäusen gewonnen werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt die basale Expression verschiedener putativer ZNF202-Zielgene untersucht werden.

3.1.2. Basale Expression verschiedener putativer ZNF202- Zielgene in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen

Um einen Eindruck von der basalen Expression möglicher Zielgene des ZNF202 in verschiedenen Geweben zu gewinnen, erfolgte eine Expressionsanalyse mittels real-time PCR nach bereits oben beschriebenen Procedere. Ein besonderes Augenmerk wurde, aufgrund der Zielsetzung des Projektes, Genen geschenkt, die im Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle spielen: sei es im Transport wie zum Beispiel die Apolipoproteine, in Stoffwechselwegen wie LCAT, LPL oder PLTP, verschiedener Lipidkomponenten oder transmembranösen Systemen wie den ABC-Transportern.

Die Präparation und das weitere Procedere verlief analog dem Vorgehen in 3.1.1. Als Housekeeper kam wiederum nagerspezifische 18s rRNA zum Einsatz. Es folgte die Normalisierung auf 18s rRNA und die entsprechende Zuordnung der Punkte (●-●●●●●), abhängig vom Ct-Wert. Die Grenzen basierten auf einer linearen Verteilung zwischen dem niedrigsten Δ Ct-Wert und einem Δ Ct-Wert von 25. Genexpressionen über einem Δ Ct-Wert von 25 wurden als nicht vorhanden gewertet. Der höchsten Expression wurden fünf Punkte (●●●●●), der niedrigsten ein Punkt (●) zugewiesen. (Übersicht Tabelle 4)

In der Leber waren vor allem die Apolipoproteine, besonders ApoAIV, und einige Enzyme wie LCAT und HNF4 sowie ZNF 36 am höchsten exprimiert. Die ABC-Transporter (ABCA1, ABCG1) waren mittelstark exprimiert. Im Hoden waren die Apolipoproteine im Vergleich zur Leber deutlich geringer exprimiert waren. Die

weiteren untersuchten Gene waren sämtlich mittel bis gering exprimiert. Im Kolon zeigten sich vor allem die Apolipoproteine (ApoA1/VI, CII/III, E) sowie HNF 4 und ZFP36 hoch exprimiert. Eine geringe Expression wurde hingegen für PEMT ermittelt. Auch in der Milz waren ApoE und ZFP36 hochexprimiert, geringer war die Expression der Apolipoproteine (vor allem ApoAV) und CRABP2. Einige der untersuchten Gene wie CALB2 oder ADRB3 waren in allen Geweben nur schwach exprimiert oder nicht nachweisbar.

Gewebe		Leber	Kolon	Milz	Hoden
Gen	ABCA1	●●●	●●●	●●●	●●●
	ABCG1	●●	●●●	●●●	●●
	ADRB3	●	-	●	●
	ApoA1	●●●●●	●●●●	●●●	●●●
	ApoA4	●●●●	●●●●	●●●	●●
	ApoA5	●●●●	●●●	●●	●●
	ApoC2	●●●●	●●●●	●●●	●●
	ApoC3	●●●●	●●●●	●●●	●●
	ApoC4	●●●	●●	●●	●●
	ApoE	●●●●	●●●●	●●●●	●●●
	CALB	-	●●	●	●
	CRABP2	●	-	●	●●
	EGR3	●	●●	●●●	●●●
	HNF4	●●●●	●●●●	●●	●●
	LAG3	●●	●●●	●●●	●●
	LCAT	●●●●	●●●	●●	●●
	LIPC	●●●	●●	●●	●●
	LPL	●●●	●●●	●●●	●●●
	PEMT	●●●	●●	●●	●●●
	PLP	●	●●	●●	●●
PLTP	●●●	●●●	●●●	●●●	
VEGFA	●●●	●●●	●●●	●●●	
ZFP36	●●●●	●●●●	●●●●	●●●	

Tabelle 4: Basale Expression verschiedener putativer ZNF202- Zielgene in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen, ausgewählte Gewebe waren Leber, Kolon, Milz und Hoden.

3.2 Vergleich der Genexpression der ZNF202-Zielgene in ZNF202 Knockout-Mäusen versus Wildtypmäusen

Nachdem im ersten Abschnitt die basale Expression des ZNF202 sowie mehrerer putativer Zielgene untersucht wurde, sollte in einem weiteren Schritt die Genexpression verschiedener, ausgewählter ZNF202-Zielgene in der Leber als wesentlichem Lipidstoffwechselorgan bei ZNF202^{-/-} Mäusen und Wildtypen verglichen werden. Dazu wurden aus den bereits beschriebenen Gruppen jeweils sechs Monate alte Tiere entnommen und die Gewebe zur weiteren Verarbeitung gewonnen.

Nach entsprechender Vorbereitung der Gewebeproben wurde die mRNA-Expression der Gene mittels real-time PCR (TaqMan) vermessen und in Säulendiagrammen dargestellt. Dazu wurden die ermittelten RQ-Werte linear auf die y-Achse aufgetragen, auf die x-Achse wurden die verschiedenen Versuchstiergruppen aufgetragen. Die Wildtypmäuse wurden dabei mit +/+, die für ZNF202 heterozygoten Mäuse mit +/- und die ZNF202-Knockout-Mäuse mit -/- bezeichnet. Das Ausmaß der Expression bzw. dessen Veränderung wurde nach Geschlechtern getrennt bestimmt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Testes (SPSS12.0 Software). Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

3.2.1 Genexpression ABCA 1

Für den Cholesterintransporter ABCA1 zeigte sich im Lebergewebe der männlichen Tiere ein tendenzieller Anstieg des ABCA1 beim Vergleich der Wildtyptiere (0,89±0,20) zu den Knockout-Tieren (1,05±0,30). (Abbildung 7, blaue Säulen).

Bei den weiblichen Tieren zeigt sich ausgehend von den Wildtyptieren (0,78±0,24) über die Heterozygoten (0,87±0,20) bis hin zu den ZNF202^{-/-} Tieren (1,04±0,17) ein tendenzieller, allerdings nicht signifikanter Anstieg der ABCA1-Expressionswerte (Abbildung 7, rote Säulen).

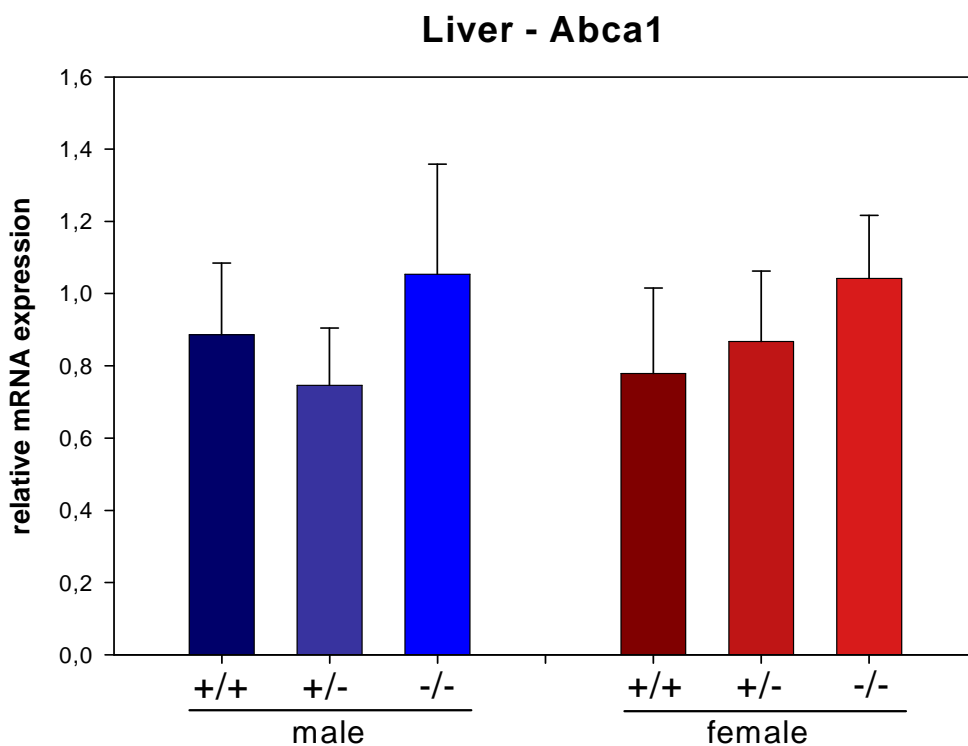


Abb. 7: Relative mRNA-Expression des ABCA1 in der Leber von männlichen und weiblichen Wildtyp-, Heterozygoten- und Knockoutmäusen, lineare Sklarierung, Angaben mit Standardabweichung..

3.2.2 Genexpression ABCG1

Die Genexpressionanalyse für ABCG1 (Abbildung 8) zeigte für die männlichen Tiere keine signifikanten Veränderungen. Für die Männchen wurden Werte von $0,91 \pm 0,14$ für Wildtyptiere, für die heterozygoten Tiere $0,78 \pm 0,20$ und für die ZNF202-defizienten Tiere $1,20 \pm 0,51$. Bei den weiblichen Tieren konnte ein tendenzieller Anstieg von $1,25 \pm 0,63$ über $1,41 \pm 0,30$ bei den heterozygoten Weibchen bis auf $1,81 \pm 0,57$ bei den ZNF202-defizienten Tieren festgestellt werden.

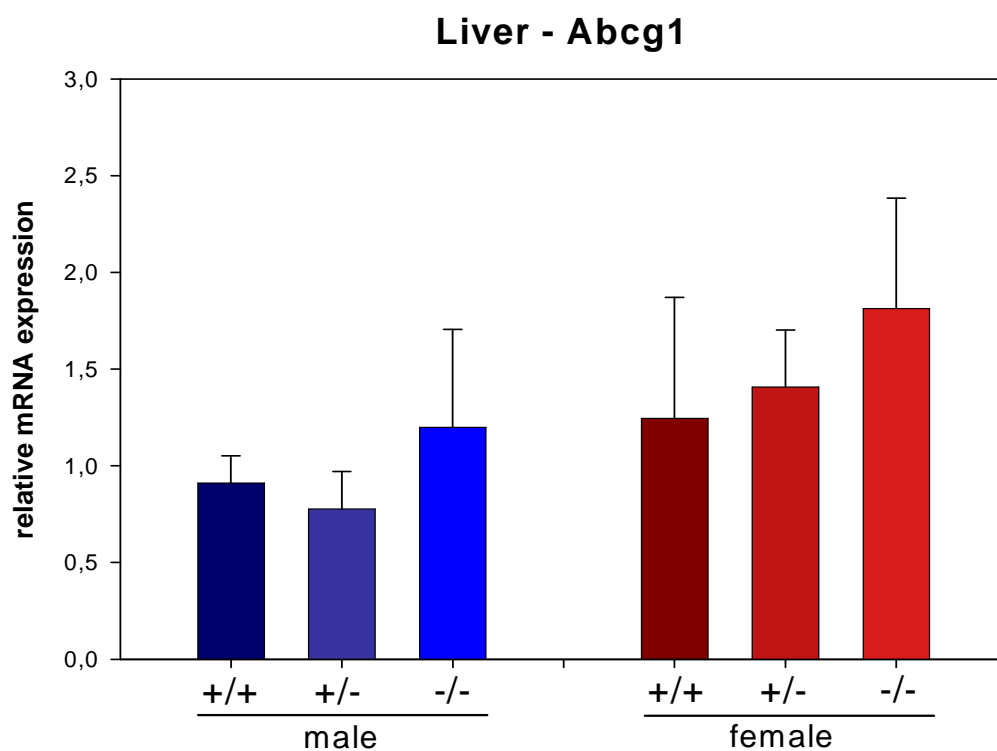


Abb. 8: Relative mRNA-Expression des ABCG1 in der Leber von männlichen und weiblichen Wildtyp-, Heterozygoten- und Knockoutmäusen, lineare Skalierung, Angabe der Standardabweichung

3.2.3 Genexpression PPAR delta

Die Analyse der Genexpression des PPAR delta zeigte bei beiden Geschlechtern keine Veränderungen. So stellten sich die RQ-Werte für die männlichen Tiere folgendermaßen dar: +/+-Tiere $1,02 \pm 0,2$, +/-Tiere $1,00 \pm 0,17$, -/-Tiere $1,05 \pm 0,41$. Bei den weiblichen Tieren wurde für die +/+Tiere eine relative mRNA-Expression von $1,12 \pm 0,76$ ermittelt, die eine große Streubreite zeigte. Die RQ-Werte für die +/-Tiere wurden mit $0,97 \pm 0,13$ und für die ZNF202-Knockout-Tiere mit $1,07 \pm 0,15$ berechnet.

3.2.4 Genexpression Apo B

Die Expressionsanalyse des Apolipoprotein B zeigte keine signifikanten Veränderungen des Expressionslevels bei den männlichen ZNF202^{-/-}-Mäusen (1,13 \pm 0,33) gegenüber den männlichen ^{+/+}-Wildtypmäusen (1,06 \pm 0,30) und den heterozygoten Mäusen (1,23 \pm 0,33). Bei den weiblichen Tiere zeigte sich ein signifikanter Anstieg (siehe Darstellung in Abbildung 9, rote Säulen) der ApoB-Expression mit $p < 0,05$ von der ^{+/+}-Wildtypgruppe (0,85 \pm 0,22) zur heterozygoten Gruppe (1,06 \pm 0,18) sowie von den ^{+/+}-Wildtyptieren zu den ZNF202^{-/-}-Knockout-Tieren mit einem RQ-Wert von 1,39 \pm 0,33.

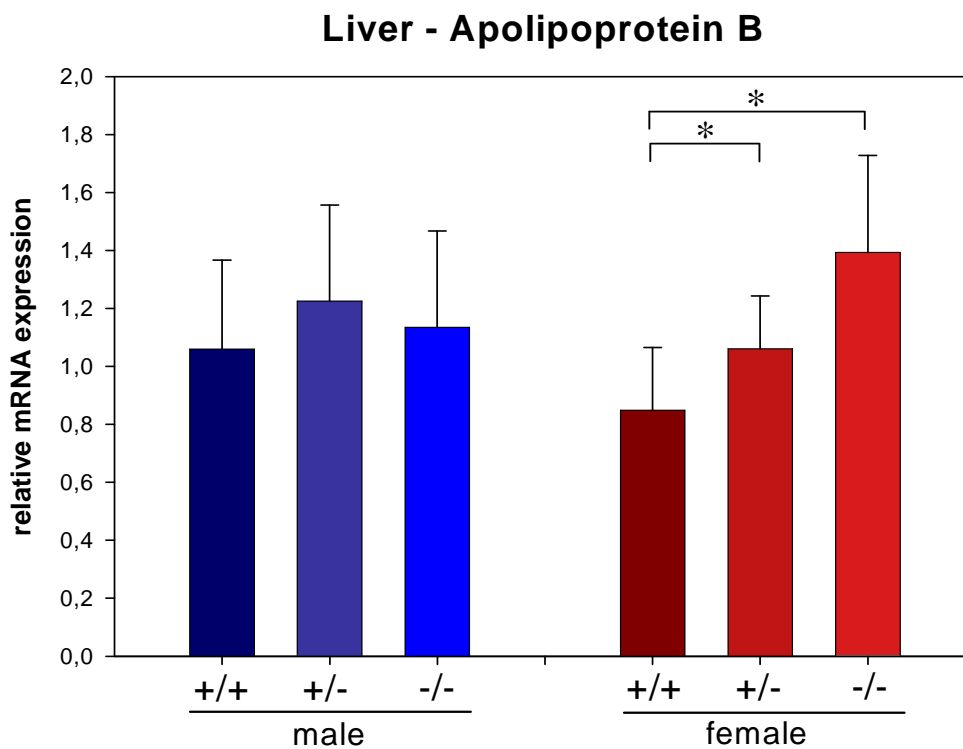


Abb.9: Relative mRNA-Expression des ApoB in der Leber von männlichen und weiblichen Wildtyp-, Heterozygoten- und Knockoutmäusen, lineare Skalierung, Angaben mit Standardabweichung

3.2.5 Genexpression MTP

Die Genexpressionsanalyse zeigte für das MTP (microsomal triglyceride transfer protein) bei den männlichen Versuchstieren keine signifikanten Veränderungen des Expressionsausmaßes: Wildtypmäuse $0,94 \pm 0,24$ gegenüber Heterozygoten $1,25 \pm 0,38$ und ZNF202-defizienten Tieren $1,07 \pm 0,23$). Bei den weiblichen Tieren konnte ausgehend von den $+/+$ -Wildtypmäusen ($1,06 \pm 0,46$) ein signifikanter Anstieg mit $p < 0,05$ hin zu den heterozygoten Tieren mit einer relativen mRNA-Expression von $1,66 \pm 0,33$ nachgewiesen werden. Die Expression der ZNF202-/- - Tiere zeigte sich mit $1,61 \pm 0,51$ auf demselben Niveau wie die Expression der heterozygoten Weibchen (Abbildung 10).

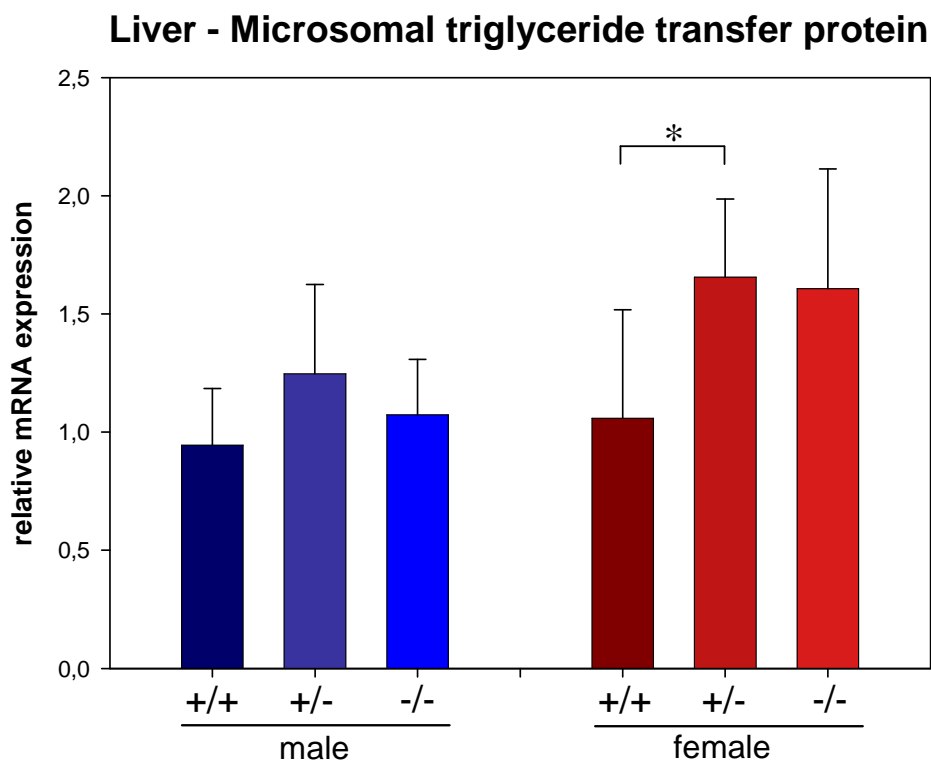


Abb.10: Relative mRNA-Expression des MTP in der Leber von männlichen und weiblichen Wildtyp-, Heterozygoten- und Knockoutmäusen, lineare Skalierung, Angabe der Standardabweichung.

3.3 Veränderungen im Lipidprofil (Serum) von ZNF202 Knockout-Mäusen versus Wildtypmäusen

Nach der Expressionsanalyse verschiedener für den Lipidstoffwechsel relevanter Gene sollten die Auswirkungen des ZNF202 auf den Cholesterinspiegel *in-vivo* untersucht werden. Mittels FPLC (fast protein liquid chromatography) wurden Cholesterin- und Triglyzeridprofile bei Wildtyp- und ZNF202^{-/-}-Mäusen sowie heterozygoten Tieren erstellt.

Bei der Darstellung der Ergebnisse wurde das Cholesterin bzw. die Triglyzeride in mg/dl auf der y-Achse gegen die FPLC-Fraktion auf der x-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. med. A. Böttcher, Institut für klinische Chemie, Universität Regensburg erstellt.

3.3.1 Analyse des Lipidprofils: Cholesterin

Abbildung 11 zeigt die FPLC-Fractionen des Cholesterins bei männlichen und weiblichen Tieren. Wie zu sehen, lag im Bereich des VLDL-Cholesterins sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen nahezu kein Unterschied zwischen den drei Untersuchungsgruppen vor. Beginnend im Bereich des IDL/LDL zeigt sich bei den männlichen Tieren betont, eine Divergenz des Cholesterinwertes zwischen Wildtyp und ZNF202-Knockouttieren. Vor allem im HDL-Cholesterinbereich zeigt sich bei den männlichen Wildtyptieren eine deutliche Erhöhung des Cholesterinspiegels; der Spiegel sinkt im Vergleich hierzu bei den ZNF202-Knockouttieren deutlich ab. Auch bei den weiblichen Tieren zeigt sich für die ZNF202-Knockouttiere der niedrigste HDL-Cholesterinspiegel, im Gegensatz dazu liegt der HDL-Cholesterinspiegel der Wildtyptiere höher.

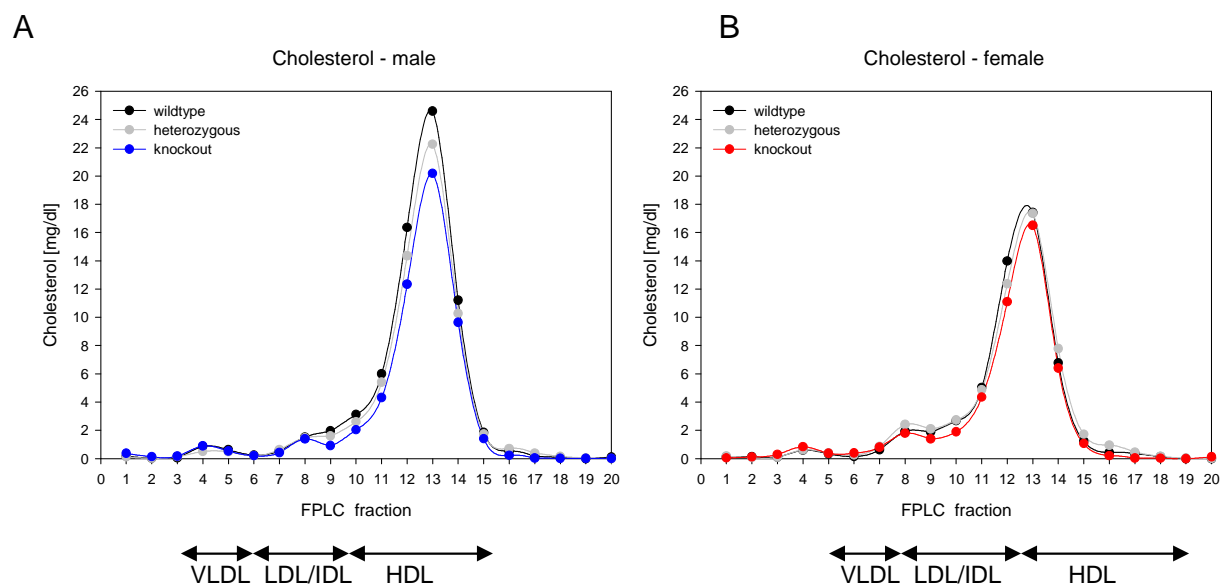


Abb.11: Bildseite A zeigt das Cholesterinprofil der FPLC-Fractionen bei männlichen Wildtyp-, Heterozygot- und ZNF202-Knockoutmäusen; Bildseite B zeigt das Cholesterinprofil der FPLC-Fractionen bei weiblichen Wildtyp-, Heterozygot- und ZNF202-Knockoutmäusen;

3.3.2 Analyse des Lipidprofils: Triglyzeride

Bei den männlichen Tieren konnte im Bereich der VLDL-Triglyzeride ein deutlicher Anstieg der ZNF202-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen verzeichnet werden (Abbildung 12A). In den Bereichen der LDL/IDL-Triglyzeride sowie der HDL-Fraktion zeigte sich kein Unterschied zwischen den drei Untersuchungsgruppen.

Auch bei den Weibchen zeigte sich im Bereich der VLDL-Fraktion für die ZNF202-Knockouttiere ein deutlich höherer Wert als für die Wildtyptiere. Angedeutet konnte im Bereich der IDL/LDL-Triglyzeride eine Erhöhung des Anteils im Gegensatz zu den beiden Vergleichsgruppen verbucht werden. Bei der HDL-Fraktion zeigte sich zwischen den Untersuchungsgruppen kein Unterschied (Abbildung 12 B).

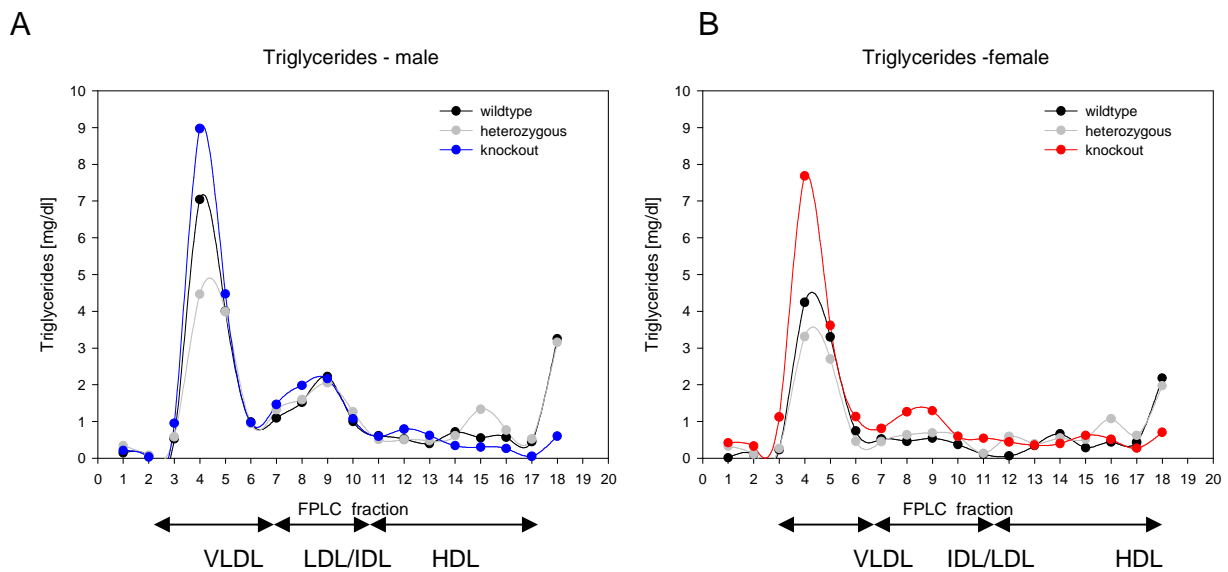


Abb. 12: Bildseite A zeigt das Triglyzeridprofil der FPLC-Fractionen bei männlichen Wildtyp-, Heterozygot- und ZNF202-Knockoutmäusen
 Bildseite B zeigt das Triglyzeridprofil der FPLC-Fractionen bei weiblichen Wildtyp-, Heterozygot- und ZNF202-Knockoutmäusen

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollten die bereits *in-vitro* erhobenen Erkenntnisse über ZNF202 und seine Wirkungen anhand eines ZNF202^{-/-} -Mausmodell *in-vivo* überprüft werden. Dazu wurden mit Hilfe von real-time PCR-Analysen zunächst die basalen Expressionen von ZNF202 sowie einiger putativer ZNF202-Zielgene untersucht. Danach folgten detaillierte Genexpressionsanalysen einzelner möglicher Zielgene wie ABCA1 oder ApoE, die ebenfalls mit Hilfe der real-time-PCR erhoben wurden. Zum Abschluss wurden die Auswirkungen der durch ZNF202 verursachten Lipidveränderungen im Serum mittels einer FPLC-Analyse untersucht. Die in diesen Untersuchungen erhobenen Ergebnisse sollen im Folgenden mit bereits bekannten Fakten abgeglichen werden.

4.1 Basale Genexpression in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen

4.1.1 *Basale Expression des ZNF202 in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen*

ZNF202 wird in zahlreichen Geweben exprimiert. Erste *in-vitro* Ergebnisse hierzu lieferten Wagner et al. Mit Hilfe von zwei multi-tissue blots (Human I und II) [2], die eine Vielzahl von menschlichen Geweben und Zelllinien enthielten, stellten sie mittels Northern Blot-Analysen das Expressionsmuster von ZNF202 dar. Maximale RNA-Expressionen wurden dabei in Herz, Lunge, Leber und Hoden ermittelt. Basierend auf diesen Erkenntnissen untersuchten wir an BL6Ntac Wildtypmäusen die Expression der ZNF202-Isoformen ZNF202m1 und ZNF202m3 *in-vivo*, um einen Überblick über die natürliche Expressionsverteilung zu erhalten.

Nach bereits beschriebener Präparation der RNA wurden Proben aus Leber, Ileum, Jejunum, Colon ascendens, Colon descendens, Hoden, Milz, Niere, Fettgewebe, Herz, Muskel und Lunge mittels real-time PCR (TaqMan) analysiert.

Bei Auswertung der ΔCt -Werte stellten wir keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen männlichen und weiblichen Tieren fest. Aufgrund seiner konstatierten Regulationsrolle im Lipidstoffwechsel erwarteten wir keine geschlechtsspezifische Expression von ZNF202, was sich auch in den ΔCt -Werten in der Punktetabelle widerspiegelt. Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich für die beiden Isoformen ZNF202m1 und ZNF202m3. Auch hier kam es zu keinen signifikanten Abweichungen sowohl zwischen den Geschlechtern als auch zwischen den beiden Isoformen. Übereinstimmend mit bereits von Wagner et al erhobenen Daten, zeigten sich in unseren Untersuchungen hohe Expressionswerte von ZNF202 in Hoden und Lunge. Damit konnten wir die *in-vitro* ermittelten Ergebnisse auch im Mausegewebe bestätigen. Auch im Fettgewebe zeigte sich eine mittlere Expressionsstärke, ein Vergleich mit *in-vitro* erhobenen Daten ist hier nicht möglich. Anders als in den Datensätzen von Wagner et al [2] konnten wir für Leber und Herz nur eine geringe Expression feststellen. Für Ileum, Jejunum und Colon zeigte sich eine schwache Ausprägung, konsistent mit dem von Wagner et al. dargestellten Expressionsmuster.

In weiten Bereichen stimmten somit die bereits bekannten Daten mit den erwarteten Ereignissen, die auch während unseres Experiments erzielt wurden, überein.

4.1.2. Basale Expression verschiedener putativer ZNF202-

Zielgene in C57/BL6Ntac Wildtypmäusen

Bereits Wagner et al konnten in ihrer Arbeit die Struktur des ZNF202 und dessen daraus resultierende biochemische Funktion erforschen. Durch seinen Aufbau aus C-terminalen C2H2-Zinkfingermotiven (zur Bindung an DNS), einer Krueppel-associated box (zur Mobilisierung von Co-Repressoren) und einer N-terminalen SCAN-Domäne (zur Proteininteraktion) enthält ZNF202 alle wichtigen Bestandteile eines Transkriptionsrepressors. Mit Hilfe eines GST-Fusionproteins, das die letzten sechs Zinkfinger des ZNF202m1 enthielt, wurde ein einfaches 5'-GGGGT-3'-Motiv

als DNS-Bindungslocus identifiziert[2]. Wiederholungen dieses Motivs konnten in den Promotoren von zum Beispiel ApoAIV oder LPL gefunden werden.

Nach weiteren möglichen Zielgenen wurde mit Hilfe einer Keyword-Search in GenBank™ anhand des zuvor identifizierten G_nT-Bindungsmotives geforscht[2]. In einer Reihe von Genen konnten dieses Motiv *in-vitro* gefunden werden.

Basierend auf diesen *in-vitro* erworbenen Erkenntnissen wurden in unserer Studie die basalen Expressionen putativer Zielgene von ZNF202 *in-vivo* an C57/BL6Ntac Wildtypmäusen bestimmt. Ein besonderes Augenmerk wurde auf Gene gerichtet, die im Lipidmetabolismus eine wichtige Rolle spielen. Hierzu wurden Proben aus Leber, Kolon, Milz und Hoden vergleichend analysiert.

In der Leber als zentralem Organ des Lipidstoffwechsels waren vor allem die Gene hochexprimiert, die für die Weiterverarbeitung bzw. den Transport der Lipidpartikel eine wichtige Rolle spielen. Die Apolipoproteine, besonders ApoAI und ApoE, sowie Enzyme wie LCAT und HNF4 waren hochexprimiert. LCAT erleichtert die Veresterung des Cholesterins und ermöglicht damit eine Zunahme an Cholesterinestern in den HDL-Partikeln[85]; damit ist nachvollziehbar, warum es vor allem in der Leber hoch exprimiert wird. LCAT ermöglicht die weitere Cholesterin- sowie Apolipoprotein C und E-Aufnahme und damit die Bildung von HDL2-Partikeln[34]. Auch die ABC-Transporter ABCA1 und ABCG1 zeigten eine hohe Expressionsrate. Beide Transporter sind für den transmembranösen Transport von Lipiden aus dem Zellinneren in das Zellplasma verantwortlich: ABCA1 für den Efflux zellulären Cholesterins zu Apolipoproteinen wie ApoAI.

Im Hoden waren die Apolipoproteine im Vergleich zur Leber deutlich geringer exprimiert, auch die anderen untersuchten Gene des Lipidstoffwechsels waren in diesem Gewebe als Energieabnehmer eher gering exprimiert. Im Kolon als einem der Organe der Lipidaufnahme zeigten sich vor allem die Apolipoprotein Apo A I und IV sowie Apo CII, III und E hoch exprimiert. Apo AIV stellt mit Apo AI und ApoE die wesentlichen Komponenten reifer HDL-Partikel dar, während Apo CIII an der Regulation der triglyzeridreichen Lipoproteine beteiligt ist und einen der Hauptbestandteile der Chylomikronen und des VLDL-Cholesterins darstellt[85]. Apo E schließlich spielt eine wichtige Rolle im zellulären Cholesterinefflux[60] und kann dadurch einer Überladung der Zellen mit Lipiden entgegenwirken.

Verglichen dazu waren in den Geweben wie Hoden und Milz ABCA1 und G1 sowie die Apolipoproteine eher niedrig exprimiert, da dort nicht die unmittelbare

Notwendigkeit einer Lipidverwertung besteht. Einige der untersuchten Gene wie CALB2 oder ADRB3 waren in allen Geweben niedrigst oder nicht messbar exprimiert. Es fand sich wenig oder kein gewebespezifischer Expressionsunterschied.

4.2 Vergleich der Genexpression der ZNF202-Zielgene in ZNF202 Knockout-Mäuse versus Wildtypmäuse

4.2.1 *Genexpression von ABCA1 und ABCG1*

Die wichtige Rolle des ABCA1 im Lipidstoffwechsel, vor allen im HDL-Cholesterin-Stoffwechsel, konnte erstmals durch den Morbus Tangier eruiert werden. Bei dieser Erkrankung kommt es durch Mutationen im ABCA1-Gen[20-22] zu einem vermindertem Cholesterinefflux aus peripheren Zellen; dieser Vorgang nimmt vor allem im RCT eine zentrale Stellung ein. Auswirkungen dieses Funktionsausfalls zeigen sich in einem fehlenden HDL-Cholesterin, einem verminderten Serumcholesterin sowie eines verringerten zellulären Cholesterin- und Phospholipidefflux aus den peripheren Zellen[24,25]. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, folgen daraus eine Lipidübersättigung der Makrophagen mit Schaumzellbildung, Atherosklerose und koronare Erkrankungen.

Bei ABCG1 handelt es sich um einen half-size-Transporter aus der ABC-Familie, der eine wichtige Rolle beim Cholesterin- und Phospholipidefflux aus Makrophagen zu HDL-Cholesterin als Akzeptor spielt[55]. Während der so genannten Schaumzellbildung im Rahmen einer beginnenden Atherosklerose wird die Expression von ABCG1 durch die zunehmende Cholesterinbeladung des Makrophagen stimuliert[42] und damit einer Überakkumulation von Lipiden in der Zelle entgegengewirkt.

Die transkriptionelle Regulation von ABCA1 und ABCG1 ist bereits gut charakterisiert.

ZNF202 bindet *in-vitro* an eine spezifische Sequenz im Promotor von ABCA1 und ABCG1, dem GnT-Motiv[42]. Die Funktion von ZNF202 konnte in einem Luziferase Reporter-Gen-Assay gezeigt werden. Bei der Transfektion wurde ein Reporter-Gen-Konstrukt, das die Promotorregion von ABCG1 enthielt, mit unterschiedlichen Mengen von ZNF202 kotransfiziert. Es zeigte sich eine dosisabhängige Repression des ABCG1-Promotors um bis zu 80%, für die das Vorliegen einer SCAN-Domäne im ZNF202 unerlässlich war[42]. In Untersuchungen an Hep2G-Zellen wurde eine ZNF202-dosisabhängige ABCA1-Repression beobachtet, für die das Interagieren einer SCAN-Domäne und der funktionellen Integrität der TATA-Box von ABCA1 verantwortlich gemacht wurden.

Es ist bekannt, dass eine Induktion der Genexpression über GC-Boxen, HNF1 und E-Boxen durch Cholesterin und/oder cAMP herbeigeführt werden kann. Auch eine oxysterolabhängige Regulation über den LXR/RXR mit einer Bindung im DR4-Element des ABCA1-Promotors[24,25] konnte nachgewiesen werden. Chinetti et al [26] zeigten, dass sowohl eine direkte Induktionskaskade über PPAR→LXR α als auch SREBP 1c[48], das zusätzlich vermehrt Lipoproteine als Transportmoleküle bereitstellt, vermittelt zu einer deutlichen Erhöhung der ABCA1-Expression führt. Unterstützt wurden die Überlegungen zur Rolle des ZNF202 als Repressor in Untersuchungen an RAW 264.7 Makrophagen mit einer ZNF202m1-Überexpression. Die Überexpression von ZNF202 verhinderte die LXR/RXR-vermittelte Induktion von ABCA1[6].

Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Langmann et al konnten eine inverse Regulation von ZNF202 zu seinen Zielgenen ABCA1 und ABCG1 zeigen[6,8]. Für eine wirksame Repression seiner Targets ist eine Kopplung von ZNF202-Scan-Domäne und KRAB notwendig. *In-vitro* Analysen zeigten, dass SDP1 nicht nur die Bindung der ZNF202-Scan-Domäne and KRAB und damit eine Repression der Zielgenpromotoren verhindert, sondern auch eine zu PGC-2[24,25] analoge ABCA1-Induktion via LXR α vermitteln könnte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass in einem THP-1-Zellmodell während der Differenzierung von Makrophagen zu Schaumzellen sowie der damit einhergehenden steigenden Lipidbelastung die Expression des ZNF202 zunehmend abfällt, wohingegen die Expressionsrate von ABCG1 zunimmt[8]. Daraus leiteten wir ab, dass bei ZNF202-Knockoutmäusen eine

Repression der Targetpromotoren, in diesem Fall ABCA1 und ABCG1, wegfallen sollte.

Entgegen unseren Erwartungen blieben unsere *in-vivo* Ergebnisse für ABCA1 deutlich hinter den bekannten *in-vitro* Ergebnissen zurück. Es zeigte sich sowohl bei den männlichen (+/+-Tiere 0,89+/-0,20 → -/- -Tiere 1,05+/-0,30) als auch bei den weiblichen (+/+-Tiere 0,78+/- 0,24 → -/- -Tiere 1,04+/-0,17) statt eines signifikanten Anstiegs, nur ein tendenzieller Unterschied zwischen den Gruppen, der auch *in-vivo* eine Regulation erahnen lässt. Warum unsere *in-vivo* Ergebnisse nicht die Erwartungen erfüllten, kann verschiedene Ursachen aufweisen. Zum einen wurden nur Proben von 6 Monate alten Tieren untersucht. Um den Einfluss dieser Größe zu bestimmen, müssten bei weiteren Versuchsreihen Gruppen unterschiedlicher Altersstufen betrachtet werden. Der Effekt der ABCA1-Induktion könnte mit steigendem Alter zunehmen und deutlicher ersichtlich werden. Auch können weitere bisher zum Teil noch nicht identifizierte Parameter in die ABCA1-Expression eingreifen.

Ausgehend von den *in-vitro* erhobenen Daten erwarteten wir in unserem ZNF202-Knockout Mausmodell bei Fehlen seines Repressors ZNF202 auch eine deutliche Steigerung der Expressionsrate von ABCG1. Bei den weiblichen Tieren konnte ausgehend von den Wildtyp-Tieren über die Heterozygoten bis hin zu den ZNF202-Knockouttieren ein tendenzieller Anstieg der Expression beobachtet werden. Dieser war bei den männlichen Tieren weniger betont zu sehen. Somit waren unsere Ergebnisse konform mit den bereits bestehenden *in-vitro* Daten. Die erhöhte Bereitstellung von ABCG1 lässt, seiner Funktion entsprechend, einen erhöhten Efflux von Cholesterin und Phospholipiden aus Zellen wie den Makrophagen erwarten. So zeigten FPLC-Analysen an männlichen Tieren unserer drei Vergleichsgruppen einen deutlichen Anstieg des Cholesterins im Plasma bei ZNF202-Knockouttieren gegenüber den Wildtypmäusen.

4.2.2 Genexpression von PPAR delta

Bei PPAR delta handelt es sich um einen nukleären Hormonrezeptor, der mit RXR ein Heterodimer bildet, nahezu ubiquitär exprimiert wird[72] und an DR1-Elemente bindet. Untersuchungen an PPAR delta- Knockout-Mäusen zeigten, dass diesem Gen eine wichtige Rolle in entwicklungsnotwendigen und homöostatischen Prozessen, wie dem Aufbau der Lipidmasse oder dem Myelinisierungsprozess[84], zukommt. Zu seinen Liganden zählt man verschiedene gesättigte Fettsäuren, Eicosanoide und Derivaten des VLDL-Cholesterins[75]. Als Schutz vor Adipositas werden beim metabolischen Syndrom durch PPAR delta der reverse Cholesterintransport und die Expression von ApoA1, AII sowie CIII[76] angeregt. Zusätzlich erfolgt über das Niemann-Pick C1-like 1Gen (NPC1L1) eine Verringerung der Fettresorption im Darm. Durch die Aktivierung über die PPAR-LXR/RXR-Schiene kommt es zu vielfältigen Auswirkungen im Stoffwechsel. Neben einer Erhöhung der Expression von ABCA1 kommt es zur Steigerung vieler stoffwechselrelevanter Gene wie dem LPL, das die Hydrolyse zirkulierender Triglyzeride bedingt und eine Bindung an Lipidrezeptoren ermöglicht[94], oder der Cyp7a-Hydroxylase, die im Cholesterinkatabolismus eine Rolle spielt[95].

Als Koaktivator von PPAR gamma2 verhindert SDP-1 durch SCAN-Domänen vermittelte Interaktion die Bindung von KAP-1 an ZNF202[96]. Damit sinkt die Repressionskapazität von ZNF202 und die Transkription des PPAR sowie seiner abhängigen Gene wie ABCA1 nimmt zu[96]. Im Umkehrschluss führt eine Überexpression von ZNF202 zu einer deutlichen Abnahme von LXR/RXR und nachfolgend ABCA1[42]. DeVrins et al beschrieben *in-vitro* eine Absenkung von PPAR delta bei einer Überexpression von ZNF202.

In Zusammenschau der bisher erhobenen *in-vitro* Daten erwarteten wir deshalb eine gesteigerte PPAR delta-Expression in ZNF202-Knockoutmäusen, bedingt durch den Wegfall der Repression durch ZNF202. Die Analyse der PPAR delta-Expression bei unseren ZNF202-Knockoutmäusen zeigte nur geringe Schwankungen zwischen den Geschlechtern und bei gleich bleibenden RQ-Werten keine signifikante Regulation der Expression von PPAR delta. Wir konnten die *in-vitro* erhobenen Ergebnisse somit *in-vivo* zumindest im Mausmodell nicht reproduzieren.

4.2.3 Genexpression von MTP und ApoB

MTP katalysiert den Transfer von Lipiden zu ApoB. Apo B existiert in den zwei Isoformen ApoB48 und ApoB100, das vor allem auf VLDL-, IDL- und LDL-Cholesterin präsent ist[87]. Apolipoprotein B 48 ist eine trunkierte Form des ApoB100, der das C-terminale Ende des ApoB100 fehlt und das von Enterozyten synthetisiert wird. Für beide natürlicherweise vorkommenden Isoformen kodiert dasselbe Gen. Apo B besteht aus einer fünfgeteilten Struktur mit einer globularen N-terminalen Struktur, zwei amphipathischen β -Faltblatt-Domänen und zwei amphipathischen α -Helix-Domänen[96]. Die 1000 N-terminal gelegenen Aminosäuren sind der Lipidbindungstasche des lamprey vitellogenin homolog; diese Sequenz spielt für die Bildung des VLDL-Cholesterins eine herausragende Rolle, da sie die Interaktion mit dem mikrosomalen Triglyzeridtransferprotein (MTP) vermittelt: es katalysiert den Transfer von Lipiden zu ApoB[88]. Apolipoprotein B ist für die intrazelluläre Sammlung und Bildung von VLDL-Cholesterin (in der Leber) und Chylomikronen (in den Enterozyten) essentiell[87]. Apo B befindet sich als sekretorisches Enzym auf der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums(ER). Nach seiner Bildung gelangt es durch einen Kanal in das Lumen des ER, wo es durch Bindung an Chaperonproteine seine tertiäre Struktur erhält. Bei Fehlern in der Bildung verbleibt es im ER und wird der proteasomalen Degradierung zugeführt[89;90]. Korrekte Apo B-Partikel werden weiter durch den Golgi-Apparat geschleust und dabei prozessiert, um über die Plasmamembran sezerniert zu werden[91]. Die Bildung von VLDL-Cholesterin beinhaltet 3 verschiedene Partikeltypen: dem prä-VLDL-Cholesterin, einem Vorläuferprotein, das nicht sezerniert wird; VLDL2-Cholesterin, einer triglyzeridreichen Form; VLDL1-Cholesterin, triglyzeridreich und hoch atherogen[92]. Der Bildungsprozess beginnt im rauen ER. Durch die Interaktion von Apo B100 mit MTP werden Lipidtaschen gebildet und somit Lipide an das wachsende ApoB-Protein angelagert; es kommt zur Faltung um seinen hydrophoben Kern[93], dem prä-VLDL-Cholesterin[87]. Durch die weitere Aufnahme von Lipiden kommt es zur Umwandlung in VLDL2-Partikel oder dem degenerativen Abbau bei fehlendem Vorliegen von MTP. Diese weitere Funktion des MTP bei der Bildung sezernierungsfähiger ApoB100-Partikel erklärt auch die Aktivität des MTP nach vollendeter Translation des Proteins. Durch die Aufnahme einer definierten Menge an Lipiden entsteht aus VLDL2 VLDL1-Cholesterin [87]. Diese kotranslationale Lipidation des ApoB stimmt mit der

Beobachtung überein, dass MTP während dieser Phase der VLDL-Bildung aktiv ist[97]. Die kotranslationale Degradierung von ApoB wird unter anderem von der Verfügbarkeit der Lipide und der Aktivität von MTP beeinflusst. Die Fähigkeit des ApoB prä-VLDL-Partikel zu bilden, ist von der Aminosäuresequenz zwischen 3265-4082 abhängig[92]. Diese Sequenz ist auch dazu in der Lage, die lineare Lipidation zu verändern bzw. abzuschalten, um z.B. die Verfügbarkeit von MTP oder Lipiden abzuwarten[87].

Eine verringerte MTP-Aktivität bewirkt somit, dass ApoB100 im ER verweilt und proteosomal abgebaut wird[87].

ApoB48 ist wesentlicher Bestandteil von Chylomikronen und formt ein Partikel, das in Größe und Dichte dem HDL-Cholesterin entspricht. Dieses ist voll lipidgesättigt und kann sezerniert werden. Häufig wird es als VLDL2-Analogen bezeichnet[87]. Beide Isoformen werden durch Anreicherung mit Triglyzeriden zu VLDL1 konvertiert[92]. Die Sezernierung von ApoB wird post-transkriptionell durch eine co-translationelle und post-translationelle Degradierung reguliert[98]: bei einem erhöhten Angebot an Fettsäuren sinkt die Degradierung rapide.

Die Sekretion von VLDL1 ist häufig mit einer Insulinresistenz vergesellschaftet und trägt damit zumindest zum Teil zum atherogenischen Effekt bei. Eine erhöhte Sekretion von VLDL1 in Zusammenspiel mit den Effekten der Cholesterinester-Transferprotein (CETP) und der hepatischen Lipase vermehrt die Bildung von LDL und verringert den Plasmaspiegel des HDL-Cholesterins[87], wichtigen Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose.

Vor allem bei der weiblichen Versuchsgruppe konnte eine deutliche Regulation von ApoB unter Abwesenheit von ZNF202 gezeigt werden. So stieg die ApoB-Expression signifikant ausgehend von $0,85 \pm 0,22$ bei den Wildtypweibchen über $1,06 \pm 0,18$ bei den Heterozygoten bis hin zu $1,39 \pm 0,33$ bei den ZNF202^{-/-}-Tieren. Die von uns erhobenen *in-vivo* Daten aus dem ZNF202-Knockoutmodell wiesen somit auf eine Regulation durch ZNF202 hin und waren konsistent mit den erwarteten und bereits bekannten *in-vitro* Untersuchungsdaten.

DeVrins et al (European Lipoprotein Club 2003) konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Adenovirus medierte ZNF202-Überexpression *in-vitro* in der murinen Hepatomzelllinie AT3F2 zu einer verminderten MTP-Expression führen kann. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte, geht man von einer Expressionsregulation

aus, nun eine Regulation der Genexpression *in-vivo* an ZNF202-/-Knockoutmäusen untersucht werden.

Erwartet wurde eine gegensinnige Reaktion im Sinne einer vermehrten MTP-Expression durch das Fehlen von ZNF202 als Repressor in der Knockoutgruppe im Vergleich zu den heterozygoten Tieren mit zumindest einer Kopie des ZNF202 und der Wildtypgruppe mit zwei ZNF202-Kopien.

Bei der Analyse der MTP-Expression in den drei männlichen Gruppen zeigten sich entgegen unserer Erwartungen weder signifikante noch tendenzielle Veränderungen im Ausmaß der Expression. Alle drei Gruppen schwankten um eine relative mRNA-Expression von 1. Bei den weiblichen Tieren hingegen konnte zwischen der Expression der Wildtypmäuse (1,06±0,46) und der ZNF202-Knockoutgruppe (1,61±0,51) bzw. der Heterozygotgruppe (1,66±0,33) ein signifikanter Anstieg der MTP-Expression gezeigt werden, was sich als konsistent mit unserer These einer ZNF202 getriggerten Regulation erwies. Die Abweichungen zwischen den Ergebnissen der männlichen und weiblichen Versuchstiere konnten nicht endgültig geklärt werden. Diese geschlechtsspezifischen Expressionsunterschiede spiegelten sich auch in den Veränderungen der Serumlipidprofile wider. So zeigten die Weibchen im Bereich des VLDL einen deutlichen Anstieg des Spiegels im Gegensatz zur Vergleichsgruppe der Wildtypen.

4.3 Veränderungen im Lipidprofil (Serum) ZNF202 Knockout-Mäuse versus Wildtypmäuse

Aufgrund der putativen Zielgene des ZNF202, die besonders im Lipidstoffwechsel wichtige Funktionen übernehmen, rechneten wir bei ZNF202-/-Mäusen auch mit Veränderungen in den Serumspiegeln von Cholesterin und den Triglyzeriden. Mittels FPLC konnten die verschiedenen Triglyzeridfraktionen dargestellt werden. Es erfolgte eine getrennte Analyse der Weibchen und Männchen, um geschlechtsspezifische Unterschiede nicht mitzubewerten.

Während Stene et al 2006 bei Untersuchungen an Menschen mit dem ZNF202 A154V-Genotyp keine Assoziation mit Veränderungen im Plasmalipidprofil nachweisen konnten, zeigten sich in unseren FPLC-Analysen deutliche Unterschiede zwischen der Kontroll- und der ZNF202-Knockoutgruppe.

Die Vorarbeiten von Porsch-Özcürümez et al, die bei einer Überexpression von ZNF202 in RAW264.7 Makrophagen unter Inkubation mit 20S-OH-Cholesterin und 9-cis-Retinsäure eine signifikante Reduktion der Expression von ABCA1 und ABCG1 zeigten, belegten eine damit verbundene Verringerung des Phospholipid- und Cholesterineffluxes in diesen Zellen[42]. Die Schlüsselrolle von ABCA1 als Regulator des HDL-Cholesterins im Plasma und die Mediation des Phospholipid- und Cholesterineffluxes wurde in mehreren Arbeiten herausgestellt[18-20]. In unseren Experimenten konnten wir nur einen allenfalls leichten Anstieg des HDL-Cholesterins in ZNF202 defizienten Mäusen nachweisen. Dies ist konsistent mit der beobachteten fehlenden *in-vivo* Regulation von ABCA1 und ABCG1, steht jedoch im Widerspruch zu dem nach Porsch-Özcürümez et al. erwarteten verstärkten Cholesterinefflux aus den Zellen, vermittelt durch die erhöhte Expression der benötigten Transporter wie ABCA1 nach Wegfall der ZNF202 vermittelten Hemmung.

Wie bereits in 4.2.4 und 4.2.5 erörtert, kommt es bei den ZNF202^{-/-}-Mäusen zu einer Derepression des MTP bzw. des ApoB und damit zu einer erhöhten Expression dieser Gene. Beide sind für die Bildung und Sekretion des VLDL-Cholesterin und damit seiner Nachfolgeprodukte wie IDL-Cholesterin essentiell. Wie in den vorhergehenden Punkten ausgeführt, kommt es bei den ZNF202^{-/-}-Tieren zu einer vermehrten Expression beider Gene und damit zu einer verstärkten bzw. erleichterten Bildung von VLDL. Übereinstimmend mit den bisherigen bekannten Daten sowie unseren Expressionsanalysen zeigte sich bei der FPLC-Analyse bei den ZNF202^{-/-}-Weibchen und -Männchen eine deutliche Erhöhung des VLDL-Cholesterinplasmaspiegels, den man auf die durch MTP und ApoB gesteigerte Bildung und Sekretion von VLDL-Cholesterin zurückführen könnte. Zusammenfassend konnten die bisher erhobenen *in-vitro* Daten sowie unsere Erwartungen bezüglich der Cholesterin- und Triglyzeridverschiebungen in weiten Teilen auch *in-vivo* im Mausmodell veranschaulicht werden. Dieses Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass ZNF202 nicht nur in Zellexperimenten, sondern auch *in-vivo* eine hohe Bedeutung in der Regulation des Lipidstoffwechsels zukommt.

5. Zusammenfassung

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Arteriosklerose und ihren Folgeerkrankungen spielen Veränderungen im Lipidstoffwechsel. In diesen Metabolismus greifen eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel die nukleären Hormonrezeptoren LXR, RXR und PPAR, ein. Darüber hinaus konnte in verschiedenen *in-vitro* Studien eine Regulation des Lipidstoffwechsels durch den transkriptionellen Repressor ZNF202 gezeigt werden. In der vorliegenden Studie sollten nun die bereits erhobenen Daten von ZNF202 *in-vivo* in einem ZNF202-Knockout-Mausmodell weiter untersucht und verifiziert werden.

ZNF202-defiziente Mäuse in einem C57/BL6Ntac-Hintergrund wurden in jeweils geschlechtsgetrennten Gruppen in Wildtypen, Heterozygote und Knockout-Mäuse aufgeteilt. Bei einem Alter von 6 Monaten wurden die zu untersuchenden Gewebe gewonnen, homogenisiert, die RNA isoliert und RT-PCR-Expressionsanalysen durchgeführt.

Zusätzlich wurden Serumlipiddaten mittels FPLC-Trennung der Serumlipoproteinfraktionen und Konzentrationsanalyse von Cholesterin und Triglyceriden erhoben.

Übereinstimmend damit zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerung der VLDL-Cholesterin- assoziierter Gene Apolipoprotein B und Microsomal triglycerid transfer protein in der Leber. Vor allem bei weiblichen, aber ebenso bei männlichen ZNF202 *-/-* -Mäusen konnte ein deutlicher Anstieg der VLDL-Triglyceride im Serum im Vergleich mit den Kontrollgruppen festgestellt werden. Entgegen der aufgestellten These konnte keine Einflussnahme von ZNF202 auf die Expression von ABCA1 und ABCG1 sowie PPARdelta *in-vivo* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit die wichtige Rolle von ZNF202 im Lipidmetabolismus, vor allem im Triglyceridstoffwechsel, *in-vivo* belegen. Zur weiteren Charakterisierung sind hier jedoch weiterführende Untersuchungen, wie die Durchführung eines Mausmodells über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten oder ein Fütterungsversuch mit Gruppen unterschiedlichen Fettgehalts in der Nahrung erforderlich.

6. Literatur

1. Monaco C., Helmer CM, Caprini E, Vorechovsky I, Russo G, Croce CM, Barbanti-Brodano G, Negrini M: Molecular cloning and characterization of ZNF202: a new gene at 11q23.3 encoding testis-specific zinc finger proteins. *Genomics* 1998, 52:358-362.
2. Wagner S, Hess MA, Ormonde-Hanson P, Malandro J, Hu H, Chen M, Kehrer R, Frodsham M, Schumacher C, Beluch M, Honer C, Skolnick M, Ballinger D, Bowen BR: A broad role for the zinc finger protein ZNF202 in human lipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:15685-15690.
3. Hohner C, Chen P, Toth MJ, Schumacher C: Identification of SCAN dimerization domains in four gene families. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1517:441-448
4. Schuhmacher C, Wang H, Honer C, Ding W, Koehn J, Lawrence Q, Coulis CM, Wang LL, Ballinger D, Bowen BR, Wagner S: The SCAN domain mediates selective oligomerization. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 17173-17179
5. Lechner MS, Begg Ge, Speicher DW, Rauscher FJ III.: Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1- mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol. Cell Biol.* 2000; 20:6449-6465
6. Porsch-Ozcurumez M, Langmann T, Heimerl S, Borsukova H, Kaminski WE, Drobnik W, Honer C, Schumacher C, Schmitz G: The zinc finger protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP bonding cassette transporter A1 (ABCA1) und ABCG1 gene expression und a modulator of cellular lipid efflux. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:12427-12433.
7. QUIAGEN: RNeasy® Midi/Maxi Handbook, Second Edition, June 2001
S. 9, 18, 29-31
8. Langmann T, Schuhmacher C, Morham SG, Honer C, Heimerl S, Moehle C, Schmitz G.: ZNF202 is inversely regulated with its target genes ABCA1 and APO E during macrophage differentiation and foam cell formation. *J. Lipid Res.* 2003; 44: 968-977
9. Agilent Technologies: Reagent Kit Guide RNA 6000 Nano Assay
November 2003
10. Glomset JA. The plasma lecithin: cholesterol acetyltransferase reaction. *J. Lipid Res.* 1968; 9:155-67
11. Stender S, Hjelm E. In vivo influx of free and esterified cholesterol into human aortic tissue without atherosclerotic lesions. *J. Lipid Res.* 1984; 74:1871-81
12. Glass C. und Witztum J.: Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 2001; 104:503-516
13. Gough PJ., Gordon S.: The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes Infect* 2000; 2:305-311
14. Boullier A., Bird D.A., Chang M., Dennis E., Friedman P., Gillotre-Taylor K., Horkko S., Palinski W., Quehenberger O., Shaw P., Steinberg D., Terpstra V., Witztum J.: Scavenger receptors, oxidized LDL and atherosclerosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 2001; 947:214-223
15. Hansson G.: Immun mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2001; 21: 1876-1890
16. Libby P.: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874
17. Quiagen GmbH: RNAlater™ Handbook
July 2002

18. Bodzioch M., Orso E., Klukken J., Langmann T., Bottcher A., Diederich W., Drobnik W., Barlage S., Buchler C., Porsch-Ozcurumez M., Kaminski WE., Hahmann HW., Oette K., Rothe G., Aslanidis C., Lackner KJ., Schmitz G.: The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease.
Nat. Genet. 1999; 22: 347-351
19. Brooks-Wilson A., Marcil M., Clee SM., Zhang LH., Roomp K., van Dam M., Brewer C., Collins JA., Molhuizen HO., Loubser O., OueletteBF., Fichter K., Ashbourne-Excoffon KJ., Sensen CW., Scherer S., Mott S., Denis M., Martindale D., Frohlich J., Morgan K., Koop B., Pimstone S.,Kastelein JJ., Genest J., Hayden MR.: Mutations in ABCA1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency.
Nat. Genet 1999; 22: 336-245
20. Rust S., Rosier M., Funke H., Real J., Amoura Z., Piette JC., Daleuze JF., Brewer HB., Duverger N., Deneffe P., Assmann G.: Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1.
Nat. Genet. 1999; 22: 352-355
21. Rogler G., Trumbach B., Klima B., Lackner KJ., Schmitz G.: HDL-mediated efflux of intracellular cholesterol is impaired in fibroblasts from Tangier disease patients.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995; 15:683-690
22. Francis GA., Knopp RH., Oram JF.: Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A1 in Tangier Disease.
J. Clin. Invest. 1995; 96:78-87
23. Willy P.J., Mangelsdorf D.J.in 1998 *Genes Dev.* 11,289-298
24. Costet P., Luo Y., Wang N., Tall AR.:Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver Xreceptor/retinoid X receptor.
J Biol Chem. 2000; 275:28240-28245
25. Schwartz K., Lawn RM., Wade DP.: ABC1 gene expression and ApoA-1mediated cholesterol efflux are regulated by LXR.
Biochem Biophys Res Commun. 2000; 274:794-802
26. Chinetti G., Lestavel S., Bochner V., Remaley AT., Neve B., Torra IP., Teisier E., Minnich A., Jaye M., Dyvenger N., Brewer HB., Fruchart JC., Clavey V., Staels B.: PPAR- alpha and PPAR- gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway.
Nat Med. 2001; 7: 53-58
27. Lu TT., Repa JJ., Mangelsdorf DJ.: Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism.
J Biol Chem. 2001; 276: 37735-37738
28. Blanco-Vaca F., Escola-Gil JC., Martin-Campos JM., Julve J.: Role of apo A-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein.
J Lipid Res. 2001; 42: 1727-39
29. Fielding CJ., Fielding PE.:Molecular physiology of reverse cholesterol transport.
J Lipid Res. 1995; 36: 211-28
30. Rothblat GH., Llera-Moya M de la, Atger V., Kellner-Weibel G., Williams DL., Phillips MC.: Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights.
J Lipid Res. 1999; 40: 781-96
31. Miyazaki A., Nakayama H., Horiuchi S.: Scavenger receptors that recognize advanced glycation end products.
Trends Cardiovasc Med. 2002; 12:258-62
32. Schmitz G., Langmann T.: Structure, function and regulation of the ABC1 gene product.
Curr Opin Lipidol. 2001; 12:129-140
33. Fielding CJ., Fielding PE.: Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblasts and its relationship to lecithin: cholesterol acyltransferase.
Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78:3911-4
34. Eisenberg S.: High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res.* 1984; 25:1017-58

35. Trigatti B., Rigotti A., Krieger M.: The role of the high-density lipoprotein receptor SR-B1 in cholesterol metabolism.
Curr Opin Lipidol. 2000; 11:123-31
36. Borggreve SE., Vries R. de, Dullaart RPF. : Alternations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus : role of lipolytic enzymes, lecithin-cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins.
Eur J of Clin Invest. 2003; 33:1051-69
37. Dullaart RPF., Groener JEM., Erkelens DW.: Cholesterylester transfer between lipoproteins.
Diab Nutr Metab. 1991; 14: 329-43
38. Vassiliou G., Bonoist F., Lau P., Nihan Kavaslar G., McPherson R.: The low density lipoprotein receptor-related protein contributes to selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by SW872 liposarcoma cells and primary human adipocytes.
J Lipid Res. 2001; 52: 48823-30
39. Berkel TJC., Fluiter K., van Velzen AG., Vogelesang CJM., Ziere GJ.: LDL-receptor-independent and – dependent uptake of lipoproteins.
Atherosclerosis 1995; 118(Suppl.): S43-S50
40. Medh JD., Fry GL., Bowen SL., Ruben S., Wong H., Chapell DA.: Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase-promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism.
J Lipid Res. 2000; 41: 1858-71
41. St. Pierre MV., Kullak-Ublick GA., Hagenbuch B., Meier PJ.: Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues.
J Exp Biol. 2001; 204: 1673-86
42. M. Porsch-Özcürümez, T. Langmann, S. Heimerl, H. Borsukova, W. Kaminski, W. Drobnik, C. Honer, C. Schumacher, G. Schmidt: The Zinc Finger Protein 202 (ZNF202) is a transcriptional repressor of ATP Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) and ATP Binding Cassette Transporter (ABCG1) gene expression and a modulator of cellular lipid efflux.
J. Biol. Chem.; Vol. 276, No. 15, Issue of April 13,; 12427: 1-34
43. Lehmann J.M., Kliewer S.A. Moore L.B., Smith-Oliver T.A., Oliver B.B., Su J.-L., Sundseth S.S., Winegar D.A., Blanchard D.E., Spencer T.A., Willson T.M.; *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 3137-3140
44. Forman B.M., Goode E., Chen J., Oro A.E., Bradley D.J., Perlmann T., Noonan D.J., Burka L.T., McMorris T., Lamph W.W., Evans R.M., Weinberger C.: *Cell* 1995, 81; 687-693
45. Galarneau B., Pare J.F., Allard D., Hamel D., Lavesque L., Tugwood J.D., Green S., Belanger L. : *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16, 3853-3865
46. Seol W., Choi H.S., Moore D.D.: *Science* 1996; 272, 1336-1339
47. Russell D.W., Setchell K.D.R.: *Biochemistry* 1992; 31, 4737-4749
48. Schultz J.R., Tu H., Luk A., Repa J.J., Medina J., Li L., Schwendner S., Wang S., Thollen M., Mangelsdorf D.J., Lustig K.D., Shan B.: *Genes Dev.* 2000; 14, 2831-2838
49. Repa J.J., Turley S.D., Lobaccaro J.-M., Medina J., Li L., Lustig K., Shan B., Heyman R.A., Dietschy J.M., Mangelsdorf D.J.: *Science* 2000; 289, 1524-1529
50. Berge K.E., Tian H., Graf G.A., Yu L., Grishin N.V., Schultz J., Kwiterovich P., Shan B., Barnes R., Hobbs H.H.: *Science* 2000; 290, 1771-1775
51. Nitta M., Ku S., Brown C., Okamoto A.Y., Shan B.: *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 1999; 96, 6660-6665
52. Lu T.T., Makishima M., Repa J.J., Schoonjans K., Kerr T.A., Auwerx J., Mangelsdorf D.J.: *Mol. Cell* 2000; 6, 507-515
53. Li A.C., Glass C.K.: PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 2004; 45, 2161-2173

54. Schoonjans K., M. Watanabe, H. Suzuki, A. Mahfoudi, G. Krey, W. Whale, P. Grimaldi, B. Staels, T. Yamamoto, J. Auwerx: induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferators response element in C promoter. *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 19269-19276
55. Klucken J, Buchler C, Orso E, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:817-822
56. Langmann T, Porsch-Ozcurumez M, Unkelbach U, et al. Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1494:175-180
57. G. Schmitz, S. Heimerl and T. Langmann: Zinc finger protein ZNF202 structure and function in transcriptional control of HDL metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15,199-208
58. Zannis VI, Kan HY, Kritis A, et al. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:181-207
59. Prieur X, Coste H, Rodriguez JC. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem* 2003; 278:25468-25480
60. Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11:243-251
61. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:507-512
62. Mak PA, Kast-Woelbern HR, Anisfeld AM, Edwards PA. Identification of PLTP as an LXR target gene and apoE as an FXR target gene reveals overlapping targets for the two nuclear receptors. *J Lipid Res* 2002; 43:2037-2041
63. Salero E, Gimenez C, Zafra F. Identification of a non-canonical E-box motif as a regulatory element in the proximal promoter region of the apolipoprotein E gene. *Biochem J* 2003; 370 (Pt 3):979-986.
64. Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J., Chen H., Evans R.M.: Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell* 1998; 93: 229-240
65. Babb R, Bowen BR. SPP1 is a peroxisome-proliferator-activated receptor gamma 2 co-activator that binds through its SCAN domain. *Biochem J* 2003; 370 (Pt 2):719-727.
66. Privalsky, M.L. 2004. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 66:315-360.
67. Ordentlich, P., Downes, M., and Evans, R.M. 2001. Corepressors and nuclear hormone receptor function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 254:101-116.
68. Jepsen, K., and Rosenfeld, M.G. 2002. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J. Cell Sci.* 115:689-698.
69. Grant D, Barish, Vihang A, Narkar, Ronald M, Evans: PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116:590-597 (2006)
70. Lehmann, J.M., et al. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270:12953-12956.
71. Forman, B.M., et al. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 83:803-812.
72. Kliewer, S.A., et al. 1994. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:7355-7359.

73. Xu, H.E., et al. 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell.* 3:397–403.
74. Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator- activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:4312–4317
75. Chawla, A., et al. 2003. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:1268–1273.
76. Oliver, W.R., Jr., et al. 2001. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:5306–5311.
77. Wang, Y.X., et al. 2003. Peroxisome-proliferatoractivated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 113:159–170.
78. Vosper, H., et al. 2001. The peroxisome proliferator- activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 276:44258–44265.
79. Borst P, Zelcer N, van HA. ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486:128–144.
80. Dean M, Allikmets R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr* 2001; 33:475–479.
81. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8:67–113
82. K. J. Isselbacher, E. Braunwald, J. D. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci, D. L. Kasper: *Harrisons Innere Medizin* 1/2, 13. Auflage, 1995.
83. Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. & Gay, N.J. Distantly related sequences in the alpha and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945-951 (1982).
84. G. D. Barish, V. A. Narkar, R.M. Evans: PPAR δ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116:590–597 (2006)
85. G. Löffler: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 4. Auflage, 2001
86. Kardassis D., Laccotripe M., Talianidis I., Zannis V.: *Hypertension* 27: 980-1008 (1996)
87. S. Olofsson, J. Borèn: Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis; *J. Int. Med.* 2005; 258:395-410
88. N. Dashti, M. Gandhi, X. Liu et al.: The N-terminal 1000 residues of apolipoprotein B associate with microsomal triglyceride transfer protein to create a lipid transfer pocket required for lipoprotein assembly. *Biochemistry* 2002; 41: 6078-87.
89. A. Johnson, M. van Waas: the translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999; 15:799-842
90. L. Ellgaard, A. Helenius: Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 181-91
91. M. Elsner, H. Hashimoto, T. Nilsson: cisternal maturation and vesicle transport: join the band wagon (review)! *Mol Membr Biol* 2003; 20:221-9
92. P. Stillemark-Billton, C. Beck, J. Boren, S. Olofsson: Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL1 und VLDL2. *J. Lipid Res.* 2005; 46: 104-14
93. S. Olofsson, P. Stillemark-Billton, L. Asp.: The intracellular assembly of VLDL—a process that consists of two major steps that occur in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc. Med.* 2000; 10: 341-6
94. K Preiss-Landl, R. Zimmermann, G. Hammerle, R. Zechner: Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2002; 13:471-481

95. J. Lehman, S. Kliewer, L. Moore, T. Smith-Oliver, B. Oliver, T. Wilson;
J Biol Chem 272:3137-3140
95. R. Babb, B. Brown: SDP1 is a PPAR γ 2 coactivator that binds through its SCAN domain.
Biochem J 2003; 370(Pt2):719-727
96. J. Segrest, M. Jones, H. De Loof, N Dashi: Structure of apolipoproteinB-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res* 2001; 42: 1346-67
97. D. Gordon, J. Jamil, R. Gregg et al: Inhibition of the microsomal triglyceride transfer protein blocks the first step of apolipoprotein B lipoprotein assembly but not the addition of bulk core lipids in the second step. *J Biol Chem* 1996; 271: 33047-53
98. S.Olofsson, L. Asp, J. Borén: The assembly and secretion of Apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr. Opin Lipidol* 1999; 10: 341-6
99. C. Ameen, U. Edvardsson, A. Ljungberg et al: Activation of peroxisome proliferators-activated receptor α increases the expression and activity of microsomal triglyceride transfer protein in the liver. *J Biol Chem* 2005. 280: 1224-9
- 100.S. Heimerl, G. Liebisch, S. Le Lay, A. Böttcher, P. Wiesner, S. Lindtner, T. V. Kurzchalia, K. Simons, G. Schmitz:Caveolin-1 deficiency alters plasma lipid and lipoprotein profiles in mice.
Biochemical and Biophysical Research Communications 367 (2008) 826–833

7. **Abkürzungsverzeichnis**

ABC	ATP binding cassette
APO	Apolipoprotein
CEPT	Cholesterylestertransferprotein
CRABP	cellular retinoic acid binding proteins
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FXR	farnesoid X receptor
GST	Glutathion-S-Transferase
HDL	high density lipoprotein
HNF	hepatic nuclear factor
HTGL	hepatic triglyceride lipase
KAP1	Krüppel-associated box-associated protein1
KRAB	Krüppel-associated box
LAG	lymphocyte-activation gene
LCAT	Lecithin Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	liver X receptor
PPAR	peroxisome proliferators-activated receptor
PEMT	Phosphatidylethanolamin N-Methyltransferase
PLTP	Phospholipidtransferprotein
RAR	retinoid acid receptor
RCT	Reverser Cholesterintransport
RXR	retinoid X receptor
SDP1	SCAN domain protein 1
SREBP	sterol regulatory element binding protein
VEGFA	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoprotein
ZNF202	Zinkfingerprotein 202