

Institut für Experimentelle Genetik  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Neuherberg



# Analyse der molekularen Wirkungsmechanismen bei Funktionsstörungen der Cholesterinbiosynthese

Christina Guggenberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Jerzy Adamski  
2. Univ.-Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis  
3. Univ.-Prof. Dr. Hannelore Daniel

Die Dissertation wurde am 31.01.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 20.06.2007 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis . . . . .	ix
Zusammenfassung . . . . .	1
Abstract . . . . .	3
<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1. Cholesterin . . . . .	5
1.1.1. Bedeutung des Cholesterins . . . . .	5
1.1.2. Cholesterinbiosynthese im embryonalen und adulten Organismus . . . . .	6
1.1.3. Ausgewählte Enzyme der Cholesterinbiosynthese . . . . .	9
1.1.4. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 7 . . . . .	13
1.1.5. Regulation der Cholesterinhomeostase . . . . .	14
1.2. Apoptose . . . . .	17
1.2.1. Caspasen . . . . .	17
1.2.2. Unterschiedliche Apoptosewege . . . . .	18
1.2.3. Apoptose in der Entwicklung . . . . .	19
1.3. RNA-Interferenz . . . . .	20
1.3.1. Entdeckung der RNAi . . . . .	21
1.3.2. Mechanismus der RNAi . . . . .	21
1.4. Ziel der Arbeit . . . . .	23
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
2.1. Untersuchung der Cholesterinbiosynthese in Wildtyp-Embryonen der Maus . . . . .	25
2.1.1. Bestätigung der Expression aus <i>whole mount in situ</i> -Experimenten auf Proteinebene . . . . .	25
2.1.2. Cholesterinbiosynthese colokalisiert zum Teil mit apoptotischen Bereichen . . . . .	27
2.1.3. Entwicklung von Antikörpern gegen NSDHL und EBP . . . . .	29
2.2. Untersuchung der Cholesterinbiosynthese an Mausmutanten . . . . .	33
2.2.1. Embryotransfer . . . . .	34
2.2.2. Genotypisierung der <i>Td</i> -Mäuse . . . . .	34
2.2.3. Rückkreuzung der <i>Td</i> -Mäuse auf einen definierten Hintergrund und Zucht . . . . .	36

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.4.	Phänotyp der <i>Td</i> -Mäuse . . . . .	37
2.2.5.	Untersuchung der <i>Td</i> -Mäuse . . . . .	39
2.2.6.	Embryonalentwicklung der <i>Td</i> -Mäuse . . . . .	46
2.3.	Aktivitätsbestimmung <i>in vitro</i> mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie(GC/MS) . . . . .	51
2.3.1.	Grundlagen der GC/MS Messmethode . . . . .	51
2.3.2.	Ermittlung der geeigneten Messparameter . . . . .	52
2.3.3.	Enzymatische Umsetzung von Zymosterol zu Lathosterol durch die Katalyse von EBP . . . . .	53
2.3.4.	Messung der Aktivität von HSD17B7 <i>in vitro</i> . . . . .	53
2.4.	Molekulare Mechanismen in Zellkultur: Untersuchungen mittels RNA Interferenz (RNAi) . . . . .	59
2.4.1.	Bioinformatische Auswahl der siRNA-Sequenzen . . . . .	60
2.4.2.	Effektivitätstest der ausgewählten shRNA-Sequenzen . . . . .	60
2.4.3.	Nachweis des Knock-down auf endogener mRNA-Ebene . . . . .	62
2.4.4.	Stabile Zelllinien . . . . .	64
2.4.5.	Auswirkungen der RNAi in transient transfizierten Zellen auf apoptotisches Verhalten und Zellviabilität . . . . .	70
2.4.6.	Auswirkungen der RNAi in stabil transfizierten Zellen auf apoptotisches Verhalten und Zellviabilität . . . . .	78
2.5.	Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren . . . . .	84
2.5.1.	Auswirkungen von Pravastatin und BM 15766 auf apoptotisches Verhalten und Zellviabilität . . . . .	84
2.5.2.	Auswirkungen von Pravastatin und BM 15766 auf das Expressionslevel . . . . .	86
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
3.1.	Überblick über Ziele und Fortschritt . . . . .	89
3.2.	Expression von Hsd17b7 in Mausembryonen . . . . .	89
3.3.	Entwicklung von Antikörpern gegen NSDHL und EBP . . . . .	90
3.4.	Cholesterinbiosynthese und Apoptose . . . . .	90
3.4.1.	Colokalisation von Apoptose und Cholesterinbiosynthese in der Embryonalentwicklung . . . . .	90
3.4.2.	Was ist das apoptotische Signal? . . . . .	91
3.5.	Mausmodelle zur Untersuchung der defekten Cholesterinbiosynthese und ihrer Folgen . . . . .	92
3.5.1.	<i>Bare patches (Bpa)</i> - ein Mausmodell für CHILD . . . . .	92
3.5.2.	Zum CDPX2-Modell: <i>Tattered (Td)</i> . . . . .	92
3.5.3.	Embryotransfer - Probleme bei der Revitalisierung der Mauslinien . . . . .	93
3.5.4.	Zucht der <i>Td</i> -Mäuse . . . . .	94

3.5.5.	Was zeigt das Mausmodell <i>Tattered</i> ? . . . . .	96
3.5.6.	Vergleich von Mausmodellen unterschiedlicher menschlicher Missbildungssyndrome - sind dadurch neue Erkenntnisse möglich? . . . . .	101
3.6.	Entwicklung eines GC/MS-basierten Analyseverfahrens für die Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Enzyme der Cholesterinbiosynthese . . . . .	105
3.6.1.	Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Aktivitätsmessung . . . . .	107
3.6.2.	Herausforderungen bei der Entwicklung eines GC/MS-basierten Analyseverfahrens zur Bestimmung der Aktivität von EBP <i>in vitro</i> . . . . .	107
3.6.3.	Analyseverfahren für die enzymatische Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol durch die Katalyse von HSD17B7 . . . . .	108
3.6.4.	Chancen und Herausforderungen der GC/MS-Analyse . . . . .	111
3.7.	RNA Interferenz - das richtige Werkzeug? . . . . .	112
3.7.1.	Bedeutung der richtigen Sequenzauswahl für die siRNAs . . . . .	112
3.7.2.	Unterschiedliche Bereitstellung von siRNAs . . . . .	113
3.7.3.	Limitierung der transienten Transfektion . . . . .	113
3.7.4.	Stabil shRNAs-exprimierende Zelllinien . . . . .	114
3.7.5.	Krebszelllinien für die stabile Transfektion? . . . . .	116
3.7.6.	Auswirkungen von RNAi auf die Intensität der Apoptose . . . . .	117
3.8.	Auswirkungen der Inhibition der Cholesterinbiosynthese . . . . .	119
3.8.1.	Hemmung einiger Schritte der Cholesterinbiosynthese . . . . .	120
3.8.2.	Erkenntnisse aus den Untersuchungen mit den Inhibitoren Pravastatin und BM 15766 . . . . .	122
3.8.3.	Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese - geeignete Mittel zur Ermittlung der Auswirkungen einer gestörten Synthese? . . . . .	123
3.9.	Ausblick . . . . .	124
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>127</b>
4.1.	Molekularbiologische Methoden mit DNA . . . . .	127
4.1.1.	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	127
4.1.2.	Aufreinigung von dsDNA . . . . .	127
4.1.3.	Fällen von DNA . . . . .	128
4.1.4.	Messung von DNA-Konzentrationen und Qualitätsabschätzung . . . . .	128
4.1.5.	Klonierungsstrategien . . . . .	129
4.1.6.	Generierung von dsOligos . . . . .	130
4.1.7.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	131
4.1.8.	DNA-Sequenzierung . . . . .	131
4.1.9.	Isolation genomischer DNA zur Genotypisierung . . . . .	132
4.1.10.	Quantitative RealTime-PCR . . . . .	132
4.2.	Arbeiten mit RNA . . . . .	135

*Inhaltsverzeichnis*

---

4.2.1.	Isolation von total-RNA . . . . .	135
4.2.2.	Handhabung und Messung . . . . .	137
4.2.3.	Reverse Transkription von mRNA in cDNA . . . . .	138
4.2.4.	RNA-Synthese durch <i>in vitro</i> Transkription und Labeling mit Digoxigenin . . . . .	139
4.3.	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien . . . . .	139
4.3.1.	Kultivierung unterschiedlicher Zelllinien . . . . .	139
4.3.2.	Inhibitorische Medienzusätze . . . . .	141
4.3.3.	Allgemeine Methoden zur Zellkultur . . . . .	142
4.3.4.	Transiente Transfektion . . . . .	143
4.3.5.	Färbung von Zellen . . . . .	143
4.3.6.	Zellkultur-Assays . . . . .	145
4.4.	Arbeiten mit Bakterien . . . . .	148
4.4.1.	Nährmedien . . . . .	148
4.4.2.	Inhibitorische und selektive Medienzusätze . . . . .	149
4.4.3.	Bakterien kultivieren . . . . .	149
4.4.4.	Kurz- und Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen . . . . .	149
4.4.5.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation . . . . .	149
4.5.	Genexpressionsanalyse in Mäuseembryonen . . . . .	151
4.5.1.	Präparation von Embryonen und Fixierung . . . . .	151
4.5.2.	Whole mount mRNA <i>in situ</i> -Hybridisierung . . . . .	151
4.6.	Immunhistochemie . . . . .	155
4.6.1.	Gewebepräparation für Paraffinschnitte . . . . .	155
4.6.2.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	155
4.7.	Proteinchemische Methoden . . . . .	156
4.7.1.	Lyse von Bakterien . . . . .	156
4.7.2.	Lyse von humanen Zellen . . . . .	156
4.7.3.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) . . . . .	157
4.7.4.	Western Blot . . . . .	158
4.8.	Enzymaktivitätstest <i>in vitro</i> . . . . .	159
4.8.1.	Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Enzyme . . . . .	159
4.8.2.	Festphasenextraktion . . . . .	159
4.9.	Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) . . . . .	159
4.9.1.	Handhabung der Standard-Substanzen . . . . .	159
4.9.2.	Bestimmung der Kalibriergerade . . . . .	160
4.9.3.	Probenvorbereitung . . . . .	160
4.9.4.	Messung . . . . .	160

<b>5. Material und Organismen</b>	<b>163</b>
5.1. Material . . . . .	163
5.1.1. Vektoren . . . . .	163
5.1.2. Chemikalien . . . . .	163
5.1.3. Enzyme . . . . .	165
5.1.4. Antikörper . . . . .	165
5.1.5. Kits . . . . .	166
5.1.6. Equipment . . . . .	167
5.2. Organismen . . . . .	168
5.2.1. Bakterienstämme . . . . .	168
5.2.2. Zelllinien . . . . .	168
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>169</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>187</b>
A.1. Primer . . . . .	187
A.1.1. Primer für den Expressionstest . . . . .	187
A.1.2. Primer für die Genotypisierung . . . . .	187
A.1.3. Primer für Klonierungen . . . . .	188
A.1.4. Primer für Vektoren . . . . .	189
A.1.5. Primer für die quantitative RealTime-PCR . . . . .	189
A.2. shRNA Oligonukleotide . . . . .	190
A.2.1. Oligonukleotide für den Vektor pENTR/U6 für die transiente Trans- fektion . . . . .	190
A.2.2. Oligonukleotide für den Vektor pENTR/H1/TO für die stabile Trans- fektion . . . . .	192
A.3. GC/MS . . . . .	193
A.3.1. Massenspektren . . . . .	193
A.3.2. Messparameter . . . . .	195
A.4. Publikationen . . . . .	197
Danksagung . . . . .	199





## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A
amu	atomic mass unit
APS	Ammoniumperoxodisulphat
ATP	Adenosintriphosphat
AY 9944	Trans-1,4-bis(2-chlorobenzylaminomethyl)cyclohexan-dihydrochlorid
BLAST	Basic local alignment search tool
BM 15766	4-[2-[4-[3-(4-Chlorophenyl)-2-propenyl]-1-piperazinyl]ethyl]benzoesäure
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CHILD	Congenital Hemidysplasia with Ichthyosiform erythroderma and Limb defects
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDPX2	Conradi-Hünermann-Happle-Syndrom
DHCR7	7-Dehydrocholesterin-Reduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EBP	Emapomil binding protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alteri
FBS	Fötales Rinderserum
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
HMGCR	3-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
HSD17B7	17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7
INSIG2	Insulin induced gene 2

---

kb	Kilobasenpaare
LDLR	Low density lipoprotein receptor
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid
m/z	Masse/Ladungs Verhältnis
NADP	$\beta$ -Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-3'-Phosphat
NADPH	$\beta$ -Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-3'-Phosphat, reduziert
NSDHL	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like
OD	Optische Dichte
PBD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCARB1	Scavenger receptor class B, member 1
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SLOS	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
ss	einzelsträngig
TCF7L2	Transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRF1	Transferrin-Rezeptor
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit (Einheit)
V	Volt
w/v	Weight/volume (Gewicht/Volumen)

---

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der Cholesterinbiosynthese im Hinblick auf Funktionsstörungen und deren Auswirkungen untersucht. Die Folgen der Unterbrechung dieses Synthesewegs durch Defekte in den Enzymen NSDHL, HSD17B7 und EBP waren dabei von besonderem Interesse. Mutationen in den Genen *NSDHL* und *EBP* sind für die schweren humanen Missbildungssyndrome CHILD und CDPX2 verantwortlich.

Mit Hilfe einer Immunfärbung an Wildtyp-Mausembryonen wurde eine zeitlich und räumlich distinkte Expression der *Hsd17b7* nachgewiesen. Dabei konnte für *Hsd17b7* erstmalig eine Lokalisation von mRNA und Protein in den selben Geweben bestätigt werden.

Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen aktive Caspase-3 zeigten erstmalig eine Kolo-kalisation von Cholesterinbiosynthese und Apoptose während der Entwicklung von Mäusen. Dabei wurden beide Prozesse in den Pharyngealbögen, Ganglien und den Gliedmaßenknospen gezeigt. Diese Gewebe sind auch bei menschlichen CHILD- und CDPX2-Patienten betroffen.

Die Mauslinie *Tattered*, die eine Mutation im *Ebp*-Gen aufweist und ein Tiermodell für das humane Missbildungssyndrom CDPX2 darstellt, wurde eingehend untersucht. Dabei konnten Übereinstimmungen mit dem menschlichen Phänotyp, wie z. B. Veränderungen der Haut und im Skelett, identifiziert werden. Eine genauere Charakterisierung der Embryonen zeigte weitere Parallelen zum humanen CDPX2 und brachte erste Hinweise auf eine mögliche Störung des *Sonic Hedgehog*-Signalwegs. Zudem wurde gezeigt, dass durch die Mutation in *Ebp* auch Gene, die in der adulten Cholesterinhomeostase eine Rolle spielen, reguliert werden.

Um Hinweise auf die Auswirkungen von Defekten einzelner Enzyme der Cholesterinbiosynthese zu erhalten, wurde eine GC/MS-basierte Methode zur Messung der *in vitro*-Aktivität dieser Enzyme etabliert. In erster Anwendung konnte die Aktivität von Maus und humaner HSD17B7 anhand der Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol bestimmt werden. Die Auswirkungen von Funktionsstörungen der Enzyme NSDHL, HSD17B7 und EBP wurden eingehend in Zellkultur untersucht. Dazu wurde zu Beginn der Arbeit als neue Technologie RNA Interferenz (RNAi) für den Cholesterinbiosynthese-Weg etabliert. Es konnte ein effizienter Knock-down der drei genannten Gene nachgewiesen werden. Die erfolgreich getesteten shRNA-Konstrukte wurden daraufhin stabil in eine induzierbare Zelllinie (HeLa T-REx) transfiziert. In diesen Zellen wurde ein Knock-down von ca. 90 % auf mRNA-Ebene erreicht, der auch auf Proteinebene nachweisbar war. Eine Untersuchung der Apoptose in diesen Zellen zeigte eine Verringerung der Apoptosehäufigkeit bei einer Reduktion der entsprechenden Proteine bei Wachstum der Zellen auf Mangelmedium. Die Ergebnisse deuten auf ein Steroid oder ein Cholesterinderivat als möglichen

---

apoptoseauslösenden Faktor hin.

Unterschiedliche Enzyme der Cholesterinbiosynthese wurden mit Hilfe von Inhibitoren blockiert und die Auswirkungen auf die Apoptose in Zellkultur untersucht. Die Expressionslevel einzelner an der Cholesterinbiosynthese beteiligter Gene wurden mittels quantitativer RealTime-PCR bestimmt. Mit ihrer Hilfe konnte eine deutliche Expressionssteigerung der inhibierten Enzyme HMG-CoA-Reduktase und DHCR7 nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte erstmals gezeigt werden, dass die Gene *HMGCR*, *NSDHL*, *HSD17B7*, *EBP* und *DHCR7* eine Synexpressionsgruppe bilden.

Durch die in dieser Arbeit etablierten neuen Methoden zur Modulation der Cholesterinbiosynthese konnten neue Erkenntnisse über die Auswirkungen von Funktionsstörungen der Cholesterinbiosynthese gewonnen werden. Sie liefern damit neue Hinweise auf die molekularen Vorgänge der humanen Missbildungssyndrome CHILD und CDPX2.

---

## Abstract

The main topic of the work at hand was on the molecular mechanisms of the cholesterol biosynthesis and related inborn errors of metabolism. Special focus was given on the enzymes NSDHL, HSD17B7 and EBP and the effects of their disruption. When mutated, *NSDHL* and *EBP* cause the severe malformation syndromes CHILD und CDPX2.

By immunostaining of murine wildtype embryos, a spatial and distinct expression of Hsd17b7 could be shown. Furthermore, I could show the localisation of Hsd17b7-mRNA and protein in the same tissues.

Immunostaining with antibodies against active Caspase-3 showed a colocalisation of cholesterol biosynthesis and apoptosis during the murine development. Both processes take place in the pharyngeal pouches, ganglia and limb buds. The same tissues are affected in human CHILD and CDPX2 patients.

*Tattered* is an animal model for human CDPX2 with a mutation in *Ebp* and was in-depth analysed here. I could identify changes in skin and bones which have been described for the human phenotype as well. Furthermore, first hints to the affection of the *sonic hedgehog* signalling pathway and the regulation of cholesterol homeostasis were gained.

GC/MS measurement was established for detection of mouse and human Hsd17b7 activity. I could thereby show the conversion of zymosterone into zymosterol through this enzyme. At the same time, the effects of disrupted NSDHL, HSD17B7 and EBP were analysed in cell culture. To this end, I established RNA interference in our laboratory. For all three genes under investigation I could show an efficient knock-down. Stable and inducible transfection of these constructs in HeLa T-Rex yielded about 90 % decrease in mRNA level which could be proven on protein level as well. When grown on deprivation media, these cells displayed a decrease in apoptosis. These results hint at a steroid or cholesterol-like substance which could be the proapoptotic signal.

By application of several inhibitors, apoptosis in functional deficient cholesterol biosynthesis was analyzed in cell culture. Expression levels were detected by quantitative RealTime-PCR. I could thereby show a significant upregulation of inhibited HMG CoA reductase and DHCR7. At the same time, *HMGCR*, *NSDHL*, *HSD17B7*, *EBP* and *DHCR7* were detected as a synexpression group for the first time.

This investigation has established new technologies for the modulation of cholesterol biosynthesis and thereby gained new insights on the effect of functional disruption of the cholesterol biosynthesis. These provide new hints to the molecular mechanisms underlying CHILD and CDPX2.



# 1. Einleitung

## 1.1. Cholesterin

Cholesterin gewinnt in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung, da es als Risikofaktor in der Entstehung einiger Volkskrankheiten wie der Arteriosklerose und der Bildung von Gallensteinen angesehen wird. Zu den bekannten Krankheiten gehört auch die Familiäre Hypercholesterinämie, die unabhängig von der Nahrungsaufnahme zu erhöhten Cholesterinwerten im Blut führt. Ein erhöhter Cholesterinspiegel wird zudem mit koronarer Herzerkrankung in Zusammenhang gebracht und führt zu einem vergrößerten Alzheimer-Risiko.

### 1.1.1. Bedeutung des Cholesterins

Cholesterin ist ein lebensnotwendiges Molekül, das viele unterschiedliche Funktionen erfüllt. Es ist essentieller Bestandteil eukaryotischer Membranen. In eukaryotischen Zellen befinden sich 65–90 % des freien (unveresterten) Cholesterins in der Plasmamembran [105]. Dabei beträgt die durchschnittliche Konzentration an Cholesterin ca. 200–300  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Protein und das molare Verhältnis von Cholesterin zu Phospholipiden kann dabei abhängig vom Zelltyp 1:1 betragen [174]. Die intrazelluläre Verteilung des Cholesterins zwischen den einzelnen Organellen, den unterschiedlichen Membrandomänen und den Schichten der Doppelmembran erfolgt nicht zufällig. Durch seine chemische Struktur mit einer 3 $\beta$ -Hydroxylgruppe am einen und einer flexiblen Kohlenhydratkette am anderen Ende des Steroidgerüsts, ist es in der Lage, die physikalischen Eigenschaften von Membranen zu beeinflussen [175]. Dabei setzt es die passive Permeabilität der Membranen herab und erhöht die mechanische Stabilität der Lipiddoppelschicht. Eine weitere wichtige Funktion übernimmt Cholesterin in den Lipid-Rafts, die es zusammen mit Sphingolipiden bildet. Lipid-Rafts sind dynamische Strukturen, die sich im exoplasmatischen Layer der Membrandoppelschicht befinden [148, 149]. Sie können unterschiedliche Klassen von Proteinen binden, zu denen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) verankerte Proteine, doppelt acetylierte periphere Membranproteine, cholesteringebundene Proteine und Transmembranproteine gehören. Lipid-Rafts erfüllen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse, wie einer alternativen Art der Endozytose [150], der Internalisierung von Toxinen, Bakterien und Viren [53, 145], beim Cholesterintransport [151], bei der Proteinsortierung [148] und der Signaltransduktion [79].

Zudem fungiert Cholesterin als Vorstufe für Steroidhormone, die in sechs Klassen eingeteilt werden. Zu ihnen zählen die Sexualhormone, bei denen man Östrogene (18 C-Atome), Androgene (19 C-Atome) und Gestagene (21 C-Atome) unterscheidet. Zu den Steroidhormonen gehören auch die in der Nebennierenrinde entstehenden Mineralokortikoide und Glukokortikoide. Mineralokortikoide beeinflussen vorwiegend den Kalium-Natrium-Haushalt und damit den Wassergehalt des Körpers, Glukokortikoide sind wichtig für den Kohlendhydratstoffwechsel. Cholesterin dient auch als Vorstufe der Vitamin D-Gruppe. Die Aktivierung dieser Hormone erfolgt durch die UV-katalysierte Spaltung in der Haut. Sie sind verantwortlich für die Regulation des Calcium-Pegels in Blut, Knochen und Geweben. Niedrige Vitamin D-Level führen zu Rachitis und Osteoporose. Gallensäuren entstehen ebenfalls aus Cholesterin. Sie stellen eine unerlässliche Komponente der Fettverdauung dar.

Isoprenoidintermediate aus frühen Schritten der Cholesterinbiosynthese sind Vorstufen für die Synthese von Isopentyl-tRNAs der Proteinsynthese. Ebenso entsteht daraus Dolichol, das für die N-verknüpfte Glykosilierung von Proteinen verwendet wird, und Ubiquinon, ein Cofaktor für respiratorische Enzyme in den Mitochondrien. Cholesterin und einzelne Sterole können zu Oxysterolen umgesetzt werden, die als regulatorische Signalmoleküle an nukleäre Rezeptoren wie LXR $\alpha$  binden [40].

### 1.1.2. Cholesterinbiosynthese im embryonalen und adulten Organismus

Im adulten Organismus wird Cholesterin zum Großteil vom Körper selbst synthetisiert (endogenes Cholesterin). Der Hauptort dieser Synthese ist dabei die Leber, wobei Cholesterin auch in der Darmschleimhaut, der Nebennierenrinde, im Gehirn und den Gonaden gebildet wird. Nur ein kleiner Anteil des benötigten Cholesterins wird mit der Nahrung aufgenommen.

Der Embryo kann das Cholesterin entweder von der Mutter erhalten (exogen) oder selbst *de novo* synthetisieren (endogen). Beide Quellen sind für den Embryo unerlässlich, d. h. der Ausfall einer dieser Quellen kann von der anderen nicht kompensiert werden [49, 170]. Die embryonale Cholesterinproduktion beginnt in der Maus an E4–5 [131]. Bis vor kurzem ging man noch davon aus, dass Cholesterin im Embryo ubiquitär synthetisiert wird mit einer erhöhten Produktion in der fötalen Leber, der Niere und dem Gehirn [70]. In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch mittels mRNA *in situ*-Hybridisierungen an Maus-embryonen erstmals gezeigt, dass cholesterinsynthetisierende Proteine ein räumlich und zeitlich dynamisches Expressionsmuster aufweisen. Hohe mRNA-Level konnten dabei in Neuralleisten-Derivaten, dem Neuralrohr, dem Gehirn, der Schwanzspitze und den Gliedmaßen nachgewiesen werden. Eine Expression in der Leber wurde in den untersuchten Stadien (E10,0–13,5) hingegen nicht nachgewiesen [99].

Embryonen haben eine enorme Wachstumsrate, die in keinem anderen Stadium des Lebens nochmals erreicht wird. Um dieses Wachstum zu ermöglichen, benötigt der Embryo



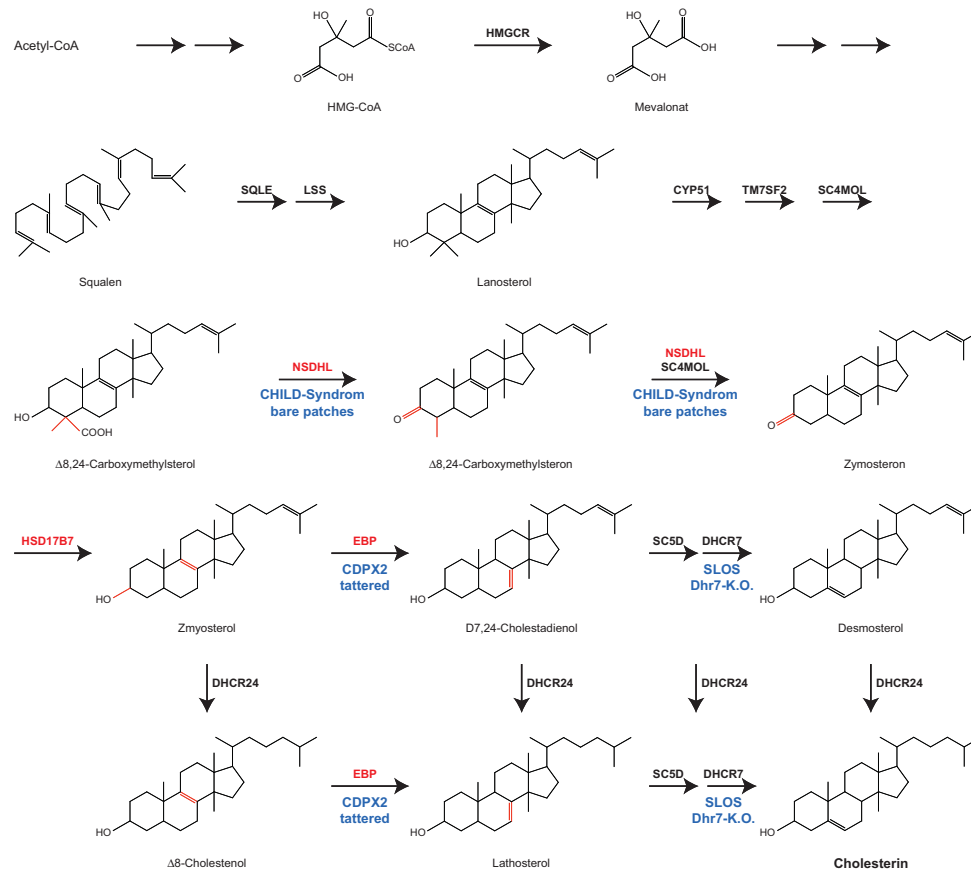
u. a. große Mengen an Cholesterin, das hauptsächlich dem Aufbau neuer Zellmembranen dient, aber auch als Vorläufer für die Steroidhormone fungiert. Zudem ist Cholesterin auch für die Aktivierung des Morphogens *Sonic Hedgehog* (SHH) unerlässlich [130]. SHH wird als inaktiver Precursor synthetisiert und anschließend autokatalytisch gespalten. An die N-terminale Domäne des gespaltenen Vorläufers wird ein Cholesterinmolekül kovalent gebunden [130], das die Verankerung in Membranen [56] und damit die biologische Funktionalität des Morphogens ermöglicht. SHH spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Rechts-Links-Asymmetrie und ist entscheidend an der Bildung von Gehirn, Gliedmaßen, sklerotomalen Strukturen, Haarfollikeln und epithelialen Organen beteiligt [25, 46].

### Ablauf und Regulation der Cholesterinbiosynthese

Cholesterin wird aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert, das dem Körper aus mehreren Quellen zur Verfügung steht, z. B. durch die  $\beta$ -Oxidation langkettiger Fettsäuren. Das erste Steroidintermediat dieses Stoffwechselweges, Lanosterol, wird durch die Kondensation von Squalen, einem Isoprenoid mit 30 Kohlenstoffatomen, gebildet. Diese und darauf folgende Reaktionen der postsqualenen Cholesterinbiosynthese finden an den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. In dreizehn weiteren Reaktionen, katalysiert durch elf Enzyme, wird Squalen durch Zyklisierung, Demethylierungen, Isomerisierungen, Dehydratationen und Reduktionen zu Cholesterin umgesetzt (Abb. 1.1). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Synthese ist die Umsetzung von Acetyl-Coenzym A durch die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A- (HMG-CoA-) Reduktase.

Die Regulation der fötalen Cholesterinbiosynthese ist bislang uncharakterisiert. Im adulten Organismus wird die *de novo*-Synthese von *sterol regulatory element binding proteins* (SREBPs) reguliert [18, 19]. Bisher wurden drei Mitglieder der SREBP Familie, SREBP-1a und SREBP-1c, zwei Transkriptvarianten des selben Gens, und SREBP-2, identifiziert [177, 76]. SREBPs sind membranständige Transkriptionsfaktoren, die als Vorläufer synthetisiert und haarnadelartig in die ER-Membran verankert werden. Sinkt der Cholesteringehalt in der Zelle, werden diese Vorläuferproteine durch *SREBP cleavage activating protein* (SCAP) zweimal gespalten [126]. SCAP besitzt eine *sterol sensing domain* (SSD) [75, 98], mit deren Hilfe es auf den variierenden Cholesteringehalt reagieren kann [121]. Durch diese Spaltungsreaktion werden die Transkriptionsfaktoren aktiviert und in den Zellkern transportiert, wo sie für eine erhöhte Expression von HMGCR und des LDL-Rezeptors sorgen [137]. Dadurch wird die endogene Synthese gesteigert und gleichzeitig die Aufnahme von exogenem Cholesterin gefördert.

## 1. Einleitung



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese.** Die Synthese von Cholesterin erfolgt aus Acetyl-CoA. Dabei findet die Synthese von Mevalonat bis Farnesyldiphosphat in den Peroxisomen statt. Die restlichen Schritte bis zum Cholesterin laufen in den ER-Membranen ab. Bekannte humane Missbildungssyndrome und Mausmutanten sind unter den jeweiligen beteiligten Enzymen aufgeführt. Die Enzyme, die in dieser Arbeit vorwiegend untersucht wurden, sind in rot dargestellt.

### 1.1.3. Ausgewählte Enzyme der Cholesterinbiosynthese

Aufgrund der vielfältigen Funktionen des Cholesterins hat die Biosynthese dieses Moleküls eine zentrale metabolische Bedeutung. Funktionsstörungen der embryonalen Cholesterinbiosynthese führen deshalb zu schweren Missbildungen. Man kennt bis heute zwei präsqalene (*mevalonic aciduria* und Ausfall der Squalensynthese) und fünf postsqualene Defekte (CHILD, CDPX2, Lathosterolose, Desmosterolose und SLOS). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit näher untersuchten Enzyme, deren Defekte für einige der eben erwähnten Missbildungssyndrome verantwortlich sind, näher beschrieben.

#### 3-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase

Die humane 3-Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase ( HMGCR bzw. HMG-CoA-Reduktase) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese, die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat. HMG-CoA-Reduktase ist in der Membran des ER lokalisiert und besitzt im Menschen fünf transmembrane Domänen. Das Gen wurde auf Chromosom 5q13.3-q14 lokalisiert [104] und ist ca. 25 kb groß. Der Translationsstart liegt in Exon zwei.

#### NAD(P)H Steroid Dehydrogenase-Like

Das *NAD(P)H-steroid dehydrogenase like*-Gen (*NSDHL*) kodiert für eine 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD), die an der Umsetzung von 4,4-Dimethylcholesta-8,14, 24-trienol beteiligt ist [92]. *NSDHL* wird sowohl im Menschen wie auch in der Maus durch ein ca. 40 kb großes Gen codiert, das aus acht Exons mit dem Translationsstart im zweiten Exon besteht. Dieses Gen ist im Menschen auf Chromosomabschnitt Xq28,8 lokalisiert [67]. Im adulten Organismus wird das Protein ubiquitär exprimiert, mit einer erhöhten Expression in Geweben mit höherem Cholesterinbedarf. NSDHL wandert durch den Golgi-Apparat und akkumuliert an den ER-Membranen. Zudem wurde eine Assoziation mit Lipid-Tröpfchen nachgewiesen. Lipid-Tröpfchen sind cytoplasmatische Organellen und an der Speicherung neutraler Lipide beteiligt. Die Bedeutung der Akkumulation von NSDHL auf der Oberfläche von Lipid-Tröpfchen ist bisher nicht abschließend geklärt [21].

**CHILD** CHILD ist die Abkürzung für ein menschliches Missbildungssyndrom, dass 1980 erstmalig unter dem Namen *congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects* beschrieben wurde [65]. Ursache für diese Erkrankung ist eine Mutation in *NSDHL*. Für hemizygoten männlichen Betroffenen ist CHILD letal. Das CHILD-Syndrom ist durch einseitige Hautläsionen, verkürzte oder fehlende Gliedmaßen, Gehirndefekte, Dysplasie aller sklerettalen Strukturen, geringes Größenwachstum, Herz-, Lungen- und Nierendefekte gekennzeichnet [68, 87, 89]. Es zeigt phänotypische Ähnlichkeiten zu CDPX2,

ist allerdings streng einseitig verteilt [65, 66]. Das CHILD-Syndrom tritt nur sporadisch auf. Bisher wurden nur wenige Fälle dokumentiert, in denen eine Weitergabe von der Mutter auf die Tochter erfolgte. Vor kurzem wurde jedoch der erste Fall beschrieben, bei dem CHILD in einer milden Form über drei Generationen hin auftritt [11].

**Bare patches und Striated** Die Mauslinien *Bare patches* (*Bpa*) und *Striated* (*Str*) dienen als Modelle für CHILD. Es wurden unterschiedliche *Bpa*-Allele identifiziert, die entweder spontan oder durch Bestrahlung entstanden. Vor einigen Jahren ging man sogar noch davon aus, dass mildere Allele auf einem unterschiedlichen Locus zu finden sind und bezeichnete diesen als *Str*.

Auch bei den Mausmodellen ist eine Mutation im *Nsdhl*-Gen für männliche Embryonen letal. Die X-Inaktivierung bei heterozygoten Weibchen äußert sich durch kahle Flecken im Fell, die den Blaschko-Linien folgen [106]. Der Phänotyp dieser Mäuse entspricht weitgehend dem humanen Syndrom. Die Mutanten sind durch Kleinwüchsigkeit, Gaumenspalte, Hautveränderungen, Katarakte, Chondrodysplasia punctata und Kamptodaktylie gekennzeichnet.

*Str*-Mäuse besitzen ein *Nsdhl*-Allel, das zu einem Protein mit verminderter enzymatischer Aktivität übersetzt wird. Der Phänotyp dieser Mäuse ist vergleichbar mit den *Bpa*-Mäusen, allerdings mit schwächeren Ausprägungen.

### Emapomil-Binding Protein

Das *Emapomil-Binding Protein* (EBP) ist auch als  $3\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase bekannt und wurde als hoch-affin bindendes Protein für das antiischämische Medikament Emapomil beschrieben. Es gehört zur Sigma-Klasse der medikamentenbindenden Proteine, deren Liganden eine große Anzahl an pharmakologisch aktiven Substanzen wie Chlorpromazin, Haoperidol [115] und Tamoxifen [27] mit einschließen. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass EBP auch eine Sterol-Isomerase-Aktivität besitzt und diese Funktion in einem Erg2 defizienten Hefe-Stamm übernehmen kann; Erg2 kodiert für die  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase der Hefe [147]. Es besteht aber keine signifikante Homologie in der Aminosäuresequenz von EBP und der Sterolisomerase aus Hefe.

EBP katalysiert die Umlagerung der Doppelbindung von C8–9 nach C7–8 im B-Ring des Sterols, wobei Zymosterol ( $\Delta 8$ - $\Delta 24$ -Cholestadien- $3\beta$ -ol) zu  $\Delta 7,24$ -Cholestadienol ( $\Delta 7$ - $\Delta 24$ -Cholestadien- $3\beta$ -ol) und  $\Delta 8$ -Cholestenol ( $\Delta 8$ -Cholesten- $3\beta$ -ol) zu Lathosterol ( $\Delta 7$ -Cholesten- $3\beta$ -ol) umgesetzt wird. *In vitro* benötigt EBP dazu keinen Cofaktor, zeigt allerdings eine sehr niedrige Umsatzgeschwindigkeit mit einem  $k_{\text{kat}}$  von  $5 * 10^{-2} * \text{s}^{-1}$  [117]. Das *EBP*-Gen umfasst annähernd 7 kb genomischer DNA und besteht aus fünf Exons, wobei der Translationsstart in Exon zwei liegt. Beim Menschen befindet sich *EBP* auf dem Chromosomenabschnitt Xq11,23-q11,22 [63, 139]. Die Expression des Proteins ist in Ge-

weben der Cholesterinbiosynthese und der Steroidogenese, wie Leber, Nebenniere und den Gonaden am stärksten. Für das Protein werden vier Transmembrandomänen vorhergesagt. Zwischen Transmembrandomäne zwei und drei liegt eine in Vertebraten hochkonservierte Sequenz, die vermutlich Teil des aktiven Zentrums ist [118]. EBP ist im ER lokalisiert [63].

**CDPX2** Mutationen im *EBP*-Gen sind für CDPX2 (*Chondrodysplasia Punctata 2, X-Linked Dominant* oder auch *Conradi-Hünemann-Happle-Syndrom*) verantwortlich. Patienten mit CDPX2 haben sehr ähnliche Symptome wie CHILD-Patienten und sind durch Ichthyose, Gliedmaßenverkürzungen, stellenweise Alopecia und Chondrodysplasia punctata gekennzeichnet [14]. Während die Symptome bei CHILD strikt unilateral auftreten, sind bei CDPX2 häufig beide Körperhälften betroffen. Ein vollständiges Fehlen der Gliedmaßen wurde bei CDPX2 noch nie beobachtet [92].

An fünf weiblichen CDPX2-Patienten konnte ein deutlich erhöhtes Level an 8-Dehydrocholesterin (8-DHC) und 8(9)-Cholestenol nachgewiesen werden [90]. Dieses spezifische Sterolmuster wurde später bestätigt und scheint typisch für CDPX2 zu sein [14, 78].

**Tattered und Tattered Hokkaido** Wie für CHILD existieren auch für CDPX2 künstlich erzeugte Mausmutanten, die als *Tattered (Td)* und *Tattered-Hokkaido (Td<sup>ho</sup>)* bezeichnet werden. Die *Td*-Mauslinie trägt eine Punktmutation (G107R) im *Ebp*-Gen. Die ausgetauschte Aminosäure befindet sich in der hochkonservierten Region zwischen den Transmembrandomänen zwei und drei [36]. Heterozygote *Td*-Weibchen sind kleiner und entwickeln hyperkeratotische Hautläsionen und Katarakte. Betroffene Männchen sterben zwischen E12,5 und der Geburt, je nach Hintergrund der Mauslinie. Männchen, die bis zur Geburt überleben, zeigen Symptome wie Chondrodysplasia punctata, Rhizomelia, Katarakte, verringertes Größenwachstum, Mikrognathia, Gaumenspalte und ein vollständiges Fehlen des Darms [36].

Die Mauslinie *Td<sup>ho</sup>* wurde 1997 erstmalig beschrieben und weist einen ähnlichen Phänotyp wie die *Td*-Mauslinie auf [143]. Das *Ebp*-Gen der *Td<sup>ho</sup>*-Mäuse besitzt eine doppelte Punktmutation (T530C, A532T), die zu einem zweifachen Aminosäureaustausch führt (L132P, S133C). Diese Mutationen liegen in der dritten transmembranen Domäne des Proteins. Es ist bisher unklar, ob diese Mutationen zu einem kompletten Verlust der Funktionsfähigkeit des Enzyms führen [142].

### 7-Dehydrocholesterin-Reduktase

Das 7-Dehydrocholesterin-Reduktase- (*DHCR7*-) Gen umfasst ca. 12,5 kb auf genomischer Ebene und ist auf Chromosom 11q12-13 lokalisiert [166]. Es kodiert für eine 7-Dehydrocholesterin-Reduktase ( $3\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta$ 7-Reduktase) und katalysiert die Umsetzung

von 7-Dehydrocholesterin zu Cholesterin, den letzten Schritt im Kandutsch-Russell-Biosyntheseweg [86]. Das Enzym ist an die Membran des ER gebunden. DHCR7 enthält ein sterolregulierendes Element und unterliegt wahrscheinlich einer Regulation über Phosphorylierung und Dephosphorylierung [144].

**SLOS** Das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS) wurde 1964 zum ersten mal beschrieben [152]. Aber erst 1993 erkannte man, dass es sich bei diesem autosomal rezessiven Missbildungssyndrom um einen metabolischen Defekt handelt, der die Cholesterinbiosynthese betrifft. In Patienten mit SLOS wurde ein mehr als 100-facher Anstieg von 7-Dehydrocholesterin (Cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol; 7DHC) im Plasma gemessen [82, 160]. Weitere fünf Jahre später wurde das humane *DHCR7*-Gen kloniert und lokalisiert [116]. Kurz darauf fanden mehrere Gruppen unabhängig voneinander heraus, dass Mutationen von *DHCR7* SLOS verursachen [52, 166, 168]. Dabei handelt es sich um das am häufigsten auftretende Missbildungssyndrom der postsqualenen Cholesterinbiosynthese. In den USA kommt es mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:40000 bis 1:50000 Lebendgeburten vor, bei Nordeuropäern mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:20000 [123]. Die tatsächliche Häufigkeit von SLOS liegt wahrscheinlich aber noch deutlich höher, da schwere Fälle zu spontanem Abort führen und deshalb statistisch nicht erfasst werden können.

SLOS-Patienten leiden an einer Vielzahl von körperlichen Beeinträchtigungen, die in ihrer Schwere jedoch stark variieren. Zu den am häufigsten beobachteten Symptomen zählen Missbildungen im Gesicht wie Mikrozephalie, Mikrognathia, Gaumenspalte, Katarakt, und milde Formen der Holoprosenzephalie. Des Weiteren wurden geistige Retardierung, Myelinisierungsstörungen, Kleinwüchsigkeit, postaxiale Polydaktylie an den Händen, Syndaktylie des zweiten und dritten Zehs, Herz-, Lungen- und Nierendefekte sowie selten Chondrodysplasia punctata beschrieben [88, 69].

**Dhcr7-Knock-out-Mäuse** Die bisher beschriebenen Mausmodelle *Bpa*, *Str*, *Td* und *Td<sup>ho</sup>* ähneln den humanen Krankheitssymptomen sehr stark. Dagegen weisen die *Dhcr7*-Knock-out-Mäuse starke Unterschiede zu den humanen Symptomen auf. Gemeinsamkeiten sind Kleinwüchsigkeit, Gaumenspalte und weitere Missbildungen des Gesichts. Offensichtliche Defekte in Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Ganglien oder Gliedmaßen konnten jedoch nicht entdeckt werden. Homozygote Mäuse sterben kurz nach der Geburt, wahrscheinlich an der Unfähigkeit, Nahrung aufzunehmen [167]. Obwohl das Gehirn der Mutanten morphologisch unauffällig ist, lassen unterschiedliche Symptome wie eine eingeschränkte Beweglichkeit und unkoordiniertes Saugen und Schlucken auf einen neurologischen Defekt schließen. Die biochemischen Parameter entsprechen denen bei menschlichen SLOS-Patienten.

Ein SLOS-ähnlicher Phänotyp lässt sich in Rattenembryonen durch die Verabreichung der Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren AY 9944 und BM 15766 erzeugen [94, 93], die beide

die 7-Dehydrocholesterin-Reduktase hemmen.

#### 1.1.4. $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 7

Sowohl das murine wie auch das humane  $17\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 7-Gen (*HSD17B7*) sind auf Chromosom 1 (humaner Genlokus 1q23) lokalisiert. Beide Gene bestehen aus 9 Exons und 8 Introns. Das humane Gen umfasst 21,8 kb. Für die humane *HSD17B7* wurden zwei Pseudogene beschrieben. Neben einem Pseudogen auf Chromosom 1 (Lokus 1q44), dessen codierende Sequenz viele Stoppcodons enthält und somit nicht zu einem funktionierenden Protein führen kann [162], befindet sich ein weiteres auf Chromosom 10 (Lokus 10q11.2). Es enthält ein Stoppcodon in Exon 6. Da alle zur Katalyse notwendigen Elemente in den Exons 1–5 kodiert werden und sich in den Exons 6 und 7 die für die Membranassoziiierung verantwortlichen Abschnitte befinden, könnte dieses Pseudogen alternativ für eine lösliche, aktive Form der HSD17B7 kodieren.

Die HSD17B7 wurde in der Ratte entdeckt und als Prolaktinrezeptor-assoziiertes Protein (PRAP) beschrieben [38]. Die Funktion dieses Proteins blieb zunächst jedoch unklar. Bald darauf erfolgte die erste Beschreibung des homologen Proteins in der Maus als mHsd17b7. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Enzym *in vitro* Estron in das biologisch aktivere  $17\beta$ -Estradiol überführt. Diese Tatsache und die gewebespezifische Expression hauptsächlich in den Ovarien legten eine Funktion zur Erhaltung der Trächtigkeit nahe. Zusätzlich wurde vermutet, dass die mHsd17b7 zur Deckung des zusätzlichen Estradiolbedarf während der Trächtigkeit beiträgt [122]. Beim Menschen konnten HSD17B7-ESTs zusätzlich in der Leber und in neuronalem Gewebe gefunden werden. Phylogenetische Analysen zeigten eine große Ähnlichkeit zwischen HSD17B7 und ERG27, einer 3-Ketosterol Reduktase aus der Hefe [15], die in der postsqualenen Ergosterolbiosynthese die Umsetzung von Zymosteron ( $\Delta^8$ - $\Delta^{24}$ -Cholestadien- $3\beta$ -on) zu Zymosterol ( $\Delta^8$ - $\Delta^{24}$ -Cholestadien- $3\beta$ -ol) katalysiert [55]. Sowohl die murine wie auch die humane HSD17B7 sind in der Lage, ERG27 in defizienten Hefestämmen zu ersetzen [111]. Es wurde vermutet, dass es sich bei HSD17B7 um das letzte bisher unbekannte Enzym der postsqualenen Cholesterinbiosynthese handelt [111]. Lokalisiert wurde HSD17B7 im ER.

Neben der bekannten Umwandlung von Estron zu Estradiol konnte auch die Umwandlung von Dihydrotestosteron zu  $5\alpha$ -Androstan- $3\beta,17\beta$ -diol durch die Katalyse von HSD17B7 nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden für die humane HSD17B7 die Umwandlung von Progesteron zu 4-Pregnen- $3\beta$ -ol-20-on und von  $20\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu 4-Pregnen- $3\beta,20\alpha$ -diol beschrieben [162]. Die Umsetzungsraten sind in diesen Fällen allerdings sehr gering. Allerdings zeigen diese Befunde, dass das Enzym neben der  $17\beta$ -Reduktase- auch eine 3-Reduktase-Aktivität besitzt, die es für die Umwandlung von Zymosteron zu Zymosterol benötigt. Auch diese Umsetzung konnte *in vitro* gezeigt werden [111].

## **HSD17B7 als möglicher Kandidat für weitere angeborene Stoffwechselerkrankungen in der Cholesterinbiosynthese**

*Hsd17b7* zeigt in Mäuseembryonen eine überlappende Expression mit anderen Genen der Cholesterinbiosynthese (*Hmgcr*, *Nsdhl*, *Ebp*, *Dhcr7*) [99]. Es spricht einiges dafür, dass auch bei einer Mutation von *Hsd17b7* Krankheitsbilder auftreten, die mit den Syndromen CHILD, CDPX oder SLOS vergleichbar sind. Zu Beginn meiner Arbeit wurde in unserem Labor an der Generierung einer *Hsd17b7*-Knock-out-Maus gearbeitet, die zur Klärung der molekularen Mechanismen dieser Erkrankungen beitragen sollte [125].

### **1.1.5. Regulation der Cholesterinhomeostase**

Die Cholesterinhomeostase ist für ein gesundes Leben und das Wohlbefinden unter den sich ständig ändernden Umweltbedingungen unerlässlich. Ein Ungleichgewicht dieser Homeostase kann zu entwicklungsbedingten Störungen wie CDPX2, CHILD und SLOS führen [129]. Es können aber auch die Steroidgenese [114], die Membranfluidität [108] oder die Bildung von HDL und LDL [110] beeinträchtigt werden.

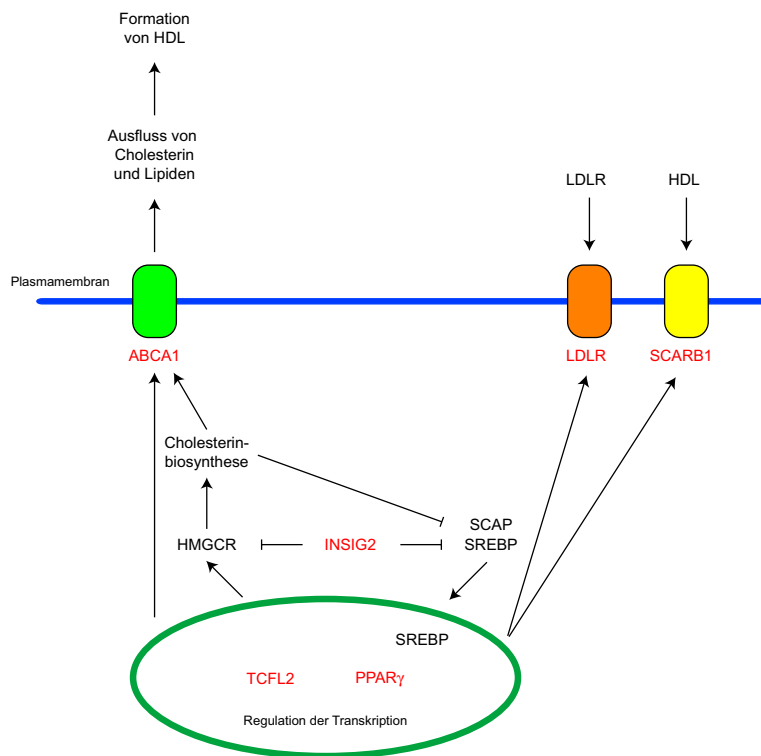
Die zelluläre Cholesterinhomeostase wird durch die Regulation des Cholesterinimports, der Neusynthese und des Abtransportes von Cholesterin aus der Zelle aufrecht erhalten (Abb. 1.2). Bis jetzt ist noch nicht vollständig klar, wie diese Prozesse coreguliert werden, aber man weiß, dass Cholesterinsensoren dabei eine wichtige Rolle spielen. Es konnten einige Proteine mit einer *sterol sensing domain* (SSD) identifiziert werden, die für eine korrekte Verteilung des Cholesterins innerhalb der Zelle und für die Regulation der Enzyme der Cholesterinbiosynthese unerlässlich sind [97]. Hierbei spielt auch die bereits zuvor beschriebene Regulation über SREBP und SCAP eine entscheidende Rolle. *Low density lipoprotein* (LDL) transportiert vom Körper selbst gebildetes Cholesterin von der Leber zu den Geweben und zirkuliert im Blut. Innerhalb der Zelle wird LDL über den endosomalen Weg über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran und dem ER neu verteilt. Dabei spielt das Niemann-Pick C1 Protein (NPC1) eine Schlüsselrolle. NPC1 dirigiert das Cholesterin von den späten Endosomen zum Golgi Apparat [71]. Mutationen in diesem Protein führen zur Akkumulation von Cholesterin in falschen endosomalen und lysosomalen Kompartimenten und zu einem allgemeinen Anstieg von freiem Cholesterin in der Zelle, was wiederum zu einer verringerten Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene führt [12].

Überschüssiges freies Cholesterin kann verestert und im Cytosol gespeichert werden oder aus der Zelle transportiert werden. Dabei spielen die *high density lipoproteins* (HDLs) eine entscheidende Rolle. HDLs transportieren überschüssiges Cholesterin von peripheren Geweben (z. B. der Arterienwand) zurück zur Leber, wo das Cholesterin dann über die Galle ausgeschieden werden kann. Für den Transport über HDLs stehen zwei unabhängige Mechanismen zur Verfügung [178]. Zum einen kann der Cholesterinausfluss über eine nicht



spezifische Diffusion von der Zelloberfläche mit einer anschließenden Veresterung des Cholesterins in HDL erfolgen, zum anderen kann das Cholesterin in einem von Apolipoprotein gesteuerten Prozess neues HDL bilden. Dabei werden Phospholipide und Cholesterin aus den Zellen entfernt. Dieser Vorgang wird durch eine Interaktion von lipidfreien und lipid-armen Apolipoproteinen mit der Zelloberfläche gesteuert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression einiger ausgewählter Gene der Cholesterinhomöostase an *Td*-Mäusen eingehender untersucht. Diese Gene werden im Folgenden kurz beschrieben.



**Abbildung 1.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Regulation der Cholesterinhomöostase.** Einige der an der Cholesterinhomöostase beteiligten Komponenten sind in vereinfachter Weise dargestellt. Die Gene, die in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht wurden, sind rot gekennzeichnet.

### ATP-binding cassette, sub-family A

*ATP-binding cassette, sub-family A* (ABCA1) ist an der Bildung von neuem HDL aus zellulären Phospholipiden und Cholesterin beteiligt. Diese Reaktion besteht aus zwei Elementen: der Assemblierung von HDL-Partikeln mit Phospholipiden durch Apolipoprote-

in und der Anreicherung von Cholesterin in HDL-Partikeln. ABCA1 ist notwendig für den ersten Schritt dieser Reaktion [179]. Es ist der mengenlimitierende Faktor der HDL-Assemblierung. ABCA1 selbst wird durch transkriptionelle und post-transkriptionelle Faktoren reguliert und ist ein Membranprotein.

### **Insulin induced gene 2**

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterinbiosynthese ist die Bildung von Mevalonat durch die HMG-CoA-Reduktase. Die Aktivität dieses Enzyms wird durch das *Insulin induced gene 2* (INSIG2) beeinflusst, welches für die Ubiquitinierung der HMG-CoA-Reduktase verantwortlich ist [45]. Dabei führt ein hoher Gehalt an Cholesterin bzw. Lathosterol zu einer Bindung von INSIG2 an HMG-CoA-Reduktase, wodurch es zu einer Translokation vom ER ins Cytoplasma und zu einer proteosomalen Degradierung kommt. Zudem hält INSIG2 das Protein SCAP im ER, was eine vermehrte Transkription von *HMGCR* verhindert [154]. Beide Prozesse werden durch Sterole (Lanosterol und Cholesterin) stimuliert. Hohe Sterolkonzentrationen führen zu einer Verringerung der Cholesterinbiosynthese.

### **Low density lipoprotein receptor**

Für die endozytotische Aufnahme von Cholesterin in Form von LDL ist der LDL-Rezeptor (LDLR) verantwortlich [17]. LDL transportiert endogenes Cholesterin von der Leber zu den Geweben und zirkuliert im Blut.

### **Peroxisome proliferator activated receptor gamma**

*Peroxisome proliferator activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) spielt eine wichtige Rolle bei der Cholesterinhomeostase und wirkt auf transkriptioneller Ebene. Zum einen ist PPAR $\gamma$  für die Hochregulation von *Abca1* verantwortlich, das wiederum den Abfluss von Cholesterin durch die Formation von HDL kontrolliert [1]. Diese Regulation wird durch ein hohes Level von oxidierten Lipiden ausgelöst [24]. PPAR $\gamma$  kontrolliert zusätzlich das Expressionslevel des LDL-Rezeptors und damit die Aufnahme von Cholesterin in Form von LDL.

### **Scavenger receptor class B, member 1**

*Scavenger receptor class B, member 1* (SCARB1) wurde als hepatischer HDL-Rezeptor identifiziert und ist auf molekularer Ebene gut charakterisiert [163]. Er spielt eine wichtige Rolle beim Rücktransport von HDL aus peripheren Zellen, wie z. B. Makrophagen und anderen Zellen der Arterienwand, zur Leber.

### **Transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box**

*Transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box* (TCF7L2) ist ein Transkriptionsfaktor, der das Cholesterinlevel auf noch ungeklärte Weise beeinflusst [60]. Das Genprodukt von *TCF7L2* ist ein Transkriptionsfaktor aus der *High mobility group box* und wird seit kurzem mit der Blut-Glucose-Homeostase in Verbindung gebracht. Es wird angenommen, dass TCF7L2 über die Regulation der Proglucagon-Genexpression in enteroendokrinen Zellen über den Wnt-Signalweg wirkt [176].

## **1.2. Apoptose**

Der programmierte Zelltod oder Apoptose ist ein elementarer Mechanismus, um nicht mehr benötigte Zellen aus Organismen zu entfernen, insbesondere während der Entwicklung und der Homeostase [84, 132]. Es handelt sich hierbei um einen exakt regulierten und hochorganisierten Vorgang, bei dem die Zellen schrumpfen, sich deformieren und den Kontakt zu den Nachbarzellen verlieren. Es kommt zu einer DNA-Fragmentierung, zur Kondensierung des Chromatins und zum Auflösen der Membranen in kleine Bläschen (*membrane blebbing*). Schließlich wird die Zelle in kompakte, membranumschlossene Vesikel fragmentiert, den so genannten *apoptotic bodies*, die Cytosol, das kondensierte Chromatin und Organellen enthalten. Diese werden über Phagocytose aus dem Gewebe geschleust ohne einen entzündlichen Vorgang auszulösen.

Der unregulierte Ablauf der Apoptose, der so genannte unregulierte Zelltod, wird mit einer wachsenden Anzahl klinischer Funktionsstörungen in Zusammenhang gebracht. Übermäßige Apoptose kann zu ischämischen Schäden und neurodegenerativen Erkrankungen führen, wohingegen eine unzureichende Apoptose Krebs, sich ausbreitende virale Infektionen und Autoimmunkrankheiten auslösen kann [47]. Im menschlichen Körper werden ca. 100000 Zellen pro Sekunde durch Mitose neu gebildet, während ungefähr die gleiche Anzahl durch Apoptose stirbt [164].

Zu den Apoptose auslösenden Faktoren zählen auch Steroide und Cholesterinderivate wie 25-Hydroxycholesterin und 7-Ketocholesterin [5, 103]. Der genaue Mechanismus dieser Wirkungsweise ist jedoch noch nicht geklärt.

### **1.2.1. Caspasen**

Caspasen (*cytosolic aspartate-specific proteases*) sind die Hauptmediatoren der Apoptose. Sie wurden durch die Entdeckung von CED-3, einem Genprodukt, das für den Zelltod bei *Caenorhabditis elegans* benötigt wird, und das dem *interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme* (ICE oder Caspase 1) aus Säugetieren ähnlich ist, mit Apoptose in Verbindung gebracht

[54]. Obwohl Caspase 1 keine offensichtliche Rolle in der Apoptose einnimmt, wurde sie das erste identifizierte Mitglied einer großen Familie von Proteasen, die bestimmte Rollen bei Entzündungen und Apoptose spielen. Beim Menschen besteht diese Familie aus 13 Proteinen, die sich in unterschiedliche Gruppen einteilen lassen. Bei der Apoptose übernehmen sie unterschiedliche Aufgaben als Initiator- und Effektorcaspasen.

Caspasen zeichnen sich durch Gemeinsamkeiten, betreffend die Aminosäuresequenz, die Struktur und die Substratspezifität, aus [95]. Alle Caspasen werden als Proenzyme mit einer Größe von 30 bis 50 kDa exprimiert, bestehend aus drei Domänen mit einer NH<sub>2</sub>-terminale Domäne, einer großen Untereinheit mit ca. 20 kDa und einer kleinen Untereinheit mit ca. 10 kDa. Die Aktivierung beinhaltet die Proteolyse zwischen den Domänen, gefolgt von einer Assoziation der großen und kleinen Untereinheit zu einem Heterodimer. Zwei Heterodimere bilden dann ein Tetramer mit zwei aktiven Zentren, die unabhängig voneinander funktionieren [165, 171].

### 1.2.2. Unterschiedliche Apoptosewege

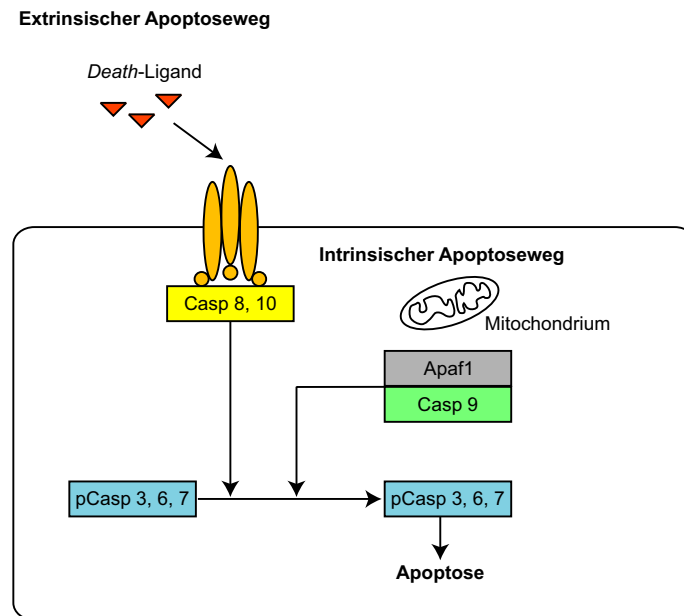
Die Initiation der Apoptose kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen, dem extrinsischen oder dem intrinsischen. Beide Wege sind schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt.

#### Extrinsische Apoptoseinitiation

Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung eines von mindestens fünf unterschiedlichen *cell death*-Rezeptoren, die alle zur TNF-Rezeptor-Familie gehören, eingeleitet [4]. Alle diese Rezeptoren besitzen in ihrer cytoplasmatischen Domäne eine so genannte *Death domain* (DD). Binden Liganden wie TNF an diese Rezeptoren, so binden die *death receptors* Adaptorproteine wie z. B. FADD (*Fas associated death domain*) über eine Interaktion mit deren DDs [26]. FADD besitzt zudem eine *death effector domain* (DED), über die die Initiatorcaspasen 8 und 10 über deren DEDs gebunden werden. Dieser so entstandene Rezeptor-Aktivatorprotein-Caspase-Komplex wird auch als *death inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet. Im Anschluss daran werden die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert.

#### Intrinsische Apoptoseinitiation

Beim intrinsischen Weg kommt es zu so genanntem zellulären Stress, der beispielsweise durch irreparable Genomschäden, verursacht durch Mutationen oder Arzneimittel, ausgelöst werden kann. Dieses intrazelluläre Signal bewirkt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Cytoplasma. Cytochrom c und ATP binden an Apaf1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*). Dadurch verändert sich die Konformation von Apaf1 und



**Abbildung 1.3: Stark vereinfachtes Schema der unterschiedlichen Apoptosewege.** Dargestellt ist zum einen der extrinsische Apoptoseweg, bei dem die Aktivierung über die Bindung von Liganden an die *cell death*-Rezeptoren erfolgt. Dadurch kommt es zur Bindung von Adaptorproteinen und damit zur Aktivierung der Initiatorcaspasen 8 und 10. Beim intrinsischen Apoptoseweg kommt es zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, ausgelöst durch zellulären Stress. Cytochrom c bindet dabei an Apaf1, das zunächst selbst aktiviert wird und anschließend die Caspase 9 aktiviert. In beiden Fällen kommt es anschließend zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7, wodurch es zur Apoptose kommt.

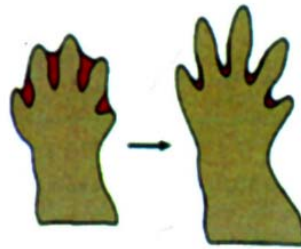
dessen *caspase recruitment domain* (CARD) wird zugänglich, so dass sie an die CARD der proCaspase 9 binden kann. Caspase 9 aktiviert dann die Caspasen 3, 6 und 7.

### 1.2.3. Apoptose in der Entwicklung

Apoptotische Vorgänge spielen in der Entwicklung eine entscheidende Rolle. Mutierte Nematoden, die keine Apoptose mehr durchführen können, haben zwar unter Laborbedingungen eine normale Lebenserwartung, besitzen allerdings ca. 15 % mehr Zellen als normal und sind in einigen Funktionen beeinträchtigt [44]. Anders reagieren apoptosedefiziente Fliegen, die schon früh in der Entwicklung sterben [169]. Auch Mäuse, bei denen CPP32 (Caspase 3) durch eine gezielte Mutation eliminiert wurde, sterben um den Zeitpunkt der Geburt. Sie weisen einen enormen Überschuss an Zellen in ihrem Nervensystem auf, obwohl die Apoptose in anderen Organen normal zu verlaufen scheint [96].

Apoptose erfüllt in der Entwicklung viele Funktionen, von denen die meisten die Elimi-

nierung von nicht benötigten Zellen beinhalten: Bildung von Strukturen, Entfernen nicht benötigter Strukturen, Kontrolle der Zellzahl, Eliminierung anormaler, falsch platzierter, nicht funktionierender oder schädlicher Zellen und die Produktion differenzierter Zellen ohne Organellen. Die Apoptose spielt eine entscheidende Rolle bei der Formung des Körpers. Die Bildung von Fingern in höheren Vertebraten wurde sehr gut untersucht, wobei Zellen zwischen den sich entwickelnden Fingern durch Apoptose entfernt werden (Abb. 1.4). Wird die Apoptose durch die Behandlung mit Caspaseinhibitoren blockiert, so ist auch die Fingerformation blockiert [83]. Strukturen, die nur während einem bestimmten Stadium der Entwicklung benötigt werden, wie z. B. der Schwanz von Kaulquappen, können durch Apoptose wieder eingeschmolzen werden. Auch Strukturen wie die Müllerschen Gänge, die bei weiblichen Säugern Uterus und Ovidukt bilden, werden bei männlichen Säugern durch Apoptose entfernt. Genauso verhält es sich mit den Wolffschen Gängen, die von den Weibchen nicht benötigt werden [84].



**Abbildung 1.4: Funktionen der Apoptose während der Entwicklung.** Die Apoptose spielt eine entscheidende Rolle bei der Gliedmaßenformierung. Die Finger entwickeln sich durch das kontrollierte Absterben des interdigitalen mesenchymalen Gewebes. (Abbildung modifiziert nach [84])

Apoptotische Prozesse sind nicht nur in der Entwicklung, sondern auch in Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Homeostase, Regulation und Funktion des Immunsystems und Entfernung defekter und damit gesundheitsgefährdender Zellen involviert.

### 1.3. RNA-Interferenz

Die gezielte Inaktivierung von Genen spielt in der Untersuchung von zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. In den letzten Jahren gewann die Technik der RNA-Interferenz (RNAi) an immer größerer Bedeutung. RNAi ist ein natürlich in der Zelle vorkommender Prozess, der in die zelluläre Abwehr gegen dsRNA-Viren, die Expansion von Transposons und die post-transkriptionelle Regulation involviert ist. Die Bedeutung der RNAi wird besonders daraus ersichtlich, dass die Genetiker A. Fire und C. Mello für die Entdeckung

dieses Mechanismus mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 2006 ausgezeichnet wurden.

Die RNAi-basierte Technologie ermöglicht einen gezielten Eingriff in die Expression und damit auf die Funktionalität einzelner Gene. Deswegen sollte sie in der vorliegenden Arbeit bei den komplexen und noch nicht verstandenen Regulationswegen der Cholesterinbiosynthese eingesetzt werden.

### 1.3.1. Entdeckung der RNAi

RNAi ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, der den Organismus vor der Beschädigung durch exogene (z. B. Viren) und endogene (z. B. mobile genetische Elemente) Parasiten schützt. Dabei kommt es zu einem sequenzspezifischen Knock-down einzelner Gene. Dieses Phänomen wurde zunächst in Pflanzen (*Petunia*) beobachtet und als Cosuppression oder allgemeiner als post-transkriptionelles Gen-Silencing (PTGS) bezeichnet [85]. Diese transgene Cosuppression wurde unter anderem auch in *Neurospora crassa* nachgewiesen und dort als *Quelling* bezeichnet [133].

A. Fire und seine Kollegen konnten 1998 erstmals zeigen, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) in *Caenorhabditis elegans* zu einem effizienten sequenzspezifischen Gen-Silencing führte [51]. Der Silencing-Effekt, der durch die dsRNA hervorgerufen wurde, war dabei mindestens zehnmal effektiver, als der durch einzelsträngige sense- oder antisense-RNAs. Bald darauf konnten small interfering RNAs (siRNAs) als Auslöser für RNAi identifiziert werden [62]. Durch die Transfektion von synthetischen siRNA-Doppelsträngen mit einer Länge von 21–23 Nukleotiden (nt) und sogar von ssRNAs gleicher Länge kann in eukaryotischen Zellen effizient RNAi induziert werden [41].

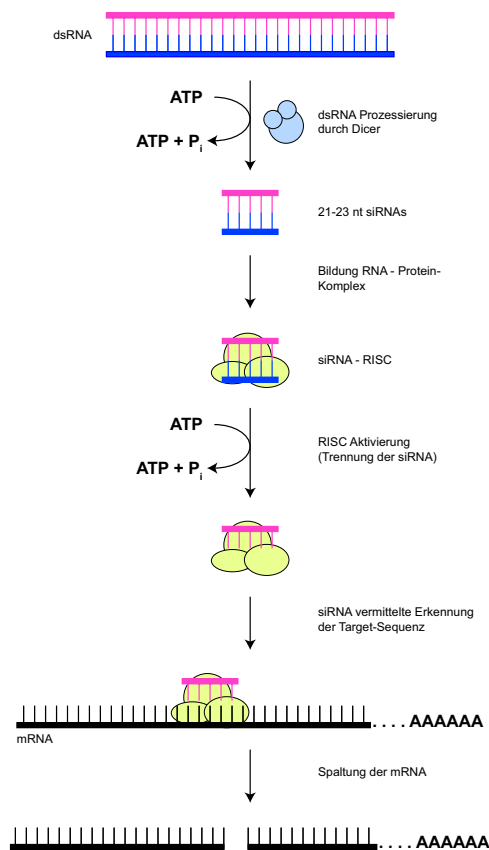
Die Genexpression der meisten Eukaryoten wird sequenzspezifisch durch microRNAs (miRNAs) reguliert [2, 6], die aus einzelsträngigen pre-miRNAs mit Haarnadel-Struktur durch Spaltung entstehen.

### 1.3.2. Mechanismus der RNAi

Bei den RNAi auslösenden siRNAs handelt es sich um 21–23 nt dsRNA-Duplexe. Diese besitzen 3'-Überhänge von 2–3 nt und freie 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxygruppen [42]. Diese Struktur ist charakteristisch für RNaseIII-spezifische enzymatische Spaltungsmuster. dsRNA wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch Dicer in siRNAs gespalten. Bei Dicer handelt es sich um ein Mitglied der RNaseIII-Familie, die in drei Gruppen eingeteilt werden kann. Dicer wird der dritten Gruppe zugeordnet, die sich durch eine doppelte katalytische Domäne und eine zusätzliche Helicase und eine PAZ-Domäne auszeichnet [10]. Dicer-Enzyme blieben während der Evolution stark konserviert. Man geht davon

## 1. Einleitung

aus, dass Dicer als dimeres Enzym arbeitet. Die so entstandenen siRNAs werden nun in den *RNA-inducing silencing complex* (RISC) aufgenommen. Dafür ist es unerlässlich, dass die siRNAs 5'-phosphoryliert sind [124]. Die Aufnahme der siRNA durch RISC ist unabhängig von ATP, allerdings wird für das Aufwinden der doppelsträngigen siRNA ATP benötigt. Die einzelsträngige antisense-siRNA dirigiert den RISC schließlich zu den komplementären mRNA-Molekülen. Die Target-mRNA wird an einer Stelle im Zentrum der neu entstandenen Duplexregion zwischen siRNA und der Target-mRNA, 10 nt vom 5'-Ende der siRNA entfernt, geschnitten [42]. Eine schematische Darstellung des RNAi-Mechanismus zeigt Abbildung 1.5.



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des RNAi-Signalweges.** Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von Dicer, einem Mitglied der RNaseIII-Familie, in einer ATP-abhängigen Reaktion in small interfering RNAs (siRNAs) gespalten. Diese siRNAs werden in den *RNA-inducing silencing complex* (RISC) aufgenommen. In einem weiteren, ATP-abhängigen Schritt werden die siRNAs aufgewunden. Der einzelsträngige antisense-Strang lenkt RISC zur mRNA mit der komplementären Sequenz der Target-mRNA. Diese wird anschließend endonucleolytisch gespalten.



## 1.4. Ziel der Arbeit

Störungen der embryonalen Cholesterinbiosynthese führen zu schweren Missbildungssyndromen, deren genetischer Hintergrund mittlerweile bekannt ist. Allerdings weiß man bis heute nichts über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, die für die Symptome verantwortlich sind. Ziel meiner Arbeit war die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bei Funktionsstörungen der Cholesterinbiosynthese und deren Auswirkungen. Unterschiedliche Technologien und Vorgehensweisen wurden in dieser Arbeit angewandt:

1. Charakterisierung der embryonalen Expression einzelner Enzyme der postsqualenen Cholesterinbiosynthese und genauere Betrachtung der betroffenen Gewebe.
2. Untersuchung der defekten Cholesterinbiosynthese mit Hilfe von Mausmutanten.
3. Für die Messung der enzymatischen Umsetzung einzelner postsqualener Enzyme der Cholesterinbiosynthese stand bis dahin keine geeignete Methode zur Verfügung. Deshalb sollte eine Methode zur Aktivitätsbestimmung mittels GC/MS etabliert werden.
4. Etablierung einer Methode für die Untersuchung der defekten Cholesterinbiosynthese mittels Zellkultur. Hierfür sollte die neue Technologie der RNAi genutzt werden. Mit ihrer Hilfe sollten Auswirkungen des Knock-downs auf das apoptotische Verhalten aufgedeckt werden.
5. Untersuchung der Auswirkungen einiger Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren auf Kulturzellen.



## 2. Ergebnisse

### 2.1. Untersuchung der Cholesterinbiosynthese in Wildtyp-Embryonen der Maus

Erst vor kurzem wurde in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass die Expression der an der Cholesterinbiosynthese beteiligten Enzyme in einem distinkten Muster auftritt [100]. Bis dato ging man noch von einer ubiquitären Cholesterinproduktion in der fötalen Leber aus [172]. Funktionelle Untersuchungen zur Aufklärung dieses Expressionsmusters wurden bisher allerdings nicht durchgeführt.

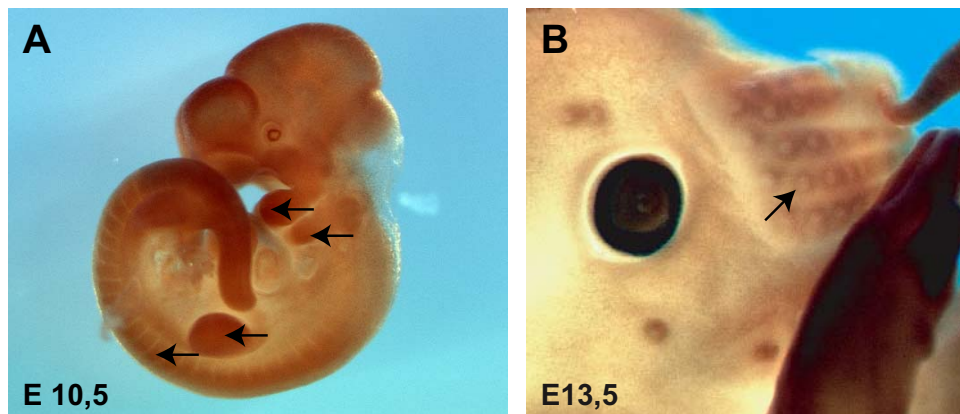
#### 2.1.1. Bestätigung der Expression aus whole mount in situ-Experimenten auf Proteinebene

Die Expression einiger der an der Cholesterinbiosynthese beteiligten Enzyme wie Hmg-CoA-Reduktase, Nsdhl, Hsd17b7, Ebp und Dhcr7 wurde mit *whole mount in situ* mRNA-Hybridisierung untersucht. In dieser Arbeit sollte diese Expression zusätzlich auf Proteinebene charakterisiert werden. Ziel war es zu klären, ob die Proteine möglicherweise durch Diffusion oder aktiven Transport in andere Bereiche der Embryonen wandern. Zu diesem Zweck war es notwendig, die Methodik zur Antikörperfärbung ganzer Embryonen für diese Anwendung zu entwickeln und zu optimieren. Dazu stand nur der Antikörper gegen Hsd17b7 zur Verfügung, der bis dahin lediglich in der Western Blot-Analyse eingesetzt worden war.

Bei der Immunfärbung der Embryonen von E10,5 bis E13,5 konnte das Expressionsmuster der *Hsd17B7*-mRNA bestätigt werden. In Embryonen an E10,5 bis E11,5 zeigte sich Hsd17b7 eindeutig im Neuralrohr, dem Gehirn und den Pharyngealbögen. Diese wiesen allerdings nicht von Beginn an eine komplette Färbung auf, sondern begannen sich im ersten Pharyngealbogen von anterior und im zweiten Pharyngealbogen von posterior ausgehend auszudehnen (Abb. 2.1, A). An E11,0 wurde Hsd17b7 in den kompletten Pharyngealbögen detektiert. Gleichzeitig war das Protein in den Spinalganglien und den vorderen Gliedmaßenknospen deutlich zu erkennen. An E11,5 und E12,5 waren alle Spinalganglien gefärbt. Ab etwa E13,0 zog sich die Expression in Richtung caudal zurück. Das Vorhandensein von Hsd17b7 konnte von E10,5 bis E13,5 im gesamten Gehirn nachgewiesen werden. An E13,5 brachte die *whole mount in situ*-Hybridisierung eine Expression in den Follikeln

## 2. Ergebnisse

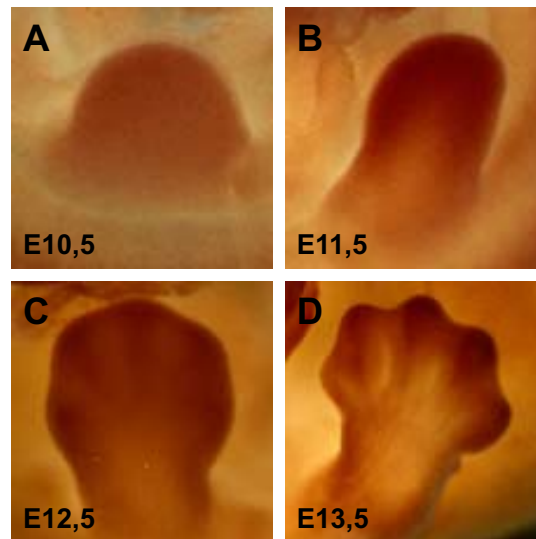
der Vibrissae zutage. Diese zeigte sich ebenfalls einheitlich bei allen untersuchten Genen der Cholesterinbiosynthese. Diese Bestätigung der Expression konnte mit Hilfe der Immunfärbung gegen Hsd17b7 erbracht werden (Abb. 2.1, B). Dabei manifestierte sich auch die Spezifität dieser Färbung.



**Abbildung 2.1: Expression von Hsd17b7 in Mausembryonen an E10,5 und E13,5.** Mit Hilfe von Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen Hsd17b7 konnte das Expressionsmuster einiger Enzyme der Cholesterinbiosynthese aus den *whole mount in situ*-Hybridisierungen bestätigt werden. **A** zeigt einen Embryo an E10,5 mit Hsd17b7 im Gehirn, den Pharyngealbögen, dem Neuralrohr, den Gliedmaßenknospen und der Schwanzspitze. In **B** wurde eine spezifische Färbung der Follikel der Vibrissae eindeutig nachgewiesen. Die Färbung zeigte sich dabei in kreisrunden Domänen um die Follikel.

In den Gliedmaßenknospen der vorderen und hinteren Extremitäten ließ sich mit Hilfe der *whole mount in situ*-Hybridisierung ein dynamisches Expressionsmuster der Cholesterinbiosynthese-Gene identifizieren. Bei der Immunfärbung zeigte sich bis E11,0 eine gleichmäßige Färbung der Gliedmaßenknospen. Ab E12,5 konnte Hsd17b7 zunehmend in den interdigitalen Bereichen lokalisiert werden und an E13,5 wurde die Immunfärbung hauptsächlich in Bereichen detektiert, die direkt die Finger umschlossen (Abb. 2.2).

Mit diesen Versuchen gelang erstmalig der Nachweis der Expression der Cholesterinbiosynthese-Gene für das Enzym Hsd17b7 auf Proteinebene. Außerdem wurde dabei deutlich, dass das Enzym am Ort der Synthese aktiv wird und nicht in andere Gewebe transportiert wird oder diffundiert.



**Abbildung 2.2: Expression von Hsd17b7 während der Gliedmaßenentwicklung.** Gezeigt sind jeweils die vorderen Gliedmaßen. Bis E11,0 fand sich das Protein in der gesamten Gliedmaßenknospe. Danach konnte die Expression zunehmend in den interdigitalen Bereichen nachgewiesen werden.

### 2.1.2. Cholesterinbiosynthese kolokalisiert zum Teil mit apoptotischen Bereichen

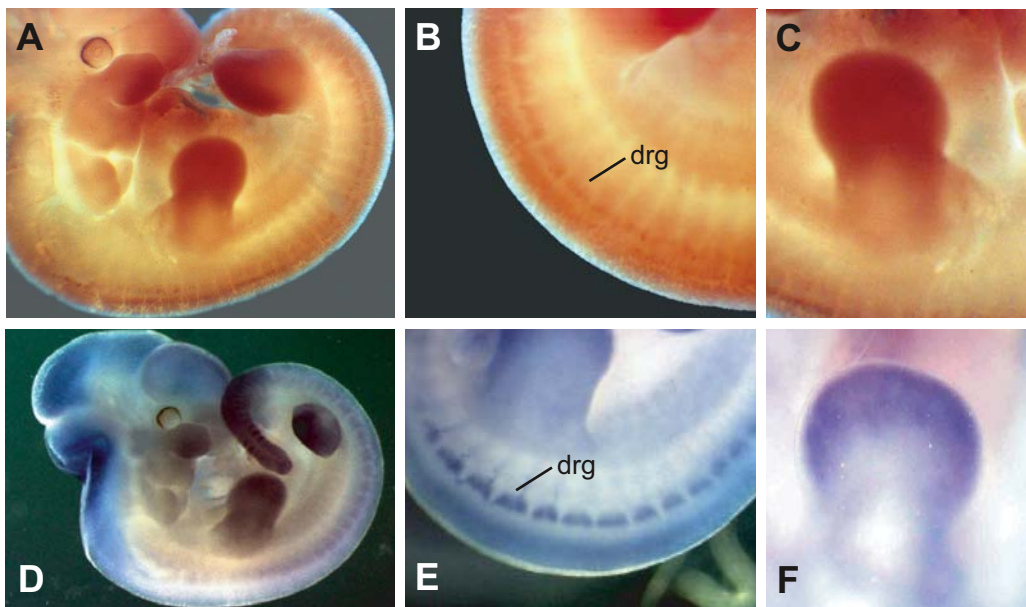
Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Bereiche extrem hoher lokaler Cholesterinbiosynthese scheinen nicht immer auch Bereiche erhöhter Proliferation und enormen Wachstums zu sein. Zu diesen gehören beispielsweise die interdigitalen Bereiche, die bei der Gliedmaßenentwicklung durch Apoptose wieder eingeschmolzen werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Lokalisation von apoptotischen Bereichen an Mausembryonen untersucht, um eine mögliche Colokalisation mit Bereichen hoher Cholesterinbiosynthese aufzudecken.

Für die Lokalisation der Apoptose in Wildtyp-Embryonen wurde hier eine *whole mount*-Immunfärbung mit einem Antikörper gegen aktive Caspese-3, einem vom Apoptoseweg (extrinsisch oder intrinsisch) unabhängigen Apoptosemarker, durchgeführt. Apoptose fand sich nachweislich an E10,5 in Bereichen des Gehirns, in den Pharyngealbögen, den Ganglien, den Gliedmaßenknospen und der Schwanzspitze (Abb. 2.3).

In Embryonen an E11,5 konnte eine Colokalisation unterschiedlicher Gene der Cholesterinbiosynthese (in diesem Fall *Hmgcr*) mit apoptotischen Bereichen in den Pharyngealbögen, den Gliedmaßenknospen, den dorsalen Wurzelganglien, dem Neuralrohr, dem Trigeminus Ganglion und im Schwanz nachgewiesen werden (Abb. 2.4). Auch andere Gene der Cholesterinbiosynthese wie *Nsdhl*, *Hsd17b7*, *Ebp* und *Dhcr7* werden im gleichen Muster



**Abbildung 2.3: Aktive Caspase-3 in Embryonen an E10,5.** Apoptose konnte an E10,5 in den Pharyngealbögen, in Bereichen des Gehirns, den Gliedmaßenknospen und den Ganglien nachgewiesen werden.



**Abbildung 2.4: Vergleich apoptotischer Regionen mit Bereichen der Cholesterinbiosynthese im Embryo an E11,5.** Abbildung A–C zeigt die Immunfärbung des Antikörpers gegen aktive Caspase-3. In Abbildung D–F ist die *whole mount in situ*-Hybridisierung von *Hmgcr*, stellvertretend für unterschiedliche Enzyme der Cholesterinbiosynthese, dargestellt.

exprimiert.

Mit Hilfe dieser Versuche wurde gezeigt, dass eine Colokalisation von Apoptose und Cholesterinbiosynthese in unterschiedlichen Bereichen des sich entwickelnden Mausembryos stattfindet.

### 2.1.3. Entwicklung von Antikörpern gegen NSDHL und EBP

Bisher sind für die Proteine NSDHL und EBP keine kommerziellen Antikörper verfügbar. Um vergleichbare Untersuchungen wie mit Hsd17b7 durchführen zu können, sollten in dieser Arbeit Peptidantikörper sowohl für immunhistochemische Arbeiten, Western Blot-Analysen und für die Anwendung in Zellkultur etabliert werden.

#### Sequenzauswahl

Die Proteine NSDHL und EBP sind membranverankert im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert [21, 39]. Für die gewünschten Anwendungsbereiche sollten Peptidantikörper hergestellt werden, die unsiversell einsetzbar sind und speziesübergreifend an die entsprechenden Proteine binden können. Dazu wurde zunächst ein Alignment der Aminosäuresequenzen von NSDHL und EBP aus Mensch, Maus und Ratte durchgeführt.

Das menschliche NSDHL besitzt elf Aminosäuren mehr als die homologen Proteine aus Maus und Ratte. Die Sequenzen sind in weiten Bereichen identisch und besitzen je eine transmembrane Domäne (Abb. 2.5). Die Peptidsequenz des humanen NSDHL für die Herstellung des Antikörpers wurde so gewählt, dass sie im Cytoplasma liegt und in weiten Bereichen in allen drei Spezies identisch ist.

Die Auswahl der Peptidsequenz für die Generierung des Antikörpers gegen EBP gestaltete sich erheblich schwieriger. Das Protein besitzt vier transmembrane Domänen (Abb. 2.6). Nach den vorher genannten Kriterien war nur eine Peptidsequenz im N- und C-Terminus sowie im Bereich zwischen den transmembranen Domänen zwei und drei (Aminosäuren 87–116) geeignet, da nur diese im Cytoplasma liegen. Aus diesem Bereich wurde eine Sequenz aus 15 Aminosäuren ausgewählt, die eine möglichst große Übereinstimmung zwischen den drei Spezies aufweist.

Die Peptide wurde von der Firma BioLUX GmbH (Stuttgart) synthetisiert. Die ausgewählten Sequenzen wurden an einem Ende mit einem Cystein verlängert, um daran KLH koppeln zu können. Ebenfalls von der BioLUX GmbH wurde anschließend die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen zur Generierung polyklonaler Antikörper durchgeführt. Wir erhielten jeweils zwei polyklonale Antikörper zur Detektion von NSDHL und EBP.

## 2. Ergebnisse

mNSDHL	MEQAVHGESKRGQVTGTHLTNDIS-----KAKKCTVIGGSGFLGQHMQVLE	48
rNSDHL	MEQAVRSESKKQVGTDLINQV-----KAKKCTVIGGSGFLGQHMQVLLS	48
hNSDHL	MEPAVS-EPMRDQVARTHLTETDTPKVNADIEKVNQNAKRCCTVIGGSGFLGQHMQVLLA	59
mNSDHL	RGYTVNVFDIHQGFDPNPRVQFFIGDLCNQDLYPALKGVSTVPHCASPPYSSNNKELFYR	108
rNSDHL	RGYAVNVFVQGFDPNPRVQFFIGDLCNQDLYPALKGVSTVPHCASPPSSNNKELFYR	108
hNSDHL	RGYAVNVFDIQGFDPNPRVQFFIGDLCNQDLYPALKGVSTVPHCASPPSSNNKELFYR	119
mNSDHL	VNFIGTKVIETCREAGVQKLIITSSASVVFEGVDIKNGTEDLPYAMKPIDYTTETKILQ	168
rNSDHL	VNSTGKTVIETCKEAGVQKLIITSSASVVFEGVDIKNGTEDLPYAMKPIDYTTETKILQ	168
hNSDHL	VNYIGTKNVIETCKEAGVQKLIITSSASVVFEGVDIKNGTEDLPYAMKPIDYTTETKILQ	179
mNSDHL	ERAVLDANDPKKNFLTAAIRPHGIFGPRDPQLVPEILIDAARKGKMKFMI GNGENLVDFTF	228
rNSDHL	ERAVLDANDPKKNFLTAAIRPHGIFGPRDPQLVPEVPLIDAARKGKMKFMI GNGKLVDFTF	228
hNSDHL	ERAVLGANDPEKNFLTAIRPHGIFGPRDPQLVPEILEAARNGKMKFVI GNGKLVDFTF	239
mNSDHL	VENVVHGHILAAEHLSDAALGGKAFHITNDEPIPFWTFLSRIITGLNYEAPKYHIPYWM	288
rNSDHL	VENVVHGHILAAEHLSDAALGGKAFHITNDEPIPFWTFLSRIITGLNYEAPKYHIPYRV	288
hNSDHL	VENVVHGHILAAEQLSRDSTLGGKAFHITNDEPIPFWTFLSRIITGLNYEAPKYHIPYVW	299
mNSDHL	AYYLAFLLSLLVMVSPLIQIQPTFTPIRVALAGTFPHYYSCEKAKKLFGYRPLVTMDEAV	348
rNSDHL	AYYLAFLLSLLVMVSPLIQIQPTFTPIRVALAGTFPHYYSCEKAKKLIQYRPLVTMDDAV	348
hNSDHL	AYYLAFLLSLLVMVSEVIQLQPTFTPIRVALAGTFPHYYSCEKAKKAMGYQPLVTMDAM	359
mNSDHL	ERTVQSFHHLRDKK	362
rNSDHL	ERTVQSFHHLRDKK	362
hNSDHL	ERTVQSFHHLRRVK	373

**Abbildung 2.5: Aminosäure-Sequenzvergleich von NSDHL aus unterschiedlichen Vertebraten.** Aminosäuren, die in Maus (m), Ratte (r) und im Menschen (h) übereinstimmen sind grau hinterlegt. Der blaue Balken kennzeichnet eine vorausberechnete transmembrane Region. Die Sequenz, gegen die der Antikörper gebildet wurde, ist rot gekennzeichnet.

mEBP	MTTNVPLHPYWRHLKLDNFVPNDLPTSHILVGLFSISGGLIVITWLLSSRASVVPLGA	60
rEBP	MTTNMLPLHPYWRHLRLDNFVPNDLPTWHILVGLFSFSGVLIIVITWLLSSRVSVVPLGT	60
hEBP	MTTNAGPLHPYWRHLRLDNFVPNDRPTWHILAGLFSVTGVLVVTWLLSGRAAVVPLGT	60
mEBP	GRRALCWFVAVCTFIHLVIEGWFSLYNGILLEDQAFSLQWKEYSKGDSRYILSDSFVVC	120
rEBP	GRRALCWFVAVCTFIHLVIEGWFSFYHEILLEDQAFSLQWKEYSKGDSRYILSDGFIVC	120
hEBP	WRRLSLCWFVAVCGFIHLVIEGWFLVLYYEDLLGDQAFSLQWKEYAKGDSRYILGDNFTVC	120
mEBP	METVTACLWGPLSLWVVIAPLRQPPFRFVLQLVVSMGQIYGDVLYFLTELHEGLQHGEIG	180
rEBP	MESVTACLWGPLSLWVVIAPLRHQPPFRFVLQLVVSVGQIYGDVLYFLTELRDGFQHGELG	180
hEBP	METITACLWGPLSLWVVIAPLRQHPLRFILQLVVSVGQIYGDVLYFLTEHRDGFQHGELG	180
mEBP	HPVYFWFYFVFLNAVWLVIPI SILVLDIAIKHLTSAQSVLDSKVMKIKSKHN	230
rEBP	HPLYFWFYFVIMNAIWLVIPIGILVFDIAIKHLTNAQSMLDNKVMKIKSKHN	230
hEBP	HPLYFWFYFVFMNALWLVLPGVVLVLDIAIKHLTNAQSTLDAKATKAKSKKN	230

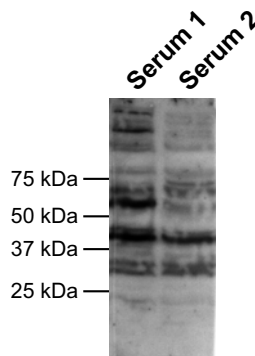
**Abbildung 2.6: Aminosäure-Sequenzvergleich von EBP aus unterschiedlichen Vertebraten.** Aminosäuren, die in Maus (m), Ratte (r) und im Menschen (h) übereinstimmen sind grau hinterlegt. Die blauen Balken kennzeichnen vier vorausberechnete transmembrane Regionen. Die Sequenz, gegen die der Antikörper gebildet wurde, ist rot gekennzeichnet.



### Funktionalität der Antikörper im Western Blot

Die Antikörper gegen NSDHL und EBP sollten vor allen Dingen auch in der Western Blot-Analyse eingesetzt werden. Dazu wurden diese Antikörper zunächst bei unterschiedlichen Bedingungen getestet.

Sowohl HeLa- als auch HepG2-Zellen exprimieren die Proteine NSDHL und EBP. Für die Funktionalitätsprüfung der Peptidantikörper wurden NSDHL und EBP durch Transfektion der Zellen mit pcDNA3/hNSDHL bzw. pcDNA3/hEBP überexprimiert und die Membranfraktionen anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt. NSDHL besitzt ein Molekulargewicht von 41,9 kDa, EBP von 26,2 kDa. Bei der Western Blot-Analyse wurden die Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Unter keinen der hier getesteten Bedingungen konnte für NSDHL (Daten nicht gezeigt) und für EBP (Abb. 2.7) eine spezifische Bindung der getesteten Peptidantikörper nachgewiesen werden. Es traten sehr viele unspezifische Banden auf, in deren Hintergrund eine mögliche spezifische Bindung des Antikörpers nicht nachgewiesen werden konnte. Deshalb wurden diese Antikörper gegen NSDHL und EBP im weiteren Verlauf der Arbeit nicht für die Analyse im Western Blot eingesetzt.



**Abbildung 2.7: Detektion von EBP im Western Blot.** Humanes EBP wurde in HeLa-Zellen überexprimiert. Beim anschließenden Western Blot wurden die Antikörper aus zwei immunisierten Kaninchen getestet. Beide zeigten nur unspezifische Färbungen.

### Funktionalität der Antikörper in der Immuncytochemie

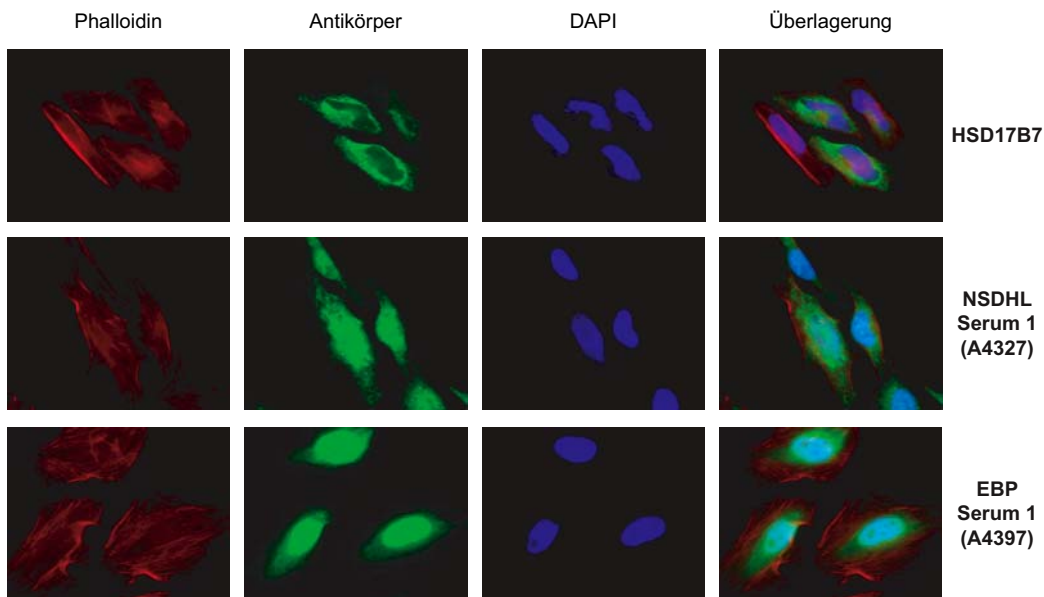
Mit Hilfe dieser Peptidantikörper sollten die jeweiligen Proteinmengen der zu untersuchenden Enzyme NSDHL und EBP in Zellkultur bestimmt werden. Insbesondere war hier die Reduktion der Proteine durch RNAi von besonderem Interesse. Dafür wurden diese polyklonalen Antikörper für die Färbung von Zellen und damit auch für die subzelluläre Lokalisation eingesetzt. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA3/hNSDHL, pcDNA3/hHSD17B7

## 2. Ergebnisse

und pcDNA3/hEBP transfiziert und anschließend für mindestens 24 h inkubiert, so dass die Überexpression der einzelnen Proteine deutlich sichtbar sein sollte. Die Zellen wurden anschließend gefärbt. Um die Struktur der einzelnen Zellen besser identifizieren zu können, wurde das Cytoskelett mit Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte die Lokalisation von HSD17B7 im Endoplasmatischen Retikulum mit Hilfe eines GFP-Fusionsproteins gezeigt werden [111]. Deshalb wurde in dieser Arbeit HSD17B7 als positive Referenz für die ER-Lokalisation verwendet, da auch NSDHL und EBP im ER lokalisiert sind [21, 39].

Die Struktur des Endoplasmatischen Retikulums war bei der Detektion von HSD17B7 deutlich zu erkennen. Für die Detektion von NSDHL und EBP wurden die Peptidantikörper aus beiden immunisierten Kaninchen getestet. Die Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Gezeigt sind die Daten repräsentativ für einen Antikörper (Abb. 2.8). Die Bindung der Antikörper scheint auch hier unspezifisch, da nicht wie erwartet das ER gefärbt wurde, sondern sowohl das gesamte Cytoskelett als auch die Zellkerne eine Färbung aufwiesen. Aus diesem Grund wurden diese Antikörper für die Proteindetektion in Zellkultur nicht eingesetzt.



**Abbildung 2.8: Detektion von NSDHL, HSD17B7 und EBP in Zellkultur.** Die Proteine NSDHL, HSD17B7 und EBP wurden in HeLa Zellen überexprimiert und anschließend mit den jeweiligen Antikörpern detektiert. Dabei diente der Nachweis von HSD17B7 als positive Referenz für die ER-Lokalisation. Die Antikörper gegen NSDHL und EBP zeigen eine unspezifische Färbung des Cytoplasmas und der Zellkerne.

### **Funktionalität der Antikörper in der Immunhistochemie**

Obwohl die Antikörper gegen Peptide der humanen Sequenzen generiert wurden, bestand die Möglichkeit, dass sie in der Immunhistochemie von Mausgeweben eine eindeutige Bindung zeigen.

Die Antikörper wurden sowohl an Gewebeschnitten der Leber (hohe Expression der zu untersuchenden Proteine) als auch an Paraffinschnitten ganzer Embryonen getestet. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden zur Demaskierung der Epitope in Paraffinschnitten angewandt. Gleichzeitig wurden die Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt. Leider zeigte sich auch hier keine spezifische Färbung der Gewebe (Daten nicht gezeigt).

Diese Peptidantikörper wurden nicht für weitere Versuche eingesetzt, da sie in keiner der hier getesteten Anwendungsbereiche eindeutige Ergebnisse lieferten.

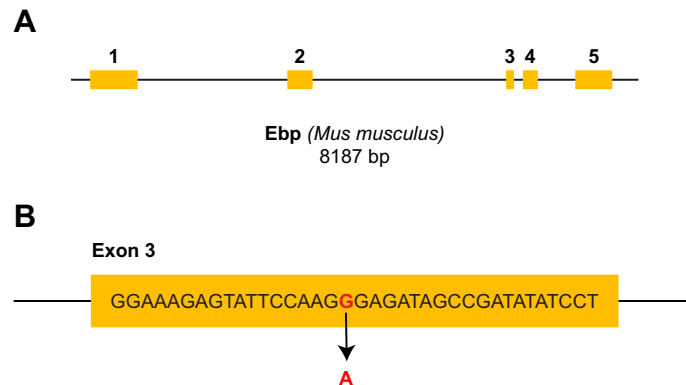
## **2.2. Untersuchung der Cholesterinbiosynthese an Mausmutanten**

Es sind unterschiedliche Mausmodelle mit Mutationen im postsqualenen Cholesterinbiosyntheseweg bekannt, die als Modelle für die entsprechenden humanen Missbildungssyndrome fungieren. Bei einigen dieser Mausmodelle erfolgte lediglich die Charakterisierung der Mutation und einige phänotypische Betrachtungen. Eine eingehendere Untersuchung dieser Mauslinien könnte Aufschlüsse über die den Funktionsstörungen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen liefern. Aus diesem Grund sollten zwei dieser Mauslinien in unserem Labor etabliert werden. Dazu wurden Mauslinien mit Mutationen in den Genen *Nsdhl* und *Ebp* ausgewählt, die für die humanen Syndrome CHILD und CDPX2 verantwortlich sind.

Die Mauslinien Bare patches (*Bpa*) und Striated (*Str*) weisen Mutationen im *Nsdhl*-Gen auf, wobei mehrere Linien mit unterschiedlichen Mutationen existieren [106]. Für die Untersuchungen wurde die Mauslinie *Bpa*<sup>6H</sup> ausgewählt. Diese zeichnet sich durch eine Deletion von 18 Basen an Position 655 aus, die zu einem Verlust von sechs Aminosäuren (G174D del TEDLPY) führt.

Tattered- (*Td*-) Mäuse besitzen eine Mutation im *Ebp*-Gen. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation an Position 1082 (Position 320 der kodierenden Sequenz), die zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Arginin (G107R) an einer hoch konservierten Stelle führt (Abb. 2.9).

Für beide Mauslinien wurden gefrorene Embryonen beim Medical Research Council (MRC, Harwell) bestellt. Die *Bpa*<sup>6H</sup>-Embryonen stammen aus einer Verpaarung von heterozygoten *Bpa*<sup>6H</sup>-Weibchen mit (C3H/HeH x 101/H)F<sub>1</sub>-Männchen, die *Td*-Embryonen aus Verpaa-



**Abbildung 2.9: Genstruktur von *Ebp*.** A zeigt das *Ebp*-Gen mit Exon- und Intronstruktur (A). In B ist die Punktmutation an Position 320 der kodierenden Sequenz in Exon 3 dargestellt, bei der ein Guanin durch ein Adenin ersetzt wird.

rungen von heterozygoten *Td*-Weibchen mit (C3H/HeH x 101/H)<sub>F1</sub>-Männchen.

### 2.2.1. Embryotransfer

Der Embryotransfer der *Bpa*<sup>6H</sup>- und *Td*-Embryonen wurde in der Abteilung für Vergleichende Medizin des GSF-Forschungszentrums durchgeführt. Dabei erhielten wir ein Weibchen der Linie *Bpa*<sup>6H</sup> und 2 Weibchen und 2 Männchen der Linie *Td*. Leider wies keines der Nachkommen die gesuchte Mutation auf. Ein zweiter Embryotransfer erbrachte keine Nachkommen der *Bpa*<sup>6H</sup>-Linie. Von den transferierten *Td*-Embryonen wurden fünf Weibchen und zwei Männchen geboren, wovon zwei der Weibchen die gesuchte Mutation aufwiesen. Auf die erneute Anschaffung weiterer gefrorenen Embryonen der *Bpa*<sup>6H</sup>-Linie wurde verzichtet, da auch MRC diese Linie nicht wieder revitalisieren konnte.

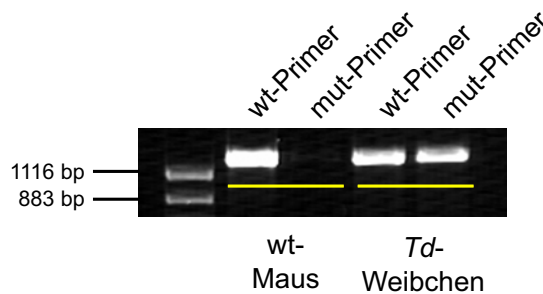
In der vorliegenden Arbeit konnten deshalb nur die *Td*-Mäuse untersucht werden. Bei allen in dieser Arbeit im adulten Stadium untersuchten betroffenen Tieren handelt es sich um heterozygote Weibchen. *Ebp* ist ein X-chromosomales Gen. Die Mutation der *Td*-Mäuse ist deshalb für männliche Nachkommen letal; diese sterben noch vor der Geburt. Lediglich im Embryonalstadium konnten männliche hemizygoten *Td*-Nachkommen untersucht werden.

### 2.2.2. Genotypisierung der *Td*-Mäuse

Zunächst musste eine Methode etabliert werden, mit der sich die heterozygoten *Td*-Mäuse möglichst schnell und eindeutig genotypisieren lassen. Da die Mutante eine Punktmutation im *Ebp*-Gen trägt wurde für die Genotypisierung dieser Mäuse eine spezielle Nachweis-PCR entwickelt. In dieser PCR wurden zwei unterschiedliche forward-Primer eingesetzt,

## 2. Ergebnisse

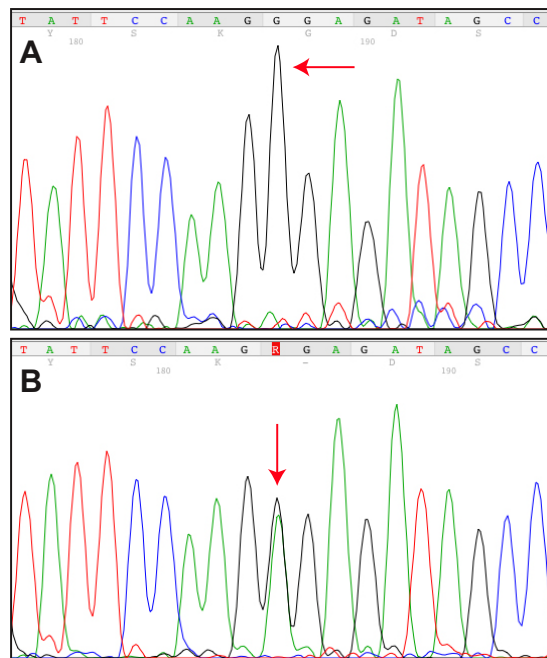
die sich nur an der letzten Position am 3'-Ende unterscheiden. Der Primer zur Detektion des Wildtyp-Allels endet am 3'-Ende mit einem Guanin (wt-Primer). Zur Amplifizierung des mutierten Allels wurde der forward-Primer mit einem Adenin am Ende (mut-Primer) verwendet. Jede genomische DNA wurde mit beiden forward-Primern amplifiziert, wobei der reverse-Primer jedes mal gleich blieb. Handelte es sich um eine Wildtyp-Maus, so ergab nur die PCR-Reaktion mit dem wt-Primer eine Bande. Bei einer heterozygoten *Td*-Maus lieferte auch die PCR-Reaktion mit dem mut-Primer ein Produkt, so dass man auf einem Agarosegel zwei Banden erhielt (Abb. 2.10). Diese Methode wurde auch zur Genotypisierung von *Td*-Embryonen eingesetzt. Bei diesen konnten auch hemizygoten Männchen identifiziert werden, bei denen nur die PCR mit dem mut-Primer eine Bande ergab (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2.10: Genotypisierung der *Td*-Mäuse mittels PCR.** Für die PCR wurden zwei unterschiedliche forward-Primer verwendet. Diese unterscheiden sich lediglich in der letzten Base am 3'-Ende, die entweder ein G (wt-Primer) oder ein A (mut-Primer) ist. Für beide Reaktionen wurde der gleiche reverse-Primer verwendet. Jede genomische DNA-Probe wurde in zwei PCRs mit unterschiedlichen forward-Primern eingesetzt. Bei einer Wildtyp-Maus erfolgte die Amplifizierung nur mit dem wt-Primer. Bei heterozygoten *Td*-Mäusen erhielt man mit beiden forward-Primern Banden.

Um die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden die DNA der zu genotypisierenden Mäuse zu Beginn der Arbeit zusätzlich sequenziert. Im Elektropherogramm war der Unterschied zwischen Wildtyp- (Abb. 2.11, A) und heterozygoten *Td*-Mäusen (Abb. 2.11, B) eindeutig zu erkennen. Wildtyp-Mäuse zeigten an dieser Position lediglich ein Adenin, wohingegen *Td*-Mäuse sowohl ein Adenin als auch ein Guanin enthielten. Durch die Sequenzierungen konnte die Genotypisierung mittels PCR eindeutig bestätigt werden. Deshalb wurde im Verlauf der Arbeit auf die Kontrolle mittels Sequenzierung verzichtet.

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.11: Elektropherogramm von Wildtyp- und heterozygoten *Td*-Mäusen.** Mit Hilfe der Sequenzierung konnte bei Wildtyp-Mäusen eindeutig ein Guanin an Position 320 der kodierenden Sequenz nachgewiesen werden (**A**). Heterozygote *Td*-Weibchen zeigten an gleicher Stelle sowohl ein Guanin als auch ein Adenin (**B**).

### 2.2.3. Rückkreuzung der *Td*-Mäuse auf einen definierten Hintergrund und Zucht

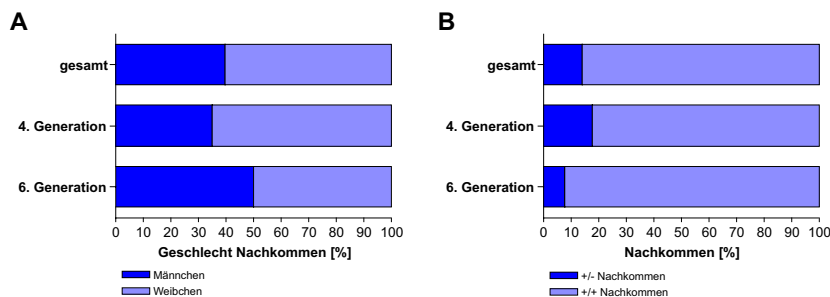
Um die Mäuse genauer untersuchen zu können, war es wichtig, dass diese Mäuse einen definierten genetischen Hintergrund besitzen. Die einzelnen Mauslinien wie z. B. C3H und C57/Bl6J weisen Unterschiede in mehreren Parametern auf, die sonst fälschlicherweise als Auswirkungen der Mutation ausgelegt werden könnten.

Die *Td*-Weibchen aus dem Embryotransfer wurden mit C57/Bl6J-Männchen verpaart, um eine Rückkreuzung auf die C57/Bl6J-Linie zu erhalten. Bei der Zucht der *Td*-Mäuse mussten wir feststellen, dass sich diese Mäuse nur sehr schlecht fortpflanzten. Wurfzahlen von fünf oder mehr Nachkommen waren und sind eine sehr selten auftretende Ausnahme. Über die gesamte Zuchtspanne betrachtet wurden im Durchschnitt 3,6 Junge pro Wurf geboren. Statistisch kann man 50 % männliche und 50 % weibliche Nachkommen erwarten. Da das *Ebp*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und die Mutation für männliche Träger letal ist, werden statistisch 25 % aller Nachkommen schon vor der Geburt wieder eingeschmolzen. Berücksichtigt man dies, so sollte man ca. 33 % männliche und 66 %

## 2. Ergebnisse

weibliche Nachkommen erhalten. Der Prozentsatz an tatsächlich geborenen Männchen liegt im Durchschnitt bei 35 %. Allerdings steigt der Anteil an männlichen Nachkommen in der 5. und 6. Generation deutlich bis auf 50 % an (Abb. 2.12, A).

Von den zur Welt gekommenen Nachkommen müssten laut Statistik 66 % weiblich sein, wovon wiederum die Hälfte die Mutation tragen sollte. Allerdings konnte während der gesamten Zuchtdauer beobachtet werden, dass der Anteil an heterozygoten *Td*-Weibchen erheblich geringer war. Dabei trat die Mutation in der vierten Generation am häufigsten auf; 17,8 % aller Nachkommen (davon 65 % Weibchen) konnten als heterozygot identifiziert werden. In der sechsten Generation konnte die Mutation nur noch mit einer Häufigkeit von 7,7 % aller Nachkommen (davon 50 % Weibchen) nachgewiesen werden. Im Durchschnitt tragen 14,2 % aller lebenden Nachkommen die Mutation (Abb. 2.12, B).



**Abbildung 2.12: Statistische Betrachtung der *Td*-Zucht.** In A ist die Gesamtanzahl der Nachkommen in % dargestellt. Dabei waren 39,7 % aller Nachkommen männlich. In der vierten Generation waren 35,1 % männliche Nachkommen zu verzeichnen, in der sechsten Generation stieg dieser Anteil auf 50 % an. Dabei betrug der Anteil an heterozygoten *Td*-Weibchen über die gesamte Zuchtdauer hinweg lediglich 14,2 %, mit einem minimalen Anteil an *Td*-Weibchen in der sechsten Generation mit 7,7 % aller lebend geborenen Nachkommen (B).

Zudem wirkte sich die Mutation bei den einzelnen betroffenen Mäusen unterschiedlich aus. Die Variationen reichten hier von einer kaum sichtbaren Beeinträchtigung bis zu so schweren Auswirkungen, dass die Mäuse mit ca. 4–6 Wochen starben.

Sowohl für die Untersuchungen an adulten Mäusen als auch für die Entnahme von Embryonen standen deshalb nur wenige Mäuse zur Verfügung, da bei einer größeren Entnahme die weitere Zucht dieser Mäuse gefährdet worden wäre.

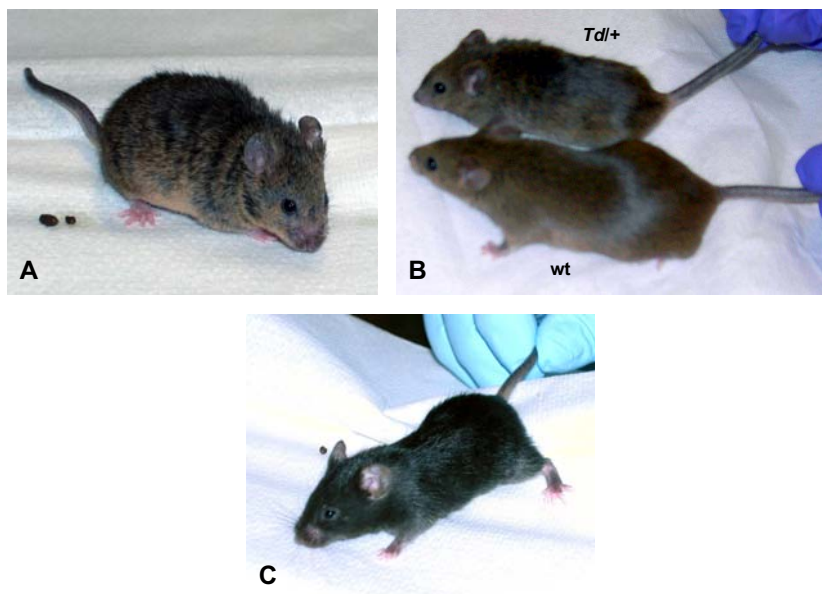
### 2.2.4. Phänotyp der *Td*-Mäuse

Die nach dem Embryotransfer erhaltenen Mäuse konnten schon durch den äußerlich sichtbaren Phänotyp als *Td*-Weibchen identifiziert werden. Sie zeichneten sich durch ein struppi-

## 2. Ergebnisse

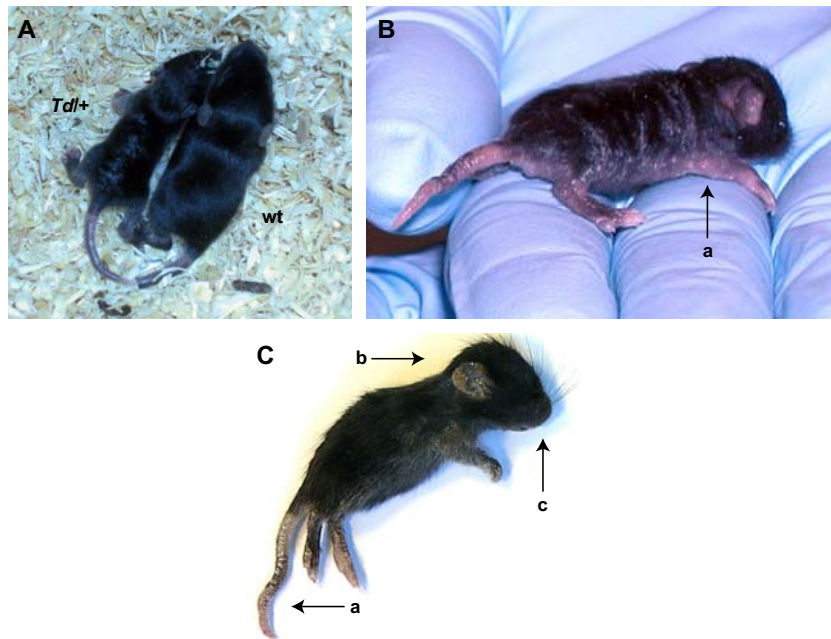
ges Fell aus (Abb. 2.13, A) und waren im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern deutlich kleiner (Abb. 2.13, B). Zudem besaßen sie eine verkürzte Schnauze. Mit der Rückkreuzung auf C57/Bl6J-Mäuse änderte sich das Erscheinungsbild dieser Mäuse geringfügig. Die sehr charakteristische Schuppung des Fells war immer noch deutlich zu erkennen, allerdings verlor sie gegenüber den Mäusen aus dem Embryotransfer etwas an Intensität (Abb. 2.13, C). Auch mit dem C57/Bl6J-Hintergrund waren Wildtyp-Mäuse größer. Die Verkürzung der Schnauze war ebenfalls bei allen heterozygoten Mäusen festzustellen.

Die Ausprägung des Phänotyps fiel bei diesen Mäusen sehr unterschiedlich aus. Einige der *Td*-Weibchen starben bereits im Alter von wenigen Wochen, wohingegen andere Mäuse eine unter Laborbedingungen normale Lebenserwartung besaßen. Im Alter von 1 bis 3 Wochen war der Größenunterschied noch deutlicher zu erkennen als bei adulten Tieren (Abb. 2.14, A). Bei einigen Individuen fand man eine sehr stark ausgeprägte Form der Ichthyose (Abb. 2.14, B und C). Auch eine Veränderung der Schädelform war sehr häufig zu erkennen (Abb. 2.14, C), wobei der Schädel der *Td*-Weibchen mehr gewölbt erschien als der ihrer Wildtyp-Geschwister.



**Abbildung 2.13: *Td*-Mäuse mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund.** Die hier gezeigten Mäuse waren zwischen 10 und 12 Wochen alt. Bei den heterozygoten *Td*-Weibchen, die aus dem Embryotransfer hervorgingen, war die Struppigkeit des Fells sehr deutlich zu erkennen (A). Im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern waren sie kleiner und besaßen eine verkürzte Schnauze (B). Bei Mäusen der vierten Generation war der C57/Bl6J-Hintergrund deutlich zu erkennen. Die Auffälligkeit im Fell war weiterhin gut zu beobachten, verlor aber gegenüber den Mäusen aus dem Embryotransfer etwas an Intensität (C).





**Abbildung 2.14: *Td*-Mäuse der vierten Generation.** Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Ausprägung im Phänotyp von heterozygoten *Td*-Weibchen. In **A** sind 12 Tage alte Geschwister dargestellt, bei denen der Größenunterschied sehr deutlich zu erkennen war. Bei der in **B** abgebildeten Maus handelte es sich um ein 9 Tage altes *Td*-Weibchen, bei dem die Ichtyose (a) besonders stark ausgebildet war. Dieses Weibchen starb kurze Zeit später. Bei der in **C** gezeigten Maus war die Ichtyose (a) ebenfalls sehr gut erkennbar. Zudem zeigte sich der gewölbte Schädel (b) und die verkürzte Schnauze (c).

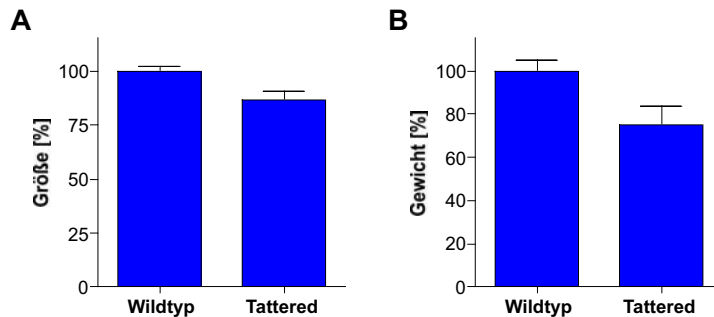
### 2.2.5. Untersuchung der *Td*-Mäuse

Für die folgenden Untersuchungen wurden zwei Würfe genauer untersucht. Es handelte sich bei den untersuchten Tieren um Mäuse aus der vierten Generation. Diese beiden Würfe (geboren am 22.12.2004 und 10.01.2005) waren während der gesamten bis jetzt andauernden Zucht die einzigen beiden Würfe mit größerer Nachkommenschaft, die auch *Td*-Weibchen enthielten. In diesen Fällen wurden die einzelnen Geschwister miteinander verglichen. Dadurch war es möglich, größere Variationen, bedingt durch Unterschiede im Hintergrund der Mäuse, weitgehend auszuschließen.

Untersucht wurden die Mäuse im Alter von 11 Wochen. Die beiden Würfe bestanden aus drei Männchen, fünf Wildtyp-Weibchen und fünf heterozygoten *Td*-Weibchen.

### Größe und Gewicht der *Td*-Weibchen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern

Sehr auffällig bei den Mäusen war, dass Mäuse mit der *Td*-Mutation kleiner erschienen als ihre Wildtyp-Geschwister. Deshalb wurden die Mäuse gemessen und anschließend gewogen. Wildtyp-Weibchen waren im Durchschnitt 9,12 cm groß und 25,2 g schwer. Heterozygote *Td*-Weibchen waren dagegen im Durchschnitt nur 7,9 cm groß und 18,8 g schwer. Männchen wurden bei diesem Versuch nicht berücksichtigt, da sie im Allgemeinen etwas größer und auch schwerer sind als Weibchen und deshalb die Ergebnisse verfälschen würden. Die Werte der Wildtyp-Weibchen wurden als 100 % definiert und die Größe bzw. das Gewicht der *Td*-Weibchen dazu in Relation gesetzt (Abb. 2.15). Dabei zeigte sich, dass letztere im Durchschnitt um 15 % kleiner und um 25 % leichter waren als ihre weiblichen Wildtyp-Geschwister.



**Abbildung 2.15: Größe und Gewicht 11 Wochen alter *Td*-Weibchen im Vergleich zu Wildtyp-Weibchen.** Jeweils fünf Wildtyp-Mäuse und fünf *Td*-Mäuse wurden untersucht. Die Werte der Wildtyp-Mäuse wurden als 100 % Größe (A) und 100 % Gewicht (B) definiert und die Messwerte der *Td*-Weibchen dazu in Relation gesetzt.

### Veränderungen im Skelett

Die beim Menschen auftretende *Chondrodysplasia Punctata*, ein wesentliches Merkmal von CDPX2, zeichnet sich unter anderem durch Veränderungen im Knochenwachstum und der Verknöcherung aus [64, 146]. Deshalb lag es nahe, bei den *Td*-Mäusen das Skelett genauer zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Mäuse nach der Organentnahme geröntgt. Die Aufnahmen zeigten bei zwei der fünf untersuchten *Td*-Weibchen Veränderungen in der Wirbelsäule (Abb. 2.16). Hierbei handelte es sich um eine leichte Form der Skoliose. Bei Wildtyp-Weibchen war diese Verformung der Wirbelsäule hingegen nicht zu beobachten. Gleichzeitig konnte auf dem Röntgenbild die Verkürzung der Schnauze deutlich erkannt werden. Diese Veränderung trat bei allen untersuchten *Td*-Weibchen auf.



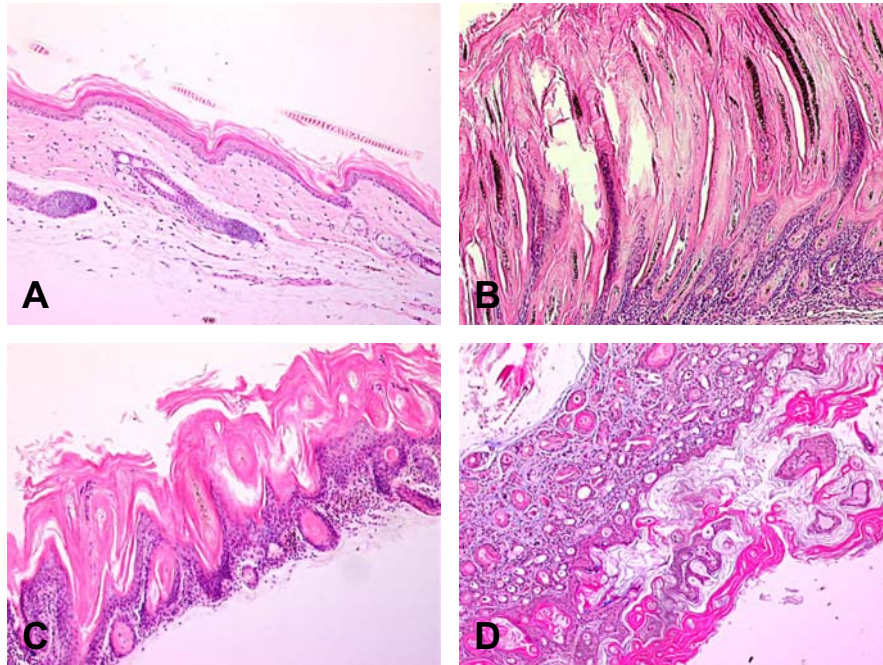
**Abbildung 2.16: Röntgenaufnahmen einer Wildtyp-Maus und eines *Td*-Weibchens.** Das heterozygote *Td*-Weibchen zeigte eine leichte Verkrümmung der Wirbelsäule (Skoliose), die bei den Wildtyp-Weibchen nicht zu beobachten war. Gleichzeitig war die Verkürzung der Schnauze bei den *Td*-Weibchen deutlich zu erkennen.

### Morphologische Untersuchung einzelner Organe

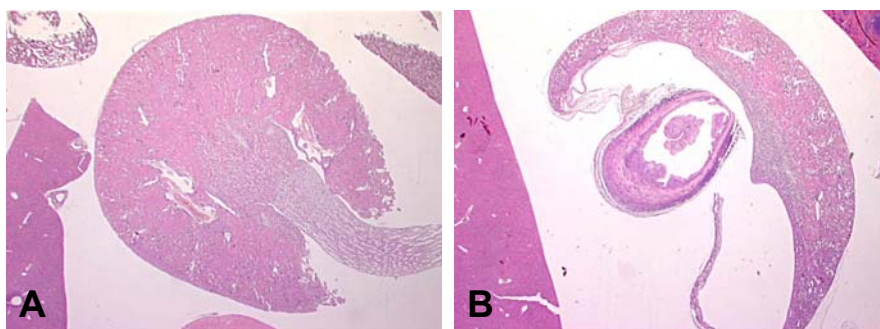
Um die betreffenden Mäuse eingehender charakterisieren zu können, wurden ihnen unterschiedliche Organe entnommen. In Zusammenarbeit mit Dr. J. Calzada (Institut für Pathologie, GSF-Forschungszentrum, Neuherberg) wurden Paraffinschnitte der Organe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Bei den hier untersuchten Geweben handelte es sich um Haut, Knochen, Herz, Lunge, Gehirn, Kleinhirn, Milz, Halslymphknoten, Schilddrüse, Niere, Nebenniere, Magen, Darm, Leber und reproduktive Organe. Dabei wurden nur in der Haut und der Niere Unterschiede zwischen Wildtyp-Weibchen und heterozygoten *Td*-Weibchen festgestellt.

Die auffälligsten Erscheinungen konnten bei der genaueren Betrachtung der Haut charakterisiert werden. Bei allen hier untersuchten *Td*-Weibchen zeigten sich unterschiedliche Verhornungsstörungen (Ichthyose), die sich vor allen Dingen in Verdickungen der Hornschicht (Hyperkeratose) äußerten, die teilweise mit Entzündungen einhergingen (Abb. 2.17).

Bei der Untersuchung der Nieren fanden sich bei zwei der fünf untersuchten *Td*-Weibchen



**Abbildung 2.17: Histologie der Haut.** Im Unterschied zu der Haut von Wildtyp-Mäusen (A) konnten bei allen untersuchten heterozygoten *Td*-Weibchen Veränderungen der Haut festgestellt werden. Diese zeichneten sich durch Verhornung der epidermialen Hautschicht aus, die teilweise mit Entzündungen einhergingen (B–D).



**Abbildung 2.18: Histologie der Niere.** A zeigt die gesunde Niere einer Wildtyp-Maus. In B ist die hydronephrotische Niere eines *Td*-Weibchens dargestellt.

Läsionen. Dabei handelt es sich um Hydronephrose, einer irreversiblen Erweiterung des Nierenbeckens und der Nierenkelche mit Parenchymschwund. Gleichzeitig konnte bei einer untersuchten Maus eine Entzündung des Harnleiters beobachtet werden (Abb. 2.18).

### **Auswirkungen der Mutation in Ebp auf die Cholesterinhomeostase adulter Mäuse**

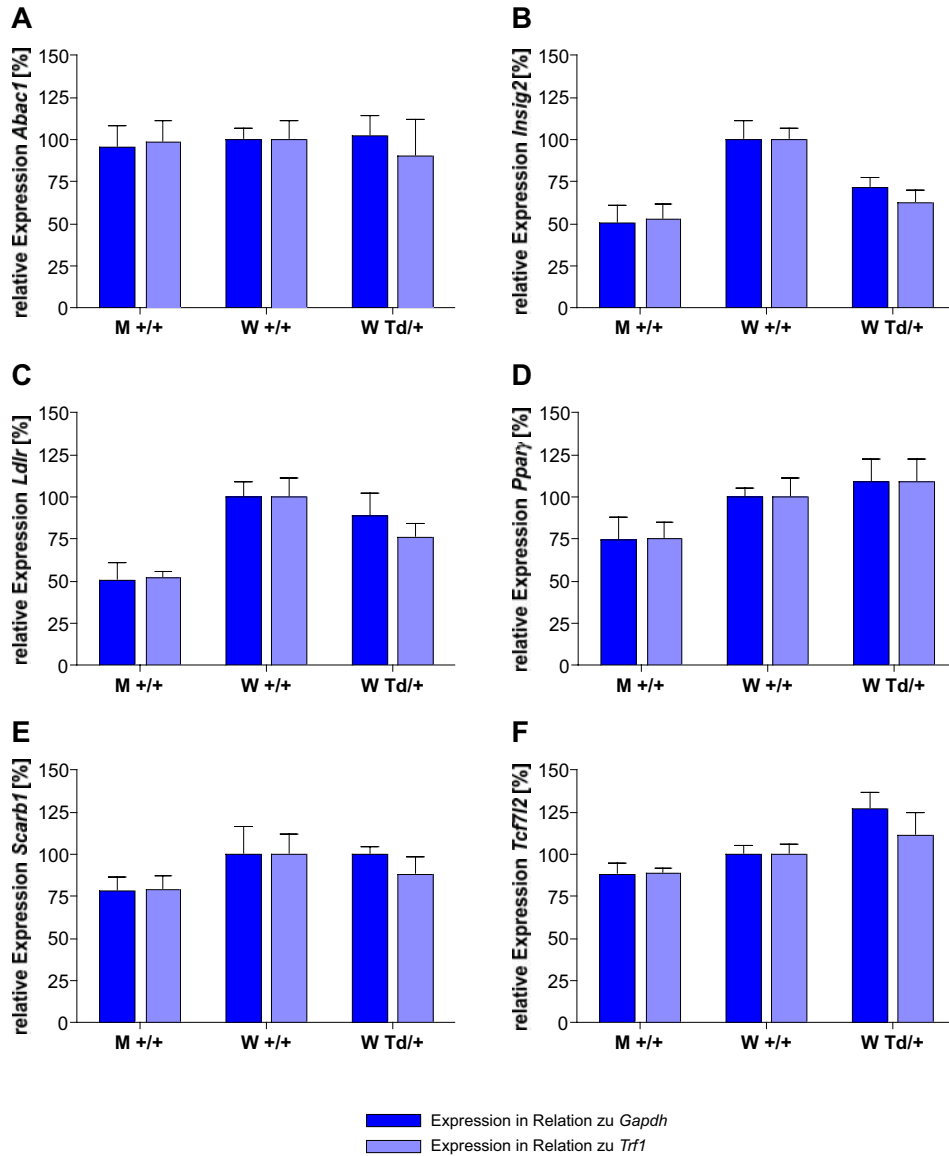
Durch Defekte in der Cholesterinbiosynthese könnte es auch zu einer Beeinflussung der adulten Cholesterinhomeostase kommen. Um Hinweise darauf zu erhalten, wurden mit Hilfe der quantitativen RealTime-PCR die Expressionslevel einiger für die Cholesterinhomeostase wichtiger Gene betrachtet. Bei den in diese Studie einbezogenen Genen handelt es sich um *Abca1* (*ATP-binding cassette, sub-family A*), *Insig2* (*Insulin induced gene 2*), *Ldlr* (*Low density lipoprotein receptor*), *Ppar $\gamma$*  (*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*), *Scarb1* (*Scavenger receptor class B, member1*) und *Tcf7l2* (*Transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box*). Untersucht wurden dabei sowohl Leber als auch Muskel von heterozygoten *Td*-Weibchen und deren Geschwister der vierten Generation.

Für die quantitative Auswertung wurde die Expression der untersuchten Gene zu so genannten *Housekeeping-Genen* in Relation gesetzt, die durch die Versuchsbedingungen selbst nicht reguliert werden. Dafür mussten aus mehreren möglichen Genen die für diesen Versuch geeigneten endogenen Kontrollen ausgewählt werden. Hierfür wurden die Gene *Gapdh* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) und *Trf1* (*Transferrin Receptor*, auch *Trfc*) verwendet. Bei diesen Versuchen zeigte sich jedoch, dass *Hprt* als *Housekeeping-Gen* für diese Durchführung nicht geeignet war. Die Expressionslevel der hier untersuchten Gene wiesen in Relation zu *Hprt* Unterschiede zu den Expressionsleveln in Relation zu *Gapdh* und *Trf1* auf (Daten nicht gezeigt). Eine Regulation von *Hprt* konnte unter den hier getesteten Versuchsbedingungen nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden nur die Gene *Gapdh* und *Hprt* als endogene Kontrollen verwendet. Die Expressionslevel der einzelnen Gene wurden in Leber von Wildtyp-Weibchen als Normalwert mit 100 % Expression definiert. Die Expression in Wildtyp-Männchen und *Td*-Weibchen wurde dazu ins Verhältnis gesetzt.

Bei den hier untersuchten Genen *Abca1*, *Insig2*, *Ldlr*, *Scarb1* und *Tcf7l2* war die Expression im Muskel deutlich niedriger als die in der Leber und lag zwischen 1–7 % der Leberwerte. Eine Ausnahme dazu bildete *Ppar $\gamma$* , bei dem die Muskelexpression 59–104 % der Expression in der Leber erreichte (Daten nicht gezeigt).

*Abca1* wurde in Leber von Wildtyp-Männchen, Wildtyp-Weibchen und heterozygoten *Td*-Weibchen gleich stark exprimiert (Abb. 2.19, A). Die Expression von *Insig2* war in Wildtyp-Mäusen bei Männchen um ca. 50 % geringer als in den Weibchen. Beim Vergleich der Weibchen konnte gezeigt werden, dass *Td*-Weibchen eine 20–30% geringere Expression in der Leber aufwiesen als ihre Wildtyp-Geschwister (Abb. 2.19, B). Auch *Ldlr* wurde in den hier untersuchten Männchen nur etwa halb so stark exprimiert wie in Wildtyp-

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.19: Relative Expression einiger für die Cholesterinhomeostase relevanter Gene.** Die Expressionslevel von *Abca1* (A), *Insig2* (B), *Ldlr* (C), *Pparγ* (D), *Scarb1* (E) und *Tcf7l2* (F) in der Leber wurden an heterozygoten *Td*-Weibchen im Vergleich zur Expression in ihren Wildtyp-Geschwistern untersucht. Dabei wurde die Expression jedes Gens in Wildtyp-Weibchen als 100 % Expression definiert und die Werte für Wildtyp-Männchen und *Td*-Weibchen dazu in Relation gesetzt.

Weibchen. Im Vergleich zu diesen war die Expression von *Ldlr* in *Td*-Weibchen um 10–25 % reduziert (Abb. 2.19, C). *Ppar $\gamma$*  wurde in Weibchen mit mutiertem *Ebp* um 10 % stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe, in männlichen Mäusen wurde das Gen um 25 % schwächer exprimiert (Abb. 2.19, D). Männchen besaßen auch eine 20 % schwächere Expression von *Scarb1* in der Leber als Wildtyp-Weibchen. Das Expressionslevel in Leber von *Td*-Weibchen zeigte keine Unterschiede zu Wildtyp-Weibchen (Abb. 2.19, E). *Tcf7l2* wurde in *Td*-Weibchen um 10–25 % stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe. Bei Männchen lagen die Werte für die Expression 10 % unter denen der Wildtyp-Weibchen (Abb. 2.19, F).

### Cholesterinwerte im Blut

Da bei den *Td*-Mäusen ein Enzym des Cholesterinbiosynthese-Weges mutiert ist, könnte der gesamte Cholesterinhaushalt dieser Mäuse beeinträchtigt sein. Deshalb war es interessant, die Cholesterinwerte im Blut anzuschauen. Dazu wurden die Plasmawerte der Mäuse an Gesamtcholesterin, LDL und HDL gemessen. Diese Messdaten könnten Hinweise auf die Auswirkungen der defekten Cholesterinbiosynthese auf den Cholesterinhaushalt im adulten Organismus liefern.

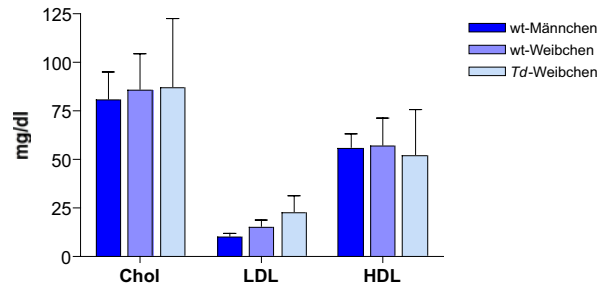
Den Mäusen wurde das Blut aus den Augenvenen direkt in Heparin-Röhrchen entnommen. Die Messung der Cholesterinwerte wurde von Fr. Dr. Birgit Rathkolb (Institut für Experimentelle Genetik, GSF-Forschungszentrum) durchgeführt. Acht Wildtyp-Männchen, fünf Wildtyp-Weibchen und sechs heterozygote *Td*-Weibchen der vierten Generation wurden untersucht. Die gemessenen Werte sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst. Im Vergleich zu den hier gemessenen Werten wurden auch die Bezugsdaten der C57/Bl6J-Mauslinie angegeben.

**Tabelle 2.1: Cholesterinwerte der untersuchten Mäuse im Vergleich zu Mäusen der C57/Bl6J-Linie.**

Genotyp	Cholesterin (mg/dl)	LDL (mg/dl)	HDL (mg/dl)
C57/Bl6J-Männchen	65–120	9–19,7	58,3–99,6
C57/Bl6J-Weibchen	50–100	8,4–16,1	46,2–76,3
Wildtyp-Männchen	64–106	8,2–12,4	42,2–78,7
Wildtyp-Weibchen	62–107	12,4–20,8	38–73
<i>Td</i> -Weibchen	39–126	13,5–29,4	18,8–68,8

Bei diesen Werten war zu beobachten, dass die Messdaten der heterozygoten *Td*-Weibchen stärker schwankten als die ihrer Wildtyp-Geschwister. Die Werte wiesen eine sehr große Heterogenität auf, weswegen auch hier keine gesicherten Aussagen über die Beeinflussung des Cholesterinhaushalts durch die Mutation im *Ebp*-Gen getroffen werden konnten. Hierfür wäre die Untersuchung einer größeren Anzahl von Mäusen notwendig. Allerdings

konnten in der Tendenz erhöhte LDL- und Gesamtcholesterinwerte festgestellt werden. Zur Verdeutlichung wurden die gemessenen Werte graphisch wiedergegeben (Abb. 2.20).



**Abbildung 2.20: Bestimmung von Cholesterin im Blut.** Aus dem Plasma wurden die Werte für Cholesterin, LDL und HDL sowohl an Wildtyp-Mäusen (Männchen und Weibchen) als auch an heterozygoten *Tattered*-Mäusen bestimmt.

### 2.2.6. Embryonalentwicklung der Td-Mäuse

Die endogene Cholesterinbiosynthese spielt während der Embryonalentwicklung eine ganz entscheidende Rolle. Deshalb sollte die Embryonalentwicklung der *Td*-Mauslinie genauer untersucht werden, um so Hinweise auf Auswirkungen der Mutation im *Ebp*-Gen zu erhalten. Dabei ergab sich erneut die Schwierigkeit, dass nur eine geringe Anzahl an Mäusen für die Embryoentnahme aus der Zucht entnommen werden konnte, um den Fortbestand dieser Linie nicht zu gefährden.

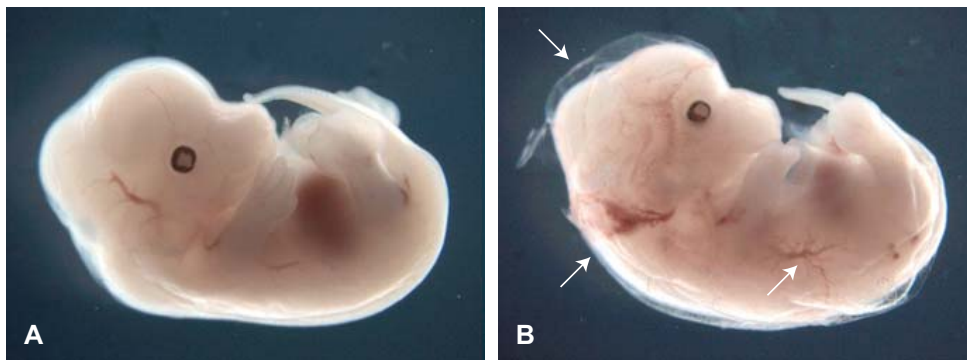
Nach der Entnahme von Embryonen wurden diese genotypisiert. Dazu wurde aus dem Embryosack, der kein maternales Gewebe enthält, genomische DNA isoliert und diese anschließend als Template in unterschiedliche PCRs eingesetzt, die der Genotypisierung bezüglich der Mutation in *Ebp* dienen (Kap. 2.2.2). Zusätzlich wurde eine weitere PCR zur Amplifizierung von *Sry* (*sex determining region on chromosom Y*) durchgeführt, die der Geschlechtsbestimmung der Embryonen diene.

### Bestimmung der Überlebensdauer von hemizygoten Td-Männchen während der Trächtigkeit

Es ist bekannt, dass der Zeitpunkt, an dem hemizygoten *Td*-Männchen während der Trächtigkeit sterben, vom genetischen Hintergrund der Mauslinie abhängt [36]. Um zu überprüfen, bis zu welchem Embryonaltag die *Td*-Männchen unserer Zucht überlebensfähig sind, wurden Embryonen bis E14,5 präpariert.



Weibliche *Td*-Embryonen zeigten in keinem hier untersuchten Stadium phänotypische Unterschiede zu Wildtyp-Geschwistern. Auch die untersuchten männliche *Td*-Embryonen wiesen bis E12,5 phänotypisch keine Unterschiede zu ihren Geschwistern auf. Bei der Präparation von E13,5 Embryonen konnten aus einer Maus zwei männliche hemizygoten *Td*-Embryonen identifiziert werden. Diese unterschieden sich phänotypisch sehr stark von ihren Geschwistern (Abb. 2.21). Es war deutlich zu beobachten, dass eine Ablösung der äußeren Hautschicht stattfand. Im Vergleich zu Wildtyp-Männchen, die aus der selben Mutter stammten, war eindeutig ein Defekt im Gefäßsystem der *Td*-Embryonen festzustellen. Die dunklen Flecken wiesen dabei auf Einblutungen hin.



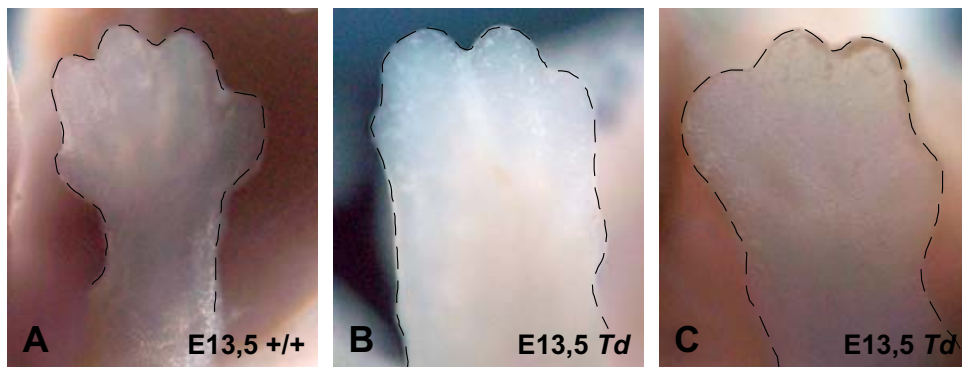
**Abbildung 2.21: Wildtyp-Männchen an E13,5 im Vergleich mit einem hemizygoten *Td*-Männchen.** Die Embryonen wurden an E13,5 präpariert und sind Geschwister. **A** zeigt ein Wildtyp-Männchen. Bei dem in **B** dargestellten *Td*-Männchen war die Ablösung der äußeren Hautschicht sowie defekten Blutgefäße und Einblutungen deutlich zu erkennen.

Sehr auffällig bei diesen *Td*-Männchen war die Fehlbildung bei der Gliedmaßenentwicklung. Dabei kam es nicht zur normalen Ausbildung einer fünfstrahligen Extremität (Abb. 2.22). Möglicherweise verlief hier die Trennung der Gliedmaßen nicht vollständig. Diese Fehlentwicklung bei der Gliedmaßenentwicklung der männlichen *Td*-Embryonen kann auch bei menschlichen CDPX-2-Patienten beobachtet werden.

### Expression von Sonic Hedgehog (*Shh*) als Entwicklungsmarker

Hedgehog-Proteine sind extrazelluläre Signalmoleküle, die in der Embryonalentwicklung eine zentrale Rolle spielen [29]. *Sonic hedgehog* (*Shh*) ist an der Etablierung der Rechts-Links-Asymmetrie beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung von Gehirn, Gliedmaßen, sklerotomalen Strukturen, Haarfollikeln und epithelialen Organen.

Die genauere Betrachtung der *Shh*-Expression könnte daher Hinweise auf Funktionsstörungen während der Embryonalentwicklung liefern. Deshalb wurde in *whole mount in situ*-Hybridisierungs-Versuchen die Expression von *Shh* an heterozygoten *Td*-Weibchen



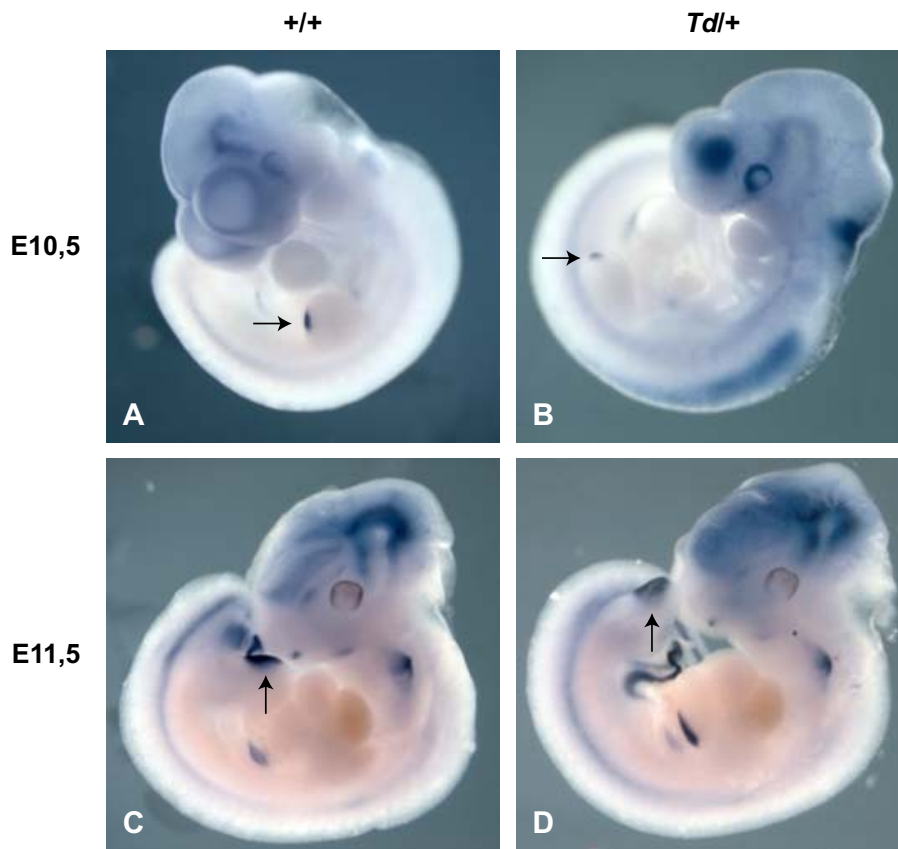
**Abbildung 2.22: Gliedmaßenentwicklung von *Td*-Männchen an E13,5.** Im Vergleich zu der rechten vorderen Gliedmaße von Wildtyp-Männchen (**A**) sieht man bei *Td*-Männchen (**B**: Embryo Nr. 2 aus Weibchen 415; **C**: Embryo Nr. 6 aus Weibchen 415) deutliche Unterschiede. Es kam hier an der jeweiligen linken vorderen Gliedmaße nicht zur Ausbildung einer fünfstrahligen Extremität. Die Gliedmaßenumrisse wurden nachgezeichnet, da die Struktur wegen des Hintergrundes sonst nur vage zu erkennen war.

und ihren Wildtyp-Geschwistern an E10,5, E11,5 und E13,5 verglichen. An E12,5 standen nicht genügend Embryonen für diese Untersuchung zur Verfügung. An E10,5 und E11,5 zeigten sich Unterschiede in der Stärke der *Shh*-Expression in den Gliedmaßenknospen (Abb. 2.23). An E10,5 wiesen die hier untersuchten *Td*-Weibchen eine schwächere *Shh*-Expression in der vorderen Gliedmaßenknospe auf. An E11,5 zeigte sich dagegen eine deutlich stärkere *Shh*-Expression in den hinteren Gliedmaßenknospen von *Td*-Weibchen als bei ihren Wildtyp-Geschwistern. Männliche Embryonen mit der Mutation im *Ebp*-Gen konnten hier nicht untersucht werden, da nicht genügend Embryonen zur Verfügung standen.

An E13,5 konnten auch männliche hemizygote *Td*-Embryonen untersucht werden. Im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern gab es hier einige Unterschiede, die am deutlichsten bei der Anordnung und der verminderten Anzahl der Haarfollikel der Vibrissae zu erkennen waren (Abb. 2.24). Zudem konnte bei diesen Embryonen eine Missbildung des Unterkiefers, eine allgemein veränderte Schädelform und die Fehlentwicklung der vorderen Gliedmaßen beobachtet werden.

### Apoptose bei *Td*-Mäusen

Einige Folgen der defizienten embryonalen Cholesterinbiosynthese wie beispielsweise die Syndaktylie könnten durch ein beeinträchtigtes apoptotisches Verhalten zustande kommen. Deshalb sollte die Apoptose an *Td*-Embryonen mit Hilfe der *whole mount*-Antikörperfär-

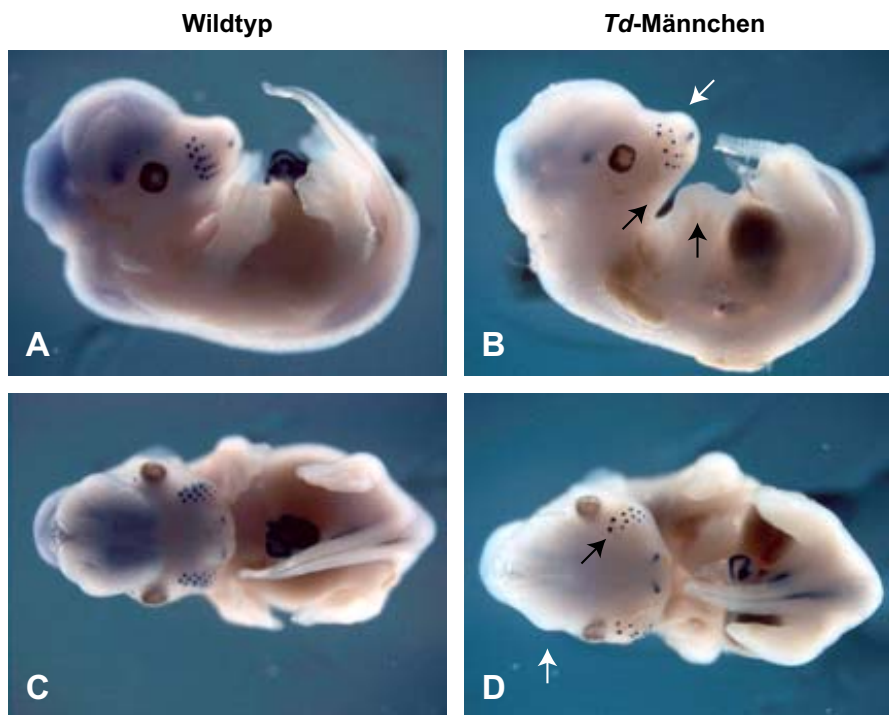


**Abbildung 2.23: Expression von *Shh*.** Mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung wurde die Expression von *Shh* an E10,5 (A, B) und E11,5 (C, D) bei Wildtyp- (+/+) und *Td*-Weibchen (*Td*/+) untersucht. Dabei zeigten sich Unterschiede in der *Shh*-Expression in den Gliedmaßenknospen.

bung eingehender untersucht werden.

Untersucht wurden Embryonen von E9,5 bis E12,5, wobei es sich bei E9,5, E10,5 und E11,5 um heterozygote *Td*-Weibchen handelte und bei E12,5 um hemizygoten *Td*-Männchen. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen die aktive Caspase-3.

Apoptose ließ sich bei den untersuchten Embryonen an Tag E10,5 in Bereichen des Gehirns, der Pharyngealbögen und den Gliedmaßenknospen detektieren. Auch in den Somiten war Apoptose vorzufinden. Für E11,5 ließ sich kein Unterschied in der Verteilung der Apoptose im Vergleich von *Td*-Embryonen zu ihren Wildtyp-Geschwistern feststellen. Apoptose ist in diesem Entwicklungsstadium in den Gliedmaßenknospen und den Somiten zu beobachten. Die untersuchten *Td*-Männchen zeigten an E12,5 die Färbung der aktiven Caspase-3 in den gleichen Bereichen wie ihre Wildtyp-Geschwister (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2.24: Expression von *Shh* an E13,5.** Die Expression von *Shh* wurde mit *whole mount in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Dabei wurden Embryonen aus einem heterozygoten *Td*-Weibchen an E13,5 miteinander verglichen. In **A** und **C** wurden männliche Wildtyp-Embryonen dargestellt. **B** und **D** zeigten ein *Td*-Männchen, wobei deutlich die unterschiedliche Anordnung und Anzahl der Follikel der Vibrissae zu erkennen war. Zudem konnte an diesem Embryo eine Missbildung des Unterkiefers und eine veränderte Schädelform beobachtet werden. Die Missbildung der vorderen rechten Gliedmaße war auch hier eindeutig zu sehen.

Sie unterschieden sich lediglich in der Intensität der Färbung, die bei den hemizygoten *Td*-Männchen schwächer ausfiel als bei deren Wildtyp-Geschwistern.

Bei den hier untersuchten Embryonen konnten im Bezug auf das Auftreten der Apoptose keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Td*-Embryonen und ihren Wildtyp-Geschwistern festgestellt werden. Lediglich ein Unterschied in der Intensität der Färbung war zu beobachten. Allerdings müßten hier noch mehr Embryonen untersucht werden, um eine allgemeingültige Aussage treffen zu können. Weitere Embryonen standen allerdings für diese Versuche nicht zur Verfügung (Kap. 2.2.3).

### 2.3. Aktivitätsbestimmung in vitro mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie(GC/MS)

Um einen Einblick in die molekularen Mechanismen bei Funktionsstörungen der Cholesterinbiosynthese und deren Auswirkungen zu erhalten sollte eine Methode zur Messung der enzymatischen Umsetzung einiger wichtiger Enzyme der postsqualenen Cholesterinbiosynthese (NSDHL, HSD17B7 und EBP) etabliert werden. Dazu wurde diese Methode zunächst anhand von Messungen bei Überexpression dieser Enzyme in HeLa-Zellen etabliert, um anschließend die Umsetzung in stabil shRNA-exprimierenden HeLa T-REx-Zellen (Kap. 2.4.4) genauer untersuchen zu können. Ziel dabei war es, Hinweise auf sich möglicherweise anreichernde Metabolite zu erhalten, die wiederum Ursache für Schädigungen in den humanen und murinen Syndromen sein könnten.

Folgende Reaktionen sollten mit dieser Methode untersucht werden: NSDHL katalysiert die Umsetzung von  $\Delta 8,24$ -Carboxymethylsterol zu Zymosteron. Das Substrat  $\Delta 8,24$ -Carboxymethylsterol ist kommerziell nicht auf dem Markt erhältlich. Aus diesem Grund konnte die Messung der enzymatischen Umsetzung durch die Katalyse von NSDHL nicht weiter verfolgt werden. Im nächsten Schritt der Cholesterinbiosynthese wird Zymosteron durch die Katalyse von HSD17B7 zu Zymosterol reduziert (Abb. 3.7). Beide Substrate standen mir für diese Untersuchungen zur Verfügung. Anschließend erfolgt die Isomerisierung von Zymosterol zu Lathosterol, katalysiert von EBP (Abb. 3.6). Bei dieser Reaktion entstehen die Zwischenprodukte  $\Delta 7,24$ -Cholestadienol und  $\Delta 8$ -Cholestenol. Diese Zwischenprodukte waren ebenso wie  $\Delta 8,24$ -Carboxymethylsterol nicht kommerziell erhältlich.

#### 2.3.1. Grundlagen der GC/MS Messmethode

Der GC (Gaschromatograph) dient zur Auftrennung des zu untersuchenden Stoffgemisches. Die Substanzen können anschließend im MS (Massenspektrometer) identifiziert und quantifiziert werden. Dabei wird das jeweilige Masse/Ladungs-Verhältnis gemessen, das in der Einheit amu (atomic mass unit) angegeben wird. Die GC/MS-Messung ist dabei grundsätzlich in zwei unterschiedlichen Modi möglich. Der Scan-Modus dient der Identifizierung einzelner Substanzen. Dabei kann der gesamte mögliche Messbereich (10–700 amu) erfaßt werden. Für die Messungen in dieser Arbeit war eine Messung im Bereich von 20–600 amu jedoch ausreichend. Messungen im SIM (Single Ion Modus) dienen der Quantifizierung von Substanzen, wobei nur bestimmte Masse/Ladungs-Verhältnisse detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei unterschiedliche Verweilzeiten (50 ms, 80 ms, 100 ms sowie 130 ms) getestet. Die höchste Empfindlichkeit konnte dabei mit einer Verweilzeit von 80 ms erreicht werden. Die einzelnen Substanzen wurden vor der Messung mit MSTFA acitvated I derivatisiert. Durch die Derivatisierung erreicht man eine Erhöhung der chemischen Stabilität und gleichzeitig eine Vergrößerung der Massen-

bruchstücke, was zu einem besseren Signal/Rausch-Verhältnis führt. Insgesamt erreicht man dadurch eine höhere Empfindlichkeit. Für die Quantifizierung einzelner Substanzen wurde die jeweilige Ionenspur eines charakteristischen Massenbruchstückes der Substanz betrachtet. Die korrelierende Peakfläche wurde für die Auswertung herangezogen.

### 2.3.2. Ermittlung der geeigneten Messparameter

Die zu untersuchenden Substanzen Zymosteron, Zymosterol und Lathosterol wurden zunächst in underivatisierter Form im Scan-Modus gemessen, um das charakteristische Massenspektrum und damit charakteristische Massenbruchstücke für die SIM Analyse zu ermitteln. Bei vielen Steroiden haben die Molekülonen eine hohe Intensität und werden daher für die Messungen herangezogen. Lathosterol entsteht aus Zymosterol durch Isomerisierung und Reduktion (Abb. 3.6). Dadurch unterscheiden sich beide Moleküle nur durch die Masse von zwei Wasserstoffatomen und sind somit sehr ähnlich. Deshalb genügte hier die Betrachtung der Molekülonen alleine nicht und es wurden andere Massenbruchstücke für die Identifizierung mit herangezogen. Die bei den Messungen ermittelten Daten sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt. Die gemessenen derivatisierten Substanzen zeigten bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine ausreichende Empfindlichkeit für eine Quantifizierung.

Tabelle 2.2: Ermittlung der Messparameter

Substanz	m/z underivatisiert	m/z derivatisiert
Zymosteron	382,40	454,40
Zymosterol	213,40, 269,40, 384,40	351,40, 414,40, 456,40
Lathosterol	255,40, 271,40, 386,40	255,40, 443,40, 458,40

Die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen lagen relativ eng beisammen. Für Zymosterol lag sie in einem Bereich von 8,60–8,80 min, für Zymosteron bei 8,70–8,90 min und für Lathosterol bei 8,85–9,05 min. Die Differenz der Retentionszeiten von Zymosteron zu Zymosterol betrug -0,10 min und die von Zymosterol zu Lathosterol lediglich -0,05 min. Eine deutlichere Trennung im zeitlichen Verlauf wäre für die folgenden Versuche erstrebenswert gewesen. Deshalb wurde überprüft, ob die Versuchsbedingungen durch eine Erhöhung der Initialtemperatur von 200 °C auf 250 °C und eine kontinuierliche Temperaturerhöhung bis zum Erreichen der Endtemperatur von 300 °C verbessert werden können. Diese Modifikationen führten zwar zu einer früheren Retentionszeit, allerdings erhielt man auch eine deutliche Verbreiterung der einzelnen Peaks, vermutlich durch erhöhte Diffusion. Dadurch verringerte sich die Empfindlichkeit. Da diese Änderungen nicht den erhofften Vorteil brachten, wurde auf die vorher verwendete Methode zurückgegriffen.

Eine zusätzliche Identifizierung von Zymosterol und Lathosterol in underivatisierter Form

erfolgte durch Vergleiche mit der NIST-Spektralbibliothek. Die erhaltenen Fragmente stimmten dabei mit den Referenzspektren überein. Für Zymosteron war keine Referenz in der NIST-Spektralbibliothek verfügbar.

### 2.3.3. Enzymatische Umsetzung von Zymosterol zu Lathosterol durch die Katalyse von EBP

EBP katalysiert die Isomerisierung von Zymosterol zu Lathosterol. Dabei wird die Doppelbindung im B-Ring des Steroidgerüsts von Position 8–9 auf die Position 7–8 verschoben. Als Edukt für diese Isomerisierung können sowohl Zymosterol als auch  $\Delta 8$ -Cholestenol dienen, wodurch die Substanzen  $\Delta 7,24$ -Cholestadienol bzw. Lathosterol entstehen. 24-Dehydrocholesterin-Reduktase katalysiert dabei die Reduktion der Seitenkette von Zymosterol bzw.  $\Delta 8$ -Cholestenol (Abb. 3.6). Die Substanzen  $\Delta 8$ -Cholestenol und  $\Delta 7,24$ -Cholestadienol sind nicht kommerziell erhältlich. Auch stehen die Spektren dieser Substanzen in der NIST-Spektralbibliothek nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde die durch EBP katalysierte Isomerisierung nicht weiter untersucht.

### 2.3.4. Messung der Aktivität von HSD17B7 in vitro

#### Linearität der Verhältnisse von Zymosteron und Zymosterol

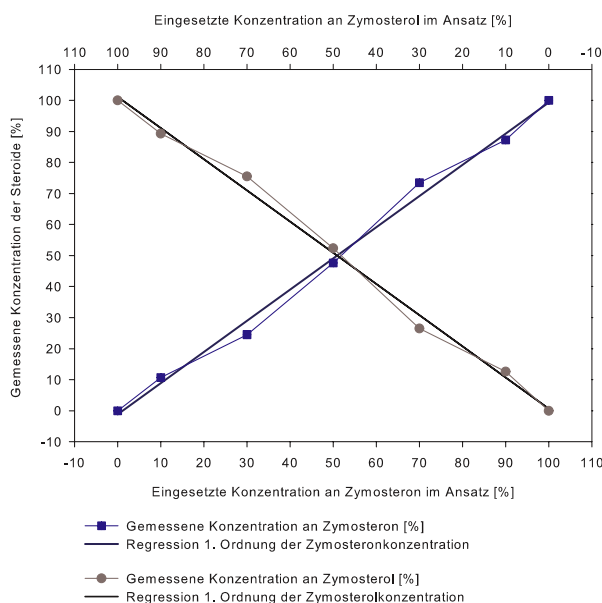
HSD17B7 katalysiert im Cholesterinbiosyntheseweg die Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol. Für die weiterführenden Versuche war es wichtig, dass die beiden Substanzen im gleichen Verhältnis zueinander detektiert und somit analysiert werden können. Deshalb wurde eine umgekehrt verlaufende Verdünnungsreihe von Zymosteron und Zymosterol gemessen, wobei die Gesamtkonzentration jeweils  $10 \mu\text{M}$  betrug. Die Messungen der derivatisierten Substanzen wurden in einem Endvolumen von 1 ml (in TBME) im Programm DZZ80.M durchgeführt.

Für die quantitative Analyse wurden die Flächen beider Substanzen integriert und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dabei zeigte die Verknüpfung der einzelnen Datenpunkte eine eindeutige Linearität (Abb. 2.25). Die Regressionsgleichung erster Ordnung weist dies noch deutlicher aus. Dabei entsprachen die realen Konzentrationen weitgehend den idealen Konzentrationen. Abweichungen davon sind durch experimentelle Ungenauigkeiten bzw. übliche Meßschwankungen zu erklären.

#### Optimierung der Aufreinigung

Für die Aufreinigung wurden unterschiedliche Extraktionsmethoden getestet, um eine möglichst hohe Wiederfindungsrate der eingesetzten Substrate zu erhalten. Zum einen

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.25: Kalibrierkurve von Zymosteron und Zymosterol.** Die Verhältnisse von Zymosteron und Zymosterol weisen einen linearen Zusammenhang auf. Gezeigt wurde dies durch eine Regression erster Ordnung der realen Konzentrationen an Zymosterol und Zymosteron.

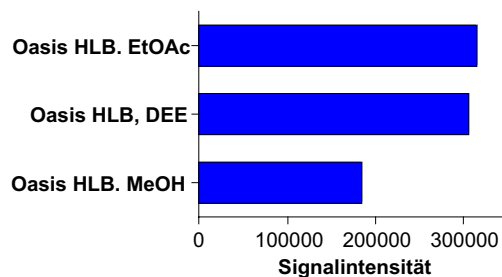
wurden die Substrate mit den Lösungsmitteln Isooctan und TBME extrahiert. Die Wiederfindung der eingesetzten Substanzen entsprach dabei nicht den Erwartungen. Diese Methode wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Für die Festphasenextraktion wurden unterschiedliche Säulen und Elutionsmittel getestet. Die Säulentypen unterscheiden sich in der Art des Packmaterials. Getestet wurden die kieselgelbasierten Strata C-18E- (100 mg; Phenomenex), die polymerbasierten Strata-X- (30 mg; Phenomenex) und die Oasis HLB- (30 mg; Waters) Säulen. Als Elutionsmittel wurden für alle Säulen Methanol, Diethylether und Ethylacetat verwendet. Für die Aufreinigung wurde ein Aktivitätssay mit Hek293/pcDNA3 simuliert. Auf die Zugabe von NADPH und den Inkubationsschritt wurde für diese Versuche verzichtet. Die Substrate Zymosteron und Zymosterol wurden in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte wie unter Kapitel 4.9 beschrieben. Die Elution erfolgte mit 1 ml des jeweiligen Lösungsmittels. Die eingedampften und mit TMBE aufgenommenen Proben wurden in  $\mu$ -Vials überführt und nach erneuter Trocknung unter Argon-Schutzatmosphäre mit MSTFA activated I derivatisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Signalintensität bei einer Elution mit Methanol ca. 10 mal kleiner ist als bei der Elution mit Diethylether und Ethylacetat, unabhängig von



der Art der verwendeten Säulen. Der Vergleich der Oasis HLB Säulen mit unterschiedlichen Elutionsmitteln ergab eine deutlich geringere Signalintensität bei der Verwendung von Methanol im Vergleich zur Elution mit Diethylether oder Ethylacetat (Abb. 2.26).

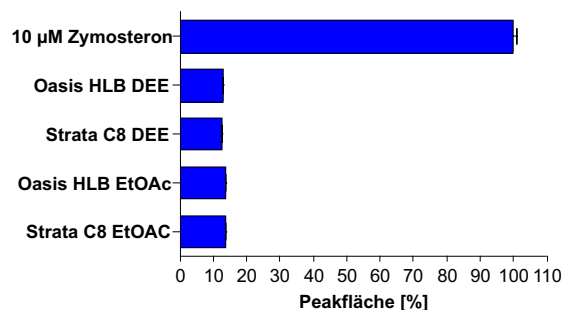


**Abbildung 2.26: Test unterschiedlicher Elutionsmittel.** Für die Festphasenextraktion wurden unterschiedliche Elutionsmittel verwendet. Die eingesetzte Substratkonzentration betrug  $10 \mu\text{M}$ . Die Messung erfolgte im Programm DZZ80.M.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte kontrolliert werden, wie hoch der Verlust an eingesetzter Substanz durch die Aufreinigung über die Säulen ist. Dazu wurde das Substrat Zymosteron in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  direkt gemessen. Zum anderen wurden die gleichen Konzentrationen zu einem Reaktionsansatz ohne NADPH gegeben. Die Inkubation wurde nicht durchgeführt, es erfolgte lediglich die Aufreinigung über die Säulen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur ca. 10 % des eingesetzten Substrats wieder von den Säulen eluiert werden kann (Abb. 2.27). 90 % des Substrats gehen dabei verloren.

### **Ermittlung der Massenspektren einiger Intermediate des Cholesterinbiosynthesewegs**

Um die Auswirkung einer HSD17B7-Reduktion genauer untersuchen zu können, ist es wichtig, auch die möglicherweise auftretenden Intermediate identifizieren zu können. Uns wurden zu diesem Zweck von Dr. C. Shackleton (Children's Hospital-Oakland Research Institute, Oakland, USA) drei Substanzen zur Verfügung gestellt, die nicht als Massenspektren in den Datenbanken vorhanden waren und eventuell in der Cholesterinbiosynthese eine Rolle spielen könnten. Cholest-8-en- $3\beta$ -ol wurde underivatisiert und derivatisiert gemessen. Cholest-8-en- $3\beta$ -ol-acetat und Cholesta-7,24-dien- $3\beta$ -ol-acetat können nicht derivatisiert werden, da die Hydroxyl-Gruppen dieser Substanzen bereits mit einem Acetat-Rest gesättigt sind. Probeweise wurden allerdings auch diese Substanzen mit MSTFA acitvated I versetzt, um zu prüfen, ob sie sich dadurch chemisch verändern. Dies war jedoch nicht der Fall.



**Abbildung 2.27: Prozentuale Wiederfindung der eingesetzten Substratmenge nach Säulenaufreinigung.** Zymosteron wurde in derivatisierter Form in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zur Messung in die GC/MS eingesetzt. Nach Integration der erhaltenen Peakfläche wurde dieser Wert als 100 % definiert. Gleiche eingesetzte Mengen an Zymosteron wurden nach Aufreinigung über unterschiedliche Säulen und Elutionsmittel (DEE = Diethylether, EtOAc = Ethylacetat) und anschließender Derivatisierung ebenfalls gemessen und anschließend zum eingesetzten Zymosteron ins Verhältnis gesetzt.

### Messung der Aktivität nach Überexpression von HSD17B7

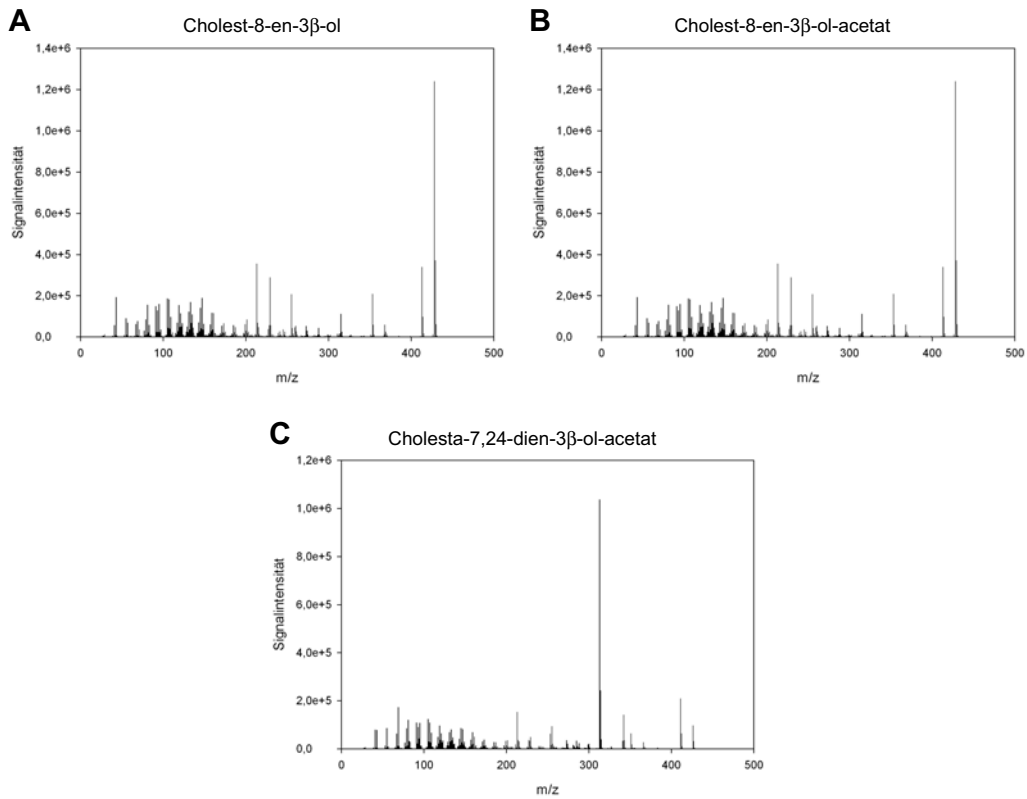
Zunächst wurde die Aktivität von in HeLa-Zellen überexprimierten pcDNA3/hHSD17B7 und pcDNA3/mHSD17B7 bestimmt. Als Referenz dienen dabei Zellen, die mit dem leeren Vektor pcDNA3 transfiziert wurden. Die Substratkonzentration betrug 10  $\mu\text{M}$ . Zusätzlich wurde eine Kontrollprobe mitgeführt, ein identischer Reaktionsansatz, dem kein Substrat zugesetzt wurde. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 90 min. Die Elution erfolgte sowohl mit Diethylether als auch mit Methanol bzw. Ethylacetat. Die Proben wurden in  $\mu$ -Einsätze überführt und dort mit MSTFA acitvated I derivatisiert.

Bei der Auswertung wurden die Datenpunkte der Spektren abzüglich der Datenpunkte der Spektren der internen Kontrollen aufgetragen. Die quantitative Analyse erfolgte ebenfalls, indem die integrierten Peakflächen der extrahierten Ionen abzüglich der der internen Kontrollen betrachtet wurden.

Für die Proben, die mit Methanol bzw. Diethylether eluiert wurden, konnten keine quantitativen Aussagen getroffen werden (Abb. 2.29). Die Signalintensitäten der mit Methanol eluierten Proben waren nach Abzug der internen Kontrolle zu gering. Auch die Auswertung der mit Diethylether eluierten Proben war problematisch (Abb. 2.29, B). Die Messungen zeigten einen sehr starken Hintergrund und die Peaks der Substanzen waren überlagert. Auch nach Abzug der internen Kontrolle konnten keine eindeutigen Peaks ermittelt werden.

Die mit Ethylacetat eluierten Proben konnten dagegen quantitativ analysiert werden. Dazu

## 2. Ergebnisse



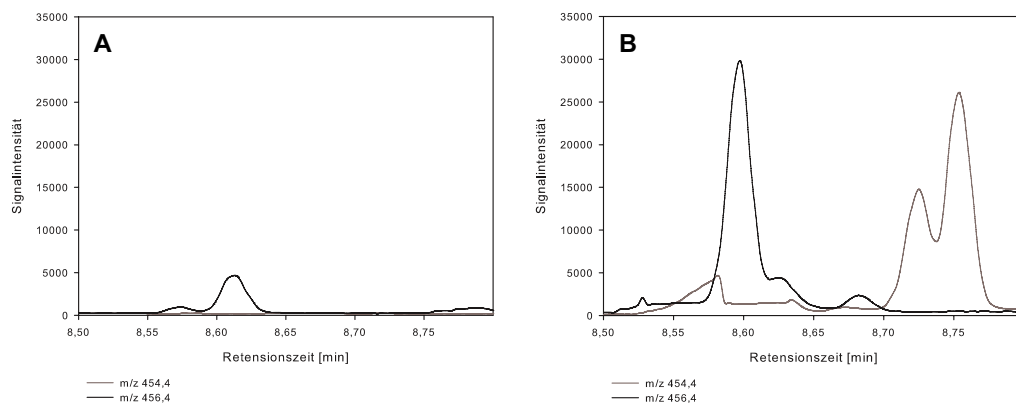
**Abbildung 2.28: Massenspektren einiger Cholesterinbiosynthese-Intermediate.** Dargestellt sind die Spektren von Cholest-8-en-3 $\beta$ -ol (A), das mit MSTFA activated I derivatisiert wurde, Cholest-8-en-3 $\beta$ -ol-acetat (B) und Cholesta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol-acetat (C). Die Substanzen wurden in underivatisierter Form und derivatisiert gemessen, wobei keine Unterschiede in den Spektren festzustellen waren.

wurden die Datenpunkte der Spektren sowie die integrierten Peakflächen abzüglich der internen Kontrolle betrachtet (Abb. 2.30). Der Umsatz von hHSD17B7 konnte nach der Korrektur mit 47 % detektiert werden, der von mHsd17b7 mit 44 %.

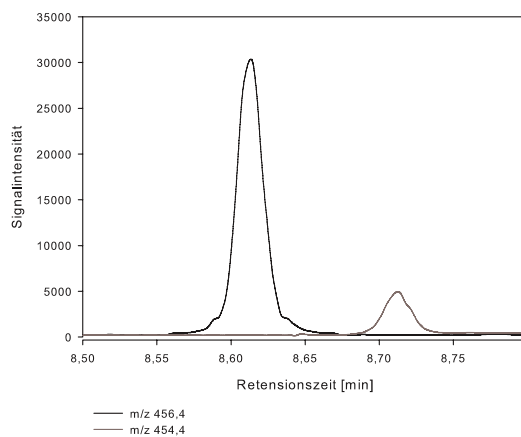
### Verbesserung der Aufreinigung des *in vitro* Ansatzes

Bei der Aktivitätsmessung der überexprimierten HSD17B7 hat sich herausgestellt, dass die Aufreinigung einen sehr großen Substratverlust mit sich zieht. Des weiteren war festzustellen, dass durch die Aufreinigung über die Säulen noch große Mengen an Zellbestandteilen mit in die GC/MS eingespritzt werden, was zu einer sehr starken Verschmutzung der Anlage führt. In der Arbeit von F. Haller [61] wurde der Reaktionsansatz für die Messung der enzymatischen Aktivität einiger Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) vor der Aufrei-

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.29: Aktivitätsassay hHSD17B7 mittels GC/MS.** Die Elution von den Säulen erfolgte mit Methanol (A) bzw. Diethylether (B). Die eingesetzte Substratkonzentration betrug jeweils  $10 \mu\text{M}$ . Die Datenpunkte der abgebildeten Spektren wurden durch Subtraktion mit der Kontrollprobe korrigiert.



**Abbildung 2.30: Aktivitätsassay mHSD17B7 mittels GC/MS und Elution mit Ethylacetat.** Die Elution erfolgte mit Ethylacetat. Das Substrat wurde in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  eingesetzt. Die Datenpunkte des abgebildeten Chromatogramms wurden durch die Subtraktion einer internen Kontrolle korrigiert.

nigung über die Säulen bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und nur der Überstand auf die Säulen aufgetragen. Die Säulenverschmutzung konnte dadurch reduziert werden. Nach Einbau dieses Aufreinigungsschrittes in die Festphasenextraktion der hier untersuchten Umsetzung konnte das eingesetzte Substrat nicht mehr gemessen werden. Diese zusätzliche Aufreinigung war für die Anwendung mit Zymosteron und Zymosterol nicht geeignet. Da es sich bei HSD17B7 um eine ER-Membran assoziiertes Protein handelt, könnte es bei diesem zusätzlichen Zentrifugationsschritt abgetrennt werden, genauso wie auch das Substrat. Die weiteren Versuche wurden deshalb weiterhin ohne diesen Zentrifugationsschritt durchgeführt.

### **Messung der Aktivität in HeLa T-REx/shHSD17B7**

Ziel der Etablierung der GC/MS-Messung war die genauere Untersuchung der Cholesterinbiosynthese. Nun sollte der Umsatz von HSD17B7 aus HeLa T-REx/shHSD17B7 Zellen gemessen werden.

HeLa T-REx/shHSD17B7 wurden für 15 Tage konstant mit Zugabe von Tetrazyklin inkubiert, um die Menge an HSD17B7 deutlich zu reduzieren. Den Zellen wurde dann Zymosteron (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$  bzw. 1  $\mu\text{M}$ ) und NADHP zugesetzt. Es folgten eine 90 min Inkubation und anschließend die Festphasenextraktion und Elution mit Ethylacetat. Die Proben wurden in  $\mu$ -Vials überführt und anschließend derivatisiert. Die Messung wurde in den Programmen DZZ80.M und SCAN\_F vorgenommen.

Bei der Messung zeigte sich, dass bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  kein Umsatz nachweisbar war. Dies kann vor allen Dingen daran liegen, dass nur noch eine sehr geringe Menge umgesetzt wird, die nicht mehr messbar ist. Bei der Zugabe des Substrates von nur 1  $\mu\text{M}$  konnte überhaupt kein Substrat mehr detektiert werden. Die Messung mit der SCAN\_F Methode ergab einen sehr starken Hintergrund an Cholesterin und Fettsäuren aus den Zellen. Andere Signale waren deshalb nicht mehr sichtbar.

Für eine Messung des Substratumsatzes in HeLa T-REx/shHSD17B7-Zellen müßte die Aufreinigung weiter optimiert werden, damit die Substratverluste nicht bei ca. 90 % liegen. Zudem müßte eine Möglichkeit gefunden werden, um Cholesterin und Fettsäuren vor der GC/MS-Messung abzutrennen.

## **2.4. Molekulare Mechanismen in Zellkultur: Untersuchungen mittels RNA Interferenz (RNAi)**

Die Expression der Gene *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* wurde in sogenannten Knock-down-Experimenten mittels RNA Interferenz (RNAi) reduziert. Ziel dieser Versuche war die Untersuchung der Auswirkungen dieser Reduktion auf die Apoptose und die Zellviabilität. Für diese Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Wege gewählt. Zum einen

wurden shRNA-exprimierende Vektoren (pENTR/U6) transient in unterschiedliche Zelllinien (HeLa, HepG2 und MRC-5) transfiziert. Zum anderen erfolgte die Transfektion von shRNA-exprimierenden Vektoren (pENTR/H1/TO) stabil in HeLa T-REx-Zellen.

#### 2.4.1. Bioinformatische Auswahl der siRNA-Sequenzen

Bis zu Beginn meiner Arbeit waren Auswirkungen eines Knock-downs einzelner Gene der Cholesterinbiosynthese noch nicht untersucht worden. Für die RNAi standen deshalb auch noch keine bekannten siRNA-Sequenzen zur Verfügung, die einen effektiven Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* hervorrufen.

Da nicht alle siRNA-Sequenzen einen starken Knock-down des entsprechenden Gens auslösen ist die sorgfältige Auswahl dieser Sequenzen von besonderer Bedeutung. Für die Vorauswahl der Sequenzen wurden folgende Programme verwendet:

- <https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>
- <http://www.promega.com/siRNADesigner/>
- <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>

Diese Programme arbeiten mit leicht unterschiedlichen Algorithmen. Die vorgeschlagenen Sequenzen wurden anschließend nochmals überprüft und miteinander verglichen. Für einen effektiven Knock-down sollten die Sequenzen nach dem Muster AA(N<sub>19</sub>)TT gestaltet sein und am 3'-Ende einen Überhang von 2 Nukleotiden aufweisen. Zudem steigert eine 5'-Phosphatgruppe und eine 3'-Hydroxygruppe die Effektivität. Der GC-Gehalt sollte annähernd 50 % betragen. Für den Knock-down der Gene *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* wurden jeweils mehrere Sequenzen ausgewählt, die im nächsten Schritt experimentell getestet wurden.

#### 2.4.2. Effektivitätstest der ausgewählten shRNA-Sequenzen

Da es zum Zeitpunkt dieser Versuche wenig Erfahrung mit der Funktionalitätsprüfung der unterschiedlichen shRNA-Sequenzen in Zellkultur gab, testete ich verschiedene Systeme (BLOCK-iT RNAi Target Screening System und psiCHECK-2) zum Screenen dieser Sequenzen. In beiden Fällen wurde die Target-Sequenz, die durch die entsprechenden shRNAs reduziert werden sollte, in einen Reportervektor kloniert. Dieser wurde zusammen mit den RNAi-Molekülen in die Zellen transfiziert und anschließend gemessen. Dabei diente die Transfektion des jeweiligen Screening-Vektors alleine als Kontrolle. Die Werte, die man mit Zugabe der shRNAs erhielt, wurden dazu in Relation gesetzt.

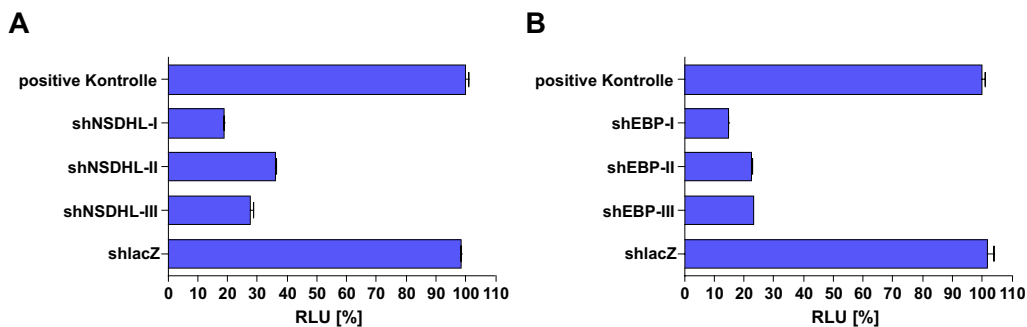
Mit dem BLOCK-iT RNAi Target Screening System erfolgt der Effektivitätstest über eine

## 2. Ergebnisse

Fluoreszenzmessung. Dabei zeigten die Zellen aber eine so hohe Hintergrundfluoreszenz, dass keine Aussage über die Effektivität der entsprechenden shRNAs mehr möglich war. Mit Hilfe des psiCHECK-2-Vektors wird der Knock-down mittels Lumineszenz bestimmt. Mit diesem System kann gleichzeitig auch eine Transfektionsnormalisierung vorgenommen werden. Für die Bestimmung der Knock-down-Effizienzen erwies sich dieses System als geeignet und wurde deshalb in den weiteren Versuchen eingesetzt.

Für die zu untersuchenden Gene wurden jeweils drei unterschiedliche siRNA-Sequenzen für die Klonierung in pENTR/U6 ausgewählt. Als positive Kontrolle wurde nur der jeweilige psiCHECK-2 Vektor transfiziert und der erhaltende Wert als 100 % RLU definiert. Um die Spezifität des Knock-downs zu zeigen, wurde shlacZ/pENTR/U6 mit NSDHL/psiCHECK-2, HSD17B7/psiCHECK-2 bzw. EBP/psiCHECK-2 cotransfiziert.

Alle drei getesteten siRNA-Sequenzen für den Knock-down von *NSDHL* zeigten eine Effizienz von 64–82 % (Abb. 2.31, A). Für die anschließenden Versuche wurde die Sequenz shNSDHL-I ausgewählt, die im Folgenden als shNSDHL bezeichnet wird. Die für den Knock-down von *EBP* getesteten siRNA-Sequenzen zeigten eine Reduktion um 77 % (shEBP-II und shEBP-III) und 85 % (shEBP-I, Abb. 2.31, B). Für die weiteren Versuche wurde die Sequenz shEBP-I (im Folgenden shEBP) verwendet.

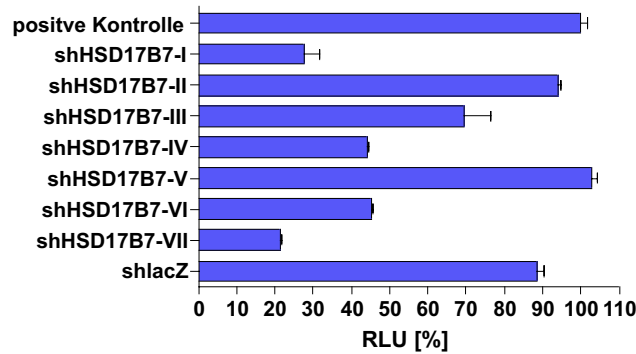


**Abbildung 2.31: Knock-down Effizienz unterschiedlicher shRNA-Konstrukte für *NSDHL* und *EBP*.** Um den Knock-down von *NSDHL* (A) und *EBP* (B) zu untersuchen, wurden jeweils drei unterschiedliche shRNA-Konstrukte getestet. Als positive Kontrolle diente die Transfektion von NSDHL/psiCHECK-2 bzw. EBP/psiCHECK-2 ohne zusätzliche Transfektion eines shRNA-Konstruktes. Um die Spezifität des Knock-down zu zeigen wurde eine Cotransfektion von NSDHL/psiCHECK-2 bez. EBP/psiCHECK-2 und shlacZ/pENTR/U6 durchgeführt.

Der Knock down von *HSD17B7* bereitete dagegen weit größere Probleme. Die ersten drei getesteten Sequenzen (shHSD17B7-I, shHSD17B7-II und shHSD17B7-III) zeigten einen Knock-down zwischen 6 % (shHSD17B7-II) und 70 % (shHSD17B7-I, Abb. 2.32), der für

## 2. Ergebnisse

die weiteren geplanten Versuche nicht ausreichend war. Deshalb wurden weitere Sequenzen getestet, bis schließlich ein Knock-down von ca. 80 % (shHSD17B7-VII, im Folgenden als shHSD17B7 bezeichnet) nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 2.32: Knock-down Effizienz unterschiedlicher shHSD17B7-Konstrukte.** Um einen effizienten Knock-down von *HSD17B7* zu erreichen, mussten sieben unterschiedliche siRNA-Sequenzen getestet werden. Als positive Kontrolle fungierten Zellen, in denen nur HSD17B7/psiCHECK-2 transfiziert wurde.

Die siRNA-Sequenzen, die einen effizienten Knock-down der jeweiligen Gene hervorriefen und deshalb für die weiteren Versuche verwendet wurden sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

**Tabelle 2.3: Ausgewählte siRNA-Sequenzen**

Bezeichnung	NCBI Datenbank	Sequenz
shNSDHL-I	NM_015922	GGG CGT CGA TAT CAA GAA TGG
shHSD17B7-VII	NM_016371	GTG GCT TTG AAC AGG AAC TT
shEBP-I	NM_006570	GCT GGC CTC TTC TCT GTC ACA

### 2.4.3. Nachweis des Knock-down auf endogener mRNA-Ebene

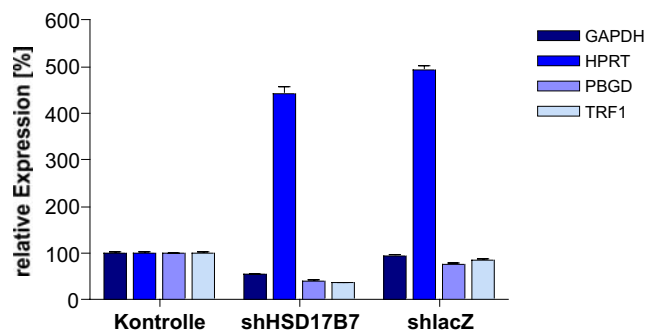
Bei den Screening-Experimenten mit psiCHECK-2 wurde der Knock-down von exogen zugeführter Target-mRNA gemessen. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde eine Quantifizierung der endogenen Target-mRNA mit Hilfe der quantitativen RealTime-PCR (qRT-PCR) durchgeführt.



### Auswahl der Housekeeping-Gene für die quantitative RealTime-PCR

In diesen qRT-PCR-Versuchen wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen, d. h. die Expression eines Gens wurde zu einem *Housekeeping*-Gen in Relation gesetzt. Dabei spielt die Auswahl dieser Vergleichsgene eine ganz entscheidende Rolle. Sie sind nicht regulierte proteinkodierende Gene, welche in jedem Zelltyp und in jedem Zellstadium konstant exprimiert sein sollten. Welche *Housekeeping*-Gene für den jeweiligen Versuchsaufbau geeignet sind, muss unbedingt experimentell getestet werden, da auch diese Gene einer Regulation unter den jeweiligen Versuchsbedingungen unterliegen können.

Für die Auswahl geeigneter *Housekeeping*-Gene wurden HeLa-Zellen mit shHSD17B7/pENTR/U6 bzw. shlacZ/pENTR/U6 transfiziert und 30 h nach der Transfektion für die RNA-Isolation geerntet. Als Kontrollprobe dienten Zellen, die nur mit dem Transfektionsmittel (FuGENE6) ohne Vektor behandelt wurden. Als *Housekeeping*-Gene wurden zunächst *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *HPRT* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), *PBGD* (*Porphobilinogen deaminase*) und *TRF1* (auch *TRFC*, *Transferrin Receptor*) getestet (Abb. 2.33). Dabei zeigte sich, dass die Expression von *HSD17B7* in Relation zu *GAPDH*, *PBGD* und *TRF1* identisch war. In Relation zu *HPRT* zeigten HeLa-Zellen, die mit shHSD17B7/pENTR/U6 transfiziert worden waren, einen Anstieg in der Expression von *HSD17B7* um ca. das Fünffache. Für die Expression von *NSDHL* und *EBP* ließ sich dieses Ergebnis ebenfalls bestätigen (Daten nicht gezeigt). Diese Daten deuteten auf eine Regulation von *HPRT* unter diesen Bedingungen hin. Deshalb wurde *HPRT* für diese Versuche nicht als *Housekeeping*-Gen verwendet.



**Abbildung 2.33: Test unterschiedlicher endogener Kontrollen für die quantitative RealTime-PCR.** In HeLa-Zellen wurde sowohl shHSD17B7/pENTR/U6 als auch shlacZ/pENTR/U6 transfiziert und die relative Expression von *HSD17B7* in Relation zu unterschiedlichen endogenen Kontrollen (*GAPDH*, *HPRT*, *PBGD* und *TRF1*) bestimmt. Dabei wurde die Expression in unbehandelten Zellen als 100 % definiert.

Für alle folgenden Versuche wurden *GAPDH* und *PBGD* als *Housekeeping*-Gene mitgeführt.

### **Bestätigung des Knock-down von NSDHL, HSD17B7 und EBP**

Für die Quantifizierung der Target-mRNAs wurden die shRNA-Konstrukte für den Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7*, *EBP* und *lacZ* (als Kontrolle für die Spezifität des Knock-downs) in HeLa-Zellen transfiziert und für 30 h inkubiert. Die Abnahme der Expression konnte mit Hilfe der qRT-PCR-Methode für die Gene *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* in Bezug zu zwei unterschiedlichen endogenen Kontrollen (*GAPDH* und *PBGD*) bestätigt werden (Abb. 2.34). Die Reduktion der jeweiligen Target-mRNA lag dabei für *NSDHL* bei 41–49 %, für *HSD17B7* bei 42–55 % und für *EBP* bei 46–68 %. Dabei zeigen sich leichte Schwankungen, je nachdem, welches Gen als endogene Kontrolle verwendet wurde. Gleichzeitig konnte mit diesem Versuch auch gezeigt werden, dass der Knock-down spezifisch ist. Die Hauptursache für den unvollständigeren Knock-down dürfte die transiente Transfektion sein, da nicht alle Zellen mit dem pENTR/U6 Vektor transfiziert wurden. In der quantitativen RealTime-PCR werden jedoch alle Zellen betrachtet, also auch diejenigen ohne die Expression der shRNAs.

#### **2.4.4. Stabile Zelllinien**

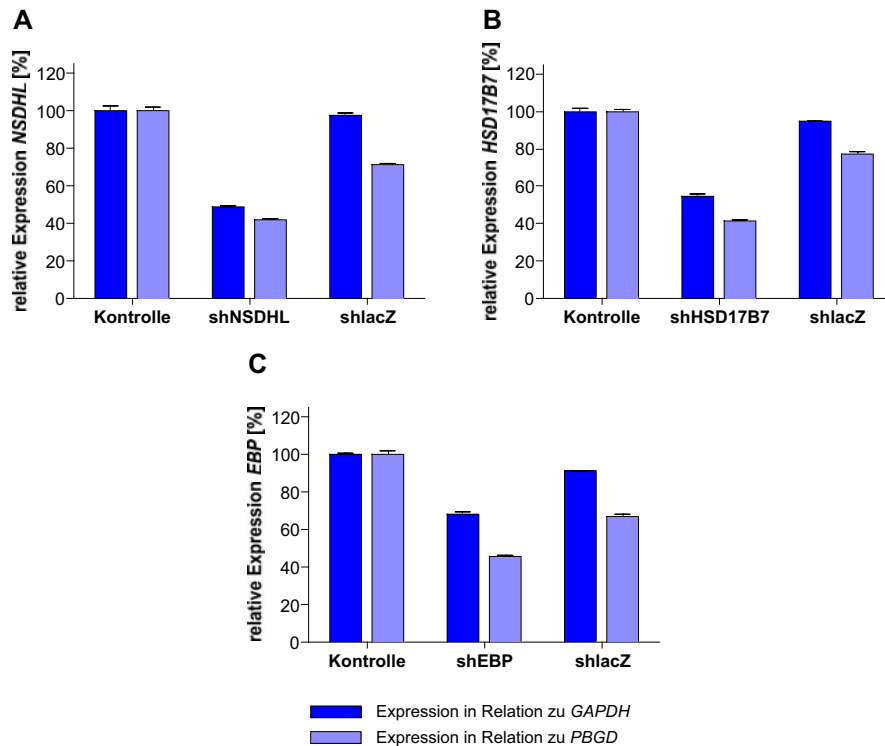
Die shRNA-Sequenzen für den Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* sollten auch stabil in Zellen transfiziert werden, um die Limitierungen der transienten Transfektion ausschließen zu können. Dafür wurde die HeLa T-REx-Zelllinie (*tetracyclin regulated expression*) ausgewählt. Diese Zellen bieten den Vorteil, dass die Expression des shRNA-Konstruktes beliebig durch die Zugabe von Tetrazyklin induziert werden kann (Kap. 4.3.1).

#### **Stabile Transfektion der shRNA-Konstrukte**

Für die stabile Transfektion wurden diejenigen shRNA-Sequenzen ausgewählt, die in der transienten Transfektion die besten Knock-down Ergebnisse erzielten (Kap. 2.4.2). Diese Sequenzen wurden in den Vektor pENTR/H1/TO inkloniert. Die stabile Transfektion wurde im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit [80] durchgeführt.

#### **Nachweis der Knock-down-Effizienz der stabilen Zelllinien mit Hilfe des Luciferase Screening Systems**

Die bei der stabilen Transfektion erhaltenen unterschiedlichen Klone (K) mussten auf ihre Knock-down-Effizienz getestet werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden psiCHECK-2-Vektoren in die mit den shRNA-Konstrukten stabil transfizierten Zellen



**Abbildung 2.34: Bestätigung des Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* mit Hilfe der quantitativen RealTime-PCR.** HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden pENTR/U6-Vektoren transfiziert und die Expression von *NSDHL* (A), *HSD17B7* (B) und *EBP* (C) mittels quantitativer RealTime-PCR bestimmt. Nur mit dem Leervektor transfizierte HeLa-Zellen dienten dabei als Kontrollen und wurden als 100 % Expression definiert. *GAPDH* und *PBGD* dienten als endogene Kontrollen. In allen Fällen konnte der Knock-down der endogenen Target-mRNA bestätigt werden.

transfiziert. Sechs Stunden nach der Transfektion wurde das Medium bei allen Zellen gewechselt und die Expression der shRNA-Konstrukte durch Zugabe von tetrazyklinhaltigem Medium gestartet. Nach einer 30-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und die Detektion mit dem Dual Luciferase Reporter Assay durchgeführt.

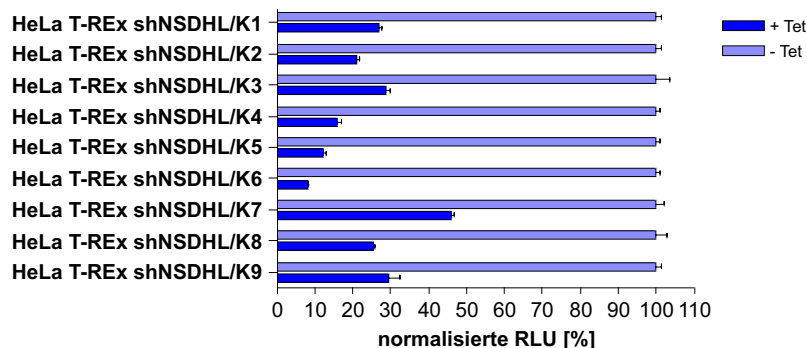
Im Rahmen der von D. Ilgen durchgeführten Masterarbeit wurden die Klone HeLa T-REx/shHSD17B7/K4 (im Folgenden als HeLa T-REx/shHSD17B7 bezeichnet) und HeLa T-REx/shEBP/K2 (im Folgenden als HeLa T-REx/shEBP bezeichnet) als die mit dem effektivsten Knock-down identifiziert. Dieser betrug in HeLa T-REx/shHSD17B7-Zellen 94 %, wenn die nichtinduzierte Zelllinie als Referenz genutzt wurde. Im Verhältnis zu den nativen HeLa T-REx-Zellen lag der Knock-down bei 95 %. Für HeLa T-REx/shEBP konnte ein Knock-down von 82 % im Vergleich zur nichtinduzierten Zelllinie gemessen wer-

## 2. Ergebnisse

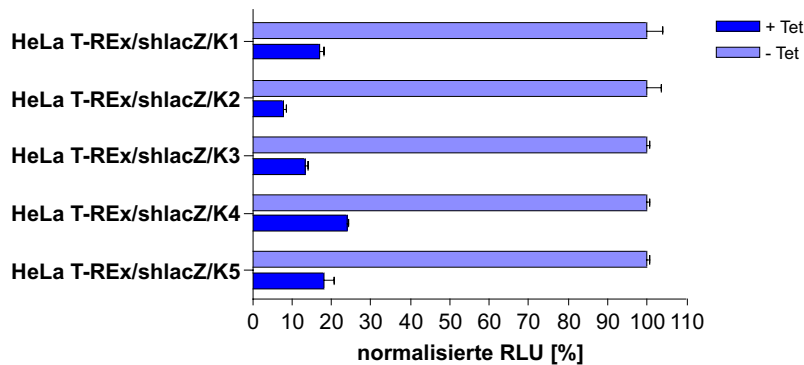
den. Diente die native HeLa T-REx-Zelllinie als Referenz, so lag der Knock-down bei 88 %. Die Ergebnisse für den Knock-down in HeLa T-REx/shNSDHL waren bis dato nicht einheitlich und wurden von mir erneut getestet (Abb. 2.35). Der Knock-down von neun Klonen wurde gegen native HeLa T-REx-Zellen gemessen, wovon HeLa T-REx/shNSDHL/K6 die größte Knock-down-Effizienz mit 92 % aufwies. Dieser Klon wurde für die weiteren Versuche verwendet und wurde im Folgenden als HeLa T-REx/shNSDHL bezeichnet.

Auch das shRNA-Konstrukt für den Knock-down von lacZ wurde stabil transfiziert. Diese stabile Zelllinie sollte als Kontrolle dienen. Aus der stabilen Transfektion entstanden fünf HeLa T-REx/shlacZ-Klone, die ebenfalls auf ihre Knock-down-Fähigkeit getestet wurden (Abb. 2.36). Alle Konstrukte zeigten einen signifikanten Knock-down zwischen 76 % (HeLa T-REx/shlacZ/K4) und 94 % (HeLa T-REx/shlacZ/K2). Für die weiteren Versuche wurde der Klon HeLa T-REx/shlacZ/K2 (im Folgenden als HeLa T-REx/shlacZ bezeichnet) verwendet.

Bei all diesen Versuchen zeigte sich, dass der Knock-down nicht immer induzierbar war. Alle Versuche mussten mindestens vier mal wiederholt werden, um sichere Ergebnisse zu erhalten. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass auch ohne Zugabe von Tetrazyklin ein geringer Anteil an shRNA exprimiert wird.



**Abbildung 2.35: Knock-down-Effizienz der HeLa T-REx/shNSDHL-Klone.** NSDHL/psiCHECK-2 wurde in die HeLa T-REx/shNSDHL-Klone transfiziert. Nach 6 h wurde das Medium abgenommen und die Expression der shRNA durch Zugabe von Tetrazyklin gestartet. Die Messung erfolgte nach weiteren 30 h Inkubation. Als Kontrolle dienten native HeLa T-REx-Zellen, deren RLU als 100 % definiert wurde. Die RLU der induzierten stabil shRNA-exprimierenden Zellen wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Alle getesteten Klone wiesen einen signifikanten Knock-down auf. (Tet = Tetrazyklin)



**Abbildung 2.36: Knock-down Effizienz der HeLa T-REx/shlacZ-Klone.** Alle HeLa T-REx/shlacZ Klone zeigten einen signifikanten Knock-down. Die Werte wurden zu den nativen HeLa T-REx-Zellen in Relation gesetzt. Diese wurden als 100 % definiert. (Tet = Tetrazyklin)

### Bestätigung des Knock-down in den stabilen Zelllinien mit quantitativer RealTime-PCR

Auch für die stabil transfizierten shRNA-Konstrukte sollte der Knock-down auf endogener mRNA-Ebene bestätigt werden. Dazu wurde aus den Zellen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als Vorversuche für die quantitative RealTime-PCR wurden die zu untersuchenden mRNAs mit spezifischen Primern in einer einfachen PCR amplifiziert. Als Kontrolle diente dabei die Amplifizierung von  $\beta$ -Actin. Auf dem Agarosegel sind die Banden für *NSDHL* (793 bp), *HSD17B7* (993 bp) und *EBP* (629 bp) deutlich zu erkennen (Daten gezeigt für *HSD17B7*, Abb. 2.37). RNA aus HeLa T-REx/shlacZ-Zellen diente dabei als Kontrolle. Die Abnahme der *HSD17B7*-RNA durch RNAi in mit Tetrazyklin induzierten HeLa T-REx/shHSD17B7 gegenüber nativen HeLa Zellen war hier deutlich zu erkennen. Das Expressionslevel von nativen HeLa T-REx Zellen und HeLa T-REx/shHSD17B7 ohne Zugabe von Tetrazyklin schien in etwa gleich hoch zu sein.

Zur genaueren Quantifizierung der Knock-down-Effizienz wurde die Verringerung der Expression mittels quantitativer RealTime-PCR untersucht. Als Kontrolle dienten native HeLa T-REx-Zellen, deren Expression von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* als 100 % Expression definiert wurde. Die induzierten HeLa T-REx/shNSDHL-Zellen zeigten eine Reduktion der Expression von 73–85 % (Abb. 2.38, A). Die Expression von *HSD17B7* wurde um 68–76 % (Abb. 2.38, B) und die von *EBP* um 79–84 % (Abb. 2.38, C) verringert. Die Unterschiede, die in Relation zu den hier verwendeten *Housekeeping*-Genen *GAPDH* und *PBGD* entstanden, waren nur sehr gering. Um die Spezifität des Knock-down zu unter-

## 2. Ergebnisse

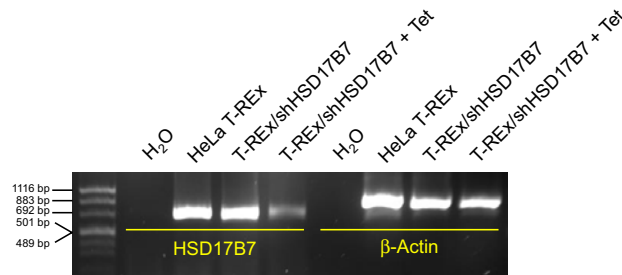


Abbildung 2.37: Bestätigung des Knock-down von *HSD17B7* in HeLa T-REx/shHSD17B7 mittels PCR. Als Kontrolle diente die Amplifizierung von  $\beta$ -Actin.

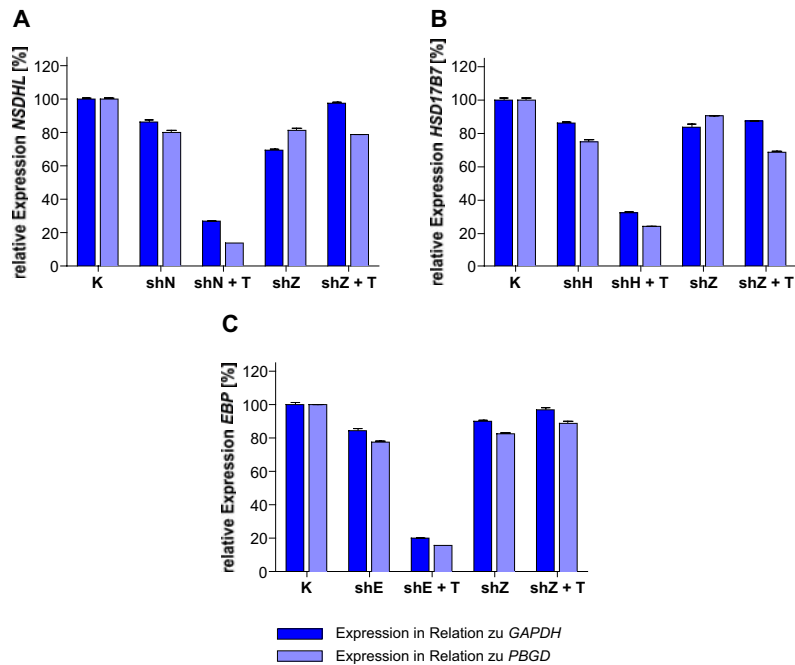


Abbildung 2.38: Bestätigung des Knock-down der stabil tranfizierten Zelllinien mit Hilfe quantitativer RealTime-PCR. Durch Zugabe von Tetrazyklin wurde die Expression der shRNA-Konstrukte gestartet. Nach 32 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurde die quantitative RealTime-PCR durchgeführt. Dabei dienten native HeLa T-REx-Zellen als Kontrolle, deren Expression wurde auf 100 % festgelegt. Auch in HeLa T-REx/shlacZ-Zellen wurde die Expression gemessen um zu zeigen, dass der Knock-down spezifisch war. Für alle getesteten Klone konnte eine signifikante Reduktion der Target-mRNA gemessen werden. (K = native HeLa T-REx, shN = HeLa T-REx/shNSDHL, shH = HeLa T-REx/shHSD17B7, shE = HeLa T-REx/shEBP, shZ = HeLa T-REx/shlacZ, + T = Induktion durch Zugabe von Tetrazyklin)

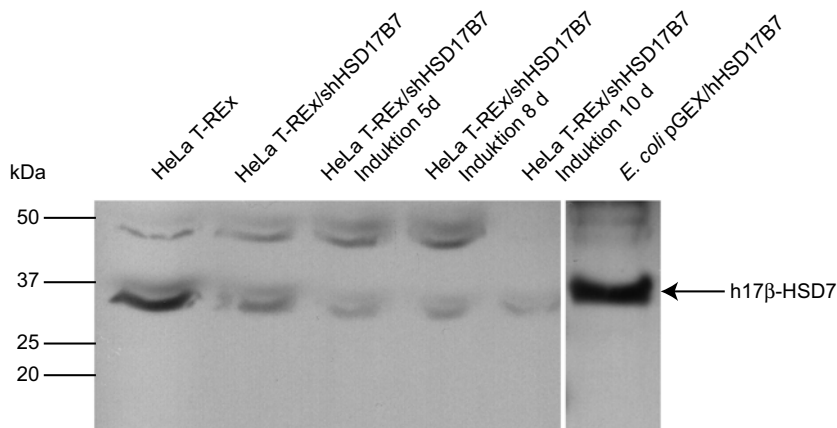
suchen und um unerwünschte Nebeneffekte ausschließen zu können, wurde die Expression auch in HeLa T-REx/shlacZ untersucht. Dabei zeigte sich eine ähnliche Expressionsrate der Gene *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* wie in nativen HeLa T-REx-Zellen. Diese Versuche bestätigten zudem die Beobachtung aus den Screening-Experimenten, dass bei stabil transfizierten HeLa T-REx-Zellen auch ohne Zugabe von Tetrazyklin ein kleiner Anteil an shRNA exprimiert wurde. Die Expression der untersuchten Gene ist in den jeweiligen stabil tranfizierten Zellen um ca. 10–20 % geringer als in nativen HeLa T-REx-Zellen.

### Nachweis des Knock-down von HSD17B7 auf Proteinebene

Für die weiteren Untersuchungen war es von entscheidender Bedeutung, dass nicht nur eine Reduktion auf mRNA-Ebene stattfand, sondern dass die Reduktion auch auf Proteinebene nachweisbar war. Besonders wichtig war hierbei der Zeitraum, in dem eine solche Reduktion bestätigt werden konnte.

Die Expression von shHSD17B7-RNA wurde in HeLa T-REx/shHSD17B7 für unterschiedlich lange Zeiträume (fünf, acht und zehn Tage) induziert. Als Referenz dienten sowohl native HeLa T-REx- als auch nicht induzierte HeLa T-REx/shHSD17B7-Zellen. Als positive Kontrolle diente eine humane HSD17B7-exprimierende *E. coli*-Kultur. Der Western Blot wurde mit einem Peptidantikörper gegen HSD17B7 durchgeführt.

Humane HSD17B7 besitzt ein Molekulargewicht von 35 kDa. In dieser Größe wurden distinkte Banden nachgewiesen, die kontinuierlich über einen Zeitraum von 10 Tagen abnehmen (Abb. 2.39).



**Abbildung 2.39: Nachweis des Knock-down von humaner HSD17B7 in HeLa T-REx/shHSD17B7.** HSD17B7 konnte bei 35 kDa detektiert werden. Mit zunehmender Induktionsdauer wurde die Menge an vorhandenem Protein reduziert.

Dieser Versuch zeigte, dass nach spätestens einer 10-tägigen Induktion der shRNA eine signifikante Reduktion auf Proteinebene erreicht wurde.

#### **2.4.5. Auswirkungen der RNAi in transient transfizierten Zellen auf apoptotisches Verhalten und Zellviabilität**

Die Immunfärbungen an Mäuseembryonen haben gezeigt, dass Cholesterinbiosynthese und Apoptose in einigen Bereichen colokalisieren. Zudem stimmten diese Gewebe mit denen überein, die bei den unterschiedlichen Symptomen einer defekten Cholesterinbiosynthese betroffen sind. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen einer Enzymverringerung auf die Apoptose und die Zellviabilität untersucht.

##### **Optimierung der positiven Kontrolle Staurosporin**

Um Veränderungen im apoptotischen Verhalten der Zellen durch RNAi messen zu können, benötigte man eine induzierbare Apoptose als Kontrolle. In diesem Fall erfolgte diese Induktion durch Zugabe von Staurosporin aus *Streptomyces staurosporeus* zum Zellkulturmedium. Staurosporin hemmt nicht nur die Proteinkinase C, wie zunächst angenommen, sondern besitzt eine weitaus größere Spezifität für viele unterschiedliche Proteinkinasen [157, 173].

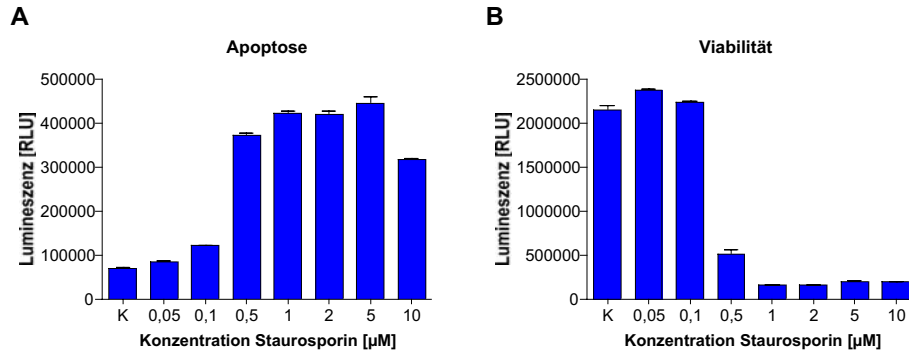
Zunächst wurde die Menge an zugegebenen Staurosporin und der zeitliche Verlauf der Apoptoseinduktion optimiert. Dazu wurden HeLa-Zellen in 12 well Platten ausgesät und zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen an Staurosporin behandelt. Nach ca. 6 h wurde mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7 Assays (Kap. 4.3.6) die Apoptose (Abb. 2.40, A) und mit dem CellTiter-Glo Assay (Kap. 4.3.6) die Zellviabilität gemessen (Abb. 2.40, B). Dabei zeigte sich, dass eine 1  $\mu\text{M}$  Staurosporinkonzentration für die Apoptoseinduktion ausreichend war. Eine höhere Konzentration an Staurosporin ergab ein unwesentlich stärkeres Apoptosesignal. Die Zellviabilität sank dabei in gleichem Maße, mit dem die Apoptoserate der Zellen anstieg. Bereits bei einer 0,5  $\mu\text{M}$  Staurosporinkonzentration war die Viabilität der Zellen stark eingeschränkt.

Für die Untersuchung der Kinetik der Apoptoseinduktion mit Hilfe von Staurosporin wurde den Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten Staurosporin in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Die Zellen wurden zum selben Zeitpunkt geerntet und die Zellkulturassays durchgeführt.

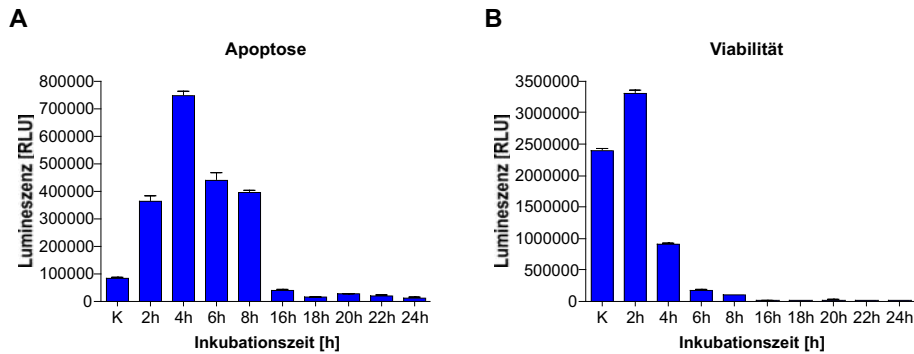
Nach einer vierstündigen Inkubationsdauer war die apoptotische Reaktion am stärksten ausgeprägt (Abb. 2.41, A). Nach einer Inkubation von mehr als 10 Stunden nahm die Apoptosereaktion drastisch ab. Im Viabilitätstest konnte man deutlich sehen, dass bereits nach einem Zeitraum von 4–6 Stunden kaum noch Viabilität zu messen war (Abb. 2.41, B). Die Zellen waren nach dieser Zeit zum Großteil bereits tot, so dass auch keine Apoptose



## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.40: Optimierung der Apoptoseinduktion durch Staurosporin.** HeLa-Zellen wurden in 12 well Platten ausgesät und am folgenden Tag mit unterschiedlichen Mengen Staurosporin behandelt. Nach 6 h Inkubationszeit wurden die Zellen für die Detektion mit dem Caspase-Glo 3/7 Reagent geerntet. Dabei zeigte sich, dass eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Staurosporin für die Induktion der Apoptose ausreichend war.



**Abbildung 2.41: Kinetik der Staurosporininduktion.** Staurosporin wurde in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 24 h zugegeben. Als Kontrolle (K) dienten Zellen ohne Zugabe von Staurosporin. Gemessen wurden die Auswirkungen auf das apoptotische Verhalten (A) und die Zellviabilität (B).

mehr messbar war.

Für die folgenden Versuche wurde Staurosporin deshalb in einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  4 Stunden vor Versuchsende zugesetzt.

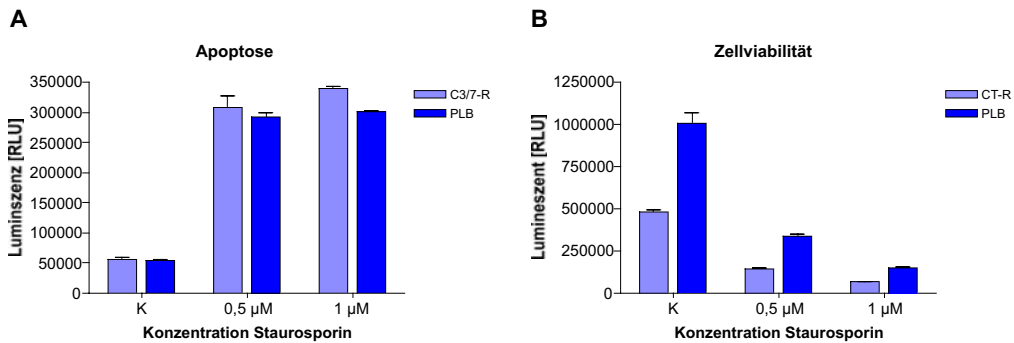
### Optimierung der Zellkultur-Assays

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkultur-Assays sind für eine Anwendung im 96 well Format ausgelegt. Bei den ersten Versuchen hat sich allerdings gezeigt, dass eine Versuchsdurchführung in diesem Format keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte (Daten nicht gezeigt). Deshalb musste die Anwendung sowohl für den Caspase-Glo 3/7 Assay als auch für den CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay so optimiert werden, dass eine Durchführung im 12 well Format möglich wurde. Gleichzeitig sollte eine Messung von Apoptose und Zellviabilität aus einem einzigen well ermöglicht werden, da dadurch mehr Informationen gewonnen werden.

Für diese Optimierung wurden die Zellen nach der Behandlung mit Staurosporin mit unterschiedlichen Volumina der entsprechenden Assay-Reagenzien (Caspase-Glo 3/7 Reagenz, CellTiter-Glo Reagenz) bzw. Passive Lysis Buffer (PLB) aufgenommen und unterschiedlich lange bis zur Messung der Lumineszenz inkubiert. Die Assay-Reagenzien wurden dabei im Verhältnis 1:1 direkt zum Zellkulturmedium zugegeben (je  $200 \mu\text{l}$ /well). Die Zellen wurden unterschiedlich lange inkubiert, in eine weiße 96 well Platte überführt und anschließend gemessen. Bei der Behandlung mit PLB wurde das Zellkulturmedium abgenommen und  $200 \mu\text{l}$  PBL direkt auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 15 min inkubiert. Aus jedem well wurden 3 mal  $20 \mu\text{l}$  in eine weiße 96 well Platte überführt und gleiches Volumen der Assay-Reagenzien zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation erfolgte auch hier die Messung.

Bei der Messung der Apoptose zeigten die unterschiedlich behandelten Zellen gleiche Messwerte (Abb. 2.42, A). Bei der Lumineszenzdetektion der Zellviabilität wiesen die mit PLB behandelten Zellen sogar noch höhere Werte auf als die Zellen, die direkt mit dem CellTiter-Glo Reagenz versetzt wurden (Abb. 2.42, B). Rechnet man die erhaltenen Werte in Prozentwerte um und definierte die Zellviabilität der unbehandelten Zellen als 100 %, so erhielt man in beiden hier gezeigten Fällen eine Viabilität von 33 % für die mit  $0,5 \mu\text{M}$  Staurosporin behandelten Zellen und 14 % Viabilität für die mit  $1 \mu\text{M}$  Staurosporin behandelten Zellen. Das Verhältnis der einzelnen Proben zueinander änderte sich nicht, lediglich die Absolutwerte wurden erhöht.

Für die weiteren Versuche wurden die Zellen in Passive Lysis Buffer aufgenommen und erst anschließend mit dem jeweiligen Assay Reagenz versetzt.

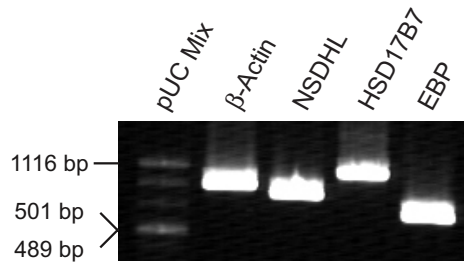


**Abbildung 2.42: Optimierung der Zellkultur-Assays für die Anwendung im 12 well Format.** HeLa-Zellen wurden auf einer 12 well Platte ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen Staurosporin behandelt. Zellen ohne Staurosporin dienten dabei als Kontrolle (K). Zur Detektion wurden die Zellen einmal in 200 µl des jeweiligen Assay-Reagent (Caspase-Glo 3/7 Reagenz = C3/7-R, CellTiter-Glo Reagenz = CT-R) bzw. in 200 µl Passive Lysis Buffer aufgenommen. Die standard-behandelten Zellen wurden direkt zur Messung auf eine 96 well Platte überführt. Die mit PLB behandelten Zellen wurden ebenfalls auf eine 96 well Platte gegeben. Dann wurde gleiches Volumen des entsprechenden Assays zugegeben, die Proben geschüttelt, 10 min inkubiert und anschließend gemessen.

### Nachweis der Expression von NSDHL, HSD17B7 und EBP in den verwendeten Zelllinien

Die Auswirkungen auf Apoptose und Viabilität durch Verringerung der Expression von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* sollten zunächst mittels transienter Transfektion untersucht werden. Dazu wurden die Konstrukte in HeLa-Zellen transfiziert. Diese Zellen wurden verwendet, um einen Vergleich mit den stabil transfizierten Zellen, bei denen es sich ebenfalls um HeLa-Zellen handelte, ziehen zu können. Gleichzeitig wurden diese Versuche auch in zwei anderen Zelllinien durchgeführt. HepG2-Zellen, eine Leberzelllinie, wurde verwendet, da ein Großteil der adulten Cholesterinbiosynthese in der Leber stattfindet. Die Versuche wurden auch in MRC-5-Zellen durchgeführt, bei denen es sich um fötale Lungenzellen handelt. Die Auswirkungen der RNAi könnten hauptsächlich in embryonalem Gewebe nachweisbar sein.

Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde in allen diesen Zelllinien mit Hilfe einer Standard-PCR überprüft. Gezeigt wurde hier exemplarisch die Expression in MRC-5-Zellen (Abb. 2.43). Dabei diente die Expression von  $\beta$ -Actin als Kontrolle. Die amplifizierten Produkte wiesen erwartungsgemäß folgende Größen auf: 884 bp für  $\beta$ -Actin, 793 bp für *NSDHL*, 993 bp für *HSD17B7* und 629 bp für *EBP*. Die Expression der zu untersuchenden Gene konnte in allen verwendeten Zellen eindeutig nachgewiesen werden.



**Abbildung 2.43: Expression der zu untersuchenden Cholesterinbiosynthese-Enzyme in MRC-5-Zellen.** Aus MRC-5-Zellen wurde RNA isoliert. Nach der Umschreibung in cDNA wurden  $\beta$ -Actin, NSDHL, HSD17B7 und EBP mit spezifischen Primern amplifiziert.

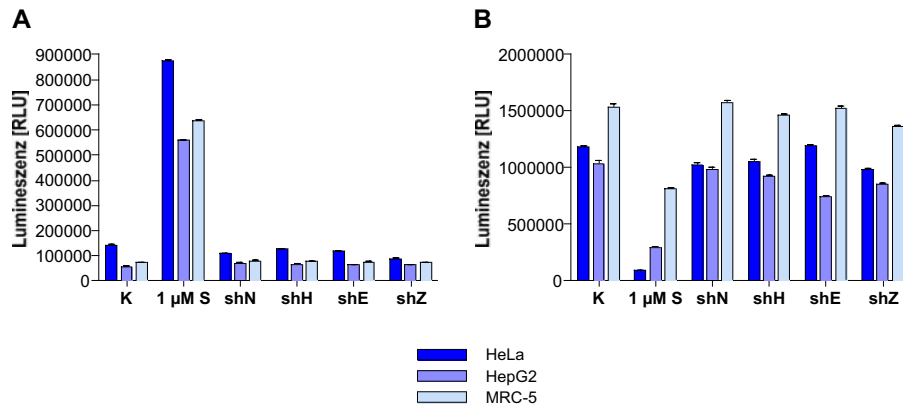
### Auswirkungen der RNAi in HeLa, HepG2 und MRC-5

Um Veränderungen im apoptotischen Verhalten der Zellen zu detektieren, wurden HeLa-, HepG2- und MRC-5-Zellen mit den shRNA-exprimierenden Vektoren zur Reduktion von NSDHL, HSD17B7, EBP und lacZ transfiziert. Um möglichst hohe Transfektionseffizienzen zu erhalten wurden die besten Transfektionsbedingungen für alle verwendeten Zelllinien in jedem verwendeten Format experimentell ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion mit dem shRNA-Konstrukt für den Knock-down von lacZ diente als Kontrolle, um unspezifische Effekte, die möglicherweise durch die Transfektion bzw. den pENTR/U6-Vektor ausgelöst werden könnten, identifizieren zu können.

Dieser Versuch zeigte sehr deutlich, dass sich Apoptose in allen drei verwendeten Zelllinien durch Zugabe von Staurosporin induzieren ließ. Des weiteren war zu beobachten, dass sich gegenüber den untransfizierten Kontroll-Zellen kein Unterschied im apoptotischen Verhalten von HeLa-, HepG2- und MRC-5-Zellen feststellen ließ (Abb. 2.44, A). Demzufolge zeigte sich auch kein Unterschied der einzelnen Zellen in ihrer Viabilität (Abb. 2.44, B). In diesen Versuchen ließ sich die Apoptose nur durch Zugabe von Staurosporin induzieren. In den shRNA-transfizierten Zellen zeigten sich keine Veränderungen gegenüber nicht transfizierten Zellen

Wie in Kapitel 2.4.4 gezeigt werden konnte, ist zumindest das Protein HSD17B7 über mehrere Tage hinweg stabil. Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich Auswirkungen der RNAi nach längerem Inkubationszeitraum beobachten lassen.



**Abbildung 2.44: Apoptose und Zellviabilität in transient transfizierten HeLa-, HepG2- und MRC-5-Zellen.** HeLa- und HepG2-Zellen wurden mit je 3  $\mu$ l FuGENE6 und 1  $\mu$ g shRNA-Vektor transfiziert. Die Transfektion von MRC-5-Zellen wurde mit 3  $\mu$ l FuGENE6 und 2  $\mu$ g shRNA-Vektor durchgeführt. Die Zellen wurden 32 h nach der Transfektion mit den unterschiedlichen Assay-Reagenzien behandelt und anschließend die Lumineszenz gemessen. **A** zeigt die Apoptosemessung und in **B** wurde die Viabilität der einzelnen Zellen dargestellt. (K = Kontrolle, Zellen nicht transfiziert; 1  $\mu$ M S = Zugabe von 1  $\mu$ M Staurosporin zu untransfizierten Zellen 6 h vor dem Lysieren der Zellen; shN = Transfektion mit shNSDHL/pENTR/U6; shH = Transfektion mit shHSD17B7/pENTR/U6; shE = Transfektion mit shEBP/pENTR/U6; shZ = Transfektion mit shlacZ/pENTR/U6)

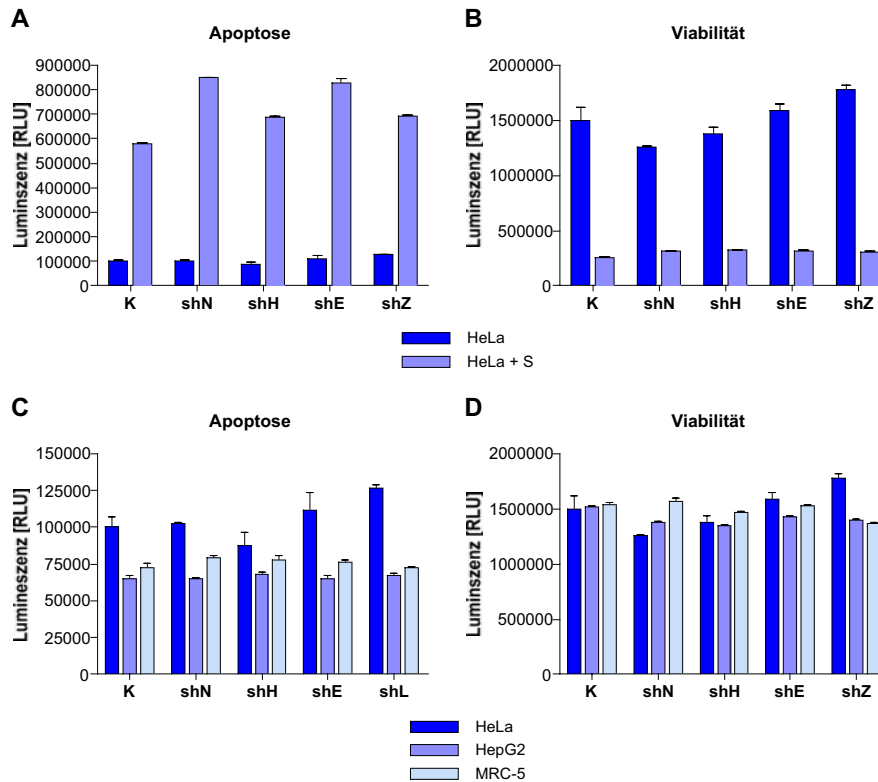
### Auswirkungen der RNAi bei Transfektion über längere Zeiträume

Auch hier wurden die Versuche sowohl in HeLa-, HepG2- und MRC-5-Zellen durchgeführt, um eventuelle Unterschiede aufdecken zu können. Die Zellen wurden über unterschiedlich lange Zeiträume alle zwei Tage nachtransfiziert, um einen konstanten Knock-down über 5, 10, 15 und 20 Tage zu erhalten. So sollte gewährleistet werden, dass der Knock-down nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene stattfindet.

Die Apoptoseinduktion erfolgte hier in untransfizierten Zellen und zugleich auch in mit shRNA transfizierten Zellen. In allen Zellen erhielt man durch die Zugabe von Staurosporin einen starken Anstieg der Apoptose (Abb. 2.45, A), was mit einer gleichzeitigen Verringerung der Viabilität einherging (Abb. 2.45, B; hier nur Daten für HeLa-Zellen gezeigt). Staurosporin wurde in allen Versuchen als positive Kontrolle mitgeführt (in Abb. 2.45 C und D nicht gezeigt).

Die erhaltenen Ergebnisse waren für die unterschiedlich langen Inkubationszeiten (5, 10, 15 und 20 Tage) völlig identisch, deshalb wurden hier nur die Daten für die 15-tägige Nachtransfektion gezeigt. Dabei zeigten sich keine messbaren Auswirkungen auf die Apoptoseintensität der einzelnen Zelllinien.

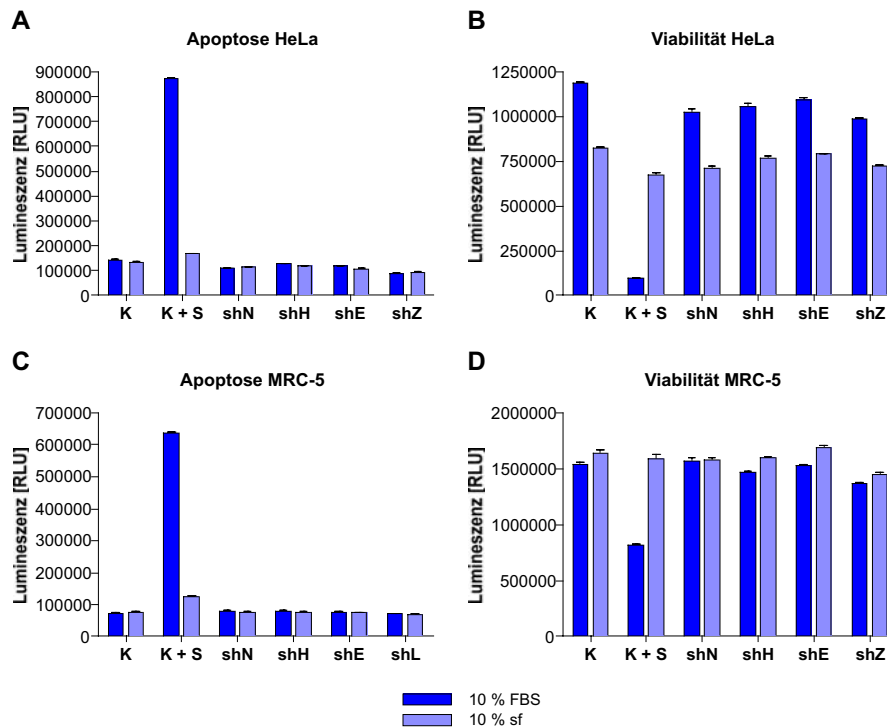
## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.45: Langzeittransfektion der shRNA-Konstrukte über 15 Tage.** Die Zellen wurden alle zwei Tage erneut mit den pENTR/U6-Vektoren transfiziert und 15 Tage nach der ersten Transfektion für die Messungen lysiert. Staurosporin wurde jeweils 4 h vor der Messung zu den Zellen gegeben. **A** und **B** zeigen HeLa-Zellen, bei denen Staurosporin auch zu den transfizierten Zellen zugegeben wurde. In **C** und **D** wurde die Staurosporin-Probe nicht gezeigt. (K = Kontrolle, Zellen nicht transfiziert; 1  $\mu$ M S = Zugabe von 1  $\mu$ M Staurosporin zu untransfizierten Zellen 6 h vor dem Lysieren der Zellen; shN = Transfektion mit shNSDHL/pENTR/U6; shH = Transfektion mit shHSD17B7/pENTR/U6; shE = Transfektion mit shEBP/pENTR/U6; shZ = Transfektion mit shlacZ/pENTR/U6)

### Untersuchung der Auswirkungen der RNAi bei Anzucht der Zellen auf unterschiedlichen Seren

Um auszuschließen, dass Zellen das durch den Knock-down einiger wichtiger Cholesterinbiosynthese-Enzyme fehlende Cholesterin und dessen Folgeprodukte aus dem Medium aufnehmen können und somit die möglicherweise auftretenden Auswirkungen unterdrücken können, wurden die Zellen für unterschiedlich lange Zeiträume in einem Medium mit steroidfreiem Serum kultiviert. Gleichzeitig erfolgte eine konstante Transfektion von shNSDHL/pENTR/U6, shHSD17B7/pENTR/U6, shEBP/pENTR/U6 und shlacZ/pENTR/U6 über einen Zeitraum von 15 Tagen hinweg. Die Zellen wurden dabei alle 2 Tage erneut transfiziert.



**Abbildung 2.46: Anzucht der Zellen auf unterschiedlichen Seren.** Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen alle 2 Tage transfiziert. Nach 12 Tagen wurde bei allen Zellen das Medium gewechselt, und ein Teil der Zellen auf Medium mit steroidfreiem Serum (10 % sf) weiter kultiviert. Die Detektion der Luciferaseaktivität erfolgte nach 15 Tagen. (K = Kontrolle, Zellen nicht transfiziert; 1  $\mu$ M S = Zugabe von 1  $\mu$ M Staurosporin zu untransfizierten Zellen 6 h vor dem Lysieren der Zellen; shN = Transfektion mit shNSDHL/pENTR/U6; shH = Transfektion mit shHSD17B7/pENTR/U6; shE = Transfektion mit shEBP/pENTR/U6; shZ = Transfektion mit shlacZ/pENTR/U6)

Der Wechsel von Vollmedium zu Medium mit steroidfreiem Serum wurde nach 12 Tagen durchgeführt. Dies sollte gewährleisten, dass die Zellen zu Beginn des Versuches nicht beeinträchtigt wurden, um sich weiterhin gut transfizieren zu lassen. Anschließend wurden die Zellen noch 3 Tage lang auf Medium mit steroidfreiem Serum kultiviert. Den Zellen sollte es damit nicht mehr möglich sein, fehlendes Cholesterin oder dessen Vorstufen bzw. Folgeprodukte von außerhalb aufzunehmen.

In der Auswertung sind die Daten für die Versuche in HeLa- (Abb. 2.46 A und B) und MRC-5-Zellen (Abb. 2.46 C und D) gezeigt. HepG2-Zellen verhielten sich bei diesem Versuch identisch zu HeLa-Zellen. Es konnte zunächst festgestellt werden, dass sich die Apoptose durch Zugabe von 1  $\mu$ M Staurosporin zu Zellen auf steroidfreiem Serum nicht induzieren ließ (Abb. 2.46 A und C). Separate Versuche dazu zeigten, dass selbst eine 10-fache Konzentration an Staurosporin bei Zellen, die auf steroidfreiem Serum wuchsen, nur eine schwache Apoptosereaktion auslösen konnte (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren war zu beobachten, dass HeLa-Zellen, die in Medium mit steroidfreiem Serum wuchsen, eine geringere Viabilität aufwiesen als HeLa-Zellen in Vollmedium (mit 10 %FBS). Die Zellen wurden einen Tag vor der Messung nochmals gesplittet und gleiche Zellzahlen pro Well ausgesät. Deshalb konnte man davon ausgehen, dass die unterschiedliche Viabilität nicht auf eine Differenz in der absoluten Zellzahl zurückzuführen war. MRC-5-Zellen zeigten diese Eigenschaft nicht. Hier war die Viabilität von Zellen auf 10 % FBS-haltigem Medium identisch mit der von Zellen auf 10 %igem steroidfreiem Serum. Im apoptotischen Verhalten zeigen weder HeLa- noch MRC-5-Zellen eine Veränderung. Die über einen Zeitraum von 15 Tagen shNSDHL-, shHSD17B7-, shEBP- und shlacZ-exprimierenden Zellen wiesen eine identische Apoptoserate auf wie nicht transfizierte Zellen, unabhängig vom eingesetzten Serum.

### **2.4.6. Auswirkungen der RNAi in stabil transfizierten Zellen auf apoptotisches Verhalten und Zellviabilität**

Bei der transienten Transfektion shRNA-exprimierender Vektoren konnte keine 100 %ige Transfektionseffizienz erreicht werden. Um sicherzustellen, dass wirklich alle Zellen, die man untersucht, die shRNA exprimieren, wurden nun die stabil transfizierten Zellen verwendet. Dies sollte verhindern, dass schwache Auswirkungen der RNAi im Hintergrund von nicht transfizierten Zellen übersehen werden könnten.

#### **Morphologie der stabil transfizierten HeLa T-REx-Zellen**

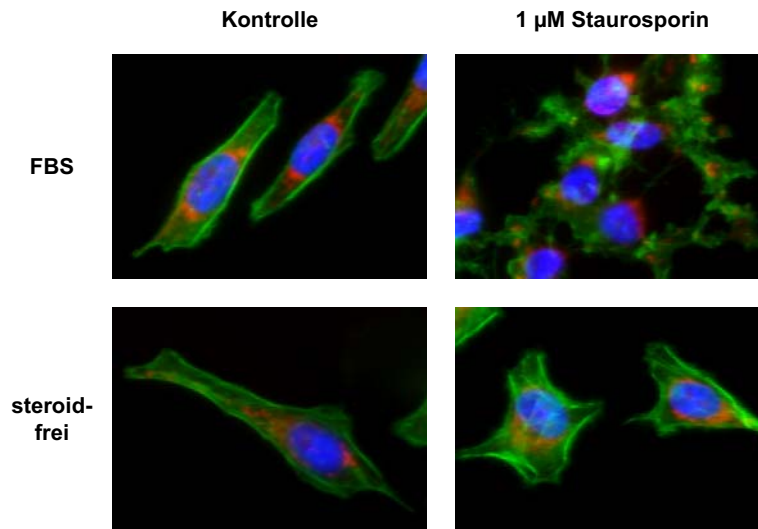
Um erste Hinweise auf die Auswirkungen der RNAi in HeLa T-REx-Zellen zu erhalten, wurde nach morphologischen Unterschieden zwischen nicht induzierten und induzierten stabil transfizierten HeLa T-REx-Zellen gesucht. Dafür wurde die Expression der shRNA-



## 2. Ergebnisse

---

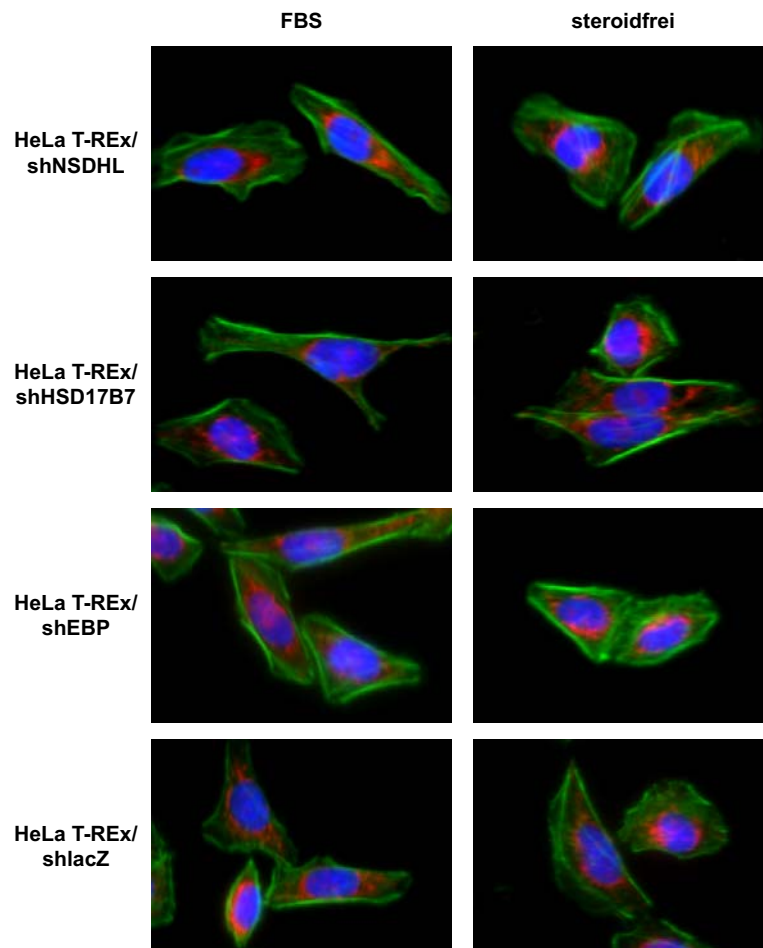
Konstrukte konstant über einen Zeitraum von 15 Tagen induziert. Die Zellen wurden auf Medium mit 10 % FBS (Vollmedium) und mit 10 % steroidfreiem Serum (Mangelmedium) kultiviert. In Vorversuchen wurde mit Hilfe von Staurosporin die Apoptose bei HeLa T-REx-Zellen induziert, um einen Vergleich apoptotischer Zellen zu erhalten.



**Abbildung 2.47: Morphologie der nativen HeLa T-REx-Zellen.** HeLa T-REx-Zellen wurden auf Medien mit unterschiedlichen Seren (10 % FBS und 10 % steroidfreies Serum) kultiviert. Vier Stunden vor Beginn der Zellfärbung wurde dem Medium Staurosporin zugesetzt. Cytoskelett, Mitochondrien und Zellkern wurden gefärbt (Kap. 4.3.5) und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Da bei der Betrachtung der Zellen im Lichtmikroskop keine Unterschiede gegenüber den nativen Zellen festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurden das Cytoskelett, die Mitochondrien und der Zellkern mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt (Kap. 4.3.5). Die Auflösung des Cytoskeletts durch die Apoptose war deutlich zu erkennen (Abb. 2.47). Wurden die Zellen auf Medium mit steroidfreiem Serum kultiviert, konnten keine morphologischen Veränderungen selbst nach Zugabe von Staurosporin festgestellt werden.

Die stabil transfizierten Zellen wurden zur genaueren Untersuchung der Zellmorphologie für 15 Tage mit Tetrazyklin behandelt, was eine konstante Expression der shRNA gewährleistete. Zudem wurde die Abhängigkeit der Knock-down-Auswirkungen von unterschiedlichen Seren auf die Apoptose überprüft. Dabei konnte auch nach längerer konstanter shRNA-Expression und Wachstum auf Medium mit steroidfreiem Serum kein morphologischer Unterschied zu nativen HeLa T-REx-Zellen festgestellt werden (Abb. 2.48).



**Abbildung 2.48: Morphologie der stabilen HeLa-T-REx Zellen.** Über einen Zeitraum von 15 Tagen erfolgte eine konstante Expression der unterschiedlichen shRNAs. Zwei Tage vor der Färbung wurde bei einem Teil der Zellen das Medium gewechselt und diese in Medium mit 10 % steroidfreiem Serum kultiviert.

### **Auswirkungen der RNAi bei Kultivierung von HeLa T-REx-Zellen auf Medien mit unterschiedlichen Seren**

Um die Auswirkungen der RNAi untersuchen zu können, sollten die Zellen nicht nur im Vollmedium (mit 10 % FBS) kultiviert werden, sondern auch unter Serumangel (0,1 % FBS oder 10 % steroidfreies humanes Serum) angezogen werden. Unter diesen Wachstumsbedingungen durchgeführte Versuche könnten wichtige Hinweise auf die Auswirkungen der Reduktion von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* liefern, da die Zellen fehlende Substanzen unter Umständen nicht oder nicht in ausreichendem Maße aus dem Medium aufnehmen können.

### **Apoptoserate und Zellviabilität von HeLa T-REx-Zellen bei Zugabe von Staurosporin**

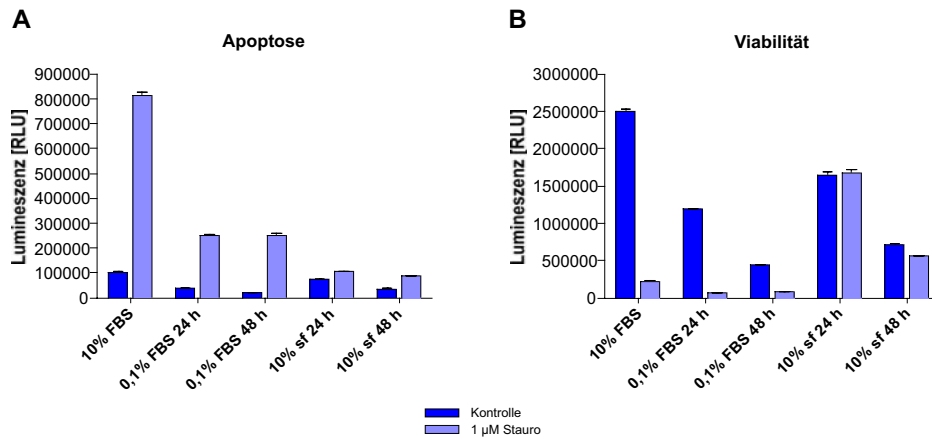
Zunächst wurden die Apoptoserate und die Zellviabilität der HeLa T-REx-Zellen auf den unterschiedlichen Medien mit und ohne Apoptoseinduktion getestet (Abb. 2.49). Dabei zeigte sich, dass die Zellviabilität am größten war, wenn die Zellen auf 10 % FBS-haltigem Medium kultiviert wurden. Bei längerer Kultivierungsdauer auf Medium mit 0,1 % FBS oder mit steroidfreiem Serum nahm die Viabilität ab, wobei die Zellen am schlechtesten auf Mangelmedium mit 0,1 % FBS wuchsen. Die Apoptosereaktion ließ sich am besten bei Zellen auf Normalmedium beobachten. Auch Zellen auf Mangelmedium zeigten eine erhöhte Apoptoserate nach Staurosporinzugabe. Durch Zugabe von Staurosporin ließ sich bei Wachstum der Zellen auf Medium mit steroidfreiem Serum Apoptose nur sehr schwach induzieren.

### **Langzeitinduktion der shRNA-Expression bei Wachstum auf Medium mit unterschiedlichen Seren**

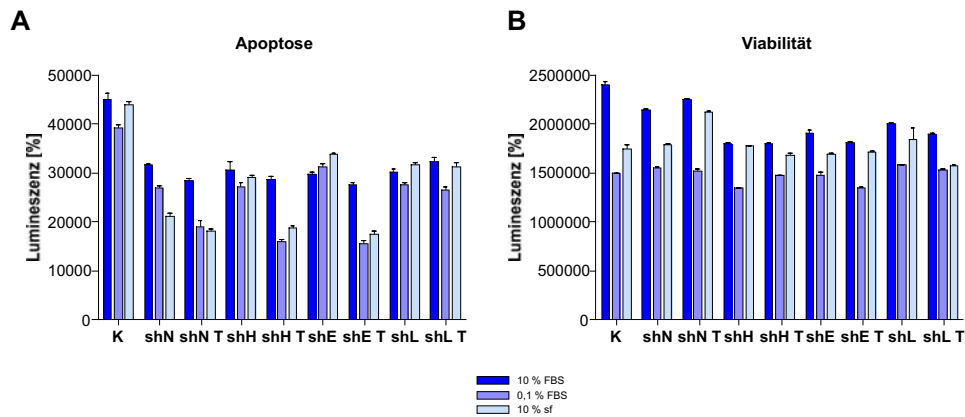
Um sicherzustellen, dass nicht nur das mRNA-Level von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP*, sondern auch die Proteinmenge der Enzyme reduziert wurden, erfolgte eine 15-tägige Induktion der shRNA-Expression. Als Vergleich dienten hierbei sowohl die nativen HeLa T-REx-Zellen als auch die stabil transfizierten Zellen HeLa T-REx-Zellen (shNSDHL, shHSD17B7, shEBP und shlacZ) ohne shRNA-Expression. Die Zellen wurden 24 h vor der Messung mit unterschiedlichen Seren versetzt.

Betrachtet man die Zellen, die auf 10 % FBS-haltigem Medium gewachsen sind, so konnte man weder in der Apoptoseintensität noch in der Viabilität Veränderungen feststellen (Abb. 2.50). Konnten die Zellen fehlende Substanzen jedoch nicht in ausreichender Menge aus dem Medium aufnehmen, wie das bei 0,1 % FBS und 10 % steroidfreiem Serum der Fall ist, so zeigte sich eine Veränderung. Die Zellen mit RNAi wiesen eine niedrigere Apoptoserate auf als die Vergleichszellen ohne shRNA-Expression (Abb. 2.50, A). Die Viabilität der Zellen veränderte sich dabei nicht.

## 2. Ergebnisse

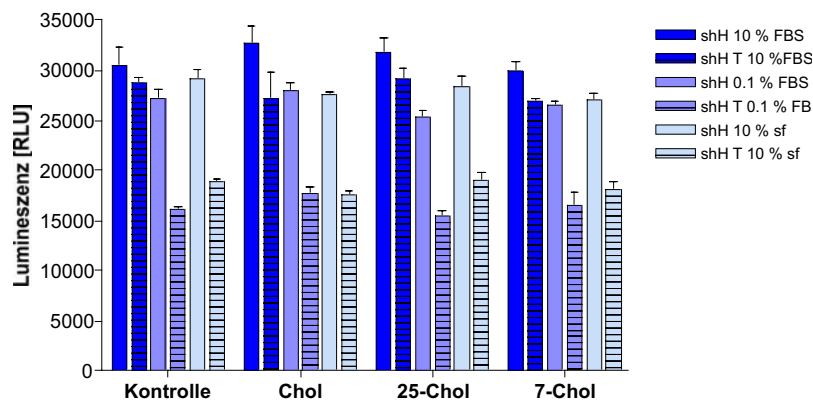


**Abbildung 2.49: Einfluss unterschiedlicher Seren auf das apoptotische Verhalten von HeLa T-REx-Zellen.** HeLa T-REx-Zellen wurden 24 h bzw. 48 h auf unterschiedlichen Medien kultiviert. Die Zugabe von Staurosporin erfolgte vier Stunden vor der Lumineszenzmessung. (Kontrolle = unbehandelte Zellen; 1 µM Stauro = Zugabe von 1 µM Staurosporin zu den Zellen)



**Abbildung 2.50: Auswirkungen der RNAi in stabil transfizierten Zellen bei Wachstum auf unterschiedlichen Seren.** Stabil transfizierte HeLa T-REx-Zellen wurden 15 Tage unter Zugabe von Tetrazyklin kultiviert. Anschließend erfolgte ein Medienwechsel. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend Medium mit 0,1 % FBS bzw. 10 % steroidfreiem Serum zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Messung der Apoptose (**A**) und der Zellviabilität (**B**). (K = Kontrolle; shN = HeLa T-REx/shNSDHL; shH = HeLa T-REx/shHSD17B7; shE = HeLa T-REx/shEBP; shZ = HeLa T-REx/shlacZ; T = konstante Zugabe von Tetrazyklin)

**Langzeit-shRNA-Expression: Kultivierung der Zellen auf Medium mit unterschiedlichen Seren und gleichzeitige Zugabe von Cholesterinderivaten** Mit dem folgenden Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob durch die Zugabe einiger ausgewählter Cholesterinderivate zu den shRNA-exprimierenden Zellen eine Änderung der Apoptoseintensität hervorgerufen werden kann. Dazu erfolgte eine konstante shRNA-Expression über einen Zeitraum von 15 Tagen. 24 h vor der Messung wurden die Zellen auf Medium mit unterschiedlichen Serenzusätzen (10 % FBS, 0,1 % FBS und 10 % steroidfreies Serum) gesetzt und dem Medium gleichzeitig Cholesterin (Chol, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 25-Dehydrocholesterin (25-Chol, 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 7-Dehydrocholesterin (Provitamin D, 7-Chol, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt.



**Abbildung 2.51: Apoptoseverhalten von HeLa T-REx/shHSD17B7-Zellen mit unterschiedlichen Medienzusätzen.** Die Expression der shRNA für den Knock-down von *HSD17B7* erfolgte über einen Zeitraum von 15 Tagen. Einen Tag vor der Messung wurde das Medium gewechselt. Die Zusätze wurden ebenfalls 24 h vor der Messung zugesetzt. (shH = HeLa T-REx/shHSD17B7; T = konstante Zugabe von Tetrazyklin; 10 % sf = 10 % steroidfreies Serum)

Bei der Messung der Apoptose zeigten sich unter den hier getesteten Bedingungen keine Unterschiede zu den nativen unbehandelten Zellen. Zellen auf Mangelmedium wiesen einen leichten Rückgang der Apoptose auf, auch wenn Cholesterin, 25-Dehydrocholesterin oder 7-Dehydrocholesterin zugegeben wurde. Dies spricht für ein proapoptotisches Signal, das unter diesen Versuchsbedingungen, auch nach Zugabe dieser Cholesterinderivate, nicht gebildet werden konnte. Hier sind die Daten für die Messungen mit HeLa T-REx/shHSD17B7-Zellen gezeigt (Abb. 2.51). Die stabilen Zelllinien HeLa T-REx/shNSDHL und HeLa T-REx/shEBP verhalten sich identisch (Daten nicht gezeigt).

## 2.5. Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren

In dieser Arbeit sollten Auswirkungen des Fehlens oder der Hemmung einiger spezieller Enzyme der Cholesterinbiosynthese untersucht werden. Neben der Möglichkeit, die Neusynthese dieser Enzyme mittels RNAi zu reduzieren besteht auch die Möglichkeit, die Proteine selbst zu inhibieren. Da für die Enzyme NSDHL, HSD17B7 und EBP keine Inhibitoren zur Verfügung standen, wurde die Hemmung der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) und 7-Dehydrocholesterin-Reduktase (DHCR7) untersucht.

### 2.5.1. Auswirkungen von Pravastatin und BM 15766 auf apoptotisches Verhalten und Zellviabilität

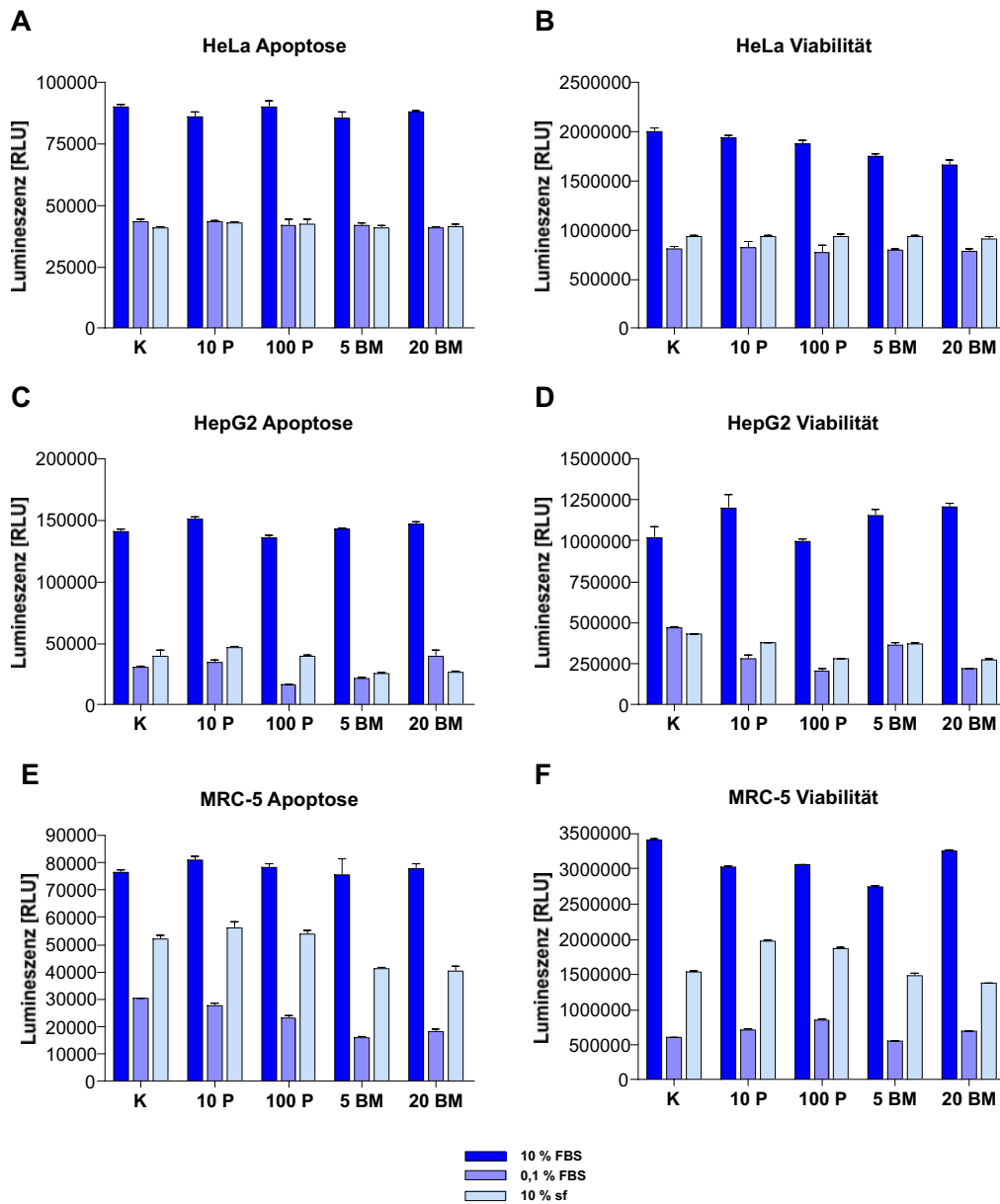
Pravastatin hemmt die durch das Enzym HMG-CoA-Reduktase katalysierte Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A (HMG-CoA) zu Mevalonat. Dabei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese. BM 15766 hemmt die 7-Dehydrocholesterin-Reduktase (DHCR7), die einen sehr späten Schritt der Cholesterinbiosynthese, nämlich die Umsetzung von 7-Dehydrodesmosterol zu Desmosterol bzw. von 7-Dehydrocholesterin zu Cholesterin, hemmt.

Für diese Versuche wurden die einzelnen Zelllinien unterschiedlich lange in unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Die Messung der Apoptoseintensität und der Zellviabilität wurde nach 16 h, 24 h, 32 h und 48 h durchgeführt. Die unterschiedlich langen Inkubationszeiten zeigten keine unterschiedlichen Auswirkungen (Daten nicht gezeigt).

12 h vor der Zugabe der Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren wurden die Zellen in Medien mit unterschiedlichen Seren (10 % FBS, 0,1 % FBS und 10 % steroidfreies Serum) inkubiert. Anschließend wurde den Zellen Pravastatin in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und BM 15766 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Die gezeigten Daten wurden nach 24 h Inkubationszeit mit diesen Inhibitoren gemessen (Abb. 2.52). Dabei zeigte sich bei keiner der untersuchten Zelllinien ein Unterschied in der Apoptoseintensität bzw. der Zellviabilität zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

Bei allen drei untersuchten Zelllinien traten unter Wachstumsbedingungen mit 10 % FBS-haltigem Medium höhere Apoptosewerte auf als bei Wachstum auf anderen Serenzusätzen. Dies war dadurch zu erklären, dass die Zellen unter diesen Bedingungen besser wachsen konnten und somit auch mehr Zellen in den einzelnen wells vorhanden waren. Dies wurde dadurch bestätigt, dass in diesen Fällen auch eine erhöhte Viabilität zu beobachten war.

## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.52: Auswirkungen von Pravastatin und BM 15766 auf Apoptose und Viabilität unterschiedlicher Zelllinien.** HeLa- (A und B), HepG2- (C und D) und MRC-5-Zellen (E und F) wurden in 12 well Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde bei allen Zellen das Medium gewechselt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Pravastatin (P) und BM 15766 (BM). Nach weiteren 24 h Inkubationszeit wurden die Apoptose und die Zellviabilität gemessen. Dabei konnte bei keiner der untersuchten Zelllinien eine Veränderung durch die Zugabe der Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren festgestellt werden. (10% sf = 10% steroidfreies Serum; 10 P = 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 100 P = 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 5 BM = 5  $\mu\text{M}$  BM 15766; 20 BM = 20  $\mu\text{M}$  BM 15766)

### 2.5.2. Auswirkungen von Pravastatin und BM 15766 auf das Expressionslevel

Sowohl die Hemmung von Pravastatin als auch die von BM 15766 finden auf Proteinebene statt. Da es sich bei der Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese handelt, wurde untersucht, ob die Hemmung auf Proteinebene eine gesteigerte Expression von *HMGCR* und *DHCR7* zur Folge hat. Gleichzeitig wurde auch das Expressionslevel der Cholesterinbiosynthese-Gene *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP*, die nicht direkt von den Inhibitoren beeinflusst werden, untersucht.

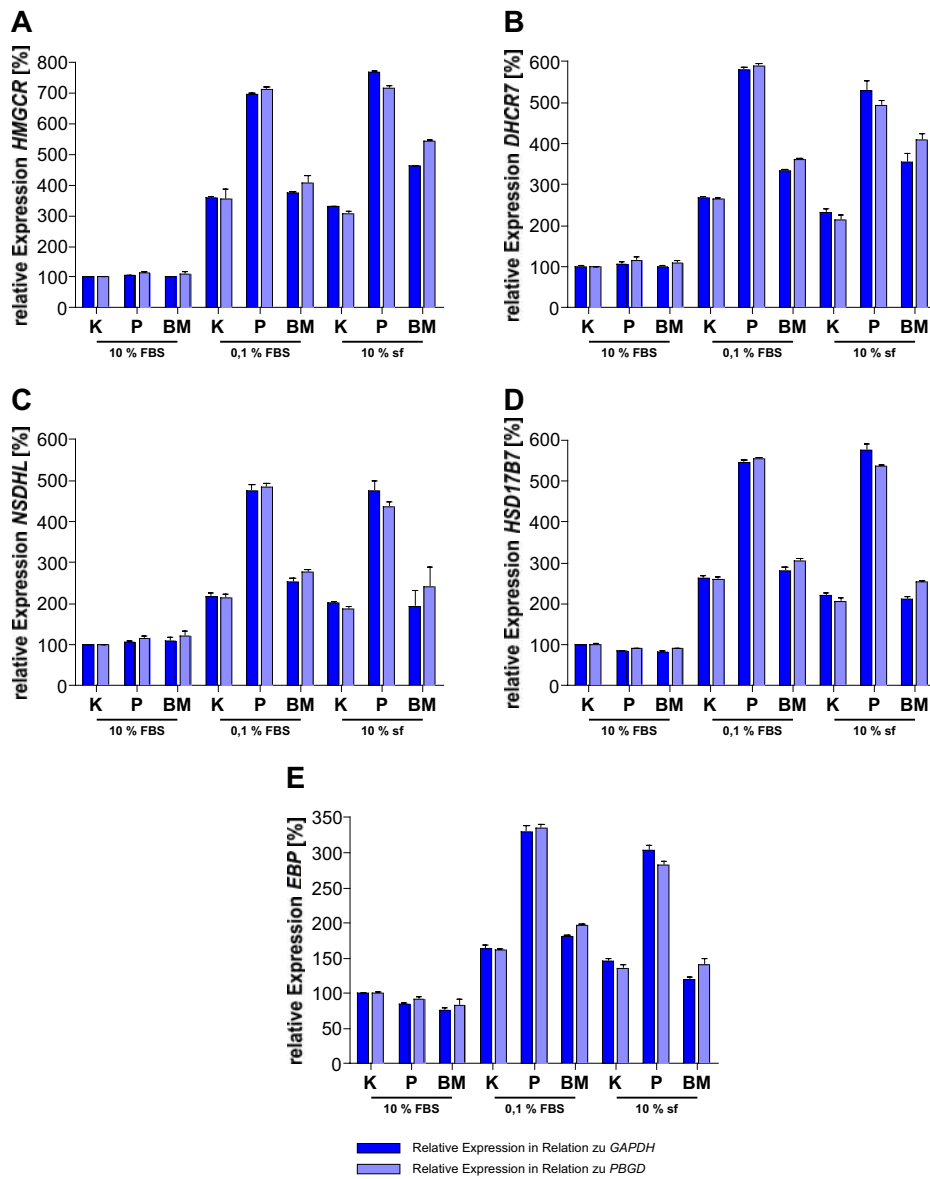
Die Auswirkungen dieser Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren wurden unter unterschiedlichen Bedingungen für die Zellen untersucht. HeLa-Zellen wurden dazu in 6 well Platten auf MEM mit unterschiedlichen Seren (10% FBS, 0,1 % FBS und 10 % steroidfreies Serum) kultiviert. Zu den Zellen wurde Pravastatin (10 µg/ml) und BM 15766 (5 µM) gegeben und diese nach einer 28 h Inkubationszeit geerntet. Als Kontrolle für diese Versuche dienten Zellen, die auf dem entsprechenden Medium ohne Zugabe der Inhibitoren wuchsen. Anschließend wurde eine quantitative RealTime-PCR durchgeführt, in der *GAPDH* und *PBGD* als *Housekeeping*-Gene verwendet wurden.

Bei der Auswertung wurde die Expression in HeLa-Zellen, die auf MEM mit 10 % FBS kultiviert und nicht mit Pravastatin oder BM 15766 behandelt wurden, als 100 % Expression des jeweiligen Gens definiert. Die Expression der einzelnen Gene bei den unterschiedlichen Versuchsbedingungen wurde dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse wurden in Abb. 2.53 dargestellt.

Bei diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass weder die Zugabe von Pravastatin noch die von BM 15766 die Expression der hier untersuchten Gene in HeLa-Zellen veränderte, wenn diese auf Vollmedium kultiviert wurden. Bei allen hier untersuchten Genen wurde die Expression erhöht, wenn die Zellen auf Mangelmedium (0,1 % FBS bzw. 10 % steroidfreies Serum) kultiviert wurden. Allgemein stieg die Expression der hier untersuchten Gene bei Wachstum der Zellen auf 0,1 % FBS haltigem Medium etwas stärker an als bei Wachstum auf Medium mit 10 % steroidfreiem Serum. Einzig die Expression von *EBP* war auf steroidfreiem Serum etwas stärker als bei 0,1 % FBS (Abb. 2.53, E). Die Zugabe von Pravastatin zum Zellkulturmedium löste bei den Genen *HMGCR*, *DHCR7*, *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* eine starke Steigerung der Expression aus, unabhängig ob die Zellen auf Medium mit 0,1 % FBS oder 10 % steroidfreiem Serum kultiviert wurden. Bei *HMGCR* wurde das Expressionslevel auf den ca. siebenfachen Wert gesteigert. *EBP* zeigte die schwächsten Auswirkungen mit einer Expressionssteigerung von ca. 200 %. Die Hemmung durch BM 15766 führte zu nur minimalen Anstiegen der Expression von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP*. Die Expressionsrate von *DHCR7* selbst wurde in HeLa-Zellen auf 10 % steroidfreiem Serum um das Doppelte gesteigert, auf 0,1 % FBS-haltigem Serum war der Anstieg etwas geringer. Auch bei *HMGCR* konnte eine Expressionssteigerung von ca.



## 2. Ergebnisse



**Abbildung 2.53: Relative Expression einiger Enzyme der Cholesterinbiosynthese nach Zugabe von Inhibitoren.** HeLa-Zellen wurden in Medium mit unterschiedlichen Seren (10 % FBS, 0,1 % FBS und 10 % steroidfreies Serum = sf) kultiviert und mit Pravastatin (P) und BM 15766 (BM) behandelt. 28 h nach der Inhibitorenzugabe wurden die Zellen geerntet. Untersucht wurde die relative Expression der Gene *HMGCR* (A), *DHCR7* (B), *NSDHL* (C), *HSD17B7* (D) und *EBP* (E), jeweils in Relation zu den beiden *Hou-sekeeping*-Genen *GAPDH* und *PBGD*. Als Kontrolle (K) dienten Zellen, die nicht mit den Inhibitoren behandelt wurden. Ihre Expression auf Vollmedium wurde als 100 % Expression des jeweiligen Gens definiert.

## 2. Ergebnisse

---

330 % (Wachstum auf Medium mit steroidfreiem Serum ohne Zugabe der Inhibitoren) auf ca. 460–540 % erreicht werden.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expressionssteigerung von *HMGCR* im Vergleich zu den anderen hier betrachteten Genen am stärksten ausfällt. Die Inhibition von Pravastatin führte zu einer Steigerung der Expression von *HMGCR*, *DHCR7*, *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP*, wohingegen die Inhibition nur in *DHCR7* selbst eine signifikante Änderung auslöste.

## 3. Diskussion

### 3.1. Überblick über Ziele und Fortschritt

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf den molekularen Mechanismen der Cholesterinbiosynthese, insbesondere auf Funktionsstörungen dieses Syntheseweges und deren Auswirkungen. Dabei wurden *NAD(P)H-steroid dehydrogenase like (NSDHL)* und *Emapomil binding protein (EBP)*, die für das Auftreten von CHILD (*Congenital Hemidysplasia with Ichthyosiform Erythroderma and Limb Defects*) und CDPX2 (*Conradi-Hünermann-Happle-Syndrom*) verantwortlich sind, eingehend untersucht. Zugleich galt der *17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 7 (HSD17B7)* ein besonderes Augenmerk. Das Enzym HSD17B7 katalysiert die Umsetzung zwischen NSDHL und EBP und ist somit ein potentieller Kandidat für eine weitere Stoffwechselerkrankung im Zusammenhang mit der Cholesterinbiosynthese.

Für diese Aufklärung wurden unterschiedliche Ansätze gewählt. In der Embryonalentwicklung von Wildtyp-Mäusen konnte erstmalig eine Colokalisation der Expression von Cholesterinbiosynthese-Genen und Apoptose detektiert werden. *Tattered*-Mäuse, die ein Tiermodell für CDPX2 darstellen, wurden sowohl im embryonalen als auch im adulten Stadium eingehend charakterisiert.

Weiterhin wurde ein GC/MS-basiertes Analyseverfahren zur Untersuchung der HSD17B7-Aktivität *in vitro* entwickelt. Auswirkungen der Inhibition einzelner Schritte der Cholesterinbiosynthese wurden in Zellkultur untersucht. Hierfür habe ich RNAi als Methode in unserem Labor etabliert. Zusätzlich wurden Inhibition und deren Auswirkungen auf Proteinebene analysiert.

### 3.2. Expression von Hsd17b7 in Mausembryonen

Da alle Zellen Cholesterin als Membranbestandteil benötigen, ging man bis vor kurzem davon aus, dass die Enzyme der Cholesterinbiosynthese im Embryo ubiquitär exprimiert werden mit einer verstärkten Expression an Orten mit erhöhter Proliferationsrate und in der Leber [172]. In unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch erstmalig in Mausembryonen gezeigt werden, dass die an der Cholesterinbiosynthese beteiligten Enzyme in einem räumlich und zeitlich dynamischen Muster exprimiert werden [100]. Mit Hilfe von *whole mount in situ*-Hybridisierungen konnten verschiedene Neuralleistenderivate (Spinalganglien, kraniale

Ganglien und Pharyngealbögen), das Gehirn und die Gliedmaßen als cholesterinproduzierende Gewebe identifiziert werden. Die Leber, das Hauptorgan der adulten Cholesterinbiosynthese, zeigt dagegen keine Expression in den untersuchten Embryonalstadien (E10,0 bis E13,0).

Um die Spezifität der *whole mount in situ*-Hybridisierung zu bestätigen, wurden in dieser Dissertation *whole mount*-Immunfärbungen mit einem Peptidantikörper gegen Hsd17b7 etabliert und durchgeführt. Dabei konnte eine vollständige Übereinstimmung der mRNA mit der Protein-Expression nachgewiesen werden. Die besonders charakteristische Färbung der Haarfollikel der Vibrissae an E13,5 zeigte die Spezifität der Immunfärbung (Abb. 2.1). Für Hsd17b7 konnte somit erstmalig bestätigt werden, dass mRNA und Protein in den selben Geweben lokalisiert sind.

### 3.3. Entwicklung von Antikörpern gegen NSDHL und EBP

Gegen die Proteine NSDHL und EBP standen zu Beginn meiner Dissertation keine Antikörper zur Verfügung. Für die Anwendung unterschiedlicher Methoden wie der Immunfärbung und der Western Blot-Analyse wurden deshalb Peptidantikörper generiert. Diese Antikörper wurden für unterschiedliche Anwendungsbereiche (Western Blot, Immunocytochemie und Immunhistochemie) getestet. Auf diese Weise wurden auch unterschiedliche Möglichkeiten der Antigenpräsentation überprüft. Allerdings konnte keine spezifische Antikörperbindung in den unterschiedlichen Anwendungen nachgewiesen werden (Kap. 2.1.3). In der Western Blot-Analyse konnten viele unspezifische Banden detektiert werden. Möglicherweise war unter diesen auch eine spezifische Färbung, die allerdings wegen des starken Hintergrundes nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Andererseits könnten NSDHL und EBP nicht auf das SDS-Gel aufgetragen worden sein: beide Proteine besitzen transmembrane ER-Domänen und sind deshalb schwer von der Membranfraktion zu lösen.

### 3.4. Cholesterinbiosynthese und Apoptose

Während der Embryonalentwicklung beginnt die Expression der Schlüsselenzyme der Cholesterinbiosynthese an E8,0 im dorsalen Neuralrohr und kann später in dorsalen Wurzel- und Cephalganglien, den Pharyngealbögen und den Gliedmaßenknospen detektiert werden [100]. Einige dieser Gewebe werden bald darauf wieder eingeschmolzen.

#### 3.4.1. Colokalisation von Apoptose und Cholesterinbiosynthese in der Embryonalentwicklung

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Colokalisation von Cholesterinbiosynthese und Apoptose während der Entwicklung von Mäusen nachgewiesen werden. Die Untersuchung der

apoptotischen Bereiche während der Entwicklung erfolgte mit *whole mount*-Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen aktive Caspase-3, einem Apoptosemarker. Diese Versuche wurden an C57/Bl6J-Embryonen im Alter von E10,0 bis E11,5 durchgeführt. Dabei konnte eine weitgehende Übereinstimmung von apoptotischen Bereichen und Cholesterinbiosynthese gezeigt werden. Vor allem in den Pharyngealbögen, den Gliedmaßenknospen, den dorsalen Wurzelganglien, dem Neuralrohr, dem Trigemini-Ganglion und im Schwanz konnten sowohl aktive Caspase-3 als auch die Schlüsselenzyme der Cholesterinbiosynthese detektiert werden (Kap. 2.1.2). Die Bereiche der Colokalisation von Cholesterinbiosynthese und Apoptose sind Bereiche, die bei den humanen Missbildungssyndromen der Cholesterinbiosynthese wie beispielsweise CHILD, CDPX2 und SLOS betroffen sind. Dies lässt auf eine Störung der Apoptose schließen und damit auf ein pro- oder antiapoptotisches Signal, das entweder ein Vorläufer oder ein Derivat von Cholesterin sein könnte. Bei den Missbildungssyndromen der Cholesterinbiosynthese scheint es unter anderem zu einer Störung der Apoptose zu kommen.

#### 3.4.2. Was ist das apoptotische Signal?

Bei einem Defekt der lokalen Cholesterinbiosynthese in den unterschiedlichen Mausmutanten kann der Mangel während der Embryonalentwicklung offensichtlich nicht durch maternales Cholesterin ausgeglichen werden und verursacht eventuell eine Fehlregulation der Apoptose in unterschiedlichen Geweben. Dafür spricht, dass es sich bei vielen der bei den Mausmutanten betroffenen Geweben um apoptotische Gewebe handelt. Darunter sind z. B. Neuralleisten-Derivate, durch deren Fehlfunktion es zu Symptomen wie Agangliose, Gaumenspalte und Mikrognathia kommen kann. Zudem kann in den Mutanten ebenso wie bei den humanen Missbildungssyndromen häufig Syn- und Kamptodaktylie beobachtet werden. Aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen werden scheinbar sowohl pro- als auch antiapoptotische Signale gebildet. Steroidinduzierte und -inhibierte Apoptose wurde auch in adulten Geweben und Zelllinien beobachtet [159, 3, 101].

Die Colokalisation von Cholesterinbiosynthese und Apoptose deutet darauf hin, dass Cholesterin der Vorläufer eines apoptotischen oder antiapoptotischen Steroids sein könnte. Dafür spricht, dass in den Geweben der embryonalen Cholesterinbiosynthese auch P450<sub>scc</sub> und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen anwesend sind, die für eine weitere Umsetzung des Cholesterins benötigt werden [30]. Es könnte sich bei dem apoptotischen oder antiapoptotischen Molekül allerdings auch um ein Intermediat der Cholesterinbiosynthese handeln.

Im Menschen sind Oxysterole als Apoptoseinduktoren bekannt [158]. Oxysterole entstehen durch die Autoxidation von Cholesterin [153]. Sie sind beispielsweise bei Arteriosklerose dafür verantwortlich, dass Monozyten und Makrophagen, die das gefährliche Lipidmaterial von den Gefäßwänden abbauen können, durch Induktion der Apoptose ausgeschaltet

werden [16].

Apoptotische Mechanismen können auch durch transkriptionelle Mechanismen reguliert werden. In vielen Säugetiergeweben wie Brustdrüse, Prostata, Ovar und Testis sind Steroidhormon-Rezeptoren wichtige Regulatoren für die Apoptose [91]. Die Apoptose der interdigitalen Bereiche wird durch die Transkription der Zielgene des BMP-Signalweges induziert [113].

Mit den hier durchgeführten Versuchen konnte erstmalig eine Colokalisation von apoptotischen Bereichen und Cholesterinbiosynthese gezeigt werden. Die Symptome der menschlichen Missbildungssyndrome CHILD, CDPX2 und SLOS lassen auf eine Störung der Apoptose schließen und damit auf ein pro- oder antiapoptotisches Signal, das entweder ein Vorläufer oder ein Derivat von Cholesterin sein könnte.

### 3.5. Mausmodelle zur Untersuchung der defekten Cholesterinbiosynthese und ihrer Folgen

Defekte in der Cholesterinbiosynthese führen beim Menschen zu unterschiedlichen Mißbildungssyndromen wie beispielsweise CHILD und CDPX2. Für diese Erkrankungen existieren unterschiedliche Mausmodelle, die aber nicht umfassend charakterisiert sind. Deshalb war geplant, die genaue Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit vorzunehmen.

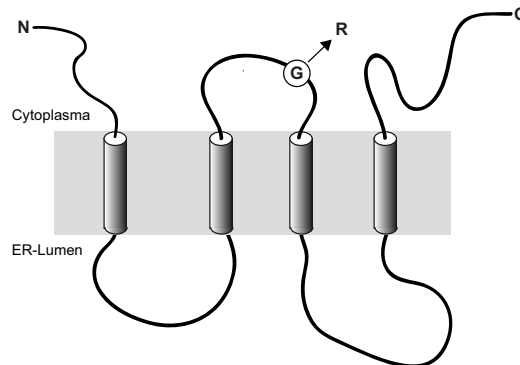
#### 3.5.1. Bare patches (Bpa) - ein Mausmodell für CHILD

Bei der Mauslinie *Bpa*<sup>6H</sup>, die für diese Untersuchungen ausgewählt wurde, kommt es in Exon 5 des *NSDHL*-Gens zu einer Deletion von 18 Basen (655del18), was zu einem Verlust von sechs Aminosäuren führt (G147D, delTEDLPY). Inwieweit das Enzym dadurch seine Funktionalität verliert, ist nicht bekannt. Es wird jedoch ein auffälliger Phänotyp für diese Mäuse beschrieben [106].

#### 3.5.2. Zum CDPX2-Modell: Tattered (Td)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mauslinie *Td* als Modell für das menschliche CDPX2-Syndrom untersucht. Diese zeichnet sich durch eine Punktmutation im *Ebp*-Gen (G454A) aus, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Durch diese Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch (G107R) in einem hoch konservierten Bereich des Enzyms, der sich im Cytoplasma zwischen den Transmembrandomänen zwei und drei befindet [36] (Abb. 3.1).

Man geht davon aus, dass EBP vier transmembrane Domänen besitzt [63]. Es gibt aber auch Vorhersagen, die von fünf transmembranen Domänen ausgehen (Ensembl Datenbank). In beiden Fällen liegt die Schleife mit dem Aminosäureaustausch im Cytoplasma.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung von EBP.** EBP ist ein Protein mit vier transmembranen Domänen. Bei *Td*-Mäusen kommt es durch eine Punktmutation (G454A) zu einem Aminosäureaustausch (G107R) in einem stark konservierten Bereich. (Abbildung modifiziert nach [36])

Einige Strukturmodule sind zwischen Mensch, Maus und Ratte konserviert. Zu diesen Bereichen zählen hydrophobe Regionen, die transmembranen Domänen und die Signalsequenz für die Lokalisation in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. In den transmembranen Domänen zwei bis vier befinden sich einige konservierte Aminosäuren (His<sup>77</sup>, Glu<sup>81</sup>, Glu<sup>123</sup>, Thr<sup>126</sup>, Asn<sup>1947</sup> und Trp<sup>197</sup>), die sich in der cytoplasmatischen Hälfte der transmembranen Segmente befinden und von denen man glaubt, dass sie die katalytische Spalte säumen [118]. Eine konservierte cytoplasmatische Domäne (WKEYXKGDSTRY) zwischen den transmembranen Domänen zwei und drei scheint ebenfalls für die Enzymfunktion wichtig zu sein. In diesem Bereich befindet sich die für den charakteristischen Aminosäureaustausch verantwortliche Mutation der *Td*-Mäuse.

### 3.5.3. Embryotransfer - Probleme bei der Revitalisierung der Mauslinien

Zum Aufbau der Zucht erhielten wir vom Medical Research Council (MRC, Harwell) eingefrorene Embryonen der Mauslinien *Bpa*<sup>6H</sup> und *Td*.

#### Bare patches

Von insgesamt zwei Embryotransfers (jeweils ein Straw mit ca. 25 Embryonen) der *Bpa*<sup>6H</sup>-Mäuse wurde nur ein einziges Weibchen geboren, bei dem es sich um ein Wildtyp-Weibchen handelte (Kap. 2.2.1). Der Grund für diese sehr schlechte Ausbeute an geborenen Mäusen liegt wahrscheinlich an der Qualität der eingefrorenen Embryonen. Nach Rückfragen erhielten wird die Aussage, dass diese Mäuse auch bei MRC direkt nicht wieder revitalisiert

werden konnten. Bei den *Bpa*<sup>6H</sup>-Mäusen könnte es sich aber auch um eine Linie handeln, die sich nicht revitalisieren lässt. Da die Chancen auf eine Anzucht als nicht sehr groß eingestuft werden konnten, wurde auf die Bestellung weiterer eingefrorener Embryonen verzichtet. Daher war es nicht möglich, Auswirkungen dieser Mutation zu untersuchen.

#### **Tattered**

Auch der Embryotransfer der *Td*-Mäuse war mit Problemen behaftet. Beim ersten Embryotransfer kamen zwar unter anderem zwei Weibchen zur Welt, bei denen es sich aber ebenfalls um Wildtyp-Mäuse handelte. Bei einem zweiten Embryotransfer wurden fünf Weibchen und zwei Männchen geboren, wovon bei zwei Weibchen die Mutation im *Ebp*-Gen nachgewiesen werden konnte. Es wurde noch ein dritter Embryotransfer durchgeführt, um eine größere Startpopulation für die Zucht zu erhalten. Auch hier wurden keine lebenden Nachkommen geboren.

#### **Mögliche Ursachen**

Zum Aufbau der Zucht sollten die Mauslinien durch Embryotransfer revitalisiert werden. Dies gelang bei *Bpa* jedoch nicht, auch bei *Td* traten Probleme auf. Als Ursache für die unterschiedliche Geburtenrate der transferierten *Td*-Embryonen kann eine unsachgemäße Handhabung der Embryonen ausgeschlossen werden. Alle Embryotransfers wurden von Mitarbeitern der Abteilung für Vergleichende Medizin des GSF-Forschungszentrums durchgeführt, die große Erfahrung auf diesem Gebiet besitzen. Unterschiedliche Gründe kommen für die schlechte Ausbeute an geborenen Mäusen in Frage: Zum einen gibt es Mausstämme, die sich trotz sachgemäßer Behandlung nicht wieder revitalisieren lassen. Zudem kann die Qualität der einzelnen Straws stark variieren, selbst wenn diese gleichzeitig eingefroren wurden. Eine weitere Ursache für die Probleme bei der Revitalisierung könnten auch die Mäuse sein, in welche die Embryonen eingesetzt werden. Stehen sie in irgendeiner Art und Weise unter Stress (z. B. durch laute Geräusche), so kann dies die Aufnahmefähigkeit stark mindern.

#### **3.5.4. Zucht der Td-Mäuse**

Nicht nur der Embryotransfer, sondern auch die Zucht der *Td*-Mäuse gestaltete sich äußerst schwierig. Da die Mäuse keinen definierten genetischen Hintergrund besaßen, wurden sie auf den C57/Bl6J-Hintergrund zurückgekreuzt. Für die Untersuchungen ist ein einheitlicher Hintergrund unerlässlich. Bei heterogenem Hintergrund der einzelnen Mäuse kann nicht einwandfrei geklärt werden, ob detektierte Befunde aufgrund der untersuchten Mutation oder eventuell wegen des nicht einheitlichen Hintergrundes entstanden sind. Unterschiedliche Mauslinien zeichnen sich beispielsweise durch Unterschiede in der Größe,



im Gewicht, der Fellfarbe und durch verschieden hohe Cholesterinwerte aus. Zunächst musste zudem eine größere Anzahl an heterozygoten *Td*-Weibchen erreicht werden, um bei der Entnahme einzelner Mäuse den Fortbestand der Zucht nicht zu gefährden. Die *Td*-Mauslinie war durch Würfe mit geringer Nachkommenschaft gekennzeichnet. Zudem wurde nur ein kleiner Anteil an weiblichen Nachkommen mit der gewünschten Mutation geboren (Kap. 2.2.3).

Da das *Ebp*-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert und die Mutation für männliche Träger im Embryonalstadium letal ist, wurden statistisch 25 % der Nachkommen schon vor der Geburt wieder eingeschmolzen. Dies kann die kleinen Wurfzahlen jedoch nicht ausreichend erklären. In der Literatur wurde beschrieben, dass hemizygoten Männchen mit einem C57/Bl6J-Hintergrund länger überleben (bis ca. E16,5) als beispielsweise mit einem 3H1-Hintergrund (E12,5) [36]. Deshalb konnte man davon ausgehen, dass die Symptome der *Ebp*-Mutation mit dem gewählten Hintergrund schwächer sein sollten. Dagegen spricht jedoch, dass im Laufe der Zucht von Generation zu Generation weniger *Td*-Weibchen geboren wurden. Der Phänotyp der *Td*-Weibchen könnte sich mit dem C57/Bl6J-Hintergrund verstärken, wodurch bereits die Embryonen so stark beeinträchtigt werden, dass sie noch vor der Geburt sterben. Bei Männchen mit C57/Bl6J-Hintergrund schwächt sich der Effekt jedoch eher ab [36].

Die Mutation im *Ebp*-Gen könnte zumindest in einigen Tieren zu einer Reduktion an Cholesterin führen. Cholesterin stellt unter anderem eine Vorstufe der Steroidhormone wie z.B. Progesteron dar, die für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft unerlässlich sind. Defekte im Cholesterinbiosynthese-Weg könnten somit über einen Mangel an Cholesterin auch zu einem Mangel an für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft wichtigen Hormonen führen.

Sowohl für die Embryoentnahme als auch für die Untersuchung adulter Tiere konnten nur vereinzelt Tiere aus der bestehenden Zucht entnommen werden, ohne den Fortbestand der *Td*-Mauslinie zu gefährden. Für viele der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wäre jedoch die Untersuchung weiterer Tiere von Nöten gewesen, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Eine statistische Auswertung der einzelnen Experimente konnte ebenfalls aufgrund zu geringer Tierzahlen nicht durchgeführt werden.

Mit der Rückkreuzung auf einen definierten C57/Bl6J-Hintergrund verlor der Phänotyp der *Td*-Mäuse etwas an Intensität (Kap. 2.2.4), was mit der Literatur in Einklang steht [36]. Hieran ist deutlich zu erkennen, dass der genetische Hintergrund zu Unterschieden in der Ausprägung führen kann. Dennoch wurden selbst mit diesem einheitlichen Hintergrund immer wieder starke Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps bei heterozygoten *Td*-Weibchen festgestellt. Einige dieser Weibchen starben schon im Alter von wenigen Wochen, wohingegen andere eine normale Lebenserwartung hatten. Diese unterschiedliche Ausprägung könnte auf die X-Inaktivierung zurückzuführen sein [28]. Zu dieser

zufälligen Inaktivierung eines der beiden vorhandenen X-Chromosomen kommt es in der Embryonalentwicklung während des Blastozystenstadiums. Je nachdem, in welchen Geweben die mutierte Form von Ebp exprimiert wird, kann dies zu schwächeren bzw. stärkeren Beeinträchtigungen führen.

Auch ist noch nicht bekannt, in wieweit die mutierte  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Sterolisomerase noch funktionstüchtig ist. Da die *Ebp*-Mutation aber in einem hoch konservierten Bereich des Proteins liegt, von dem angenommen wird, dass er für die Enzymfunktion wichtig ist, kann man davon auszugehen, dass das Enzym seine Aktivität zum Großteil einbüßt. Zur Klärung dieser Fragen sollte in der vorliegenden Arbeit ein GC/MS-basiertes Analyseverfahren zur Messung der enzymatischen Umsetzung durch EBP entwickelt werden (Kap. 2.3.3 und 3.6.2).

Im Normalfall werden Mäuse bei der Rückkreuzung ab der vierten oder fünften Generation für Untersuchungen entnommen, da ab diesem Zeitpunkt von einem einheitlichen genetischen Hintergrund ausgegangen werden kann. Die *Td*-Mäuse dieser Zucht wurden bereits ab der dritten Generation für Untersuchungen herangezogen. Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten dauerte diese Zucht sehr lange. Deshalb mussten aus Zeitmangel bereits Mäuse früherer Generationen untersucht werden. Dabei wurde jedoch darauf geachtet, dass diese Mäuse zumindest phänotypisch bereits dem C57/Bl6J-Hintergrund entsprachen.

#### 3.5.5. Was zeigt das Mausmodell Tattered?

##### Phänotyp und Symptome

Während der gesamten, bis heute andauernden Zuchtphase der *Td*-Mauslinie waren die heterozygoten *Td*-Weibchen stets durch ein struppiges Fell gekennzeichnet. Bei der Rückkreuzung auf den C57/Bl6J-Hintergrund konnte eine Abschwächung dieses phänotypischen Merkmals beobachtet werden (Kap. 2.2.4). Diese Tatsache spricht, im Gegensatz zu der zunehmend schlechteren Vermehrung der Mäuse, eher für eine mildere Ausprägung der *Ebp*-Mutation im Vergleich zu den aus dem Embryotransfer hervorgegangenen Mäusen.

Bei der genaueren Untersuchung zweier Würfe der dritten Generation konnte bestätigt werden, dass *Td*-Weibchen im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern sowohl durch eine geringere Körpergröße als auch durch weniger Gewicht gekennzeichnet waren (Kap. 2.2.5). Charakteristisch für diese Mäuse scheint auch eine Verkürzung der Schnauze zu sein. Dies zeigten Röntgenaufnahmen der oben beschriebenen Würfe. Zusätzlich wurde eine stärkere Wölbung des Schädels im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet. Des Weiteren war bei zwei der fünf untersuchten Mäuse eine Verkrümmung der Wirbelsäule (Skoliose) zu erkennen (Kap. 2.2.5). Diese Symptome wurden hier erstmalig für die *Td*-Mäuse beschrieben. Analoge Symptome treten auch bei menschlichen CDPX2-Patienten auf.

#### **Morphologie unterschiedlicher Organe**

Die histologischen Untersuchungen der Haut zeigten deutliche Verhornungsstörungen (Ichthyose), die sich hauptsächlich in Verdickungen der Hornschicht (Hyperkeratose) bemerkbar machten (Kap. 2.2.5). Teilweise gingen diese Veränderungen mit Entzündungen einher. Ichthyose stellt auch bei menschlichen CDPX2-Patienten ein Symptom dar, das bei fast allen Betroffenen auftritt.

Bei zwei der fünf untersuchten *Td*-Weibchen konnte eine Hydronephrose festgestellt werden. Allerdings ist auch bekannt, dass C57/Bl6J-Mäuse mit zunehmendem Alter häufig eine Hydronephrose entwickeln. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Mäusen kann das jedoch ausgeschlossen werden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Untersuchung erst elf Wochen alt, d.h. in einem Alter, in dem bei C57/Bl6-Wildtyp-Mäusen noch keine Hydronephrose auftritt. Hydronephrose wurde ebenfalls bei Patienten mit CDPX2 beschrieben [36]. Bei *Td*-Mäusen konnte sie hier erstmalig gezeigt werden.

#### **Beeinträchtigt eine defekte Cholesterinbiosynthese auch die Cholesterinhomeostase?**

Defekte der Cholesterinbiosynthese scheinen hauptsächlich Auswirkungen während der Embryonalentwicklung zu haben. Es ist allerdings fraglich, ob es neben einer eventuellen Anreicherung von Intermediaten zu weiteren Beeinträchtigungen kommt. Einen Hinweis darauf sollte die Untersuchung einiger Aspekte der adulten Cholesterinhomeostase liefern. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass sich die Cholesterinwerte im Plasma der untersuchten *Td*-Mäuse im Mittelwert nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern unterscheiden. Sowohl die Werte für Cholesterin, LDL und HDL zeigten im Durchschnitt keine signifikanten Änderungen. Allerdings war die Schwankung der einzelnen Werte in der Gruppe der untersuchten *Td*-Weibchen sehr hoch. Dabei wurde Cholesterin und HDL in sehr niedrigen Werten gemessen, LDL dagegen eher in sehr hohen Dosen im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern. Hohe Konzentrationen an LDL gelten als Risikofaktor für Arteriosklerose und koronare Herzerkrankungen. Mäuse mit einem niedrigen Gesamtcholesterinwert wiesen auch einen niedrigen HDL-Wert auf. Ansonsten war keine Tendenz in den gemessenen Werten zu erkennen. Für fundierte Aussagen müsste eine größere Anzahl an Mäusen untersucht werden. Durch die Untersuchung der Expressionslevel einiger an der Cholesterinhomeostase beteiligter Gene sollte ein erster Hinweis darauf erhalten werden, ob die Defekte in der Cholesterinbiosynthese auch die Cholesterinhomeostase beeinträchtigen. Vorstellbar wäre eine vermehrte Aufnahme von Cholesterin aus der Nahrung, um den durch die Mutation verursachten Cholesterinmangel auszugleichen. Hierbei stellt sich jedoch auch die Frage, inwieweit die Cholesterinbiosynthese wirklich beeinträchtigt ist, d.h. ob und um wieviel durch die Mutation der  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Sterolisomerase weniger Cholesterin

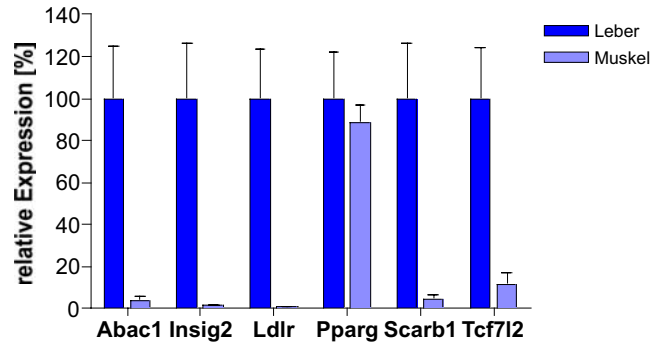
synthetisiert wird. Es ist durchaus vorstellbar, dass ein Cholesterinmangel hauptsächlich in der Entwicklungsphase zum Tragen kommt, da hier viel mehr Cholesterin benötigt wird, als das später nochmals der Fall ist. Während der Entwicklung wird das Cholesterin nicht nur zum Aufbau neuer Zellmembranen benötigt, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Morphogens *Sonic Hedgehog* (Shh).

Für die Untersuchung der Expressionslevel einiger an der Cholesterinhomeostase beteiligter Gene wurde sowohl Lebergewebe wie auch Muskelgewebe von fünf heterozygoten *Td*-Weibchen und deren Wildtyp-Geschwister (sowohl Männchen als auch Weibchen) entnommen. Da im adulten Stadium die Cholesterinhomeostase hauptsächlich von der Leber aus gesteuert wird, wurden nur die Ergebnisse aus der Leber verwendet. Bei der Interpretation der erhaltenen Daten wurden die Expressionslevel der *Td*-Weibchen im Verhältnis zu ihren weiblichen Geschwistern betrachtet.

Die hier untersuchten Gene *Abca1* und *Scarb1* wurden in *Td*-Weibchen nicht reguliert. Die Expression von *Insig2* wurde um 20–30 %, die von *Ldlr* um 10–25 % reduziert. *Ppar $\gamma$*  zeigte einen Anstieg der Expression um 10 %, *Tcf7l2* um 10–25 %.

Von *Ppar $\gamma$*  sind drei Isoformen bekannt, die sich lediglich in ihren 5'-Enden unterscheiden [161, 112]. In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Isoformen nicht unterschieden. Sie werden hauptsächlich in Adipocyten, aber auch im Knochenmark, Milz, Testis, Gehirn, Skelettmuskeln und der Leber exprimiert [43]. *Ppar $\gamma$*  reguliert die Transkription unterschiedlicher Gene und ist an der Differenzierung von Adipocyten beteiligt. Es wäre möglich, dass die drei Isoformen von *Ppar $\gamma$*  unterschiedlich reguliert werden und es deshalb in der Gesamtauswertung nur zu einem kleinen Anstieg der Expression kommt. Das ließe sich nur mit Hilfe einer quantitativen RealTime-PCR klären, die diese drei Formen unterscheiden kann. Die Expression von *Ppar $\gamma$*  stellt jedoch vor allem im Vergleich Leber - Muskel eine Ausnahme dar: Alle anderen hier untersuchten Gene zeigten im Verhältnis zur Leber nur eine Expression von 1–7 % im Muskel. Die Expression von *Ppar $\gamma$*  lag dagegen im Muskel bei 59–104 % (je nach endogener Kontrolle) im Vergleich zur Leberexpression (Abb. 3.2).

Entscheidend für diese Analyse war die Auswahl der endogenen Kontrollen. Ein ideales *Housekeeping*-Gen besitzt immer die gleiche Expression, wird also nicht durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen reguliert. Deshalb müssen vor dem eigentlichen Versuchsstart unbedingt mehrere unterschiedliche *Housekeeping*-Gene getestet werden und im Idealfall auch mehrere solcher Gene bei den einzelnen Versuchen mitgeführt werden. Schwierig wird die Wahl der endogenen Kontrolle, wenn mehrere unterschiedliche Gewebe miteinander verglichen werden. Bei diesen Versuchen zeigte sich in Relation zu dem *Housekeeping*-Gen *Hprt* starke Schwankungen, die darauf schließen lassen, dass dieses Gen in diesem Versuchsansatz selbst reguliert wurde und daher nicht als endogene Kontrolle geeignet war.



**Abbildung 3.2: Vergleich der Expression einiger Gene der Cholesterinhomeostase in Leber und Muskel.** Dargestellt ist die Expression der einzelnen Gene von Wildtyp-Weibchen in der Leber und im Muskel in Relation zu *GAPDH*. Die Expression in der Leber wurde dabei als 100 % Expression definiert.

Um statistische Aussagen bezüglich der Regulation der hier untersuchten Gene treffen zu können, müssten noch mehr Tiere untersucht werden. Zusätzlich könnten mehr an der Cholesterinhomeostase beteiligte Gene in die Untersuchung mit einbezogen werden. Dafür würden sich z. B. die Gene *Capn10*, *Kcnj11* und *Mc4r* eignen, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Cholesterinhomeostase spielen.

Bei Patienten mit CDPX2 konnten abweichende erhöhte Werte von 8-Dehydrocholesterin und Cholest-8(9)-en-3 $\beta$ -ol im Plasma und im Gewebe gemessen werden. In der Literatur sind bei fünf Wochen alten *Td*-Weibchen abnorme Sterolprofile beschrieben worden, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ebenfalls eine erhöhte Menge an 8-Dehydrocholesterin und Cholest-8(9)-en-3 $\beta$ -ol zeigten [36]. Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnten diese Messdaten für die hier untersuchten Mäuse nicht überprüft werden, da keine etablierte Messmethode zur Verfügung stand.

### **Welche Erkenntnisse kann man durch die Betrachtung der Shh-Expression gewinnen?**

Durch die Mutation im *Ebp*-Gen kommt es bei den *Td*-Mäusen zu Störungen, die schon die Embryonalentwicklung betreffen. Heterozygote *Td*-Weibchen zeigen an E10,5 und E11,5 eine im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen veränderte Expression von *Shh*. Hemizygoten männliche *Td*-Embryonen wiesen an E13,5 deutlich sichtbare Missbildungen des Schädels und der Gliedmaßen auf. Dabei kommt es zu einer Verringerung der Anzahl der Tasthaarfollikel. In diesen wird *Shh* stark exprimiert.

Das veränderte Expressionsmuster von *Shh* scheint dabei auf Störungen in der Entwicklung zurückzuführen sein. Bei den untersuchten Embryonen wurden weniger Tasthaarfol-

likel gebildet, weshalb es zu einem veränderten Expressionsbild kam (Abb. 2.24). Auch bei der Expression in den Gliedmaßenknospen ergab dieser Versuch nicht eindeutig, ob das veränderte Expressionsmuster auch auf eine veränderte Expression oder auf eine fehlerhafte Entwicklung einzelner Gewebe zurückzuführen ist. Durch die Störung in der Cholesterinbiosynthese könnte es über noch unbekannte Wege zu einer gestörten Entwicklung in einigen Bereichen des Embryos kommen. Die *Shh*-Expression läuft möglicherweise störungsfrei ab, sie könnte allerdings vermindert sein.

#### **Verändertes Apoptosebild in Td-Embryonen?**

Einige der bei CDPX2-Patienten und *Td*-Mäusen auftretende Veränderungen wie z.B. Syn- und Kamptodactylie lassen auf einen gestörten apoptotischen Ablauf während der Entwicklung schließen. Ein Vergleich von apoptotischen Bereichen in betroffenen *Td*-Embryonen mit deren Wildtyp-Geschwistern wäre deshalb geeignet, um einen Hinweis auf die Art der Störungen zu liefern. Auch ein genauere Vergleich von heterozygoten *Td*-Weibchen und hemizygoten *Td*-Männchen im Embryonalstadium wäre von sehr großem Interesse. Dabei könnten sich ebenfalls Unterschiede in der Apoptose zeigen, die eventuell die schweren Schädigung der Männchen erklären, die bei diesen zum Tode führen.

Die Untersuchung der Apoptose von *Td*-Weibchen und *Td*-Männchen mit ihren Wildtyp-Geschwistern zeigte keine Unterschiede in der Lokalisation der Apoptose bei Embryonen von E9,5 bis E12,5. Bei den hemizygoten *Td*-Männchen fiel die Intensität der Färbung jedoch schwächer aus als bei deren Wildtyp-Geschwistern. Allerdings wurde dieser Versuch nur ein einziges Mal durchgeführt, da nicht mehr Embryonen zur Verfügung standen (Kap. 3.5.4). Für eine eindeutige Aussage bezüglich des apoptotischen Verhaltens müssten mehr Embryonen untersucht werden. Diese standen jedoch nicht zur Verfügung, da bei einer weiteren Embryoentnahme die Zucht der Mäuse gefährdet worden wäre. Die erzielten Hinweise lassen jedoch auf eine verringerte Apoptose, zumindest bei hemizygoten *Td*-Männchen, schließen. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem mit der Apoptose in Zusammenhang stehenden Cholesterinderivat um ein proapoptotisches Molekül handelt.

#### **Bestimmung der Überlebensdauer von hemizygoten Td-Männchen**

Die Mutation im *Ebp*-Gen ist für männliche Nachkommen der *Td*-Mauslinie letal. Dabei hängt der Zeitpunkt, an dem die männlichen Embryonen eingeschmolzen werden, stark vom genetischen Hintergrund der entsprechenden Mäuse ab. Für Mäuse mit einem C57/Bl6J-, 101/H- und *Mus spretus*-Hintergrund wurde beschrieben, dass sie zwischen E16,5 und E18,5 sterben. Bei einem 3H1-Hintergrund tritt der Tod bereits an E12,5 ein [36]. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mäusen wurde ein Überleben der Männchen bis E13,5 beobachtet. Bei Embryopräparationen ab E14,5 ließen sich keine

männlichen Nachkommen mit der Mutation mehr identifizieren. Allerdings konnten auch hier nur wenige Mäuse betrachtet werden, so dass es durchaus denkbar wäre, dass die untersuchten trächtigen Weibchen keine männlichen Embryonen mit Mutation hatten. Dagegen spricht allerdings, dass die männlichen *Td*-Embryonen an E13,5 bereits schwere Defekte zeigten. Diese deuten ebenfalls darauf hin, dass die Embryonen nicht länger überleben können. Die sichtbaren Defekte der Blutgefäße könnten auf eine Schädigung des Herzens und des Kreislaufes hinweisen. Zudem wurde beobachtet, dass sich die äußere Haut der Embryonen an einigen Stellen abzulösen begann. Dies deutet auf Wassereinlagerungen hin, die ebenfalls durch Herzdefekte zustande kommen könnten. Zudem waren Missbildungen im Gesicht und bei der Gliedmaßenentwicklung zu beobachten (Abb. 2.21). Ob diese Beeinträchtigungen durch mangelndes Cholesterin entstehen oder ob es sich hier um Sekundärschäden handelt, ist nicht bekannt. Diese Erscheinungen zeigen sich auch bei weiblichen CDPX2-Patienten.

#### **3.5.6. Vergleich von Mausmodellen unterschiedlicher menschlicher Missbildungssyndrome - sind dadurch neue Erkenntnisse möglich?**

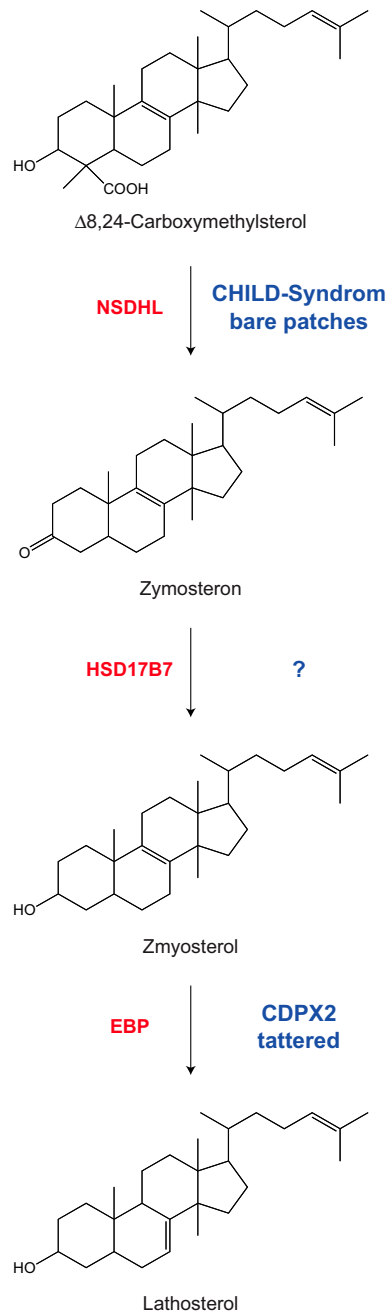
Einige Symptome treten bei allen Cholesterinbiosynthese-Mutanten gleichermaßen auf. Gewebe, die in den unterschiedlichen Mausmutanten morphologisch oder histologisch beeinträchtigt sind, weisen gleichzeitig die stärkste Expression der Cholesterinbiosynthese-Enzyme auf [48]. Gesichtsdeformationen (z. B. Agnathia oder Mikrognathia), die die Folge von defekten Neuralleisten-Zellen sind, werden sehr häufig beobachtet. Charakteristisch sind auch Gliedmaßenmissbildungen wie Syn- und Kamptodaktylie, die durch eine nicht vollständige Trennung der Finger verursacht werden. Als alleinige Ursache für diese Missbildungen ist ein Mangel an Cholesterin für die Neusynthese von Plasmamembranen eher unwahrscheinlich. Einige Expressionsterritorien liegen in histologisch homogenen Geweben, deren Zellen den gleichen Bedarf an Cholesterin zur Neubildung von Plasmamembranen haben sollten. Der Phänotyp der einzelnen Missbildungssyndrome, der sich in einigen Bereichen deckt, spricht für einen spezifischen morphogenetischen Defekt.

Da alle untersuchten Enzyme der Cholesterinbiosynthese (*Hmgcr*, *Nsdhl*, *Hsd17b7*, *Ebp* und *Dhcr7*) einheitlich exprimiert werden, können einige Merkmale der einzelnen Symptome, z. B. die Gehirndefekte bei menschlichen SLOS-Patienten oder die Ichthyose-Formen bei CHILD und CDPX2, nicht durch unterschiedliche Expression erklärt werden.

Der gravierendste Phänotyp bei SLOS betrifft das Gehirn und ist durch Mikrozephalie, Holoprosenzephalie und geistige Retardierung charakterisiert [88]. Diese Symptome treten weder bei CHILD- noch CDPX2-Patienten noch im Mausmodell von SLOS auf. Ein Ratten-Modell für SLOS, in dem durch die Verabreichung von AY 9944 die Aktivität der *Dhcr7* inhibiert wird, weist darauf hin, dass die Ursache für diese Gehirn-Defekte nicht die Akkumulierung toxischer Intermediate, sondern ein Cholesterinmangel ist [57]. Andere

### 3. Diskussion

---



**Abbildung 3.3: Aufeinanderfolgende Defekte der Cholesterinbiosynthese.** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Cholesterinbiosynthese. NSDHL und EBP sind für die bei menschlichen Patienten bekannten Missbildungssyndrome CHILD und CDPX2 verantwortlich. HSD17B7 katalysiert den Syntheseschritt dazwischen und könnte somit ein Kandidat für ein weiteres, bis jetzt noch nicht identifiziertes Missbildungssyndrom sein.



### 3. Diskussion

---

Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass AY 9944 nicht spezifisch die Dhcr7 hemmt, sondern auch die  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Sterolisomerase und die Sphingomyelinase-Aktivität [180]. Ein Einfluss von anderen unphysiologisch hoch konzentrierten Cholesterinvorläufern auf die Pathologie der Gehirndefekte bei menschlichem SLOS ist nicht auszuschließen.

Patienten mit CHILD und CDPX2 leiden unter Ichthyose, einer entzündlichen Hauterkrankung, die bei SLOS-Patienten nicht beobachtet wird. Auch diese Hauterkrankungen sind vermutlich auf einen toxischen Effekt von Sterolen zurückzuführen, die aufgrund der defekten enzymatischen Schritte akkumulieren. Da bei CHILD und CDPX2 fast aufeinanderfolgende Schritte blockiert sind, könnte es sich bei den angehäuften Vorläufern um strukturell ähnliche Moleküle handeln.

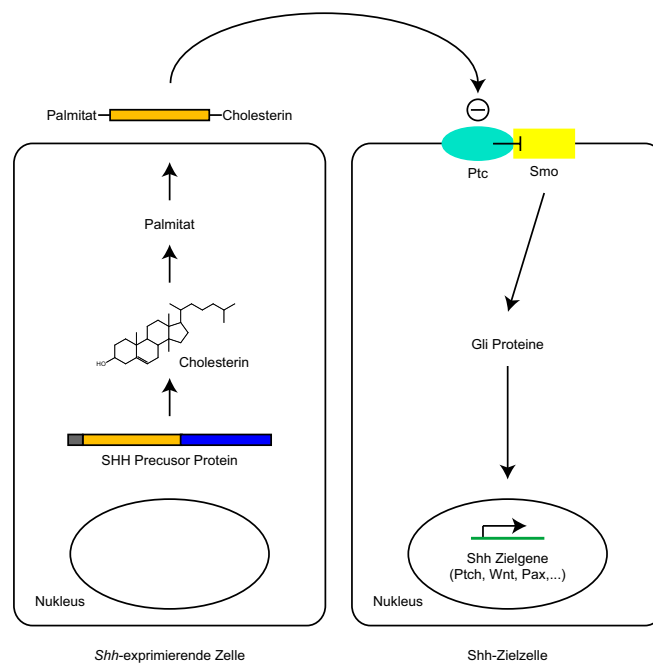
CHILD und CDPX2 sind sich in einigen Symptomen sehr ähnlich und weisen beide Chondrodysplasia punctata, Gliedmaßendefekte, Missbildungen im Gesicht, Herz-, Lungen- und Nierendefekte und Kleinwüchsigkeit auf. Bei CHILD treten verkürzte oder fehlende Gliedmaßen auf, die Symptome sind jedoch strikt unilateral ausgeprägt. Bei CDPX2 fehlen die Gliedmaßen nie. Außerdem sind beide Körperhälften gleichermaßen von den Symptomen betroffen. Die Untersuchung der Mausmodelle *Bpa*<sup>6H</sup> und *Td* im Vergleich könnte viele neue Aufschlüsse über die Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser Missbildungssyndrome liefern. Zudem war zu Beginn meiner Arbeit die Untersuchung einer Hsd17b7-Knock-out-Maus geplant, die zu dieser Zeit in unserer Arbeitsgruppe generiert wurde [125]. Diese könnte als Modell für eine noch nicht identifizierte Stoffwechselerkrankung die Cholesterinbiosynthese betreffend fungieren, da Hsd17b7 den Schritt zwischen *Nsdhl* und *Ebp* katalysiert (Abb. 3.3). Durch die vermutete Ähnlichkeit mit diesen Syndromen ist es auch wahrscheinlich, dass die Auswirkungen eines Defektes der HSD17B7 fälschlicherweise als CHILD oder CDPX2 diagnostiziert werden könnten. Ein Vergleich von drei Mausmutanten, bei denen drei aufeinanderfolgende Schritte des Cholesterinbiosynthese-Wegs blockiert sind, würde viele neue wichtige Erkenntnisse liefern. Leider schlug die Generierung der Hsd17b7-Knock-out-Mauslinie bis heute fehl. Die *Bpa*<sup>6H</sup>-Mauslinie war nicht zu revitalisieren; aus dem Embryotransfer gingen keine lebenden Mäuse mit der erwünschten Mutation hervor.

Ein erster Hinweis auf mögliche Ursachen für die Auswirkungen dieser Mutationen ließe sich durch die Betrachtung der Proteinexpression der jeweiligen Enzyme während der Embryonalentwicklung gewinnen. Dazu müssten zunächst funktionstüchtige Antikörper gegen *Nsdhl* und *Ebp* generiert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt wäre hier die Betrachtung der mRNA- und/oder Protein-Expression von *Shh*. In der Embryonalentwicklung besteht ein Zusammenhang zwischen dem *Shh*-Signalweg und Cholesterin. *Hh*-Proteine fungieren als Morphogene und sind an der Organogenese, der Ausbildung des Gehirns und der Knochenentwicklung beteiligt. Aktive *Hh*-Proteine werden durch eine C-terminale Cholesterinmodifikation an die Zell-

### 3. Diskussion

membran gebunden (Abb. 3.4) [7, 130]. *Patched* (Ptch), der Rezeptor der Hh-Proteine, enthält eine hochkonservierte *Sterol Sensing Domain* (SSD), die Cholesterin oder dessen Derivate bindet [22, 98]. Cholesterinbiosynthese-Inhibitoren wie AY 9944 [136] und cholesterinähnliche Pflanzenalkaloide wie Cyclopamin [81] können zudem embryonale Missbildungen verursachen, die denen bei Mutationen im *Shh*-Gen ähneln [31, 57]. Diese Ähnlichkeit ist eine Bestätigung für die Verbindung zwischen der Cholesterinbiosynthese und dem *Shh*-Signalweg.



**Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Shh-Signaltransduktion.** Das Shh-Vorläuferprotein wird nach Abspaltung des Signalpeptids durch die C-terminale Domäne autokatalytisch gespalten. Gleichzeitig wird Cholesterin kovalent C-terminal an die N-terminale Domäne gebunden. N-terminal wird eine Palmitoyl-Gruppe angehängt. Die Reaktion zu diesem Signal wird durch die zwei transmembranen Proteine Patched (Ptch) und Smoothened (Smo) reguliert. Ptch unterdrückt die Aktivität von Smo und die Bindung von Shh zu Ptch inhibiert diese Funktion. Dies führt zu einer Aktivierung von Smo, wodurch es zu einer transkriptionellen Reaktion durch die Gli-Familie der Transkriptionsfaktoren kommt. (Abbildung modifiziert nach [32])

### 3.6. Entwicklung eines GC/MS-basierten Analyseverfahrens für die Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Enzyme der Cholesterinbiosynthese

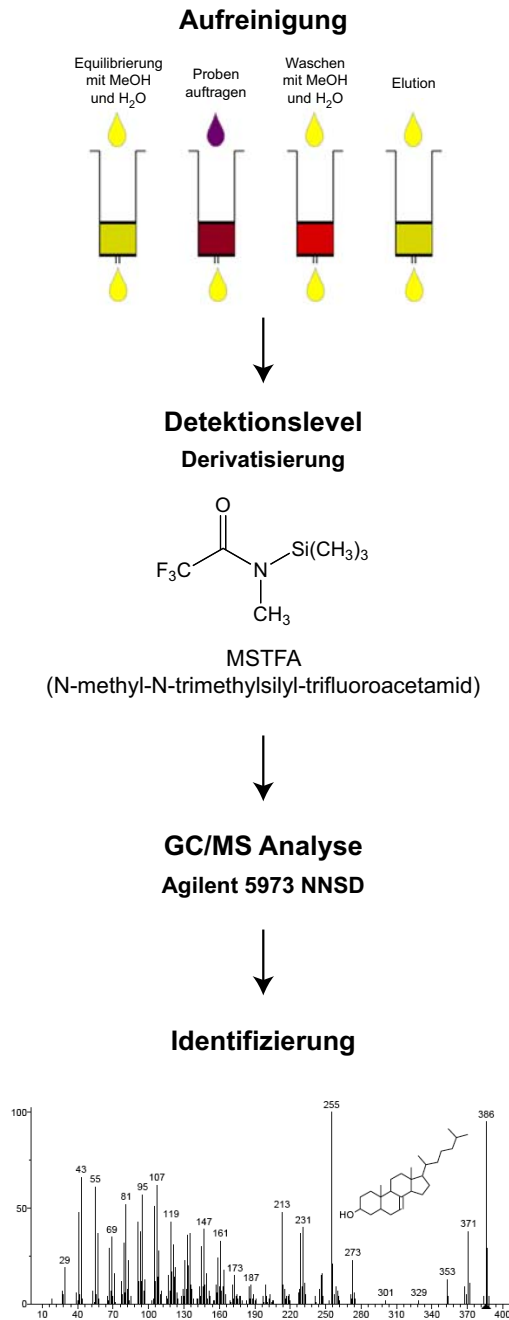
In der vorliegenden Arbeit sollte die Aktivität der Enzyme NSDHL, HSD17B7 und EBP, die eine zentrale Rolle in der Cholesterinbiosynthese spielen, eingehender untersucht werden. Die Bestimmung der Aktivität dieser Enzyme könnte wichtige Informationen liefern, um Auswirkungen von Mutationen auf Stoffwechselprozesse zu erklären. Deshalb sollten zunächst die enzymatischen Umsetzungen in Zellkultur nach einer Überexpression des jeweiligen Proteins gemessen werden. Davon ausgehend war eine genauere Untersuchung der Aktivität von mutierten Proteinen (wie z. B. im Fall der *Tattered*-Mäusen bzw. bekannter Mutationen, die beim Menschen auftreten) bzw. bei verringerter Proteinmenge (durch RNAi) geplant.

Für diese enzymatischen Messungen standen theoretisch mehrere Methoden zur Wahl. Eine Möglichkeit zur Trennung von Zymosteron und Zymosterol stellt die Dünnschichtchromatographie dar, ein physikalisch-chemisches Trennverfahren [111]. Aussagen über die Quantität des enzymatischen Umsatzes sind mit dieser Methode jedoch nur bei Verwendung radioaktiv markierter Substanzen möglich, die kommerziell nicht erhältlich waren. Eine Messung der Umsetzung mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) und Durchfluss-Szintillation wäre ebenfalls denkbar gewesen [34]. Mit dieser Methode kann auch eine Quantifizierung der enzymatischen Umsetzung durchgeführt werden. Allerdings ergab sich auch hier die Schwierigkeit, dass die zu untersuchenden Substanzen nicht radioaktiv markiert erhältlich waren. Die Herstellung dieser Substanzen auf Bestellung hätte den finanziellen Rahmen dieser Arbeit jedoch gesprengt.

Da für die durch NSDHL und HSD17B7 katalysierten Reaktionen jeweils der Cofaktor NADPH benötigt wird, wäre in diesen Fällen auch die Messung der Cofaktorabsorption bei 340 nm möglich. Dazu wird nach einer Aufreinigung des jeweiligen Proteins, NSDHL bzw. HSD17B7, die enzymatische Aktivität mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie gemessen. Bei der Oxidation des Cofaktors NADPH zu NADP<sup>+</sup> nimmt die Absorption bei 340 nm ab. Allerdings kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden, ob andere Intermediate bei der Umsetzung entstehen. Zudem bereitet die Aufreinigung der HSD17B7 einige Schwierigkeiten und die Verfügbarkeit des isolierten Proteins in ausreichenden Mengen stellt eine Limitierung dar. Da NSDHL eine transmembrane Domäne besitzt ist zu erwarten, dass die Aufreinigung ebenfalls zu Problemen führen kann.

Die Bestimmung der Aktivität durch eine GC/MS-basierte Messung eröffnet die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Analyse mit sehr hoher Präzision. Sie bietet darüber hinaus den Vorteil, dass nicht mit radioaktiv markierten Substanzen gearbeitet werden muss. Für diese Untersuchungen wurden die Ansätze zunächst mittels Festpha-

### 3. Diskussion



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Detektion mittels GC/MS. Die einzelnen Proben müssen zunächst aufgereinigt werden. Anschließend erfolgt eine Derivatisierung. Die Proben werden dann in die GC/MS gebracht und mit Hilfe dieser die Substanzen gemessen und identifiziert.

senextraktion aufgereinigt. Zur besseren Detektion wurden die Substanzen anschließend derivatisiert und dann gemessen. In der Auswertung erfolgte die Zuordnung der gemessenen Substanzen (Abb. 3.5).

#### 3.6.1. Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Aktivitätsmessung

Für die Messung der enzymatischen Umsetzungen wurde ein *in vitro*-Ansatz gewählt. Dazu wurde der pcDNA3-Vektor für die eukaryotische Expression in die entsprechenden Zellen transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und bis zur Messung bei -80 °C aufbewahrt.

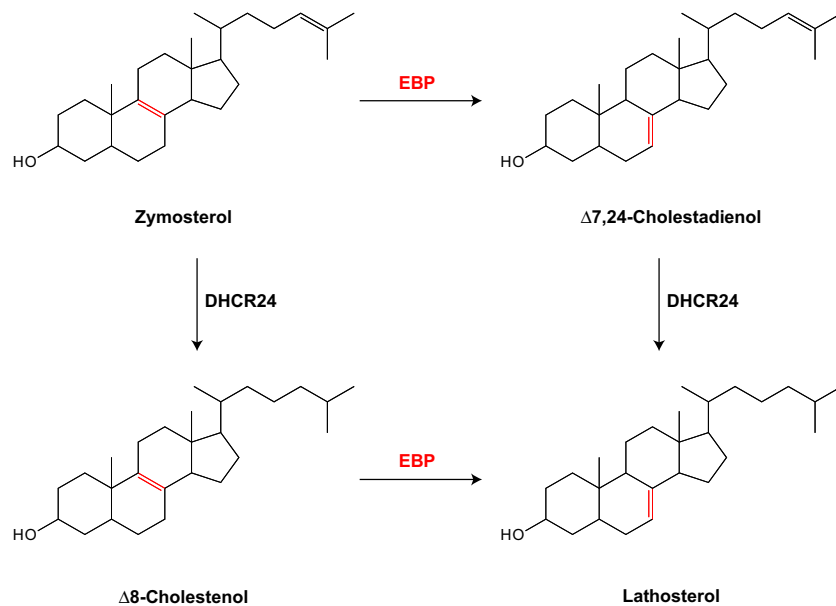
Da der enzymatische Umsatz dieser Enzyme bislang nicht in Zellkultur mittels GC/MS gemessen wurde, konnte nicht auf Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen zurückgegriffen werden. Die Auswahl der zu verwendenden Zelllinie hing im Wesentlichen von zwei Faktoren ab. Für die Versuche war eine effiziente Transfektion von großer Bedeutung. Zudem sollten die Zellen einfach in der Handhabung sein.

Für Versuche zur steroidogenen Wirkung einiger Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) haben sich die Zellen Hek293 [77] und HeLa [107] bewährt. Beide Zelllinien zeichnen sich zudem durch eine problemlose Handhabung und eine gute Transfektionseffizienz aus. Deshalb wurden beide Zelllinien für diese Versuche getestet. Da sich keine messbaren Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien für diese Versuche zeigten, wurden in der vorliegenden Arbeit HeLa-Zellen verwendet. Auch die shRNA-Vektoren wurden stabil in eine HeLa-Zelllinie transfiziert (Kap. 2.4.4). Damit sollte eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsansätze gewährleistet werden.

#### 3.6.2. Herausforderungen bei der Entwicklung eines GC/MS-basierten Analyseverfahrens zur Bestimmung der Aktivität von EBP *in vitro*

EBP katalysiert die Isomerisierung von Zymosterol zu  $\Delta^{7,24}$ -Cholestadienol sowie die Isomerisierung von  $\Delta^8$ -Cholestadienol zu Lathosterol (Abb. 3.6). Die Massenspektren für Zymosterol und Lathosterol konnten in underivatisierter und derivatisierter Form ermittelt werden (Kap. A.3.1). Allerdings waren weder  $\Delta^{7,24}$ -Cholestadienol noch  $\Delta^8$ -Cholestenol als Substanz kommerziell erhältlich, noch waren ihre Referenzspektren in der NIST-Spektralbibliothek vorhanden.

Die Spektren von Zymosterol und Lathosterol sind sich sehr ähnlich, weshalb es nicht möglich war, diese Substanzen alleine durch die Betrachtung der Molekülmassen zu unterscheiden. Durch die Identifizierung weiterer charakteristischer Ionen mit hohem Molekulargewicht konnten die Substanzen schließlich identifiziert werden. Allerdings hatte dies eine deutliche Reduktion der Signalintensität zur Folge. Gleichzeitig zeigte sich, dass die Fragmentierung der underivatisierten und derivatisierten Substanzen in mehrere charakte-

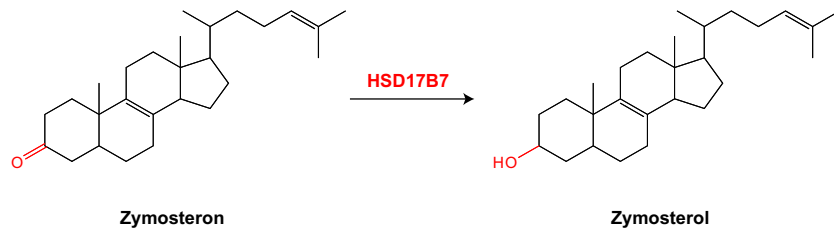


**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der Umsetzung von Zymosterol zu Lathosterol. Die Isomerisierung von Zymosterol zu  $\Delta^{7,24}$ -Cholestadienol bzw. von  $\Delta^8$ -Cholestenol zu Lathosterol wird durch EBP katalysiert.

ristische Ionen der von Cholesterin entspricht. Da Cholesterin in allen Zellen vorhanden ist, erhält man einen sehr hohen Hintergrund, der eine genaue Quantifizierung der eigentlich zu untersuchenden Substanzen stark beeinträchtigt.

### 3.6.3. Analyseverfahren für die enzymatische Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol durch die Katalyse von HSD17B7

HSD17B7 wurde erst vor kurzem als letztes unbekanntes Enzym der Cholesterinbiosynthese identifiziert [111]. Es katalysiert die Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol, wobei die Ketogruppe an C3 des Steroidgerüsts mit Hilfe des Cofaktors NADPH in eine Hydroxygruppe umgewandelt wird (Abb. 3.7). Im Cholesterinbiosyntheseweg katalysiert dieses Enzym den Schritt zwischen den Enzymen NSDHL und EBP, die bei einer Dysfunktion für schwere Krankheitsbilder (CHILD und CDPX2) verantwortlich sind. HSD17B7 könnte deshalb ein potentieller Kandidat für eine weitere bis jetzt nicht identifizierte Stoffwechselerkrankung sein. Die Betrachtung der enzymatischen Umsetzung dieses Enzyms und möglicherweise auftretender Intermediate könnten einen ersten Hinweis auf solche Funktionsstörungen geben.



**Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol.** Die Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol wird durch das Enzym HSD17B7 katalysiert. Bei dieser Reaktion dient NADPH/H<sup>+</sup> als Cofaktor.

### Bestimmung der Messparameter

Vorversuche zeigten, dass eine Derivatisierung der Substanzen für eine ausreichende Empfindlichkeit bei niedrigen Substratkonzentrationen notwendig ist. Zudem wurden die Parameter für die Quantifizierung im SIM bestimmt. Dabei wurden jeweils die Molekülonen gemessen. Diese weisen das höchste Masse-/Ladungsverhältnis der jeweiligen Substanz auf. Je höher dieses Verhältnis ist, desto exakter kann die Substanz quantifiziert werden. Bei einem geringen Masse-/Ladungsverhältnis wird mehr Hintergrund detektiert, wodurch die quantitative Analyse erschwert wird. Auch hier hat sich bestätigt, dass die Empfindlichkeit der Messung im SIM im Vergleich zum Scan-Modus deutlich gesteigert wird.

### Linearität der Verhältnisse der Analysesubstanzen

Für die Quantifizierung ist ein linearer Zusammenhang zwischen den Messwerten und der eingesetzten Konzentration Voraussetzung. Abweichungen von der Linearität können beispielsweise durch unterschiedliche Affinität der Substanzen zur Säulenmatrix hervorgerufen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Messwerte an Zymosteron und Zymosterol den eingesetzten Konzentrationen entsprachen (Kap. 2.3.4). Damit ist ein direkter Rückschluss von der quantifizierten Konzentration auf die eingesetzte Konzentration möglich.

### Optimierung der Aufreinigung

Die Aufreinigung der einzelnen Proben mittels Festphasenextraktion erwies sich als schwierig. Bei der Festphasenextraktion handelt es sich um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase stattfindet. Die Trennung von Analyt und Matrix wird durch eine reversible Wechselwirkung des Analyten mit der festen Phase des Sorbens ermöglicht.

Bei Zymosteron und Zymosterol handelt es sich um hydrophobe Substanzen. Hydropho-

be Analyte besitzen eine starke Bindung an Reversed-Phase-Sorptionsmittel. Anhand des Polaritätsindex  $P'$ , der die Fähigkeit des Lösungsmittels angibt, als Protonendonator, Protonenakzeptor oder Dipol zu reagieren, kann eine theoretische Vorauswahl eines geeigneten Elutionsmittels getroffen werden. Für die Elution der hier verwendeten Substrate sollten hydrophobe Lösungsmittel besser geeignet sein als hydrophile. Diethylether und Ethylacetat sind solche Lösungsmittel und haben sich auch experimentell für diesen Ansatz bewährt. In den Experimenten wurden verschiedene polymerbasierte SPE-Säulen verwendet, die sich durch eine erhöhte Stabilität gegenüber Lösungsmitteln auszeichnen. Auch nach Festphasenextraktion verblieben Zellfragmente in den Proben, die die GC/MS-Anlage verunreinigten. Dies machte sich durch eine verringerte Trennleistung und einen höheren Hintergrund bei den einzelnen Messungen bemerkbar. Zudem wurde die Auswertung der Daten erschwert, da neben den zu messenden Substanzen Zymosteron und Zymosterol viele Cholesterinderivate aus den Zellen gemessen wurden, die die eigentlichen Peaks überlagerten. Charakteristische Ionen von Cholesterintrimethylsilylether entsprechen den Molekülionen von derivatisiertem Zymosteron und Zymosterol. Mit der Hydrophobizität des Elutionsmittels nahm auch der unspezifische Hintergrund zu. Die Signalintensität unter verschiedenen Elutionsbedingungen sind daher nur bedingt vergleichbar. Nach Abzug des Hintergrundes wurden mit Ethylacetat jedoch die besten Ergebnisse erzielt.

#### **Messung der Aktivität von HSD17B7 in vitro**

Eine Quantifizierung des Umsatzes von Zymosteron zu Zymosterol war bei einer Überexpression von muriner Hsd17b7 (mHsd17b7) und humaner HSD17B7 (hHSD17B7) trotz der vorher beschriebenen Schwierigkeiten möglich. Die Überlagerung der Peaks der Analyten durch Cholesterinderivate erforderte das Mitführen einer Kontrollprobe. Dazu wurde bei jeder Versuchsdurchführung auch eine identische Probe ohne Zugabe des Substrates gemessen

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Zymosteron im Reaktionsansatz und einer Inkubationszeit von 90 min wurde für mHsd17b7 ein Umsatz von 84–91 % und für hHSD17B7 von 79–88 % bestimmt. HeLa-Zellen, die ausschließlich mit dem pcDNA3-Plasmid transfiziert wurden, zeigten bereits einen Grundumsatz von 39–47 %, der durch die endogene HSD17B7-Expression zu erklären ist. Dabei schwankten die Werte bei den einzelnen Messungen. Es konnte hier jedoch eine Methode etabliert werden, die der Messung der enzymatischen Aktivität von HSD17B7 dient.

#### **Messung der Aktivität von HSD17B7 in HeLa T-REx/shHSD17B7**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode für die Messung des durch HSD17B7 katalysierten enzymatischen Umsatzes von Zymosteron zu Zymosterol zu etablieren. Ausgehend



von dieser Methode sollte auch der Umsatz in HeLa T-REx/shHSD17B7 nach Induktion der RNAi gemessen werden, um Erkenntnisse über die Auswirkungen einer verminderten HSD17B7-Proteinexpression zu erhalten. Diese sollten mit einer Funktionsstörung des Proteins vergleichbar sein, welche z. B. durch eine Mutation des *HSD17B7*-Gens verursacht sein könnte.

Hierbei ergaben sich mehrere Probleme. Unterhalb einer Zymosteron-Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  war keine Detektion und Quantifizierung in der GC/MS möglich. Dies ist vor allem durch Verluste während der Aufreinigung bedingt. Allerdings liegt eine 10  $\mu\text{M}$  Zymosteron-Konzentration weit über dem physiologischen Level. Eine Untersuchung von Störungen der Cholesterinbiosynthese, ausgelöst durch eine Beeinträchtigung der HSD17B7, war daher mit der hier etablierten Methode nicht möglich.

Der hohe Hintergrund stellte ein weiteres Problem dar. Es werden viele Cholesterinderivate mitgemessen, die zum Teil stärkere Signale zeigen als die zu messenden Substrate. Zudem kann nicht unterschieden werden, welche Intermediate in den Zellen schon vorhanden sind und ob durch die Blockierung der HSD17B7 andere Intermediate entstehen.

#### 3.6.4. Chancen und Herausforderungen der GC/MS-Analyse

Für die Messung der enzymatischen Umsetzung von Zymosteron zu Zymosterol ist eine optimale Aufreinigung des Zellextraktes unerlässlich, die zu einer hohen Signalintensität und einem geringen Hintergrund führt. Der hohe Hintergrund, der in den hier durchgeführten Versuchen nicht verringert werden konnte, erforderte die Subtraktion einer Kontrollprobe, was wiederum zu Ungenauigkeiten in der quantitativen Analyse führte.

Um die Präzision der Messungen zu erhöhen, könnte auch die Menge an eingesetztem Substrat erhöht werden. Dabei wäre eine Substratinhibition des Enzyms allerdings sehr wahrscheinlich. Diese mögliche Inhibition müsste in einer eigenen Versuchsreihe bestimmt werden. Zudem können die Auswirkungen einer beeinträchtigten enzymatischen Umsetzung so nicht mehr untersucht werden.

Trotz der sich ergebenden Schwierigkeiten bietet die GC/MS-basierte Messung die Chance, das Enzym HSD17B7 näher zu charakterisieren und neue Einblicke in die Auswirkungen von Mutationen des *HSD17B7*-Gens auf die Cholesterinbiosynthese zu erhalten. Die GC/MS-Analyse ermöglicht auch das Modellieren von Kinetiken. Dadurch könnte der Umsatz im zeitlichen Verlauf betrachtet werden, was weitere Aufschlüsse über die Wirkung der HSD17B7 liefern könnte. Die Messung unterschiedlicher Substratkonzentrationen in Abhängigkeit der Produktbildungsrate würde die Aufstellung eines formalkinetischen Modells ermöglichen. Dadurch könnten Aussagen über die Umsatzgeschwindigkeit und eine vorliegende Inhibition des Enzyms getroffen werden.

Die Messung der stabil HSD17B7-shRNA exprimierende Zelllinie könnte Erkenntnisse über die Auswirkungen einer Downregulation der HSD17B7-Aktivität liefern. In diesem Zusam-

menhang könnte nach anderen Enzymen gesucht werden, die gemeinsam mit der HSD17B7 reguliert werden. Eine Messung im Scan-Modus könnte neu entstandene Metabolite aufzeigen. Damit könnte auch nachgewiesen werden, ob HSD17B7 ein Kandidat für die Verursachung diverser Krankheitsbilder ist, die mit fehlender oder eingeschränkter Aktivität von Schlüsselenzymen der Cholesterinbiosynthese in Verbindung gebracht werden.

## 3.7. RNA Interferenz - das richtige Werkzeug?

Die RNA Interferenz stellt eine relativ neue Methode zur gezielten Reduktion eines bestimmten Genprodukts dar. Dadurch eröffnen sich völlig neue Untersuchungsmöglichkeiten, um Auswirkungen defekter Stoffwechselwege, wie der Cholesterinbiosynthese, genauer zu betrachten. In dieser Arbeit wurden Konstrukte kreiert, die die Down-Regulation von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* ermöglichen. Als Negativkontrolle für diese Versuche diente ein Konstrukt für den Knock-down von *lacZ*.

### 3.7.1. Bedeutung der richtigen Sequenzauswahl für die siRNAs

Sequenzen für den effektiven Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* standen zu Beginn meiner Arbeit nicht bereit. Verschiedene siRNAs, die an unterschiedliche Regionen der selben Target-mRNA binden, zeigen unterschiedliche Knock-down Effizienzen [74]. Einige Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Parameter für den siRNA-induzierten Gen-Knock-down optimiert, die die Länge, die Sekundärstruktur und die Sequenzspezifität des siRNA-Duplexes mit einschließen. Die Effektivität dieser Parameter wurden bei der Induktion der RNAi in *D. melanogaster* und in humanen Zellen mehrfach getestet [42, 140]. Daraus konnte zwar kein Konsensus für die Auswahl von siRNAs entwickelt werden, aber es wurden einige Richtlinien zur Generierung von siRNAs entdeckt. Die Sequenzen sollten nach dem Muster AA(N<sub>19</sub>)TT gestaltet sein und am 3'-Ende einen Überhang von 2 Nucleotiden aufweisen. Zudem scheint eine 5'-Phosphatgruppe und eine 3'-Hydroxygruppe für die Effektivität von Bedeutung zu sein. Mittlerweile stehen einige Programme zur Verfügung, die unterschiedliche Algorithmen bei der Auswahl der Sequenzen berücksichtigen und somit eine Vorauswahl an effektiven Sequenzen ermöglichen.

Diese so ausgewählten siRNA-Sequenzen mussten experimentell getestet werden. Insbesondere für den Knock-down von *HSD17B7* zeigte sich, dass die Vorhersagen bezüglich der Knock-down-Fähigkeiten einzelner Sequenzabschnitte oftmals nicht zutrafen (Kap. 2.4.2). Es scheinen also auch noch andere, bis jetzt nicht bekannte Faktoren eine Rolle bei der RNAi zu spielen.

### 3.7.2. Unterschiedliche Bereitstellung von siRNAs

Für die Generierung von siRNAs standen zu Beginn dieser Arbeit unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Eine Möglichkeit zur Generierung von siRNAs besteht in der chemischen Synthese. Solche siRNAs werden von einigen Firmen vertrieben. Hierbei hat man die siRNAs schnell zur Verfügung und kann sofort mit den Experimenten beginnen. Allerdings waren die synthetischen siRNAs zu dem benötigten Zeitpunkt relativ teuer. Zudem hätten für jedes Gen mehrere unterschiedliche Sequenzen zur Optimierung bestellt werden müssen (Kap. 3.7.1). Bei den synthetisierten siRNAs handelt es sich um RNA, die sehr anfällig für Degradierung ist.

Des Weiteren standen unterschiedliche Systeme zur *in vitro*-Transkription von siRNAs zur Verfügung. Diese sind kostengünstiger als chemisch synthetisierte siRNAs, liefern aber nur eine begrenzte Menge an Material. Eine Möglichkeit, um die Auswahl von effektiven siRNA-Sequenzen zu vermeiden, ist der Verdau langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) durch ein Enzym der RNaseIII-Familie. Dabei erhält man eine zufällige Auswahl an siRNAs [37]. Dafür wählt man einen ca. 200–1000 nt Bereich der Target-mRNA aus. Diese wird anschließend *in vitro* verdaut. Der erhaltene Mix unterschiedlicher siRNAs kann anschließend transfiziert werden. Dabei erhält man jedoch keinen eindeutigen Vorgang. Bruchstücke könnten auch an andere mRNAs als die gewünschte binden, so dass nicht mehr zweifelsfrei festgestellt werden kann, ob der beobachtete Effekt allein durch den Knock-down des Target-Gens entstanden ist. Unspezifische Effekte könnten hierbei die Ergebnisse verfälschen.

Bei den oben beschriebenen Methoden gibt es keine Möglichkeit zur Amplifizierung der siRNAs. Diese Problematik wird bei der Verwendung von siRNA-Expressions-Kassetten (SECs) und siRNA-Expressions-Vektoren vermieden. Sie erlauben es, siRNA *de novo* innerhalb der Zellen zu generieren. SECs wurden erstmalig von Castanotto beschrieben und besitzen ebenso wie die Vektoren eine Sequenz, die für die entsprechende haarnadelförmige siRNA codieren [20, 23, 102, 128, 156]. Diese Methoden ermöglichen die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an siRNAs.

Ich habe mich in dieser Arbeit für die Bereitstellung der siRNAs mit Hilfe shRNA-exprimierender Vektoren entschieden. Zusätzlich zu einer beliebigen Menge an shRNAs bieten sie den Vorteil, dass man sie stabil in Zellen transfizieren kann. Allerdings nimmt die Klonierung dieser Vektoren einige Zeit in Anspruch und die inklonierten Sequenzen müssen unbedingt zur Kontrolle sequenziert werden.

### 3.7.3. Limitierung der transienten Transfektion

Die Untersuchung der Effekte auf die Cholesterinbiosynthese in Zellkultur durch RNAi wurde mit Hilfe von shRNA-exprimierenden Vektoren durchgeführt. Diese bieten den Vor-

teil, dass die shRNA in der Zelle generiert wird und dort in größerem Maße zur Verfügung steht. Ein Problem stellt die Transfektionseffizienz dar. Unterschiedliche Zelllinien lassen sich unterschiedlich gut bzw. schlecht transfizieren. Die Effizienz der ausgewählten shRNAs für den Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP*, die mit Hilfe eines Screening-Vektors (psiCHECK-2) über die Lumineszenzmessung ermittelt wurde, lag jeweils bei ca. 90 %. Bei der transienten Transfektion werden nie alle Zellen mit dem Vektor transfiziert. Viele nachfolgende Analysemethoden betrachten dagegen die Gesamtheit der Zellen, also auch diejenigen, in denen kein Knock-down stattfand. Dies kann die Ergebnisse verfälschen, wie man beispielsweise auch bei der Bestätigung des Knock-downs auf endogener mRNA-Ebene mittels qRT-PCR beobachten konnte (Kap. 2.4.3). Da die mRNA aller Zellen, d. h. transfizierter und nichttransfizierter Zellen, in die PCR eingesetzt wurde, betrug die Reduktion hier nur noch 30–60 %.

Desweiteren bewirkt eine transiente Transfektion eine Expression der shRNAs nur während eines begrenzten Zeitraums. Für Beobachtungen über längere Zeiträume ist es deshalb notwendig, die Zellen in regelmäßigen Abständen erneut mit den entsprechenden Vektoren zu transfizieren. Ob es jedoch zu Nebeneffekten durch diese wiederholten Transfektionen kommen kann, wurde noch nicht untersucht. Dabei ergibt sich jedoch auch die Problematik, dass bei wiederholten Transfektionen nicht immer die selben Zellen transfiziert werden. Bei der anschließenden Analyse konnte man so unterschiedlich behandelte Zellen erhalten, die beispielsweise nicht bzw. nicht über den gesamten untersuchten Zeitraum die shRNA exprimierten.

Wichtig ist auch, in welcher Zeitspanne das entsprechende Protein in den Zellen wieder abgebaut wird. Für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine NSDHL, HSD17B7 und EBP stand nur ein Antikörper gegen HSD17B7 zur Verfügung. Für dieses Protein konnte in stabil transfizierten Zellen gezeigt werden, dass es erst nach zehn Tagen zu einer deutlichen Abnahme der Proteinmenge kam (Kap. 2.4.4). Auch die Auswirkungen des Knock-downs von NSDHL und EBP wurden nach einer wiederholten Transfektion der shRNA-Vektoren nach zehn bis 20 Tagen untersucht.

Um die Limitierung der transienten Transfektion zu umgehen, müssten die Zellen nach der Transfektion z. B. mit Hilfe eines FACS aussortiert werden, so dass in weiteren Untersuchungen nur diese transfizierten Zellen betrachtet werden können. Dazu müssten die Zellen allerdings cotransfiziert werden, damit diese Sortierung überhaupt möglich wird. Allerdings geraten die Zellen durch diese Behandlung unter zusätzlichen Stress. Eine bessere Alternative hierzu bietet die stabile Transfektion.

#### 3.7.4. Stabil shRNAs-exprimierende Zelllinien

In den stabilen Zellen sollten vor allen Dingen Auswirkungen der Reduktion der zu untersuchenden Proteine auf das apoptotische Verhalten der Zellen untersucht werden. Aus

diesem Grunde fiel die Entscheidung bei der Generierung dieser stabilen Zellen auf ein System, mit dem sich RNAi induzieren lässt. Hierfür standen wiederum nur wenige Zelllinien zur Auswahl. Für die Anwendung als induzierbare shRNA-exprimierende Zellen wurde uns nach eingehender Beratung die HeLa T-REx-Zelllinie empfohlen.

Aus den generierten stabilen Zelllinien konnten für alle vier Gene (*NSDHL*, *HSD17B7*, *EBP* und als Negativkontrolle *lacZ*) diejenigen Klone ausgewählt werden, die gegenüber den nativen HeLa T-REx-Zellen einen signifikanten Knock-down aufwiesen (Kap. 2.4.4). Dabei wurde bei HeLa T-REx/shNSDHL ein Knock-down von 92 %, bei HeLa T-REx/shHSD17B7 von 94 %, bei HeLa T-REx/shEBP von 95 % und bei HeLa T-REx/shlacZ von 94 % erreicht. Es zeigten sogar alle generierten Klone (neun HeLa T-REx/shNSDHL-Klone, acht HeLa T-REx/shHSD17B7-Klone, zehn HeLa T-REx/shEBP-Klone und fünf HeLa T-REx/shlacZ-Klone) eine deutliche Reduktion der entsprechenden mRNA bei den Screening-Experimenten. Die unterschiedlich hohe Knock-down-Effizienz hing bei allen Klonen mit der Insertion des Vektors in die genomische DNA der HeLa T-REx-Zellen zusammen. Dieser Knock-down konnte für die stabilen Zelllinien HeLa T-REx/shNSDHL, HeLa T-REx/shHSD17B7 und HeLa T-REx/shEBP auch auf endogener mRNA-Ebene mittels quantitativer RealTime-PCR bestätigt werden.

Ein bereits vorher angesprochenes Problem stellt die Stabilität der Proteine innerhalb der Zelle dar. Auswirkungen der Reduktion der mRNA sind unter Umständen erst nach längeren Zeiträumen zu beobachten. Die mRNA wird zwar sofort abgebaut, aber bereits bestehendes Protein kann noch länger aktiv sein. In dieser Arbeit konnte ein signifikanter Knock down von HSD17B7 in HeLa T-REx/shHSD17B7 auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Die in einem Western-Blot detektierten Banden wurden mit zunehmender Induktionsdauer der shRNA deutlich schwächer (Abb. 2.39). Nach zehn Tagen war nur noch eine schwache Expression des Proteins zu erkennen. Dies zeigt, dass HSD17B7 eine relativ lange Lebensdauer besitzt. Zudem war zu beachten, dass immer ein kleiner Bestandteil des Proteins vorhanden blieb, da nicht die komplette mRNA degradiert wurde, sondern nur ein Anteil von ca. 90 %. Somit war eine Restaktivität des Proteins immer vorhanden. Die Lebensdauer von NSDHL und EBP konnte in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da die Peptidantikörper gegen diese beiden Proteine keine spezifische Färbung zeigten und unspezifisch viele Zellkomponenten färbten (Kap. 2.1.3).

Die in der vorliegenden Arbeit generierten stabilen Zelllinien zeigten Probleme, die Induzierbarkeit der shRNA-Expression betreffend. Es konnte gezeigt werden, dass selbst ohne die Zugabe von Tetrazyklin eine kleine Menge an shRNAs exprimiert wurde. Hierbei handelt es sich jedoch um ein bekanntes Phänomen, dass bei allen induzierbaren Systemen auftritt, da die Promotoren nie zu 100 % dicht sind. Für Vergleiche wurden deshalb in allen Versuchen zum einen nicht induzierte Zellen, zum anderen aber auch native HeLa T-REx-Zellen mitgeführt.

Ein schwerwiegenderes Problem trat bei der Überprüfung der Knock-down-Effizienzen der einzelnen Klone auf. Durch die Zugabe von Tetrazyklin konnte die Expression der shRNAs nicht immer induziert werden. Die Ursache für diese Erscheinung scheint in der nativen HeLa T-REx-Zelllinie zu liegen. Gespräche mit anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls T-REx-Zelllinien für eine stabil induzierbare Expression von shRNA-Konstrukten verwenden, ergaben, dass diese Problematik immer wieder auftritt. Um diesbezüglich Fehler bei den einzelnen Experimenten zu vermeiden, wurden die Versuche mindestens vier- bis fünfmal wiederholt. Zur vollständigen Behebung dieses Problems, müssten die shRNA-exprimierenden Vektoren erneut stabil in eine Zelllinie transfiziert werden, die nicht induzierbar ist. Somit wäre gewährleistet, dass eine konstante Expression der shRNAs stattfindet. Wie in den Versuchen in dieser Arbeit gezeigt wurde, hat die kontinuierliche Expression der hier untersuchten shRNAs keinen negativen Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Zellen.

#### 3.7.5. Krebszelllinien für die stabile Transfektion?

Für die stabile Transfektion wurden HeLa-Zellen verwendet. Krebszelllinien sind jedoch genomisch instabil und weisen cytogenetische Anomalien auf [109]. Für HeLa-Zellen sind zahlreiche numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen beschrieben. Für die HeLa T-REx-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass diese einen hypertriploiden Karyotyp besitzen [80]. Zudem fanden sich charakteristische Bruchstücke von Chromosom 1, 2 und 5 sowie Translokationen zwischen den Chromosomen 1 und 4, 3 und 6, 15 und 1, 15 und 2 sowie 22 und 13. Auch wurden weitere Translokationen erfasst und die Karyotypen der einzelnen Metaphasen wiesen zahlreiche Unterschiede auf [80]. Dies deutet darauf hin, dass zwei stabile Transfektionen in einer Zelllinie eine verstärkte genetische Instabilität mit sich bringen. Diese Befunde könnten für die Probleme mit diesen Zellen verantwortlich sein, die sich hauptsächlich in der oftmals nicht möglichen Induktion der shRNA-Expression äußerten.

Eine Alternative zu den Krebszelllinien stellen telomerase-immortalisierte Zelllinien dar. Bei diesen werden die Chromosomenenden durch die Telomere stabilisiert, wodurch die Chromosomen vor Degradierung besser geschützt werden. Das Fehlen dieser Telomere führt dagegen zu Chromosomenfusionen und genomischer Instabilität. Dabei wird die Verkürzung der Telomere als eine molekulare Uhr angesehen, die Seneszenz auslöst. Telomere regulieren die Anzahl an Zellteilungen und mit jeder Teilung verkürzen sich die Telomere. Bei einer kritischen Länge der Telomere befinden sich die Zellen in einem nicht teilungsaktiven Stadium (Seneszenz). Keimbahnzellen besitzen eine ausgedehnte Lebensdauer, in der sie aktiv Telomerase exprimieren. Normale menschliche Zellen wurden mit einem Vektor transfiziert, der für die katalytische Domäne der humanen Telomerase (*hTRT*) codiert. *hTRT*-exprimierende Klone zeigen selbst nach mehr als 300 Verdop-

pelungen keine Anzeichen von Seneszenz. Eine stabile Telomerase-Expression führt zu genomischer Stabilität und schützt vor der Akkumulation von cytogenetischen Anomalien. Die Telomerase-exprimierenden Zellen besitzen einen normalen diploiden Karyotyp mit einer geringen Frequenz an chromosomalen Aberrationen in späten Passagen [13, 119]. Die Etablierung einer stabilen Zelllinie mit einer Telomerase-immortalisierten Mutterzelllinie bietet eine viel versprechende Alternative gegenüber Krebszelllinien.

#### 3.7.6. Auswirkungen von RNAi auf die Intensität der Apoptose

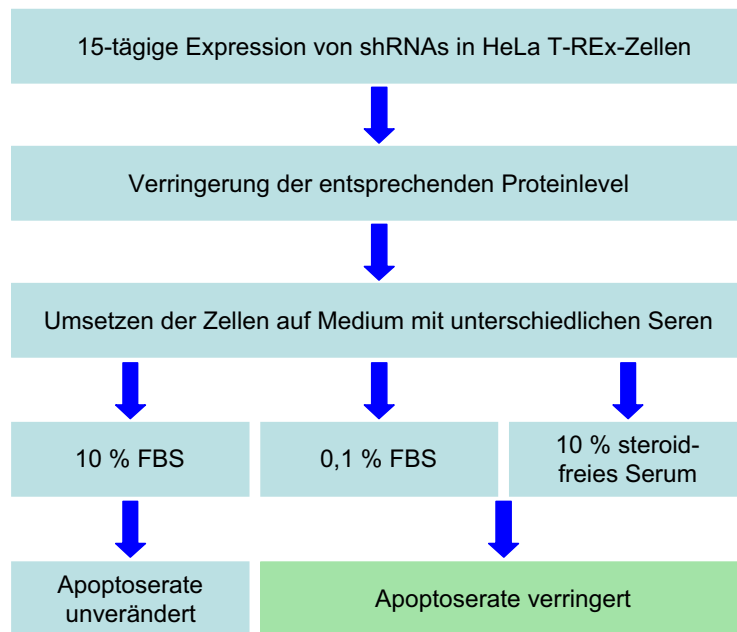
Mit Hilfe von RNAi wurde die mRNA unterschiedlicher Gene der Cholesterinbiosynthese reduziert. Ziel dieser Versuche war die Untersuchung der Auswirkungen dieser Reduktion auf die Apoptose und die Zellviabilität.

Wurden die shRNA-exprimierenden Vektoren transient in Zellen transfiziert, so konnten keine Veränderungen gegenüber unbehandelten Zellen im apoptotischen Verhalten festgestellt werden (Kap. 2.4.5). Die Versuche wurden in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Die Verwendung von HeLa-Zellen sollte eine Vergleichbarkeit der Versuche von transient und stabil transfizierten Zellen liefern. Im adulten Organismus findet die Cholesterinbiosynthese überwiegend in der Leber statt. Für die Untersuchungen mittels RNAi wurden deshalb auch HepG2-Zellen verwendet. MRC-5-Zellen wurden ausgewählt, da die Möglichkeit besteht, dass Funktionsstörungen der Cholesterinbiosynthese nur während der Embryonalentwicklung Auswirkungen zeigen. Die Ursache dafür, dass trotz einer deutlichen Reduktion der mRNA keine Auswirkungen zu beobachten waren, könnte wiederum in der Methodik der transienten Transfektion (Kap. 3.7.3) und der Stabilität der zu untersuchenden Proteine liegen.

Eine Veränderung der Apoptoseintensität konnte nach einer 15-tägigen konstanten Expression der shRNA-Konstrukte in den stabil transfizierten HeLa T-REx-Zellen beobachtet werden. Nach dieser Inkubationszeit war zumindest das Level an HSD17B7 deutlich reduziert, wie in Kapitel 2.4.4 gezeigt. Für diese Versuche wurde davon ausgegangen, dass auch die Proteinlevel von NSDHL und EBP nach dieser Zeit deutlich reduziert sein müssten. Bei Wachstum auf 10 % FBS-haltigem Medium konnte noch kein Unterschied zwischen den shRNA-exprimierenden Zellen und nativen Zellen festgestellt werden. Erst nach Kultivierung auf Mangelmedien (Medium mit Zusatz von 0,1 % FBS bzw. 10 % steroidfreiem Serum) ließ sich eine Veränderung beobachten. Dabei kam es sowohl beim Knock-down von NSDHL, HSD17B7 als auch EBP zu einer deutlichen Verringerung der Apoptoserate bei gleichbleibender Viabilität der Zellen (Abb. 2.50, Abb. 3.8). Die Reduktion der Apoptoseintensität fiel dabei bei induzierten HeLa T-REx/shNSDHL-Zellen im Vergleich zu nicht induzierten Zellen am geringsten aus. Möglicherweise ist NSDHL als Protein länger stabil als HSD17B7, so dass zum Zeitpunkt der Untersuchung noch mehr Protein vorhanden war und deshalb die Auswirkungen der Beeinträchtigung noch nicht vollständig zum

Tragen kamen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die geringere Apoptosehäufigkeit keine sich anreichernden Intermediate verantwortlich sein können. Wäre dies der Fall, so müssten die Auswirkungen dieser Anreicherung auch in den Zellen mit 10 % FBS-haltigem Medium zu beobachten sein. Durch die Reduktion der untersuchten Proteine kommt es unter den hier getesteten Versuchsbedingungen zu einer Abnahme der Apoptose. Deshalb liegt die Schlussfolgerung nahe, dass zumindest eines der proapoptischen Signale ein Cholesterinderivat sein muss, dass durch den Knock-down der hier untersuchten Gene nicht mehr oder nur noch in geringerem Maße gebildet wird.



**Abbildung 3.8: Vergleich der Auswirkungen der RNAi in stabil transfizierten Zellen.** Eine Verringerung der Apoptosehäufigkeit konnte nach einer 15-tägigen konstanten Expression der shRNAs für den Knock-down von *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* auf Medium mit 0,1 % FBS bzw. 10 % steroidfreiem Serum beobachtet werden.

Diese Verringerung der Apoptose, die durch eine defekte Cholesterinbiosynthese ausgelöst wird, würde beispielsweise die bei menschlichen CHILD- und CDPX2-Patienten auftretende Syndaktylie erklären. Jedoch spielen bei diesen Krankheiten komplexe Mechanismen eine entscheidende Rolle. Neben dieser Verringerung der Apoptose treten weitere Symptome auf, die dadurch nicht zu erklären sind. Dazu gehört z. B. das Fehlen von Gliedmaßen bei CHILD. Möglicherweise tritt hier eine Beeinträchtigung des Shh-Signalwegs auf.



### 3.8. Auswirkungen der Inhibition der Cholesterinbiosynthese

Die Inhibition der Cholesterinbiosynthese kann an unterschiedlichen Stellen erfolgen (Abb. 3.9). Allerdings sind nicht für alle enzymatischen Umsetzungen dieses Syntheseweges Inhibitoren bekannt.

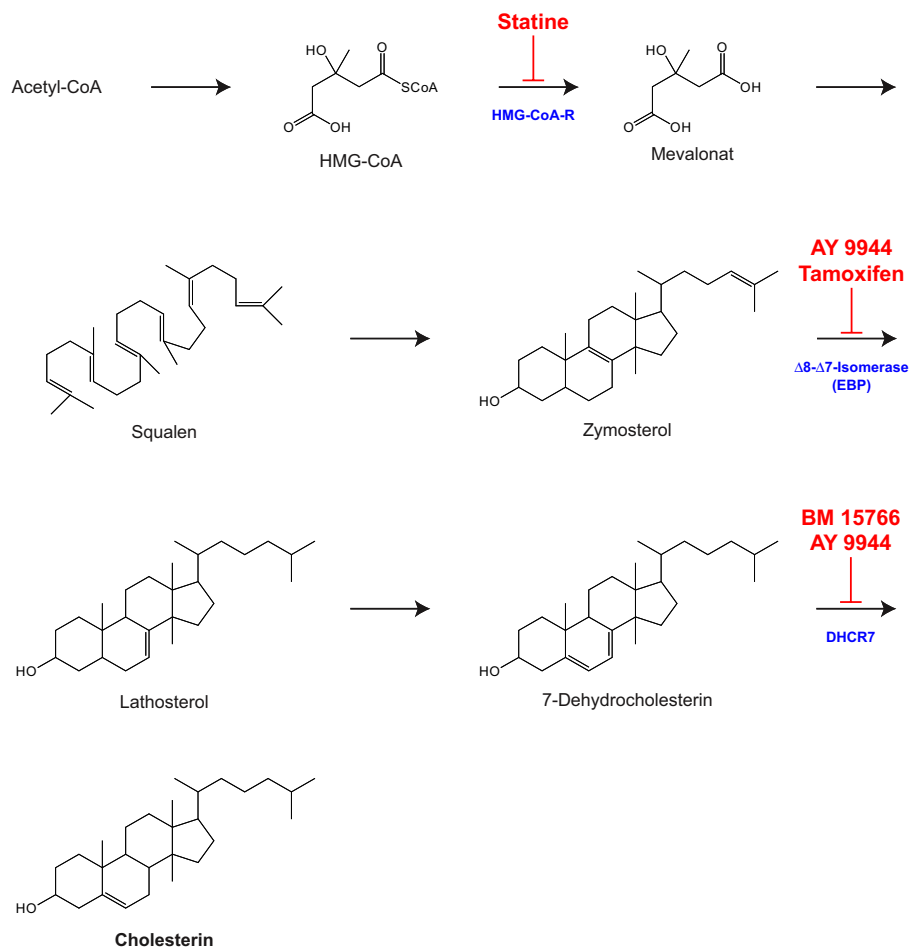


Abbildung 3.9: Stark vereinfachte Darstellung der Cholesterinbiosynthese mit einigen ausgewählten Inhibitoren.

### 3.8.1. Hemmung einiger Schritte der Cholesterinbiosynthese

#### Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine

Statine, Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), gehören zu den wichtigsten Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese. Sie finden eine breite Anwendung als cholesterinreduzierende Medikamente und werden bei Patienten mit erhöhten Cholesterinwerten und arteriosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt. Statine üben pleiotrope Effekte auf eine Vielzahl von Zellen aus, wobei sie die Kapazität der Cholesterinbiosynthese reduzieren und den Lipidmetabolismus beeinflussen. Sie sind beteiligt an der Inhibition der Cholesterinbiosynthese, an einer gesteigerten Aufnahme und Degradierung von LDL, der Inhibition der LDL-Oxidation und der Inhibition der Expression des *Scavenger*-Rezeptors [9]. Statine modulieren eine Reihe von Prozessen die zu einer Reduktion der Akkumulation von verestertem Cholesterin in Macrophagen führt, einer Reduktion des Entzündungsprozesses und einer erhöhten Stabilität der arteriosklerotischen Plaques. Zusätzlich sind Statine in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen zu inhibieren und die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium zu steigern.

**Regulation der HMG-CoA-Reduktase** Die Umsetzung von HMG-CoA zu Mevalonat stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese dar. Das dafür verantwortliche Enzym HMG-CoA-Reduktase ist eine AMP-aktivierte Proteinkinase, deren katalytische Aktivität hauptsächlich vom Status der Phosphorylierung und Dephosphorylierung abhängt [8]. Dabei wird die katalytische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase durch eine Phosphorylierung verringert und gleichzeitig ihre Abbaurate erhöht [127]. Mevalonat, das bei der Umsetzung von HMG-CoA entstehende Produkt, ist aktiv in die Rückkopplungs-Regulation der HMG-CoA-Reduktase involviert. Mevalonat, 25-Hydroxycholesterin, LDLs, Insulin, Glucagon, Schilddrüsenhormone und Estrogene können die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase auf transkriptionellem und translationellem Level regulieren [120].

**Wirkungsweise der Statine** Die Statine wirken auf unterschiedliche Art und Weise. Sie konkurrieren mit dem Substrat um das aktive Zentrum des Enzyms (chemische Strukturen in Abb. 3.10). Wenn sie an das aktive Zentrum der HMG-CoA-Reduktase binden, verändern sie deren Konformation. Dies verhindert die Bildung einer funktionellen Struktur. Diese Konformationsänderung im aktiven Zentrum macht die Statine sehr effektiv und spezifisch. Die Bindung der Statine zur HMG-CoA-Reduktase ist reversibel und ihre Affinität zum Enzym liegt im nanomolaren Bereich, wohingegen das natürliche Substrat eine Affinität im mikromolaren Bereich aufweist [33]. Die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase hat eine Reduktion des intrazellulären Cholesterinspiegels zur Folge, wodurch SCAP ak-

tiviert wird und SREBPs vom Endoplasmatischen Retikulum löst. Diese werden in den Zellkern transportiert und erhöhen dort die Expression des LDL-Rezeptors. Die Reduktion des Cholesterins führt dann zu einem Anstieg des LDL-Rezeptors, der die Reduktion von zirkulierendem LDL und dessen Vorstufen bestimmt [141]. Die Reduktion des LDL-Cholesterins durch Statine ist mengenabhängig und nicht linear.

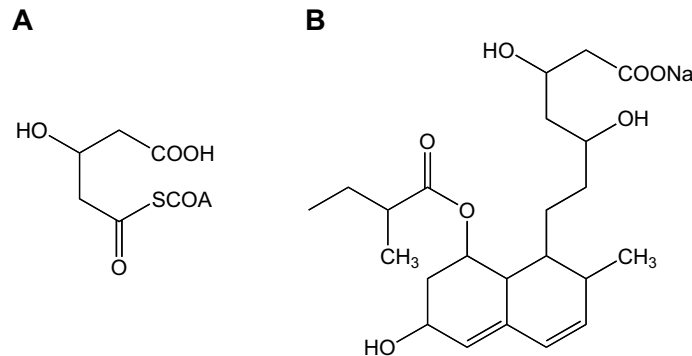


Abbildung 3.10: Chemische Strukturen von HMG-CoA (A) und Pravastatin (B).

Gleichzeitig hemmen Statine auch die hepatische Synthese von Apolipoprotein B-100, was zu einer Reduktion der Synthese und Sekretion von triglyceridreichen Lipoproteinen [59] und einem Anstieg der Rezeptorbildung für die Apolipoproteine B und E führt [58].

#### Hemmung der 7-Dehydrocholesterin-Reduktase

Die Hemmung der 7-Dehydrocholesterin-Reduktase (DHCR7) ist durch die Inhibitoren AY 9944 oder BM 15766 möglich. AY 9944 besitzt darüber hinaus die Fähigkeit, weitere Reaktionen der Cholesterinbiosynthese durch Inhibition der  $\Delta$ 14-Reduktase und der  $\Delta$ 8- $\Delta$ 7-Isomerase zu blockieren. Die Hemmung von AY 9944 ist dabei konzentrationsabhängig [50].

Sowohl AY 9944 als auch BM 15766 sind hochteratogene Substanzen. In Ratten wurde gezeigt, dass diese Substanzen Holoprosenzephalie auslösen können. Auch Anomalien der Gliedmaßen und der männlichen Genitalien wurden dabei beobachtet. GC/MS-Analysen zeigten eine Hypocholesterinämie und eine Anreicherung der Precursor [93, 94]. Tiere, denen diese Inhibitoren verabreicht wurden, dienten als Modelle für SLOS.

#### Hemmung anderer Schritte der Cholesterinbiosynthese

Eine Inhibition der  $\Delta$ 24-Dehydrocholesterin Reduktase kann man mit Triparanol (4-Chlor- $\alpha$ -[4-[2-diethylamino)ethoxy]phenyl]- $\alpha$ -(4-methylphenyl)benzenethanol]) bewirken. Es löst

eine Abnahme der Cholesterinkonzentration und eine Akkumulation von Desmosterol in maternalem Serum und in embryonalem Gewebe aus. Die Behandlung mit Triparanol an den ersten Tagen der Trächtigkeit ist hoch teratogen und führt zu charakteristischen Veränderungen wie Holoprosencephalie [135].

Auch für die  $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Isomerase sind mehrere Inhibitoren bekannt. Zu diesen Hemmstoffen gehören Tamoxifen (ein chemotherapeutisches Mittel, das für die Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird), U18666A (3 $\beta$ -[2-Diethylamino]-ethoxy]androst-5-en-17-on) und AY 9944 [27].

#### **3.8.2. Erkenntnisse aus den Untersuchungen mit den Inhibitoren Pravastatin und BM 15766**

Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Inhibitoren Pravastatin und BM 15766 sollte in Zellkultur überprüft werden, ob sich durch diese Inhibitoren Änderungen in der Apoptoseintensität auslösen lassen. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden mit den Resultaten aus den RNAi-Versuchen verglichen.

##### **Auswirkungen der Inhibition auf die Apoptoserate**

Unabhängig von der Zelllinie, in der diese Versuche durchgeführt wurden (HeLa-, HepG2- und MRC-5-Zellen), zeigten sich bei der Inhibition der Enzyme HMG-CoA-Reduktase und DHCR7 keinerlei Auswirkungen auf die Apoptosehäufigkeit der behandelten Zellen (Kap. 2.5.1). Die Kultivierung der Zellen auf verschiedenen Mangelmedien (0,1 % FBS und 10 % steroidfreies Serum) führte auch ohne Zugabe der Inhibitoren zu einer deutlich verminderten Viabilität im Vergleich zu identisch behandelten Zellen auf Vollmedium (Medium mit 10 % FBS). In Folge dessen war für diese Zellen auch eine geringere Apoptoseaktivität zu messen, die mit größter Wahrscheinlichkeit nur auf das allgemein verminderte Wachstum zurückzuführen war. Bei der Betrachtung der Zellen unter dem Lichtmikroskop konnte dementsprechend eine deutlich geringere Zelldichte festgestellt werden.

Da hier andere Enzyme des Cholesterinbiosynthese-Wegs als mit RNAi untersucht wurden, fällt ein direkter Vergleich der Untersuchungen schwer. Eine Erklärung für die gleichbleibende Apoptoseaktivität nach Behandlung mit diesen Inhibitoren könnte sein, dass die Enzyme nur zu einem kleinen Teil gehemmt werden, d. h. es könnten noch genügend Enzym vorhanden sein, um das proapoptotische Signal zu bilden.

##### **Auswirkungen der Inhibition auf das Expressionslevel einiger Gene der Cholesterinbiosynthese**

Bei der Untersuchung der Expressionslevel der Cholesterinbiosynthese-Gene *HMGCR*, *NSDHL*, *HSD17B7*, *EBP* und *DHCR7* konnte nach Zugabe von Pravastatin eine deut-

liche Zunahme der Expression bei Wachstum der Zellen auf Medium mit Mangelserum gemessen werden. Auch durch die Hemmung der DHCR7 wurde die Expression gesteigert, allerdings in geringerem Maße (Abb. 2.53).

Diese Versuche zeigten deutlich, dass es sich bei der Umsetzung durch die HMG-CoA Reduktase um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese handelt. Wird in Folge dieser Inhibition weniger Cholesterin synthetisiert, so kommt es zu einem Anstieg der Synthese. Da die Rückkopplung zur Steigerung der Neusynthese von Cholesterin über mehrere unterschiedliche Substanzen wie beispielsweise Mevalonat, 7-Dehydrocholesterin und Cholesterin erfolgt, fällt die Expressionssteigerung durch Inhibition der DHCR7 geringer aus als bei Inhibition der HMG-CoA-Reduktase.

Mit diesen Versuchen konnte allerdings erstmalig gezeigt werden, dass alle hier untersuchten Gene einschließlich der *HSD17B7*, die erst vor kurzem als letztes Enzym der Cholesterinbiosynthese identifiziert wurde [111], als Synexpressionsgruppe fungieren.

#### **3.8.3. Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese - geeignete Mittel zur Ermittlung der Auswirkungen einer gestörten Synthese?**

In der vorliegenden Arbeit sollten in erster Linie Funktionsstörungen der Gene *NSDHL*, *HSD17B7* und *EBP* und deren Auswirkungen untersucht werden. Für die Hemmung von *NSDHL* und *HSD17B7* existieren bislang keine Inhibitoren. Die Suche nach geeigneten Substanzen oder gar die Synthese neuer Hemmstoffe war in dieser Arbeit nicht möglich, da diese Aufgabe ein eigenes Projekt darstellt und den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

Die Hemmung von *EBP* ist mit AY 9944 möglich. Allerdings blockiert AY 9944 hauptsächlich die  $\Delta^7$ -Dehydrocholesterin-Reduktase und wirkt nur in sehr hohen Konzentrationen auch auf die  $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -Reduktase. Zugleich wird in diesen hohen Inhibitorkonzentrationen die  $\Delta^{14}$ -Reduktase gehemmt [50]. Versuche mit AY 9944 würden also nie eine reine Inhibition von *EBP* zeigen, wie das bei *CDPX2*-Patienten der Fall ist. Mögliche Auswirkungen einer solchen Inhibition sind somit nicht auf die Störung eines Enzyms zurückzuführen, sondern stellen immer ein Ergebnis unterschiedlicher Ursachen dar. Tamoxifen, das ebenfalls die  $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -Reduktase hemmt, ist kommerziell nicht erhältlich und konnte deshalb ebenfalls nicht für die Untersuchung verwendet werden.

Die Verwendung von Statinen ist ebenfalls problematisch. Zum einen greifen sie nicht nur in die Cholesterinbiosynthese ein, sondern bewirken die Cholesterinreduktion auch auf anderen Wegen. Zudem inhibieren sie mit der HMG-CoA-Reduktase einen sehr frühen Schritt der Cholesterinbiosynthese, der auch noch in andere Synthesewege mündet. Somit ist auch beim Einsatz von Statinen eine differenzierte Untersuchung der defekten Cholesterinbiosynthese schwierig.

Problematisch bei der Untersuchung der Cholesterinbiosynthese mittels Inhibition einzel-

ner Syntheschritte war außerdem die Verfügbarkeit der Inhibitoren. Die meisten waren nicht kommerziell erhältlich. Als einziges stehen einige Statine zur Verfügung, da sie in der Medizin zur Behandlung von erhöhten Cholesterinwerten eingesetzt werden. Zum Zeitpunkt meiner Untersuchungen war zusätzlich BM 15766 verfügbar, AY 9944 war dagegen nicht erhältlich.

Inwieweit bei den Versuchen eine vollständige Hemmung der jeweiligen Enzyme stattfand, konnte nicht untersucht und gezeigt werden. Es wurden Versuche mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen durchgeführt, die in der Literatur beschrieben waren [35, 50]. Dabei zeigten sich keine differenzierten Auswirkungen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass eine vollständige Hemmung verursacht wurde. Dafür, dass die eingesetzten Konzentrationen an Pravastatin und BM 15766 auch tatsächlich eine Inhibition hervorgerufen haben, spricht auch die Tatsache, dass eine Änderung der Expressionslevel der blockierten Enzyme eintrat.

Die Verwendung dieser Hemmstoffe ermöglicht die Inhibition der Cholesterinbiosynthese auf einer anderen Ebene, als das bei der Inhibition mittels RNAi möglich ist. In dieser Arbeit wurden deshalb Versuche mit Pravastatin und BM 15766 durchgeführt, um die Auswirkungen in Zellkultur mit denen zu vergleichen, die durch die RNAi verursacht wurden. Unter den hier gewählten Bedingungen war dies jedoch nur bedingt der Fall.

### 3.9. Ausblick

In dieser Dissertation wurden unterschiedliche Ansätze zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Cholesterinbiosynthese, insbesondere bei Funktionsstörungen dieses Syntheseweges, und deren Auswirkungen verfolgt. Dazu wurden unterschiedliche Analyseverfahren eingesetzt.

Für eine weitere eingehende Untersuchung der Cholesterinbiosynthese scheint der Vergleich der bei Mutationen betroffenen Gewebe von Wildtyp-Embryonen zu männlichen und weiblichen *Td*-Embryonen weitere Erkenntnisse zu liefern. In diese Vergleichsuntersuchung sollten auch Mausmodelle anderer menschlicher, die Cholesterinbiosynthese betreffender Missbildungssyndrome einbezogen werden, wie beispielsweise die *Bare patches*-Mauslinie oder *Hsd17b7*-Knock-out-Mäuse.

Bisher konnte nur eine geringe Anzahl an Mäusen der *Td*-Linie untersucht werden. Die Zucht dieser Mäuse sollte unbedingt vorangetrieben und eventuell nocheinmal mehrere Embryotransfers durchgeführt werden. Nur so ist eine größere Anzahl an Entnahmen für die notwendigen Untersuchungen gewährleistet. Zunächst sollte das Auftreten der Apoptose in den verschiedenen Embryonalstadien im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern untersucht werden. Nur dann sind verlässliche Aussagen über eine eventuell veränderte Apop-

toseintensität möglich. Auch die Untersuchung der Embryonen mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung mit einer *Sonic Hedgehog*-Sonde könnte Erkenntnisse über Unterschiede dieser mutierten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen liefern. Zudem kann durch die Untersuchung der Expressionslevel weiterer für die Cholesterinhomeostase relevanter Gene wie beispielsweise *Capn10*, *Kcnj11* oder *Mc4r* eine neue Einsicht in die Regulation dieser Homeostase gewonnen werden. Ein Vergleich von Wildtyp-Mäusen und *Td*-Mäusen mittels DNA-Microarray-Analyse würde Hinweise auf die Regulation weiterer Gene erbringen.

Eine Weiterführung des Zellkulturansatzes scheint ebenfalls sehr viel versprechend. Hierbei sollten shRNA-Konstrukte für den Knock-down von *HMGCR* und *DHCR7* mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Dadurch erhält man zunächst Vergleichsdaten für die Hemmung der entsprechenden Enzyme mittels Inhibitoren. Mutationen in *DHCR7* führen zu SLOS, das sich teilweise von den Symptomen von CHILD und CDPX2 unterscheidet. Durch einen Vergleich der Auswirkungen des Knock-downs all dieser Gene sind neue Erkenntnisse zu erwarten.

Für die weiteren Untersuchungen empfiehlt sich die stabile Transfektion der shRNA-Konstrukte in Telomerase-immortalisierte Zellen. Auch sollte keine induzierbare Zelllinie verwendet werden, um die dadurch entstandenen Probleme zu umgehen. Besonders interessant scheinen hier embryonale Zellen zu sein, da an diesen auch Untersuchungen der für die Entwicklung maßgeblich beteiligten Genen durchgeführt werden können. Es gilt zu überprüfen, ob durch eine defekte Cholesterinbiosynthese die Wirkungen von Shh beeinträchtigt werden. Dazu sollten einige Shh-Zielgene wie *WNT* oder *PAX* mit Hilfe von quantitativen RealTime-PCR untersucht werden.

Einen weiteren aussichtsreichen Ansatz zur Untersuchung der Metabolite stellt die Analyse der enzymatischen Umsetzungen mittels GC/MS dar. Hierzu muss zunächst eine Methode zur Aufreinigung der Zellen gefunden werden, die es erlaubt, auch Substratmengen im  $\mu\text{M}$ -Bereich zu messen. Gleichzeitig sollten Substrate, die für die Messung der Umsetzungen durch NSDHL und EBP benötigt werden, synthetisiert werden. Zudem könnte der Umsatz von Zymosteron zu Zymosterol auch mittels UV/VIS-Spektroskopie über den Umsatz des Cofaktors gemessen werden. Dabei wäre ein Vergleich zwischen dem intakten Protein und einem mutierten Protein möglich.

Diese und weitere Ansätze können zur Aufklärung der durch Funktionsstörungen der Cholesterinbiosynthese hervorgerufenen humanen Missbildungssyndrome beitragen.





## 4. Methoden

### 4.1. Molekularbiologische Methoden mit DNA

#### 4.1.1. Präparation von Plasmid-DNA

Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in Selektivmedium inkubiert. Je nach gewünschter DNA-Menge wurden die Kulturen in 5 (Mini-Präp) oder 50 ml (Midi-Präp) angesetzt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel), NucleoBond PC100 Kit (Macherey-Nagel) oder PureYield Plasmid Midi-Präp System (Promega) nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wurde anschließend in Wasser aufgenommen bzw. eluiert.

#### 4.1.2. Aufreinigung von dsDNA

##### Aufreinigung aus wässrigen Lösungen

Um DNA aus Lösungen, die Enzyme, dNTP und Salze aus Pufferlösungen enthalten, aufzureinigen, wurde das Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach den Angaben des Herstellers angewandt. Zur Elution wurden 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O zugegeben.

##### Aufreinigung aus Agarosegelen

Die DNA wurde in Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen unter UV-Licht sichtbar gemacht und aus dem TAE-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das die DNA enthaltende Gel wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und gemäß den Herstellerangaben mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

- **50 x TAE**
  - 2 M Tris
  - 1 M Essigsäure
  - 0,1 M EDTA
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 4.1.3. Fällen von DNA

Zur Aufkonzentrierung von DNA aus stark verdünnten Lösungen kann diese gefällt werden. Dazu wurde der DNA-Lösung ein Zehntel Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (absolut) zugegeben. Diese Mischung wurde für mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet 10 min mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen, das Pellet getrocknet und in einem entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 4.1.4. Messung von DNA-Konzentrationen und Qualitätsabschätzung

#### Auftrennung und Betrachtung mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Für die qualitative Bestimmung von DNA wurden die DNA-Lösungen mittels der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und betrachtet. Unterschiedlich konzentrierte Agarose in 1 x TBE wurde für die optimale Analyse, entsprechend der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente, verwendet: 0,5 % (w/v) für dsDNA  $\geq$  5 kb, 1 % (w/v) für dsDNA  $\sim$  2 - 5 kb, 2 % (w/v) für dsDNA  $\leq$  0,5 kb. Für die Analyse wurde 6 x Loading Dye zur DNA-Lösung gegeben, gemischt und auf ein Gel mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid (Biomol) aufgetragen. Die DNA wurde in einem konstanten elektrischen Feld von 80 - 160 V (je nach Gelgröße und Agarosekonzentration) aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators ( $\lambda=254$  nm; BioVision Gel-Dokumentationssystem; PeqLab) sichtbar gemacht und mit Hilfe der angeschlossenen Kamera dokumentiert.

Durch die Zugabe von 6 x Loading Dye zu den Proben konnte der Gellauf während der Elektrophorese beobachtet und entsprechend gestoppt werden. Die Färbelösungen enthalten Bromphenolblau und Xylene cyanol FF und verhalten sich auf einem 0,8%igem Agarosegel wie dsDNA-Fragmente mit 0,3 und 4 kb Größe.

- **10 x TBE**

- 108 g Tris
- 55 g Borsäure
- 9,3 g EDTA
- ad 1 l H<sub>2</sub>O

- **6 x Loading Dye**

- 15 % Ficoll 400 (Pharmacia)
- 0,25 % Bromphenolblau
- 0,25 % Xylene cyanol FF

### Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Innerhalb einer Agarosegel-Matrix ist die Laufgeschwindigkeit von linearen dsDNA-Fragmenten umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts. Deshalb ist es möglich, die Länge von DNA-Fragmenten unbekannter Größe im Vergleich zu den  $R_f$ -Werten von Längen standardisierter Fragmente abzuschätzen. Aus diesem Grund wurde bei jedem Gellauf ein DNA-Standard mit aufgetragen. In dieser Arbeit wurden dazu je nach erwarteter Fragmentgröße die Marker pUC Mix (Marker 8),  $\lambda$ DNA/EcoRI + HindIII (Marker 3) bzw. O'GeneRuler 100 bp DNA Ladder (alle Fermentas) verwendet.

### Bestimmung der DNA-Konzentration

Die dsDNA-Konzentrationen wurden durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (DU530; Beckmann) bestimmt. Multiplikation des gemessenen Wertes mit 50 (dsDNA-Konzentration bei  $OD_{260} = 1$ ) und dem Verdünnungsfaktor  $f$  ergibt die Konzentration der Stammlösung in  $\mu\text{g/ml}$ .

$$c_{dsDNA} = OD_{260} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot f$$

Der Quotient der  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  gibt einen Hinweis auf den Reinheitsgrad der DNA und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

### 4.1.5. Klonierungsstrategien

#### TOPO-TA Klonierung

Für die direkte Klonierung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen ohne vorherige Aufreinigung wurde der TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Die im Elongationsschritt der PCR durch die Taq-Polymerase produzierten A-Überhänge wurden dabei an die T-Überhänge des jeweiligen Vektors ligiert (TA-Klonierung). Die Ligationseffizienz wird dabei durch die Topoisomerase erhöht, die an der Klonierungsstelle des Vektors verankert ist (TOPO-Klonierung). Nach der Amplifikation der DNA mittels PCR wurden  $4 \mu\text{l}$  des Reaktionsmixes in die Ligationreaktion mit den Vektoren pCRII, pCR2.1 oder pENTR/U6 eingesetzt. Anschließend wurde der Ansatz, wie im Herstellerprotokoll beschrieben, in chemokompetente TOP10 Zellen transformiert.

#### Klonierung über Restriktionsstellen

Für viele Anwendungen wurden die DNA-Fragmente über Restriktionsschnittstellen in die unterschiedlichen Vektoren kloniert. Der Verdau von DNA-Fragmenten und dem Vektor

mit Restriktionsendonukleasen führt zu komplementären Enden, die in eine Ligation eingesetzt werden können. Im Unterschied zur TA-Klonierung erlaubt die Verwendung von zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen die zielgerichtete Orientierung des Inserts in den Vektor.

#### Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die Klonierung oder auch für die Analyse von Plasmiden wurden DNA-Fragmente und Vektoren mit speziellen Restriktionsendonukleasen verdaut. Dabei wurden 1 - 10  $\mu\text{g}$  DNA in einem 20 - 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz, der die entsprechend konzentrierten Puffer und wenn nötig BSA enthielt, mit 5 - 20 U des Enzyms für 2 - 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde wenn möglich durch Hitzeinaktivierung gestoppt. Optional wurde der Verdau aufgereinigt.

#### Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines linearisierten Vektors mit dem gewünschten Insert wurde durch das Enzym T4 DNA Ligase (Fermentas) katalysiert. Für gewöhnlich wurden 100 ng Vektor-DNA mit der dreifachen molaren Menge an Insert-DNA und 2,5 U T4 DNA Ligase in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  gemischt. Die Reaktion wurden 2 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

#### 4.1.6. Generierung von dsOligos

Um dsOligos für die TOPO-Klonierung in pENTR/U6 und pENTR/H1/TO zu generieren wurde die Reaktion entsprechend Tabelle 4.1 bei RT angesetzt.

**Tabelle 4.1: Pipettierschema der Annealing Reaktion**

<b>Reagenz</b>	<b>eingesetztes Volumen</b>
Top Strand DNA Oligo (200 $\mu\text{M}$ )	5 $\mu\text{l}$
Bottom Strand DNA Oligo (200 $\mu\text{M}$ )	5 $\mu\text{l}$
10 x Oligo Annealing Puffer	2 $\mu\text{l}$
DNase/RNase freies H <sub>2</sub> O	8 $\mu\text{l}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 <math>\mu\text{l}</math></b>

Der Reaktionsansatz wurde für 4 min bei 95 °C inkubiert und anschließend für 5 - 10 min auf RT abgekühlt. In diesem Zeitraum wurden die Oligos hybridisiert. Nach kurzem Abzentrifugieren erfolgten zwei Verdünnungsschritte. Im ersten Schritt wurde 1  $\mu\text{l}$  der 50  $\mu\text{M}$  dsOligos in 99  $\mu\text{l}$  DNase/RNase freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurde 1  $\mu\text{l}$

der so erhaltenen 500 nM dsOligos mit 10  $\mu$ l 10 x Oligo Annealing Buffer und 89  $\mu$ l DNase/RNase freiem H<sub>2</sub>O versetzt. Die erhaltenen 5 nM dsOligos wurden zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.

#### 4.1.7. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten aus cDNA, Plasmid-DNA oder genomischer DNA wurden PCRs durchgeführt. Dazu wurden die in Tabelle 4.2 aufgeführten Ansätze verwendet.

Tabelle 4.2: PCR Reaktionsansatz

Reagenz	Taq	Pfu	Pfx	Herculase	KOD
10 x PCR-Puffer	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10 x Enhancer	-	-	5 $\mu$ l	-	-
2 mM dNTPs	2 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	2 $\mu$ l
50 mM MgSO <sub>4</sub>	-	-	1 $\mu$ l	-	-
Primer forward (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
Primer reverse (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
DNA Template	50 ng	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
DNA-Polymerase	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0,8 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
ad H <sub>2</sub> O	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet. Für Standard-PCRs wurde die hauseigene Taq-Polymerase eingesetzt. Bei schwer amplifizierbaren Templates und für möglichst fehlerfreie Amplifikation wurde entweder Herculase Hotstart DNA Polymerase (Stratagene), PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene), Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) oder KOD HIFI DNA Polymerase (Novagen) angewandt.

#### 4.1.8. DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden auf dem ABI PRISM 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Sequenzier-PCR wurde der BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben angewandt. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem Dye Ex 2.0 Spin Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll.

Die Sequenzierungen der shRNA-Vektoren wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

#### 4.1.9. Isolation genomischer DNA zur Genotypisierung

##### Phenol-Chloroform-Extraktion

Von drei bis sechs Wochen alten Mäusen wurden die Schwanzspitzen geschnitten. Diese wurden zusammen mit je 0,7 ml Tail-Puffer mit Proteinase K (Verhältnis 40 : 1) in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und über Nacht bei 55 °C schüttelnd (1200 rpm) inkubiert. Nach Zugabe von 0,7 ml Roti-Phenol/Chloroform wurden die Proben 1 h leicht geschüttelt und 10 min bei 4 °C und 7000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, nochmals 0,7 ml Roti-Phenol/Chloroform zugegeben und 30 min leicht geschüttelt. Die Proben wurden erneut 10 min bei 4 °C und 7000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde wiederum in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 0,7 ml Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24 : 1) zugegeben, 30 min unter Schütteln inkubiert und 10 min bei 4 °C und 7000 rpm zentrifugiert. Zur oberen Phase wurden 0,5 ml Isopropanol zugegeben und die Mischung leicht geschwenkt bis DNA ausfiel. Die Proben wurden 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden 2 mal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend ca. 30 min getrocknet. Die Pellets wurden über Nacht in 100 µl 0,5 x TE gelöst.

- **Tail-Puffer**

- 50 mM Tris, pH 8,0
  - 50 mM EDTA
  - 100 mM NaCl
  - 0,5 % SDS

- **TE-Puffer, pH 8,0**

- 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
  - 1mM EDTA

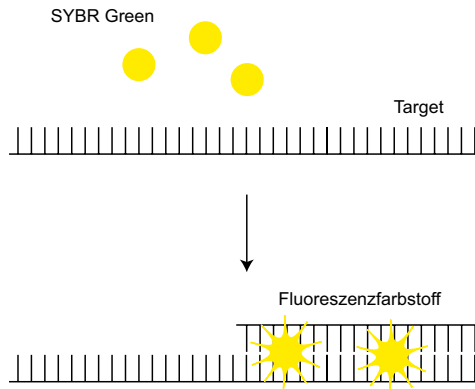
##### Wizard SV Genomic DNA Purification System

In meiner Doktorarbeit wurde zur Isolation genomischer DNA alternativ das Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) verwendet. Dieser Kit wurde nach Herstellerangaben nach der Spin-Methode durchgeführt. Die DNA wurde mit 200 µl H<sub>2</sub>O von den Säulen eluiert.

#### 4.1.10. Quantitative RealTime-PCR

Die quantitative RealTime-PCR kombiniert die große Sensitivität von PCR-basierten Methoden mit einer sehr großen Genauigkeit, da die Messungen während des gesamten Am-

plifizierungsprozesses erfolgen. Für diese Versuche wurde die Detektion mittels des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I gewählt. Dabei handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert. Der so entstandene DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 480 nm und emittiert grünes Licht bei 520 nm (Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1: SYBR Green I.** Liegt SYBR Green I frei in Lösung vor, so strahlt es keine Fluoreszenz aus. Sobald SYBR Green I in die doppelsträngige DNA eingelagert wird, fluoresziert es (Absorption bei 480 nm und Emission bei 520 nm).

### Amplifizierungsprotokolle

Die Amplifizierung des Targetgens und der endogenen Kontrolle erfolgten simultan in unterschiedlichen Reaktionen. Deshalb musste die PCR unter standardisierten Bedingungen ablaufen (siehe Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: Amplifizierungsprotokoll für den ABI Prism 9700HT**

Prozess	Temperatur	Zeit [min]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Hotstart Taq	95°C	10:00	1
Denaturierung	95°C	0:15	
Annealing und Amplifizierung	60°C	0:15	40
Denaturierung	95°C	0:15	1
Schmelzkurve	95°C	0:15	
	60°C	0:15	
	95°C	0:15	1

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden mit dem 2-fach konzentrierten iTaq SYBR Green Supermix with ROX (BioRad) angesetzt (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4: Reaktionsansatz für die quantitative RealTime-PCR**

Reagenz	eingesetztes Volumen
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	10 $\mu$ l
Primermix (forward und reverse je 5 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l
<b>Endvolumen</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

#### Primerselektion und Testen der Primer

Um vergleichbare Amplifizierungseffizienzen zu erhalten wurden die unterschiedlichen Primer gemäß den standardisierten PCR-Bedingungen ausgewählt. Dazu wurde das Programm Primer3, das frei im Internet zugänglich ist, verwendet. Die Primer wurden nach den in Tabelle 1.5 angegebenen Kriterien ausgewählt.

**Tabelle 4.5: Parameter für die Primerauswahl mit Primer3**

Parameter	Auswahlbereich
Target	X, 20 <sup>a</sup>
Produktgröße	120 - 250 bp
Primerlänge	19 - 24 bp
Primer T <sub>m</sub>	58 - 61 °C
GC-Gehalt	45 - 56 %

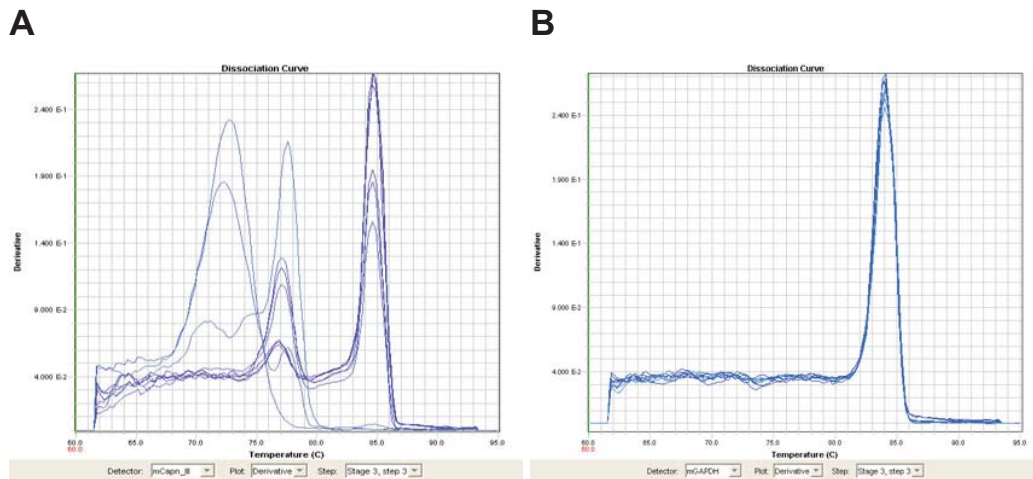
<sup>a</sup>X kennzeichnet eine Exon-Intron Grenze; jeweils 10 bp davor und dahinter sind in das Amplifizierungsprodukt mit einbezogen

Alle Primerpaare wurden vor der eigentlichen qPCR-Analyse getestet. Dazu wurden Verdünnungsreihen der entsprechenden cDNA über 3 bis 4 Größenordnungen verwendet, um die Spezifität und Linearität der Reaktion zu testen und die Amplifizierungseffizienz zu ermitteln.

Um die Spezifität zu beurteilen wurden die Schmelzkurven eines Amplifizierungsproduktes der qRT-PCR in unterschiedlichen Verdünnungen ausgewertet. Die Spitzen der Schmelzkurven sollten einen einzelnen Peak ergeben mit einem Maximum, das einen klar erkennbaren Schmelzpunkt definiert. Ausbuchtungen oder Shifts in der Schmelztemperatur weisen



auf unerwünschte Nebenprodukte hin (Abb. 4.2). Solche Primer wurden verworfen.



**Abbildung 4.2: Schmelzkurven.** Die qRT-PCR erfolgte jeweils mit einer über drei Größenordnungen verdünnten cDNA. In **A** sind die Schmelzkurven für ein Primerpaar für die Amplifikation von *Capn10* gezeigt. Diese Primer lieferten kein einheitliches Produkt. In **B** wurde *Gapdh* amplifiziert. Alle cDNA-Verdünnungen lieferten die gleiche Schmelzkurve.

Trägt man in einem Graph den Logarithmus der cDNA-Konzentration gegen die  $C_t$ -Werte auf, so sollte man eine Gerade mit einer negativen Steigung erhalten (Abb. 4.3). Von dieser Steigung kann die Effizienz der PCR mit Hilfe folgender Formel berechnet werden:

$$E = 10^{\frac{1}{\text{Steigung}}}$$

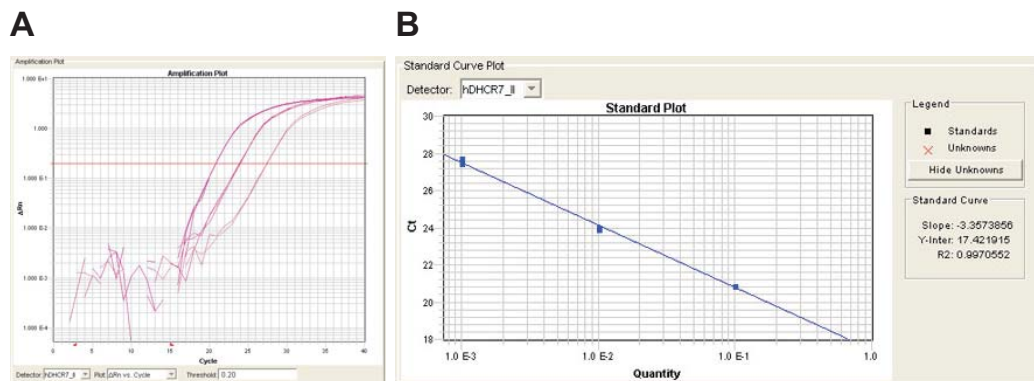
Für eine Effizienz zwischen 1,9 und 2,1 muss die Steigung im Bereich zwischen -3,10 und -3,59 liegen. Die relative Quantifizierung wurde mit und ohne Effektivitätskorrektur getestet. Lag die Effizienz nahe 2 und war die Probenkonzentration konstant, so waren die Unterschiede zwischen beiden Methoden nur sehr gering.

## 4.2. Arbeiten mit RNA

### 4.2.1. Isolation von total-RNA

#### Isolation aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation von gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen aus T75-Flaschen wurden diese trypsiniert und anschließend das Pellet mit PBS gewaschen. Dieses Zellpellet wurde in 3 ml Trizol (Gibco; bei kleineren Zellkulturflaschen entsprechend weniger) resuspendiert



**Abbildung 4.3: Amplifizierungskurve und Standardkurve.** In beiden Fällen ist die Amplifizierung von *DHCR7* dargestellt. Die Amplifizierungskurve (**A**) zeigt deutlich die drei unterschiedlichen Verdünnungen der cDNA. In **B** wurden die  $C_t$ -Werte gegen den Logarithmus der einzelnen Konzentrationen aufgetragen. Aus der Steigung dieser Geraden lässt sich die Effizienz der PCR berechnen. In diesem Fall liegt die Effizienz der PCR bei 1,985.

und 600  $\mu$ l Chloroform zugegeben. Die Proben wurden für ca. 15 sec gevortext, 3 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm (Rotor JA20.1; Beckmann) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 ml Falcon-Gefäß überführt und während des Vortexens 0,53 Volumenprozent Ethanol tröpfchenweise zugegeben. Die Lösung wurde anschließend auf die RNeasy Midi Säule überführt und die RNA-Isolation mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

Alternativ wurde die gesamt-RNA aus Zellkultur (T25-Flaschen) mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega) isoliert. Dazu wurden 175  $\mu$ l SV RNA Lysis Buffer direkt auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben und diese dann in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die RNA mit 40  $\mu$ l nukleasfreiem H<sub>2</sub>O von den Säulen eluiert.

### Isolation aus tierischem Gewebe

Um RNA aus tierischem Gewebe zu isolieren wurde dieses direkt nach der Präparation in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Präparation wurde das Gewebe in eine bei -80 °C vorgekühlte Teflonkapseln mit Stahlkugel gegeben und anschließend 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Die Kapseln wurden in den Dismembrator DIAX 900 (Heidolph) eingespannt und bei 2000 rpm 2 mal je 45 s geschüttelt. Unter dem Abzug wurden die Kapseln leicht geklopft, um das pulverisierte Gewebe auf eine Seite zu bekommen und die Deckel vorsichtig aufgeschraubt. In jede Hälfte der Kapsel wurden 2 ml Trizol pipettiert und dieses dann in 14 ml Falkons mit Rundboden überführt. Die

Kapseln wurden mit 1 ml Trizol nachgereinigt. Die Reaktionsgefäße wurden solange gevortext, bis man eine homogene Gewebelösung erhielt. Anschließend wurde 1 ml Chloroform zugegeben und kurz gevortext. Es folgte eine 3 minütige Inkubation bei RT. Die Proben wurden dann für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 0,53 Volumenprozent Ethanol tröpfchenweise unter vortexen zugegeben und die Lösung anschließend auf eine RNeasy Midi Säule überführt. Die RNA-Isolation wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem RNeasy Midi Kit durchgeführt.

### **Fällung von RNA**

Bei stark verdünnter oder ungenügend reiner RNA kann, ähnlich wie bei DNA, die Konzentration und die Reinheit durch Fällung erhöht werden. Dies erfolgt auf gleiche Weise wie bei DNA (Kap. 4.1.3).

### **Aufreinigung von RNA aus wässrigen Lösungen**

RNA-Sonden für *whole mount in situ* Hybridisierungen wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die RNA konnte bei -80 °C für ca. 8 Wochen gelagert werden.

### **4.2.2. Handhabung und Messung**

Nach der RNA-Präparation wurden 20 - 40 U Ribonuclease Inhibitor (Fermentas) zugegeben und die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

### **Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Bestimmung der erhaltenen RNA-Konzentration erfolgte analog zur Bestimmung der DNA-Konzentration (Kap. 4.1.4). Die Berechnung der Konzentration erfolgte gemäß der Formel:

$$c_{ssRNA} = OD_{260} \cdot 40 \mu g/ml \cdot f$$

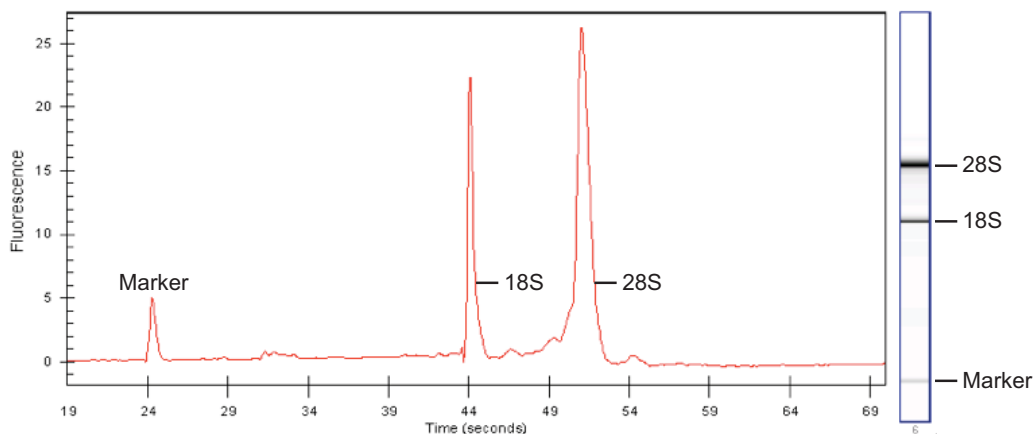
### **Bestimmung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese**

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurde diese auf einem 1%igem Agarosegel in TBE-Puffer (Kap. 4.1.4) aufgetrennt. Obwohl für die RNA-Auftrennung normalerweise denaturierende Formaldehydgele mit MOPS-Puffer verwendet werden, reicht die Auftrennung über Agarosegele in TBE-Puffer für die Qualitätsbestimmung aus.

### Bestimmung der RNA-Integrität mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer

Für verschiedene Versuche, z. B. für die quantitative RealTime-PCR, war die Qualitätsbestimmung mittels Gelelektrophorese nicht ausreichend. In diesen Fällen wurde die RNA-Qualität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) bestimmt. Dazu wurde der RNA 6000 Nano Assay und der RNA LabChip Kit (beides Agilent Technologies) verwendet.

Bei dieser Methode, bei der eine elektrophoretische Trennung auf einem Chip erfolgt, wurden die RNA-Proben aufgetrennt und anschließend mittels laserinduzierter Fluoreszenzdetektion gemessen. Die Bioanalyzer-Software generiert ein Elektropherogramm, eine Gel-ähnliche Abbildung (Abb. 4.4) und zeigt Werte wie die Konzentration und das Verhältnis von 18S zu 28S RNA. Den Grad der Degradation der RNA kann man dabei in der Abnahme der 18S und 28S ribosomalen Banden-Verhältnissen und der Zunahme im Grundliniensignal der beiden ribosomalen Peaks und dem niedrigeren Marker erkennen. Die Vorbereitung der RNA-Proben und die Durchführung der Messung erfolgte nach Herstellerangaben.



**Abbildung 4.4: Elektropherogramm und Gelbild der Bioanalyzer-Software.** Das Elektropherogramm der gesamt-RNA (hier aus Mausleber isoliert) zeigt zwei ribosomale Peaks (18S und 28S RNA) und einen Marker-Peak. Hierbei handelt es sich um eine sehr reine gesamt-RNA, die noch keine Degradierung aufweist.

#### 4.2.3. Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) oder der M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Je nach Anwendung

erfolgte die Umschreibung mit Oligo (dT)<sub>15</sub> oder Random Hexamer Primern.

### 4.2.4. RNA-Synthese durch in vitro Transkription und Labeling mit Digoxigenin

Die Plasmide mit den Sondentemplates wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und mit dem Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) aufgereinigt. Anschließend wurden die RNA-Sonden mit T7-Polymerase (MBI) oder SP6-Polymerase (MBI) in Anwesenheit von DIG RNA Labeling Mix (Roche) und RNase Inhibitor (Fermentas) 2 h bei 37 °C synthetisiert. Das linearisierte DNA-Template wurde durch Zugabe von 10 U RNase-freier DNase I (Promega) abgebaut. Zur Überprüfung der Synthese wurde die RNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Die RNA-Sonde wurde schließlich mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt und bei -80 °C gelagert. Vor dem Einsatz zur Hybridisierung wurden die Sonden 3 min bei 80 °C denaturiert.

## 4.3. Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

### 4.3.1. Kultivierung unterschiedlicher Zelllinien

Für die einzelnen Versuche wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet. Alle verwendeten Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % sowie einer Luftfeuchtigkeit von 100 % kultiviert.

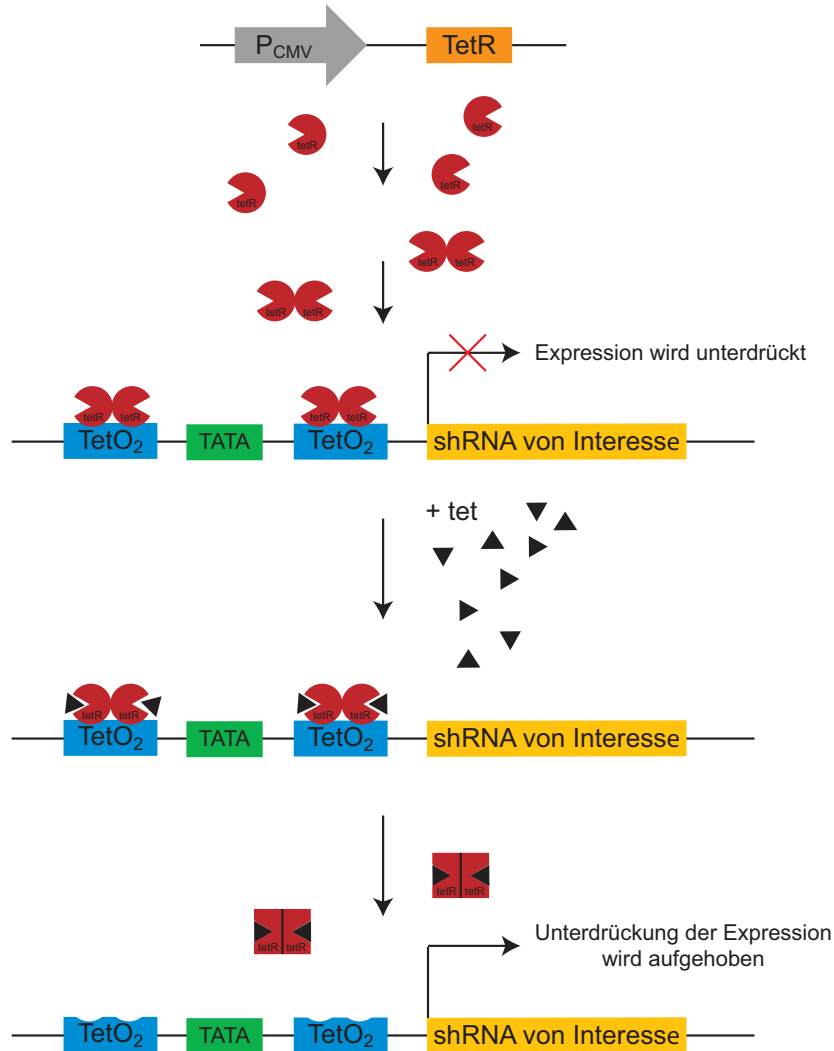
#### Kultivierung von HeLa-Zellen

Bei HeLa handelt es sich um eine gut etablierte Zelllinie, die einem Cervixkarzinom entstammt. HeLa-Zellen zeichnen sich durch ihre gute Anhaftung und gute Transfizierbarkeit aus. Sie wurden in Modified Eagle Medium (MEM; Gibco), versetzt mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco), 2 mM L-glutamine (Gibco), jeweils 100 U/ml Penicillin und Streptomycin (Gibco) kultiviert.

#### Kultivierung von HeLa T-REx-Zellen

Bei der HeLa T-REx-Zelllinie handelt es sich um eine modifizierte Form der HeLa-Zellen. Dabei ermöglicht die T-REx Technologie die Tetrazyklin-regulierte Expression eines Gens von Interesse. Dazu werden regulatorischen Elemente aus dem von *E. coli* Tn10 codierten Tetrazyklin (Tet) Resistenz-Operon [72, 73] verwendet (Abb. 4.5). HeLa T-REx-Zellen exprimieren den Tet-Repressor vom pcDNA6/TR-Plasmid.

Die Zellen wurden in Modified Eagle Medium (MEM) und Zusatz von 10 % tetrazyklinfreiem FBS (Biochrom AG), je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin und 5 µg/ml Blastocidin (Invitrogen) kultiviert.



**Abbildung 4.5: Regulation über Tetrazyklin.** pcDNA6/TR wurde stabil in HeLa-Zellen transfiziert. Die Selektion für eine Zelllinie, die stabil den Tet-Repressor (TetR) exprimiert, erfolgt mit Hilfe von Blasticidin. Der pENTR/H1/TO-Vektor mit dem gewünschten shRNA-Konstrukt wurde in diese Zellen transfiziert. Nach der Transfektion binden TetR-Homodimere an den Tet-Operator 2 (TetO<sub>2</sub> im pENTR/h1/TO-Konstrukt) und unterdrücken die Transkription der shRNA von Interesse. Gibt man Tetrazyklin zu, so bindet dieses an die TetR-Homodimere. Diese Bindung verursacht eine Konformationsänderung in TetR. Dadurch lösen sich diese Homodimere von der Tet-Operator-Sequenz und die Transkription der shRNA wird induziert.

### **Kultivierung von stabil transfizierten HeLa T-REx-Zellen**

In HeLa T-REx-Zellen wurde der Vektor pENTR/H1/TO (enthalten im BLOCK-iT Inducible H1 RNAi Entry Vector Kit; Invitrogen) mit unterschiedlichen Inserts stabil transfiziert. Als Selektionsantibiotikum wurde dem Medium Zeocin (Gibco) in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt.

### **Kultivierung von Hek293-Zellen**

Bei den Hek293-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus humanem embryonalen Nierengewebe (human embryonal kidney). Sie wurden in High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco), versetzt mit 10 % FBS, 2 mM-L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin, kultiviert.

### **Kultivierung von HepG2-Zellen**

HepG2-Zellen sind humane männliche hepatocarcinomische Zellen. Sie wurden in High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), versetzt mit 10 % FBS, 2 mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin und Streptomycin kultiviert.

### **Kultivierung von MRC-5-Zellen**

MRC-5-Zellen stammen aus gesundem Lungengewebe eines 14 Wochen alten männlichem Fötus. Sie wurden in Modified Eagle Medium (MEM; Biochrom AG) mit 10 % FBS (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Gibco) und jeweils 100 U/ml Penicillin und Streptomycin kultiviert.

#### **4.3.2. Inhibitorische Medienzusätze**

In einigen Versuchen wurde die Cholesterinbiosynthese mittels spezieller Inhibitoren gehemmt. Dazu wurden diese in unterschiedlichen Lösungsmitteln aufgenommen und für die einzelnen Versuche entsprechend verdünnt eingesetzt (Tab. 4.6).

**Tabelle 4.6: Inhibitoren der Cholesterinbiosynthese**

<b>Substanz</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BM 15766	DMSO	5 mM	Sigma Aldrich
Pravastatin	H <sub>2</sub> O	10 mg/ml	Sigma Aldrich

### 4.3.3. Allgemeine Methoden zur Zellkultur

#### Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden für 3 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 3 ml Medium resuspendiert und in eine 25 ml Zellkulturflasche mit Medium überführt. Dieser Vorgang wurde möglichst zügig durchgeführt, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO für aufgetaute Zellen schädlich ist.

#### Passagieren von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wachsen als Monolayer. Spätestens bei Erreichen der Konfluenz war es notwendig, die Zellen auf eine oder mehrere Zellkulturflaschen zu überführen (splitten). Dazu wurde zuerst das Medium abgenommen, die Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml (25 ml Zellkulturflasche) bzw. 2 ml (75 ml Zellkulturflasche) Trypsin/EDTA (Gibco) bei 37 °C abgelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen 2 min bei 1500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Verdünnung wurde je nach Wachstumsrate der jeweiligen Zelllinie und Anforderungen des Experiments gewählt und lag üblicherweise zwischen 1:2 und 1:20.

- **PBS**

- 10 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4

- 150 mM NaCl

#### Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden in einer 75 ml Zellkulturflasche bis zu einer maximalen Konfluenz von 90 % kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit 10 ml PBS wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin abgelöst (Inkubation je nach Zelllinie zwischen 3 und 10 min bei 37 °C). Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen, für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in 3 ml Einfriermedium (Medium mit 10 % DMSO) resuspendiert und auf zwei Kryoröhrchen (Nunc) aufgeteilt. Diese wurden in einem auf RT temperierten Einfrierkontainer (Cryo 1 °C Freezing Container; Nalgene) mit einer Abkühlrate von -1 °C pro min in einem -80 °C Gefrierschrank eingefroren. Für eine längere Lagerung wurden die Zellen dann in flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt.



### Zählen von Zellen

Zellen wurden für die Zählung mit Trypan Blue (Gibco) angefärbt. Dies ermöglichte die Bestimmung der Zellviabilität. Nur abgestorbene Zellen absorbieren diesen Farbstoff, vitale Zellen hingegen bleiben farblos. 50  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Trypan Blue versetzt und gut durchgemischt. Ein Tropfen davon wurde auf eine Neubauerzählkammer (Länge der Quadrate 1 mm, Höhe mit Deckglas 1  $\mu\text{m}$ ) gegeben. Auf diese Weise konnte die Anzahl der lebenden Zellen unter dem Mikroskop ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen in vier Quadranten ausgezählt und die Konzentration  $c$  in Zellen/ml der Zellsuspension wie folgt berechnet ( $\bar{x}$  ist das arithmetische Mittel der vier Quadrate):

$$c = \frac{\bar{x}}{0,1\text{mm}^3} \cdot 2 \cdot 1000 \frac{\text{mm}^3}{\text{ml}}$$

Der Faktor 2 entspricht dabei der Verdünnung mit Trypan Blue.

### 4.3.4. Transiente Transfektion

Transiente Transfektionen wurden je nach Anforderung des Experiments in unterschiedlichen Volumina durchgeführt.

Die Zellen wurden für gewöhnlich am Vortag auf das entsprechende Format gesplittet. Bei einer Konfluenz von ca. 30 - 40 % wurden die Zellen transfiziert.

Opti-MEM I (Gibco) ohne Zusätze wurde entweder in 96 well Kulturplatten oder in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Das Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche) wurde direkt in das Medium pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zugegeben und wiederum für 20 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die unterschiedlichen Zelllinien unterscheiden sich bezüglich der optimalen Transfektionsbedingungen. Zudem mussten je nach Maßstab der Transfektion andere Mengen verwendet werden, die bei den einzelnen Versuchen im Ergebnisteil angegeben wurden.

### 4.3.5. Färbung von Zellen

Für die genauere Untersuchung der stabil transfizierten HeLa T-REx-Zellen wurden diese gefärbt. Zudem wurden Zellen zur Funktionsprüfung unterschiedlicher Antikörper gefärbt. Zum Färben wurden die jeweiligen Zellen in 6 well Platten ausgesät, in die zuvor ein steriles Deckglas gelegt wurde.

### **Färbung der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums mit spezifischen Farbstoffen**

Für die Färbung der Mitochondrien und des ER wurden fluoreszenzgekoppelte Tracker verwendet. Diese Farbstoffe werden aktiv in die jeweiligen subzellulären Kompartimente der lebenden Zellen transportiert. Dafür wurden diese Farbstoffe in den jeweiligen Kulturmedien verdünnt (MitoTracker Orange CMTMRos: final 300 nM, ER-Tracker Blue-White DPX: final 600 nM; beide Molecular Probes) und auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 30 min Inkubation bei 37 °C. Anschließend wurde das Medium wieder abgenommen und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen.

### **Fixierung**

Um die Zellen zu fixieren wurde jeweils 1 ml 3,7 %iger Formaldehyd in PBS auf diese gegeben und bei 37 °C für 10–15 min inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen.

### **Permeabilisierung**

Für die Antikörperfärbungen und die Färbung mit Phalloidin war es notwendig die Zellen zu permeabilisieren. Dazu gab man 1 ml 0,5 % Triton-X (Merck) in PBS in jedes well und inkubierte die Zellen bei RT für 10 min. Die Zellen wurden anschließend 2 mal mit PBS gewaschen.

### **Immuncytochemie**

Für die Antikörperfärbungen wurden die permeabilisierten Zellen zuerst mit 5 % FBS in PBS bei RT für 30 min bis 1 h inkubiert. Der erste Antikörper (Kap. 5.1.4) wurde 1:1000 in Blocking-Lösung verdünnt. Die Zellen wurden 1 h mit der Antikörperlösung bei RT inkubiert und die Zellen dann 3 mal mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper (AlexaFluor 488 goat anti rabbit oder AlexaFluor 568 goat anti rabbit; beide Molecular Probes) wurde 1:2000 in Blocking-Lösung verdünnt und ebenfalls 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 mal mit PBS gewaschen.

### **Färbung des Cytoskeletts**

Die Färbung des Cytoskeletts erfolgte durch die Färbung des F-Actins mit Phalloidin. Phalloidin, gelabelt mit AlexaFluor 488 (grün) oder AlexaFluor 568 (rot; beide Invitrogen), wurde 1:50 in 5 % FBS/PBS verdünnt und 30 min bei RT im Dunkeln auf den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden 2 mal mit PBS gewaschen.

### **Färbung des Zellkerns**

Die Färbung des Zellkerns wurde entweder mit DAPI (4',6-Diamindino-2-phenylindole, Dihydrochlorid) oder Hoechst 33342 (beide Invitrogen) durchgeführt. DAPI wurde in einer finalen Konzentration von 300 nM in H<sub>2</sub>O für 1–2 min auf die Zellen gegeben. Die Färbung mit Hoechst 33342 wurde in einer 1:5000 Verdünnung in PBS für 1–5 min durchgeführt.

### **Einbettung der gefärbten Zellen**

Die Zellen wurden nach der Färbung 3 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Super-Frost Plus Deckgläschen (Menzel Glaeser) mit Vectashield (Vectalabs), einem Fluoreszenzverstärker, eingebettet.

### **Detektion der Fluoreszenz und Dokumentation**

Die gefärbten Zellen wurden mit einem Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskop und den geeigneten Filtern betrachtet. Mit Hilfe der ISIS-Software (Metasystems) konnte über die angeschlossene Kamera Bilder gemacht werden.

## **4.3.6. Zellkultur-Assays**

### **BLOCK-iT RNAi Target Screening System**

Das BLOCK-iT RNAi Target Screening System (Invitrogen) dient zur Bestimmung der Effektivität unterschiedlicher RNAi-Moleküle. Das zu untersuchende Target-Gen wurde in den lacZ-basierten Reporter-Vektor pSCREEN-iT/lacZ-DEST (Invitrogen) kloniert. Dieser wurde anschließend zusammen mit dem zu testenden RNAi-Molekül in Zellen cotransfiziert. Dabei kam es zur Expression eines lacZ-Fusionstranskripts, das über die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase mit dem FluoReporter lacZ/Galactosidase Quantifitation Kit (Invitrogen) gemessen wurde. Das Substrat 3-Carboxy-Umbellideryl- $\beta$ -Galactopyranoside (CUG) diente zur Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Die Messungen wurden nach Angaben des Herstellers im Safire<sup>2</sup> Microplate Reader (Tecan) durchgeführt.

### **Dual-Luciferase Reporter Assay**

Der Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) ermöglicht die gleichzeitige Expression und Messung zweier individueller Reporterenzyme innerhalb eines Systems. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser zur Transfektionsoptimierung und zur Bestimmung der Knock-down Effizienz unterschiedlicher shRNA-Konstrukte verwendet.

Für die Untersuchungen der Knock-down Effizienzen wurden die Sequenzen der runterzu-regulierenden Gene in den psiCHECK-2 Vektor (Promega) kloniert. Die *multiple cloning*

*region* befindet sich 3' zum synthetischen *Renilla* Gen und dem Translationsstopp-Codon. Nach der Klonierung wurde der Vektor in die Zellen transfiziert. Es wird eine Fusions-RNA des *Renilla*-Gens mit dem Gen von Interesse transkribiert. Gleichzeitig mit dem psiCHECK-2-Vektor wurden auch die shRNA-exprimierenden Vektoren transfiziert. Bindet die spezifische shRNA/siRNA an die Target-mRNA und startet den RNAi-Prozess, so wird die Fusions-RNA aus *Renilla* und dem Gen von Interesse geschnitten und schließlich abgebaut, so dass man ein abnehmendes *Renilla* Luciferase Signal erhält. Der psiCHECK-2-Vektor enthält eine zusätzliche Firefly Reporter Expressionskassette die als Transfektionsnormalisationsreporter dient.

**Detektion der Luciferaseaktivität** Die Transfektion für diese Versuche erfolgte meist im 12 well Format. Zur Detektion der Luciferaseaktivität wurde das Zellkulturmedium nach beendeter Inkubationszeit abgesaugt und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde in jedes well 200  $\mu$ l 1 x Passive Lysis Buffer gegeben und die Platte anschließend 15 min bei RT leicht geschüttelt. Nach erfolgter Lyse wurden aus jedem well 3 x 20  $\mu$ l in 3 wells einer weißen 96 well Platte überführt. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte mit dem GENiosPro (Tecan) nach dem in Abbildung 4.6 angegebenen Protokoll mit den im Kit enthaltenen Lösungen.

**Auswertung der Ergebnisse** Die Ergebnisse der Dual Luciferase Assays werden in „Relative Light Units“ (RLU) angegeben. Um diese zu erhalten dividiert man die erhaltenen Werte der *Renilla*-Luciferaseaktivität durch die Werte der Firefly-Luciferaseaktivität. Zur Verringerung der Fehler wurden die Mittelwerte der dreifachen Messungen und die Standardabweichungen bestimmt.

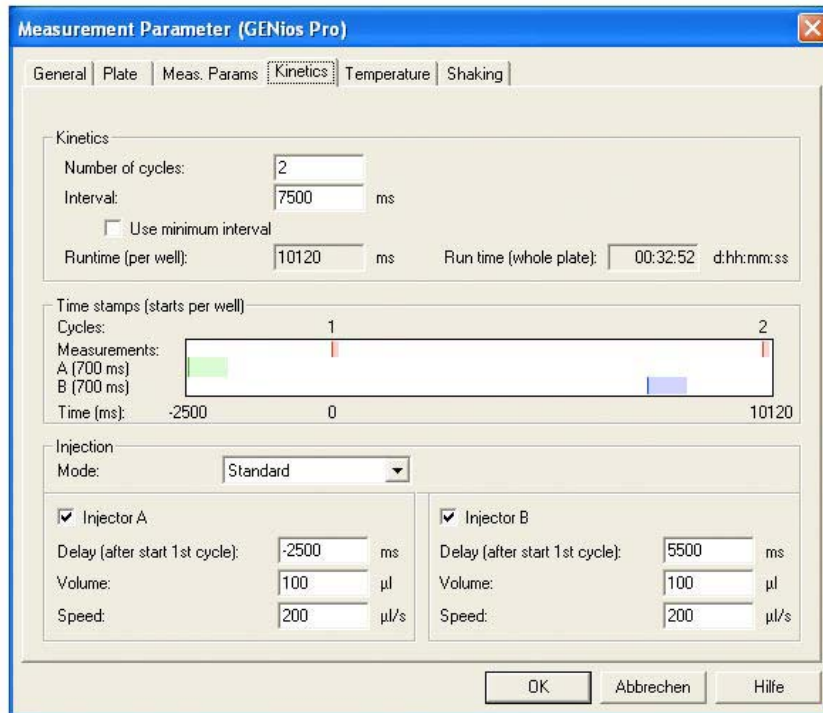
#### **Apoptose-Assay**

Um apoptotisches Verhalten in Zellkultur messen zu können wurde der Caspase-Glo 3/7-Assay (Promega) verwendet. Dabei handelt es sich um einen Lumineszenz Assay, der die Aktivität von Caspase 3 und Caspase 7 misst. Der Assay enthält ein prolumineszierendes Caspase 3/7 Substrat, nach dessen Spaltung ein Substrat für die Luciferase (Aminoluciferin) freigesetzt wird. Daher kommt es zu einer Luciferase-Reaktion und zur Produktion von Licht.

Der Assay ist auf eine Anwendung im 96 well Format ausgelegt. Da dies für einige Versuche nicht durchführbar war, wurde der Assay verändert und auf eine Anwendung im 12 well Format optimiert.

Zum Zeitpunkt der Messung wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in je 200  $\mu$ l 1 x Passive Lysis Buffer

## 4. Methoden



**Abbildung 4.6: Programm für die Messung der Luciferaseaktivität.** Der Firefly Luciferase Reporter Assay wurde durch die Zugabe von Luciferase Assay Reagent II (Injektor A) gestartet. Es erfolgte eine Messung. Die Quenchung der Firefly Luciferase Lumineszenz und die gleichzeitige Aktivierung der *Renilla* Luciferase wurden durch die Zugabe des Stop & Glo Reagent (Injektor B) zur Probe erreicht.

lysiert und 15 min bei RT geschüttelt. Aus jedem well wurden 3 x 20 µl in eine weiße 96 well Platte (Nunc) überführt. In jedes well wurden dann 20 µl Caspase-Glo 3/7 Reagent zugegeben, die Lösungen zum Mischen leicht geschwenkt und nach 10 min das Luciferasignal im GeniosPro (Tecan) mit Hilfe der XFlour4GeniosPro Software gemessen. Das Lumineszenz-Signal ist direkt proportional zur Menge der aktiven Caspase.

### Viabilitäts-Assay

Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) gemessen. Dieser basiert auf der Quantifizierung des in metabolisch aktiven Zellen vorhandenen ATP. Luciferin wird durch das Enzym Firefly Luciferase in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , ATP und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin umgewandelt. Die Menge an ATP wird als direkt proportional zu der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen angenommen. Dieser Assay ist auf eine Hochdurchsatz-Anwendung im 96 well Format ausgelegt. Für

die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde er auf eine Anwendung im 12 well Format optimiert.

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je well 200  $\mu$ l 1 x PLB zu den Zellen gegeben und diese zur Lyse bei RT unter schütteln 15 min inkubiert. Aus jedem well wurden 3 mal 20  $\mu$ l in eine weiße 96 well Platte (Nunc) überführt. Zu jedem well wurden 20  $\mu$ l CellTiter-Glo Reagent zugegeben, die Platte leicht geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im GENiosPro (Tecan).

### 4.4. Arbeiten mit Bakterien

#### 4.4.1. Nährmedien

Alle verwendeten Nährmedien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Festmedien wurde vor dem Autoklavieren Agar mit einer Konzentration von 1,5 % (w/v) zugesetzt. Temperaturempfindliche Zusätze wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

- **LB-Medium**

- 10 g NaCl
  - 10 g Bacto-Tryptone
  - 5 g Bacto-Hefeextrakt
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O (pH 7,4)

- **LB-Agar**

- LB-Medium
  - 7,5 g/l Agarose
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>

- **SOC-Medium**

- 2 g Trypton
  - 0,5 g Hefeextrakt
  - 0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O
  - 0,25 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O
  - 0,36 g Glukose
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O

#### 4.4.2. Inhibitorische und selektive Medienzusätze

Die verwendeten Hemmstoffe und Medienzusätze (Tabelle 4.7) wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien auf  $\sim 45\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Festmedien) oder direkt vor Inokulation (Flüssigmedien) zugesetzt.

Tabelle 4.7: Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Ampicillin	H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$

#### 4.4.3. Bakterien kultivieren

Das Überimpfen von *E. coli* auf Festmedien oder Flüssigmedien wurde mit einer ausgeglühten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze, ausgehend von Einzelkolonien auf Agarplatte oder von Glycerinkulturen, durchgeführt. Flüssigkulturen mit größeren Volumina als 30 ml wurden aus über Nacht gewachsenen Vorkulturen (5 ml) in einer Verdünnung von 1:100 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Brutschränken bzw. Rundschüttlern bei mindestens 200 rpm.

#### 4.4.4. Kurz- und Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen

Bakterienstämme können auf Agarplatten mehrere Monate bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Dazu wurden die Einzelkolonien einen Tag bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert, die Agarplatten anschließend mit Parafilm (American National Can, Chicago, USA) unwickelt und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für die Langzeitaufbewahrung wurden ausgehend von Flüssigkulturen Glycerinkulturen angelegt, die für mehrere Jahre bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  stabil sind. Diese Kulturen wurden im Verhältnis 1:1 mit 80%igem Glycerin in Nunc Cryo Tube<sup>TM</sup> Vials (Merck, Bruchsal) gemischt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.4.5. Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation

##### Herstellung elektrokompetenter Bakterien

10 ml Übernachtskultur von *E. coli* XL1-blue wurden mit 1 l LB-Medium verdünnt (1:100) und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  so lange inkubiert, bis sie eine OD<sub>600</sub> von 0,5–0,8 erreichten. Die Bakterienkultur wurde auf Eis abgekühlt und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 4500 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 l, 500 ml und 20 ml eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen, bevor es in 10 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert wurde. Davon wurden 50  $\mu\text{l}$  Aliquots

hergestellt, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert wurden.

#### **Elektroporation: Transformation elektrokompeterer *E. coli***

Für die Transformation in elektrokompeterer *E. coli* XL1-blue wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Plasmid-DNA oder Ligationsreaktion gemixt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine sterile Elektroporationsküvette (Biorad) überführt und ein Impuls von 200 Ω, 2,5 kV und 25 mF (Gene Pulser II; Biorad) gegeben. Direkt im Anschluss wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und die Bakterien in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert und schließlich auf LB-Agar ausplattiert.

#### **Herstellung chemokompeterer *E. coli***

250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> wurden mit 2,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5α oder JM107 (1:100) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4–0,6 bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf 4 °C abgekühlt und anschließend bei 4 °C und 4500 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem TFB1 resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 10 ml kaltem TFB2 resuspendiert. Nach einer 15–60 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

- **TFB1**

- 30 mM KAc
- 100 mM RbCl
- 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 50 mM MnCl<sub>2</sub>
- 10 % Glycerin
- mit KAc auf pH 5,8 einstellen und steril filtrieren

- **TFB2**

- 10 mM MOPS
- 75 mM CaCl<sub>2</sub>
- 10 mM RbCl
- 15 % Glycerin
- mit KOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren



### **Heat-shock Transformation: Transformation chemokompetenter Zellen**

2  $\mu$ l Plasmid-DNA oder Ligationsreaktion wurden mit 100  $\mu$ l aufgetauter chemisch kompetenter *E. coli* (DH5 $\alpha$ , JM107, TOP10) gemischt. Die Reaktion wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Bakterien mit 250  $\mu$ l SOC-Medium versetzt und bei 37 °C für 1 h unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsmix auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert.

## **4.5. Genexpressionsanalyse in Mäuseembryonen**

### **4.5.1. Präparation von Embryonen und Fixierung**

Für die Präparation wurden Mäuse der Linien C3HeB/FeJ, C57/b6J und *Tattered* verwendet. Für die *whole mount in situ* Hybridisierungs Experimente und für die Antikörper-Färbungen wurden die Embryonen (E9,0–E14,5) in 4 % PFA in DEPC-PBS über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen durch 25, 50 und 75 % Methanol in DEPC-PBS (jeweils mindestens 10 min bei 4 °C, abhängig von der Größe der Embryonen) dehydriert. Anschließend wurden die Embryonen bei -20 °C aufbewahrt.

### **4.5.2. Whole mount mRNA in situ-Hybridisierung**

Die Hybridisierung wurde nach den Protokollen von [134] und [155] durchgeführt und erfolgte in 6well-Platten (Nunc oder Flakon) unter mäßigem Schütteln.

### **Vorbereitung der Embryonen**

Die fixierten und in 100%igem Methanol gelagerten Embryonen wurden bei 4 °C in einer absteigenden Methanolreihe (75, 50 und 25 % Methanol/ DEPC-PBS, jeweils 10 min) rehydriert und anschließend mehrmals in PBT gewaschen (3 mal 10 min). Die Hirnventrikel wurden mit Subcutannadeln aufgestochen um Substrat-Präzipitate zu verhindern. Die Embryonen wurden dann in 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBT für 1 h gebleicht und anschließend 3 mal je 15 min mit PBT gewaschen. Embryonen, die älter als E9,5 waren, wurden mit Proteinase K (10  $\mu$ g/ml in Proteinase K Puffer) bei RT behandelt. Die Inkubationsdauer war abhängig vom Entwicklungsstand: E10 - 1 min, E11 - 5 min, E12 - 8 min, E13 - 12 min, E14 - 15 min. Um die Behandlung mit Proteinase K zu stoppen wurden die Embryonen auf Eis mit 2 mg/ml Glycin/PBT (2 mal 5 min) und mit PBT (2 mal 5 min) gewaschen. Es folgte eine Inkubation in RIPA -Puffer (3 mal 5 min) zur Permeabilisierung und wieder in PBT (3 mal 5 min). Danach wurden die Embryonen 20 min mit 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd auf Eis fixiert.

### **Hybridisierung**

Die Embryonen wurden 10 min in Hype-Puffer/PBT (1:1) bei RT inkubiert. Sie wurden dann 10 min in Hype-Puffer gewaschen und anschließend 3 h bei 65 °C in Hype-Puffer prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die Digoxigenin-markierte RNA bei 90 °C für 3 min denaturiert und bis zum Gebrauch auf Eis aufbewahrt. Die Hybridisierung erfolgte schließlich in Hype-Puffer mit einer 1:100 Verdünnung der DIG markierten RNA in 100 µg/ml tRNA in Hype-Puffer bei 68 °C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen mit Hype-Puffer bei 65 °C (2 mal 30 min) und anschließend bei RT 5 min mit Hype-Puffer/RNase-Puffer (1:1) gewaschen. Anschließend folgte eine 60 minütige Inkubation in 100 µg/ml RNase A in RNase-Puffer bei 37 °C um ungebundene Sonden zu entfernen. Die Embryonen wurden danach in RNase-Puffer und SSC/FA/Tween 20 (1:1) bei RT (5 min) und in SSC/FA/Tween 20 bei 65 °C (2 mal 5 min, 3 mal 10 min, 5 mal 30 min) gewaschen. Die Embryonen wurden erneut auf RT abgekühlt und bei RT in SSC/FA/Tween 20 und 1 x TBST (1:1) (5 min) und 1 x TBST (2 mal 10 min) gewaschen.

### **Antikörperinkubation**

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Embryonen 2 mal 10 min mit MABT gewaschen und dann mit 10 % Blockierungslösung (Roche) in MABT für 1 h inkubiert. Der DIG-Antikörper wurde 1:5000 mit 1 % Blockierungslösung in MABT verdünnt und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt. Die Embryonen wurden schließlich mit dieser Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundener Antikörper durch mehrmaliges Waschen bei RT in MABT (3 mal 5 min) und TBST (3 mal 5 min, 8 mal 1 h) entfernt. Die Embryonen wurden über Nacht in TBST bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Waschlösung nochmals gewechselt.

### **Färbereaktion**

Die Embryonen wurden mit Alkalischem Phosphatase-Puffer bei RT gewaschen (3 mal 20 min). Für die Färbung wurde BM Purple AB Substrat-Lösung (Roche) mit 0,5 % Tween 20 und 2 mM Levamisol versetzt und 3 min bei 2400 rpm zentrifugiert. Levamisol inhibiert endogene alkalische Phosphatasen in Leber, Niere, Plazenta, Knochen und Darm von Säugetieren und unterdrückt dadurch unerwünschte Hintergrundfärbungen. Die Färbung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln und dauerte zwischen einem und vier Tagen. Zum Stoppen der Färbung wurden die Embryonen in Alkalischem Phosphatase-Puffer gewaschen (3 mal 10 min) und anschließend in 4 % PFA/PBS über Nacht bei 4 °C fixiert. In dieser Lösung können die Embryonen über Jahre hinweg aufbewahrt werden, ohne die Färbung zu verlieren.

### **Dokumentation**

Die gefärbten Embryonen wurden in Petrischalen mit 0,6%igem Agarosegel/PBS gelegt und mit PBS bedeckt. Die Aufnahmen wurden mit dem Mikroskop MZ 95 (Leica), das mit einer Digitalkamera ausgestattet, ist aufgenommen.

- **DEPC-H<sub>2</sub>O**

0,01 % DEPC in H<sub>2</sub>O

über Nacht inkubieren und autoklavieren

- **DEPC-PBS**

0,01 % DEPC in PBS

über Nacht inkubieren und autoklavieren

- **Alkalischer Phosphatase-Puffer**

100 mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

100 mM Tris/HCL pH 9,5

2 mM Levamisol

0,1 % Tween20

- **Blockierungslösung**

10 % (w/v) Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim) wurde in MAB-Puffer gelöst, autoklaviert und aliquotiert bei -20 °C aufbewahren

- **Färbelösung**

BM purple AP Substrat (Boehringer Mannheim)

2 mM Levamisol (Sigma)

0,5 - 1 % Tween20

zentrifugieren, Überstand verwenden

- **Heparin-Lösung**

100 mg/ml Heparin (Sigma) in 4 x DEPC-SSC

- **MAB-Puffer**

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl

mit NaOH-Plättchen auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren

- **MABT-Puffer**  
0,1 % Tween20 in MAB
  
- **PBT**  
0,1 % Tween20 in DEPC-PBS
  
- **4 % PFA in DEPC-PBS**  
4 % (w/v) Paraformaldehyd in DEPC-PBS mit ein paar Tropfen NaOH alkalisieren und bei 50 °C unter Rühren lösen/depolymerisieren, abkühlen lassen und mit HCl auf pH 6,5–7,0 einstellen
  
- **Proteinase K-Puffer**  
20 mM Tris/HCl pH 7,5  
1 mM EDTA  
zweimal autoklavieren
  
- **RNase-Lösung**  
500 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl pH 7,5  
0,1 % Tween20
  
- **RIPA Puffer**  
0,05 % SDS  
150 mM NaCl  
1 % NP40  
0,5 % Deoxycholat  
1 mM EDTA  
50 mM Tris/HCl pH 8,0  
in DEPC-H<sub>2</sub>O
  
- **SSC/FA/T**  
2 x SSC  
50 % Formamid  
0,1 % Tween20
  
- **10 x TBST**  
1,4 M NaCl  
30 mM KCl  
250 mM Tris/HCl pH 7,5  
1 % Tween20

- **Tris/Glycin-Puffer**

0,1 M Tris

0,1 M Glycin

in DEPC-H<sub>2</sub>O lösen

- **tRNA**

10 mg/ml in DEPC-H<sub>2</sub>O

2 x phenolisieren

bei -20 °C aliquotiert aufbewahren

- **Hype-Puffer**

50 % deionisiertes Formamid

5 x SSC

0,05 % Heparin-Lösung

0,1 % Tween20 100 µg/ml tRNA

in DEPC-H<sub>2</sub>O, mit 1 M Zitronensäure auf pH 6,0 einstellen

## 4.6. Immunhistochemie

### 4.6.1. Gewebepreparation für Paraffinschnitte

Die Gewebe wurden entnommen und sofort in 4 % PFA für 0,5–1 h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Gewebe je nach Größe ca. 3 h in PBS und anschließend 4 h in 50 % Isopropanol inkubiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht in 75 % Isopropanol, den Tag über in 90 % und erneut über Nacht in 100 % Isopropanol. Am folgenden Tag wurden die Gewebe je 30 min in 100 % Isopropanol zunächst bei RT, dann bei 37 °C und schließlich bei 60 °C inkubiert. Danach wurden die Gewebe für 24 h in einem Isopropanol/Paraffingemisch (1:1) bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde bei 60 °C der Isopropanol vollständig abgedampft. Die Gewebe wurden dann in die entsprechenden Plastikhalter mit Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

### 4.6.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zunächst werden die Schnitte durch Spülen mit Leitungswasser entparaffiniert. Es folgt eine 4 minütige Färbung mit Hämatoxylin, bei der Strukturen wie DNA, Zellkern und ER zunächst rötlich-braun gefärbt werden. Anschließend werden die Schnitte ca. 10 min in Leitungswasser gewässert. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung des pH-Wertes, wodurch die gefärbten Strukturen ihre bau-violette Farbe erhalten. Anschließend wurden die Schnitte ca. 1 min in 1 %igem wässrigen Eosin gefärbt, wodurch hauptsächlich Zellplasmaproteine rot gefärbt wurden. Die Schnitte wurden dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30,

50, 70, 96 und 2 mal 100 % EtOH) entwässert und anschließend 2 mal in Xylol geklärt. Anschließend werden die Schnitte mit Roti-Histokit II (Roth) eingedeckelt.

- **Hämatoxylin**

- 1 g Hämatoxylin
  - 0,2 g Natriumiodat
  - 91,8 g Aluminiumkaliumsulfat
  - 50 g Chloralhydrat
  - 1 g Zitronensäure
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O

- **Eosin**

- 10 g Eosin
  - ad 1 l H<sub>2</sub>O

## 4.7. Proteinchemische Methoden

### 4.7.1. Lyse von Bakterien

Das Bakterienpellet wurde in 200  $\mu$ l Lyse-Puffer (5 ml Lyse-Puffer wurden zuvor mit 5  $\mu$ l 1000 x Proteaseinhibitor versetzt) aufgenommen. Die Bakterien wurden durch drei Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen im Wasserbad aufgeschlossen. Die Fragmentierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 5 mM Magnesiumchloridlösung und 10 U Endonuklease.

- **Lyse-Puffer**

- 50 mM Tris
  - 500 mM NaCl
  - 1 mM EDTA pH 8,7
  - in H<sub>2</sub>O

### 4.7.2. Lyse von humanen Zellen

Das Zellpellet wurde in ca. 100–200  $\mu$ l RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich) resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 0,5  $\mu$ l 1000 x Proteaseinhibitor versetzt.

### 4.7.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Schägger und von Jagow [138] durchgeführt. Die in Tabelle 4.8 aufgeführten Reagenzien wurden benötigt, um 2 Mini-Gele (Mini-PROTEAN 3 system; BioRad) zu gießen.

**Tabelle 4.8: Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Substanzen	10 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	3,3 ml	670 $\mu$ l
Gelpuffer	3 ml	670 $\mu$ l
50 % Glycerin	2,5 ml	-
H <sub>2</sub> O	1 ml	3,67 ml
TEMED	20 $\mu$ l	7 $\mu$ l
10 % APS	50 $\mu$ l	40 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 ml</b>	5 ml

Die Proteinproben wurden mit einem gleichen Volumen 1 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 8 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben und ein Molekularmarker (BioRad) zur Bestimmung der Proteingröße wurden auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde durch das Anlegen eines konstanten elektrischen Feldes erreicht. Nach Beendigung des Laufes wurden die Gele 30 min mit Coomassie-Färbelösung behandelt, in 10 % Essigsäure entfärbt und für ca. 1 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet (Model 583 Gel Dryer; BioRad).

- **Gelpuffer**  
3 M Tris/HCl pH 8,45  
0,3 % SDS
- **Kathodenpuffer**  
100 mM Tris  
100 mM Tricin  
0,1 % SDS
- **Anodenpuffer**  
200 mM Tris/HCl pH 8,9
- **SDS-Probenpuffer**  
50 % Glycerin

160 mM Tris/HCl pH 6,8  
5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2 % SDS  
0,02 % Bromphenolblau

- **Coomassie-Färbelösung**

500 mg Coomassie Brilliant Blue G-280  
200 ml Methanol  
5 ml Essigsäure  
ad 300 ml H<sub>2</sub>O

### 4.7.4. Western Blot

Um Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, mit Hilfe von Antikörpern zu analysieren, wurden diese auf eine PVDF Membran (Pall) übertragen. Die PVDF Membran wurde dazu auf die Größe der Gele zurechtgeschnitten und mit 100 % Methanol angefeuchtet. Anschließend wurden das Gel und die Membran für 10 min in Blotting-Puffer inkubiert. Zwei Stücke Filterpapier (ebenfalls in der Größe der Gele) wurden in Blot-Puffer getränkt und auf die Anodenplatte der semidry Blot-Apparatur gelegt (BioRad). Darauf wurde die Membran, das Gel und erneut zwei mit Blot-Puffer getränkte Filterpapiere gelegt. Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 20 V für 30 min. Die Membran wurde bei RT für 30 min mit 5 % Milchpulver/PBS inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem ersten Antikörper/0,5 % Milchpulver/PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörper, gelöst in 0,5 % Milchpulver in PBS, für 2 h bei RT inkubiert. Zur Visualisierung mittels ECL-Färbung wurde entsprechend des Herstellerprotokolls vorgegangen. Die verwendeten Antikörper sind in 5.1.4 aufgelistet.

- **Blot-Puffer**

48 mM Tris  
39 mM Glycin  
1,3 mM SDS  
20 % Methanol



## 4.8. Enzymaktivitätstest in vitro

### 4.8.1. Bestimmung der Aktivität unterschiedlicher Enzyme

Jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden als Pellet bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Dieses Zellpellet wurde in Reaktionspuffer resuspendiert und in ein Reagenzglas überführt. Die gewünschte Konzentration des Substrats und  $50\ \mu\text{l}$  des Cofaktors NADPH ( $5\ \text{mg/ml}$  in Reaktionspuffer) wurden zu den Zellen gegeben. Das Gesamtvolumen betrug jeweils  $500\ \mu\text{l}$  und wurde mit unterschiedlichen Volumina Reaktionspuffer eingestellt. Durch die Zugabe des Cofaktors wurde die Reaktion gestartet und für  $90\ \text{min}$  bei  $37\text{ °C}$  unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von  $100\ \mu\text{l}$  Stopp-Lösung und anschließendem Vortexen wurde die Reaktion gestoppt.

- **Reaktionspuffer, pH 8,0**

100 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

1 % BSA

1 mM EDTA

ad 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$

- **Stopp-Lösung**

0,21M  $\alpha$ -Ascorbinsäure

1 % Essigsäure

ad 100 ml MeOH

### 4.8.2. Festphasenextraktion

Für die Aufreinigung wurden unterschiedliche Säulen verwendet (Tab. 4.9). Die Durchflussrate der Vakuumvorrichtung wurde auf ca.  $1\ \text{ml/min}$  eingestellt. Die Konditionierung der Säulen erfolgte mit 2 mal  $1\ \text{ml}$  Methanol. Anschließend wurden die Säulen 2 mal mit  $1\ \text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$  equilibriert. Die Säulen wurden dann mit den Proben beladen. Gewaschen wurde 2 mal mit je  $1\ \text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 2 mal mit  $1\ \text{ml}$   $47\%$  Methanol. Die Elution erfolgte in GC-Vials mit  $1\ \text{ml}$  Ethylacetat.

## 4.9. Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

### 4.9.1. Handhabung der Standard-Substanzen

Zymosteron ( $M_W = 382,65\ \text{g/mol}$ ), Zymosterol ( $M_W = 384,65\ \text{g/mol}$ ) und Lathosterol ( $M_W = 386,65\ \text{g/mol}$ ) wurden eingewogen, in Chloroform gelöst und zu je  $50\ \mu\text{l}$  aliquotiert. Anschließend wurden die Substanzen in der Vakuumzentrifuge eingeeengt. Die Lagerung

**Tabelle 4.9: Säulen zur Festphasenextraktion**

Bezeichnung der Säule	Hersteller
Oasis HLB (30 mg)	Waters
Oasis HLB (10 mg)	Waters
Strata C8 (100 mg/ml)	Phenomenex
Strata C18-E (100 mg/mg)	Phenomenex

erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Für die Messungen wurde Zymosteron, Zymosterol und Lathosterol in TBME gelöst, so dass die Konzentration  $500\text{ mM}$  betrug. Entsprechend der gewünschten Endkonzentration wurden die Lösungen weiter verdünnt.

#### 4.9.2. Bestimmung der Kalibriergerade

Für die Kalibriergerade wurden je  $100\text{ }\mu\text{M}$  Lösungen von Zymosteron bzw. Zymosterol in entsprechenden Volumina eingesetzt, um Verhältnisse von 0:100, 10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10 und 100:0 zu erhalten. Die Gesamtkonzentration beider Substanzen betrug dabei  $10\text{ }\mu\text{M}$ .

#### 4.9.3. Probenvorbereitung

Die Proben sowie die Standards wurden in einer Vakuumzentrifuge eingengt, in TBME aufgenommen und in  $\mu$ -Vials überführt. Die Proben wurden nochmals in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Anschließend erfolgte eine Derivatisierung mit  $50\text{ }\mu\text{l}$  MSTFA activated I (Fluka) unter Argon-Schutzatmosphäre, um eine Reaktion des Derivatisierungsreagenzes mit Sauerstoff zu vermeiden. Die Proben wurden anschließend gemessen.

#### 4.9.4. Messung

Alle Proben wurden im Autosampler auf  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiert, um eine Zersetzung der derivatisierten Substanzen zu vermeiden. Für die Messungen wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Mit der Methode SCAN\_F wurden alle Massenbruchstücke im Bereich von  $m/z\ 20$  bis  $m/z\ 600$  gemessen. Für die Messung einzelner Substanzen in underivatisiertem und derivatisiertem (deriv.) Zustand wurden unterschiedliche Programme verwendet, die in Tabelle 4.10 zusammengefasst sind. Die Abtastfrequenz lag bei allen verwendeten Programmen bei  $80\text{ ms}$ .

Im Laufe meiner Arbeit wurden unterschiedliche GC/MS-Säulen verwendet. Dies hatte jedoch keinen Einfluß auf die einzelnen Versuche. Die Geräteparameter sind dem Anhang A.3.1 zu entnehmen.

Tabelle 4.10: Messbereiche

---

<b>Programm</b>	<b>gemessene Substanzen</b>	<b>detektierte Ionen (m/z)</b>
DZZ80	Zymosteron deriv. und Zymosterol deriv.	454,40, 456,40
DZ80	Zymosterol deriv.	456,40, 414,40, 351,40
ZZ80	Zymosteron und Zymosterol	382,40, 384,40
Z80	Zymosterol	384,40, 269,40, 213,40

---



## 5. Material und Organismen

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Vektoren

pBSII-SK/mShh	Dr. Daniela Laubner, IEG, GSF
pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pcDNA3	Invitrogen
pENTR/H1/TO	Invitrogen
PENTR/U6	Invitrogen
pGEX/hHSD17B7	Dr. Gabriele Möller, IEG, GSF
pSCREEN-iT/lacZ-DEST	Invitrogen
psiCHECK-2	Promega

#### 5.1.2. Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0.8%)	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumperoxodisulphat (APS)	Biozym
Ampicillin	Sigma
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
BM Purple AB substrate solution	Roche
BSA	NEB
Chloroform	Merck
Cholesterin	Sigma
Coomassie blue G250	Biomol
7-Dehydrocholesterin	Sigma
Diaminobenzidin (DAB)	Biomol
Diethylether (HPLC Grade)	Neobal
DIG RNA Labelling Mix	Roche

## 5. Material und Organismen

---

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM	Invitrogen
dNTPs	Fermentas
Enhanced Chemoluminescence ECL Substrat	Perkin Elmer
Essigsäure	Merck
Ethanol (HPLC Grade)	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylacetat (HPLC Grade)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Biomol
FBS	Biochrom
FluoroTrans W Membrane (PVDF)	Pall
Formaldehyd, 37%	Roth
FuGene6	Roche
Glucose	Merck
Hefeextrakt	Difco
25-Hydroxycholesterin	Sigma
Imidazol	Sigma
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Fermentas
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumacetat	Merck
Kanamycin	Sigma
$\lambda$ -Markers 3 and 8	Fermentas
Lathosterol, 3 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ ,7-cholesten	Sigma
L-Glutamin	Invitrogen
6 x Loading Dye	Fermentas
Manganchlorid (Tetrahydrat)	Sigma
MEM	Invitrogen
Methanol (HPLC Grade)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid activated I, MSTFA-activated I	Fluka
NN'-Dimethylformamid	Merck
Parafilm	American National Can
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen

2-Propanol	Merck
RIPA-Puffer	Sigma
Rubidiumchlorid	Sigma
Steroidfreies humanes Serum	PAA
TEMED	Sigma
tert-Butylmethylether, TBME	Merck
Tetracyclin Hydrochlorid	Sigma Aldrich
Trisbase	Merck
Triton-X100	Merck
TRIzol	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Invitrogen
Tween-20	Merck
X-Omat AR Film, XAR-5	Kodak
Zeocin	Invitrogen
Zymosterol	Jenapharm
Zymosteron	Jenapharm

### 5.1.3. Enzyme

BamHI	New England Biolabs
Herculase Hotstart DNA Polymerase	Stratagene
HindIII	New England Biolabs
KOD HiFi DNA Polymerase	Novagen
NotI	New England Biolabs
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene
T4 LigaFast Rapid DNA Ligase	Promega
T4-Ligase	MBI Fermentas
Trypsin	Gibco
XhoI	New England Biolabs

### 5.1.4. Antikörper

#### Erst-Antikörper

17 $\beta$ -HSD7 AK2 polyklonal aus <i>C. jacchus</i>	Dr. Almuth Einspanier, Primatenzentrum Göttingen
Anti-ACTIVE Caspase-3 pAb	Promega
Goat Anti-Caspase-3 (CPP32)	R&D Systems
anti-Peptide EBP Projekt 59241 Rabbit A4396	BioLux

anti-Peptide EBP Projekt 59241 Rabbit A4397	BioLux
anti-Peptide NSDHL Projekt 59240 Rabbit A4326	BioLux
anti-Peptide NSDHL Projekt 59240 Rabbit A4327	BioLux

### Zweit-Antikörper

Alkaline phosphatase conjugated Goat anti-Rabbit IgG	Sigma Aldrich
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	Roche
Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG	Molecular Probes
Alexa Fluor 568 Goat anti-Rabbit IgG	Molecular Probes
Peroxidase conjugated Goat anti-Mous IgG + IgM	Dianova
Vectastain ABC-Elite HRP Rabbit IgG Biotin	Linaris

### 5.1.5. Kits

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BLOCK-iT RNAi Target Screening System	Invitrogen
Caspase-Glo™ 3/7 Assay	Promega
CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
DyeEx bzw. DyeEx96	Qiagen
iTaq™ SYBR Green Supermix with ROX	Biorad
Nucleobond PC 100 Kit	Machery & Nagel
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery & Nagel
QuickChange	Stratagene
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNA 6000 Nano Assay	Agilent Technologies
RNeasy Midi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
SV Total RNA Isolation Kit	Promega
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Wizard SV Genomic DNA Purificatin System	Promega



### 5.1.6. Equipment

#### Laborgeräte

3730 DNA-Analyzer	Applied Biosystems
7900 HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Axiophot	Zeiss
Axiovert 40 CFL	Zeiss
Bio Vision Gel dokumentation	PeqLab
Brutschränke	Heareus Instruments
CO <sup>2</sup> Incubator MCO-17 A/C	Sanyo
Concentrator 5301	Eppendorf
Gene Pulser II	Biorad
GENios Pro	Tecan
Kühlzentrifuge Universal 32 R	Hettich
Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckmann
Mikropipetten	Gilson
Mini-PROTEAN II	Biorad
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies
pH-Meter 766 calimatic	Knick
Power Supply PA300	Biorad
RoboCycler 96	Stratagene
Safire <sup>2</sup> Microplate Reader	Tecan
Trans-Blot SD - Semidry Transfer Cell	Biorad

#### Software

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> BLAST
ISIS 3 V2.33	Metasystems
MSD ChemStation D.01.00	Agilent Technologies
NanoDrop V3.1.0	NanoDrop Technologies
NIST Mass Spectral Search Program	NIST
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/</a> primer3.www.cgi
SDS2.1	Applied Biosystems
Sequencing Analysis Software 5.1	Applied Biosystems
Sigma Plot	SPSS

Vector NTI	Infor Max
Vision-Capt	Bioprofil
XFluor4 GENios Pro	Applied Biosystems

## 5.2. Organismen

### 5.2.1. Bakterienstämme

#### DH5 $\alpha$ (Stratagene)

F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80*dlacZ*DM15, D(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ -*thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

#### TOP10 (Invitrogen)

F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mrcBC*),  $\Delta$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *ga/U*, *ga/K*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*

### 5.2.2. Zelllinien

HeLa ( <i>human cervix carcinoma</i> )	DMSZ
HeLa T-REx <sup>TM</sup> ( <i>human cervix carcinoma / tetracycline repressed expression</i> )	Invitrogen
HepG2 ( <i>human hepatocellular carcinoma</i> )	DMSZ
Hek293 ( <i>human embryonal kidney</i> )	DMSZ
MRC-5 ( <i>normal human fetal lung fibroblast</i> )	ATCC

## Literaturverzeichnis

- [1] D. Altshuler, J. N. Hirschhorn, M. Klannemark, C. M. Lindgren, M. C. Vohl, J. Nemes, C. R. Lane, S. F. Schaffner, S. Bolk, C. Brewer, T. Tuomi, D. Gaudet, T. J. Hudson, M. Daly, L. Groop, and E. S. Lander. The common ppargamma pro12ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.*, 26(1):76–80., 2000.
- [2] V. Ambros. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell.*, 113(6):673–6., 2003.
- [3] M. P. Ares, M. I. Porn-Ares, S. Moses, J. Thyberg, L. Juntti-Berggren, P. Berggren, A. Hultgardh-Nilsson, B. Kallin, and J. Nilsson. 7beta-hydroxycholesterol induces ca(2+) oscillations, map kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis.*, 153(1):23–35., 2000.
- [4] A. Ashkenazi and V. M. Dixit. Death receptors: signaling and modulation. *Science.*, 281(5381):1305–8., 1998.
- [5] N. Bansal, A. Houle, and G. Melnykovich. Apoptosis: mode of cell death induced in t cell leukemia lines by dexamethasone and other agents. *Faseb J.*, 5(2):211–6., 1991.
- [6] D. P. Bartel. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.*, 116(2):281–97., 2004.
- [7] P. A. Beachy, M. K. Cooper, K. E. Young, D. P. von Kessler, W. J. Park, T. M. Hall, D. J. Leahy, and J. A. Porter. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 62:191–204., 1997.
- [8] Z. H. Beg, D. W. Allmann, and D. M. Gibson. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity with camp and wth protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.*, 54(4):1362–9., 1973.
- [9] S. Bellosta, N. Ferri, F. Bernini, R. Paoletti, and A. Corsini. Non-lipid-related effects of statins. *Ann Med.*, 32(3):164–76., 2000.

- [10] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of rna interference. *Nature.*, 409(6818):363–6., 2001.
- [11] M. Bittar, R. Happle, K. H. Grzeschik, L. Leveleki, M. Hertl, D. Bornholdt, and A. König. Child syndrome in 3 generations: the importance of mild or minimal skin lesions. *Arch Dermatol.*, 142(3):348–51., 2006.
- [12] E. J. Blanchette-Mackie. Intracellular cholesterol trafficking: role of the npc1 protein. *Biochim Biophys Acta.*, 1486(1):171–83., 2000.
- [13] A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, and W. E. Wright. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.*, 279(5349):349–52., 1998.
- [14] N. Braverman, P. Lin, F. F. Moebius, C. Obie, A. Moser, H. Glossmann, W. R. Wilcox, D. L. Rimoin, M. Smith, L. Kratz, R. I. Kelley, and D. Valle. Mutations in the gene encoding 3 beta-hydroxysteroid-delta 8, delta 7-isomerase cause x-linked dominant conradi-hunermann syndrome. *Nat Genet.*, 22(3):291–4., 1999.
- [15] R. Breitling, A. Krazeisen, G. Moeller, and J. Adamski. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7—an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis. *Mol Cell Endocrinol.*, 171(1-2):199–204., 2001.
- [16] A. J. Brown and W. Jessup. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis.*, 142(1):1–28., 1999.
- [17] M. S. Brown and J. L. Goldstein. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(7):3330–7., 1979.
- [18] M. S. Brown and J. L. Goldstein. The srebp pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.*, 89(3):331–40., 1997.
- [19] M. S. Brown and J. L. Goldstein. Sterol regulatory element binding proteins (srebps): controllers of lipid synthesis and cellular uptake. *Nutr Rev.*, 56(2 Pt 2):S1–3; discussion S54–75., 1998.
- [20] T. R. Brummelkamp, R. Bernards, and R. Agami. A system for stable expression of short interfering rnas in mammalian cells. *Science.*, 296(5567):550–3. Epub 2002 Mar 21., 2002.

- [21] H. Caldas and G. E. Herman. Nsdhl, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the golgi and accumulates on er membranes and on the surface of lipid droplets. *Hum Mol Genet.*, 12(22):2981–91. Epub 2003 Sep 23., 2003.
- [22] D. Carpenter, D. M. Stone, J. Brush, A. Ryan, M. Armanini, G. Frantz, A. Rosenthal, and F. J. de Sauvage. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(23):13630–4., 1998.
- [23] D. Castanotto, H. Li, and J. J. Rossi. Functional sirna expression from transfected pcr products. *Rna.*, 8(11):1454–60., 2002.
- [24] A. Chawla, W. A. Boisvert, C. H. Lee, B. A. Laffitte, Y. Barak, S. B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. A. Edwards, L. K. Curtiss, R. M. Evans, and P. Tontonoz. A ppar gamma-lxr-abca1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.*, 7(1):161–71., 2001.
- [25] C. Chiang, Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal, and P. A. Beachy. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. *Nature.*, 383(6599):407–13., 1996.
- [26] A. M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit. Fadd, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell.*, 81(4):505–12., 1995.
- [27] S. Y. Cho, J. H. Kim, and Y. K. Paik. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: differential inhibition of sterol delta 8-isomerase and other lanosterol-converting enzymes by tamoxifen. *Mol Cells.*, 8(2):233–9., 1998.
- [28] J. C. Chow, Z. Yen, S. M. Ziesche, and C. J. Brown. Silencing of the mammalian x chromosome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 6:69–92., 2005.
- [29] P. T. Chuang and T. B. Kornberg. On the range of hedgehog signaling. *Curr Opin Genet Dev.*, 10(5):515–22., 2000.
- [30] N. A. Compagnone, A. Bulfone, J. L. Rubenstein, and S. H. Mellon. Expression of the steroidogenic enzyme p450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology.*, 136(6):2689–96., 1995.
- [31] M. K. Cooper, J. A. Porter, K. E. Young, and P. A. Beachy. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to shh signaling. *Science.*, 280(5369):1603–7., 1998.

- [32] M. K. Cooper, C. A. Wassif, P. A. Krakowiak, J. Taipale, R. Gong, R. I. Kelley, F. D. Porter, and P. A. Beachy. A defective response to hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet.*, 33(4):508–13. Epub 2003 Mar 24., 2003.
- [33] A. Corsini, S. Bellosta, R. Baetta, R. Fumagalli, R. Paoletti, and F. Bernini. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.*, 84(3):413–28., 1999.
- [34] D. Deluca, G. Moeller, A. Rosinus, W. Elger, A. Hillisch, and J. Adamski. Inhibitory effects of fluorine-substituted estrogens on the activity of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.*, 248(1-2):218–24. Epub 2006 Jan 6., 2006.
- [35] S. Demyanets, C. Kaun, S. Pfaffenberger, P. J. Hohensinner, G. Rega, J. Pammer, G. Maurer, K. Huber, and J. Wojta. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol.*, 71(9):1324–30. Epub 2006 Mar 15., 2006.
- [36] J. M. Derry, E. Gormally, G. D. Means, W. Zhao, A. Meindl, R. I. Kelley, Y. Boyd, and G. E. Herman. Mutations in a delta 8-delta 7 sterol isomerase in the tattered mouse and x-linked dominant chondrodysplasia punctata. *Nat Genet.*, 22(3):286–90., 1999.
- [37] O. Donze and D. Picard. Rna interference in mammalian cells using sirnas synthesized with t7 rna polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 30(10):e46., 2002.
- [38] W. R. Duan, D. I. Linzer, and G. Gibori. Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor. *J Biol Chem.*, 271(26):15602–7., 1996.
- [39] D. Dussossoy, P. Carayon, S. Belugou, D. Feraut, A. Bord, C. Goubet, C. Roque, H. Vidal, T. Combes, G. Loison, and P. Casellas. Colocalization of sterol isomerase and sigma(1) receptor at endoplasmic reticulum and nuclear envelope level. *Eur J Biochem.*, 263(2):377–86., 1999.
- [40] P. A. Edwards, M. A. Kennedy, and P. A. Mak. Lxrs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol.*, 38(4):249–56., 2002.
- [41] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide rnas mediate rna interference in cultured mammalian cells. *Nature.*, 411(6836):494–8., 2001.
- [42] S. M. Elbashir, W. Lendeckel, and T. Tuschl. Rna interference is mediated by 21- and 22-nucleotide rnas. *Genes Dev.*, 15(2):188–200., 2001.

- [43] A. Elbrecht, Y. Chen, C. A. Cullinan, N. Hayes, M. Leibowitz, D. E. Moller, and J. Berger. Molecular cloning, expression and characterization of human peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem Biophys Res Commun.*, 224(2):431–7., 1996.
- [44] R. E. Ellis, J. Y. Yuan, and H. R. Horvitz. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.*, 7:663–98., 1991.
- [45] L. J. Engelking, G. Liang, R. E. Hammer, K. Takaishi, H. Kuriyama, B. M. Evers, W. P. Li, J. D. Horton, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. Schoenheimer effect explained—feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by insig proteins. *J Clin Invest.*, 115(9):2489–98. Epub 2005 Aug 11., 2005.
- [46] J. Ericson, J. Muhr, T. M. Jessell, and T. Edlund. Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *Int J Dev Biol.*, 39(5):809–16., 1995.
- [47] B. Fadeel, B. Gleiss, K. Hogstrand, J. Chandra, T. Wiedmer, P. J. Sims, J. I. Henter, S. Orrenius, and A. Samali. Phosphatidylserine exposure during apoptosis is a cell-type-specific event and does not correlate with plasma membrane phospholipid scramblase expression. *Biochem Biophys Res Commun.*, 266(2):504–11., 1999.
- [48] Jr. Farese, R. V. and J. Herz. Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends Genet.*, 14(3):115–20., 1998.
- [49] Jr. Farese, R. V., S. L. Ruland, L. M. Flynn, R. P. Stokowski, and S. G. Young. Knockout of the mouse apolipoprotein b gene results in embryonic lethality in homozygotes and protection against diet-induced hypercholesterolemia in heterozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(5):1774–8., 1995.
- [50] C. Fernandez, M. Martin, D. Gomez-Coronado, and M. A. Lasuncion. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res.*, 46(5):920–9. Epub 2005 Feb 1., 2005.
- [51] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature.*, 391(6669):806–11., 1998.
- [52] B. U. Fitzky, M. Witsch-Baumgartner, M. Erdel, J. N. Lee, Y. K. Paik, H. Glossmann, G. Utermann, and F. F. Moebius. Mutations in the delta7-sterol reductase gene in patients with the smith-lemli-opitz syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(14):8181–6., 1998.

- [53] M. Fivaz, L. Abrami, and F. G. van der Goot. Landing on lipid rafts. *Trends Cell Biol.*, 9(6):212–3., 1999.
- [54] J. M. Frade and T. M. Michaelidis. Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism? *Bioessays.*, 19(9):827–32., 1997.
- [55] D. Gachotte, S. E. Sen, J. Eckstein, R. Barbuch, M. Krieger, B. D. Ray, and M. Bard. Characterization of the *saccharomyces cerevisiae* *erg27* gene encoding the 3-keto reductase involved in c-4 sterol demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(22):12655–60., 1999.
- [56] A. Gallet, R. Rodriguez, L. Ruel, and P. P. Therond. Cholesterol modification of hedgehog is required for trafficking and movement, revealing an asymmetric cellular response to hedgehog. *Dev Cell.*, 4(2):191–204., 2003.
- [57] W. Gaoua, C. Wolf, F. Chevy, F. Ilien, and C. Roux. Cholesterol deficit but not accumulation of aberrant sterols is the major cause of the teratogenic activity in the smith-lemli-opitz syndrome animal model. *J Lipid Res.*, 41(4):637–46., 2000.
- [58] A. Gaw, C. J. Packard, E. F. Murray, G. M. Lindsay, B. A. Griffin, M. J. Caslake, B. D. Vallance, A. R. Lorimer, and J. Shepherd. Effects of simvastatin on apob metabolism and ldl subfraction distribution. *Arterioscler Thromb.*, 13(2):170–89., 1993.
- [59] H. N. Ginsberg, N. A. Le, M. P. Short, R. Ramakrishnan, and R. J. Desnick. Suppression of apolipoprotein b production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin. implications for regulation of apolipoprotein b synthesis. *J Clin Invest.*, 80(6):1692–7., 1987.
- [60] S. F. Grant, G. Thorleifsson, I. Reynisdottir, R. Benediktsson, A. Manolescu, J. Sainz, A. Helgason, H. Stefansson, V. Emilsson, A. Helgadottir, U. Styrkarsdottir, K. P. Magnusson, G. B. Walters, E. Palsdottir, T. Jonsdottir, T. Gudmundsdottir, A. Gylfason, J. Saemundsdottir, R. L. Wilensky, M. P. Reilly, D. J. Rader, Y. Bagger, C. Christiansen, V. Gudnason, G. Sigurdsson, U. Thorsteinsdottir, J. R. Gulcher, A. Kong, and K. Stefansson. Variant of transcription factor 7-like 2 (*tcf7l2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.*, 38(3):320–3. Epub 2006 Jan 15., 2006.
- [61] Ferdinand Haller. *The Origins of Hydroxysteroid-Dehydrogenases: Identification and Characterization of New HSDs from Several Invertebrates*. PhD thesis, Technische Universitaet Muenchen, 2006.
- [62] A. J. Hamilton and D. C. Baulcombe. A species of small antisense rna in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.*, 286(5441):950–2., 1999.



- [63] M. Hanner, F. F. Moebius, F. Weber, M. Grabner, J. Striessnig, and H. Glossmann. Phenylalkylamine  $ca^{2+}$  antagonist binding protein. molecular cloning, tissue distribution, and heterologous expression. *J Biol Chem.*, 270(13):7551–7., 1995.
- [64] R. Happle. X-linked dominant chondrodysplasia punctata. review of literature and report of a case. *Hum Genet.*, 53(1):65–73., 1979.
- [65] R. Happle, H. Koch, and W. Lenz. The child syndrome. congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects. *Eur J Pediatr.*, 134(1):27–33., 1980.
- [66] K. Hashimoto, S. Prada, A. P. Lopez, J. G. Hoyos, and M. Escobar. Child syndrome with linear eruptions, hypopigmented bands, and verruciform xanthoma. *Pediatr Dermatol.*, 15(5):360–6., 1998.
- [67] N. S. Heiss, U. C. Rogner, P. Kioschis, B. Korn, and A. Poustka. Transcription mapping in a 700-kb region around the dxs52 locus in xq28: isolation of six novel transcripts and a novel atpase isoform (hpmca5). *Genome Res.*, 6(6):478–91., 1996.
- [68] G. E. Herman. X-linked dominant disorders of cholesterol biosynthesis in man and mouse. *Biochim Biophys Acta.*, 1529(1-3):357–73., 2000.
- [69] G. E. Herman. Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Genet.*, 12(Spec No 1):R75–88., 2003.
- [70] J. Herz and Jr. Farese, R. V. The ldl receptor gene family, apolipoprotein b and cholesterol in embryonic development. *J Nutr.*, 129(2S Suppl):473S–475S., 1999.
- [71] M. E. Higgins, J. P. Davies, F. W. Chen, and Y. A. Ioannou. Niemann-pick c1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-golgi network. *Mol Genet Metab.*, 68(1):1–13., 1999.
- [72] W. Hillen and C. Berens. Mechanisms underlying expression of tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol.*, 48:345–69., 1994.
- [73] W. Hillen, C. Gatz, L. Altschmied, K. Schollmeier, and I. Meier. Control of expression of the tn10-encoded tetracycline resistance genes. equilibrium and kinetic investigation of the regulatory reactions. *J Mol Biol.*, 169(3):707–21., 1983.
- [74] T. Holen, M. Amarguioui, M. T. Wiiger, E. Babaie, and H. Prydz. Positional effects of short interfering rnas targeting the human coagulation trigger tissue factor. *Nucleic Acids Res.*, 30(8):1757–66., 2002.

- [75] X. Hua, A. Nohturfft, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. Sterol resistance in cho cells traced to point mutation in srebp cleavage-activating protein. *Cell.*, 87(3):415–26., 1996.
- [76] X. Hua, C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein, and X. Wang. Srebp-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90(24):11603–7., 1993.
- [77] Y. W. Huang, I. Pineau, H. J. Chang, A. Azzi, V. Bellemare, S. Laberge, and S. X. Lin. Critical residues for the specificity of cofactors and substrates in human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1: variants designed from the three-dimensional structure of the enzyme. *Mol Endocrinol.*, 15(11):2010–20., 2001.
- [78] S. Ikegawa, H. Ohashi, T. Ogata, A. Honda, M. Tsukahara, T. Kubo, M. Kimizuka, M. Shimode, T. Hasegawa, G. Nishimura, and Y. Nakamura. Novel and recurrent ebp mutations in x-linked dominant chondrodysplasia punctata. *Am J Med Genet.*, 94(4):300–5., 2000.
- [79] E. Ikonen. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol.*, 13(4):470–7., 2001.
- [80] D. Ilgen. *Funktionelle Analyse von Schluesselenzymen der Cholesterinbiosynthese*. PhD thesis, Technische Universitaet Muenchen, 2005.
- [81] J. P. Incardona, W. Gaffield, R. P. Kapur, and H. Roelink. The teratogenic veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development.*, 125(18):3553–62., 1998.
- [82] M. Irons, E. R. Elias, G. Salen, G. S. Tint, and A. K. Batta. Defective cholesterol biosynthesis in smith-lemli-opitz syndrome. *Lancet.*, 341(8857):1414., 1993.
- [83] M. D. Jacobsen, M. Weil, and M. C. Raff. Role of ced-3/ice-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol.*, 133(5):1041–51., 1996.
- [84] M. D. Jacobson, M. Weil, and M. C. Raff. Programmed cell death in animal development. *Cell.*, 88(3):347–54., 1997.
- [85] R. Jorgensen. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.*, 8(12):340–4., 1990.
- [86] A. A. Kandutsch and A. E. Russell. Preputial gland tumor sterols. 3. a metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem.*, 235:2256–61., 1960.

- [87] R. I. Kelley. Inborn errors of cholesterol biosynthesis. *Adv Pediatr.*, 47:1–53., 2000.
- [88] R. I. Kelley and R. C. Hennekam. The smith-lemlie-opitz syndrome. *J Med Genet.*, 37(5):321–35., 2000.
- [89] R. I. Kelley and G. E. Herman. Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, 2:299–341., 2001.
- [90] R. I. Kelley, W. G. Wilcox, M. Smith, L. E. Kratz, A. Moser, and D. S. Rimoin. Abnormal sterol metabolism in patients with conradi-hunermann-happle syndrome and sporadic lethal chondrodysplasia punctata. *Am J Med Genet.*, 83(3):213–9., 1999.
- [91] W. Kiess and B. Gallaher. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol.*, 138(5):482–91., 1998.
- [92] A. Koenig, R. Happle, D. Bornholdt, H. Engel, and K. H. Grzeschik. Mutations in the *nsdhl* gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause child syndrome. *Am J Med Genet.*, 90(4):339–46., 2000.
- [93] M. Kolf-Clauw, F. Chevy, B. Siliart, C. Wolf, N. Mulliez, and C. Roux. Cholesterol biosynthesis inhibited by *bm15.766* induces holoprosencephaly in the rat. *Teratology.*, 56(3):188–200., 1997.
- [94] M. Kolf-Clauw, F. Chevy, C. Wolf, B. Siliart, D. Citadelle, and C. Roux. Inhibition of 7-dehydrocholesterol reductase by the teratogen *ay9944*: a rat model for smith-lemlie-opitz syndrome. *Teratology.*, 54(3):115–25., 1996.
- [95] G. Kroemer. Mitochondrial implication in apoptosis. towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ.*, 4(6):443–56., 1997.
- [96] K. Kuida, T. S. Zheng, S. Na, C. Kuan, D. Yang, H. Karasuyama, P. Rakic, and R. A. Flavell. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in *cpp32*-deficient mice. *Nature.*, 384(6607):368–72., 1996.
- [97] P. E. Kuwabara and M. Labouesse. The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.*, 18(4):193–201., 2002.
- [98] Y. Lange and T. L. Steck. Four cholesterol-sensing proteins. *Curr Opin Struct Biol.*, 8(4):435–9., 1998.
- [99] D. Laubner, R. Breitling, and J. Adamski. Embryonic expression of cholesterologenic genes is restricted to distinct domains and colocalizes with apoptotic regions in mice. *Brain Res Mol Brain Res.*, 115(1):87–92., 2003.

- [100] Daniela Laubner. *Regulation der Wirkung von Sonic Hedgehog durch Cholesterin*. PhD thesis, Technische Universitaet Muenchen, 2001.
- [101] C. Y. Lee and E. H. Baehrecke. Steroid regulation of autophagic programmed cell death during development. *Development.*, 128(8):1443–55., 2001.
- [102] N. S. Lee, T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M. J. Li, A. Ehsani, P. Salvaterra, and J. Rossi. Expression of small interfering rnas targeted against hiv-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol.*, 20(5):500–5., 2002.
- [103] G. Leonarduzzi, B. Vizio, B. Sottero, V. Verde, P. Gamba, C. Mascia, E. Chiarpotto, G. Poli, and F. Biasi. Early involvement of ros overproduction in apoptosis induced by 7-ketocholesterol. *Antioxid Redox Signal.*, 8(3-4):375–80., 2006.
- [104] V. Lindgren, K. L. Luskey, D. W. Russell, and U. Francke. Human genes involved in cholesterol metabolism: chromosomal mapping of the loci for the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase with cdna probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 82(24):8567–71., 1985.
- [105] L. Liscum and N. J. Munn. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.*, 1438(1):19–37., 1999.
- [106] X. Y. Liu, A. W. Dangel, R. I. Kelley, W. Zhao, P. Denny, M. Botcherby, B. Cattanaach, J. Peters, P. R. Hunsicker, A. M. Mallon, M. A. Strivens, R. Bate, W. Miller, M. Rhodes, S. D. Brown, and G. E. Herman. The gene mutated in bare patches and striated mice encodes a novel 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet.*, 22(2):182–7., 1999.
- [107] R. M. Loesel, E. Falkenstein, M. Feuring, A. Schultz, H. C. Tillmann, K. Rossol-Haseroth, and M. Wehling. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev.*, 83(3):965–1016., 2003.
- [108] H. A. Lucero and P. W. Robbins. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys.*, 426(2):208–24., 2004.
- [109] M. Macville, E. Schrock, H. Padilla-Nash, C. Keck, B. M. Ghadimi, D. Zimonjic, N. Popescu, and T. Ried. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of hela cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.*, 59(1):141–50., 1999.
- [110] R. W. Mahley, Y. Huang, and K. H. Weisgraber. Putting cholesterol in its place: apoe and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest.*, 116(5):1226–9., 2006.
- [111] Z. Marijanovic, D. Laubner, G. Moeller, C. Gege, B. Husen, J. Adamski, and R. Breitling. Closing the gap: identification of human 3-ketosteroid reductase,

- the last unknown enzyme of mammalian cholesterol biosynthesis. *Mol Endocrinol.*, 17(9):1715–25. Epub 2003 Jun 26., 2003.
- [112] G. Martin, K. Schoonjans, B. Staels, and J. Auwerx. Ppargamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. *Atherosclerosis.*, 137(Suppl):S75–80., 1998.
- [113] R. Merino, Y. Ganan, D. Macias, J. Rodriguez-Leon, and J. M. Hurle. Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci.*, 887:120–32., 1999.
- [114] R. Mindnich, G. Moeller, and J. Adamski. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.*, 218(1-2):7–20., 2004.
- [115] F. F. Moebius, G. G. Burrows, J. Striessnig, and H. Glossmann. Biochemical characterization of a 22-kda high affinity antiischemic drug-binding polypeptide in the endoplasmic reticulum of guinea pig liver: potential common target for antiischemic drug action. *Mol Pharmacol.*, 43(2):139–48., 1993.
- [116] F. F. Moebius, B. U. Fitzky, J. N. Lee, Y. K. Paik, and H. Glossmann. Molecular cloning and expression of the human delta7-sterol reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(4):1899–902., 1998.
- [117] F. F. Moebius, R. J. Reiter, K. Bermoser, H. Glossmann, S. Y. Cho, and Y. K. Paik. Pharmacological analysis of sterol delta8-delta7 isomerase proteins with [3h]ifenprodil. *Mol Pharmacol.*, 54(3):591–8., 1998.
- [118] F. F. Moebius, K. E. Soellner, B. Fiechtner, C. W. Huck, G. Bonn, and H. Glossmann. Histidine77, glutamic acid81, glutamic acid123, threonine126, asparagine194, and tryptophan197 of the human emopamil binding protein are required for in vivo sterol delta 8-delta 7 isomerization. *Biochemistry.*, 38(3):1119–27., 1999.
- [119] C. P. Morales, S. E. Holt, M. Ouellette, K. J. Kaur, Y. Yan, K. S. Wilson, M. A. White, W. E. Wright, and J. W. Shay. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet.*, 21(1):115–8., 1999.
- [120] G. C. Ness and C. M. Chambers. Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase: the concept of cholesterol buffering capacity. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 224(1):8–19., 2000.
- [121] A. Nohturfft, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. Topology of srebp cleavage-activating protein, a polytopic membrane protein with a sterol-sensing domain. *J Biol Chem.*, 273(27):17243–50., 1998.

- [122] P. Nokelainen, H. Peltoketo, R. Vihko, and P. Vihko. Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17hsd7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (prap) in rat. *Mol Endocrinol.*, 12(7):1048–59., 1998.
- [123] M. J. Nowaczyk, L. M. Nakamura, B. Eng, F. D. Porter, and J. S. Wayne. Frequency and ethnic distribution of the common dhcr7 mutation in smith-lemli-opitz syndrome. *Am J Med Genet.*, 102(4):383–6., 2001.
- [124] A. Nykanen, B. Haley, and P. D. Zamore. Atp requirements and small interfering rna structure in the rna interference pathway. *Cell.*, 107(3):309–21., 2001.
- [125] Thomas Ohnesorg. *Funktionelle Analyse der humanen und murinen 17beta-Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 7*. PhD thesis, Technische Universitaet Muenchen, 2005.
- [126] T. F. Osborne. Cholesterol homeostasis: clipping out a slippery regulator. *Curr Biol.*, 7(3):R172–4., 1997.
- [127] R. A. Parker, S. J. Miller, and D. M. Gibson. Phosphorylation of native 97-kda 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase from rat liver. impact on activity and degradation of the enzyme. *J Biol Chem.*, 264(9):4877–87., 1989.
- [128] C. P. Paul, P. D. Good, I. Winer, and D. R. Engelke. Effective expression of small interfering rna in human cells. *Nat Biotechnol.*, 20(5):505–8., 2002.
- [129] F. D. Porter. Human malformation syndromes due to inborn errors of cholesterol synthesis. *Curr Opin Pediatr.*, 15(6):607–13., 2003.
- [130] J. A. Porter, K. E. Young, and P. A. Beachy. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science.*, 274(5285):255–9., 1996.
- [131] H. P. Pratt, J. Keith, and J. Chakraborty. Membrane sterols and the development of the preimplantation mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol.*, 60:303–19., 1980.
- [132] M. Raff. Cell suicide for beginners. *Nature.*, 396(6707):119–22., 1998.
- [133] N. Romano and G. Macino. Quelling: transient inactivation of gene expression in neurospora crassa by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol.*, 6(22):3343–53., 1992.
- [134] B. Rosen and R. Beddington. Detection of mrna in whole mounts of mouse embryos using digoxigenin riboprobes. *Methods Mol Biol.*, 28:201–8., 1994.

- [135] C. Roux. Teratogenic action of triparanol in animals. *Arch Fr Pediatr.*, 21:451–64., 1964.
- [136] C. Roux, C. Wolf, N. Mulliez, W. Gaoua, V. Cormier, F. Chevy, and D. Citadelle. Role of cholesterol in embryonic development. *Am J Clin Nutr.*, 71(5 Suppl):1270S–9S., 2000.
- [137] H. B. Sanchez, L. Yieh, and T. F. Osborne. Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.*, 270(3):1161–9., 1995.
- [138] H. Schagger and G. von Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kda. *Anal Biochem.*, 166(2):368–79., 1987.
- [139] D. Schindelhauer, H. Hellebrand, L. Grimm, I. Bader, T. Meitinger, M. Wehnert, M. Ross, and A. Meindl. Long-range map of a 3.5-mb region in xp11.23-22 with a sequence-ready map from a 1.1-mb gene-rich interval. *Genome Res.*, 6(11):1056–69., 1996.
- [140] D. S. Schwarz, G. Hutvagner, B. Haley, and P. D. Zamore. Evidence that sirnas function as guides, not primers, in the drosophila and human rna pathways. *Mol Cell.*, 10(3):537–48., 2002.
- [141] E. Sehayek, E. Butbul, R. Avner, H. Levkovitz, and S. Eisenberg. Enhanced cellular metabolism of very low density lipoprotein by simvastatin. a novel mechanism of action of hmg-coa reductase inhibitors. *Eur J Clin Invest.*, 24(3):173–8., 1994.
- [142] K. W. Seo, R. I. Kelley, S. Okano, and T. Watanabe. Mouse tdho abnormality results from double point mutations of the emopamil binding protein gene (ebp). *Mamm Genome.*, 12(8):602–5., 2001.
- [143] K. W. Seo, H. Miyoshi, Y. Kon, and T. Watanabe. Chromosomal mapping and developmental study of tattered-hokkaido (tdho). *Mamm Genome.*, 8(8):578–80., 1997.
- [144] S. Shefer, G. Salen, A. Honda, A. K. Batta, L. B. Nguyen, G. S. Tint, Y. A. Ioannou, and R. Desnick. Regulation of rat hepatic 3beta-hydroxysterol delta7-reductase: substrate specificity, competitive and non-competitive inhibition, and phosphorylation/dephosphorylation. *J Lipid Res.*, 39(12):2471–6., 1998.
- [145] J. S. Shin, Z. Gao, and S. N. Abraham. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science.*, 289(5480):785–8., 2000.

- [146] I. Shur, O. Reish, E. Ezra, and D. Benayahu. Analysis of mesenchymal cells derived from an chondrodysplasia punctuate patient and donors. *J Cell Biochem.*, 93(1):112–9., 2004.
- [147] S. Silve, P. H. Dupuy, C. Labit-Lebouteiller, M. Kaghad, P. Chalon, A. Rahier, M. Taton, J. Lupker, D. Shire, and G. Loison. Emopamil-binding protein, a mammalian protein that binds a series of structurally diverse neuroprotective agents, exhibits delta8-delta7 sterol isomerase activity in yeast. *J Biol Chem.*, 271(37):22434–40., 1996.
- [148] K. Simons and E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature.*, 387(6633):569–72., 1997.
- [149] K. Simons and W. L. Vaz. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*, 33:269–95., 2004.
- [150] E. J. Smart, G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto, and M. P. Lisanti. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol.*, 19(11):7289–304., 1999.
- [151] E. J. Smart, Y. Ying, W. C. Donzell, and R. G. Anderson. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem.*, 271(46):29427–35., 1996.
- [152] D. W. Smith, L. Lemli, and J. M. Opitz. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. *J Pediatr.*, 64:210–7., 1964.
- [153] L. L. Smith. Cholesterol autoxidation 1981-1986. *Chem Phys Lipids.*, 44(2-4):87–125., 1987.
- [154] B. L. Song, N. B. Javitt, and R. A. DeBose-Boyd. Insig-mediated degradation of hmg coa reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.*, 1(3):179–89., 2005.
- [155] R. Sporle and K. Schughart. System to identify individual somites and their derivatives in the developing mouse embryo. *Dev Dyn.*, 210(3):216–26., 1997.
- [156] G. Sui, C. Soohoo, B. Affar el, F. Gay, Y. Shi, W. C. Forrester, and Y. Shi. A dna vector-based rnai technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(8):5515–20., 2002.
- [157] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, and F. Tomita. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/c<sup>+</sup> dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.*, 135(2):397–402., 1986.



- [158] E. B. Thompson and S. Ayala-Torres. Oxysterols and apoptosis: evidence for gene regulation outside the cholesterol pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 34(1):25–32., 1999.
- [159] C. S. Thummel. Steroid-triggered death by autophagy. *Bioessays.*, 23(8):677–82., 2001.
- [160] G. S. Tint. Cholesterol defect in smith-lemli-opitz syndrome. *Am J Med Genet.*, 47(4):573–4., 1993.
- [161] P. Tontonoz, E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, and B. M. Spiegelman. mppar gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.*, 8(10):1224–34., 1994.
- [162] S. Torn, P. Nokelainen, R. Kurkela, A. Pulkka, M. Menjivar, S. Ghosh, M. Coca-Prados, H. Peltoketo, V. Isomaa, and P. Vihko. Production, purification, and functional analysis of recombinant human and mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7. *Biochem Biophys Res Commun.*, 305(1):37–45., 2003.
- [163] B. L. Trigatti. Hepatic high-density lipoprotein receptors: roles in lipoprotein metabolism and potential for therapeutic modulation. *Curr Atheroscler Rep.*, 7(5):344–50., 2005.
- [164] D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer. Cell death in development. *Cell.*, 96(2):245–54., 1999.
- [165] N. P. Walker, R. V. Talanian, K. D. Brady, L. C. Dang, N. J. Bump, C. R. Ferez, S. Franklin, T. Ghayur, M. C. Hackett, L. D. Hammill, and et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell.*, 78(2):343–52., 1994.
- [166] C. A. Wassif, C. Maslen, S. Kachilele-Linjewile, D. Lin, L. M. Linck, W. E. Connor, R. D. Steiner, and F. D. Porter. Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause smith-lemli-opitz syndrome. *Am J Hum Genet.*, 63(1):55–62., 1998.
- [167] C. A. Wassif, P. Zhu, L. Kratz, P. A. Krakowiak, K. P. Battaile, F. F. Weight, A. Grinberg, R. D. Steiner, N. A. Nwokoro, R. I. Kelley, R. R. Stewart, and F. D. Porter. Biochemical, phenotypic and neurophysiological characterization of a genetic mouse model of rsh/smith-lemli-opitz syndrome. *Hum Mol Genet.*, 10(6):555–64., 2001.

- [168] H. R. Waterham, F. A. Wijburg, R. C. Hennekam, P. Vreken, B. T. Poll-The, L. Dorland, M. Duran, P. E. Jira, J. A. Smeitink, R. A. Wevers, and R. J. Wanders. Smith-lemli-opitz syndrome is caused by mutations in the 7-dehydrocholesterol reductase gene. *Am J Hum Genet.*, 63(2):329–38., 1998.
- [169] E. White. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.*, 10(1):1–15., 1996.
- [170] T. E. Willnow, J. Hilpert, S. A. Armstrong, A. Rohlmann, R. E. Hammer, D. K. Burns, and J. Herz. Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalyn. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 93(16):8460–4., 1996.
- [171] K. P. Wilson, J. A. Black, J. A. Thomson, E. E. Kim, J. P. Griffith, M. A. Navia, M. A. Murcko, S. P. Chambers, R. A. Aldape, S. A. Raybuck, and et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.*, 370(6487):270–5., 1994.
- [172] L. A. Woollett. Fetal lipid metabolism. *Front Biosci.*, 6:D536–45., 2001.
- [173] K. Yamaki, J. Hong, K. Hiraizumi, J. W. Ahn, O. Zee, and K. Ohuchi. Participation of various kinases in staurosporine induced apoptosis of raw 264.7 cells. *J Pharm Pharmacol.*, 54(11):1535–44., 2002.
- [174] P. L. Yeagle. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.*, 822(3-4):267–87., 1985.
- [175] P. L. Yeagle. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *Faseb J.*, 3(7):1833–42., 1989.
- [176] F. Yi, P. L. Brubaker, and T. Jin. Tcf-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem.*, 280(2):1457–64. Epub 2004 Nov 2., 2005.
- [177] C. Yokoyama, X. Wang, M. R. Briggs, A. Admon, J. Wu, X. Hua, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. Srebp-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.*, 75(1):187–97., 1993.
- [178] S. Yokoyama. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim Biophys Acta.*, 1529(1-3):231–44., 2000.
- [179] S. Yokoyama. Abca1 and biogenesis of hdl. *J Atheroscler Thromb.*, 13(1):1–15., 2006.

- [180] Y. Yoshida, K. Arimoto, M. Sato, N. Sakuragawa, M. Arima, and E. Satoyoshi. Reduction of acid sphingomyelinase activity in human fibroblasts induced by ay-9944 and other cationic amphiphilic drugs. *J Biochem (Tokyo)*., 98(6):1669–79., 1985.



# A. Anhang

## A.1. Primer

Forward (for) Primer binden an das 5'-, reverse (rev) Primer an die 3'- Seite des jeweiligen PCR-Produkts.

### A.1.1. Primer für den Expressionstest

Gen	Nummer		5'- 3'- Sequenz	Synthese
h $\beta$ Actin	47776	for	GGA TTC CTA TGT GGG CGA CGA GG	GSF
	47778	rev	CAC GGA GTA CTT GCG CTC AGG AGG	GSF
hEBP	1355	for	CTG GCC TCA GCA CCT AAG ACT GG	Metabion
	1356	rev	GCA TGA GTG AGG TGC TTC ACA GC	Metabion
hHSD17B7	1353	for	CGA AGA TGC GAA AGG TGG TTT TG	Metabion
	1354	rev	CCT GGA CAG GCC ACA TTG GAA TA	Metabion
hNSDHL	61594	for	CCA ATG AGA GAC CAA GTC GCA CG	GSF
	61595	rev	GCT CAT CAT TGG TGA TGT GAA ATG CC	GSF
m $\beta$ Actin	63729	for	GGG TCA GAA GGA CTC CTA TGT GGG	GSF
	63730	rev	CGA TCC ACA CAG AGT ACT TGC GC	GSF

### A.1.2. Primer für die Genotypisierung

Primer	Nummer		5'- 3'- Sequenz	Synthese
mEbp-wt_for	48576		CCA ACT CTG GAA AGA GTA TTC CAA GG	GSF
mEbp-mut_for	48577		CCA ACT CTG GAA AGA GTA TTC CAA GA	GSF
mEbp-wt_rev	48578		GGC ACT AGT GAG ATG CTT TAT GGC	GSF
mSry_for	60679		GTG GTG AGA GGC ACA AGT TGG C	GSF
mSry_rev	60680		CTG TGT AGG ATC TTC AAT CTC TGT GCC	GSF

### A.1.3. Primer für Klonierungen

Gen		Nr	V	5'- 3'- Sequenz	Synthese	RE
hEBP	for	0024	1	TAT AAA GCT TAC ATG ACT ACC AAC GCG GGC	Metabion	HindIII
	rev	0025	1	TTA ACT CGA GCA CCA CTC CTC AGT TCT TCT TGC TC	Metabion	XhoI
	for	55184	2	CAG TCT CGA GAT GAC TAC CAA CGC GGG CC	GSF	XhoI
	rev	56556	2	GTC AGC GGC CGC GGC CTT GGC ATC CAG CG	GSF	NotI
hHSD17B7	for	61069	1	ACT GAA GCT TAG TGT GAG TGC GCG AAG ATG C	GSF	HindIII
	rev	61070	1	GTC AGC GGC CGC GGC CTC CCA AAG TGC TGG AA	GSF	NotI
	for	56552	2	CAG TCT CGA GCG AAA GGT GGT TTT GAT CAC CG	GSF	XhoI
	rev	56862	2	GTC AGC GGC CGC TTC AGG CTT TTG	GSF	NotI
hNSDHL	for	0020	1	TAT AAA GCT TAT GGA ACC AGC AGT TAG CGA GC	Metabion	HindIII
	rev	0021	1	TTA ACT CGA GTC ACT TGA CCC TCC GCA GGT	Metabion	XhoI
hNSDHL	for	59038	2	CAG TCT CGA GCA GCA AGG GTT TGA TAA TCC CCA G	GSF	XhoI
	rev	59039	2	GTC AGC GGC CGC CAG GTG GCG AAA GCT CTG CAC GG	GSF	NotI
lacZ	for	57995	2	CAG TCT CGA GTG GCT GGA GTG CGA TCT TCC TG	GSF	XhoI
	rev	57996	2	GTC AGC GGC CGC GTT CAG ACG TAG TGT GAC GCG ATC	GSF	NotI
mHsd17b7	for	63550	1	TAT AAA GCT TAT GCG GAA GGT GGT TTT GAT CAC	GSF	HindIII
	rev	63738	1	TTA ACT CGA GCT CCA TCA GCT CGG GTG ATC C	GSF	XhoI

Vektoren (V) werden durch folgende Nummern angegeben: 1 = pcDNA3; 2 = psiCHECK-2. RE gibt die jeweilige Restriktionsschnittstelle an, über die das Insert in den entsprechenden Vektor kloniert wurde.

#### A.1.4. Primer für Vektoren

Primer	Nummer	5'- 3'- Sequenz	Synthese
pcDNA3_for	61401	GCG GTA GGC GTG TAC GGT GGG	GSF
pcDNA3_rev	61402	GGG CAA ACA ACA GAT GGC TGG	GSF
pENTR/H1/HO_for	0030	TAA TAT TTG CAT GTC GCT ATG TGT TCT G	Metabion
pENTR/H1/HO_rev	0031	GTT CGT TGC AAC AAA TTG ATA AGC A	Metabion
pENTR/U6_for	54952	GAG GGC CTA TTT CCC ATG ATT CC	GSF
pENTR/U6_rev	54953	AAG GTG TTT CGT CCT TTC CAC AAG	GSF
psiCHECK-2_for	63731	GCC AGG AGG ACG CTC CAG ATG	GSF
psiCHECK-2_rev	63732	GAC AAA CCC TAA CCA CCG CTT AAG	GSF

#### A.1.5. Primer für die quantitative RealTime-PCR

Gen	Nummer		5'- 3'- Sequenz	Synthese
hEBP	0004	for	GTG TGT GGG TTC ATT CAC CT	Metabion
	0005	rev	TCC ATG CAC ACT GTG AAG TT	Metabion
hGAPDH	3-2024-2/26	for	ATG ACA AGC TTC CCG TTC T	MWG
	50-3370-3/27	rev	AGT CAA CGG ATT TGG TCG TA	MWG
hHPRT	41-1464-1/22	for	CTT TGC TGA CCT GCT GGA	MWG
	41-1464-2/22	rev	GCC TGA CCA AGG AAA GCA	MWG
hHSD17B7	0031	for	GGA ATT CTG CCT CC	Metabion
	0032	rev	TGG AGA TTC AGG CTT TTG G	Metabion
hNSDHL	0010	for	CCC AGC TCT GAA AGG TGT AA	Metabion
	0011	rev	ATA TCG ACG CCC TCA AAG AT	Metabion
hPBGD	08-1167-1/112	for	CAC CCA CAC ACA GCC TAC TT	MWG
	08-1167-2/112	rev	CAC CAC ACT GTC CGT CTG TA	MWG
hTRF1	12-4143-4/25	for	GGA GAA ACT GGA CAG CAC AG	MWG
	12-4143-7/25	rev	CGC TGT CTT TGA CCT GAA TC	MWG
hHMGCR	1339	for	GAC CTT TCC AGA GCA AGC AC	MWG
	1340	rev	AGC TGA CGT ACC CCT GAC AT	MWG
hDHCR7	1345	for	CTG GAC CCT CAT CAA CCT GT	MWG
	1346	rev	TCA TGG CAG ATG TCA ATG GT	MWG
mAbca1	1322	for	GCA GAT CAA GCA TCC CAA CT	Metabion
	1323	rev	CGT TAC ACA GAC TGG CCA AA	Metabion
mGapdh	3-2024-3/26	for	TGA ATA CGG CTA CAG CAA CA	MWG

	3-2024-4/26	rev	ATT GTG AGG GAG ATG CTC AG	MWG
mHprt	1296	for	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GT	Metabion
	1297	rev	CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC	Metabion
mInsig2	1368	for	TCT ATG TCC GTT CTT GGT TGC	Metabion
	1369	rev	TCA CAC ACA CAC ACA CAC CAC	Metabion
mLdlr	1332	for	TCC AAT CAA TTC AGC TGT GG	Metabion
	1333	rev	GAG CCA TCT AGG CAA TCT CG	Metabion
mPparg	1324	for	AAG AGC TGA CCC AAT GGT TG	Metabion
	1325	rev	GCT TTA TCC CCA CAG ACT CG	Metabion
mScarb1	1330	for	GAG ATC CTG TGG GGC TAT GA	Metabion
	1331	rev	GCT GAG TCC GTT CCA TTT GT	Metabion
mTcf7l2	1316	for	GAC GAG CTG ATC TCC TTC AA	Metabion
	1317	rev	CGG GAT TTA TCT CGG AAA CT	Metabion
mTrf1	12-4143-1/25	for	AGA GTT TGC TGA CAC CAT CA	MWG
	12-4143-2/25	rev	GTG TTC ATC TCG CCA GAC TT	MWG

## A.2. shRNA Oligonukleotide

### A.2.1. Oligonukleotide für den Vektor pENTR/U6 für die transiente Transfektion

Oligo	Einzelstrang	5'- 3'- Sequenz
shNSDHL-1	shRNA-hNSDHL-453-top	CAC CGG GCG TCG ATA TCA AGA ATG GTT CAA GAG ACC ATT CTT GAT ATC GAC GCC C
	shRNA-hNSDHL-453-bottom	AAA AGG GCG TCG ATA TCA AGA ATG GTT CAA GAG ACC ATT CTT GAT ATC GAC GCC C
shNSDHL-2	shRNA-hNSDHL-659-top	CAC CGG AAC GGC AAG ATG AAG TTC GTT CAA GAG ACG AAC TTC ATC TTG CCG TTC C
	shRNA-hNSDHL-659-bottom	AAA AGG AAC GGC AAG ATG AAG TTC GTC TCT TGA ACG AAC TTC ATC TTG CCG TTC C
shNSDHL-3	shRNA-hNSDHL-688-top	CAC CGA ATG GGA AGA ACT TGG TGG ACT TAA CGA AGT CCA CCA AGT TCT TCC CA
	shRNA-hNSDHL-688-bottom	AAA ATG GGA AGA ACT TGG TGG ACT TCG TTA AGT CCA CCA AGT TCT TCC CAT TC



A. Anhang

---

shHSD17B7-1	shRNA-hHSD17B7-279-top	CAC CGC ATG CCT AAT CCA CAA CTA AAT TCA AGA GAT TTA GTT GTG GAT TAG GCA TG
	shRNA-hHSD17B7-279-bottom	AAA ACA TGC CTA ATC CAC AAC TAA ATC TCT TGA ATT TAG TTG TGG ATT AGG CAT GC
shHSD17B7-2	shRNA-hHSD17B7-484-top	CAC CGA ATC CAT CTC AGC TCA TCT GGA CTT CAA GAG AGT CCA GAT GAG CTG AGA TGG A
	shRNA-hHSD17B7-484-bottom	AAA ATC CAT CTC AGC TCA TCT GGA CTC TCT TGA AGT CCA GAT GAG CTG AGA TGG ATT C
shHSD17B7-3	shRNA-hHSD17B7-792-top	CAC CGA ACA GAA GCT CTG GTA TGG CTT TAA CGA AAG CCA TAC CAG AGC TTC TG
	shRNA-hHSD17B7-bottom	AAA ACA GAA GCT CTG GTA TGG CTT TCG TTA AAG CCA TAC CAG AGC TTC TGT TC
shHSD17B7-4	shRNA-hHSD17B7-58-top	CAC CGA AGC GGC TGC TGG CGG AAG ATC GAA ATC TTC CGC CAG CAG CCG C
	shRNA-hHSD17B7-58-bottom	AAA AGC GGC TGC TGG CGG AAG ATT TCG ATC TTC CGC CAG CAG CCG CTT C
shHSD17B7-5	shRNA-hHSD17B7-109-top	CAC CGA ACA TGA GCA AGG CAG AAG CTC GAA AGC TTC TGC CTT GCT CAT G
	shRNA-hHSD17B7-109-bottom	AAA ACA TGA GCA AGG CAG AAG CTT TCG AGC TTC TGC CTT GCT CAT GTT C
shHSD17B7-6	shRNA-hHSD17B7-572-top	CAC CGA ACC CTA CAG CTC TTC CAA ACG AAT TTG GAA GAG CTG TAG GG
	shRNA-hHSD17B7-572-bottom	AAA ACC CTA CAG CTC TTC CAA ATT CGT TTG GAA GAG CTG TAG GGT TC
shHSD17B7-7	shRNA-hHSD17B7-613-top 6	CAC CGT GGC TTT GAA CAG GAA CTT CCG AAG AAG TTC CTG TTC AAA GCC AC
	shRNA-hHSD17B7-613-bottom	AAA AGT GGC TTT GAA CAG GAA CTT CTT CGG AAG TTC CTG TTC AAA GCC AC

shEBP-1	shRNA-hEBP-97-top	CAC CGC TGG CCT CTT CTC TGT CAC ATT CAA GAG ATG TGA CAG AGA AGA GGC CAG C
	shRNA-97-bottom	AAA AGC TGG CCT CTT CTC TGT CAC ATC TCT TGA ATG TGA CAG AGA AGA GGC CAG C
shEBP-2	shRNA-EBP-263-top	CAC CGA AGA CCT GCT TGG AGA CCA AGC CTT CAA GAG AGG CTT GGT CTC CAA GCA GGT C
	shRNA-EBP-263-bottom	AAA AGA CCT GCT TGG AGA CCA AGC CTC TCT TGA AGG CTT GGT CTC CAA GCA GGT CTT C
shEBP-3	shRNA-hEBP-353-top	CAC CGC AGT GTG CAT GGA AAC CAT CAT TCA AGA GAT GAT GGT TTC CAT GCA CAC TG
	shRNA-hEBP-353-bottom	AAA ACA GTG TGC ATG GAA ACC ATC ATC TCT TGA ATG ATG GTT TCC ATG CAC ACT GC
shlacZ	shRNA-lacZ-top	CAC CGC TAC ACA AAT CAG CGA TTT CGA AAA ATC GCT GAT TTG TGT AG
	shRNA-lacZ-bottom	AAA ACT ACA CAA ATC AGC GAT TTT TCG AAA TCG CTG ATT TGT GTA GC

### A.2.2. Oligonukleotide für den Vektor pENTR/H1/TO für die stabile Transfektion

Oligo	Einzelstrang	5'- 3'- Sequenz
shEBP	shRNA-EBP-top	CAC CGC TGG CCT CTT CTC TGT CAC ATT CAA GAG ATG TGA CAG AGA AGA GGC CAG C
	shRNA-EBP-bottom	AAA AGC TGG CCT CTT CTC TGT CAC ATC TCT TGA ATG TGA CAG AGA AGA GGC CAG C
shHSD17B7	shRNA-HSD17B7-top	CAC CGT GGC TTT GAA CAG GAA CTT CCG AAG AAG TTC CTG TTC AAA GCC AC
	shRNA-HSD17B7-bottom	AAAAGTGGCTTTGAACAGG
shNSDHL	shRNA-NSDHL-top	CAC CGG GCG TCG ATA TCA AGA ATG GTT CAA GAG ACC ATT CTT GAT ATC GAC GCC C

	shRNA-NSDHL-bottom	AAA AGG GCG TCG ATA TCA AGA ATG GTC TCT TGA ACC ATT CTT GAT ATC GAC GCC C
shlacZ	shRNA-lacZ-top	CAC CAA ATC GCT GAT TTG TGT AGT CGG AGA CGA CTA CAC AAA TCA GCC A
	shRNA-lacZ-bottom	AAA ATC GCT GAT TTG TGT AGT CGT CTC CGA CTA CAC AAA TCA GCG ATT T

### A.3. GC/MS

#### A.3.1. Massenspektren

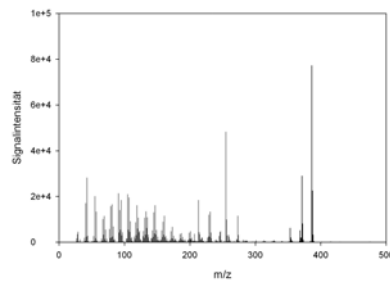


Abbildung A.1: Massenspektrum von **underivatisiertem Lathosterol**. Das Molekülion besitzt ein  $m/z$  von 386,4. Die eingesetzte Konzentration von Lathosterol betrug  $100 \mu\text{M}$ .

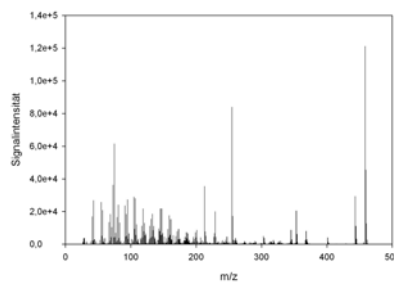
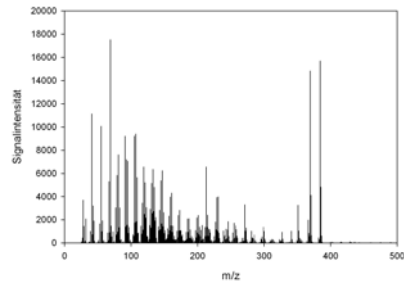
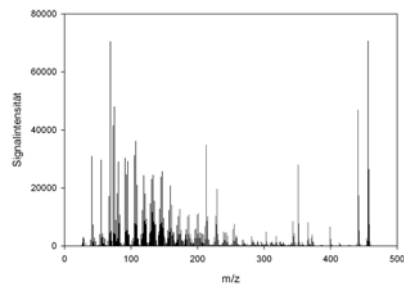


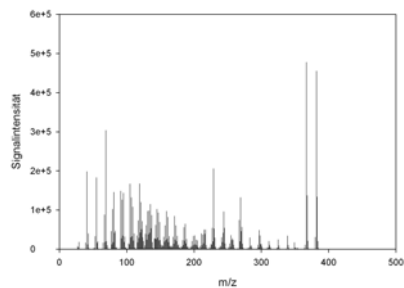
Abbildung A.2: Massenspektrum von **derivatisiertem Lathosterol**. Das Molekülion besitzt ein  $m/z$  von 358,4. Die eingesetzte Konzentration von Lathosterol betrug  $10 \mu\text{M}$ .



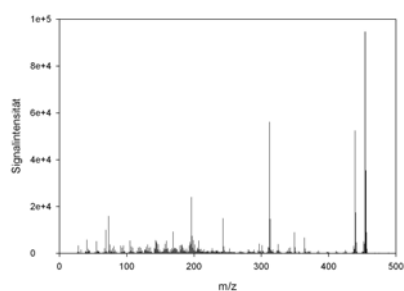
**Abbildung A.3:** Massenspektrum von **underivatisiertem Zymosterol**. Das Molekölion besitzt ein  $m/z$  von 384,4. Die eingesetzte Konzentration von Zymosterol betrug  $10 \mu\text{M}$ .



**Abbildung A.4:** Massenspektrum von **derivatisiertem Zymosterol**. Derivatisiert wurde mit MSTFA activated I. Das Molekölion besitzt ein  $m/z$  von 356,4. Die eingesetzte Konzentration von Zymosterol betrug  $10 \mu\text{M}$ .



**Abbildung A.5:** Massenspektrum von **underivatisiertem Zymosteron**. Das Molekölion besitzt ein  $m/z$  von 382,4. Die eingesetzte Konzentration von Zymosteron betrug  $10 \mu\text{M}$ .



**Abbildung A.6: Massenspektrum von derivatisiertem Zymosteron.** Derivatisiert wurde mit MSTFA activated I. Das Molekilion besitzt ein m/z von 354,4. Die eingesetzte Konzentration von Zymosteron betrug 10  $\mu\text{M}$ .

### A.3.2. Messparameter

#### Injektor

Waschschritte mit Probe	1
Ansaugschritte mit Probe	6
Injiziertes Volumen	1 $\mu\text{l}$
Spritzenvolumen	5 $\mu\text{l}$
Waschschritte mit Lösungsmittel A nach Injektion	3
Waschschritte mit Lösungsmittel B nach Injektion	3
Viskositätsverzögerung	0 Sekunden
Kolbengeschwindigkeit	Schnell
Verzögerung vor Injektion	0 min
Verzögerung nach Injektion	0 min

### Front Inlet (Split/Splitless)

Modus	Splitless
Anfangstemperatur	320 °C (On)
Druck	18,68 psi (On)
Flussrate beim Spülen	100 ml/min
Spüldauer	0,8 min
Gesamtflussrate	103 ml/min
Gassparmodus	An
Flussrate im Gassparmodus	20 ml/min
Zeit bis Gassparmodus	5 min
Gas	Helium

### Säule

Modell	Agilent 19091B-002 Ultra 2
Nominale Länge	25 m
Nominaler Durchmesser	200 µm
Nominale Filmdicke	0,11 µm
Modus	Konstanter Fluss
Initiale Flussrate	18,69 psi
Durchschnittsgeschwindigkeit	35 cm/s
Einlass	Front Inlet
Druck am Auslass	Vakuum

### Ofen

		Ramps	Rate	Final temp	Final time
		1	25,00	300	4,00
Initial temp	150 °C	2	25,00 6 325	0,00	
Maximum temp	350 °C	3	25,00 350	4,00	
Initial time	0,80 min	4	0,0	(Off)	
Equilibration time	2,00 min	Post temp	0 °C		
		Post time	0,00 min		
		Run time	16,80 min		

### Thermal Aux

Verwendung	MSD Transfer Line Heater
Beschreibung	MSD Transfer Line
Anfangstemperatur	325 °C (An)
Startzeit	11,80 min
#	Rate Final Temp Final Time
1	25,00 350 4,00
2	0,0 (Off)

### A.4. Publikationen

**Guggenberger C.**, Ilgen D. and Adamski J. (2007). Functional analysis of cholesterol biosynthesis by RNA Interference. *J Steroid Biochem Mol Biol*, im Druck





## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jerzy Adamski für die Überlassung des Themas. Durch sein Vertrauen hat er mir viel Freiraum für eigene Ideen gegeben. Ohne seine fachliche Betreuung und moralische Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei allen Mitarbeitern der AG Adamski möchte ich mich für ein äußerst angenehmes Arbeitsklima und für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt Marion Schieweg für die Unterstützung bei den *in situ*-Hybridisierungen und der Betreuung der Mäuse, Kerstin Schwerdtner für die Hilfe in der Zellkultur und Gabi Zieglmeier, unserer guten Seele des Labors, die immer hilft und mit Rat und Tat zur Seite steht. Dr. Gabriele Möller danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das kritische Lesen meiner Doktorarbeit. Dr. Cornelia Prehn hat mich in die Welt der GC/MS-Messung eingeführt. Ohne sie wäre LaTeX für mich ein Buch mit sieben Siegeln geblieben. Bedanken möchte ich mich bei Dr. Brigitte Keller dafür, dass wir zu vielen Dingen die selbe Meinung haben und für ihren Beistand nicht nur in dunklen Stunden wissenschaftlichen Schaffens und bei Marc Meier für seine unerschütterliche positive Einstellung, sein sonniges Gemüt und seine Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch an Denise Ilgen und die Praktikanten/innen, die ich während meiner Arbeit bereuen durfte; die Zusammenarbeit hat mir Spass gemacht und ich habe viel dabei gelernt.

Für seine Unterstützung am *in situ*-Roboter, beim Fotografieren der Embryonen und das offene Ohr, das er stets für meine Fragen hatte, bedanke ich mich bei Dr. Gerhard Przemec. Vielen Dank auch an Dr. Birgit Rathkolb für die Bestimmung der Cholesterinwerte und an Dr. Julia Calzada für die Zusammenarbeit bei der Phänotypisierung der *Td*-Mäuse.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden, die ich während meiner Arbeit oft sehr vernachlässigt habe und die mich mit spontanen Abendessen oder schönen Ausritten immer wieder kurzzeitig von meinem Laboralltag ablenken konnten. Mein größter Dank gilt Peter für sein Interesse an meiner Arbeit und seine liebevolle Unterstützung, die während dieser Zeit so wichtig war.