

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Phänotypische Charakterisierung des *Abcg8* p.D19H transgenen Mausmodells**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von:  
Caroline Bopp  
geb. am: 08.05.1996 in Saarbrücken

Tag der Promotion: 24.06.2022  
Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lammert  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Hartmann  
3. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Boehm

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1	Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsel .....	7
3.1.1	Cholesterinstoffwechsel .....	7
3.1.2	Gallensäurenstoffwechsel .....	12
3.1.3	Regulation des Cholesterinstoffwechsels .....	13
3.1.4	Regulation des Gallensäurenstoffwechsels .....	14
3.2	Ätiologie der Gallensteinerkrankung .....	15
3.2.1	Umweltfaktoren .....	15
3.2.2	Genetische Faktoren .....	16
3.3	Pathogenese der Cholesterinkristallisation .....	18
3.4	Fragestellung .....	20
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
4.1	<i>Abcg8</i> p.D19H Knockin-Mausmodell .....	21
4.2	Haltung und Genotypisierung der Mäuse .....	22
4.3	Makroskopische Phänotypisierung .....	23
4.4	Mikroskopische Phänotypisierung .....	24
4.5	Laborchemische Phänotypisierung .....	25
4.5.1	Biochemische Konzentrationsbestimmungen .....	25
4.5.2	Physikalisch-chemische Konzentrationsbestimmungen .....	28
4.6	Molekularbiologische Phänotypisierung .....	30
4.6.1	RNA-Isolierung .....	30

4.6.2	cDNA-Synthese .....	31
4.6.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	34
4.7	Statistik.....	36
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>
5.1	Makroskopische Phänotypen.....	37
5.1.1	Körpergewicht.....	37
5.1.2	Makroskopie der Leber .....	37
5.1.3	Lebergewicht.....	38
5.1.4	Makroskopie der Gallenblase.....	38
5.1.5	Gallenblasenvolumen.....	39
5.2	Mikroskopische Gallephänotypen.....	40
5.2.1	Qualitativ-morphologische Charakterisierung der Cholesterinkristalle .....	40
5.2.2	Semiquantitative Charakterisierung der Cholesterinkristalle .....	41
5.3	Laborchemische Phänotypen.....	43
5.3.1	Sterolkonzentrationen in Serum-, Lebergewebe- und Lebergalleproben .....	43
5.3.2	Gallensäurenprofil der Lebergalleproben .....	49
5.3.3	Cholesterin,- und Gallensäurenkonzentrationen in Gallenblasengalleproben .....	52
5.4	Molekularbiologische Phänotypen .....	53
5.4.1	Hepatische Genexpression .....	53
5.4.2	Intestinale Genexpression .....	55
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
6.1	Gallephänotyp .....	57
6.2	Serumphänotyp.....	59
6.3	Leberphänotyp.....	62
6.4	Darmphänotyp .....	65
6.5	Gallenblasenphänotyp .....	66
6.6	Synopsis.....	67

<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATION</b> .....	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>85</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>86</b>

# Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1. VENN-DIAGRAMM ZUR GALLENSTEINBILDUNG.....	6
ABBILDUNG 2. FLIEßSCHEMA ZUM CHOLESTERINSTOFFWECHSEL.....	7
ABBILDUNG 3. TERNÄRES PHASENDIAGRAMM NACH ADMIRAND UND SMALL, 1968.....	19
ABBILDUNG 4. DNA-KONSTRUKT ZUR GENERIERUNG DER <i>ABCG8</i> P.D19H KNOCKIN-MÄUSE.....	21
ABBILDUNG 5. REAKTIONS- UND TEMPERATURSCHRITTE DER REVERSE TRANSKRIPTION.....	31
ABBILDUNG 6. REAKTIONS- UND TEMPERATURSCHRITTE DER BETA-AKTIN-PCR (25 ZYKLEN).....	32
ABBILDUNG 7. GELELEKTROPHORESE NACH BETA-AKTIN-PCR.....	33
ABBILDUNG 8. KÖRPERGEWICHT.....	37
ABBILDUNG 9. RELATIVES LEBERGEWICHT.....	38
ABBILDUNG 10. MAKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON GALLENBLASEN.....	38
ABBILDUNG 11. GALLENBLASENVOLUMINA.....	39
ABBILDUNG 12. MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON CHOLESTERINKRISTALLEN.....	41
ABBILDUNG 13. MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON CHOLESTERINFLÜSSIGKRISTALLEN.....	41
ABBILDUNG 14. SERUMKONZENTRATIONEN DER STEROLE (NORMALE DIÄT).....	44
ABBILDUNG 15. HEPATISCHE STEROLKONZENTRATIONEN (NORMALE DIÄT).....	45
ABBILDUNG 16. BILIÄRE STEROLKONZENTRATIONEN (NORMALE DIÄT).....	46
ABBILDUNG 17. SERUMKONZENTRATIONEN DER STEROLE (LITHOGENE DIÄT).....	47
ABBILDUNG 18. HEPATISCHE STEROLKONZENTRATIONEN (LITHOGENE DIÄT).....	48
ABBILDUNG 19. BILIÄRE STEROLKONZENTRATIONEN (LITHOGENE DIÄT).....	48
ABBILDUNG 20. BILIÄRE GALLENSÄURENKONZENTRATIONEN (NORMALE DIÄT).....	49
ABBILDUNG 21. RELATIVE KONZENTRATIONEN DER GALLENSÄURENSPEZIES (NORMALE DIÄT).....	50
ABBILDUNG 22. BILIÄRE GALLENSÄURENKONZENTRATIONEN (LITHOGENE DIÄT).....	50
ABBILDUNG 23. RELATIVE KONZENTRATIONEN DER GALLENSÄURENSPEZIES (LITHOGENE DIÄT).....	51
ABBILDUNG 24. LIPIDKONZENTRATIONEN UND CSI IN DEN GALLENBLASENGALLEPROBEN.....	52
ABBILDUNG 25. RELATIVE GENEXPRESSION IN DER LEBER.....	54
ABBILDUNG 26. RELATIVE GENEXPRESSION IM DUODENUM.....	55
ABBILDUNG 27. RELATIVE GENEXPRESSION IM JEJUNUM.....	56
ABBILDUNG 28. RELATIVE GENEXPRESSION IM ILEUM.....	56

# Tabellenverzeichnis

TABELLE 1. LITH-LOCI.....	16
TABELLE 2. ZUSAMMENSETZUNG DER NORMALEN UND DER LITHOGENEN MAUS-DIÄT.....	22
TABELLE 3. KLASSIFIKATION DER CHOLESTERINKRISTALLE.....	24
TABELLE 4. PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE CHOLESTERINBESTIMMUNG.....	27
TABELLE 5. PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE PHOSPHOLIPIDBESTIMMUNG.....	27
TABELLE 6. PIPETTIERSCHEMA FÜR DIE GALLENÄURENBESTIMMUNG.....	27
TABELLE 7. STEROL- UND GALLENÄURENSPEZIES.....	29
TABELLE 8. HYDROPHOBIZITÄTSINDIZES DER GALLENÄURENSPEZIES.....	29
TABELLE 9. RT-MASTERMIX.....	31
TABELLE 10. REAKTIONSANSATZ FÜR DIE BETA-AKTIN-PCR.....	32
TABELLE 11. GENSPEZIFISCHER REAKTIONSANSATZ FÜR DIE QPCR.....	34
TABELLE 12. ANZAHL GALLEPROBEN MIT BESTIMMTEN CHOLESTERINKRISTALLARTEN.....	40
TABELLE 13. SEMIQUANTIFIZIERUNG DER FLÜSSIGKRISTALLE IN GALLEPROBEN DER WEIBCHEN.....	41
TABELLE 14. SEMIQUANTIFIZIERUNG DER FLÜSSIGKRISTALLE IN GALLEPROBEN DER MÄNNCHEN.....	42

# Formelverzeichnis

FORMEL 1. LAMBERT-BEER'SCHES GESETZ.....	25
FORMEL 2. BERECHNUNG DES CHOLESTERINSÄTTIGUNGSINDEX.....	28
FORMEL 3. BERECHNUNG DES $\Delta$ CT-WERTS.....	35
FORMEL 4. BERECHNUNG DES $(-2^{\Delta\Delta\text{CT}})$ -WERTS.....	35

# Abkürzungsverzeichnis

ABCA1.....	<i>Cholesterol Efflux Regulator Protein</i>
ABCB11.....	<i>Gallensäurenexportpumpe</i>
ABCB1A.....	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1a</i>
ABCB1B.....	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1b</i>
ABCB4.....	<i>Phospholipidtranslokase</i>
ABCG1.....	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 1</i>
ABCG5/8.....	<i>Sterol-Effluxpumpe Sterolin1/2</i>
Acetyl-CoA.....	<i>Acetyl-CoenzymA</i>
ApoB100.....	<i>Apolipoprotein B100</i>
ApoB48.....	<i>Apolipoprotein B48</i>
ASBT/SLC10A2.....	<i>Apikaler natriumabhängiger Gallensäurentransporter</i>
BMI.....	<i>Body Mass Index</i>
bp.....	<i>Basenpaare</i>
BRIC2.....	<i>Benigne rekurrente intrahepatische Cholestase Typ 2</i>
BSH.....	<i>Gallensäurenhydrolase</i>
CA.....	<i>Cholsäure</i>
CCK-1R.....	<i>Cholezystokinin1-Rezeptor</i>
CDCA.....	<i>Chenodeoxycholsäure</i>
cDNA.....	<i>komplementäre Desoxyribonukleinsäure</i>
Ch.....	<i>Cholesterin</i>
ChM-Kristall.....	<i>Cholesterin-Monohydrat-Kristall</i>
CI.....	<i>Konfidenzintervall</i>
CSI.....	<i>Cholesterin-Sättigungsindex</i>
C <sub>t</sub> -Wert.....	<i>threshold cycle</i>
CYP27A1.....	<i>Sterol-27-Hydroxylase</i>
CYP7A1.....	<i>Cholesterin-7<math>\alpha</math>-Hydroxylase</i>
DCA.....	<i>Desoxycholsäure</i>
DEPC.....	<i>Diethyldicarbonat</i>
DNA.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP.....	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
EDTA.....	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
FAS.....	<i>Fettsäuresynthase</i>
FGF15/19.....	<i>Fibroblasten-Wachstumsfaktor 15/19</i>
FXR.....	<i>Farnesoid-X-Rezeptor</i>
GAPDH.....	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GPAT.....	<i>Glycerolphosphat-O-Acyltransferase</i>
GS.....	<i>Gallensäuren</i>
GWAS.....	<i>Genomweite Assoziationsstudien</i>
HDL.....	<i>High Density Lipoproteine</i>

HET	Heterozygote
HI	Hydrophobizitätsindex
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA
INSIG	Insulin-induziertes Gen-Protein
KI	Knockin
LDL	Low Density Lipoproteine
LDLR	LDL-Rezeptor
LPAC	Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis
LPL	Lipoproteinlipase
LRP	LDL-Receptor-related Protein
LXR $\alpha/\beta$	Leber-X-Rezeptor $\alpha/\beta$
MCA	Muricholsäure
MD	Median
mRNA	Messenger-RNA
MUT	Mutante
MW	Mittelwert
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1
NR1H2/3	Leber-X-Rezeptor kodierendes Gen
OATP1A/1B	Organo-Anion-Transporter
PAF	attributables Risiko
PBC	Primär Biliäre Cholangitis
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PFIC2	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 2
PL	Phospholipide
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing Protein 3
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
QTL	Quantitative Trait Loci
RCT	Reverser Cholesterintransport
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	Relative Genexpression
RT	Reverse Transkription
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SCAP	SREBP Cleavage-Activating Protein
SD	Standardabweichung
SHP	Small Heterodimer Partner
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SR-B1	Scavenger Receptor Class B, type 1
SRE	Sterolregulationselement
SREBP1a/2	Sterolregulationselement-bindende Proteine
TCA	Taurocholsäure

TICE .....	<i>Transintestinale Cholesterinexkretion</i>
TL.....	<i>Gesamtlipidkonzentration</i>
TM6SF2.....	<i>Transmembrane 6 Superfamily Member 2</i>
TMD.....	<i>Transmembrandomäne</i>
UDCA.....	<i>Ursodeoxycholsäure</i>
VLDL.....	<i>Very Low Density Lipoproteine</i>
WT.....	<i>Wildtyp-Maus</i>

# 1 Zusammenfassung

Die Gallensteinerkrankung betrifft mehr als 10 % der Erwachsenen in Europa und Amerika. Das individuelle Krankheitsrisiko wird durch zahlreiche Umweltfaktoren und Risikogenvarianten bestimmt. Eine bedeutsame Risikogenvariante für die Gallensteinerkrankung ist der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus. Das *ABCG8*-Gen kodiert für den Halbtransporter ABCG8, der mit ABCG5 den Heterodimer ABCG5/8 bildet. ABCG5/8 ist eine Effluxpumpe, die in der apikalen Membran von Hepatozyten, Cholangiozyten und Enterozyten lokalisiert ist und Cholesterin sowie Phytosterine in die Galle beziehungsweise in das Darmlumen sezerniert. Phytosterine sind pflanzliche Cholesterinanaloga, die mit der Nahrung aufgenommen werden und vielfältig mit dem Cholesterinstoffwechsel interferieren. Die Funktion der ABCG5/8-Effluxpumpe ist essenziell, um die Zellen vor einer Phytosterinakkumulation sowie deren Folgen für den Cholesterinstoffwechsel zu schützen.

In unserer Arbeitsgruppe war ein transgenes Mausmodell mit dem *Abcg8* p.D19H-Polymorphismus generiert worden, um die Auswirkungen der Risikogenvariante auf die ABCG5/8-Funktion und den Cholesterinstoffwechsel zu ergründen. Die *Abcg8* p.D19H Knockin-Mäuse wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit phänotypisiert und hinsichtlich der wichtigsten Organe für den Cholesterinstoffwechsel untersucht. Hierfür wurden die Gallenblasen entnommen, das Gallenblasenvolumen bestimmt und die Gallenblasengalle mikroskopisch und laborchemisch analysiert. Des Weiteren wurden Serum-, Leber- und Darmgewebeproben gewonnen. Anhand der Leber- und Darmgewebeproben wurden Expressionsanalysen von relevanten Genen des Cholesterin- und Fettstoffwechsels durchgeführt. Außerdem wurden die Konzentrationen bestimmter Sterol- und Gallensäurenspezies aus Serum-, Leber- und Gallenproben der Knockin-Mäuse bestimmt und im Rahmen dieser Doktorarbeit ausgewertet. Die Wildtyp-Mäuse des gleichen Wurfs dienten stets als Kontrollen.

Die Untersuchungen zeigten bei den Knockin-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen größere Gallenblasenvolumina. Zudem waren in der Gallenblasengalle der Knockin-Mäuse die Cholesterinkonzentrationen höher und die Menge an Flüssigkristallen größer. Bemerkenswerterweise waren in den Leber- und Serumproben der Knockin-Mäuse die Phytosterinkonzentrationen erhöht. Die hepatische *Acat2*- und *Tm6sf2*-Expression waren bei den Knockin-Mäusen reprimiert.

Der beschriebene Phänotyp der Knockin-Mäuse führt zu der Hypothese vom Funktionsdefizit der ABCG5/8-Effluxpumpe infolge des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus. Für diese Hypothese sprechen

zwei Beobachtungen: Erstens sind die erhöhten Phytosterinkonzentrationen in der Leber und im Serum der Knockin-Mäuse ein Hinweis für die unzureichende Elimination der Sterole durch die hepatische und intestinale ABCG5/8-Effluxpumpe. Zweitens deuten die größeren Gallenblasenvolumina bei den Knockin-Mäusen auf eine Cholesterinakkumulation in der Gallenblasenwand hin, was auf die unzureichende Sterolelimination durch ABCG5/8 auf der Ebene der Cholangiozyten hinweist. Während die beiden genannten Ergebnisse die Hypothese unterstützen, besteht *prima facie* eine Inkonsistenz zwischen der Vorstellung vom Funktionsdefizit der ABCG5/8-Effluxpumpe und der beobachteten Erhöhung der Cholesterinkonzentrationen in der Gallenblasengalle der Knockin-Mäuse. Diese Beobachtung steht allerdings nicht zwingend im Widerspruch zur Hypothese, da die aktuelle Studienlage für die Existenz einer alternativen, ABCG5/8-unabhängigen Sekretion von Cholesterin spricht. Eine ABCG5/8-unabhängige Cholesterinsekretion würde erhöhte biliäre Cholesterinkonzentrationen im Rahmen eines ABCG5/8-Funktionsdefizits erklären.

Hinsichtlich der Auswirkungen der *Abcg8* p.D19H-Variante auf die hepatische Genexpression waren *Acat2* und *Tm6sf2*, die für wichtige Proteine der VLDL-Bildung und -Sekretion kodieren, reprimiert. Dies ist in Einklang damit, dass die Sterolakkumulation bei den Knockin-Mäusen primär das hepatobiliäre System betraf und die Cholesterinkonzentrationen im Serum der Knockin-Mäuse vergleichbar waren mit den Kontrollen.

Schlussendlich resultieren aus der Phänotypisierung der Knockin-Mäuse wesentliche Erkenntnisse über die Gallensteinprädisposition infolge des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus. Diese Erkenntnisse, vorausgesetzt sie lassen sich auch an humanen Polymorphismusträgern reproduzieren, liefern erste Ansatzpunkte für eine maßgeschneiderte diätetische und pharmakologische Gallensteinprävention: Den Trägern des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus sollte zu einer geringeren Phytosterinaufnahme mit der Nahrung geraten werden, um die reduzierte ABCG5/8-Transporterfunktion nicht zu überlasten. Andernfalls können Phytosterine auf längere Sicht akkumulieren, sodass es durch phytosterininduzierte Mechanismen schließlich zur kritischen Cholesterinakkumulation im hepatobiliären System und zur Gallensteinentstehung kommen kann. Ergänzend zu den Ernährungsmaßnahmen kann eine medikamentöse Therapie mit Sterolresorptionshemmern wie Ezetimib erwogen werden. Zudem könnte über den Einsatz motilitätsfördernder Medikamente nachgedacht werden, da es bei *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern frühzeitig zur Gallenblasenhypomotilität kommt, die die Gallensteinentstehung beschleunigt.

## 2 Summary

Gallstone disease is a very common disorder among adults. The individual disease risk depends on environmental factors and several risk gene variants. One important risk gene variant is the p.D19H polymorphism in the *ABCG8* gene. *ABCG8* encodes the hemitransporter protein ABCG8, which heterodimerizes with ABCG5 to form the ABCG5/8 transporter. ABCG5/8 is localized in the apical membrane of hepatocytes, cholangiocytes and enterocytes. It transports cholesterol and plant sterols (phytosterols) into the biliary tract and the intestine. The function of the ABCG5/8 transporter is essential to protect cells from phytosterol overload that disturbs cholesterol metabolism.

Our research group generated the *Abcg8* p.D19H knockin mouse model with the aim of clarifying the consequences of the *ABCG8* p.D19H polymorphism on the function of ABCG5/8 and the cholesterol metabolism. Within the context of this doctoral thesis the knockin mice were phenotyped in detail, focussing on the organs that are mainly involved in cholesterol metabolism. Wild-type littermates served as controls. Initially a cholecystectomy was performed in order to determine the gallbladder volume and to analyse the physical chemistry of gallbladder bile. Tissue samples from liver and small intestine were removed to measure the expression of genes regulating the cholesterol metabolism. Furthermore, this thesis analysed data on specific sterol concentrations in serum, bile and liver tissue.

The studies revealed larger gallbladder volumes as well as higher cholesterol concentrations and more liquid crystals in the gallbladder bile of the knockin mice as compared to controls. Furthermore, the phytosterol concentrations in the liver and the serum of the knockin mice were increased as compared to their wild-type counterparts. Hepatic *Acat2* and *Tm6sf2* steady-state mRNA levels were repressed.

The phenotype found in the knockin mice, demonstrating hepatobiliary sterol accumulation, leads to the hypothesis of a deficient transport function of ABCG5/8. There are two reasons for this: Firstly the hepatic phytosterol accumulation is a sign for insufficient sterol elimination by the efflux pump ABCG5/8 in hepatocytes and enterocytes. Secondly, the increased gallbladder volumes suggest cholesterol accumulation in the gallbladder wall, which also indicates insufficient sterol elimination, in this case by cholangiocytes. There remained only one inconsistency between the knockin phenotype and our hypothesis. How can there be higher cholesterol concentrations and cholesterol crystals in bile when there is a deficit in the transport function of ABCG5/8? However, this is not necessarily a contradiction because there is growing evidence that an alternative ABCG5/8-independent cholesterol secretion mechanism exists.

## Summary

---

Referring to the consequences of the *ABCG8* p.D19H polymorphism on cholesterol metabolism, we noticed that *Acat2* and *Tm6sf2* were repressed in liver, leading a priori to reduced VLDL secretion. This might explain the unusual combination of sterol accumulation in the hepatobiliary system and normal sterol concentrations in serum.

Finally, the phenotypic characterisation of the knockin mouse model contributes to better understanding why carriers of the *ABCG8* p.D19H variant are highly susceptible to gallstone formation and opens new avenues for stone prevention. Should further studies in humans reproduce these findings then carriers of the polymorphism could be advised to restrict their phytosterol intake so that the ABCG5/8 transport capacity is not exceeded. Otherwise phytosterols would accumulate in the long term, which in turn might lead to critical cholesterol accumulation in the hepatobiliary system due to phytosterol-induced alterations of cholesterol metabolism. The dietary regimen could be supplemented by auxiliary treatment with the sterol absorption inhibitor ezetimibe. Finally, a possible therapy with drugs increasing gallbladder motility should be assessed in order to overcome early gallbladder dysfunction promoting gallstone formation in carriers of the *ABCG8* risk allele.

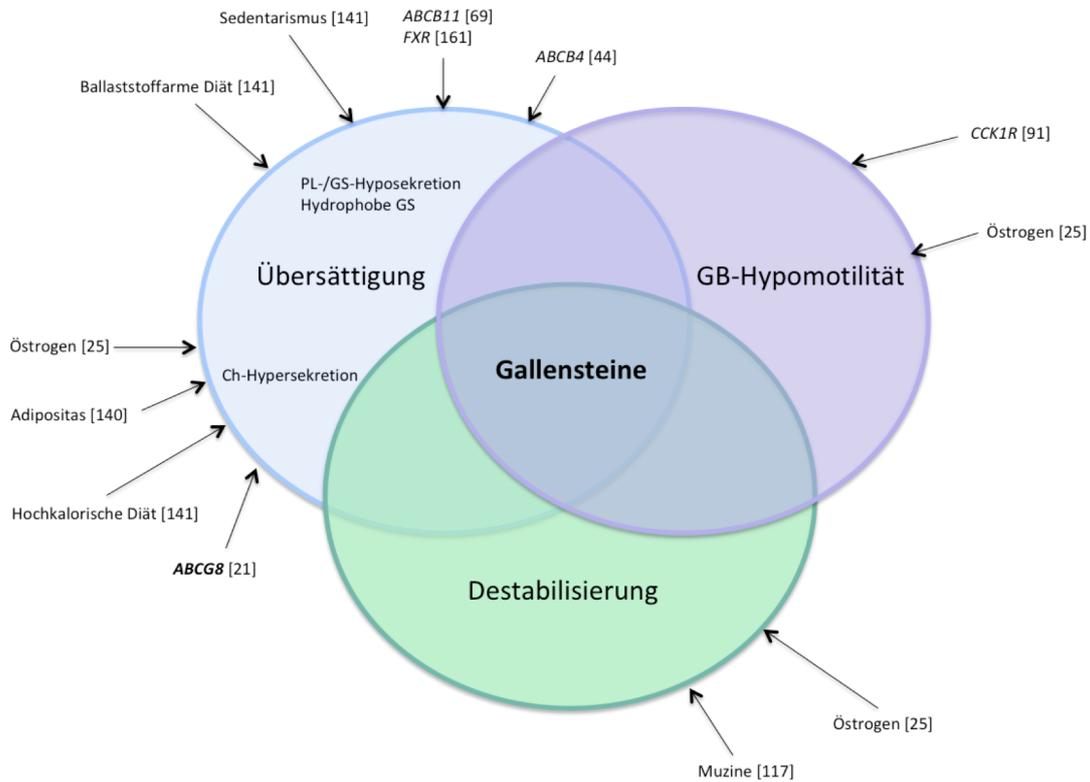
### 3 Einleitung

Gallensteine sind biliäre Fällungsprodukte, die makroskopisch als hellgelbe bis fast schwarze Konkreme unterschiedlicher Größe und Form imponieren (Portincasa et al., 2006). Die weitaus meisten Gallensteine entstehen aus Cholesterinkristallen, die aus übersättigter Gallenblasengalle präzipitieren (Paumgartner and Sauerbruch, 1991).

Eine internationale Studie – basierend auf sonographischen Untersuchungsdaten – zeigte, dass mehr als 10 % der Erwachsenen in Europa und Amerika von der Gallensteinerkrankung betroffen sind (Kratzer et al., 1999). Etwa ein Viertel der Gallensteinträger wird im Laufe des Lebens symptomatisch (Lammert and Jenssen, 2018). Die typischen Symptome wie akut einsetzende starke Schmerzen im rechten Oberbauch oder Epigastrium, Übelkeit und Fieber entstehen durch eine Gallenblasenentzündung oder eine Gallengangsobstruktion mit begleitender Gallengangsentzündung (Diehl et al., 1990). Im schlimmsten Fall können aus einer Gallensteinerkrankung lebensbedrohliche Komplikationen wie eine biliäre Sepsis oder eine biliäre Pankreatitis resultieren (Gutt et al., 2018). Die Gallensteinerkrankung ist in den westlichen Ländern die gastrointestinale Krankheit mit der höchsten Hospitalisierungsrate (Portincasa et al., 2006).

Die Gallenblasenentfernung ist seit vielen Jahrzehnten die Therapie der Wahl bei symptomatischem Gallensteinleiden (Lammert and Jenssen, 2018). Die erste Cholezystektomie wurde 1882 in Berlin von Carl Langenbuch durchgeführt (Traverso, 1976). 100 Jahre später wurde von dem Erlanger Chirurgen Erich Mühe das laparoskopische Verfahren der Cholezystektomie eingeführt (Reynolds, 2001). In Deutschland werden jährlich 180 000 Patienten cholezystektomiert (Lammert and Jenssen, 2018). Allen Bemühungen um Vermeidung der invasiven Gallenblasenentfernungen zum Trotz gibt es bisher keine Leitlinienempfehlungen zur Gallensteinprophylaxe. Die Schwierigkeit bei der Suche nach prophylaktischen Therapieansätzen liegt in der Komplexität der Krankheitsätiologie: In Abbildung 1 sind zahlreiche exogene und genetische Risikofaktoren dargestellt, die miteinander interagieren und Einfluss auf die drei Schlüsselmechanismen der Gallensteinbildung – Übersättigung, Destabilisierung und Stase der Gallenflüssigkeit – haben (Paumgartner and Sauerbruch, 1991). Hinzukommt, dass die Kombination und Gewichtung der verschiedenen Risikofaktoren individuell verschieden ist.

In den folgenden einleitenden Abschnitten wird der bisherige Kenntnisstand zur komplexen Ätiologie und Pathogenese der Gallensteinerkrankung zusammengefasst.



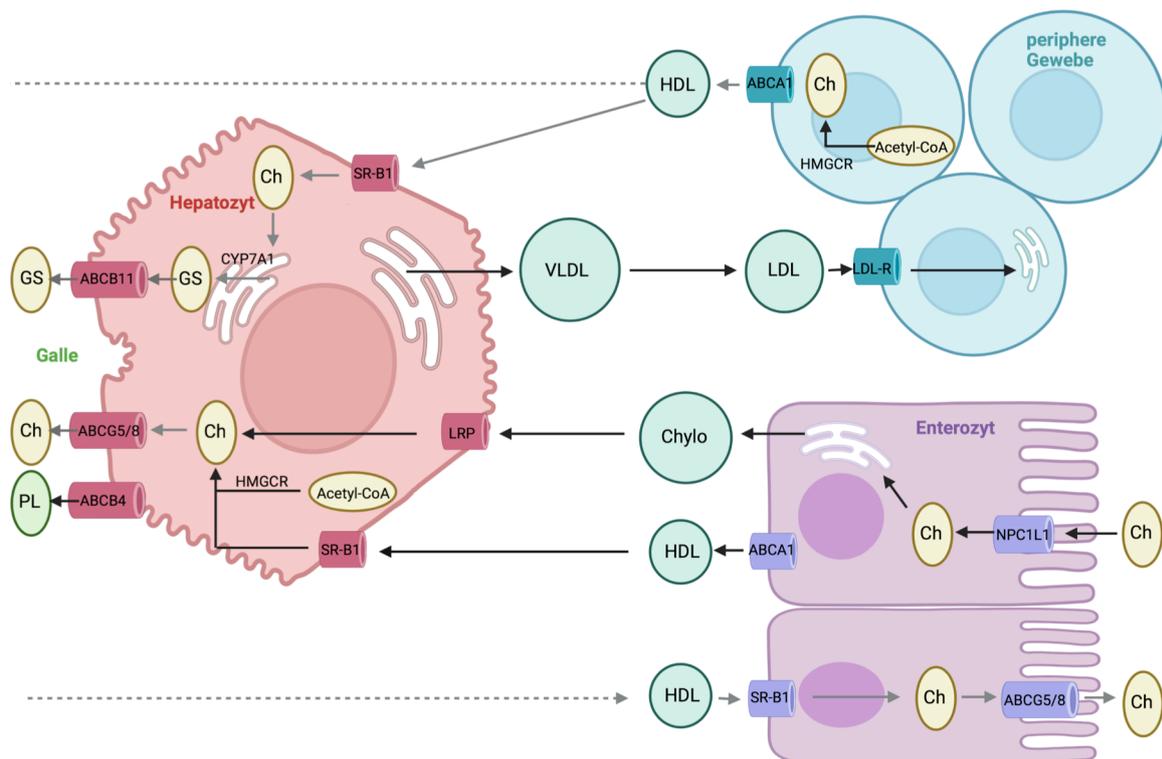
**Abbildung 1. Venn-Diagramm zur Gallensteinbildung.**

In Anlehnung an Wang et al., 2010 repräsentiert dieses Venn-Diagramm die drei Schlüsselmechanismen der Gallensteinbildung: Gallenblasenhypomotilität, Übersättigung und Destabilisierung der Gallenflüssigkeit. Die biliäre Cholesterinübersättigung kann durch Cholesterin (Ch)-Hypersekretion sowie Phospholipid (PL)- und Gallensäuren (GS)-Hyposekretion entstehen. Zudem hat die Hydrophobizität der Gallensäuren Auswirkungen auf die Cholesterinlöslichkeit. Die Schlüsselmechanismen der Gallensteinentstehung werden durch Umweltfaktoren sowie Mutationen in bestimmten Genen beeinflusst, was durch die Pfeile dargestellt wird.

### 3.1 Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsel

Für das Verständnis der komplexen Ätiologie und Pathogenese der Gallensteinerkrankung sind der Cholesterin- und der Gallensäurenstoffwechsel von Bedeutung. Die Abbildung 2 bietet einen Überblick über die wichtigsten Transporter, Enzyme und Transkriptionsfaktoren, die in den Cholesterinstoffwechsel involviert sind.

#### 3.1.1 Cholesterinstoffwechsel



**Abbildung 2. Fließschema zum Cholesterinstoffwechsel.**

Der Cholesterin-Influx wird durch die schwarzen Pfeile dargestellt und beschreibt die Cholesterinsynthese aus Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) unter Mitwirkung des Schrittmacherenzym 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGCR) sowie die Cholesterinabsorption aus dem Darmlumen über das ‚Niemann Pick C1 Like 1 Protein‘ (NPC1L1) und den ‚Scavenger Receptor Class B type 1‘ (SR-B1) in den Enterozyten. Der Cholesterin-Efflux, mit grauen Pfeilen gekennzeichnet, beginnt mit dem HDL-gebundenen Transport von überschüssigem Cholesterin aus den peripheren Geweben zu den Hepatozyten und Enterozyten (gestrichelter Pfeil). Sowohl die Hepatozyten als auch die Enterozyten können das überschüssige Cholesterin mithilfe des ABCG5/8-Transporters in die Galle respektive in das Darmlumen sezernieren. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

### ***Cholesterinsynthese***

Cholesterin ist für die Funktion des menschlichen Organismus unentbehrlich (Porter, 2008). Es spielt eine Rolle als Membranlipid, als Vorstufe der Steroidhormone, der Vitamin-D-Hormone und der Gallensäuren (Groen et al., 2014). Nahezu jede Körperzelle besitzt die Fähigkeit Cholesterin aus Acetyl-CoenzymA (Acetyl-CoA) zu synthetisieren. Als wichtige Intermediate der Cholesterinsynthese sind 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA (HMG-CoA), Mevalonat, Squalen, Lanosterol und Lathosterol oder Desmosterol zu nennen (Mazein et al., 2013). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterinsynthese ist die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonat, die durch das Enzym HMG-CoA-Reduktase (HMGCR) katalysiert wird (Goldstein and Brown, 1990). Statine sind HMGCR-Inhibitoren, die als Abkömmlinge von Pilzmetaboliten Ende des letzten Jahrhunderts entdeckt wurden (Alberts, 1988). Sie sind in der Therapie der Atherosklerose von großer Relevanz, da sie die ‚Low Density Lipoprotein‘ (LDL)-Konzentrationen im Serum sowie das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse senken (Rodriguez et al., 2017).

### ***Cholesterinabsorption***

Neben der sehr energieaufwändigen Cholesterinsynthese kann das mit der Nahrung aufgenommene Cholesterin als zweite wichtige Cholesterinquelle genutzt werden. Zwei Proteine in der apikalen Enterozytenmembran, das ‚Niemann-Pick C1 Like 1 Protein‘ (NPC1L1) und der ‚Scavenger Receptor Class B type 1‘ (SR-B1), vermitteln die Absorption des diätetischen Cholesterins. SR-B1 vermittelt die Cholesterinaufnahme aus den gemischten Mizellen im Darmlumen in die apikale Enterozytenmembran (Nguyen et al., 2009). NPC1L1 ist im nächsten Schritt für die Internalisierung von Cholesterin aus der Enterozytenmembran in den intrazellulären Raum verantwortlich (Ge et al., 2008). Die Bedeutsamkeit von NPC1L1 für die Cholesterinabsorption wird anhand von NPC1L1-defizienten Mäusen klar: Diese wiesen nach oraler Verabreichung von <sup>14</sup>C-Cholesterin deutlich niedrigere Isotopenkonzentrationen im Serum auf als die Kontrollen (Altmann et al., 2004). NPC1L1 ist zudem Angriffsort für den Sterolresorptionshemmer Ezetimib (Ge et al., 2008).

Das absorbierte Cholesterin gelangt über zwei verschiedene Transportwege von den Enterozyten zu den Hepatozyten. Es gibt den Transport von Cholesterin mit den Chylomikronen, die zudem aus Triglyceriden und Apolipoprotein B48 (ApoB48) bestehen (Cartwright et al., 2000). Die Enterozyten sezernieren die Chylomikronen in die Lymphe, von wo sie zuerst in den großen Kreislauf gelangen und Triglyceride an die peripheren Gewebe abgeben. Die triglyceridarmen und cholesterinreichen Chylomikronen-Remnants erreichen schließlich die Leber und werden über das LDL-Rezeptor-verwandte Protein (LRP) aufgenommen (Brown et al., 1981). Den limitierenden Schritt für die Chylomikronenbildung stellt die Cholesterinveresterung mithilfe der Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT2)

dar. ACAT2-defiziente Mäuse weisen unter cholesterinreicher Diät geringere Cholesterinkonzentrationen im Serum auf als die Kontrollen (Buhman et al., 2000). Der alternative Transportweg für Nahrungscholesterin vom Enterozyten zum Hepatozyten involviert das Cholesterin Efflux Regulator Protein ABCA1. ABCA1 ist eine Phospholipidtranslokase, die die Akkumulation von Phospholipiden im äußeren Membranblatt und schließlich die Ablösung eines Vorläufers der ‚High Density Lipoproteine‘ (prä-HDL) induziert (Vedhachalam et al., 2007). Die prä-HDL werden von den Hepatozyten über den gleichen Rezeptor SR-B1 aufgenommen, der in der Dünndarmmukosa für die Cholesterinabsorption aus den gemischten Mizellen verantwortlich ist (Shen et al., 2018).

### ***Cholesterinverteilung an die peripheren Gewebe***

Die Leber ist der Ausgangspunkt für die Cholesterinverteilung an die peripheren Gewebe. Die Hepatozyten sezernieren Cholesterin in Form von ‚Very Low Density Lipoproteinen‘ (VLDL) ins Blut. Die VLDL enthalten zudem Triglyceride und Apolipoprotein B100 (ApoB100). Die Triglyceride werden durch Interaktion mit der endothelgebundenen Lipoproteinlipase (LPL) an die Gewebe abgegeben (Brown et al., 1981). Die übergebliebenen cholesterinreichen Lipoproteine, die LDL, werden schließlich von den Zellen über den LDL-Rezeptor (LDLR) aufgenommen (Brown and Goldstein, 1986). Für die Entdeckung des LDL-Rezeptor-vermittelten Endozytosemechanismus und für die Aufklärung der LDLR-assoziierten Familiären Hypercholesterinämie wurden Brown und Goldstein 1985 mit dem Nobelpreis geehrt. Im Rahmen der LDL-Endozytose gibt es ein weiteres wichtiges Protein: Die Proproteinconvertase PCSK9 wird von Hepatozyten gebildet und hemmt den vesikulären Rücktransport von LDLR in die Zellmembran (Lagace et al., 2006). Funktionsgewinnmutationen im *PCSK9*-Gen führen wie Funktionsverlustmutationen im *LDLR*-Gen zum Krankheitsbild der autosomal-dominanten Familiären Hypercholesterinämie (Abifadel et al., 2003). Ein PCSK9-Funktionsverlust führt dagegen zu niedrigeren LDL-Konzentrationen im Serum (Abifadel et al., 2003). Die ersten PCSK9-Antikörper zur Behandlung der Hypercholesterinämie wurden 2015 zugelassen (Laufs et al., 2016).

### ***Reverser Cholesterintransport (RCT)***

Die peripheren Gewebe können Cholesterin synthetisieren und werden zusätzlich durch die cholesterinreichen LDL mit Cholesterin versorgt. Überschüssiges Cholesterin können die peripheren Gewebe jedoch nicht abbauen. Sie geben es daher ABCA1- und ABCG1-vermittelt an die prä-HDL im Blutstrom ab, die über SR-B1 von den Hepatozyten und Enterozyten aufgenommen werden (Acton et al., 1996). Die Leber und der Darm sind schließlich dazu in der Lage das überschüssige Cholesterin durch Sekretion in den Fäzes aus dem Körper zu eliminieren. Die hepatobiliäre und die transintestinale Cholesterinexkretion werden unter dem Begriff des reversen Cholesterintransports (RCT) zusammengefasst (Brufau et al., 2011).

### ***Hepatobiliäre Cholesterinsekretion***

Die hepatobiliäre Cholesterinsekretion bezeichnet die Sekretion von überschüssigem Cholesterin aus den Hepatozyten in die Gallenkanälchen. Das überschüssige Cholesterin, das die Hepatozyten HDL-gebundenen erreicht, stammt aus peripheren Geweben. Die Sekretion von Cholesterin sowie weiterer Bestandteile der Gallenflüssigkeit wird durch aktive Transporter gewährleistet: Freies Cholesterin wird über den ABCG5/8-Transporter in die Galle sezerniert (Yu et al., 2002a). Phospholipide und Gallensäuren werden von der hepatischen Phospholipidtranslokase ABCB4 (Smit et al., 1993) und der Gallensäurenexportpumpe ABCB11 (Gerloff et al., 1998) in die Gallenflüssigkeit sezerniert.

### ***Transintestinale Cholesterinexkretion (TICE)***

Die transintestinale Cholesterinexkretion (TICE) stellt einen alternativen Cholesterineliminationsweg zur hepatobiliären Elimination dar (Kruit et al., 2005). Mithilfe des ABCG5/8-Transporters in der apikalen Enterozytenmembran wird überschüssiges Cholesterin in das Darmlumen sezerniert (van der Veen et al., 2009). TICE trägt beim Menschen und bei Mäusen in einer Größenordnung von etwa 30 % zur Cholesterinausscheidung bei (Jakulj et al., 2016).

### ***Der Cholesterin- und Phytosterintransporter ABCG5/8***

Der ABCG5/8-Transporter spielt eine wichtige Rolle im Cholesterinstoffwechsel. Er gehört zu der großen Familie der ABC-Transporter, die in der Zellmembran für den energieabhängigen Export strukturell vielfältiger Substrate zuständig ist. Kennzeichnend und namensgebend für die ABC-Transporter ist die ATP-bindende Kasette (englisches Akronym ABC), bestehend aus drei hochkonservierten Sequenzen, die sich auch in anderen nukleotid-bindenden Proteinen finden: die ATP-bindende Schleife Walker A, das C-Motiv und die Mg<sup>2+</sup>-bindende Domäne Walker B (Jones and George, 1999; Jones and George, 2004). Die meisten ABC-Transporter bestehen aus einer Polypeptidkette mit insgesamt vier Domänen, zwei ABCs und zwei hexahelikalen Transmembrandomänen (Jones and George, 1999; Jones and George, 2004). Der ABCG5/8-Transporter bildet jedoch eine Ausnahme, denn er besteht aus den beiden dimerisierenden Halbtransportern ABCG5 und ABCG8 mit je einer ABC und TMD (Berge et al., 2000).

Die Entdeckung des ABCG5/8-Transporters ist Bhattacharyya und Connor zu verdanken, die 1974 den erstaunlichen Fall zweier Schwestern publizierten, welche mit ausgeprägten Xanthomen trotz normwertiger Cholesterinkonzentrationen aufgefallen waren. Es zeigte sich bei beiden Schwestern, dass die Serumkonzentrationen des Phytosterins  $\beta$ -Sitosterin um mehr als das 20fache des Normwertes erhöht waren (27,1 und 17,7 mg/dl vs. < 1mg/dl; Bhattacharyya and Connor, 1974). Phytosterine haben in pflanzlichen Zellmembranen eine vergleichbar wichtige Funktion wie Cholesterin in tierischen

Zellmembranen (Ostlund, 2002). Der Mensch kann Phytosterine nicht synthetisieren, aber er nimmt sie in geringen Mengen mit pflanzlichen Lebensmitteln auf (Ostlund, 2002). Nach der Publikation von Bhattacharyya wurden weitere Fälle dieses Krankheitsbildes publiziert, das fortan unter dem Namen Sitosterolämie bekannt war. Die Sitosterolämie-Patienten zeichnen sich durch eine erhöhte intestinale Sitosterin-Absorption und eine verminderte biliäre Sitosterin-Sekretion aus (Salen et al., 1992; Salen et al., 1989). In einigen Fällen erleiden die Patienten schon in jungen Jahren schwere kardiovaskuläre Ereignisse (Salen et al., 1992; Salen et al., 1989). Patel und seine Mitarbeiter genotypisierten zehn Familien mit Sitosterolämie und konnten dadurch den Sitosterolämie-Locus auf dem humanen Chromosomenabschnitt 2p21 kartieren (Patel et al., 1998). Auf diesem Locus entdeckten später Berge und seine Mitarbeiter die beiden Gene *ABCG5* und *ABCG8*, die Kopf an Kopf lokalisiert sind und für den heterodimeren ABC-Transporter ABCG5/ABCG8 kodieren (Berge et al., 2000). Es bestätigte sich, dass Sitosterolämie-Patienten von Mutationen in diesen beiden Genen betroffen sind (Berge et al., 2000; Lee et al., 2001).

Die Gene *ABCG5* und *ABCG8* werden in Hepatozyten, in Enterozyten und in Cholangiozyten exprimiert (Berge et al., 2000; Klett et al., 2004). Posttranslational dimerisieren die beiden Halbtransporter, die nur als Dimer in die hepatokanalikuläre Membran respektive in die apikale Enterozyten- und Cholangiozytenmembran integriert werden können (Graf et al., 2002). In den Hepatozyten ist ABCG5/8 für die Cholesterin- und Phytosterinsekretion in die Galle verantwortlich (Yu et al., 2002a). Bei *Abcg5/8* Knockout-Mäusen sind dementsprechend die Phytosterinkonzentrationen in der Leber deutlich erhöht (Lin et al., 1983; Yu et al., 2002a). In den Enterozyten sezerniert der ABCG5/8-Transporter Cholesterin und Phytosterine zurück in das Darmlumen. Daher kommt es bei Patienten mit Sitosterolämie und bei *Abcg5/8* Knockout-Mäusen zur deutlichen Phytosterin-Hyperabsorption (Gregg et al., 1986; Yu et al., 2002a). In den Cholangiozyten sezerniert der ABCG5/8-Transporter – zum Schutz der Gallenblasenwand vor Cholesterinüberladung – Cholesterin zurück in die Gallenblasengalle (Yoon et al., 2013).

Der Funktionsmechanismus des ABCG5/8-Transporters ist nicht endgültig aufgeklärt. Es gibt zwei verschiedene Modelle: Das erste Modell geht davon aus, dass Cholesterinmoleküle durch Anheben aus dem äußeren Membranblatt aktiviert werden, um den Prozess des Loslösen der Cholesterinmoleküle energetisch zu begünstigen (Small, 2003). Das zweite Modell sieht ABCG5/8 als Floppase, die Cholesterin aus dem inneren in das äußere Membranblatt transloziert (Kosters et al., 2006).

### 3.1.2 Gallensäurenstoffwechsel

Die Gallensäuren werden in der Leber durch  $7\alpha$ -Hydroxylierung und Seitenkettenkürzung aus Cholesterin gebildet (Russell and Setchell, 1992). Sie gelangen über die Gallensäurenexportpumpe ABCB11 in die Gallenflüssigkeit, in der sie viele wichtige Funktionen übernehmen: Zum einen wirken Gallensäuren als Detergenzien und können durch Mizellenbildung die Lithogenität der Gallenflüssigkeit herabsetzen sowie die intestinale Absorption fettlöslicher Substanzen steigern (Hofmann, 1999). Zum anderen steigern Gallensäuren den Gallefluss (Coleman and Rahman, 1992; Mazer and Carey, 1984). Die choloretische Wirkung der Gallensäuren ist darauf zurückzuführen, dass sie die ABCB4-vermittelte Phospholipidsekretion stimulieren (Oude Elferink and Groen, 2000; Oude Elferink et al., 1995). Die Phospholipidsekretion wiederum regt die biliäre Cholesterinsekretion an (Smit et al., 1993).

Zunehmendes Interesse gilt zudem der Interaktion der Gallensäuren mit dem intestinalen Mikrobiom (Hofmann, 1999). Die Darmbakterien produzieren Enzyme, welche die Gallensäuren chemisch verändern: Die bakterielle  $C7\alpha$ -Dehydroxylase überführt die primären Gallensäuren in die sekundären Formen Desoxycholsäure (DCA) und Lithocholsäure (LCA) und die bakterielle Gallensäurenhydrolase (BSH) führt zur Dekonjugation der Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren (Hofmann, 1999; Lazaridis et al., 2001). *Vice versa* haben die verschiedenen Gallensäurenspezies Auswirkungen auf das Darmmikrobiom. So favorisiert Taurocholsäure (TCA) das Wachstum von *Clostridium difficile* (Mullish and McDonald, 2019). Patienten mit rekurrenden *C. difficile*-Infektionen weisen häufig höhere TCA-Konzentrationen und einen geringeren Anteil an BSH-produzierenden Darmbakterien auf (Mullish and McDonald, 2019). Eine mögliche Erklärung für den Therapieerfolg von Stuhltransplantationen bei *C. difficile*-Infektion ist daher, dass die BSH-Aktivität bei den Patienten verbessert wird (Mullish and McDonald, 2019).

Gallensäuren spielen außerdem eine wichtige Rolle als Signalmoleküle im Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsel (3.1.3) sowie im Glucose- und Fettstoffwechsel (Hofmann, 1999).

Aufgrund der Bedeutsamkeit der Gallensäuren für den Organismus werden 95 % der biliär sezernierten Gallensäuren nicht direkt ausgeschieden, sondern von den Enterozyten mithilfe des apikalen natriumabhängigen Gallensäuretransporters (ASBT/SLC10A2) rückresorbiert (Ballatori et al., 2005). Die rückresorbierten Gallensäuren werden von den Hepatozyten am basolateralen Pol über den Organo-Anion-Transporter (OATP1A/1B) und den Natrium/Taurocholsäure-Cotransporter (NTCP/SLC10A1) aufgenommen und am apikalen Pol zurück in die Gallenflüssigkeit sezerniert (Slijepcevic et al., 2017). Dieser Vorgang ist bekannt unter dem Namen enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren.

### 3.1.3 Regulation des Cholesterinstoffwechsels

Die Cholesterinsynthese und -absorption auf der einen und die Cholesterinelimination auf der anderen Seite müssen gut aufeinander abgestimmt sein, denn jegliche Störung der Cholesterinhomöostase hat schwerwiegende Konsequenzen. Ein Cholesterinüberschuss führt zur Bildung schädlicher Cholesterinkristalle, die bei der Entstehung der beiden Volkskrankheiten, Atherosklerose und nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH), eine wichtige Rolle spielen (Baumer et al., 2017; Ioannou et al., 2019). Ein Cholesterinmangel beeinträchtigt die Membranintegrität und die Zellproliferation (Porter, 2008).

Zwei Familien von Transkriptionsfaktoren sind für die Cholesterinhomöostase besonders wichtig. Es handelt sich um die Sterolregulationselement-bindenden Proteine (SREBP1a/2), die von *SREBP1/2* kodiert werden (Brown and Goldstein, 1997), und die Leber-X-Rezeptoren (LXR $\alpha/\beta$ ), die von *NR1H2/3* kodiert werden (Janowski et al., 1996). SREBP1a/2 und LXR $\alpha/\beta$  sind zugleich Sensoren und Systemregler, das heißt sie werden in Abhängigkeit von der intrazellulären Cholesterinkonzentration aktiviert und leiten daraufhin Feedback-Mechanismen ein.

#### ***SREBP1a/2***

Im inaktiven Zustand ist der Transkriptionsfaktor SREBP2 zusammen mit dem ‚SREBP Cleavage-Activating Protein‘ (SCAP) über das Insulin-induzierte Gen-Protein (INSIG) an das ER gebunden (Radhakrishnan et al., 2008). Ist der Cholesteringehalt der Zelle zu gering, wird der SREBP/SCAP-Komplex vom ER losgelöst und zum Golgi-Apparat transportiert (Radhakrishnan et al., 2008). Am Golgi-Apparat wird das aktive SREBP2-Fragment abgespalten, sodass es in den Zellkern wandern und dort die Transkription von Sterolregulationselement (SRE)-tragenden Genen induzieren kann (Brown and Goldstein, 1997). SRE-tragende Gene kodieren für Proteine, die in die Cholesterinsynthese und -absorption involviert sind: *HMGCR*, *LDLR* (Brown and Goldstein, 1997), *NPC1L1* (Yu, 2008) und *PCSK9* (Jeong et al., 2008).

#### ***LXR $\alpha/\beta$***

LXR $\alpha/\beta$  ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) einen Heterodimer bildet. Die stärksten aktivierenden Liganden für LXR $\alpha/\beta$  sind Oxysterole, die bei Cholesterinüberschuss vermehrt aus Cholesterin gebildet werden (Janowski et al., 1996). Der aktivierte LXR $\alpha/\beta$ -RXR-Heterodimer induziert eine Reihe von Enzymen, die in den reversen Cholesterintransport involviert sind: *SR-BI*, *ABCA1*, *ABCG1*, *ABCG5/8*, *CYP7A1* und *APOE* (Malerod et al., 2002; Peet et al., 1998). LXR $\alpha/\beta$  ist aufgrund seiner antiatherogenen Wirkung ein interessantes Zielprotein für die medikamentöse Artherosklerosetherapie (Joseph et al., 2002). Allerdings werden den

synthetischen LXR-Liganden außerdem pro-steatotische Effekte zugeschrieben, die auf der LXR $\alpha/\beta$ -abhängigen Induktion des Gens *SREBP-1c* beruhen (Malerod et al., 2002; Peet et al., 1998; Yoshikawa et al., 2001). SREBP-1c induziert Enzyme der Fettsäure- und Triglyceridsynthese wie die Fettsäuresynthase (FAS) und die Glycerolphosphat-O-Acyltransferase (GPAT; Horton et al., 2002).

### 3.1.4 Regulation des Gallensäurenstoffwechsels

Für den Gallensäurenstoffwechsel spielt der Transkriptionsfaktor Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) eine wichtige Rolle (Sinal et al., 2000). FXR ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der durch Gallensäuren aktiviert wird und mit RXR einen Heterodimer bildet (Sinal et al., 2000). Der aktive FXR-RXR-Heterodimer stößt im Hepatozyten eine Kaskade an, die den Kernrezeptor ‚Small Heterodimer Partner‘ (SHP) involviert, und zur Repression des Gens *Cyp7a1* führt (Kliwer and Mangelsdorf, 2015). *Cyp7a1* kodiert für das Enzym Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase CYP7A1, das eine wichtige Rolle für die Gallensäurensynthese spielt (Kliwer and Mangelsdorf, 2015). Außerdem hemmt FXR die hepatische Gallensäurensynthese, indem er in den Enterozyten die Inkretion des murinen/humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktors 15/19 stimuliert (FGF15/19; Kliwer and Mangelsdorf, 2015). Die Darmhormone FGF15/19 binden an die hepatozytären Membranrezeptoren FGFR4 und  $\beta$ Klotho, und hemmen die Gallensäurensynthese (Kliwer and Mangelsdorf, 2015). Die Gallensäuren können somit auf zwei FXR-vermittelten Wegen eine negative Rückkopplung auf ihre eigene Synthese ausüben. Dadurch werden die Hepatozyten vor zu hohen Gallensäurenkonzentrationen und vor Gallensäuren-induzierten Schädigungen geschützt (Sinal et al., 2000). Diese leberprotektive Wirkung von FXR nutzt man im Rahmen der medikamentösen Therapie der Primär Biliären Cholangitis (PBC) mit Obeticholsäure, einem FXR-Agonisten (Nevens et al., 2016).

Hinzukommt, dass FXR das Gen *ABCB11* induziert, welches für die Gallensäurenexportpumpe ABCB11 kodiert. FXR stimuliert dadurch die biliäre Gallensäurenssekretion, verbessert die Cholesterinlöslichkeit der Gallenflüssigkeit und schützt so vor der Bildung von Gallensteinen (Ananthanarayanan et al., 2001; Moschetta et al., 2004).

## 3.2 Ätiologie der Gallensteinerkrankung

Die Gallensteinerkrankung zählt zu den komplexen (aus lat. *complexus*: umschlungen, verflochten) Erkrankungen. Letztere zeichnen sich dadurch aus, dass es zahlreiche genetische und exogene Risikofaktoren gibt, die miteinander interagieren (Hunter, 2005).

### 3.2.1 Umweltfaktoren

#### ***Hochkalorische und ballaststoffarme Ernährung***

In Verbindung mit dem wirtschaftlichen Aufschwung der Gesellschaften und dem Aufkommen des westlichen Ernährungsstils war in Europa, Amerika und China ein Anstieg der Gallensteinprävalenz zu verzeichnen (Stokes et al., 2011). Der westliche Ernährungsstil beinhaltet eine hochkalorische, kohlenhydratreiche Diät mit hochprozessierten und ballaststoffarmen Lebensmitteln. Kohlenhydratreiche Ernährung führt zu einer verstärkten Insulinausschüttung, welche die Cholesterinsynthese und die Cholesterinsekretion in die Galle stimuliert und somit das Gallensteinrisiko erhöht (Scragg et al., 1984; Tsai et al., 2005). Ballaststoffarme Produkte zeichnen sich durch eine lange intestinale Transitzeit aus, die durch körperliche Inaktivität zusätzlich verlängert wird. Eine langsame Darmpassage fördert die Resorption der dehydroxylierten, hydrophoberen Gallensäuren, welche die Lithogenität der Gallenflüssigkeit steigern (Heaton et al., 1993; Marcus and Heaton, 1986).

#### ***Übergewicht***

Das Übergewicht ist ein eigenständiger Risikofaktor für die Gallensteinerkrankung (Stender et al., 2013). *Prima facie* wäre ein Konfundierungseffekt durch die obengenannten Lebensstilfaktoren nahe liegend, doch Stender und Mitarbeiter konnten mithilfe der Mendelschen Randomisierung einen direkten Zusammenhang zwischen dem ‚Body Mass Index‘ (BMI) und Gallensteinen nachweisen. Die kausale Beziehung zwischen dem BMI und Gallensteinen lässt sich durch die ungünstigen metabolischen Effekte von Fettgewebshormonen, inflammatorischen Zytokinen und Insulin erklären (Grundy, 2004).

#### ***Östrogen***

Die Gallensteinerkrankung betrifft häufiger Frauen als Männer wie die historische 5-F-Regel ‚female, fertile, fat, forty, fair‘ richtig besagt (Bass et al., 2013). Das weibliche Hormon Östrogen hat einen ungünstigen Einfluss auf alle drei Schlüsselmechanismen der Gallensteinbildung: Die Cholesterinsekretion steigt, es werden mehr lithogene Gallensäuren sezerniert, die Gallenblasenmotilität wird gehemmt, und die Nukleation und das Kristallwachstum werden gefördert (Cirillo et al., 2005).

**Lebensalter**

Ein weiterer unabhängiger Risikofaktor für die Gallensteinerkrankung ist das Lebensalter (Volzke et al., 2005). In einer großen deutschen Studie war die höchste Gallensteinprävalenz in der Altersgruppe der 70 - 79 Jährigen zu verzeichnen (Volzke et al., 2005). Die Altersangabe ‚fourty‘ aus der 5-F-Regel erscheint daher überholt und sollte durch ‚family history‘ ersetzt werden, um der genetischen Komponente stärker Rechnung zu tragen (Bass et al., 2013).

**3.2.2 Genetische Faktoren**

Die beiden Chirurgen Vanderlinden und Lindeloef hatten 1965 festgestellt, dass Gallensteinträger häufiger Geschwister und nur selten Ehegatten mit Gallensteinen hatten. Sie gehörten zu den ersten, die der Gallensteinerkrankung eine genetische Komponente zuwiesen (Vanderlinden and Lindeloef, 1965). Viele Jahre später wurde eine groß angelegte Zwillingsstudie zur Gallensteinerkrankung durchgeführt, welche die Heritabilität der Erkrankung auf 25% (95 % Konfidenzintervall (CI) = 9 - 40 %) schätzte (Katsika et al., 2005; Wittenburg and Lammert, 2007).

Die Gallensteinerkrankung ist eine polygenetische Erkrankung (Katsika et al., 2005; Wittenburg and Lammert, 2007). Die ersten *Lith-Loci* und Kandidatengene (Tabelle 1) wurden mithilfe von ‚Quantitative Trait Loci‘ (QTL)-Analysen bei Kreuzungen gallensteinresistenter und -suszeptibler Zuchtmauslinien entdeckt und in murinen Gallensteinarten zusammengefasst (Lammert et al., 2001).

**Tabelle 1. Lith-Loci.**

Fünf der bekanntesten murinen Lith-Loci aus QTL-Analysen, denen Gallenstein-Kandidatengene zugeordnet wurden (Lyons and Wittenburg, 2006; Wang et al., 2018).

<b>Lith Gen</b>	<b>Kandidatengen</b>	<b>Murines Chromosom</b>	<b>Publikation</b>
<i>Lith 1</i>	<i>Abcb11</i>	Chromosom 2	(Khanuja et al., 1995)
<i>Lith 2</i>	<i>Abcc2</i>	Chromosom 19	(Paigen et al., 2000)
<i>Lith 7</i>	<i>Nr1h4 (Fxr)</i>	Chromosom 10	(Wittenburg et al., 2003)
<i>Lith 9</i>	<i>Abcg5/8</i>	Chromosom 17	(Wittenburg et al., 2003)
<i>Lith 13</i>	<i>Cck1r</i>	Chromosom 5	(Lyons et al., 2003)

**ABCB11**

Der erste *Lith-Locus* (*Lith 1*), der entdeckt wurde, befindet sich auf dem murinen Chromosom 2 (Khanuja et al., 1995). In der gleichen Region befindet sich das Kandidatengen *Abcb11*, das für die Gallensäurenexportpumpe ABCB11 kodiert (Wang et al., 2001). ABCB11-defiziente Mäuse wiesen in

Untersuchungen eine lithogene Galle mit verminderten Gallensäuren- und erhöhten Cholesterinkonzentrationen auf (Wang et al., 2001). Beim Menschen führen Mutationen im *ABCB11*-Gen zur benignen rekurrenten intrahepatischen Cholestase Typ 2 (BRIC2) oder zu dem schwerwiegenderen Krankheitsbild der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 2 (PFIC2; van Mil et al., 2004).

### ***ABCG5/8***

Der *Lith-Locus 9* auf dem murinen Chromosom 17 wurde erst 2003 entdeckt (Wittenburg et al., 2003). Er kolokalisiert mit den beiden benachbarten Genen *Abcg5* und *Abcg8*, die für den Cholesterintransporter ABCG5/8 kodieren (Lu et al., 2002; Wittenburg et al., 2005).

Beim Menschen befinden sich die orthologen Gene *ABCG5/8* auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 (Lu et al., 2002; Patel et al., 1998). In einer Genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) zur Gallensteinerkrankung entdeckte man unter den 500 000 sequenzierten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) die Assoziation mit dem SNP rs11887534 im *ABCG8*-Gen ( $p = 4,1 \times 10^{-9}$ ; Buch et al., 2007). Diese Variante des Gens *ABCG8* kodiert für Cytosin statt Guanin an Position 55 (c.55G>C), was auf Proteinebene (p.D19H) zum Austausch von Asparaginsäure gegen Histidin führt (Buch et al., 2007; Grünhage et al., 2007). Die Träger des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus haben ein erhöhtes Risiko für die Gallensteinerkrankung: Die Odds Ratio betrug 2,2 (95 % CI = 1,8 - 2,6) in der ersten GWAS von Buch et al. und 2,01 (95 % CI = 1,94 - 2,08) in der aktuellsten GWAS basierend auf Daten der britischen Biobank (Gellert-Kristensen et al., 2019). Inzwischen wurden zahlreiche GWAS zur Gallensteinerkrankung durchgeführt und einige weitere Risikogenvarianten aufgedeckt. Der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus trägt weiterhin unter allen SNPs das höchste attributable Risiko (PAF = 9,5 %) sowie das höchste relative Risiko für eine Erkrankung der Geschwister (Sibling recurrence risk ratio  $\log(\lambda_{Si}/\lambda_S) = 7,3$ ; Ferkingstad and Oddsson, 2018).

### ***ABCB4***

Im Rahmen von aktuellen GWAS wurden unter anderem zwei Varianten des Gens *ABCB4* entdeckt, die ebenfalls mit der Gallensteinerkrankung assoziiert sind: SNP rs756082276 und SNP rs756935975 (Ferkingstad and Oddsson, 2018; Gudbjartsson et al., 2015). Diesen beiden Polymorphismen, p.L445GfsX22 und p.G622E, wird ebenfalls ein gewisser Anteil am genetischen Risiko der Gallensteinerkrankung zugesprochen (PAF = 0,9 und 0,8 %; Ferkingstad and Oddsson, 2018). *ABCB4* kodiert für die hepatische Phospholipidtranslokase. Mutationen im *ABCB4*-Gen sind außerdem ursächlich für das ‚Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis‘ (LPAC)-Syndrom, welches sich durch das Auftreten von Gallensteinen bei ungewöhnlich jungen Patienten sowie intrahepatische Mikrolithiasis auszeichnet (Lammert et al., 2004; Rosmorduc et al., 2001).

### 3.3 Pathogenese der Cholesterinkristallisation

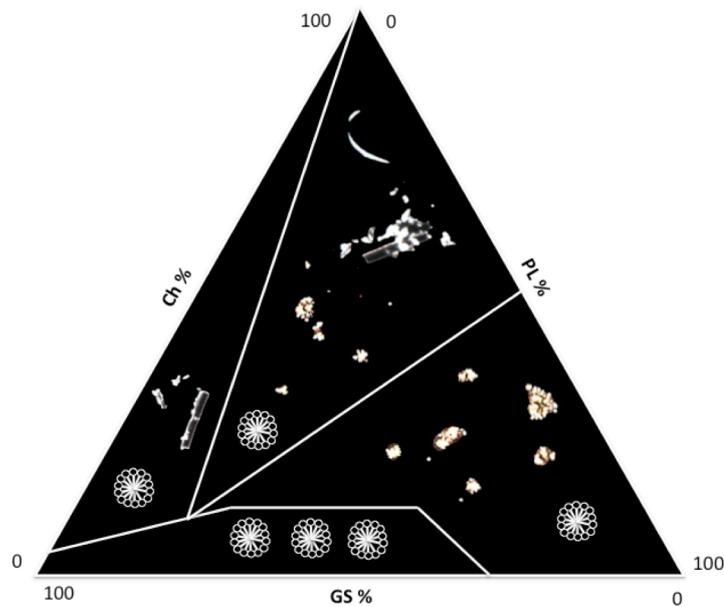
Die notwendige Bedingung für die Entstehung von Gallensteinen ist die Cholesterinkristallisation.

#### ***Cholesterinübersättigung***

Die Hauptbestandteile der Gallenflüssigkeit sind Phospholipide (PL), Gallensäuren (GS) und Cholesterin (Ch), die gemeinsam gemischte Mizellen bilden (Admirand and Small, 1968). Somit besteht die Galle normalerweise aus einer rein mizellären Phase. Erst wenn die Gallenflüssigkeit mit Cholesterin übersättigt ist, präzipitieren Cholesterinkristalle. Der kritische Wert für die lösliche Cholesterinmenge in einer Galleprobe ist abhängig vom Verhältnis der einzelnen Bestandteile an der Gesamtlipidkonzentration (TL). Je größer die Gesamtlipidkonzentrationen und je größer der molare Quotient aus  $PL/(GS+PL)$ , desto besser ist die Cholesterinlöslichkeit (Carey, 1978). Der kritische Wert für die lösliche Cholesterinmenge in einer individuellen Galleprobe kann – anhand der TL und des Quotienten  $PL/(GS+PL)$  – aus Tabellen abgelesen werden (Carey, 1978). Der Quotient aus der tatsächlichen zur kritischen Cholesterinkonzentration entspricht dem Cholesterin-Sättigungsindex (CSI) der Galleprobe (Metzger et al., 1972). Ein  $CSI > 1$  bedeutet, dass der tatsächliche den kritischen Wert für die Cholesterinkonzentration übersteigt und dass Cholesterinkristalle präzipitieren können (Admirand and Small, 1968).

#### ***Cholesterinkristallarten***

Die Cholesterinkristalle, die aus übersättigter Gallenflüssigkeit ( $CSI > 1$ ) präzipitieren, können verschiedene physikalische Zustände annehmen. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit bilden sich Flüssig- oder Festkristalle (Wang and Carey, 1996; Wang et al., 1997). Welche Kristallarten in einer spezifischen Galleprobe vorliegen, kann aus dem entsprechenden ternären Phasendiagramm mit den Achsen Ch %, PL % und GS % abgelesen werden (Abbildung 3; Admirand and Small, 1968). In einer Galleprobe mit hohem Gallensäurenanteil, die in der linken Zone des Diagramms abgebildet wird, entsteht neben der Mizellen-Phase eine zweite Phase mit soliden Cholesterinkristallen (Abbildung 3). In einer phospholipidreichen Gallenflüssigkeit, die in der rechten Zone abgebildet wird, bildet sich ebenfalls eine zweite Phase aus, die allerdings aus Flüssigkristallen besteht (Abbildung 3). In einer Galleprobe, deren Zusammensetzung zur mittleren Diagrammzone passt, entstehen erst kleine Flüssigkristalle, die mit der Zeit aggregieren und dann in feste plattenartige Cholesterin-Monohydratkristalle übergehen (Wang and Carey, 1996; Wang et al., 1997).



**Abbildung 3. Ternäres Phasendiagramm nach Admirand und Small, 1968.**

Auf den drei Achsen des ternären Phasendiagramms sind die relativen Konzentrationen von Cholesterin (Ch %), Phospholipiden (PL %) und Gallensäuren (GS %) aufgetragen. Anhand der drei Achsen kann die Zuordnung einer Galleprobe zu einer der vier Diagrammzonen erfolgen. Die Basis des Diagramms bildet die einphasige mizelläre Zone (CSI < 1), links befindet sich die zweiphasige Zone mit Mizellen und soliden Cholesterinkristallen, mittig liegt die dreiphasige Zone mit Mizellen und soliden sowie flüssigen Kristallen und rechts befindet sich die zweiphasige Zone mit Mizellen und Flüssigkristallen. Die Grenzen zwischen den vier verschiedenen Zonen sind abhängig von der Gesamtlipidkonzentration.

### 3.4 Fragestellung

Die Gallensteinerkrankung ist eine weltweit sehr verbreitete Erkrankung, die mitunter lebensbedrohliche Folgen wie eine biliäre Pankreatitis oder eine Sepsis haben kann. Die einzige Therapie, die den Patienten mit symptomatischem Gallensteinleiden angeboten werden kann, ist die operative Gallenblasenentfernung. Trotz intensiver Forschung gibt es bisher noch keinen prophylaktischen Therapieansatz, der die Gallensteinerkrankung und ihre Komplikationen verhindern könnte. Die Problematik liegt in der komplexen und heterogenen Krankheitsätiologie begründet: Es gibt zahlreiche exogene und genetische Risikofaktoren, deren Kombination und Gewichtung zudem individuell verschieden sind. Die Lösung kann nur in individualisierten Therapien für Patienten mit bestimmten Genvarianten und Risikokonstellation liegen. Dazu müssen die prädisponierenden Genvarianten ausreichend verstanden sein.

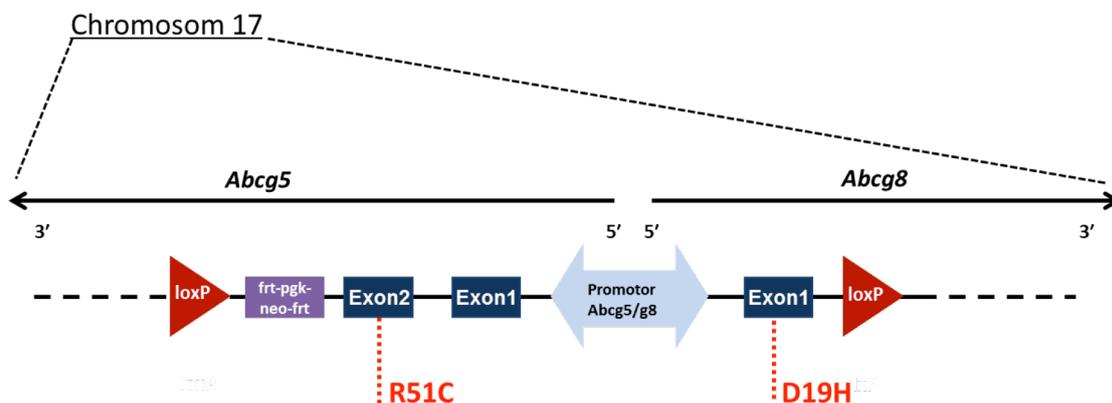
Die Genvariante mit dem höchsten attributablen Risiko in Zusammenhang mit der Gallensteinerkrankung ist die *ABCG8* p.D19H-Variante. Das *ABCG8*-Gen kodiert für den Halbtransporter ABCG8, der Teil des heterodimeren Phytosterin- und Cholesterintransporters ABCG5/8 ist. Dieser Transporter wird in der Leber und im Dünndarm exprimiert und ist in die Endstrecke der Cholesterin- und Phytosterinelimination eingebunden. Die Auswirkungen des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus auf die Transporterfunktion und insgesamt auf den Cholesterinstoffwechsel im Organismus sind noch unzureichend geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den zum *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus zugehörigen Phänotyp kennenzulernen. Zu diesem Zweck wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Knockin-Mausmodell generiert, das den p.D19H-Polymorphismus im *Abcg8*-Gen trägt. Das Mausmodell bietet für die Phänotypisierung den Vorteil, dass alle in den Cholesterinstoffwechsel involvierten Gewebe, die Leber, der Darm und die Gallenblase, untersucht werden können. Im Rahmen von humanen Studien sind diese umfangreichen Untersuchungen aufgrund der Invasivität von Biopsien nicht ohne Weiteres möglich. Zudem bietet das Mausmodell den Vorteil, dass der genetische Hintergrund und die Umweltbedingungen für die Knockin-Mäuse und die Kontrollen identisch sind. Die Phänotypisierung soll ein besseres Verständnis für die Auswirkungen des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus auf die Funktion des ABCG5/8-Transporters, den Cholesterinstoffwechsel und die Gallensteinbildung hervorbringen. Wenn die Pathophysiologie der *ABCG8* p.D19H-Mutation verstanden ist, können neue Therapieansätze für die Träger dieser Genvariante gefunden werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 *Abcg8* p.D19H Knockin-Mausmodell

In unserer Arbeitsgruppe war das *Abcg8* p.D19H Knockin-Mausmodell mit den folgenden Methoden generiert worden. Zunächst wurden der p.D19H- und der p.R51C-Polymorphismus, die miteinander im Kopplungsgleichgewicht liegen (von Kampen et al., 2013), mithilfe der BAC-basierten Rekombination in das murine *Abcg5/8*-Gen integriert. In das DNA-Konstrukt wurden zudem eine Neomycin-Resistenz-Kassette und loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase integriert (Abbildung 4). Die loxP-Erkennungssequenzen waren für die Generierung der gewebespezifischen Knockout-Mausmodelle notwendig und hatten für die Generierung des Knockin-Mausmodells keine Bedeutung.



**Abbildung 4. DNA-Konstrukt zur Generierung der *Abcg8* p.D19H Knockin-Mäuse.**

Das rekombinante DNA-Konstrukt besteht aus dem murinen *Abcg5/8*-Gen, das den p.D19H- und den p.R51C-Polymorphismus enthält sowie Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase (loxP) und eine Neomycin-Resistenz-Kassette (*frt-pgk-neo-frt*). Auf der Basis dieses Konstrukts wurde das *Abcg8* p.D19H Knockin-Mausmodell generiert.

Auf dem Weg zum transgenen Mausmodell erfolgte im nächsten Schritt die Transfektion embryonaler Stammzellen mit dem obengenannten DNA-Konstrukt. Die Zellen, die das Konstrukt aufgenommen hatten, wurden über die Neomycin-Resistenz selektiert und durch Southern-Blotting auf erfolgreiche homologe Rekombination getestet. Anschließend wurden die Stammzellen in Blastozysten injiziert und diese in scheinchwangere Mäuse (129SvC57Bl6) transferiert. Die chimären Nachkommen lieferten nach mehreren Kreuzungen heterozygote und homozygote *Abcg8* p.D19H-Knockin-Mäuse (HET und MUT). Die Wildtyp-Wurfgeschwister (WT) dienten als Kontrollen.

Die Generierung der *Abcg8* p.D19H Knockin-Mäuse erfolgte in Kooperation mit Gene Bridges (Heidelberg) und EMBLEM (Monterotondo, IT).

## 4.2 Haltung und Genotypisierung der Mäuse

Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren in einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Ein geregelter Tag-Nacht-Rhythmus (je 12 Stunden hell und dunkel) wurde eingehalten. Sie erhielten Futter (Zuchtdiät 1314M, Altromin, Lage; Tabelle 2) und Wasser *ad libitum*. Jeweils 12 Mutanten, Heterozygote und Wildtypen wurden mit einer lithogenen Spezialdiät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert, die sich insbesondere durch einen höheren Fett- und Kohlenhydratgehalt auszeichnete (Tabelle 2).

Die erste Genotypisierung erfolgte im Alter von 21 Tagen anhand einer Ohrbiopsie. Am Tag der Organentnahme wurde eine Kontroll-Genotypisierung anhand einer Gewebeprobe vom Schwanz durchgeführt. Die Genotypisierung umfasste die DNA-Isolierung (Extracta DNA Prep für PCR-Tissue, Kat.-Nr. 95091, Quantabio, Beverly, USA), die DNA-Vervielfältigung mittels PCR (Red Taq DNA Polymerase 2x Mastermix-Kit, Kat.-Nr. 5200300-1250, VWR, Haasrode, BE) und die DNA-Auftrennung mittels Gelelektrophorese.

**Tabelle 2. Zusammensetzung der normalen und der lithogenen Maus-Diät.**

Die Inhaltsstoffe der normalen Zuchtdiät 1314M und der lithogenen Spezialdiät in Gewichtsprozent (w/w %).

<b>Normale Diät (1314M, Altromin)</b>	<b>Lithogene Diät (ssniff Spezialdiät)</b>
7 % Fett (Maiskeimöl)	18% Fett (15 % Butterfett, 2 % Maiskeimöl, 1 % Cholesterin)
0 % Cholsäure	0,5 % Cholsäure
23,7 % Protein	20 % Protein
38 % Disaccharide + Polysaccharide	50 % Disaccharide
31,3 % Feuchtigkeit, Rohasche, Fasern	11,5 % Feuchtigkeit, Rohasche, Fasern

### 4.3 Makroskopische Phänotypisierung

Alle makroskopischen Organuntersuchungen und die Gewebeprobeentnahmen erfolgten am toten Tier. Die Experimente wurden gemäß Tierschutzgesetz durchgeführt und durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt (TV28/2012). Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen 3 bis 6 Monate alt.

Der Tod der Tiere erfolgte in einer geschlossenen Kammer, welche den Dampf des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Forene 100%, AbbVie, North Chicago, USA) enthielt. Im Anschluss erfolgte die Laparotomie entlang der *Linea alba*, die einen ersten Blick auf die Bauchorgane gewährte. Die *Vena cava inferior* wurde zur venösen Blutentnahme exponiert. Das Serum wurde, nach Zentrifugation bei 4 °C und 4300 U/min (Eppendorf-Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg), für weitere Lipidanalysen bei – 80 °C gelagert. Die nächsten Schritte erforderten die Zuhilfenahme eines Stereomikroskops (Leica MXX, Leica Microsystems, Wetzlar) zur Darstellung der Anatomie von Leber und Gallenblase. Zur Cholezystektomie wurde der *Ductus cysticus* mit einer Pinzette abgeklemmt und distal mit einer Mikroschere durchtrennt. Die entnommenen Gallenblasen wurden hinsichtlich ihrer Größe und Farbe beurteilt und anschließend gewogen (Präzisionswaage M-prove, Sartorius, Göttingen). Das Gallenblasengewicht wurde, wie von Wang und Mitarbeiterin 1997 publiziert, mit dem Gallenblasenvolumen gleichgesetzt. Die Gallenflüssigkeit wurde aufgefangen und ein kleiner Teil (5 µl) wurde nativ mikroskopiert (4.4), während die restliche Gallenflüssigkeit für weitere Lipidanalysen (4.5.2) bei – 80 °C aufbewahrt wurde. Zuletzt erfolgte die Entnahme weiterer Gewebe wie Leber, Milz, Duodenum, Jejunum und Ileum, die schockgefroren und bei – 80 °C für Genexpressionsanalysen (4.6) kryokonserviert wurden.

## 4.4 Mikroskopische Phänotypisierung

Die frische Gallenflüssigkeit (5  $\mu$ l) wurde unter dem Mikroskop (Leica DM 5000 B Mikroskop, Leica Instruments) untersucht. Zum Nachweis von Flüssigkristallen eignete sich die Durchlichtmikroskopie und zur Darstellung der Festkristalle wurde polarisiertes Licht verwendet. Zudem wurde der Interferenzkontrast nach Nomarski für einen besseren Kontrast dicker Strukturen eingesetzt (Gerlach, 1976). Die vorhandenen Kristalle wurden nach einer Einteilung (Tabelle 3), die in Anlehnung an die Arbeit von Wang und Mitarbeitern 1997 entstand, klassifiziert. Zu den einzelnen Kristallklassen in jeder Probe wurden semiquantitative Mengenangaben (keine, wenige, viele) dokumentiert. Die Auswertung erfolgte verblindet gegenüber dem Genotyp und durch drei unabhängige Untersucher.

### **Tabelle 3. Klassifikation der Cholesterinkristalle.**

Die Definition der Kategorien erfolgte in Anlehnung an Wang et al., 1997.

---

- a** Muzine
  - b** kleine nicht-doppelbrechende Flüssigkristalle
  - c** aggregierte nicht-doppelbrechende Flüssigkristalle
  - d** fusionierte Flüssigkristalle mit Malteserkreuzen
  - e** anhydrische (bogenförmige) Cholesterinkristalle
  - f** filamentöse Kristalle
  - g+h** typische Cholesterin-Monohydratkristalle
  - i** agglomerierte Cholesterin-Monohydratkristalle
  - j+k** desintegrierte amorphe sandige Steine
  - l** runde Steine mit schwarzem Kern
-

## 4.5 Laborchemische Phänotypisierung

### 4.5.1 Biochemische Konzentrationsbestimmungen

#### ***Cholesterinbestimmung***

Zur Bestimmung der Cholesterinkonzentrationen in der murinen Gallenblasengalle wurde eine vollenzymatische Methode verwendet. Diese Methode beruht darauf, dass in einem ersten Schritt mithilfe des Enzyms Cholesterinesterase die Cholesterinester in der Probe hydrolysiert werden, sodass das gesamte Cholesterin frei vorliegt (Allain et al., 1974). Anschließend katalysiert das Enzym Cholesterinoxidase die Reaktion von Cholesterin zu Cholesten-3-on (Allain et al., 1974). Bei der Oxidationsreaktion entsteht Peroxid in äquimolarer Menge zum freien Cholesterin in der Probe (Allain et al., 1974). Die Konzentration von Peroxid kann photometrisch bestimmt werden, denn Peroxid reagiert in Gegenwart der ‘Horseradish’-Peroxidase mit Phenol und 4-Aminoantipyrin zu einem Chinonimin-Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge  $\lambda = 492$  nm liegt. Die Cholesterinkonzentration ( $c$ ) einer Probe lässt sich schließlich aus der photometrisch bestimmten Extinktion ( $E$ ), nach Abzug des Leerwerts, und der Steigung der Standardverdünnungskurve berechnen. Die Steigung der Standardverdünnungskurve entspricht dem Kehrwert des Produktes aus dem Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  und der Schichtdicke  $d$  (Formel 1).

#### **Formel 1. Lambert-Beer'sches Gesetz.**

Die Extinktion  $E$  ist das Produkt aus der Konzentration  $c$ , dem Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  und der Schichtdicke  $d$

$$E = \log \left( \frac{I_{\text{einfallend}}}{I_{\text{austretend}}} \right) = c \times \epsilon \times d$$

Zur Durchführung der obengenannten Enzymreaktionen wurde ein Kit-Reagenz (Cholesterol Enzymatic Endpoint Method, Kat.-Nr. CH200, Randox Laboratories, Crumlin, UK) verwendet, das alle obengenannten Enzyme und Substrate enthielt. In jedes Well (96-Well-Mikrotiterplatte, Kat.-Nr. 82.1582, SARSTEDT, Nümbrecht) wurden 100  $\mu$ l des Reagenzes pipettiert und je 1  $\mu$ l der Galleproben beziehungsweise der Standardverdünnungsreihe (1:1; 1:2; 1:4; 1:8) hinzugefügt (s. Tabelle 4. Pipettierschema für die Cholesterinbestimmung). Nach der Inkubation (10 min, Raumtemperatur) erfolgte die Endpunktmessung der Probenabsorption bei  $\lambda = 491$  nm im Mikroplattenleser (Sunrise<sup>TM</sup>, TECAN, Männedorf, CH). Die Analysesoftware (Magellan<sup>TM</sup>, TECAN) lieferte die Extinktionswerte, die für die gemäß Formel 1 für die Berechnung der Steigung der Standardverdünnungskurve und für die Berechnung der Cholesterinkonzentration in den Galleproben verwendet wurden. Die Proben wurden in Doppelbestimmung getestet und daraus der Mittelwert gebildet.

### ***Phospholipidbestimmung***

Die Methode zur Phospholipidbestimmung besteht erstens in der Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und Cholin, katalysiert durch die Phospholipase D (Takayama et al., 1977). Cholin wird in einem zweiten Schritt von der Cholin-Oxidase zu Betain oxidiert. Bei der Oxidation entsteht in äquimolarer Menge Peroxid, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann (vgl. ***Cholesterinbestimmung***).

In eine Mikrotiterplatte wurden pro Well 150  $\mu\text{l}$  des Reagenzes aus dem Kit für Phospholipide Manuelle Methode (Kat.-Nr. 555-752, mti-diagnostics, Idstein) pipettiert. Anschließend wurden die Standardverdünnungsreihe (1:1; 1:2; 1:4; 1:8, 1:16), die Proben (1:4 -Verdünnung) sowie die Kontrolle (0,9 % NaCl) – jeweils in Doppelbestimmung – hinzupipettiert (s. Tabelle 5. Pipettierschema für die Phospholipidbestimmung). Nach der Inkubationszeit (15 min, 37 °C) erfolgte die Endpunktmessung der Probenabsorption bei  $\lambda = 492 \text{ nm}$ . Nach Abzug des Leerwertes wurde aus den Extinktionswerten der Standardverdünnungsreihe und der Proben die Phospholipidkonzentrationen berechnet (vgl. ***Cholesterinbestimmung***).

### ***Gallensäurenbestimmung***

Die Methode zur Gallensäurenbestimmung beruht auf dem Prinzip der enzymatischen Zyklisierung. Die Zyklisierung dient zur Amplifikation des photometrischen Signals, sodass auch sehr geringe Gallensäurenkonzentrationen bestimmt werden können (Komiyama et al., 1982). Im Rahmen der Hinreaktion werden Gallensäuren mithilfe der 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und Thio-NAD zu Ketosteroiden und Thio-NADH oxidiert (Komiyama et al., 1982). In Gegenwart von NADH läuft zudem die Rückreaktion ab, die Reduktion der Ketosteroide zu Gallensäuren, welche schließlich wieder für die Hinreaktion zur Verfügung stehen (Komiyama et al., 1982). Es wird die Extinktion am Absorptionsmaximum ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) von Thio-NADH gemessen. Die Menge Thio-NADH, die insgesamt entsteht, entspricht einem Vielfachen der eingesetzten Gallensäurenkonzentration.

Im ersten Schritt wurden 100  $\mu\text{l}$  des ersten Kit-Reagenzes (Total Bile Acids Enzymatic Colorimetric Kit, Kat.-Nr. BI 3863, Randox), welches Thio-NAD enthielt, vorgelegt. Die Standardverdünnungsreihe (1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16) sowie die Proben (1:300-Verdünnung in Methanol) und Kontrollen wurden je in Doppelbestimmung hinzupipettiert. Nach der Inkubation (5 min, Raumtemperatur) wurden 30  $\mu\text{l}$  des zweiten Reagenzes mit NADH und der 3- $\alpha$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase hinzugefügt (s. Tabelle 6. Pipettierschema für die Gallensäurenbestimmung. Nach einminütiger Inkubation erfolgten – zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_1 (= t_0 + 2 \text{ min})$  – zwei Absorptionsmessungen bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$ . Die Extinktionsdifferenz  $E(t_1) - E(t_0)$  ist proportional zur Gallensäurenkonzentration.

**Tabelle 4. Pipettierschema für die Cholesterinbestimmung.**

	Kontrolle	Standard	Probe
0,9 % NaCl (µl)	1	0	0
Standard CHOL CAL* (µl)	0	1	0
Probe (µl)	0	0	1
Reagenz (µl)	100	100	100

\* Kit-Standard Cholesterin 203 mg/dl (5,27 mmol/l)

**Tabelle 5. Pipettierschema für die Phospholipidbestimmung.**

	Kontrolle	Standard	Probe
0,9 % NaCl (µl)	1	0	0
Standard PL* (µl)	0	1	0
Probe 1:4 (µl)	0	0	1
Reagenz (µl)	150	150	150

\* Kit-Standard Phospholipide 300 mg/dl (3,87 mmol/l)

**Tabelle 6. Pipettierschema für die Gallensäurenbestimmung.**

	Kontrolle	Standard	Probe
Reagenz 1 (µl)	100	100	100
Methanol (µl)	1,5	0	0
Standard TCA* (µl)	0	1,5	0
Probe (µl)	0	0	1,5
Reagenz 2 (µl)	30	30	30

\* Taurocholsäure-Standard (1:1) 160 µmol/l

### ***Berechnung des Cholesterinsättigungsindex***

Der Cholesterinsättigungsindex (CSI) entspricht dem Verhältnis der tatsächlichen zur kritischen Cholesterinkonzentration einer Galleprobe. Die tatsächliche Cholesterinkonzentration einer Galleprobe wurde mithilfe der obengenannten Methode gemessen und in mol % an den Gesamtlipiden (TL) umgerechnet, da auch die kritische Cholesterinkonzentration in mol % angegeben wird.

Die kritische Cholesterinkonzentration einer individuellen Galleprobe, ab welcher die Cholesterinlöslichkeit überschritten wird, erhält man durch Interpolation zwischen zwei Werten aus den kritischen Tabellen von Carey. Die kritischen Tabellen enthalten die kritischen Cholesterinkonzentrationen von Modellgallen (Carey, 1978). In der linken Spalte der Tabelle kann der Wert ausgewählt werden, der dem Quotienten  $PL/(GS+PL)$  der individuellen Galleprobe am nächsten ist. In der ersten Tabellenzeile, in der die Gesamtlipidkonzentrationen (TL in g/dl) stehen, werden ausgehend von der Gesamtlipidkonzentration der individuellen Galleprobe der nächst tiefere und der nächst höhere Wert ( $x_1$  und  $x_2$ ) ausgewählt. Folglich lassen sich aus der Tabelle ein oberer und einen unterer Wert für die kritische Cholesterinkonzentration ( $y_1$  und  $y_2$ ) ablesen. Der entsprechende Wert für die kritische Cholesterinkonzentration der individuellen Galleprobe wird daraus interpoliert (Formel 2; Carey, 1978).

### **Formel 2. Berechnung des Cholesterinsättigungsindex.**

Die kritische Cholesterinkonzentration  $Ch$  (in mol %) einer Galleprobe mit einer bestimmten Gesamtlipidkonzentration  $TL$  (in g/dl) ergibt sich durch Interpolation aus den beiden Werten für die maximalen Cholesterinkonzentrationen ( $y_1$  und  $y_2$ ), die den Galleproben mit der nächsthöheren oder nächsttieferen Gesamtlipidkonzentration ( $x_1$  und  $x_2$ ) in der Tabelle zugeordnet sind. (Carey, 1978)

$$Ch \text{ (mol \%)} = y_1 + \left( \left( \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} \right) \times (TL - x_1) \right)$$

## 4.5.2 Physikalisch-chemische Konzentrationsbestimmungen

### ***Konzentrationsbestimmung der Sterole aus Serum-, Leber- und Galleproben***

Für diese Doktorarbeit wurden die Konzentrationen der Sterol- und Gallensäurenspezies, die in Tabelle 7 aufgelistet sind, im Labor für spezielle Lipiddiagnostik der Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Lütjohann gemessen. Die Messungen erforderten gaschromatographische Verfahren zur Trennung der verschiedenen Sterol- und Gallensäurenspezies sowie die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie zur quantitativen Konzentrationsbestimmung (Lütjohann, 2015; Mackay et al., 2014).

Die verwendeten Serum-, Lebergalle- und Leberproben stammten von Knockin-Mäusen und Kontrollen, die zur Gewinnung der Lebergalle über mehrere Stunden von Charlotte Rebholz mit einer Gallenfistel versorgt worden waren. Detaillierte Erklärungen zur Anlage der akuten Gallenfistel finden sich in der Dissertation von Charlotte Rebholz (Rebholz, 2019).

**Tabelle 7. Sterol- und Gallensäurenspezies.**

Liste der Sterol- und Gallensäurenspezies, die mithilfe gaschromatographisch-massenspektrometrischer Verfahren bestimmt wurden.

<b>Cholesterinvorläufer</b>	Lathosterin	<b>Cholesterinmetabolite</b>	7 $\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin
	Lanosterin		24-Hydroxy-Cholesterin
	Desmosterin		27-Hydroxy-Cholesterin
<b>Phytosterine</b>	Sitosterin	<b>Gallensäurenspezies</b>	Ursodeoxycholsäure
	Campesterin		Cholsäure
	Stigmasterin		Deoxycholsäure
	Sitostanol		Chenodeoxycholsäure
	Campestanol		$\alpha$ / $\beta$ / $\omega$ -Muricholsäure

### ***Berechnung des Hydrophobizitätsindex der Galleproben***

Zum Gallensäurenprofil einer Galleprobe gehören die Konzentrationen der Gallensäurenspezies sowie der daraus berechnete Hydrophobizitätsindex (HI) der Galleprobe nach Heuman. Die Gallensäurenspezies unterscheiden sich durch die Anzahl und Position der Hydroxyl-Seitengruppen und sind somit eine unterschiedlich hydrophob (Armstrong and Carey, 1982). Den individuellen Gallensäuren wurden, basierend auf deren Mobilität in der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, Hydrophobizitätsindizes zugeordnet (Tabelle 8; Heuman, 1989). Der Hydrophobizitätsindex einer individuellen Galleprobe berechnet sich aus den relativen Konzentrationen der einzelnen Gallensäurenspezies multipliziert mit deren Hydrophobizitätsindizes.

**Tabelle 8. Hydrophobizitätsindizes der Gallensäurenspezies.**

Hydrophobizitätsindizes der ionisierten Taurin-konjugierten Gallensäuren nach Heuman, 1989.

<b>Individuelle Gallensäure</b>	<b>Hydrophobizitätsindex HI</b>
$\omega$ -Muricholsäure ( $\omega$ -MCA)	- 0,84
$\beta$ -Muricholsäure ( $\beta$ -MCA)	- 0,84
$\alpha$ -Muricholsäure ( $\alpha$ -MCA)	- 0,78
Ursodeoxycholsäure (UDCA)	- 0,47
Cholsäure (CA)	0
Chenodeoxycholsäure (CDCA)	0,46
Deoxycholsäure (DCA)	0,59

## 4.6 Molekularbiologische Phänotypisierung

Die Genexpressionsanalysen von Leber- und Darmgewebeproben beinhalteten die folgenden drei Schritte: RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative Echtzeit-PCR (qPCR).

### 4.6.1 RNA-Isolierung

Der erste Schritt im Rahmen der RNA-Isolierung ist der Zellaufschluss. Zu diesem Zweck wurden die Gewebe mit dem Lysepuffer RLT aus dem RNeasy Mini Kit (Kat.-Nr. 74106, Qiagen, Hilden) versetzt und im TissueLyser LT (Qiagen) homogenisiert (30 s, 50 Hz). 15 - 30 mg Lebergewebe wurden mit 600  $\mu$ l Lysepuffer versetzt, beziehungsweise 5 - 10 mg Dünndarmgewebe wurden mit 350  $\mu$ l Lysepuffer versetzt. Der Lysepuffer enthält  $\beta$ -Mercaptoethanol, um den RNA-Verdau durch RNasen zu verhindern. Nach der Homogenisierung und Zentrifugation (10000 U/min, 15 s) wurde der Überstand 1:1 mit Ethanol versetzt. Es wurde Ethanol 50 % für Lebergewebe und Ethanol 70 % für Darmgewebe verwendet. Das Gemisch wurde durch die Silica-Membran der RNeasy-Säule filtriert, wobei Ethanol für eine optimale Bindung der RNA an die Silica-Membran sorgen soll. Zum Waschen der Membran wurde die Säule mit 700  $\mu$ l des Waschpuffers RW1 beziehungsweise mit 500  $\mu$ l des Waschpuffers RPE beladen und anschließend zentrifugiert (10000 U/min, 15 s). Schließlich wurde die RNA eluiert. Dazu wurden 40  $\mu$ l RNase-freies Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) auf die Säulenmembran pipettiert und unter Zentrifugation (10000 U/min, 60 s, 4 °C) wurde das Eluat mit der RNA aufgefangen.

Die RNA-Konzentration und -Reinheit des Eluats wurden mithilfe eines Spektrophotometers (Nanodrop ND1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt. Das Spektrophotometer bestimmt die RNA-Konzentration anhand der Absorptionsmessung am RNA-Absorptionsmaximum ( $\lambda = 260$  nm). Außerdem wird die Absorption am Protein-Absorptionsmaximum ( $\lambda = 280$  nm) gemessen. Der Quotient aus A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> erlaubt eine Aussage über den Grad der Reinheit beziehungsweise der Proteinverunreinigung. Er wird ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 angestrebt, damit die isolierte RNA weiterverarbeitet werden kann. Die Lagerung der RNA erfolgte bei - 80 °C.

## 4.6.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) zur Messenger-RNA (mRNA) ist ein notwendiger Zwischenschritt zur mRNA-Quantifizierung mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR, die als Matrize einen DNA-Einzelstrang benötigt.

Vor der cDNA-Synthese wurden mögliche DNA-Kontaminationen in der RNA-Probe entfernt: 1 µg der isolierten RNA in 7 µl DEPC-H<sub>2</sub>O wurde mit je 1 µl DNaseI und DNaseI-Puffer (Kat.-Nr. 18068-015, Invitrogen, Carlsbad, USA) inkubiert (15 min, Raumtemperatur). Der DNA-Verdau wurde beendet durch die Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und die Inkubation des Reaktionsgemisches (10 min, 65 °C) sowie weiteren zwei Minuten auf Eis.

### *Reverse Transkription*

Für die reverse Transkription (RT) wurden 10 µl der DNA-freien RNA mit 10 µl des RT-Mastermix versetzt. Der RT-Mastermix (Tabelle 9) enthielt die reverse Transkriptase sowie deren Substrate (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Kat.-Nr. 4368814, ABI, Waltham, USA) und zudem einen RNase Inhibitor (RNaseOut™, Kat.-Nr. 107770199, Invitrogen). Der Thermoblock (Thermocycler T3, Biometra, Jena) gewährleistete die richtige Temperatur für die Reaktionsschritte (Abbildung 5).

**Tabelle 9. RT-Mastermix**

10x RT Puffer (Kat.-Nr. 4368814, ABI)	2,0 µl
25x dNTP Mix 100mM (Kat.-Nr. 4368814, ABI)	0,8 µl
10x RT Random Primers (Kat.-Nr. 4368814, ABI)	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (Kat.-Nr. 4368814, ABI)	1,0 µl
RNase Inhibitor RNaseOut™ (Kat.-Nr. 107770199, Invitrogen)	1,0 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	3,2 µl
<b>Gesamt pro Reaktion</b>	<b>10,0 µl</b>



**Abbildung 5. Reaktions- und Temperaturschritte der reversen Transkription.**

### ***β-Aktin-PCR***

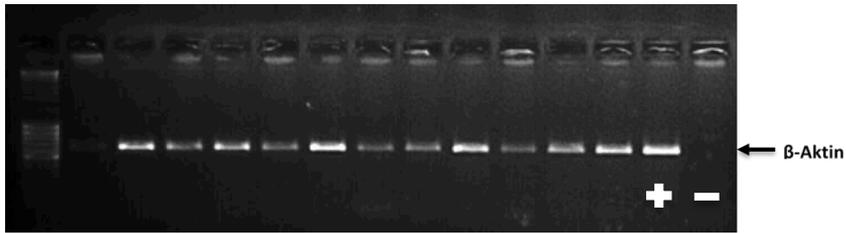
Anschließend wurden eine  $\beta$ -Aktin-PCR und -Gelelektrophorese durchgeführt, um den korrekten Ablauf der reversen Transkription zu überprüfen. Das Gen  $\beta$ -Aktin wird konstitutiv exprimiert, daher kommt die  $\beta$ -Aktin-cDNA normalerweise in jeder cDNA-Probe vor. Für die PCR wurden 2  $\mu$ l der cDNA mit einem Reaktionsansatz aus DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und  $\beta$ -Aktin-Primern versetzt (Tabelle 10). Nach insgesamt 25 PCR-Zyklen (Abbildung 6) im Thermoblock (C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, USA) erfolgte der Nachweis des PCR-Produktes mithilfe der Gelelektrophorese. Ein 2 % -Agarosegel, das den DNA-Farbstoff Midori Green Advanced DNA Stain (Kat.-Nr. MG04, Nippon Genetics, Tokyo, JP) enthielt, wurde in eine Laufkammer mit TAE-Puffer (Tris-Puffer, Eisessig, EDTA, H<sub>2</sub>O) eingebracht. In die Geltaschen wurde eine DNA-Leiter (MassRuler DNA Ladder Mix, Kat.-Nr. SM0403, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und das Produkt der  $\beta$ -Aktin-PCR, versetzt mit 2  $\mu$ l Ladepuffer (TAE, H<sub>2</sub>O, Glycerin, Farbstoff Xylencyanol), pipettiert. Während der Laufzeit (45 min, 115 V) wanderten die negativ geladenen Nukleinsäurefragmente in Abhängigkeit ihrer Größe zur Anode. Die cDNA-Synthese und die  $\beta$ -Aktin-PCR waren erfolgreich, wenn auf dem UV-Schirm (Fusion SL, Vilber, Eberhardzell) die  $\beta$ -Aktin-Bande bei 620 Basenpaaren (bp) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 7).

**Tabelle 10. Reaktionsansatz für die  $\beta$ -Aktin-PCR.**

DEPC-H <sub>2</sub> O	18,25 $\mu$ l
10x PCR-Puffer (Kat.-Nr. 10342020, Invitrogen)	2,50 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50mM (Kat.-Nr. 10342020, Invitrogen)	1,00 $\mu$ l
TaqDNA Polymerase (Kat.-Nr. 10342020, Invitrogen)	0,25 $\mu$ l
dNTP-Mix je 10mM (Kat.-Nr. 4368814, ABI)	1,00 $\mu$ l
bActforward CCA TCC TGC GTC TGG ACC TG 10 $\mu$ M (Invitrogen™ Custom DNA Oligos)	0,50 $\mu$ l
bActreverse GTA ACA GTC CGC CTA GAA GC 10 $\mu$ M (Invitrogen™ Custom DNA Oligos)	0,50 $\mu$ l
Gesamt pro Reaktion	23,00 $\mu$ l



**Abbildung 6. Reaktions- und Temperaturschritte der  $\beta$ -Aktin-PCR (25 Zyklen).**



**Abbildung 7. Gelelektrophorese nach  $\beta$ -Aktin-PCR.**

Gelelektrophorese von 12 Proben sowie einer Positiv- und einer Negativkontrolle nach  $\beta$ -Aktin-PCR.

### 4.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) koppelt die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit der Technologie zur Echtzeit-Quantifizierung des Amplikons. Im Rahmen der PCR wird eine spezifische cDNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt. Die Menge des Amplikons  $X_n$  kann mithilfe der Echtzeit-Quantifizierung bestimmt werden. Die qPCR erlaubt Rückschlüsse auf die initial eingesetzte cDNA-Menge  $X_0$  und somit auf die ‚steady-state‘ mRNA-Level.

Die Echtzeit-Quantifizierung gelingt mithilfe zielgenspezifischer Sonden, die doppelt fluoreszenzmarkiert sind (TaqMan® probe, Kat.-Nr. 4331182, ABI). Ist die Sonde intakt, dann löschen sich die beiden Fluoreszenzsignale, das ‚Quencher‘- und das ‚Reporter‘-Signal, im Rahmen des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers gegenseitig aus (Heid et al., 1996). Die DNA-Polymerase trennt im Rahmen der Synthese des Komplementärstranges – dank ihrer 5’3’-Exonukleaseaktivität – die hybridisierte Sonde in zwei Fragmente, sodass von den abgetrennten Reportermolekülen ein Fluoreszenzsignal  $\Delta R_n$  ausgeht. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wird im PCR-Block (7500 Fast Real-Time PCR System, ABI) gemessen.

Der PCR-Block ist kompatibel mit 96-Wellplatten, in deren Wells je 9  $\mu$ l des genspezifischen qPCR-Ansatzes vorgelegt wurden und je 1  $\mu$ l der cDNA-Proben in Dreifachbestimmung hinzupipettiert wurden. Als endogene Kontrolle wurde das Haushaltsgen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*Gapdh*) verwendet. Die Zusammensetzung des qPCR-Ansatzes findet sich in Tabelle 11.

**Tabelle 11. Genspezifischer Reaktionsansatz für die qPCR.**

2x TaqMan™Fast Universal PCR Master Mix (ABI, Kat.-Nr. 4366073)	5,0 $\mu$ l
<ul style="list-style-type: none"> <li>• AmpIIITaq®DNA Polymerase</li> <li>• dNTPs</li> </ul>	
20x TaqMan® Gene Expression Assay Mix (ABI, Kat.-Nr. 4331182) *	0,5 $\mu$ l
<ul style="list-style-type: none"> <li>• forward PCR-Primer (18 <math>\mu</math>M)</li> <li>• reverse PCR-Primer (18 <math>\mu</math>M)</li> <li>• TaqMan® probe (5 <math>\mu</math>M)</li> </ul>	
DEPC-H2O	3,5 $\mu$ l
Gesamt pro Reaktion	9,0 $\mu$ l

\***Assay-IDs:** *Abcg8* (Mm00445970\_m1), *Abcg5* (Mm00446241\_m1), *Npc1l1* (Mm01191973\_m1), *Abcb4* (Mm00435630\_m1), *Abcb11*(Mm0445168\_m1), *Acat2* (Mm00782408\_s1), *Abca1* (Mm00442646), *Abcg1* (Mm00437390\_m1), *Hmgcr* (Mm01282499\_m1), *Cyp7a1* (Mm00484150\_m1), *Ldlr* (Mm01177349\_m1), *Pcsk9* (Mm01263610\_m1), *Slc10a2* (Mm00488258\_m1), *Nr1h4* (Mm00436425\_m1), *Nr1h3* (Mm00443451\_m1), *Srebp2* (Mm01306292\_m1), *Srebp1* (Mm00550338\_m1), *Tm6sf2*(Mm00724919\_m1), *Pnpla3* (Mm00504420\_m1), *Abcb1a* (Mm00440761\_m1), *Abcb1b* (Mm00440736\_m1), *Scarbl* (Mm00450234\_m1), *Cyp27a1* (Mm00470430), *Gapdh* (Mm99999915\_s1)

Am PCR-Block wurden 40 PCR-Zyklen (3 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Elongation bei 60 °C) gestartet und währenddessen die Fluoreszenzemissionen in den einzelnen Wells gemessen. Die Reporteremissionsintensität  $\Delta R_n$  blieb während der ersten Zyklen unterhalb des Hintergrundsignals, nahm dann exponentiell zu und erreichte schließlich eine lineare Phase und eine Plateau-Phase. Für jedes Well wurde von der Software (SDS Software, 7500 Fast Real-Time PCR System, ABI) ein Emissionsgrenzwert ‚threshold‘ festgesetzt, der per Definition das Hintergrundsignal übersteigt und innerhalb der exponentiellen Phase liegt. Die Software bestimmte den ‚threshold cycle‘ ( $C_t$ -Wert), welcher der Anzahl PCR-Zyklen bis zum Erreichen des ‚threshold‘ entspricht. Der  $C_t$ -Wert ist abhängig von der initial eingesetzten cDNA-Menge  $X_0$ . Je kleiner der  $C_t$ -Wert, umso größer war die eingesetzte cDNA-Menge  $X_0$  und umso stärker wurde das entsprechende Zielgen exprimiert. Der  $C_t$ -Wert für ein Zielgen wird an dem  $C_t$ -Wert des Referenzgens (*Gapdh*) der jeweiligen cDNA-Probe normalisiert, um verschiedene cDNA-Proben hinsichtlich der Zielgen-Expression vergleichen zu können. Der  $\Delta C_t$ -Wert entspricht der Differenz der  $C_t$ -Werte des Zielgens und des Referenzgens der gleichen cDNA-Probe (Formel 3).

**Formel 3. Berechnung des  $\Delta C_t$ -Werts.**

Der  $\Delta C_t$ -Wert einer Probe entspricht der Differenz der  $C_t$ -Werte des Zielgens und des Referenzgens (*Gapdh*).

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Gapdh})$$

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte untersucht werden, ob ein Zielgen bei den Knockin-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen reprimiert oder induziert war. Dazu wurde der ( $-2^{\Delta\Delta C_t}$ )-Wert berechnet, der der relativen Genexpression ( $RQ$ ) einer Probe verglichen mit der Kontrollgruppe entspricht (Livak and Schmittgen, 2001). Der  $\Delta\Delta C_t$  wird aus dem  $\Delta C_t$ -Wert der jeweiligen Knockin-Probe (KI) und dem Mittelwert der  $\Delta C_t$ -Werte der Kontrollgruppe (WT) berechnet (Formel 4).

**Formel 4. Berechnung des ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )-Werts.**

Die relative Expression  $RQ$  eines Zielgens bei einer Knockin-Maus im Vergleich mit der Kontrollgruppe entspricht dem ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ )-Wert.

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta C_t(KI) - \overline{\Delta C_t(WT)})}$$

## 4.7 Statistik

Für die statistische Auswertung und Darstellung wurde die Software Graph Pad Prism Version 5.03 für Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA) verwendet. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden der Median (MD), der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Boxplots oder Scatterplots. Für die statistische Testung auf Gruppenunterschiede zwischen Knockin-Mäusen und Kontrollen wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unverbundene Stichproben auf dem Signifikanzniveau  $p_{U\text{-Test}} = 0,05$  verwendet.

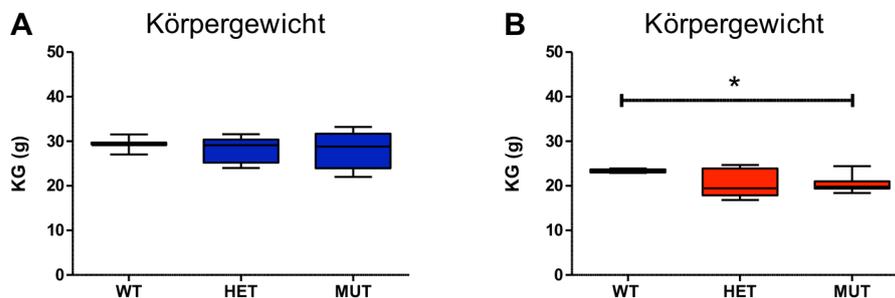
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Makroskopische Phänotypen

Die Ergebnisse der makroskopischen Phänotypisierung wurden für beide Geschlechter getrennt analysiert. Aus der geschlechtsspezifischen Auftrennung resultierten kleine Gruppengrößen ( $n = 7 - 8$ ), sodass für die deskriptive Statistik der Median (MD) verwendet und die Ergebnisse in Boxplots dargestellt wurden.

#### 5.1.1 Körpergewicht

Die männlichen Mutanten und Heterozygoten unterschieden sich bezüglich ihres Körpergewichts nicht von den gleichgeschlechtlichen Kontrollen (MD 28,8 und 29,1 vs. 29,5 g; Abbildung 8A). Die weiblichen Mutanten und Heterozygoten waren etwas leichter als die Kontrollen (MD 19,8 und 19,5 vs. 23,4 g), wobei der Unterschied zu den Kontrollen nur bei den Mutanten unter dem Signifikanzniveau lag ( $p_{U\text{-Test}} = 0,03$ ; Abbildung 8B).



**Abbildung 8. Körpergewicht.**

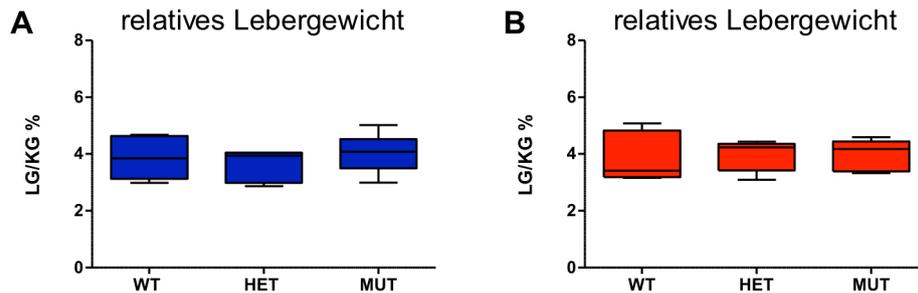
**A** Das Körpergewicht (g) von männlichen WT ( $n = 7$ ), HET ( $n = 7$ ) und MUT ( $n = 8$ ). **B** Das Körpergewicht (g) von weiblichen WT ( $n = 7$ ), HET ( $n = 8$ ) und MUT ( $n = 7$ ).

#### 5.1.2 Makroskopie der Leber

Hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit, Farbe, Form und Größe waren die Lebern der Mutanten und Heterozygoten ebenso unauffällig wie die der Kontrollen. Insbesondere gab es keine Hinweise auf das Vorliegen einer Fettlebererkrankung, das heißt keine lividen Verfärbungen oder abgerundete Leberländer.

### 5.1.3 Lebergewicht

Das relative Lebergewicht unterschied sich bei den Mutanten und Heterozygoten nicht von den Kontrollen. Dies galt gleichermaßen für die männlichen (♂ 4,1 und 3,9 vs. 3,9 %; Abbildung 9A) und die weiblichen Tiere (♀ 4,2 und 4,2 vs. 3,4 %; Abbildung 9B).

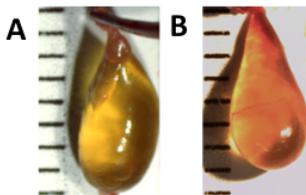


**Abbildung 9. Relatives Lebergewicht.**

**A** Das Lebergewicht normiert am Körpergewicht (%) von männlichen WT (n = 7), HET (n = 7) und MUT (n = 8). **B** Das Lebergewicht normiert am Körpergewicht (%) von weiblichen WT (n = 7), HET (n = 8) und MUT (n = 7).

### 5.1.4 Makroskopie der Gallenblase

Die Gallenblasen der Knockin-Mäuse und Kontrollen waren transluzent und von hell- bis dunkelgelber Farbe. Gallensteine waren durch die Gallenblasenwand nicht erkennbar. Auffallend waren einige besonders große und pralle Gallenblasen-Exemplare, die überwiegend bei den Mutanten zu beobachten waren (Abbildung 10).



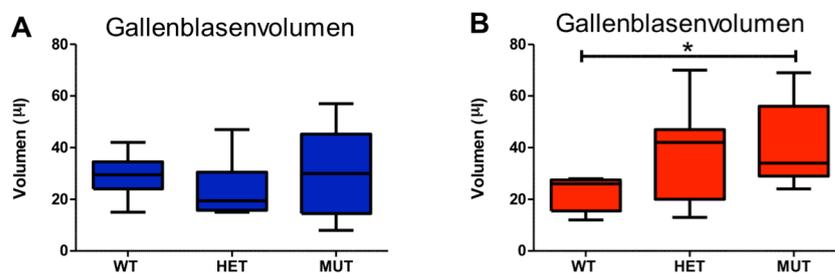
**Abbildung 10. Makroskopische Aufnahmen von Gallenblasen.**

Die Gallenblasen **A** einer Mutante (48 µl) und **B** eines Wildtyps (32 µl).

### 5.1.5 Gallenblasenvolumen

Hinsichtlich der Gallenblasenvolumina zeigten sich bei den weiblichen Tieren Unterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp: Die Gallenblasenvolumina der weiblichen Mutanten waren signifikant erhöht (MD 34,0 vs. 26,0  $\mu\text{l}$ ;  $p_{\text{U-Test}} = 0,02$ ; Abbildung 11B). Die weiblichen Heterozygoten zeigten einen – wenn auch nicht signifikanten – Trend zu größeren Gallenblasenvolumina (MD 42,0 vs. 26,0  $\mu\text{l}$ ;  $p_{\text{U-Test}} = 0,27$ ; Abbildung 11B).

Bei den männlichen Mutanten und Heterozygoten war kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen nachweisbar (MD 30,0 und 19,5 vs. 29,5  $\mu\text{l}$ ; Abbildung 11A).



**Abbildung 11. Gallenblasenvolumina.**

**A** Das Gallenblasenvolumen ( $\mu\text{l}$ ) von männlichen WT ( $n = 7$ ), HET ( $n = 7$ ) und MUT ( $n = 8$ ). **B** Das Gallenblasenvolumen ( $\mu\text{l}$ ) von weiblichen WT ( $n = 7$ ), HET ( $n = 8$ ) und MUT ( $n = 7$ ).

## 5.2 Mikroskopische Gallephänotypen

Die Ergebnisse der mikroskopischen Phänotypisierung wurden für beide Geschlechter getrennt analysiert. Aus der geschlechtsspezifischen Auftrennung resultierten kleine Gruppengrößen ( $n = 7$ ), sodass in den folgenden Tabellen die absolute Anzahl der Tiere dargestellt wird und auf die Berechnung von Prozentzahlen verzichtet wurde.

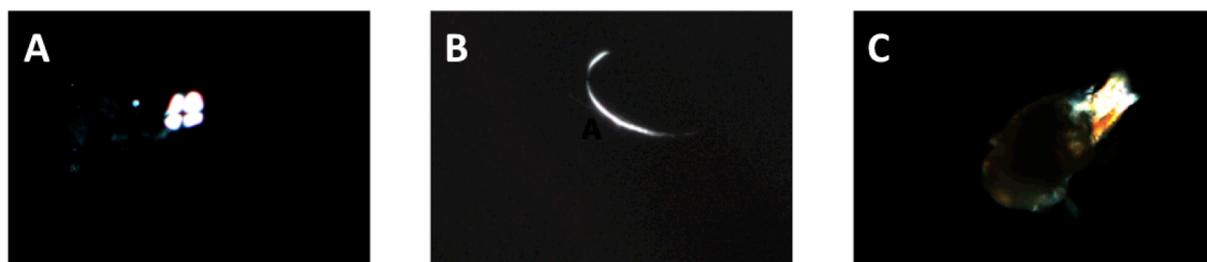
### 5.2.1 Qualitativ-morphologische Charakterisierung der Cholesterinkristalle

In der Gallenflüssigkeit der meisten Knockin-Mäuse und Kontrollen lagen einzelne Flüssigkristalle (FK) vor. Sechs der sieben weiblichen Mutanten und je fünf der sieben gleichgeschlechtlichen Heterozygoten und Kontrollen wiesen FK auf (Tabelle 12). Die Prävalenz aggregierter FK war in der Gruppe der weiblichen und der männlichen Mutanten etwas höher als in der Gruppe der gleichgeschlechtlichen Kontrollen ( $\text{♀}$  4 vs. 2;  $\text{♂}$  3 vs. 2; Tabelle 12). Fusionierte Flüssigkristalle, Malteserkreuze (Abbildung 12A), lagen bei vier weiblichen Mutanten vor, wohingegen keine der Kontrollen Malteserkreuze aufwies. Wasserfreie (ACh-)Kristalle, die bogenförmig oder filamentös imponierten (Abbildung 12B), wurden bei vier männlichen Mutanten und drei männlichen Heterozygoten beobachtet. Im Vergleich dazu gab es keine ACh-Kristalle bei den männlichen Kontrollen. Die typischen Cholesterin-Monohydratkristalle (ChM-Kristalle) waren insgesamt selten zu beobachten. Eine weibliche Mutante und eine weibliche Heterozygote wiesen ChM-Kristalle auf und im Vergleich dazu keine einzige Kontrolle. Des Weiteren lagen bei zwei männlichen Mutanten und bei einer Kontrolle ChM-Kristalle vor. Es fanden sich sogar kleine Gallensteine bei zwei weiblichen Mutanten und einer weiblichen Heterozygoten (Abbildung 12C). Gallensteine waren sonst in keiner weiteren Gruppe zu beobachten.

**Tabelle 12. Anzahl Galleproben mit bestimmten Cholesterinkristallarten.**

Die Anzahl an Wildtyp-Mäusen, Heterozygoten und Mutanten ( $\text{♂}$  /  $\text{♀}$ ), deren Galleproben die definierten Kristallarten aufwiesen. Die Gruppengröße betrug  $7\text{♂}$  und  $7\text{♀}$  je Genotyp.

	WT $\text{♂}$	HET $\text{♂}$	MUT $\text{♂}$	WT $\text{♀}$	HET $\text{♀}$	MUT $\text{♀}$
<b>Flüssigkristalle (FK)</b>	4	4	6	5	5	6
<b>Aggregierte FK</b>	2	3	3	2	1	4
<b>Malteserkreuze</b>	0	1	0	0	1	4
<b>ACh-Kristalle</b>	0	3	4	2	3	0
<b>ChM-Kristalle</b>	1	1	2	0	1	1
<b>Steine</b>	0	0	0	0	1	2



**Abbildung 12. Mikroskopische Aufnahmen von Cholesterinkristallen.**

Polarisationsmikroskopische Aufnahmen von einem **A** Malteserkreuz (♀ Mutante), einem **B** bogenförmigen anhydriischen Kristall (♂ Mutante) und einem **C** Cholesterinstein mit dunklem Kern (♀ Mutante).

## 5.2.2 Semiquantitative Charakterisierung der Cholesterinkristalle

### *Weibliche Knockin-Mäuse versus gleichgeschlechtliche Kontrollen*

Die weiblichen Mutanten und Heterozygoten wiesen verglichen mit den Kontrollen auffallend große Mengen an Flüssigkristallen auf (Tabelle 13). Fünf Mutanten und fünf Heterozygote wiesen sehr viele FK auf (Abbildung 13B), während die Menge an FK bei den fünf gleichgeschlechtlichen Kontrollen deutlich geringer war (Abbildung 13A). Diese galt gleichermaßen für die aggregierten Flüssigkristalle, die bei den Mutanten in deutlich größeren Mengen (Abbildung 13C) vorlagen als bei den Kontrollen.

**Tabelle 13. Semiquantifizierung der Flüssigkristalle in Galleproben der weiblichen Tiere.**

Die Anzahl der weiblichen WT, HET und MUT (je n = 7), die keine – wenige – **viele** Flüssigkristalle aufwiesen.

	WT ♀	HET ♀	MUT ♀
	keine – wenige – <b>viele</b>	keine – wenige – <b>viele</b>	keine – wenige – <b>viele</b>
<b>Flüssigkristalle (FK)</b>	<b>2 – 5 – 0</b>	<b>2 – 0 – 5</b>	<b>1 – 1 – 5</b>
<b>Aggregierte FK</b>	<b>5 – 2 – 0</b>	<b>6 – 0 – 1</b>	<b>3 – 0 – 4</b>



**Abbildung 13. Mikroskopische Aufnahmen von Cholesterinflüssigkristallen.**

**A** Wenige nicht-aggregierte und aggregierte Flüssigkristalle (♀ Wildtyp), **B** viele nicht-aggregierte Flüssigkristalle (♀ Mutante) und **C** viele aggregierte Flüssigkristalle (♀ Mutante) in der Durchlichtmikroskopie.

***Männliche Knockin-Mäuse versus gleichgeschlechtliche Kontrollen***

Bei den männlichen Knockin-Mäusen und Kontrollen gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Menge an Flüssigkristallen (Tabelle 14). Die eine Hälfte der männlichen Mutanten mit FK wies in der Gallenflüssigkeit viele FK und die andere Hälfte wies nur eine geringere Menge FK auf. Bei den Kontrollen verhielt es sich gleichermaßen.

**Tabelle 14. Semiquantifizierung der Flüssigkristalle in Galleproben der männlichen Tiere.**

Die Anzahl der männlichen WT, HET und MUT (je n = 7), die keine – wenige – **viele** Flüssigkristalle aufwiesen.

	<b>WT ♂</b> keine – wenige – <b>viele</b>	<b>HET ♂</b> keine – wenige – <b>viele</b>	<b>MUT ♂</b> keine – wenige – <b>viele</b>
<b>Flüssigkristalle (FK)</b>	3 – 2 – 2	3 – 4 – 0	1 – 3 – 3
<b>Aggregierte FK</b>	5 – 1 – 1	4 – 3 – 0	4 – 1 – 2

## 5.3 Laborchemische Phänotypen

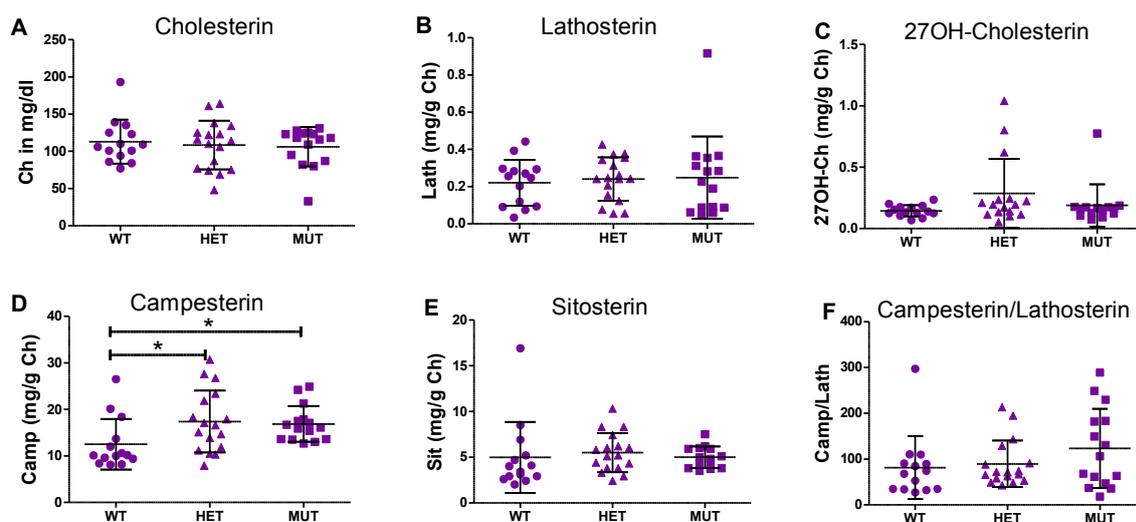
### 5.3.1 Sterolkonzentrationen in Serum-, Lebergewebe- und Lebergalleproben

Im Folgenden werden die Konzentrationen von Cholesterin, Phytosterinen, Cholesterinvorläufern und -metaboliten im Serum, im Lebergewebe und in der Lebergalle von Knockin-Mäusen und Wildtyp-Mäusen verglichen. Die angegebenen Konzentrationen sind normiert an der im Gewebe vorherrschenden Cholesterinkonzentration (Lütjohann, 2015). Es werden die Ergebnisse von 14 WT (7♀, 7♂), 16 MUT (9♀, 7♂) und 17 HET (6♀, 11♂) unter normaler Diät sowie 11 WT (6♀, 5♂), 14 MUT (7♀, 7♂) und 18 HET (8♀, 10♂) unter lithogener Diät dargestellt. Auf eine Trennung der Gruppen in die beiden Geschlechter wurde verzichtet, da eine diesbezügliche Analyse keine zusätzlichen Informationen lieferte.

#### ***Serumkonzentrationen der Sterole bei Knockin-Mäusen vs. Kontrollen unter normaler Diät***

Die Cholesterinkonzentrationen im Serum der Mutanten und Heterozygoten betragen  $106,1 \pm 26,5$  und  $108,4 \pm 32,7$  mg/dl. Die Kontrollen wiesen im Vergleich dazu nur eine unwesentlich höhere Serum-Cholesterinkonzentration auf ( $113,1 \pm 29,6$  mg/dl; Abbildung 14A). Zudem waren die Serumkonzentrationen der Cholesterinvorstufe Lathosterin zwischen den Mutanten, Heterozygoten und Kontrollen vergleichbar ( $0,25 \pm 0,22$  und  $0,24 \pm 0,12$  vs.  $0,22 \pm 0,12$  mg/g Cholesterin; Abbildung 14B). Für 27-Hydroxy-Cholesterin, einen Cholesterinmetaboliten, der durch die Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) gebildet wird, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen den Genotypen ( $0,19 \pm 0,17$  und  $0,29 \pm 0,28$  vs.  $0,14 \pm 0,05$  mg/g Cholesterin; Abbildung 14C).

Die Phytosterinkonzentrationen waren abhängig vom Genotyp: Die Serumkonzentrationen des Phytosterins Campesterin betragen  $16,9 \pm 3,9$  mg/g Cholesterin bei den Mutanten und sogar  $17,4 \pm 6,7$  mg/g Cholesterin bei den Heterozygoten, wohingegen sie bei den Kontrollen nur  $12,5 \pm 5,4$  mg/g Cholesterin betragen (Abbildung 14D). Die Campesterinkonzentrationen waren somit bei den Mutanten ( $p_{U-Test} = 0,01$ ) und bei den Heterozygoten ( $p_{U-Test} = 0,02$ ) signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen. Ein weiteres Phytosterin, Sitosterin, lag bei den Heterozygoten in leicht erhöhten Konzentrationen vor ( $5,5 \pm 2,1$  vs.  $5,0 \pm 3,9$  mg/g Cholesterin; Abbildung 14E). Dieser Unterschied erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau ( $p_{U-Test} = 0,14$ ). Der Quotient aus Campesterin/Lathosterin, der als Schätzer für das Verhältnis von Absorption zu Synthese dient, war bei den Mutanten und Heterozygoten leicht erhöht gegenüber den Kontrollen ( $123 \pm 87$  und  $90 \pm 51$  vs.  $81 \pm 69$ ; Abbildung 14F).



**Abbildung 14. Serumkonzentrationen der Sterole (normale Diät).**

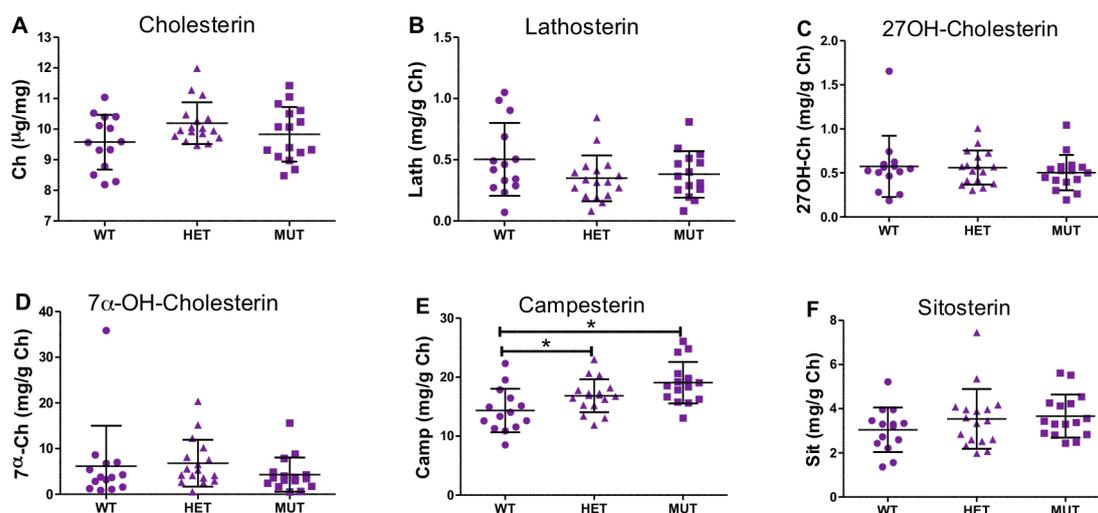
Die Serumkonzentrationen von Cholesterin (A), Lathosterin (B), 27-OH-Cholesterin (C), Campesterin (D), Sitosterin (E) und der Campesterin/Lathosterin-Quotient (F) der WT (n = 14), HET (n = 17) und MUT (n = 16).

#### *Hepatische Sterolkonzentrationen bei Knockin-Mäusen vs. Kontrollen unter normaler Diät*

Die hepatischen Cholesterinkonzentrationen der Mutanten und Heterozygoten betragen  $9,8 \pm 0,9$  und  $10,2 \pm 0,7$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Lebergewebe und waren somit vergleichbar mit den Cholesterinkonzentrationen bei den Kontrollen ( $9,6 \pm 0,9$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  Gewebe; Abbildung 15A). Die Lathosterin- ( $0,4 \pm 0,2$  und  $0,4 \pm 0,2$  vs.  $0,5 \pm 0,3$  mg/g Cholesterin; Abbildung 15B), die 27-Hydroxy-Cholesterin- ( $0,5 \pm 0,2$  und  $0,6 \pm 0,3$  vs.  $0,6 \pm 0,3$  mg/g Cholesterin; Abbildung 15C) und die  $7\alpha$ -Hydroxy-Cholesterinkonzentrationen ( $4,3 \pm 3,7$  und  $6,8 \pm 5,1$  vs.  $6,2 \pm 8,9$  mg/g Cholesterin; Abbildung 15D) im Lebergewebe der Mutanten und Heterozygoten unterschieden sich nicht von den Kontrollen.

Die hepatischen Campesterinkonzentrationen waren sowohl bei den Mutanten ( $19,1 \pm 3,5$  vs.  $14,4 \pm 3,7$  mg/g Cholesterin;  $p_{\text{U-Test}} < 0,01$ ) als auch bei den Heterozygoten ( $16,9 \pm 2,8$  vs.  $14,4 \pm 3,7$  mg/g Cholesterin;  $p_{\text{U-Test}} = 0,03$ ) signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen (Abbildung 15E). Die Sitosterinkonzentrationen waren bei den Knockin-Mäusen ebenfalls leicht erhöht ( $3,7 \pm 1,0$  und  $3,5 \pm 1,4$  vs.  $3,0 \pm 1,0$  mg/g Cholesterin; Abbildung 15F).

Insgesamt waren die Cholesterinkonzentrationen im Lebergewebe um eine Zehnerpotenz höher als im Serum. Die absoluten Phytosterinkonzentrationen im Lebergewebe waren ebenfalls um eine Zehnerpotenz höher als im Serum, sodass die Phytosterinkonzentrationen im Lebergewebe und im Serum vergleichbar waren.



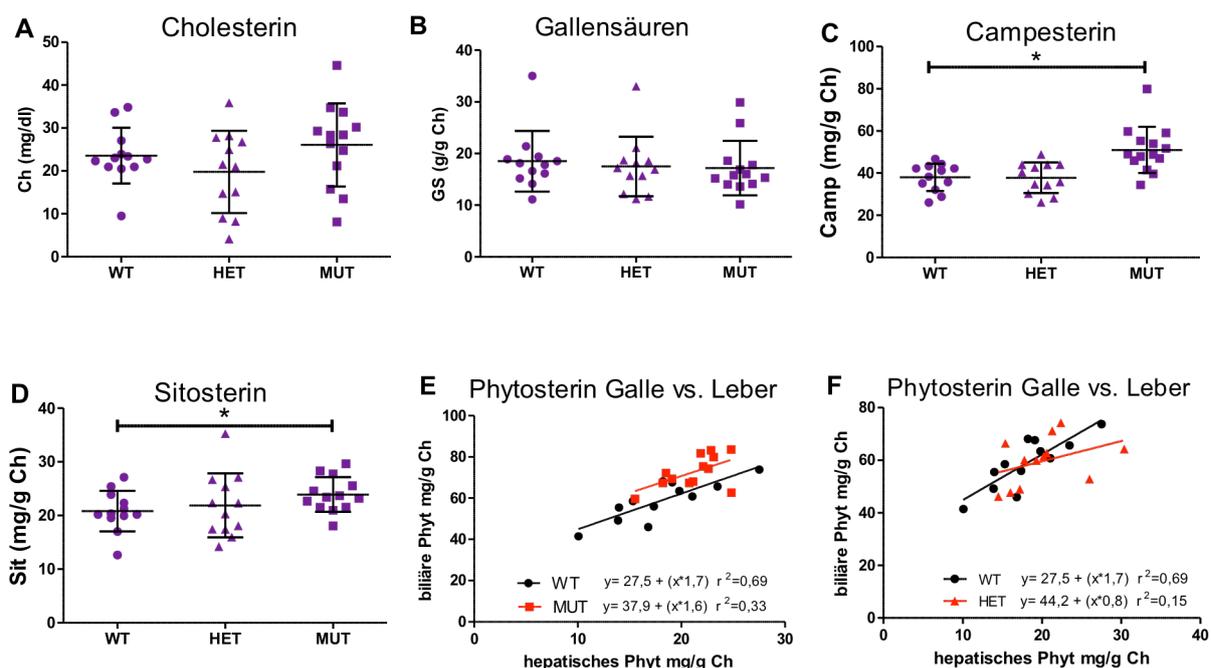
**Abbildung 15. Hepatische Sterolkonzentrationen (normale Diät).**

Die hepatischen Konzentrationen von Cholesterin (A), Lathosterin (B), 27-OH-Cholesterin (C), 7 $\alpha$ -Cholesterin (D), Campesterin (E) und Sitosterin (F) der WT (n = 14), HET (n = 17) und MUT (n = 16).

***Biliäre Sterolkonzentrationen bei Knockin-Mäusen vs. Kontrollen unter normaler Diät***

Die Cholesterinkonzentrationen in der Lebergalle der Mutanten waren leicht erhöht gegenüber den Kontrollen ( $26,1 \pm 9,7$  mg/dl vs.  $23,6 \pm 6,5$  mg/dl), während sie bei den Heterozygoten leicht vermindert waren ( $19,8 \pm 9,6$  mg/dl vs.  $23,6 \pm 6,5$ ; Abbildung 16A). Die relativen Gallensäurenkonzentrationen in diesen Galleproben – aus der zweiten Stunde der Galleableitung – waren bei den Mutanten und Heterozygoten etwas vermindert ( $17,2 \pm 5,3$  und  $17,5 \pm 5,8$  vs.  $18,5 \pm 5,8$  g/g Cholesterin; Abbildung 16B).

Die biliären Campesterin- ( $51,0 \pm 11,0$  vs.  $38,8 \pm 6,5$  mg/g Cholesterin;  $p_{U\text{-Test}} < 0,01$ ; Abbildung 16C) und die biliären Sitosterinkonzentrationen ( $23,9 \pm 3,2$  vs.  $20,8 \pm 3,8$  mg/g Cholesterin;  $p_{U\text{-Test}} = 0,03$ ; Abbildung 16D) waren bei den Mutanten signifikant erhöht. Zwischen den biliären und den hepatischen Phytosterinkonzentrationen wird ein linearer Zusammenhang vermutet: Die linearen Regressionsanalysen von der biliären auf die hepatische Phytosterinkonzentration zeigten bei den Kontrollen und bei den Mutanten eine gute bis mittelmäßige Korrelation ( $r^2 = 0,69$  und  $r^2 = 0,33$  Abbildung 16E). Die Steigungen der Regressionsgeraden, die dem Konzentrationsgradienten über der kanalikulären Membran entsprechen und als Maß für die Pumpaktivität des ABCG5/8-Transporters verwendet werden können (Yu et al., 2004), waren zwischen den Mutanten und Kontrollen nicht signifikant verschieden ( $1,6 \pm 0,7$  vs.  $1,7 \pm 0,4$ ; Abbildung 16E). Bei den Heterozygoten war die Steigung der Regressionsgerade geringer als bei den Kontrollen ( $0,8 \pm 0,6$  vs.  $1,7 \pm 0,4$ ), allerdings war der lineare Zusammenhang bei den Heterozygoten auch nur schwach ( $r^2 = 0,15$ ; Abbildung 16F).



**Abbildung 16. Biliäre Sterolkonzentrationen (normale Diät).**

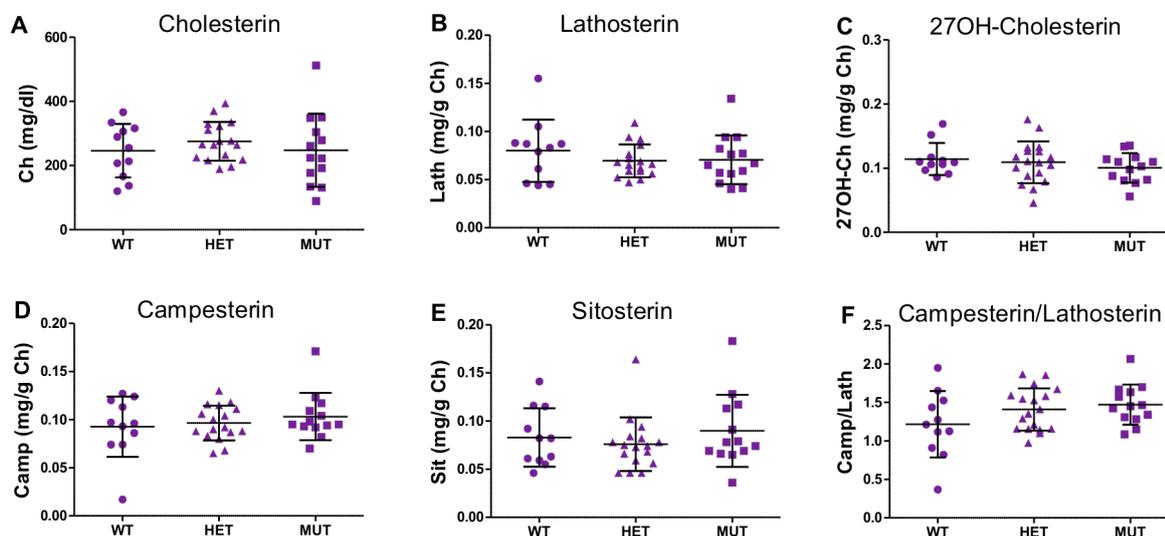
Die biliären Konzentrationen von Cholesterin (A), Gallensäuren (B), Campesterin (C) und Sitosterin (D) und die Regressionsanalyse der biliären auf die hepatische Phytosterinkonzentration (E, F) der WT (n = 12), HET (n = 12) und MUT (n = 13).

### ***Serumkonzentrationen der Sterole bei Knockin-Mäusen vs. Kontrollen unter lithogener Diät***

Unter der lithogenen Diät wiesen die Mutanten und Heterozygoten Serum-Cholesterinkonzentrationen von  $247,9 \pm 113,9$  und  $275,6 \pm 60,3$  mg/dl auf. Es gab keinen signifikanten Unterschied zu den Cholesterinkonzentrationen bei den Kontrollen ( $246,9 \pm 83,3$  mg/dl; Abbildung 17A). Die Lathosterinkonzentrationen im Serum waren zwischen den Mutanten, Heterozygoten und Kontrollen vergleichbar ( $0,07 \pm 0,03$  und  $0,07 \pm 0,02$  vs.  $0,08 \pm 0,03$  mg/g Cholesterin; Abbildung 17B). Gleichmaßen unabhängig vom Genotyp waren die 27-Hydroxy-Cholesterinkonzentrationen ( $0,10 \pm 0,02$  und  $0,11 \pm 0,03$  vs.  $0,11 \pm 0,03$  mg/g Cholesterin; Abbildung 17C). Im Vergleich zur normalen Diät ist anzumerken, dass unter der lithogenen Diät die Cholesterinkonzentrationen deutlich erhöht und die Lathosterinkonzentrationen deutlich vermindert waren.

Die Serumkonzentrationen der Phytosterine waren unter der lithogenen Diät hundertfach geringer als unter der normalen Diät. Es bestanden weder für die Campesterin- ( $0,10 \pm 0,02$  und  $0,10 \pm 0,02$  vs.  $0,10 \pm 0,03$  mg/g Cholesterin; Abbildung 17D) noch für die Sitosterinkonzentrationen ( $0,09 \pm 0,04$  und  $0,08 \pm 0,03$  vs.  $0,08 \pm 0,03$  mg/g Cholesterin; Abbildung 17E) messbare Unterschiede zwischen den Mutanten, Heterozygoten und Kontrollen.

Der Quotient aus Campesterin/Lathosterin war bei den Mutanten leicht erhöht gegenüber den Kontrollen ( $1,5 \pm 0,3$  vs.  $1,2 \pm 0,4$ ;  $p_{U\text{-Test}} = 0,09$ ; Abbildung 17F).



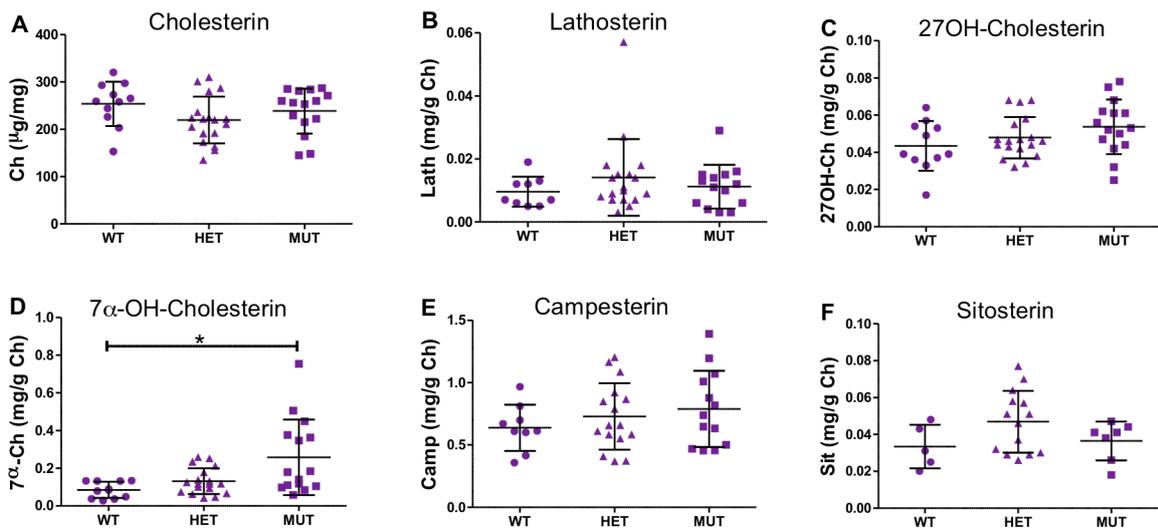
**Abbildung 17. Serumkonzentrationen der Sterole (lithogene Diät).**

Die Serumkonzentrationen von Cholesterin (A), Lathosterin (B), 27-OH-Cholesterin (C), Campesterin (D), Sitosterin (E) sowie der Campesterin/Lathosterin-Quotienten (F) der WT (n = 11), HET (n = 18) und MUT (n = 14).

### *Hepatische Sterolkonzentrationen bei Knockin-Mäusen vs. Kontrollen unter lithogener Diät*

Die hepatischen Cholesterinkonzentrationen der Mutanten und Heterozygoten waren vergleichbar mit den Kontrollen ( $238,7 \pm 47,5$  und  $219,6 \pm 49,6$  vs.  $253,7 \pm 46,8$   $\mu\text{g/mg}$  Lebergewebe; Abbildung 18A). Die hepatischen Lathosterinkonzentrationen der Knockin-Mäuse unterschieden sich ebenfalls nicht von den Kontrollen ( $0,01 \pm 0,07$  und  $0,01 \pm 0,01$  vs.  $0,01 \pm 0,05$  mg/g Cholesterin; Abbildung 18B). Die Konzentrationen von  $7\alpha$ -Hydroxy-Cholesterin waren bei den Mutanten signifikant erhöht ( $0,26 \pm 0,20$  vs.  $0,08 \pm 0,04$  mg/g Cholesterin;  $p_{U\text{-Test}} = 0,01$ ; Abbildung 18D) und die 27-Hydroxy-Cholesterinkonzentrationen waren bei den Mutanten leicht erhöht gegenüber den Kontrollen ( $0,05 \pm 0,01$  vs.  $0,04 \pm 0,01$  mg/g Cholesterin;  $p_{U\text{-Test}} = 0,11$ ; Abbildung 18C).

Die Campesterin- ( $0,79 \pm 0,27$  und  $0,73 \pm 0,31$  vs.  $0,64 \pm 0,19$  mg/g Cholesterin; Abbildung 18E) und die Sitosterinkonzentrationen ( $0,04 \pm 0,01$  und  $0,05 \pm 0,02$  vs.  $0,03 \pm 0,01$  mg/g Cholesterin; Abbildung 18F) waren bei den Mutanten und Heterozygoten leicht erhöht im Vergleich mit den Kontrollen.

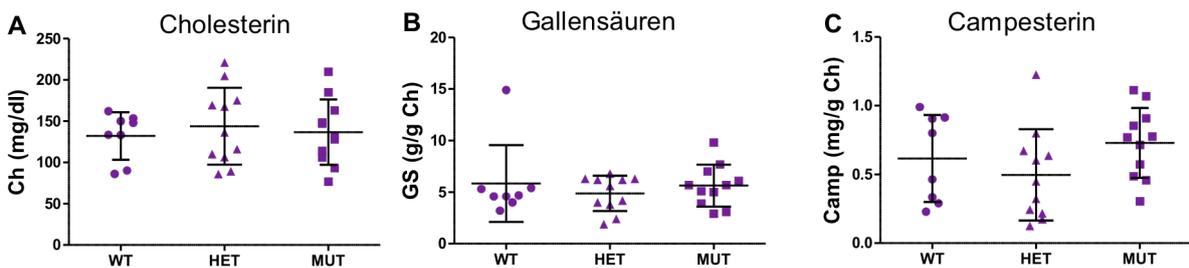


**Abbildung 18. Hepatische Sterolkonzentrationen (lithogene Diät).**

Die hepatischen Konzentrationen von Cholesterin (A), Lathosterin (B), 27-Hydroxy-Cholesterin (C), 7α-Hydroxy-Cholesterin (D), Campesterin (E) und Sitosterin (F) der WT (n = 11), HET (n = 18) und MUT (n = 14).

***Biliäre Sterolkonzentrationen bei Knockin-Mäusen vs. Kontrollen unter lithogener Diät***

Die Mutanten, Heterozygoten und Kontrollen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Cholesterin- ( $136,8 \pm 39,6$  und  $143,9 \pm 46,5$  vs.  $132,1 \pm 28,8$  mg/dl; Abbildung 19A), Gallensäuren- ( $5,6 \pm 2,0$  und  $4,9 \pm 1,7$  vs.  $5,8 \pm 3,7$  g/g Cholesterin; Abbildung 19B) und Campesterinkonzentrationen ( $0,73 \pm 0,26$  vs.  $0,62 \pm 0,32$  mg/g Cholesterin; Abbildung 19C) in der Lebergalle.



**Abbildung 19. Biliäre Sterolkonzentrationen (lithogene Diät).**

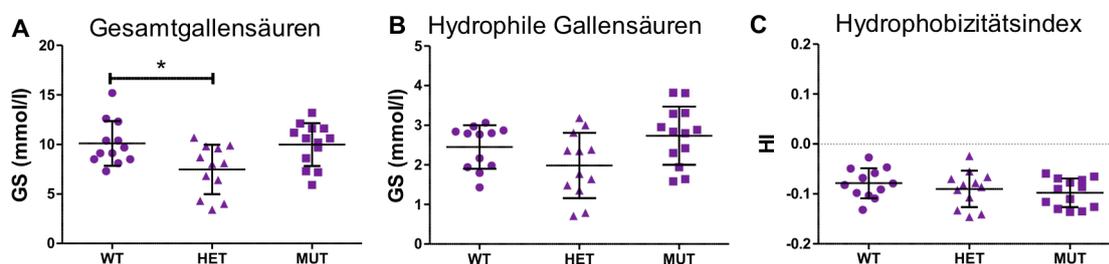
Die biliäre Konzentrationen von Cholesterin (A), Gallensäuren (B) und Campesterin (C) der WT (n = 8), HET (n = 11) und MUT (n = 11).

### 5.3.2 Gallensäurenprofil der Lebergalleproben

Im Folgenden werden die Ergebnisse von 12 WT (5♀, 7♂), 12 HET (6♀, 6♂) und 13 MUT (8♀, 5♂) unter normaler Diät sowie von 8 WT (4♀, 4♂), 11 HET (5♀, 6♂) und 11 MUT (6♀, 5♂) unter lithogener Diät dargestellt.

#### *Knockin-Mäuse vs. Kontrollen unter normaler Diät*

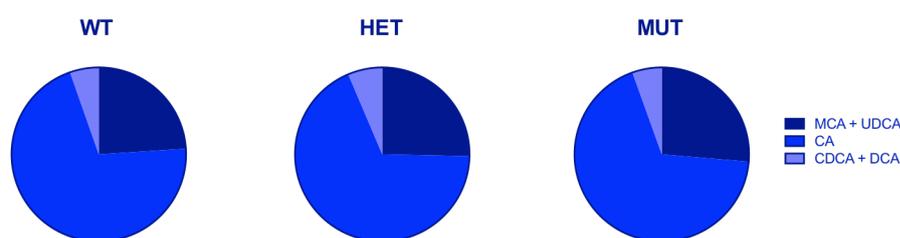
Die Konzentrationen der Gesamtgallensäuren in der Lebergalle unterschieden sich nicht zwischen den Mutanten und Kontrollen ( $10,0 \pm 2,2$  vs.  $10,1 \pm 2,3$  mmol/l; Abbildung 20A). Bei den Heterozygoten waren die Gesamtgallensäuren jedoch signifikant vermindert ( $7,5 \pm 2,5$  vs.  $10,1 \pm 2,3$  mmol/l;  $p_{U\text{-Test}} = 0,04$ ; Abbildung 20A). Die Mutanten wiesen in der Gallenflüssigkeit leicht erhöhte Konzentrationen der hydrophilen Gallensäuren wie MCA und UDCA auf ( $2,7 \pm 0,7$  vs.  $2,5 \pm 0,6$  mmol/l; Abbildung 20B) und dementsprechend war der Hydrophobizitätsindex ihrer Galleproben im Vergleich mit den Kontrollen dezent negativer ( $-0,10 \pm 0,03$  vs.  $-0,08 \pm 0,03$ ;  $p_{U\text{-Test}} = 0,15$ ; Abbildung 20C). Die Heterozygoten wiesen nur leicht verminderte Konzentrationen der hydrophilen Gallensäuren auf ( $2,0 \pm 0,8$  vs.  $2,5 \pm 0,6$  mmol/l; Abbildung 20B). Der Hydrophobizitätsindex der Heterozygoten unterschied sich kaum von den Kontrollen ( $-0,09 \pm 0,04$  vs.  $-0,08 \pm 0,03$ ; Abbildung 20C).



**Abbildung 20. Biliäre Gallensäurenkonzentrationen (normale Diät).**

Die Konzentrationen der Gesamtgallensäuren (A) und der hydrophilen Gallensäuren (B) sowie der Hydrophobizitätsindex (C) der Galleproben der WT (n = 12), HET (n = 12) und MUT (n = 13).

Das Gallensäurenprofil war unabhängig vom Genotyp (Abbildung 21): Die Gallensäure mit dem höchsten prozentualen Anteil an den Gesamtgallensäuren war die Cholsäure mit  $67 \pm 4$  % bei den Knockin-Mäusen und  $70 \pm 6$  % bei den Kontrollen. Die beiden hydrophoberen Gallensäuren DCA und CDCA machten gemeinsam einen Anteil von  $5 \pm 1$  % bei den Mutanten,  $6 \pm 2$  % bei den Heterozygoten und  $5 \pm 1$  % bei den Kontrollen aus. Der Anteil der hydrophileren Gallensäuren (MCA, UDCA) betrug  $26 \pm 4$  % bei den Mutanten,  $25 \pm 5$  % bei den Heterozygoten und  $24 \pm 5$  % bei den Kontrollen.

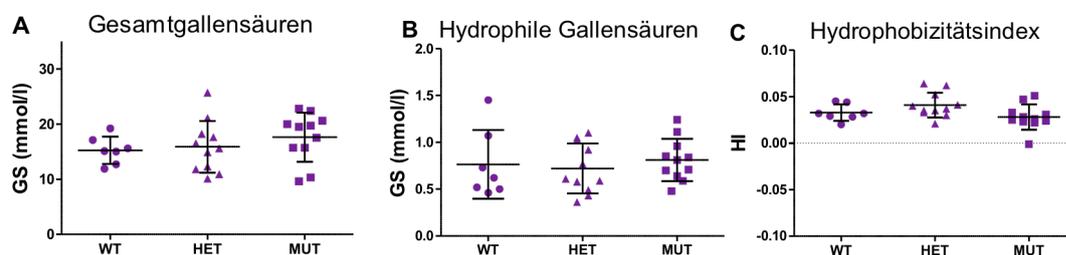


**Abbildung 21. Relative Konzentrationen der Gallensäurespezies (normale Diät).**

Vergleich der prozentualen Anteile der individuellen Gallensäuren an den Gesamtgallensäuren zwischen WT (n = 12), HET (n = 12) und MUT (n = 13). Die Blautöne spiegeln die Hydrophobizität der Gallensäuren wieder (je hydrophober, umso heller).

**Knockin-Mäuse vs. Kontrollen unter lithogener Diät.**

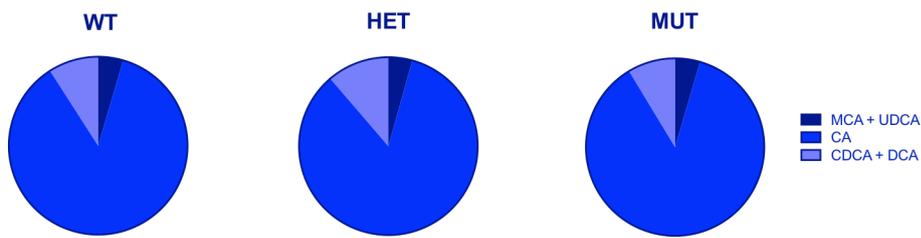
Die Mutanten und Heterozygoten unterschieden sich nicht wesentlich von den Kontrollen hinsichtlich der Konzentrationen der Gesamtgallensäuren ( $17,6 \pm 4,4$  und  $15,9 \pm 4,7$  vs.  $15,2 \pm 2,5$  mmol/l; Abbildung 22A), der hydrophilen Gallensäuren ( $0,8 \pm 0,2$  und  $0,7 \pm 0,3$  vs.  $0,8 \pm 0,4$  mmol/l; Abbildung 22B) und des Hydrophobizitätsindex ( $0,03 \pm 0,01$  und  $0,04 \pm 0,01$  vs.  $0,03 \pm 0,01$ ; Abbildung 22C) in der Lebergalle. Die Konzentrationen der Gesamtgallensäuren waren unter der lithogenen Diät, die mit Cholsäure angereichert war, insgesamt etwas höher als unter normaler Diät.



**Abbildung 22. Biläre Gallensäurekonzentrationen (lithogene Diät).**

Vergleich der Gesamtgallensäuren (A) und der hydrophilen Gallensäuren (B) sowie des Hydrophobizitätsindex (C) der Galleproben der WT (n = 8), HET (n = 11) und MUT (n = 11).

Das Gallensäurenprofil unter lithogener Diät war ebenfalls unabhängig vom Genotyp (Abbildung 23). Es gab keinen Unterschied bezüglich des relativen Anteils von Cholsäure an den Gesamtgallensäuren ( $86 \pm 4$  % und  $84 \pm 5$  % vs.  $86 \pm 4$  %). Insgesamt war der Anteil von Cholsäure jedoch deutlich größer als unter normaler Diät. Die beiden hydrophoberen Gallensäuren, DCA und CDCA, machten ebenfalls einen größeren Anteil an den Gesamtgallensäuren aus als unter normaler Diät ( $9 \pm 3$  % und  $11 \pm 3$  % vs.  $9 \pm 2$  %). Dies ging zu Lasten der hydrophileren Gallensäuren, MCA und UDCA, deren relativer Anteil nur  $4 \pm 2$  % bei den Knockin-Mäusen und  $5 \pm 2$  % bei den Kontrollen betrug.



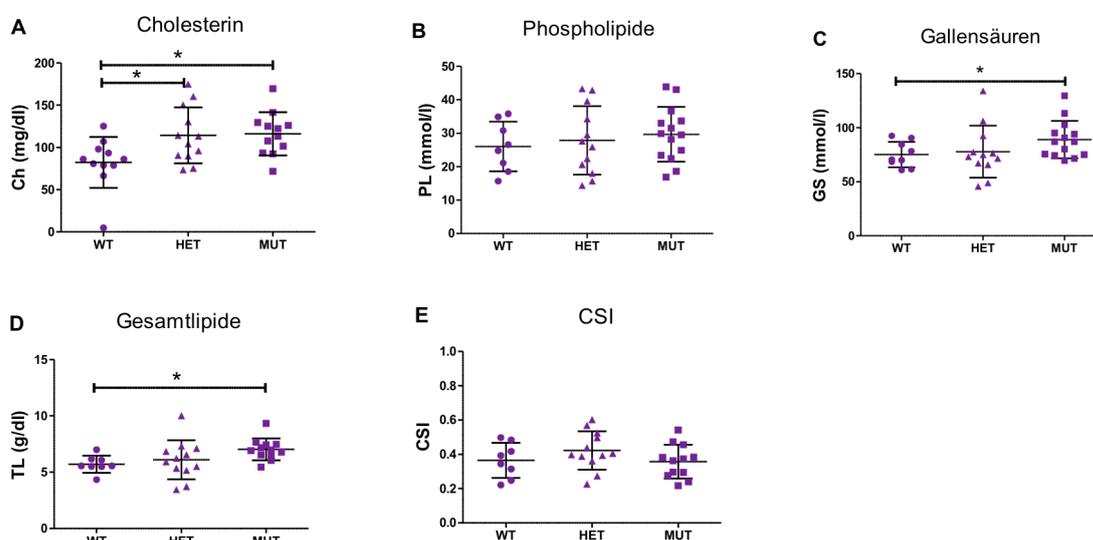
**Abbildung 23. Relative Konzentrationen der Gallensäurespezies (lithogene Diät).**

Vergleich der prozentualen Anteile der individuellen Gallensäuren an den Gesamtgallensäuren zwischen WT (n = 8), HET (n = 11) und MUT (n = 11). Die Blautöne spiegeln die Hydrophobizität der Gallensäuren wieder.

### 5.3.3 Cholesterin,- und Gallensäurenkonzentrationen in der Gallenblasengalle

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen von Cholesterin, Phosphatidylcholin und Gallensäuren aus der Gallenblasengalle von je sechs weiblichen und je sechs männlichen Mutanten, Heterozygoten und Wildtyp-Mäusen dargestellt.

Die Cholesterinkonzentrationen in der Gallenblasengalle der Mutanten waren signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen ( $116,2 \pm 25,7$  vs.  $82,2 \pm 30,3$  mg/dl;  $p_{U\text{-Test}} = 0,01$ ; Abbildung 24A). Die Cholesterinkonzentrationen in der Gallenblasengalle der Heterozygoten waren ebenfalls signifikant erhöht ( $114,4 \pm 33,3$  vs.  $82,3 \pm 30,3$  mg/dl;  $p_{U\text{-Test}} = 0,05$ ; Abbildung 24A). Die Phospholipidkonzentrationen zeigten sich weitgehend unabhängig vom Genotyp ( $29,7 \pm 8,1$  und  $27,9 \pm 10,3$  vs.  $26,0 \pm 7,4$  mmol/l; Abbildung 24B), wohingegen die Gallensäurenkonzentrationen bei den Mutanten signifikant erhöht waren im Vergleich mit den Kontrollen ( $89,0 \pm 17,2$  vs.  $75,2 \pm 11,8$  mmol/l;  $p_{U\text{-Test}} = 0,04$ ; Abbildung 24C). Insgesamt waren die Gesamtlipidkonzentrationen in der Gallenblasengalle der Mutanten signifikant ( $7,1 \pm 1,0$  vs.  $5,7 \pm 0,8$  g/dl;  $p_{U\text{-Test}} = 0,01$ ; Abbildung 24D) und bei den Heterozygoten leicht erhöht gegenüber den Kontrollen ( $6,1 \pm 1,7$  vs.  $5,7 \pm 0,8$  g/dl; Abbildung 24D). Die Cholesterinsättigungsindizes der Knockin-Mäuse und der Kontrollen lagen unter dem Wert von 1 (Abbildung 24B).



**Abbildung 24. Lipidkonzentrationen und CSI in den Gallenblasengalleproben.**

Vergleich der Cholesterin- (mg/dl; **A**), Phospholipid- (mmol/l; **B**), Gallensäuren (mmol/l; **C**) und Gesamtlipidkonzentrationen (g/dl; **D**) sowie der Cholesterinsättigungsindizes (**E**) in der Gallenblasengalle der MUT (n = 12; 6♀, 6♂), HET (n = 12; 6♀, 6♂) und WT (n = 12; 6♀, 6♂).

## 5.4 Molekularbiologische Phänotypen

Im Folgenden werden die Expressionsdaten wichtiger Gene des Cholesterinstoffwechsels aus Gewebeproben von 14 männlichen und 14 weiblichen Knockin-Mäusen (Heterozygote und Mutanten zusammengefasst) mit je sieben gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Mäusen verglichen.

### 5.4.1 Hepatische Genexpression

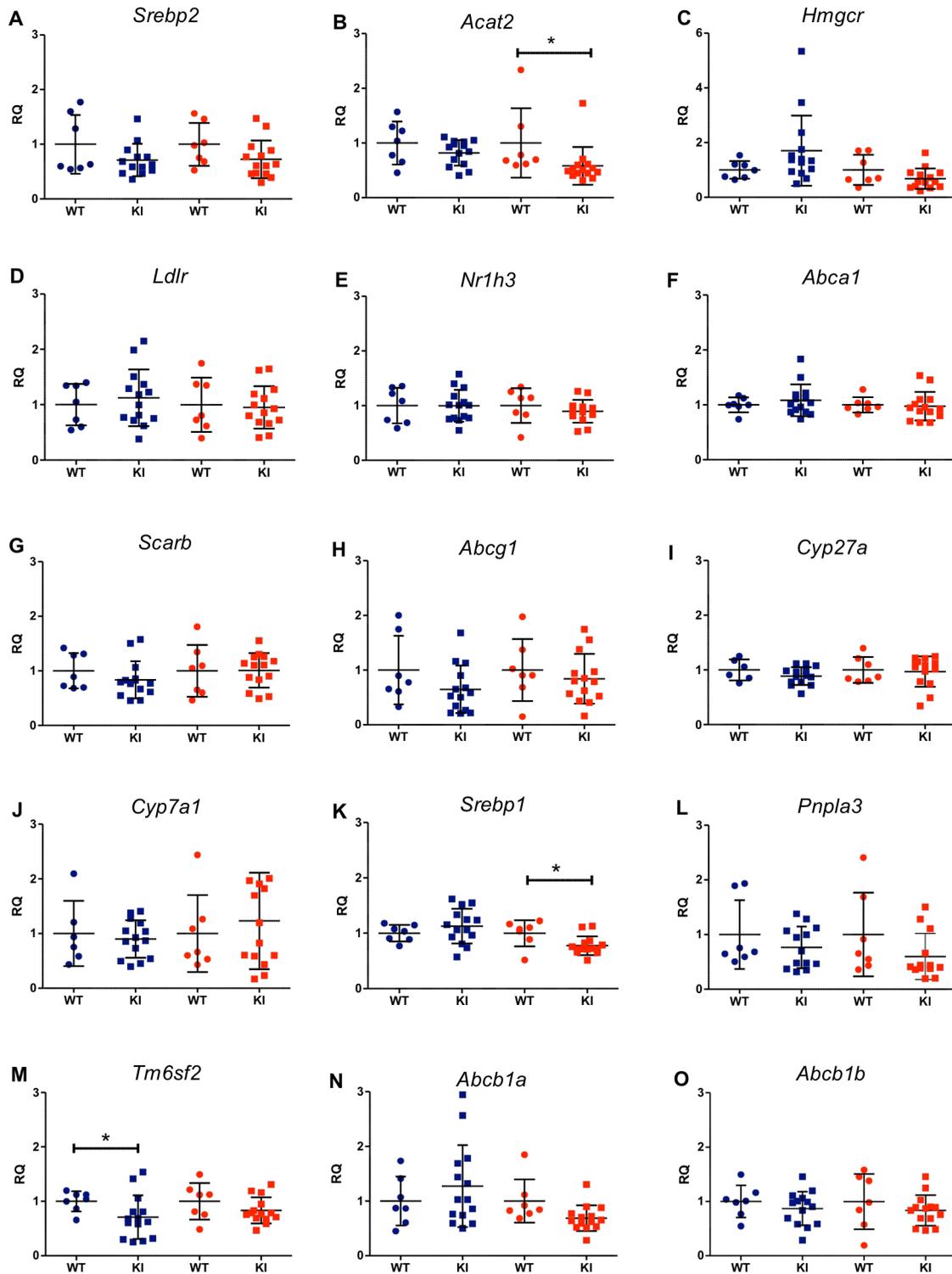
Bei den weiblichen Knockin-Mäusen war die Expression von *Srebp2* ( $0,7 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ;  $p_{U\text{-Test}} = 0,09$ ; Abbildung 25A) leicht und die Expression des SREPB2-regulierten Gens *Acat2* ( $0,6 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ;  $p_{U\text{-Test}} < 0,01$ ; Abbildung 25B) signifikant reprimiert. Bei den männlichen Knockin-Mäusen zeigte sich nur eine leichte Repression von *Srebp2* ( $0,7 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ; Abbildung 25A) und *Acat2* ( $0,8 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ; Abbildung 25B). Die beiden SREPB2-regulierten Gene *Hmgcr* ( $\sigma 1,7 \pm 1,3$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ;  $\text{♀ } 0,7 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ; Abbildung 25C) und *Ldlr* ( $\sigma 0,1 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ;  $\text{♀ } 1,0 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ; Abbildung 25D) zeigten weder bei den Männchen noch bei den Weibchen Genexpressionsunterschiede zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen.

Die Expression des Gens *Nr1h3*, das für den Transkriptionsfaktor LXR kodiert, unterschied sich nicht zwischen Knockin-Mäusen und Kontrollen ( $\sigma 1,0 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ;  $\text{♀ } 0,9 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ; Abbildung 25E). Die nachgeschalteten Gene *Abcal* ( $\sigma 1,1 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,1$ ;  $\text{♀ } 1,0 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,1$ ; Abbildung 25F), *Scarb* ( $\sigma 0,8 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ;  $\text{♀ } 1,0 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ; Abbildung 25G), *Abcg1* ( $\sigma 0,6 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ;  $\text{♀ } 0,8 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ; Abbildung 25H), *Cyp27a* ( $\sigma 0,9 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,2$ ;  $\text{♀ } 1,0 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,2$ ; Abbildung 25I) und *Cyp7a1* ( $\sigma 0,9 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ;  $\text{♀ } 1,2 \pm 0,9$  vs.  $1,0 \pm 0,7$ ; Abbildung 25J) zeigten keine signifikanten genotypabhängigen Genexpressionsunterschiede. Es fiel jedoch bei den weiblichen Knockin-Mäusen eine signifikante Repression des LXR-regulierten Gens *Srebp1* ( $\text{♀ } 0,8 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,2$ ;  $p_{U\text{-Test}} = 0,04$ ; Abbildung 25K) und eine leichte Repression des SREBP1-nachgeschalteten Gens *Pnpla3* ( $\text{♀ } 0,6 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,8$ ;  $p_{U\text{-Test}} = 0,18$ ; Abbildung 25L) auf.

Das Gen *Tm6sf2* war bei den männlichen Knockin-Mäusen signifikant ( $\sigma 0,7 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,2$ ;  $p_{U\text{-Test}} = 0,05$ ; Abbildung 25M) und bei den weiblichen Knockin-Mäusen leicht reprimiert ( $\text{♀ } 0,8 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ; Abbildung 25M).

Die Expression der Gene *Abcb1a* ( $\sigma 1,3 \pm 0,7$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ;  $\text{♀ } 0,7 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ; Abbildung 25N) und *Abcb1b* ( $\sigma 0,9 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ;  $\text{♀ } 0,8 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ; Abbildung 25O), die für mögliche alternative Cholesterintransporter kodieren, waren bei den Knockin-Mäusen vergleichbar mit den Kontrollen.

## Ergebnisse



**Abbildung 25. Relative Genexpression in der Leber.**

Hepatische Expression (RQ) von *Srebp2* (A), *Acat2* (B), *Hmgcr* (C), *Ldlr* (D), *Nr1h3* (E), *Abca1* (F), *Scarb* (G), *Abcg1* (H), *Cyp27a* (I), *Cyp7a1* (J), *Pnpla3* (K), *Srebp1* (L), *Tm6sf2* (M), *Abcb1a* (N) und *Abcb1b* (O) bei den männlichen Knockin-Mäusen (n = 14), die in blauer Farbe dargestellt sind, und bei den weiblichen Knockin-Mäusen (n = 14), die in roter Farbe dargestellt sind, relativ zu den jeweils sieben gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Mäusen.

## 5.4.2 Intestinale Genexpression

### *Relative Genexpression im Duodenum*

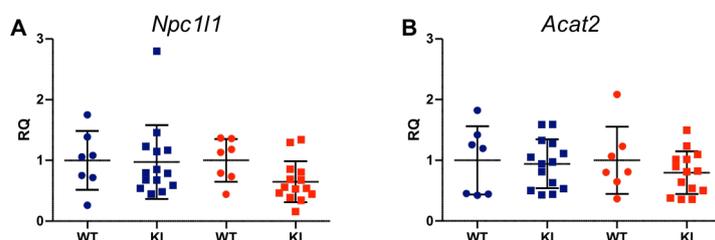
Im Duodenum ergaben die Genexpressionsanalysen von *Npc1l1* ( $\sigma$   $1,0 \pm 0,6$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ;  $\text{♀}$   $0,6 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ; Abbildung 26A) und *Acat2* ( $\sigma$   $1,0 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ;  $\text{♀}$   $0,8 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ; Abbildung 26B) keinen signifikanten Unterschied zwischen Knockin-Mäusen und Kontrollen.

### *Relative Genexpression im Jejunum*

Im Jejunum waren die Genexpression von *Npc1l1* ( $\sigma$   $1,2 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ;  $\text{♀}$   $0,9 \pm 0,3$  vs.  $1,0 \pm 0,2$ ; Abbildung 27A) und *Acat2* ( $\sigma$   $1,3 \pm 1,0$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ;  $\text{♀}$   $1,3 \pm 0,7$  vs.  $1,0 \pm 0,3$ ; Abbildung 27B) ebenfalls vergleichbar zwischen den Knockin-Mäusen und ihren gleichgeschlechtlichen Kontrollen. Hinsichtlich der Expression von *Nr1h3* ( $\sigma$   $1,1 \pm 0,8$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ;  $\text{♀}$   $0,8 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ; Abbildung 27C) und dessen nachgeschalteter Gene *Abcg1* ( $\sigma$   $0,4 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,8$ ;  $\text{♀}$   $2,5 \pm 3,2$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ; Abbildung 27D), *Abca1* ( $\sigma$   $1,2 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ;  $\text{♀}$   $1,0 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ; Abbildung 27E) und *Cyp27a* ( $\sigma$   $0,8 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ;  $\text{♀}$   $0,8 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,5$ ; Abbildung 27F) gab es keine Unterschiede zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen.

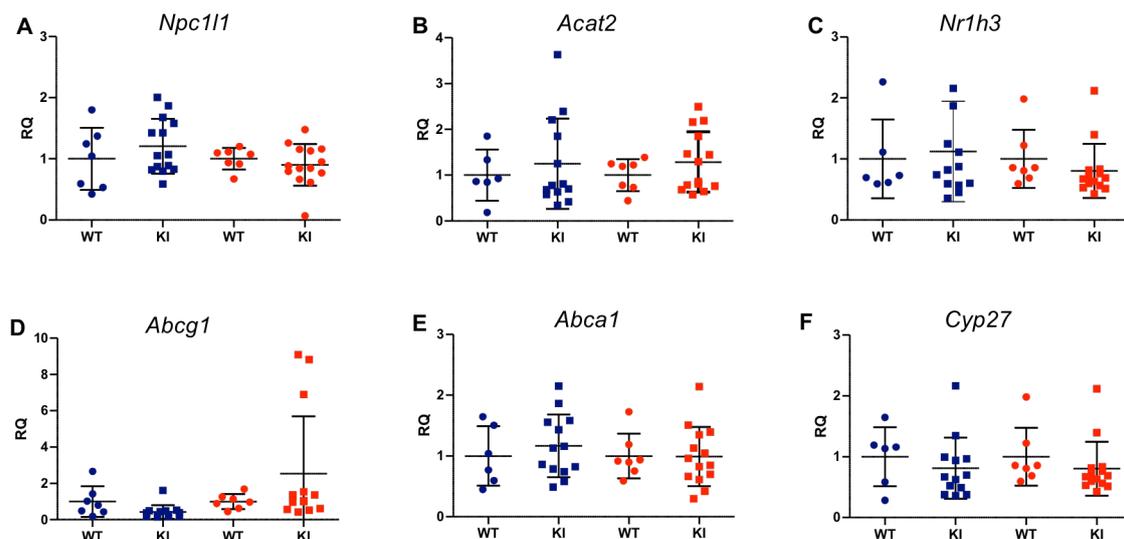
### *Relative Genexpression im Ileum*

Die Expressionsdaten aus dem ilealen Gewebe der Knockin-Mäuse unterschieden sich nicht von den Kontrollen, was *Nr1h3* ( $\sigma$   $0,9 \pm 0,2$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ;  $\text{♀}$   $0,9 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ; Abbildung 28A), *Abca1* ( $\sigma$   $0,9 \pm 0,8$  vs.  $1,0 \pm 0,8$ ;  $\text{♀}$   $0,9 \pm 0,6$  vs.  $1,0 \pm 0,9$ ; Abbildung 28B) und *Scarb* ( $\sigma$   $0,8 \pm 0,7$  vs.  $1,0 \pm 1,2$ ;  $\text{♀}$   $1,1 \pm 1,1$  vs.  $1,0 \pm 0,7$ ; Abbildung 28C) betrifft. Das Gen *Abcg8* ( $\sigma$   $0,6 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,7$ ;  $\text{♀}$   $0,6 \pm 0,4$  vs.  $1,0 \pm 0,7$ ; Abbildung 28D) und die beiden – für mögliche alternative Cholesterintransporter kodierenden – Gene *Abcb1a* ( $\sigma$   $1,3 \pm 0,6$  vs.  $1,0 \pm 0,4$ ;  $\text{♀}$   $1,0 \pm 0,5$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ; Abbildung 28E) und *Abcb1b* ( $\sigma$   $0,9 \pm 1,1$  vs.  $1,0 \pm 0,9$ ;  $\text{♀}$   $1,2 \pm 1,8$  vs.  $1,0 \pm 0,6$ ; Abbildung 28F) waren bei den Knockin-Mäusen weder reprimiert noch induziert im Vergleich zu den Kontrollen.



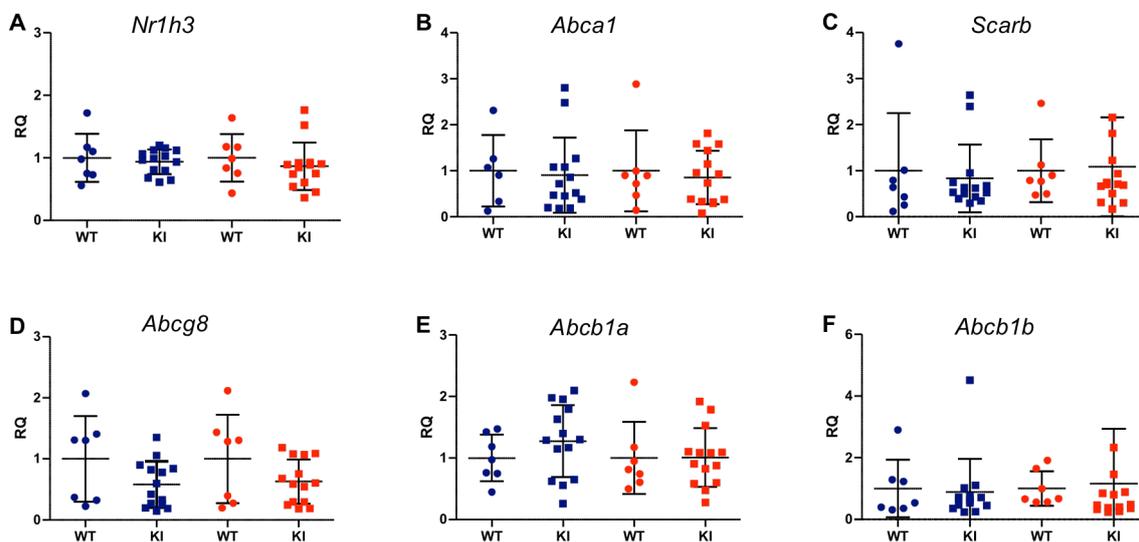
**Abbildung 26. Relative Genexpression im Duodenum.**

Duodenale Expression (*RQ*) von *Npc1l1* (A) und *Acat2* (B) bei den männlichen Knockin-Mäusen ( $n = 14$ ), die in blauer Farbe dargestellt sind, und bei den weiblichen Knockin-Mäusen ( $n = 14$ ), die in roter Farbe dargestellt sind, relativ zu den jeweils sieben gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Mäusen.



**Abbildung 27. Relative Genexpression im Jejunum.**

Jejunale Expression (RQ) von *Npc1l1* (A), *Acat2* (B), *Nr1h3* (C), *Abcg1* (D), *Abca1* (E) und *Cyp27a* (F) bei den männlichen Knockin-Mäusen (n = 14), die in blauer Farbe dargestellt sind, und bei den weiblichen Knockin-Mäusen (n = 14), die in roter Farbe dargestellt sind, relativ zu den jeweils sieben gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Mäusen.



**Abbildung 28. Relative Genexpression im Ileum.**

Ileale Expression (RQ) von *Nr1h3* (A), *Abca1* (B), *Scarb* (C), *Abcg8* (D), *Abcb1a* (E) und *Abcb1b* (F) bei den männlichen Knockin-Mäusen (n = 14), die in blauer Farbe dargestellt sind, und bei den weiblichen Knockin-Mäusen (n = 14), die in roter Farbe dargestellt sind, relativ zu den jeweils sieben gleichgeschlechtlichen Wildtyp-Mäusen.

## 6 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Phänotypisierung des transgenen Mausmodells zusammengefasst und interpretiert. Das Ziel ist es, mehr Erkenntnisse über die *ABCG8* p.D19H-spezifische Gallensteinpathogenese zu gewinnen.

### 6.1 Gallephänotyp

Für den Einstieg in die Diskussion eignet sich der Gallephänotyp der Knockin-Mäuse, da dieser zur Validierung des Mausmodells geführt hat. Die mikroskopischen und laborchemischen Galleuntersuchungen wiesen auf eine Prädisposition der Knockin-Mäuse für die Gallensteinerkrankung hin. Diese Ergebnisse sind somit in Einklang mit den internationalen GWAS, die bereits eine Assoziation der Gallensteinerkrankung mit dem *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus nachgewiesen haben (Buch et al., 2007; Ferkingstad and Oddsson, 2018; Gellert-Kristensen et al., 2019).

#### ***Die mikroskopische Galleuntersuchung wies auf eine einsetzende Gallensteinbildung bei den Knockin-Mäusen hin.***

Die mikroskopische Galleuntersuchung war auf den Nachweis von Cholesterinkristallen ausgerichtet. Cholesterinkristalle sind wichtige Frühindikatoren für die Gallensteinerkrankung, da bis zur Manifestation von Gallensteinen einige Zeit vergeht (Wang and Carey, 1996). Die Flüssigkristalle bilden eine Untergruppe der Cholesterinkristalle, welche im Rahmen der gängigen Kristallisationswege als erstes entsteht (Wang and Carey, 1996). In der Tat lagen bei den meisten Knockin-Mäusen und Kontrollen Flüssigkristalle vor. Bei den weiblichen Knockin-Mäusen waren jedoch deutlich größere Mengen an Flüssigkristallen zu beobachten als bei den Kontrollen. Hinzukommt, dass zwei weibliche Mutanten und eine weibliche Heterozygote bereits kleine Gallensteine aufwiesen. Letzteres ist außergewöhnlich bei Mäusen unter normaler Diät und angesichts des jungen Alters der untersuchten Mäuse. Der Gallephänotyp der Knockin-Mäuse weist somit auf eine beginnende und teilweise bereits vorliegende Gallensteinerkrankung hin.

Bei den männlichen Mäusen waren keine Gallensteine zu beobachten und bezüglich der Menge an Flüssigkristallen war kein Unterschied zwischen den Genotypen erkennbar. Diese Diskrepanz zwischen den Geschlechtern ist am ehesten durch die prolithogene Wirkung von Östrogen zu erklären (Cirillo et al., 2005).

Insgesamt wurden selten solide Cholesterin-Monohydratkristalle identifiziert. Ein Grund dafür könnte sein, dass ChM-Kristalle im Rahmen der *in vivo*-vorkommenden Kristallisationswege selten auftreten

(Wang and Carey, 1996). Hinzukommt, dass die Identifizierung der Monohydratkristalle mit einer gewissen Unsicherheit behaftet war, da diese sich im Polarisationslicht nur durch die charakteristischen 79°- und 108°-Winkel (Wang and Carey, 1996) von den unvermeidbaren Glaskristallen auf dem Objektträger unterscheiden ließen.

***Die erhöhten Cholesterinkonzentrationen in der Gallenblasengalle der Knockin-Mäuse weisen auf eine gesteigerte biliäre Cholesterinsekretion hin.***

Die notwendige Bedingung für die Präzipitation von Cholesterinkristallen ist die Übersättigung der Gallenblasengalle mit Cholesterin. Prinzipiell kann die Cholesterinübersättigung eine Folge von Cholesterinhypersekretion oder Phospholipid- und GallensäurehyPOSEKRETION sein (Lammert et al., 2001). Die Cholesterinkonzentrationen in der Gallenblasengalle der Knockin-Mäuse waren signifikant erhöht, was in erster Linie auf eine biliäre Cholesterinhypersekretion hinweist. In der Tat zeigten aktuelle Sekretionsanalysen mit kontinuierlicher Galleableitung über eine Gallefistel, dass es bei den Knockin-Mäusen zur Cholesterinhypersekretion kommt (Rebholz, 2019).

Trotz der erhöhten Cholesterinkonzentrationen in den Galleproben der Knockin-Mäuse lag der Cholesterinsättigungsindex unter dem Wert, der eine Cholesterinübersättigung anzeigt ( $CSI < 1$ ). Dies ist allerdings nicht ungewöhnlich, da nach den stattgehabten Ausfällungsprozessen erst eine Neueinstellung des Gleichgewichts erfolgen muss.

Bei den humanen Polymorphismusträgern waren ebenfalls erhöhte Cholesterinkonzentrationen in der Gallenblasengalle gemessen worden (Siddapuram et al., 2010). *In vitro*-Sekretionsanalysen an transfizierten HEK293-Zellen, die den *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus exprimierten, konnten einen signifikant gesteigerten Cholesterinefflux nachweisen (von Kampen et al., 2013). Beim Menschen sind *in vivo*-Sekretionsanalysen aufgrund der invasiven Messmethode nicht möglich.

## 6.2 Serumphänotyp

Der Gallephänotyp der Knockin-Mäuse ist in Einklang mit der aktuellen Studienlage, entsprechend derer der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus mit der Gallensteinerkrankung assoziiert ist und zu einer gesteigerten biliären Cholesterinsekretion führt (Buch et al., 2007; von Kampen et al., 2013). Darauf aufbauend wurde vermutet, dass der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus einen Funktionsgewinn des Cholesterin- und Phytosterintransporters ABCG5/8 zur Folge hat (Grünhage et al., 2007). Diese Hypothese wird durch den Nachweis verminderter Serum-Phytosterinkonzentrationen bei den humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern gestützt (Berge et al., 2002; Gylling et al., 2004; Jakulj et al., 2010). Bei den Knockin-Mäusen wurden daher ebenfalls die Phytosterinkonzentrationen im Serum gemessen. Zudem wurden die Serumkonzentrationen von Cholesterin sowie Cholesterinvorläufern und -metaboliten bestimmt, um mögliche Auswirkungen des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus auf den Cholesterinstoffwechsel zu analysieren.

### ***Die erhöhten Phytosterinkonzentrationen im Serum der Knockin-Mäuse weisen auf ein Funktionsdefizit der ABCG5/8-Effluxpumpe hin.***

Phytosterine werden über die gleichen Transporter wie Cholesterin aus der Nahrung absorbiert und in die Galle sezerniert (Yu et al., 2002a). Allerdings können Phytosterine – im Unterschied zu Cholesterin – nicht vom Körper synthetisiert werden. Daher kommt ihnen eine wichtige Bedeutung als Surrogatparameter für die Cholesterinabsorption und -sekretion zu (Matthan et al., 2000; Miettinen et al., 1990; Lutjohann, 2015). Die Serum-Phytosterinkonzentrationen werden unter anderem zur Beurteilung der Funktion des Cholesterin- und Phytosterintransporters ABCG5/8 herangezogen (Berge et al., 2002; Gylling et al., 2004; Jakulj et al., 2010): Hohe Phytosterinkonzentrationen im Serum sind typisch für einen ABCG5/8-Funktionsverlust wie bei *Abcg5/8* Knockout-Mäusen (Yu et al., 2002a) und Sitosterolämie-Patienten (Salen et al., 1992). Verminderte Serum-Phytosterinkonzentrationen liegen beispielsweise bei *ABCG5/8*-Überexpression vor (Yu et al., 2002b).

Bei den *Abcg8* p.D19H Knockin-Mäusen waren die Serum-Phytosterinkonzentrationen signifikant erhöht im Vergleich mit den Kontrollen. Die Erhöhung der Phytosterinkonzentrationen war zwar nur bei den Knockin-Mäusen unter normaler Diät nachweisbar, und das Ausmaß der Phytosterinakkumulation war lange nicht so hoch wie bei den *Abcg5/8* Knockout-Mäusen. Nichtsdestotrotz ist basierend auf diesen Ergebnissen davon auszugehen, dass bei den Knockin-Mäusen ein Funktionsdefizit und nicht wie bisher postuliert ein Funktionsgewinn der ABCG5/8-Effluxpumpe vorliegt.

Dass sich die verminderte ABCG5/8-Pumpaktivität nur unter normaler Diät demaskieren ließ, ist am ehesten durch den unterschiedlichen Phytosteringehalt der normalen und der lithogenen Diät zu erklären. Die normale Maus-Diät enthält einen vergleichsweise hohen Anteil (7 %) an phytosterinreichem Maiskeimöl (Yang et al., 2019), wohingegen die lithogene/westliche Diät aufgrund eines geringen Maiskeimöl-Anteils (2 %) und eines hohen Butterfett-Anteils (15 %) deutlich phytosterinärmer ist. Unter der lithogenen, phytosterinarmen Diät ist die ABCG5/8-Pumpaktivität vermutlich gerade noch ausreichend, um die Serum-Phytosterinkonzentrationen nicht ansteigen zu lassen. Zudem kann ein leichter Anstieg der Phytosterinkonzentrationen kompensiert werden: Phytosterine können bis zu einem gewissen Grad ihre eigene Serumkonzentration reduzieren, indem sie die Chylomikronen- und die VLDL-Bildung und somit ihren eigenen Transport mit dem Blut hemmen (Marangoni and Poli, 2010; Plat and Mensink, 2005).

Die hemmenden Effekte der Phytosterine auf die Chylomikronen- und die VLDL-Bildung würden auch die signifikant verminderten non-HDL-Cholesterinkonzentrationen (Helgadottir et al., 2020) und die signifikant verminderten Serum-Phytosterinkonzentrationen bei humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern erklären (Gylling et al., 2004). Initial hatten die verminderten Serum-Phytosterinkonzentrationen bei humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern zu der Hypothese vom ABCG5/8-Funktionsgewinn geführt (Grünhage et al., 2007).

***Die Cholesterinkonzentrationen im Serum der Knockin-Mäuse waren nicht erhöht trotz des vermuteten Funktionsdefizits der Sterol-Effluxpumpe ABCG5/8.***

Es wäre zu erwarten, dass ein Funktionsdefizit der gemeinsamen Effluxpumpe für Cholesterin und Phytosterin zur Akkumulation beider Substrate führt. Bei den Knockin-Mäusen mit dem vermuteten ABCG5/8-Funktionsdefizit waren allerdings nur die Serum-Phytosterinkonzentrationen signifikant erhöht. Die Cholesterinkonzentrationen im Serum der Knockin-Mäuse waren weder unter normaler noch unter phytosterinreicher Diät signifikant erhöht. Die beiden Substrate der ABCG5/8-Effluxpumpe, Cholesterin und Phytosterin, unterscheiden sich in zwei Punkten.

Erstens werden Phytosterine von ABCG5/8 präferenziell transportiert: Der Exkretionsquotient für Phytosterin beträgt das Dreifache des Exkretionsquotienten für Cholesterin (Yu et al., 2004). Eine ABCG5/8-Funktionsänderung wirkt sich daher zuerst auf die Serum-Phytosterinkonzentrationen aus. Sogar die *Abcg5/8* Knockout-Mäuse weisen zehnfach erhöhte Serum-Phytosterinkonzentrationen und trotzdem keine erhöhten Cholesterinkonzentrationen auf (Yu et al., 2002a).

Zweitens besteht für Cholesterin – nicht jedoch für Phytosterine – die Möglichkeit ein Sekretionsdefizit durch Anpassung der Cholesterinsynthese und -metabolisierung auszugleichen, um die Homöostase

aufrechtzuerhalten. Die Lathosterol- und Oxysterolkonzentrationen im Serum der Knockin-Mäuse lieferten allerdings keinen Hinweis auf eine etwaige Anpassung des Cholesterinstoffwechsels. An dieser Stelle sei auf den Leberphänotyp verwiesen, denn in der Leber sind die Konzentrationen der Cholesterinvorläufer und -metabolite deutlich höher und daher besser beurteilbar.

Darüber hinaus gab es bei humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern ebenfalls keine Assoziation zwischen der Genvariante und den Cholesterinkonzentrationen im Serum (Jakulj et al., 2010).

## 6.3 Leberphänotyp

Die Phytosterinakkumulation im Serum der Knockin-Mäuse hat zu der Hypothese vom ABCG5/8-Funktionsdefizit geführt. Die Cholesterinkonzentrationen im Serum der Knockin-Mäuse waren allerdings trotz des vermuteten Funktionsdefizits der Sterol-Effluxpumpe nicht erhöht. Letzteres könnte auf eine Anpassung des hepatischen Cholesterinstoffwechsels an die veränderte Sterolsekretion hindeuten. Daher wurden im Lebergewebe die Konzentrationen von Cholesterinvorläufern und Cholesterinmetaboliten bestimmt sowie Expressionsanalysen der wichtigsten Gene des Cholesterinstoffwechsels durchgeführt. Diese Untersuchungen an Lebergewebeproben der Knockin-Mäuse sind interessant, da es aufgrund der invasiven Probengewinnung bisher keine Daten zum Leberphänotyp von humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern gibt.

***Es gab keine laborchemischen oder molekularbiologischen Hinweise für eine Anpassung des Cholesterinstoffwechsels an die Veränderungen infolge des ABCG5/8-Funktionsdefizits.***

Auf der Leberebene gab es keine laborchemischen oder molekularbiologischen Unterschiede zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen, die auf Anpassungen des Cholesterinstoffwechsels hindeuteten. Die hepatischen Konzentrationen des Cholesterinvorläufers Lathosterol sowie des Cholesterinmetaboliten 27-Hydroxy-Cholesterin waren bei den Knockin-Mäusen und den Kontrollen vergleichbar. Die Expression der Gene *Hmgcr*, *Cyp7a1* und *Cyp27a1*, die für Enzyme der Cholesterinsynthese und -metabolisierung kodieren, war vergleichbar zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen. Zum sicheren Ausschluss einer Regulation der Cholesterinsynthese oder -metabolisierung sind weitere Untersuchungen auf Enzymebene notwendig.

Bisher sprechen die Daten nicht dafür, dass die Cholesterinhomöostase im Serum der Knockin-Mäuse von einer Anpassung der Cholesterinsynthese und -metabolisierung abhängt. Alternativ könnte die verminderte ABCG5/8-Pumpaktivität durch eine ABCG5/8-unabhängige Cholesterinsekretion ausgeglichen werden. In der Tat wird die Existenz einer ABCG5/8-unabhängigen Cholesterinsekretion schon seit einigen Jahren vermutet. Diese Vermutung wird dadurch begründet, dass selbst bei kompletten *Abcg5/8* Knockout-Mäusen die intestinale (Le May et al., 2013) und die biliäre Cholesterinsekretion (Poppenborg, 2019) erhalten oder sogar gesteigert waren gegenüber den Kontrollen. Aktuelle Gallesekretionsanalysen von *Abcg5/8* Knockout- (Poppenborg, 2019) und *Abcg8* p.D19H Knockin-Mäusen (Rebholz, 2019) wiesen insbesondere eine gesteigerte gallensäurenunabhängige Cholesterinsekretion nach. Ein alternativer Transporter (Le May et al., 2013) oder eine transporterunabhängige gallensäurenabhängige Membranknospeung (Eckstein and Holzhutter, 2018) könnten für die gallensäurenunabhängige Cholesterinsekretion verantwortlich sein.

### ***Die erhöhten hepatischen Phytosterinkonzentrationen sind frühe Anzeichen für eine Phytosterinakkumulation bei den Knockin-Mäusen.***

Der Leberphänotyp der Knockin-Mäuse bestätigt den zentralen Befund aus der Serumanalyse. Bei den Knockin-Mäusen unter normaler Diät waren in der Leber wie im Serum die Phytosterinkonzentrationen signifikant erhöht im Vergleich mit den Kontrollen.

Die hepatischen Phytosterinkonzentrationen waren sogar bei den Knockin-Mäusen unter lithogener, phytosterinarmer Diät leicht erhöht, obgleich diese Kohorte im Serum keine erhöhten Phytosterinkonzentrationen aufgewiesen hatte. In der Leber ist die Phytosterinakkumulation bei den Knockin-Mäusen demnach sogar unter günstigen Umweltbedingungen wie phytosterinarmer Diät nachweisbar. Der Leberphänotyp kann im Vergleich mit dem Serumphänotyp als der sensitivere Marker für ein ABCG5/8-Funktionsdefizit angesehen werden. Bei den humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern wären die hepatischen Phytosterinkonzentrationen daher ebenfalls von großem Interesse.

### ***Die hepatische Acat2-Repression könnte zur Aufrechterhaltung der Cholesterinhomöostase im Serum der Knockin-Mäuse beigetragen haben.***

Die Gene *Acat2* und *Tm6sf2* waren bei den Knockin-Mäusen signifikant reprimiert im Vergleich mit den Kontrollen. ACAT2 und das ER-gebundene Protein ‚Transmembrane 6 Superfamily Member 2‘ (TM6SF2) spielen wichtige Rollen für die Lipoprotein-Assemblierung (Ehrhardt et al., 2017; Smagris et al., 2016). ACAT2 verestert Cholesterin und Phytosterine (Temel et al., 2003), damit diese in VLDL verpackt und in das Blut abgegeben werden können. Ein ACAT2-Mangel, der durch die *Acat2*-Repression entsteht, führt zur verminderten Bildung und Abgabe von Lipoproteinen (Buhman et al., 2000; Luo and Yang, 2020). Die stabilen Serum-Cholesterinkonzentrationen bei den Knockin-Mäusen könnten daher mit der Repression von *Acat2* und *Tm6sf2* in Zusammenhang stehen. Die *Acat2*-Repression wiederum könnte durch die erhöhten intrahepatischen Phytosterinkonzentrationen bei den Knockin-Mäusen ausgelöst worden sein. Dafür sprechen weitere Studien, die bereits eine phytosterininduzierte Repression von *Acat2* und weiteren Genen wie *Srebp2* nachgewiesen haben (Jesch et al., 2009; Lanlan Yuan, 2020).

Des Weiteren war das LXR-nachgeschaltete Gen *Srebp1c* reprimiert. Der SREBP1c/Scap-Komplex ist ein Transkriptionsfaktor für Gene der Fettsäure- und Triglyceridsynthese sowie des hepatischen Triglycerid-Remodelings (Horton et al., 2002; Qiao et al., 2011). Das ‚Patatin-like phospholipase domain-containing Protein 3‘ (PNPLA3) ist ein nachgeschaltetes Gen von SREBP1c und Enzym des Triglycerid-Remodelings (Ruhanen et al., 2014). Die *Pnpla3*-Expression war bei den untersuchten Knockin-Mäusen ebenfalls leicht vermindert. *PNPLA3*-Mutationen gehen mit einer erhöhten Suszeptibilität für

die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) einher (Romeo et al., 2008). Das Lebergewicht, welches ein Surrogatparameter für Steatosis ist (Inoue et al., 2005), war bei den Knockin-Mäusen allerdings unauffällig.

Darüber hinaus gab es – betreffend der wichtigsten Gene des Cholesterinstoffwechsels – keine weiteren Expressionsunterschiede zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen. Außerdem war die Expression von *Abcb1a* und *Abcb1b* bei den Knockin-Mäusen nicht verschieden von den Kontrollen. Die beiden Transporter ABCB1A und ABCB1B kommen als mögliche Alternativen zu ABCG5/8 infrage (Le May et al., 2013). Es sind allerdings noch zusätzliche Untersuchungen auf Enzymebene nötig, um eine Regulation von ABCB1A und ABCB1B sicher ausschließen zu können.

Bei den humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern wurden bisher keine Genexpressionsanalysen aus Lebergewebe durchgeführt. Die verminderten non-HDL-Konzentrationen im Serum der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträger (Helgadottir et al., 2020) weisen allerdings auf eine hepatische *ACAT2*-Repression hin.

## 6.4 Darmphänotyp

Die molekularbiologischen Untersuchungen der Leberproben haben gezeigt, dass der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus Auswirkungen auf die Genexpression hat. Der Dünndarm, der das zweitwichtigste Organ im Cholesterinstoffwechsel darstellt und gleichfalls *ABCG5/8* exprimiert, wurde daher ebenfalls molekularbiologisch analysiert.

***Dass es im Dünndarm keine Genexpressionsunterschiede zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen gab, könnte auf die Versuchsdurchführung zurückführbar sein.***

Im Duodenum, im Jejunum und im Ileum gab es zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen keine Unterschiede hinsichtlich der Expression der wichtigsten Gene des Cholesterinstoffwechsels. Insbesondere die LXR-regulierten Gene *Abca1*, *Scarb* und *Abcg1* wiesen keine Genexpressionsunterschiede zwischen den Knockin-Mäusen und den Kontrollen auf. Eigentlich wäre in den Dünndarmabschnitten der Knockin-Mäuse – aufgrund des Funktionsdefizits der enterozytären *ABCG5/8*-Effluxpumpe und den folglich hohen intrazellulären Phytosterinkonzentrationen – mit einer phytosterin-induzierten Repression der LXR-nachgeschalteten Gene zu rechnen gewesen. Eine Studie an Caco-2-Zellen hat gezeigt, dass Phytosterine kompetitiv das CYP27A-Enzym und somit die Bildung des CYP27A-Produktes, 27-Hydroxy-Cholesterin, hemmen (Brauner et al., 2012). Auf diesem Weg hemmen Phytosterine den Transkriptionsfaktor LXR, dessen wichtigster Ligand 27-Hydroxy-Cholesterin ist (Brauner et al., 2012; Hutchinson et al., 2019). Die Phytosterine können somit ihre eigene ABCA1-, ABCG1- und SCARB-vermittelte Abgabe an die prä-HDL im Blut hemmen (Brauner et al., 2012). Dass die ‚steady-state‘ mRNA-Level von *Abca1*, *Scarb* und *Abcg1* bei den Knockin-Mäusen nicht reprimiert waren, könnte der unphysiologischen 12-stündigen Fastenperiode vor der Organentnahme geschuldet sein.

## 6.5 Gallenblasenphänotyp

Die Gallensteinentstehung wird maßgeblich durch die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit bestimmt. Die biliäre Cholesterinübersättigung alleine führt allerdings nicht zwangsläufig zu Gallensteinen (Holzbach et al., 1973). Für die Nukleationsprozesse ist zudem die andauernde Stase der Gallenflüssigkeit notwendig, die durch eine verminderte Gallenblasenmotilität zustande kommt. Die Gallenblasenhypomotilität ist daher – zusammen mit der Cholesterinübersättigung und destabilisierenden Faktoren in der Gallenflüssigkeit – einer der drei Schlüsselmechanismen der Gallensteinentstehung (Behar et al., 1989; Pauletzki et al., 1993; van Erpecum et al., 1992; van Erpecum et al., 2006). Als Maß zur Beurteilung der Gallenblasenmotilität gilt das Gallenblasenvolumen nach 12-stündiger Fastenperiode (Pauletzki et al., 1993; Wang et al., 2004).

### ***Die größeren Gallenblasenvolumina weisen auf eine Gallenblasenhypomotilität bei den weiblichen Knockin-Mäusen hin.***

Die Gallenblasenvolumina der weiblichen Knockin-Mäuse waren größer im Vergleich mit den Kontrollen. Diese Beobachtung spricht für seltenere Gallenblasenentleerungen bei den Knockin-Mäusen (Wang et al., 2004). Eine bekannte Ursache für die Gallenblasenhypomotilität – neben den weiblichen Hormonen (Cirillo et al., 2005) – ist die Einlagerung von Cholesterin in die Gallenblasenwand (Cong et al., 2010). Die Integration von Cholesterin in die Plasmamembran der Gallenblasenmuskelzellen führt zur Sequestrierung der Cholezystokinin1-Rezeptoren (CCK-1R) und folglich zur Abnahme der Zellkontraktilität (Cong et al., 2010). Cholesterin aus der Gallenflüssigkeit wird durch aktive und passive Mechanismen in die Gallenblasenwand eingelagert (Ginanni Corradini et al., 1998; Jacyna et al., 1987). Die Cholangiozyten können – zum Schutz vor Cholesterinüberladung – Cholesterin über die ABCG5/8-Effluxpumpe zurück in die Galle sezernieren (Yoon et al., 2013). Dieser Sekretionsweg ist bei den Knockin-Mäusen aufgrund des ABCG5/8-Funktionsdefizits vermutlich eingeschränkt, sodass es schon in einer sehr frühen Phase der Gallensteinerkrankung zur Sterolakkumulation in der Gallenblasenwand kommen kann. Die Gallenblasenhypomotilität manifestiert sich daher bereits bei den wenigen Wochen alten Knockin-Mäusen und beschleunigt das Fortschreiten der Gallensteinerkrankung.

Bisher gibt es keine Daten über die postprandialen Gallenblasenvolumina bei humanen *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträgern. Allerdings besteht eine Assoziation von Gallenblasenkarzinomen mit dem *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus (Srivastava et al., 2009; Stender et al., 2011). Ein Grund dafür könnte sein, dass chronische Entzündungen durch die intrazelluläre Cholesterinakkumulation ausgelöst werden (Rajamaki et al., 2010).

## 6.6 Synopsis

Die Quintessenz der umfassenden Phänotypisierung des Knockin-Mausmodells war, dass der *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus zur Phytosterin- und Cholesterinanreicherung im hepatobiliären System und infolgedessen zur Gallensteinentstehung führt. In der Leber der Knockin-Mäuse akkumulierten Phytosterine, in der Gallenblasengalle zeigten sich erhöhte Cholesterinkonzentrationen, und die Gallenblasenhypomotilität deutete auf eine Sterolakkumulation in der Gallenblasenwand hin. Die biliäre Cholesterinübersättigung und die Gallenblasenhypomotilität erhöhen beide das Risiko für die Gallensteinentstehung. In der Gallenblasengalle der Knockin-Mäuse fanden sich dementsprechend vermehrt Cholesterinkristalle sowie erste Gallensteine.

Die Erkenntnisse aus der Phänotypisierung des Knockin-Mausmodells führen außerdem zu einer neuen Hypothese bezüglich der *ABCG5/8*-Funktionsänderung infolge des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus. Diese geht von einem *ABCG8* p.D19H-induzierten Funktionsdefizit der *ABCG5/8*-Effluxpumpe aus. Bisher wurde postuliert, dass es im Rahmen des *ABCG8* p.D19H-Polymorphismus zu einem *ABCG5/8*-Funktionsgewinn kommt (Grünhage et al., 2007). Das Argument für die neue Hypothese ist, dass der *Abcg8* p.D19H Knockin-Phänotyp insgesamt wie eine Minorform des *Abcg5/8* Knockout-Phänotyps imponiert: Erstens sind die erhöhten Serum-Phytosterinkonzentrationen, die bei den Knockin-Mäusen nachgewiesen wurden, pathognomonisch für die *ABCG5/8*-Defizienz bei Knockout-Mäusen (Yu et al., 2002a). Zweitens glichen sich die Knockin- und die Knockout-Mäuse bezüglich der erhöhten Cholesterinkonzentrationen in der Gallenflüssigkeit (Poppenborg, 2019; Rebholz, 2019). Wie es zu den erhöhten Cholesterinkonzentrationen in der Gallenflüssigkeit kam, zeigten die Gallesekretionsanalysen von Poppenborg (2019) und Rebholz (2019): Die gallensäurenunabhängige Cholesterinsekretion war bei den Knockin-Mäusen sowie bei den leberspezifischen Knockout-Mäusen gesteigert. Die gallensäurenunabhängige Cholesterinsekretion ist vermutlich das Korrelat einer *ABCG5/8*-unabhängigen Cholesterinsekretion in die Galle, deren Existenz schon seit einiger Zeit vermutet wird (Geuken et al., 2005).

Die Schlussfolgerung der Phänotypisierung des *Abcg8* p.D19H Knockin-Mausmodells ist, dass die *ABCG8* p.D19H-Variante zu einem leichten Funktionsdefizit der *ABCG5/8*-Effluxpumpe führt. Die daraus resultierende Phytosterin- und Cholesterinakkumulation betrifft primär das hepatobiliäre System und führt zur Gallensteinentstehung. Die Beschränkung der Sterolakkumulation auf das hepatobiliäre System steht vermutlich mit der Repression der beiden Gene *Acat2* und *Tm6sf2* in Zusammenhang. ACAT2 und TM6SF2 spielen für die hepatische VLDL-Bildung eine wichtige Rolle.

In der Zukunft sollten die Ergebnisse der Phänotypisierung des Knockin-Mausmodells durch Studien an humanen Polymorphismusträgern verifiziert werden. Um die *ABCG8* p.D19H-induzierte Funktionsänderung des ABCG5/8-Transporters mit letzter Sicherheit zu identifizieren, sind zudem Struktur- und Funktionsanalysen des ABCG5/8-Transporters notwendig.

Auf der Basis der aktuellen Erkenntnisse aus dem Knockin-Mausmodell lassen sich erste Therapieansätze für die *ABCG8* p.D19H-Polymorphismusträger formulieren. Dieser Patientengruppe sollte in erster Linie zu einer cholesterin- und phytosterinarmen Diät geraten werden. Unterstützend könnte die Einnahme von Sterolresorptionshemmern wie Ezetimib erwogen werden, um die Sterolakkumulation im hepatobiliären System zu reduzieren. Zudem könnte eine medikamentöse Prävention mit motilitätsfördernden Medikamenten wie beispielsweise Makroliden sinnvoll sein (Portincasa et al., 2000), um die Cholesterineinlagerung in die Gallenblasenwand zu verhindern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, et al. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature Genetics* 34:154-156
2. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M (1996) Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520
3. Admirand WH, Small DM (1968) The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *Journal of Clinical Investigation* 47:1043-1052
4. Alberts AW (1988) Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *American Journal of Cardiology* 62:10j-15j
5. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry* 20:470-475
6. Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303:1201-1204
7. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ (2001) Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Journal of Biological Chemistry* 276:28857-28865
8. Armstrong MJ, Carey MC (1982) The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of Lipid Research* 23:70-80
9. Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, et al. (2005) OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 42:1270-1279
10. Bass G, Gilani SN, Walsh TN (2013) Validating the 5Fs mnemonic for cholelithiasis: time to include family history. *Postgraduate Medical Journal* 89:638-641
11. Baumer Y, McCurdy S, Weatherby TM, Mehta NN, Halbherr S, Halbherr P, et al. (2017) Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis. *Nature Communications* 8:1129
12. Behar J, Lee KY, Thompson WR, Biancani P (1989) Gallbladder contraction in patients with pigment and cholesterol stones. *Gastroenterology* 97:1479-1484

13. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 290:1771-1775
14. Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, et al. (2002) Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *Journal of Lipid Research* 43:486-494
15. Bhattacharyya AK, Connor WE (1974) Beta-sitosterolemia and xanthomatosis. A newly described lipid storage disease in two sisters. *Journal of Clinical Investigation* 53:1033-1043
16. Brauner R, Johannes C, Ploessl F, Bracher F, Lorenz RL (2012) Phytosterols reduce cholesterol absorption by inhibition of 27-hydroxycholesterol generation, liver X receptor alpha activation, and expression of the basolateral sterol exporter ATP-binding cassette A1 in Caco-2 enterocytes. *Journal of Nutrition* 142:981-989
17. Brown MS, Goldstein JL (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232:34-47
18. Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331-340
19. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL (1981) Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212:628-635
20. Brufau G, Groen AK, Kuipers F (2011) Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31:1726-1733
21. Buch S, Schafmayer C, Volzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, et al. (2007) A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nature Genetics* 39:995-999
22. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, et al. (2000) Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nature Medicine* 6:1341-1347
23. Carey MC (1978) Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *Journal of Lipid Research* 19:945-955
24. Cartwright IJ, Plonne D, Higgins JA (2000) Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *Journal of Lipid Research* 41:1728-1739

25. Cirillo DJ, Wallace RB, Rodabough RJ, Greenland P, LaCroix AZ, Limacher MC, et al. (2005) Effect of estrogen therapy on gallbladder disease. *Journal of the American Medical Association* 293:330-339
26. Coleman R, Rahman K (1992) Lipid flow in bile formation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1125:113-133
27. Cong P, Pricolo V, Biancani P, Behar J (2010) Effects of cholesterol on CCK-1 receptors and caveolin-3 proteins recycling in human gallbladder muscle. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 299:G742-750
28. Diehl AK, Sugarek NJ, Todd KH (1990) Clinical evaluation for gallstone disease: usefulness of symptoms and signs in diagnosis. *American Journal of Medicine* 89:29-33
29. Eckstein J, Holzhutter HG (2018) The importance of membrane microdomains for bile salt-dependent biliary lipid secretion. *Journal of Cell Science* 131
30. Ehrhardt N, Doche ME, Chen S, Mao HZ, Walsh MT, Bedoya C, et al. (2017) Hepatic Tm6sf2 overexpression affects cellular ApoB-trafficking, plasma lipid levels, hepatic steatosis and atherosclerosis. *Human Molecular Genetics* 26:2719-2731
31. Ferkingstad E, Oddsson A (2018) Genome-wide association meta-analysis yields 20 loci associated with gallstone disease. *Nature Communications* 9:5101
32. Ge L, Wang J, Qi W, Miao HH, Cao J, Qu YX, et al. (2008) The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1. *Cell Metabolism* 7:508-519
33. Gellert-Kristensen H, Dalila N, Fallgaard Nielsen S, Gronne Nordestgaard B, Tybjaerg-Hansen A, Stender S (2019) Identification and Replication of Six Loci Associated With Gallstone Disease. *Hepatology* 70:597-609
34. Gerlach D (1976) Das Lichtmikroskop: e. Einf. in Funktion, Handhabung u. Spezialverfahren für Mediziner u. Biologen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
35. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, et al. (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *Journal of Biological Chemistry* 273:10046-10050
36. Geuken E, Visser DS, Leuvenink HG, de Jong KP, Peeters PM, Slooff MJ, et al. (2005) Hepatic expression of ABC transporters G5 and G8 does not correlate with biliary cholesterol secretion in liver transplant patients. *Hepatology* 42:1166-1174

37. Ginanni Corradini S, Ripani C, Della Guardia P, Giovannelli L, Elisei W, Cantafora A, et al. (1998) The human gallbladder increases cholesterol solubility in bile by differential lipid absorption: a study using a new in vitro model of isolated intra-arterially perfused gallbladder. *Hepatology* 28:314-322
38. Goldstein JL, Brown MS (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430
39. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, et al. (2002) Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *Journal of Clinical Investigation* 110:659-669
40. Gregg RE, Connor WE, Lin DS, Brewer HB, Jr. (1986) Abnormal metabolism of shellfish sterols in a patient with sitosterolemia and xanthomatosis. *Journal of Clinical Investigation* 77:1864-1872
41. Groen AK, Bloks VW, Verkade H, Kuipers F (2014) Cross-talk between liver and intestine in control of cholesterol and energy homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* 37:77-88
42. Grundy SM (2004) Cholesterol gallstones: a fellow traveler with metabolic syndrome? *American Journal of Clinical Nutrition* 80:1-2
43. Grünhage F, Acalovschi M, Tirziu S, Walier M, Wienker TF, Ciocan A, et al. (2007) Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology* 46:793-801
44. Gudbjartsson DF, Helgason H, Gudjonsson SA, Zink F, Oddson A, Gylfason A, et al. (2015) Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population. *Nature Genetics* 47:435-444
45. Gutt C, Jenssen C, Barreiros A-P, Götze T, Stokes C, Jansen PJ, et al. (2018) Aktualisierte S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie (DGAV) zur Prävention, Diagnostik und Behandlung von Gallensteinen. *AWMF-Register* 021/008
46. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, et al. (2004) Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *Journal of Lipid Research* 45:1660-1665
47. Heaton KW, Emmett PM, Symes CL, Braddon FE (1993) An explanation for gallstones in normal-weight women: slow intestinal transit. *Lancet* 341:8-10

48. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6:986-994
49. Helgadottir A, Thorleifsson G, Alexandersson KF, Tragante V, Thorsteinsdottir M, Eiriksson FF, et al. (2020) Genetic variability in the absorption of dietary sterols affects the risk of coronary artery disease. *European Heart Journal* 41:2618-2628
50. Heuman DM (1989) Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *Journal of Lipid Research* 30:719-730
51. Hofmann AF (1999) The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Archives of Internal Medicine* 159:2647-2658
52. Holzbach RT, Marsh M, Olszewski M, Holan K (1973) Cholesterol solubility in bile. Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *Journal of Clinical Investigation* 52:1467-1479
53. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation* 109:1125-1131
54. Hunter DJ (2005) Gene-environment interactions in human diseases. *Nature Reviews Genetics* 6:287-298
55. Hutchinson SA, Lianto P, Moore JB (2019) Phytosterols Inhibit Side-Chain Oxysterol Mediated Activation of LXR in Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 20
56. Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, et al. (2005) Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336:215-222
57. Ioannou GN, Landis CS, Jin GY, Haigh WG, Farrell GC, Kuver R, et al. (2019) Cholesterol Crystals in Hepatocyte Lipid Droplets Are Strongly Associated With Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology Communications* 3:776-791
58. Jacyna MR, Ross PE, Bakar MA, Hopwood D, Bouchier IA (1987) Characteristics of cholesterol absorption by human gall bladder: relevance to cholesterolosis. *Journal of Clinical Pathology* 40:524-529
59. Jakulj L, van Dijk TH, de Boer JF, Kootte RS, Schonewille M, Paalvast Y, et al. (2016) Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. *Cell Metabolism* 24:783-794

60. Jakulj L, Vissers MN, Tanck MW, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJ, et al. (2010) ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. *Journal of Lipid Research* 51:3016-3023
61. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383:728-731
62. Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, Yoon D, Park SW (2008) Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *Journal of Lipid Research* 49:399-409
63. Jesch ED, Seo JM, Carr TP, Lee JY (2009) Sitosterol reduces messenger RNA and protein expression levels of Niemann-Pick C1-like 1 in FHs 74 Int cells. *Nutrition Research (New York, NY)* 29:859-866
64. Jones PM, George AM (2004) The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 61:682-699
65. Jones PM, George AM (1999) Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiology Letters* 179:187-202
66. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7604-7609
67. Katsika D, Grijbovski A, Einarsson C, Lammert F, Lichtenstein P, Marschall HU (2005) Genetic and environmental influences on symptomatic gallstone disease: a Swedish study of 43,141 twin pairs. *Hepatology* 41:1138-1143
68. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, et al. (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metabolism* 1:121-131
69. Khanuja B, Cheah YC, Hunt M, Nishina PM, Wang DQ, Chen HW, et al. (1995) Lith1, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7729-7733
70. Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD, Patel SB (2004) Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterology* 4:21

71. Kliewer SA, Mangelsdorf DJ (2015) Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 33:327-331
72. Komiyama Y, Adachi T, Ito Y, Hirano K, Sugiura M, Sawaki S (1982) Microassay of serum bile acids by an enzymatic cycling method. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 30:3796-3799
73. Kosters A, Kunne C, Looije N, Patel SB, Oude Elferink RP, Groen AK (2006) The mechanism of ABCG5/ABCG8 in biliary cholesterol secretion in mice. *Journal of Lipid Research* 47:1959-1966
74. Kratzer W, Mason RA, Kachele V (1999) Prevalence of gallstones in sonographic surveys worldwide. *Journal of Clinical Ultrasound : JCU* 27:1-7
75. Kruit JK, Plosch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PH, Groen AK, et al. (2005) Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 128:147-156
76. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. (2006) Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *Journal of Clinical Investigation* 116:2995-3005
77. Lammert F, Carey MC, Paigen B (2001) Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 120:221-238
78. Lammert F, Jenssen C (2018) Die neue Gallenstein-Leitlinie: Grenzen überwinden. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 56:895-897
79. Lammert F, Wang DQ, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, et al. (2004) Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2<sup>-/-</sup> mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 39:117-128
80. Lanlan Yuan FZ, Shuo Jia, Jianhua Xie, Mingyue Shen, (2020) Differences between phytosterols with different structures in regulating cholesterol synthesis, transport and metabolism in Caco-2 cells. *Journal of Functional Foods* 65
81. Laufs U, Custodis F, Werner C (2016) PCSK9-Inhibitoren. *Herz* 41:296-306
82. Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD (2001) Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *Journal of Hepatology* 35:134-146

83. Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, et al. (2013) Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33:1484-1493
84. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, et al. (2001) Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nature Genetics* 27:79-83
85. Lin HJ, Wang C, Salen G, Lam KC, Chan TK (1983) Sitosterol and cholesterol metabolism in a patient with coexisting phytosterolemia and cholestanolemia. *Metabolism* 32:126-133
86. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
87. Lu K, Lee MH, Yu H, Zhou Y, Sandell SA, Salen G, et al. (2002) Molecular cloning, genomic organization, genetic variations, and characterization of murine sterolin genes *Abcg5* and *Abcg8*. *Journal of Lipid Research* 43:565-578
88. Luo J, Yang H (2020) Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21:225-245
89. Lütjohann D (2015) Methodological Aspects of Plant Sterol and Stanol Measurement. *Journal of AOAC International* 98:674-676
90. Lyons MA, Wittenburg H (2006) Cholesterol gallstone susceptibility loci: a mouse map, candidate gene evaluation, and guide to human LITH genes. *Gastroenterology* 131:1943-1970
91. Lyons MA, Wittenburg H, Li R, Walsh KA, Leonard MR, Churchill GA, et al. (2003) New quantitative trait loci that contribute to cholesterol gallstone formation detected in an intercross of CAST/Ei and 129S1/SvImJ inbred mice. *Physiological Genomics* 14:225-239
92. Mackay DS, Jones PJ, Myrie SB, Plat J, Lutjohann D (2014) Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 957:116-122
93. Malerod L, Juvet LK, Hanssen-Bauer A, Eskild W, Berg T (2002) Oxysterol-activated LXRA/alpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299:916-923

94. Marangoni F, Poli A (2010) Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research* 61:193-199
95. Marcus SN, Heaton KW (1986) Intestinal transit, deoxycholic acid and the cholesterol saturation of bile--three inter-related factors. *Gut* 27:550-558
96. Matthan NR, Raeini-Sarjaz M, Lichtenstein AH, Ausman LM, Jones PJ (2000) Deuterium uptake and plasma cholesterol precursor levels correspond as methods for measurement of endogenous cholesterol synthesis in hypercholesterolemic women. *Lipids* 35:1037-1044
97. Mazein A, Watterson S, Hsieh WY, Griffiths WJ, Ghazal P (2013) A comprehensive machine-readable view of the mammalian cholesterol biosynthesis pathway. *Biochemical Pharmacology* 86:56-66
98. Mazer NA, Carey MC (1984) Mathematical model of biliary lipid secretion: a quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species. *Journal of Lipid Research* 25:932-953
99. Metzger AL, Heymsfield S, Grundy SM (1972) The lithogenic index--a numerical expression for the relative lithogenicity of bile. *Gastroenterology* 62:499-501
100. Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1990) Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *American Journal of Epidemiology* 131:20-31
101. Moschetta A, Bookout AL, Mangelsdorf DJ (2004) Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nature Medicine* 10:1352-1358
102. Mullish BH, McDonald JAK (2019) Microbial bile salt hydrolases mediate the efficacy of faecal microbiota transplant in the treatment of recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Gut* 68:1791-1800
103. Nevens F, Andreone P, Mazzella G, Strasser SI, Bowlus C, Invernizzi P, et al. (2016) A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *New England Journal of Medicine* 375:631-643
104. Nguyen DV, Drover VA, Knopfel M, Dhanasekaran P, Hauser H, Phillips MC (2009) Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *Journal of Lipid Research* 50:2235-2244
105. Ostlund RE, Jr. (2002) Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 22:533-549

106. Oude Elferink RP, Groen AK (2000) Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis. *Seminars in Liver Disease* 20:293-305
107. Oude Elferink RP, Ottenhoff R, van Wijland M, Smit JJ, Schinkel AH, Groen AK (1995) Regulation of biliary lipid secretion by mdr2 P-glycoprotein in the mouse. *Journal of Clinical Investigation* 95:31-38
108. Paigen B, Schork NJ, Svenson KL, Cheah YC, Mu JL, Lammert F, et al. (2000) Quantitative trait loci mapping for cholesterol gallstones in AKR/J and C57L/J strains of mice. *Physiological Genomics* 4:59-65
109. Patel SB, Salen G, Hidaka H, Kwiterovich PO, Stalenhoef AF, Miettinen TA, et al. (1998) Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *Journal of Clinical Investigation* 102:1041-1044
110. Pauletzki J, Cicala M, Holl J, Sauerbruch T, Schafmayer A, Paumgartner G (1993) Correlation between gall bladder fasting volume and postprandial emptying in patients with gall stones and healthy controls. *Gut* 34:1443-1447
111. Paumgartner G, Sauerbruch T (1991) Gallstones: pathogenesis. *Lancet (London, England)* 338:1117-1121
112. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, et al. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704
113. Plat J, Mensink RP (2005) Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *American Journal of Cardiology* 96:15d-22d
114. Poppenborg F (2019) Biliäre Lipidsekretion bei leberspezifischem Knock-out des Cholesterintransporters ABCG5/G8. Medizinische Doktorarbeit, Universität des Saarlandes, Homburg. <http://dx.doi.org/10.22028/D291-31009>
115. Porter FD (2008) Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *European Journal of Human Genetics* 16:535-541
116. Portincasa P, Altomare DF, Moschetta A, Baldassarre G, Di Ciaula A, Venneman NG, et al. (2000) The effect of acute oral erythromycin on gallbladder motility and on upper gastrointestinal symptoms in gastrectomized patients with and without gallstones: a randomized, placebo-controlled ultrasonographic study. *American Journal of Gastroenterology* 95:3444-3451

117. Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G (2006) Cholesterol gallstone disease. *Lancet* 368:230-239
118. Qiao A, Liang J, Ke Y, Li C, Cui Y, Shen L, et al. (2011) Mouse patatin-like phospholipase domain-containing 3 influences systemic lipid and glucose homeostasis. *Hepatology* 54:509-521
119. Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS (2008) Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metabolism* 8:512-521
120. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT, et al. (2010) Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5:e11765
121. Rebholz C (2019) Biliäre Lipidsekretion bei Abcg8 p.D19H-transgenen und intestinalen Abcg5/g8-Knockout Mäusen. Medizinische Doktorarbeit, Universität des Saarlandes, Homburg. <http://dx.doi.org/10.22028/D291-32764>
122. Reynolds W, Jr. (2001) The first laparoscopic cholecystectomy. *JLS : Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons* 5:89-94
123. Rodriguez F, Maron DJ, Knowles JW, Virani SS, Lin S, Heidenreich PA (2017) Association Between Intensity of Statin Therapy and Mortality in Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiology* 2:47-54
124. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics* 40:1461-1465
125. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R (2001) MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 120:1459-1467
126. Ruhanen H, Perttilä J, Hölttä-Vuori M, Zhou Y, Yki-Järvinen H, Ikonen E, et al. (2014) PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodeling. *Journal of Lipid Research* 55:739-746
127. Russell DW, Setchell KD (1992) Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31:4737-4749
128. Salen G, Shefer S, Nguyen L, Ness GC, Tint GS, Shore V (1992) Sitosterolemia. *Journal of Lipid Research* 33:945-955

129. Salen G, Shore V, Tint GS, Forte T, Shefer S, Horak I, et al. (1989) Increased sitosterol absorption, decreased removal, and expanded body pools compensate for reduced cholesterol synthesis in sitosterolemia with xanthomatosis. *Journal of Lipid Research* 30:1319-1330
130. Scragg RK, Calvert GD, Oliver JR (1984) Plasma lipids and insulin in gall stone disease: a case-control study. *British Medical Journal (Clinical research ed)* 289:521-525
131. Shen WJ, Asthana S, Kraemer FB, Azhar S (2018) Scavenger receptor B type 1: expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *Journal of Lipid Research* 59:1114-1131
132. Siddapuram SP, Mahurkar S, Duvvuru NR, Mitnala S, Guduru VR, Rebala P, et al. (2010) Hepatic cholesterol transporter ABCG8 polymorphisms in gallstone disease in an Indian population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25:1093-1098
133. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102:731-744
134. Slijepcevic D, Roscam Abbing RLP, Katafuchi T, Blank A (2017) Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice. *Hepatology* 66:1631-1643
135. Smagris E, Gilyard S, BasuRay S, Cohen JC, Hobbs HH (2016) Inactivation of Tm6sf2, a Gene Defective in Fatty Liver Disease, Impairs Lipidation but Not Secretion of Very Low Density Lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 291:10659-10676
136. Small DM (2003) Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4-6
137. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. (1993) Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462
138. Srivastava A, Tulsyan S, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B (2009) Single nucleotide polymorphism in the ABCG8 transporter gene is associated with gallbladder cancer susceptibility. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 29:831-837

139. Stender S, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2011) Sterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G8, gallstones, and biliary cancer in 62,000 individuals from the general population. *Hepatology* 53:640-648
140. Stender S, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2013) Elevated body mass index as a causal risk factor for symptomatic gallstone disease: a Mendelian randomization study. *Hepatology* 58:2133-2141
141. Stokes CS, Krawczyk M, Lammert F (2011) Gallstones: environment, lifestyle and genes. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)* 29:191-201
142. Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I (1977) A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 79:93-98
143. Temel RE, Gebre AK, Parks JS, Rudel LL (2003) Compared with Acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) 1 and lecithin:cholesterol acyltransferase, ACAT2 displays the greatest capacity to differentiate cholesterol from sitosterol. *Journal of Biological Chemistry* 278:47594-47601
144. Traverso LW (1976) Carl Langenbuch and the first cholecystectomy. *American Journal of Surgery* 132:81-82
145. Tsai CJ, Leitzmann MF, Willett WC, Giovannucci EL (2005) Glycemic load, glycemic index, and carbohydrate intake in relation to risk of cholecystectomy in women. *Gastroenterology* 129:105-112
146. van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, et al. (2009) Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 284:19211-19219
147. van Erpecum KJ, van Berge Henegouwen GP, Stolk MF, Hopman WP, Jansen JB, Lamers CB (1992) Fasting gallbladder volume, postprandial emptying and cholecystokinin release in gallstone patients and normal subjects. *Journal of Hepatology* 14:194-202
148. van Erpecum KJ, Wang DQ, Moschetta A, Ferri D, Svelto M, Portincasa P, et al. (2006) Gallbladder histopathology during murine gallstone formation: relation to motility and concentrating function. *Journal of Lipid Research* 47:32-41

149. van Mil SW, van der Woerd WL, van der Brugge G, Sturm E, Jansen PL, Bull LN, et al. (2004) Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* 127:379-384
150. Vanderlinden W, Lindeloef G (1965) The familial occurrence of gallstone disease. *Acta Genetica et Statistica Medica* 15:159-164
151. Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, et al. (2007) Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry* 282:25123-25130
152. Volzke H, Baumeister SE, Alte D, Hoffmann W, Schwahn C, Simon P, et al. (2005) Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion* 71:97-105
153. von Kampen O, Buch S, Nothnagel M, Azocar L, Molina H, Brosch M, et al. (2013) Genetic and functional identification of the likely causative variant for cholesterol gallstone disease at the ABCG5/8 lithogenic locus. *Hepatology* 57:2407-2417
154. Wang DQ, Carey MC (1996) Characterization of crystallization pathways during cholesterol precipitation from human gallbladder biles: identical pathways to corresponding model biles with three predominating sequences. *Journal of Lipid Research* 37:2539-2549
155. Wang DQ, Paigen B, Carey MC (1997) Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: physical-chemistry of gallbladder bile. *Journal of Lipid Research* 38:1395-1411
156. Wang DQ, Schmitz F, Kopin AS, Carey MC (2004) Targeted disruption of the murine cholecystokinin-1 receptor promotes intestinal cholesterol absorption and susceptibility to cholesterol cholelithiasis. *Journal of Clinical Investigation* 114:521-528
157. Wang HH, Portincasa P, Afdhal NH, Wang DQ (2010) Lith genes and genetic analysis of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology Clinics of North America* 39:185-207
158. Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, et al. (2001) Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:2011-2016

159. Wang TY, Portincasa P, Liu M, Tso P, Wang DQ (2018) Mouse models of gallstone disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 34:59-70
160. Wittenburg H, Lammert F (2007) Genetic predisposition to gallbladder stones. *Seminars in Liver Disease* 27:109-121
161. Wittenburg H, Lyons MA, Li R, Churchill GA, Carey MC, Paigen B (2003) FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology* 125:868-881
162. Wittenburg H, Lyons MA, Li R, Kurtz U, Mossner J, Churchill GA, et al. (2005) Association of a lithogenic *Abcg5/Abcg8* allele on Chromosome 17 (Lith9) with cholesterol gallstone formation in PERA/EiJ mice. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 16:495-504
163. Yoon JH, Choi HS, Jun DW, Yoo KS, Lee J, Yang SY, et al. (2013) ATP-binding cassette sterol transporters are differentially expressed in normal and diseased human gallbladder. *Digestive Diseases and Sciences* 58:431-439
164. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka T, et al. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Molecular and Cell Biology* 21:2991-3000
165. Yu L (2008) The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein. *Current Opinion in Lipidology* 19:263-269
166. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, et al. (2002a) Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:16237-16242
167. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, et al. (2002b) Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *Journal of Clinical Investigation* 110:671-680
168. Yu L, von Bergmann K, Lutjohann D, Hobbs HH, Cohen JC (2004) Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *Journal of Lipid Research* 45:301-307

## 8 Publikation

Caroline Bopp, Friederike Poppenborg, Charlotte Rebholz, Dieter Lütjohann, Frank Lammert, Susanne Weber (2019) *Abcg8* D19H Variante im Mausmodell: Größere Gallenblasenvolumina und gesteigerte biliäre Sterolkonzentrationen. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 57(09). DOI: 10.1055/s-0039-1695591. (DGVS 2019, Wiesbaden).

Caroline Bopp, Friederike Poppenborg, Charlotte Rebholz, Annika Nicklas, Frank Lammert, Susanne Weber (2019) Hepatische *Abcg5/g8*-Defizienz führt zu erhöhten Cholesterinspiegeln in der Galle. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 57 (09). DOI:10.1055/s-0039-1695589. (DGVS 2019, Wiesbaden).

Friederike Poppenborg, Caroline Bopp, Annika Nicklas, Frank Lammert, Susanne N Weber (2019) Elevated biliary cholesterol in spite of hepatic *ABCG5/G8* deficiency: Biliary lipid secretion in conditional knock-out mice. *Journal of Hepatology* 70:812-813. (SAT-406, ILC 2019, Wien).

Susanne Weber, Caroline Bopp, Marcin Krawczyk, Frank Lammert (2019) Genetics of gallstone disease revisited: updated inventory of human lithogenic genes. *Current opinion in gastroenterology* 35:82-87. DOI: 10.1097/MOG.0000000000000511.

*Für diese englischsprachige Publikation wurden die Einleitung der Promotion und die darauf basierenden Konzepte und Hypothesen herangezogen.*

## 9 Danksagung

Zuvorderst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Lammert für die vertrauensvolle Überlassung des Dissertationsthemas sowie die herausragende Betreuung. Insbesondere möchte ich mich für die interessanten Diskussionen, die wertvollen Anregungen und schließlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt zudem meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Susanne Weber für die stets unkomplizierte und verlässliche Hilfe bei allen Fragen und Problemen. Für die gute Organisation meiner Einarbeitung im Labor und die Genauigkeit bei der Korrektur meiner Abstracts, Poster, Präsentationen und der Dissertation bin ich sehr dankbar.

Außerdem möchte ich ein großes Dankeschön an Annika Nicklas und Irina Nowak aussprechen. Ihre exzellente Einführung in die Labormethoden und ihre großzügige Hilfsbereitschaft haben ganz maßgeblich zum Gelingen der Experimente beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Lütjohann und den Labormitarbeitern der Universität Bonn danke ich für die gute Kooperation im Rahmen der Phytosterin- und Gallensäurendiagnostik.

Bei allen meinen lieben Kollegen und Kolleginnen aus dem Labor der Inneren II – Friederike Berghaus, Rabea Hall, Ersin Karatayli, Senem Ceren Özen-Karatayli, Manuela Puchalla, Lena Heintz, Johanna Inkermann, Maximilian Tessenyi und Charlotte Rebholz – möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, den interessanten Austausch und die stets sehr angenehme Atmosphäre bedanken. Ich werde die gemeinsame Zeit im Labor sehr vermissen!

Schließlich bin ich meinen Eltern, Großeltern, Geschwistern und Freunden, ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre, zutiefst dankbar für die ausgezeichnete Unterstützung während meines gesamten Studiums.

## 10 Lebenslauf