

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg
Direktor: Univ-Prof. Dr. med. Frank Lammert

Biliäre Lipidsekretion bei Abcg8 p.D19H-transgenen und intestinalen Abcg5/g8-Knockout-Mäusen

Dissertation zum Erlangen des Grades eines
Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes 2019

**Vorgelegt von Charlotte Rebholz, geboren am 13.01.1990 in Friedrichshafen
15.07.2019**

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschule der Hochschulbibliothek
des Saarlandes online verfügbar

Aus der Klinik für Innere Medizin II
Universitätsklinikum des Saarlandes
Homburg
Direktor: Univ-Prof. Dr. med. Frank Lammert

Biliäre Lipidsekretion bei Abcg8 p.D19H-transgenen und intestinalen Abcg5/g8-Knockout-Mäusen

Dissertation zum Erlangen des Grades eines
Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes 2019

Vorgelegt von Charlotte Rebholz, geboren am 13.01.1990 in Friedrichshafen
15.07.2019

Tag der Promotion: 09.11.2020
Dekant: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert
Prof. Dr. Ulrich Böhm

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
TABELLENVERZEICHNIS	
ABKÜRZUNGEN	
ZUSAMMENFASSUNG	
1 ALLGEMEINER TEIL	1
1.1 EINLEITUNG	1
1.2 GALLE	2
1.2.1 ANATOMIE	2
1.2.2 ZUSAMMENSETZUNG	3
1.2.3 FUNKTION	3
1.2.4 MOLEKULARE MECHANISMEN DER GALLEBILDUNG	4
1.3 PATHOPHYSIOLOGISCHE MECHANISMEN DER GALLENSTEINBILDUNG	5
1.4 GENETISCHE FAKTOREN	8
1.5 DIE ATP-BINDENDEN MEMBRANTRANSPORTER	9
1.5.1 DER ABCG5/G8-TRANSPORTER	10
1.5.2 GENETISCHE POLYMORPHISMEN DES <i>ABCG5/ABCG8</i> -GENS	11
1.5.3 DIE ABCB4/ ABCB11-TRANSPORTER.....	12
2 ZIEL DER ARBEIT	14
3 MATERIAL UND METHODEN	15
3.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	15
3.2 INSTRUMENTE	16
3.3 PRIMER	17
3.4 MÄUSE	17
3.4.1 GENOTYPEN	17
3.4.2 HALTUNG UND FÜTTERUNG.....	18
3.5 GENOTYPISIERUNG	18
3.5.1 DNA-ISOLIERUNG	18
3.5.2 POLYMERASEKETTENREAKTION.....	19
3.5.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	20
3.5.4 ALLELISCHE DISKRIMINIERUNG	22

3.6 ANLAGE EINER AKUTEN GALLENFISTEL UND PROBENGEWINNUNG	23
3.7 MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG	24
3.8 CHEMISCHE UND BIOCHEMISCHE ANALYSE DER NATIVEN GALLE.....	24
3.8.1 CHOLESTERIN	24
3.8.2 LECITHIN	25
3.8.3 GALLENSÄUREN	26
3.9 BERECHNUNGEN	27
3.9.1 GALLEFLUSS	27
3.9.2 GESAMTLIPIDKONZENTRATION	27
3.9.3 CHOLESTERINSÄTTIGUNGSINDEX.....	27
3.9.4 OUTPUT- UND SEKRETIONS RATEN.....	28
3.10 STATISTISCHE METHODEN	28
4 ERGEBNISSE.....	29
4.1 GRUPPEN.....	29
4.2 KÖRPERGEWICHT UND LEBERGEWICHT.....	29
4.3 MAKRO- UND MIKROSKOPISCHE PHÄNOTYPISIERUNG DER ORGANE UND GALLE.....	31
4.3.1 MAKROSKOPIE	31
4.3.2 MIKROSKOPISCHE BETRACHTUNG DER LEBERGALLE	32
4.4 ERGEBNISSE <i>ABCg8</i> P.<i>D19H</i>-VARINATE	34
4.4.1 GALLEFLUSS	34
4.4.2 BILIÄRE LIPIDZUSAMMENSETZUNG	35
4.4.3 REGRESSIONSANALYSE DES GALLEFLUSSES	38
4.4.4 BILIÄRE OUTPUTRATEN FÜR GALLENSÄUREN, CHOLESTERIN UND LECITHIN	40
4.4.5 REGRESSIONSANALYSE DER CHOLESTERINSEKRETION	41
4.4.6 REGRESSIONSANALYSE DER LECITHIN-SEKRETION	42
4.5 ERGEBNISSE DES <i>ABCg5/g8</i>- GEWEBESPEZIFISCHEN KNOCK-OUT IM DARM	45
4.5.1 GALLEFLUSS	45
4.5.2 BILIÄRE LIPIDZUSAMMENSETZUNG	45
4.5.3 REGRESSIONSANALYSE DES GALLEFLUSSES	47
4.5.4 BILIÄRE OUTPUTRATEN FÜR GALLENSÄUREN, CHOLESTERIN UND LECITHIN	48
4.5.5 REGRESSIONSANALYSE DER CHOLESTERIN-SEKRETION	49
4.5.6 REGRESSIONSANALYSE DER LECITHIN-SEKRETION	50

5 DISKUSSION	52
LITERATURVERZEICHNIS	63
PUBLIKATIONEN	70
LEBENS LAUF	71
DANKE	72

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER CHOLESTERIN-CARRIER.	6
ABBILDUNG 2: BILIÄRES GLEICHGEWICHTS-PHASENDIAGRAMM FÜR MODELLGALLE)	7
ABBILDUNG 3: AUFBAU DES HETERODIMERER ABCG5/G8- TRANSPORTERS.....	10
ABBILDUNG 4: GELELEKTROPHORESE VON ABCG5/G8 KNOCK-IN.....	21
ABBILDUNG 5: GELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS DER ABCG5/G8 KNOCK-OUT DARMSPEZIFISCHEN REKOMBINATION:.....	21
ABBILDUNG 6: KÖRPERGEWICHT, LEBERGEWICHT UND RELATIVES LEBERGEWICHT VON WT-, MUT-, HET- UND VILCRE- MÄUSEN UNTER NORMALER DIÄT (-DIÄT).....	30
ABBILDUNG 7: KÖRPERGEWICHT, LEBERGEWICHT UND RELATIVES LEBERGEWICHT VON WT-, MUT-, HET- UND VILCRE- MÄUSEN UNTER LITHOGENER DIÄT (+ DIÄT).....	30
ABBILDUNG 8: PROZENTUALE HÄUFIGKEIT VON FETTLERBER BEI WT-, MUT-, HET- UND VILCRE- MÄUSEN NACH FÜTTERUNG EINER LITHOGENEN DIÄT.	31
ABBILDUNG 9: MIKROSKOPISCHE EINTEILUNG DER GALLE BEI TIEREN, GEFÜTTERT MIT LITHOGENER DIÄT.	32
ABBILDUNG 10: VERTEILUNG DER PRÄZIPITATION VON GALLESTEINEN UNTER LITHOGENER DIÄT BEI DEN GENOTYPEN WT, MUT, HET UND VILCRE.	33
ABBILDUNG 11: ABSOLUTER GALLEFLUSS ($\mu\text{L}/\text{HR}/100\text{G}$) BEI NORMALER DIÄT DER ERSTEN DREI STUNDEN	34
ABBILDUNG 12: ABSOLUTER GALLEFLUSS ($\mu\text{L}/\text{HR}/100\text{G}$) BEI LITHOGENER DIÄT ÜBER DIE ERSTEN DREI STUNDEN	35
ABBILDUNG 13: BILIÄRE LIPIDZUSAMMENSETZUNG BEI NORMALER DIÄT.	36
ABBILDUNG 14: BILIÄRE LIPIDZUSAMMENSETZUNG BEI LITHOGENER DIÄT.	37
ABBILDUNG 15: LINEARE REGRESSION DES GALLEFLUSSES ($\mu\text{L}/\text{HR}/100\text{G}$) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLENSÄUREN (GS)-SEKRETION ($\mu\text{MOL}/\text{HR}/100\text{G}$) DER ERSTEN DREI STUNDEN BEI FÜTTERUNG MIT NORMALER DIÄT.	39
ABBILDUNG 16: LINEARE REGRESSION DES GALLEFLUSSES ($\mu\text{L}/\text{HR}/100\text{G}$) IN ABHÄNGIGKEIT DER GALLENSÄUREN (GS)-SEKRETION ($\mu\text{MOL}/\text{HR}/100\text{G}$) DER ERSTEN DREI STUNDEN BEI FÜTTERUNG MIT LITHOGENER DIÄT.	39
ABBILDUNG 17: BILIÄRE OUTPUTRATEN IN $\mu\text{MOL}/\text{HR}/\text{KG}$ FÜR GALLENSÄUREN, CHOLESTERIN UND LECITHIN ZUM ZEITPUNKT DER DER 1. STUNDE BEI NORMALER DIÄT.	40
ABBILDUNG 18: BILIÄRE OUTPUTRATEN IN $\mu\text{MOL}/\text{HR}/\text{KG}$ FÜR GALLENSÄUREN, CHOLESTERIN UND LECITHIN ZUM ZEITPUNKT DER 1.STUNDE BEI LITHOGENER DIÄT.	40
ABBILDUNG 19: LINEARE REGRESSION DER CHOLESTERIN (CH)-SEKRETION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLESÄUREN (GS)-SEKRETION DER ERSTEN DREI STUNDEN BEI FÜTTERUNG MIT NORMALER DIÄT.....	42

ABBILDUNG 20: LINEARE REGRESSION DER CHOLESTERIN-SEKRETION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLESÄURE- SEKRETION DER ERSTEN DREI STUNDEN BEI FÜTTERUNG MIT LITHOGENER DIÄT.....	42
ABBILDUNG 21: SÄTTIGUNGSBINDUNGSKURVE DER LECITHIN (LEC)-SEKRETION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLENSÄUREN (GS)-SEKRETION DER ERSTEN DREI STUNDEN BEI NORMALER DIÄT.	43
ABBILDUNG 22: SÄTTIGUNGSBINDUNGSKURVE DER LECITHIN (LEC)-SEKRETION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLENSÄUREN (GS)-SEKRETION DER ERSTEN DREI STUNDEN BEI LITHOGENER DIÄT.....	44
ABBILDUNG 23: GALLEFLUSS BEI NORMALER UND LITHOGENER DIÄT DES WT UND DES VILCRE.....	45
ABBILDUNG 24: BILIÄRE LIPIDZUSAMMENSETZUNG VON WT UND VILCRE BEI NORMALER DIÄT.	46
ABBILDUNG 25: BILIÄRE LIPIDZUSAMMENSETZUNGEN DES WT UND VILCRE BEI LITHOGENER DIÄT.	47
ABBILDUNG 26: LINEARE REGRESSION DES GALLEFLUSS ($\mu\text{L}/\text{HR}/100\text{G}$) IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLENSÄUREN-SEKRETION DER ERSTEN DREI STUNDEN FÜR WT UND VILCRE BEI NORMALER UND LITHOGENER DIÄT.	48
ABBILDUNG 27: BILIÄRE OUTPUTRATEN IN $\mu\text{MOL}/\text{HR}/\text{KG}$ FÜR GALLESÄUREN, CHOLESTERIN UND LECITHIN ZUM ZEITPUNKT DER 1. STUNDE FÜR WT UND VILCRE BEI NORMALER UND LITHOGENER DIÄT.....	49
ABBILDUNG 28: LINEARE REGRESSION DER CHOLESTERIN (CH)-SEKRETION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLENSÄUREN (GS)-SEKRETION DER ERSTEN DREI STUNDEN VON WT UND VILCRE BEI NORMALER UND LITHOGENER DIÄT.	50
ABBILDUNG 29: SÄTTIGUNGSBINDUNGSKURVE DER LECITHIN (LEC)-SEKRETION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER GALLENSÄUREN (GS)-SEKRETION IN DEN ERSTEN DREI STUNDEN VON WT UND VILCRE BEI NORMALER UND LITHOGENER DIÄT.	51
ABBILDUNG 30: KONZEPT ZUR AUSWIRKUNGEN VON <i>ABCG5/G8</i> P.D19H MIT STEIGERUNG DER CHOLESTERINSEKRETION IN DIE GALLE UND EXKRETIIONSSTEIGERUNG IN DEN DARM.	58

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PRODUKTE UND HERSTELLER.....	15
TABELLE 2: INSTRUMENTE UND HERSTELLER	16
TABELLE 3: PCR-PROTOKOLL FÜR ABCG5/G8-KNOCK-IN (MUT, HET, WT)	19
TABELLE 4: PCR-PROTOKOLL FÜR GEWEBSSPEZIFISCHEN KNOCK-OUT (VILCRE)	19
TABELLE 5: PROTOKOLL ZUM HERSTELLEN EINES 2% ARAGOSE-GEL	20
TABELLE 6: TAGMAN-PROTOKOLL FÜR ABCG8 P.D19H	22
TABELLE 7: TAGMAN-PROTOKOLL FÜR ABCG5 P.R50C	22
TABELLE 8: NARKOSEPROTOKOLL.....	23
TABELLE 9: PIPETTIERSHEMA ZUR PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG DER CHOLESTERINKONZENTRATION	25
TABELLE 10: PIPETTIERSHEMA ZUR PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG DER LECITHINKONZENTRATION.....	26
TABELLE 11: PIPETTIERSHEMA ZUR PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG DER GALLENsäUREKONZENTRATION (SCHRITT 1)	26
TABELLE 12: PIPETTIERSHEMA ZUR PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG DER GALLENsäUREKONZENTRATION (SCHRITT 2)	27
TABELLE 13: GRUPPENEINTEILUNG UND ANZAHL (N) DER IN DEN VERSUCH EINGESCHLOSSENEN TIERE.	29
TABELLE 14: STUDIEN ZUR ROLLE VON ABCG8 P.D19H	52

Abkürzungen

µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
3-α-HSD	3-α-Hydroxysteroiddehydrogenase
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding Casette
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Base Pair
BRIC	Benigne Rekurrenrende Intrahepatische Cholestase
Ch	Cholesterin
Cl⁻	Chlorid
CSI	Cholesterinsättigungsindex
CVD	Chronic Vascular Disease (chronische Gefäßerkrankung)
CYP7A1	Cholesterin-7α-Hydroxylase
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotids
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGF 19	Fibroblast Growth Factor 19
FXR	Farnesoid X Receptor
g	Gramm
GER	Germany (Deutschland)
GPRD	General Practice Research Database
GS	Gallensäure
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
H₂O	Wasser
HCO₃	Hydrogencarbonat
HDL	High Density Lipoprotein
Het	Heterozygote Variante des <i>Abcg8</i> p.D19H
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydro-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hr	Hour (Stunde)
IT	Italia (Italien)
K⁺	Kalium
kg	Kilogramm

I	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
Lec	Lecithin
M.Crohn	Morbus Crohn
MDR	Multidrug Resistance
mg	Milligramm
MgCl₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MLC	Maximal lösliches Cholesterin
mm	Millimeter
mmol	Millimol
Mut	Homozygote Variante des <i>Abcg8</i> p.D19H
Na⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPC1L1	Niemann-Pick-C1-like-1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PL	Phosphatidylcholin
QTL	Quantitative Trait Locus
RCT	Reverser Cholesterintransport
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TICE	Transintestinale Cholesterinexkretion
TL	Total Lipids (Gesamtlipidkonzentration)
UK	United Kingdom
UV	Ultraviolett
VIP	Vasointestinales Peptid
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Cholesterincholelithiasis ist eine der häufigsten Diagnosen in der Gastroenterologie und verursacht hohe Kosten in unseren Gesundheitssystemen. Die Erkrankung betrifft vorwiegend Erwachsene und wird durch exogene Risikofaktoren begünstigt. Jedoch trägt auch eine erbliche Prädisposition durch lithogene Gene und deren komplexe Interaktionen zur Gallesteinbildung bei. Kreuzungsversuche im Mausmodell und Genomanalysen führten zur Identifizierung muriner Gallensteingene, die Grundlage für genomweite Assoziationsstudien beim Menschen waren. Es wurden mehrere zu Gallsteinen prädisponierende Genvarianten identifiziert, wobei für die Mutation p.D19H des hepatischen und intestinalen Cholesterintransporters ABCG5/G8 die stärksten Effekte nachgewiesen wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem transgenen Mausmodell die Auswirkung der homozygoten und heterozygoten *Abcg8* p.D19H-Variante auf die hepatische Cholesterinsekretionsrate und die anderen biliären Lipide untersucht. Zusätzlich wurden die Folgen des gewebsspezifischen Knock-out von *Abcg5/g8* im Darm auf die hepatische Lipidsekretion ermittelt. Zur Gewinnung der Galleproben wurden nach einer modifizierten Methode von Wang akute Gallefisteln operativ angelegt. Mit photometrischen Tests wurden die Lipidkonzentrationen von Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin in der hepatischen Galle bestimmt. Daraus konnten die Sekretionsraten dieser Lipide ermittelt werden. Anhand linearer Regressionsanalysen und hyperboler Sättigungsbindungskurven ließen sich Aussagen zu den Unterschieden der Sekretionsraten und zu Funktionsveränderungen des ABCG5/G8-Transporters treffen.

Die Analyse ergab, dass Tiere mit der *Abcg8* p.D19H-Variante eine gesteigerte Cholesterinsekretionsrate und eine höhere Cholesterinsättigung der Galle bei unveränderter Gesamtlipidkonzentration aufweisen. Diese Unterschiede wurden durch eine lithogene Diät aufgehoben. Der gewebsspezifische Knock-out von *Abcg5/g8* im Darm führte durch Verlust der intestinalen Cholesterinsekretion gleichfalls zu einer gesteigerten Sekretion und einer Übersättigung der Galle mit Cholesterin.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht die Rolle des genetischen Risikofaktors *ABCG8* p.D19H in der Pathogenese der Cholelithiasis und erbrachte erstmals den direkten Nachweis der

Funktionsveränderung des ABCG5/G8-Transporters durch die p.D19H-Variante *in vivo*. Damit trägt sie zum besseren molekularen Verständnis dieser Genvariante und ihrer Relevanz für die Gallensteinbildung bei. Als erste Studie zur Auswirkung des gewebsspezifischen Knock out von *Abcg5/g8* im Darm weist sie die wichtige Funktion der intestinalen Exkretion für die systemische Cholesterinhomöostase nach. Die Aufklärung der genetischen Risikofaktoren sowie das bessere Verständnis des intestinalen Cholesterintransports eröffnen Möglichkeiten für neue Ansätze zur Risikoabschätzung, Prävention und Therapie des Gallensteinleidens.

Summary:

Biliary lipid secretion in *Abcg8* p.D19H-transgenic and intestinal *Abcg5/g8*-knockout mice

Gallstone disease is one of the most common gastrointestinal disorders and causes high socioeconomic costs in our health care systems. The disease mainly affects adults and is promoted by exogenous risk factors. Importantly, hereditary predisposition due to lithogenic genes and their complex interactions contribute to the formation of gallstones. Experimental crosses of inbred mouse strains and genome-wide analyses led to the identification of murine gallstone genes, which were the basis for genome-wide association studies in human cohorts. Several variants predisposing to gallstones were identified, and the strongest effects were demonstrated for the mutation p.D19H of the hepatic and intestinal cholesterol transporter ABCG5/G8.

In the present study, the functional consequences of the homozygous and heterozygous *ABCG8* p.D19H variant on biliary lipid secretion rate and bile composition were investigated in a transgenic mouse that carries the human mutation. In addition, the hepatic effects of tissue-specific knock-out of *Abcg5/g8* in the intestine were determined. To obtain hepatic bile, acute bile fistulas were created surgically using a modified method by Wang & Carey. Biliary concentrations of bile acids, cholesterol and phosphatidylcholine (lecithin) were measured by photometric assays, and secretion rates for bile acids, cholesterol and lecithin were calculated. Using linear regression analyses and hyperbolic saturation binding curves, we assessed the differences in secretion rates and the functional alterations of the ABCG5/G8 transporter. The analyses revealed that mice with the *Abcg8* p.D19H variant

present with increased biliary cholesterol secretion rate and higher cholesterol saturation of bile in the setting of unchanged total lipid concentration. However, these differences were found to be offset by a lithogenic diet containing butter fat, cholic acid, and cholesterol. Of note, the tissue-specific knock-out of *Abcg5/g8* in the intestine also resulted in increased cholesterol secretion and saturation of bile due to loss of fecal cholesterol excretion.

The present study clarifies the role of the genetic risk factor *ABCG8* p.D19H in the pathogenesis of cholelithiasis and for the first time, provides direct evidence of the functional effects of the lithogenic p.D19H variant *in vivo*. Thereby it improves our knowledge about this lithogenic gene and its relevance for gallstone formation. As first study of the effects of the intestine-specific knock-out of *Abcg5/g8* on biliary lipid secretion, it demonstrates the important function of intestinal excretion for both systemic and biliary cholesterol homeostasis. The elucidation of genetic risk factors and better understanding of hepatic and intestinal cholesterol transport open new avenues for risk assessment, prevention and therapy of gallstones.

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einleitung

Schon in der Medizin der Antike wurde dem ausgewogenen Gleichgewicht zwischen Blut, Schleim, gelber und schwarzer Galle eine große Bedeutung für die Gesundheit des Menschen zugeschrieben. Bereits das hippokratische Krankheitskonzept stützte sich auf die Harmonie- und Gleichgewichtstheorie. Die Erkrankungen des Menschen wurden als ein Missverhältnis der Körpersäfte (Dyskrasie) verstanden, und erst der Ausgleich (Eukrasie) führte zu einer Genesung des Betroffenen. Somit waren schon damals die wesentlichen Charakteristika der Humoral- und Verdauungspathologie vorhanden. Später wurden diese von Galenos aus Pergamon zu ihrer kanonischen Form der Viersäftelehre ausdifferenziert¹. Im 16. Jahrhundert führte Paracelsus das Konzept der tartarischen Krankheitslehre ein, um die Steinentstehung im menschlichen Körper zu erklären. Dabei beschrieb er die Ausfällung von Substanzen in Körperflüssigkeiten analog der Ablagerung von Weinstein in Weinfässern². Die Erkenntnisse der modernen Gallensteinforschung können auf dieses Bild zurückgreifen, das den Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsverhältnis der einzelnen Komponenten der Galle und der Steinentstehung zeigt.

Das Gallensteinleiden (Cholelithiasis) ist eine weltweit auftretende Krankheit und eine der häufigsten Diagnosen, die hohe Kosten im Gesundheitswesen verursacht. Im Jahr 2015 verzeichnete das statistische Bundesamt für Gesundheit eine Zahl von 228 981 vollstationär behandelten Fällen aufgrund von Cholelithiasis, die damit den 11. Platz der häufigsten Hauptdiagnosen in deutschen Krankenhäusern einnimmt³. Die Häufigkeit der Cholelithiasis steigt zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr von 2,3–4,9% auf 6,7–18% an, wobei in mehr als 50% der Fälle Frauen betroffen sind. Im Alter zwischen 50 und 75 Jahren finden sich bei 14–37% der Menschen in Deutschland Gallensteine⁴. Somit wird die Prävalenz von Gallensteinen mit steigender Lebenserwartung weiter zunehmen. Viele Gallensteinträger sind symptomlos, jedoch entwickeln 25% der Gallensteinträger Symptome in Form von kolikartigen Schmerzen im rechten Oberbauch, Fieber oder Gelbsucht, die eine chirurgische Intervention durch laparoskopische Cholezystektomie nötig machen⁵. Jedes Jahr werden über 200.000 Cholezystektomien in Deutschland durchgeführt. Die laparoskopische Cholezystektomie ist mit einer Mortalitätsrate <1% bis jetzt die vorherrschende und effektivste Methode zur Therapie der Cholelithiasis⁶. Nichtchirurgische Ansätze, wie die Litholyse mittels Ursodeoxycholssäure oder extrakorporaler Stoßwellenlithotripsie haben an

Bedeutung verloren und werden ausschließlich bei einer kleinen Anzahl ausgewählter Patienten mit unkomplizierter symptomatischer Cholezystolithiasis vorgenommen⁷.

1.2 Galle

1.2.1 Anatomie

Das hepatobiliäre System umfasst die Leber, die ableitenden Gallenwege und die Gallenblase, die die Speicherung der Gallenflüssigkeit übernimmt. Die intrahepatischen Gallengänge beginnen als epithellose Canaliculi biliferi an den apikalen (kanalikulären) Zellpolen gegenüberliegender Hepatozyten⁸. In diese, durch Tight Junctions und Zonulae occludentes abgedichtete Gallenkanälchen, wird die von den Hepatozyten produzierte Lebergalle sezerniert. Die Canaliculi biliferi bilden ein Netzwerk und transportieren die Galle entgegen der Blutflussrichtung in die Ductus biliferi interlobulares in der periportalen Trias. Über den Ductus hepaticus dexter und sinister gelangt die Galle über den Ductus hepaticus communis in die extrahepatischen Gallenwege.

Die Gallenblase ist ein 8-12 cm langes und 3-4 cm breites Hohlorgan, das ein Fassungsvermögen von 40-50 ml beim Menschen besitzt. Es liegt am Unterrand des rechten Leberlappens in der Fossa vesicae biliaris und ist über den Ductus cysticus mit den extrahepatischen Gallengängen verbunden. Der Ductus cysticus weist im Gegensatz zum Ductus hepaticus und Ductus choledochus eine schraubenförmig angeordnete Schleimhaut auf, sodass eine spiralförmige Verschlussfalte entsteht (Heister-Klappe). Diese verhindert bei Anstieg des intraabdominellen Druckes die vorzeitige Entleerung der Gallenblasengalle, erlaubt jedoch den Gallenzufluss aus dem Ductus hepaticus. Der gemeinsame Ausführungsgang von Ductus choledochus und Ductus pancreaticus ist zu einer Ampulle erweitert. Die Entleerung der Galle in das Duodenum wird dort durch den Musculus sphincter ampullae hepatopancreaticae (Oddi) reguliert⁸.

Eine komplizierte Wechselwirkung zwischen Gallenblasenmotilität und dem Tonus der Papilla Vateri ist verantwortlich für die zeitgerechte Bereitstellung der Galle während der Verdauung. Der Reiz für die Kontraktion und die Entleerung der Gallenblase ist die Ausschüttung von Cholezystokinin und Sekretin, die Relaxation wird über das aus dem Ileum bei Kontakt mit Gallensäuren freigesetzte Hormon Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19) vermittelt⁹.

1.2.2 Zusammensetzung

In ihrer Funktion als größte exokrine Drüse produziert die Leber pro Tag 500-1000 ml Gallenflüssigkeit (Lebergalle). Die funktionell wichtigen Hauptbestandteile bilden die Gallensäuren (Gallensalze), das Phospholipid Lecithin (Phosphatidylcholin), Cholesterin und die Gallenfarbstoffe (Hämoglobinabbauprodukte, v.a. Bilirubin). Zusätzlich enthält die Galle verschiedene lipophile Produkte des Fremdstoffmetabolismus wie Steroidhormone, Aminosäuren, Enzyme, Porphyrine, Vitamine, Schwermetalle und Abbauprodukte von Medikamenten, die nicht über die Niere ausgeschieden werden können¹⁰.

Zu 82% besteht Galle aus Wasser. Die restlichen 18% der festen Gallebestandteile setzen sich aus 65–70% Gallensäuren, 20–23% Phospholipide und 4% Cholesterin zusammen. Bilirubin bildet weniger als 0,3% und Protein bis zu 5% der festen Bestandteile¹¹.

In der interdigestiven Phase wird die Primärgalle in der Gallenblase gespeichert und durch Absorption von NaCl und H₂O konzentriert. Dieser Vorgang reduziert das Gallenvolumen auf 10% des primären Sekretionsvolumen. Im Umkehrschluss sind somit in der entstehenden Blasengalle Cholesterin, Gallensäuren und Lecithin in bis zu 10-fach höherer Konzentration vorhanden¹².

1.2.3 Funktion

Die Fettverdauung und die zeitgleiche Entgiftung des Körpers von toxischen lipophilen Substanzen stellen die Hauptfunktionen der Galle dar. Die Fettersorption wird hauptsächlich über Emulsion durch Gallensäuren und das Lecithin übernommen. Zusätzlich entledigt sich der Körper über die Galle verschiedener lipophiler Substanzen, die in der Leber metabolisiert und anschließend mit hydrophilen Substanzen (z.B. Glutathion, Glukuronsäure) konjugiert werden. Dazu gehören vor allem potenziell schädliche Substanzen wie Bilirubin, Steroidhormone und Medikamente, deren Molekulargewicht >300-500 Dalton liegt und nicht von der Niere filtriert oder ausgeschieden werden können¹². Die Bedeutung der Galle für die Gesundheit des Organismus wird bei Sekretionstörungen durch entwicklungs- oder genetischbedingte, sowie erworbene cholestatische Erkrankungen augenscheinlich. Dies zeigt sich auf besonders dramatische Weise bei Neugeborenen mit Gallengangsatresie, die einen fortschreitenden cholestatischen Leberschaden und/oder eine biliäre Zirrhose bis hin zum akuten Leberversagen entwickeln¹⁰.

1.2.4 Molekulare Mechanismen der Gallebildung

Die Sekretion der Primärgalle aus den Hepatozyten ist zu 40% von gallensäurenabhängigen und zu 40% von gallensäurenunabhängigen Mechanismen abhängig. Die übrigen 20% werden von den intrahepatischen Cholangiozyten sezerniert, die ein HCO_3^- - und Cl^- reiches Sekret produzieren und die endgültige Lebergalle modifizieren. Dies steigert nicht nur die Menge an Gallenflüssigkeit, sondern führt zudem zu einer Alkalisierung der Galle.

Bei der gallensäurenabhängigen hepatozytären Sekretion werden die aus Cholesterin synthetisierten primären Gallensäuren (Cholsäure, Chenodeoxycholsäure) und die über den enterohepatischen Kreislauf wieder aufgenommenen sekundären Gallensäuren (Deoxycholsäure, Lithocholsäure) mit den Aminosäuren Glyzin und Taurin konjugiert. Dabei entstehen die wasserlöslichen Gallensäurenkonjugate. Über ATP-abhängigen Transport werden diese in die Ductus biliferi sezerniert. Bis zur Plasmaisotonität der Primärgalle folgen Wasser und Na^+ - Ionen über Aquaporinkanäle osmotisch nach. Somit ist das ausgeschiedene Gesamtgallenvolumen direkt abhängig von der sezernierten Menge an Gallensäuren. Die sekundären Gallensäuren aus dem Pfortaderblut werden über einen sekundär aktiven Na^+ -abhängigen Symporter wieder in die Hepatozyten aufgenommen. Der dazu erforderliche Ionengradient wird über die Na^+/K^+ -ATPase aufrecht erhalten¹². Zwei Enzyme sind verantwortlich für die Gallensäuren-Biosynthese, deren Aktivität durch negative Rückkopplung beeinflusst wird: HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinbiosynthese ist und Cholesterin-7- α -Hydroxylase, das geschwindigkeitslimitierende Enzym der Gallensäurenbiosynthese¹³. Beide Enzyme werden über das Sterol-Regulatory-Element-Binding-Protein (SREBP) und nukleäre Rezeptorsignalwege, die u.a. zur Freisetzung von FGF-19 führen, reguliert^{14,15}.

Auf Seiten der kanalikulären Membrandomäne konnten für die Sekretion von Gallensäuren, Lecithin und Cholesterin unterschiedliche ATP-abhängige Transporterproteine - auch bekannt als ATP-binding Cassette (ABC) - identifiziert werden. Der ABCB11-Transporter ist die Exportpumpe für Gallensäuren¹⁶, ABCB4 transportiert Lecithin^{16,17}, und ABCG5 und ABCG8 bilden einen heterodimeren Transporter, der für die Sekretion von Cholesterin aus dem Hepatozyten in die Galle verantwortlich ist¹⁴. Cholesterin und Lecithin werden zeitgleich in die Galle sekretiert und lagern sich zusammen als unilaminäre Vesikel. Dabei zeigen die hydrophilen Cholingruppen des Lecithin nach außen in die wässrige Phase, wohingegen die lipophilen Fettsäureketten in das Innere der Membrandoppelschicht zeigen. Die lipophilen Fettsäuren stellen ein hydrophobes Milieu her, in das sich Cholesterin einlagert. Da

Gallensäuren ein lipohiles Cholesteringerüst und ein hydrophilen Aminosäurerest besitzen, sind sie amphiphil und wirken als Detergenzien. Sie sind wasserlöslich, aber ab einer Konzentration von 1-2 mmol/l lagern sie sich zu einfachen Mizellen zusammen^{12,18}. Zusammen mit den unilamellären Lecithin-Cholesterin-Vesikeln bilden sie gemischte Mizellen aus. Diese bestehen nun aus einer Lecithin-Cholesterin-Doppelschicht, umgeben von einer Schicht aus Gallensäuren, wobei sich deren hydrophile Anteile nach außen zur wässrigen Phase der Galle und die lipophilen Anteile nach innen zur Lecithin-Cholesterin-Doppelschicht wenden. Durch die anschließende Einlagerung des lipophilen Anteils der Gallensäuren in die Lecithin-Cholesterin-Doppelmembran verringert sich deren Durchmesser auf 4-6 nm¹⁸. Dies bewirkt eine Verbesserung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, wodurch Pankreaslipasen und die Cholesterinesterase mit ihren Substraten in Kontakt kommen und der enzymatische Aufschluss der Nahrung gefördert wird¹².

Zu dem Zeitpunkt der Gallensekretion in die Ductus biliferi unterliegt die Zusammensetzung der Galle keinem thermodynamischen Gleichgewicht. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass es Tage bis Wochen dauern kann, bis sich zwischen Gallensäuremizellen, gemischten Mizellen, Lecithin-Cholesterin-Vesikeln und Cholesterinmonohydratkristallen ein Gleichgewicht eingespielt hat. Unter normalen Umständen wird eine suffiziente Anzahl an Gallensäuren sezerniert, sodass das gesamte Cholesterin der Vesikel in gemischte Mizellen transferiert werden kann. Mizelläre Lösungen von Cholesterin sind thermodynamisch stabil und präzipitieren keine Cholesterinkristalle. Dies erlaubt eine stabile Lösung des Cholesterins während der Passage durch das biliäre System¹⁸.

Die gallensäureunabhängige hepatozytäre Sekretion ist von der Sekretion von Bicarbonat und Bilirubin abhängig. Bikarbonat wird dabei aktiv - durch Gallensäuren, Glukagon und das vasointestinale Peptid (VIP) stimuliert - sezerniert. Bilirubin wird durch den ATP-Transpoter ABCC2 in die Galle sezerniert.

1.3 Pathophysiologische Mechanismen der Gallensteinbildung

Basierend auf der chemischen Zusammensetzung werden Gallensteine in Cholesterin- als auch schwarze und braune Bilirubinsteine (Pigmentsteine) klassifiziert. Cholesterin- und schwarze Pigmentsteine entstehen in der Galleblase, wohingegen braune Pigmentsteine in obstruktiven und infizierten Gallengängen präzipitieren¹⁸. Mehr als 80% der Gallensteine bestehen aus Cholesterin und stellen einen Defekt der biliären Cholesterinhomöostase dar. Gegenwärtig zählen zu den Hauptmechanismen drei pathophysiologische Faktoren, die für

die Kristallisation von Cholesterin in der Gallenflüssigkeit verantwortlich sind. Dazu gehören die Übersättigung der Galle mit Cholesterin, die Gallenblasenhypomotilität und die Destabilisierung der Galle durch Proteine. Kommt es zu einem Anfall von vermehrtem Cholesterin bzw. fällt der Gehalt an Gallensäuren, kann das Cholesterin nicht mehr in gemischte Mizellen aufgenommen werden. Der Grad der Instabilität der entstehenden Lecithin-Cholesterin-Vesikel ist entscheidend von deren Cholesteringehalt abhängig. In übersättigter Galle entstehen instabile Vesikel, die mit Cholesterin angereichert sind. Diese cholesterinreichen Vesikel aggregieren und verschmelzen zu multilamellären Vesikeln, aus denen Monohydratcholesterinkristalle ausfallen. Als Maß der Cholesterinübersättigung der Galle wird allgemein der Cholesterinsättigungsindex (CSI) angegeben. Er ist definiert als das molare Verhältnis der Cholesterinkonzentration einer Gallenprobe zu der Konzentration, die in einer Modellgalle gleicher Lipidzusammensetzung im Gleichgewicht maximal in Mizellen gelöst werden kann. Modellgalle besteht aus einer wässrigen Lösung von Taurocholsäure, Lecithin und Cholesterin¹⁹. Monohydratkristalle fallen dann aus der Galle aus, wenn der Cholesteringehalt der Galle die Löslichkeitskapazität von Gallensäuren und Phospholipiden übersteigt, was sich in einem CSI-Wert >1 zeigt.

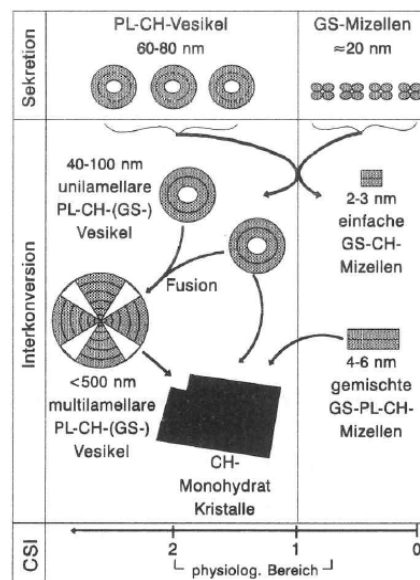


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Cholesterin-Carrier und ihrer Verteilung in ungesättigter und in übersättigter Galle (vgl. Erklärung im Text).

Die Verteilung der Cholesterin-Carrier und deren Aggregationszustand wird also durch die Lipidzusammensetzung der Galle bestimmt. Sie kann aus einem triangulären

Gleichgewichtsphasendiagramm abgelesen werden, dass für Modellgalle erstellt wurde (Abb. 3). Eine rein Mizelläre Phase findet man bei niedrigen Cholesterinkonzentrationen, bei höheren Konzentrationen dagegen Zweiphasenzonen, die entweder Cholesterinkristalle und Mizellen oder Vesikel und Mizellen enthalten. In der zentralen Dreiphasenzone koexistieren Kristalle, Vesikel und Mizellen²⁰.

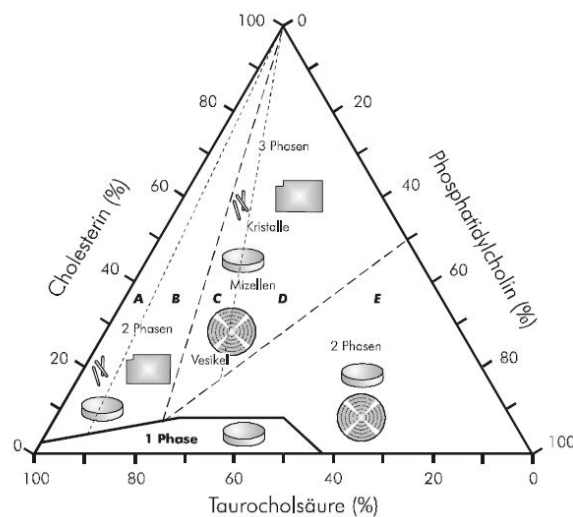


Abbildung 2: Biliäres Gleichgewichts-Phasendiagramm für Modellgalle aus Taurocholsäure, Lecithin, Cholesterin und Wasser nach Wang und Carey²¹. Cholesterinkristalle präzipitieren bei niedrigen Lecithin- bzw. Cholesterinkonzentrationen (Zone A und B). Bei einem Verhältnis von Cholesterin zu Lecithin >1 treten Kristalle auf (Zone C und D)

Wie im Gleichgewichtsphasendiagramm veranschaulicht treten Cholesterinkristalle also dann auf, wenn die Galle hohe Gallensalz- und niedrigen Lecithinkonzentrationen aufweist bzw. das Verhältnis von Cholesterin zu Lecithin > 1 ist¹¹. Ein Überschuss an Cholesterin im Verhältnis zu Gallensäuren und Lecithin resultiert entweder aus einer Hypersekretion von Cholesterin oder einer Mindersekretion von Gallensäuren oder Lecithin¹⁸. Die Hypersekretion von Cholesterin stellt dabei den Hauptgrund der Übersättigung der Galle dar. Ursächlich hierfür werden eine vermehrte Aufnahme und Synthese von Cholesterin in den Hepatozyten, eine verminderte hepatische Synthese von Gallensäuren oder eine verminderte hepatische Synthese von Cholesterylester, die in VLDL eingebaut werden, angesehen. Der größte Anteil der Aufnahme von Cholesterin in die Hepatozyten wird über den HDL-Rezeptor B1 vermittelt. Zusätzlich tragen der Apolipoprotein B/E- Rezeptor für LDL und der LDL-abhängige Rezeptor für Chylomikronen-Remnants zur Aufnahme des Cholesterins bei. Die inverse Korrelation zwischen Serum-HDL- Konzentration und der Bildung von Gallensteinen lässt vermuten, dass die Cholelithiasis mit einem vermehrt

gegenläufigen Cholesterintransport und hepatischen HDL-Katabolismus assoziiert ist²². Entsprechend kann jedes Enzym, das am hepatischen Cholesterinmetabolismus beteiligt ist, die Bildung von Cholesteinen beeinflussen¹⁶.

Die Hypomotilität der Gallenblase trägt ebenfalls entscheidend zur Steinbildung bei. Studien zeigen, dass dies vorallem unter hohem Östrogeneinfluss (z.B. in der Schwangerschaft), bei schnellem Gewichtsverlust oder bei total-parenteraler Ernährung der Fall ist. Überschüssiges Cholesterin lagert sich in die glatten Muskelzellen der Gallenblasenwand ein und führt so zu einer Versteifung der sarkoplasmatischen Membran und einer Entkopplung der G-Protein vermittelten Signaltransduktion. Cholezystokinin-1 kann so nicht mehr an seinen Rezeptor binden, und eine suffiziente Kontraktion der Gallenblase bleibt aus²³. Dadurch verlängert sich die Verweildauer der Galle in der Gallenblase, was die Nukleation, Präzipitation, Aggregation und das Wachstum von Cholesterinkristallen fördert. Die Nukleation und das Wachstum der Gallensteine werden weiter von Promotor- (α_1 -Glykoprotein, Aminopeptidase N, Immunglobulin G und M, Phospholipase C) und Inhibitorproteinen (Apolipoprotein A, Immunglobulin A) beeinflusst, die mit Vesikeln und soliden Cholesterinkristallen interagieren¹⁸. Es zeigt sich, dass hauptsächlich die Hypersekretion von Mucin in der Gallenblase die Cholesteinbildung fördert²⁴. Mucin ist ein Gemisch aus schwer löslichen hochmolekularen Glykoproteinen mit niedrigem Mannosegehalt, das von den Cholangiozyten sekretiert wird. Dies führt zur Bildung eines viskösen Gels auf der Gallenblasenmukosa. In diesem finden die Fusion der unilamellaren Vesikel und die Entstehung der Cholesterinkristalle statt. Durch die zunehmende Akkumulation der Cholesterinkristalle in der eingedickten Gallenflüssigkeit entwickelt sich der sonographisch nachweisbare Sludge²⁵.

Die weniger häufig auftretenden schwarzen Pigmentsteine sind meist eine Folge chronischer Hämolyse, die zu erhöhten Konzentrationen von Bilirubin in der Galle führt²⁶. Des Weiteren verursacht ein Verlust von Gallensalzen, z.B. durch ileale Resektion, M.Crohn oder Leberzirrhose, eine erhöhte Resorption von Bilirubin im Colon mit gesteigerter enterohepatischer Zirkulation und Anstieg der biliären Konzentrationen von Bilirubin, was schlussendlich zur Ausfällung der schwarzen Pigmentsteine führt.

1.4 Genetische Faktoren

In der Ätiologie der Cholelithiasis deuten die bisherigen Erkenntnisse auf eine multifaktorielle Genese hin. Daten von epidemiologischen Studien aus den USA, Europa,

China und Japan implizieren eine chronische hochkalorische, kohlenhydrat- und fettreiche sowie ballaststoffarme Kost als Hauptursache. Gestützt wird diese Aussage durch den starken Anstieg der Cholesterinsteinerprävalenz bei amerikanischen Ureinwohnern, in der Nachkriegszeit in Europa und aktuell in den asiatischen Schwellenländern. Zusammengefasst wird dieses Risikoprofil durch die Verlagerung der Essgewohnheiten, die als „westernized“ oder lithogene Provokationsdiät bezeichnet wird^{22,27}. Wie bei der Atherosklerose steigt das Risiko für das Entstehen eines Gallensteinleidens mit Zunahme von Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Insulinresistenz und Dyslipidämie (Hypertriglyzeridämie und niedrige HDL-Serumkonzentrationen)²⁸. Jedoch erbrachte die moderne Gallensteinforschung den Nachweis, dass nicht nur Umweltfaktoren⁷, ethnische und geographische Unterschiede^{29,30} sondern auch genetische Faktoren Einfluss auf die Gallensteinbildung haben. Es zeichnet sich also ein Bild einer komplexen Interaktion der einzelnen Komponenten, die zum Entstehen der Erkrankung beitragen, ab.

Schlüssige Beweise für die Rolle der genetischen Faktoren im Menschen lieferte erstmals eine großangelegte Studie im Rahmen des schwedischen Zwillingsregisters bei 43.141 Zwillingspaaren, die zwischen 1900 und 1958 geboren sind. Es zeigte sich eine signifikant höhere Übereinstimmung der phänotypischen Variation in monozygoten als in dizygoten Zwillingen (12% vs. 6%). Daraus lässt sich berechnen, dass in bis zu 25% der Fälle genetische Faktoren bei der Entstehung von Gallensteinen ursächlich sind³¹.

Genomweite Studien in experimentellen Kreuzungen von Inzuchtmauslinien identifizierten eine Reihe von Genen (*Lith genes*), die die Anfälligkeit zur Bildung von Gallensteinen deutlich erhöhen^{14,32-34}. Zusammengefasst in einer „Murine Gallstone Map“ wurden zunächst über 25 Genloci identifiziert^{16,35}. Diese werden in sechs Hauptklassen unterteilt, die für regulierende hepatische Lipidenzyme, hepatische Lipoproteinrezeptoren und mit ihnen assoziierte Proteine, hepatische und intestinale intrazelluläre Lipidtransporter, regulierende hepatische Lipidtranskriptionsfaktoren, Cholezystokinin und dessen Rezeptoren und biliäres Mucin kodieren.

1.5 Die ATP-bindenden Membrantransporter

Die ATP-bindenden Membrantransporter - auch bekannt als ATP-binding Cassette (ABC)-Transporter - gehören zur großen Superfamilie der Membranproteine, die die Energie aus ATP-Spaltung nutzen, um eine weite Bandbreite von Substanzen entgegen eines Konzentrationsgefälles zu sezernieren. ABC-Transporter transportieren meist Lipide oder

toxische Verbindungen und spielen deshalb eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von angeborenen oder erworbenen Krankheiten (z.B. der Cholelithiasis) und in der Toxikologie³⁶.

1.5.1 Der ABCG5/G8-Transporter

Besonders interessant in der Pathophysiologie der Gallensteinbildung ist der ABCG5/G8-Transporter (auch als Sterolin 1 und 2 bezeichnet). Dieser wird vom *Lith9*-Locus (Chromosom 2p21) kodiert¹⁴ und bildet ein Heterodimer als ATP-abhängige Exportpumpe für Cholesterin sowohl in der kanalikulären Membran der Hepatozyten als auch in der luminalen Membran der Enterozyten im Dünndarm³⁷. Die kodierenden Abschnitte von *ABCG5* und *ABCG8* stehen sich in einer Kopf-zu-Kopf orientierten Position gegenüber und werden nur durch 140 Basenpaare von ihren ersten Exons getrennt. Jeder Genabschnitt besteht aus 13 Exons und 12 Introns. Dabei werden die kodierenden Gene von einem gemeinsamen Promoter abgelesen. Die beiden Genabschnitte kodieren für zwei verschiedene Proteine, wobei jedes davon eine ATP-Bindungsstelle nahe des N-Terminus, eine Transmembran-Domäne mit sechs Helices und eine Nukleotidbindungsdomäne aufweist³⁸. ABCG5 und ABCG8 lagern sich im endoplasmatischen Retikulum (ER) als Heterodimer zusammen und werden über den Golgi-Apparat in die Zellmembran transportiert.

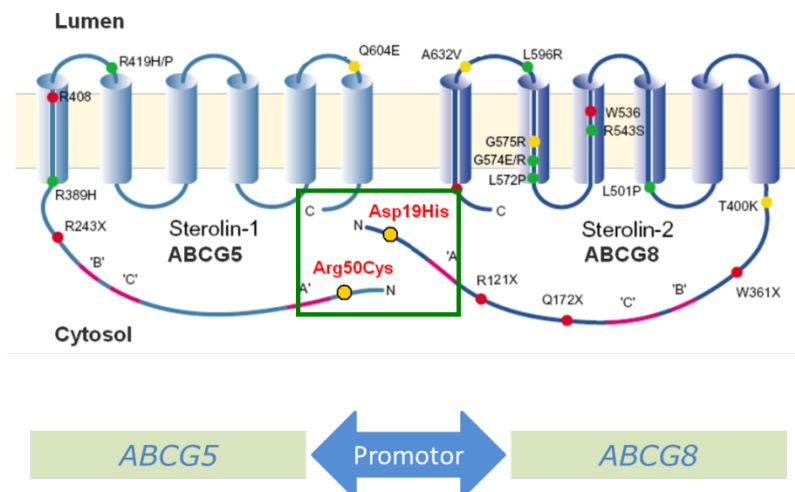


Abbildung 3: Aufbau des heterodimeren ABCG5/G8-Transporters. Erläuterungen siehe Text (Kapitel 1.5.1)

Nur als Heterodimer ist die volle Funktionalität des Cholesterintransports gegeben. Ein Mangel des jeweiligen einen Anteils führt zu einer Akkumulation des anderen Anteils im ER und verhindert die Translokation in die Zellmembran³⁹. Früh schon konnten Studien nachweisen, dass ABCG5/G8 auch Pflanzensterole transportiert. Durch eine „Loss-of-function“-Mutation entsteht die seltene autosomal-rezessive Krankheit der Sitosterolämie,

die durch eine hohe Retention von Pflanzensterolen und Cholesterin mit hohen Sterolserumwerten⁴⁰, Unfruchtbarkeit und Lipoarthropathie⁴¹, einer beschleunigten Entstehung von Arteriosklerose und frühzeitige kardialen Schäden⁴² einhergeht. Ein komplettes Fehlen von *Abcg5/g8* in Mäusen führt zu extrem niedrigen biliären Cholesterinkonzentrationen, währenddessen biliäres Lecithin und Gallensäuren nicht verändert sind⁴³. Die gleichen Effekte wurden auch bei Mäusen beobachtet, bei denen entweder *Abcg5* oder *Abcg8* fehlt^{44,45}. Umgekehrt führt eine Überexpression von *Abcg5/g8* in Mäusen zu einer bis zu 5-fach erhöhten Cholesterinkonzentration in der Galle und einer um 50% reduzierten fraktionellen Absorption des über die Nahrung aufgenommen Cholesterins⁴⁶. Wang *et al.*⁴⁷ zeigten, dass eine negative Korrelation zwischen der Effizienz der Cholesterinabsorption und der Menge an ABCG5/G8 im Jejunum und Ileum besteht. Die intestinale Cholesterinabsorption wird also über die jejunealen und ilealen ABCG5/G8-Transporter reguliert. Im Gegensatz zur Funktion des Niemann Pick C1-like-1-Transporter⁴⁸ (NPC1L1) fungiert ABCG5/G8 als Exportpumpe von Cholesterin und Pflanzensterolen vom Enterozyten in das Darmlumen. Somit entledigt sich der Körper überschüssig anfallenden Cholesterins und der Sterole über fäkale Ausscheidung. Es wurden weitere Faktoren identifiziert, die den Wirkungsgrad der ABCG5/G8-Sekretion der Leber einschränken. Dazu gehört auch der ABCB4-Transporter, der für die Lecithinsekretion aus den Hepatozyten in die Gallenwege verantwortlich ist. Ein Defizit des *Abcb4*-Transporters in Mäusen brachten die ABCG5/G8 vermittelte Cholesterinsekretion zum Erliegen. Dies zeigt, dass eine Kopplung zwischen ABCG5/G8 und ABCB4 besteht, die eine effiziente Cholesterinsekretion gewährleistet⁴⁹.

1.5.2 Genetische Polymorphismen des *ABCG5/ABCG8*-Gens

In neuster Zeit konzentrierte sich eine Reihe von Studien auf genetische Varianten von *ABCG5/G8*. Tatsächlich ist eine Veränderung im *ABCG8*-Gen mit einem doppelt so hohen Risiko für die Entstehung von Cholesterinsteinen vergesellschaftet wie Studien bei deutschen, serbischen, rumänischen, schwedischen, chilenischen und chinesischen Patienten zeigten⁵⁰. Einen großen Durchbruch erbrachte die Identifizierung der p.D19H-Variante in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS, engl. Genome-wide association study) mit Patienten aus Chile und Deutschland⁵¹. Zugrunde liegt dabei ein Single Nucleotide Polymorphism (SNP) des *ABCG8*-kodierenden Genabschnitts auf Chromosom 2, wobei die organische Base Guanin zu Cytosin an erster Stelle des Triplets verändert ist. Dies führt zur

Expression der Aminosäure Histidin anstatt von Asparaginsäure. Buch *et al.*⁵¹ stellten einen Zusammenhang zwischen dem Austausch dieser Aminosäuren und einer höheren Cholesterinsteinbildungsrate her. Zum selben Ergebnis kam eine Studie bei betroffenen Geschwisterpaaren: Verglichen mit der steinfreien Kontrollgruppe hatten die Träger der p.D19H-Variante ein erhöhtes Risiko für Gallensteine⁵². Weiter bekräftigt wurde diese Hypothese durch eine Studie innerhalb des schwedischen Zwillingsregisters. Zwillinge, die entweder heterozygote oder homozygote Träger der p.D19H-Variante waren, zeigten ein signifikant höheres Steinrisiko³⁰. Hinzu kommt, dass niedrige Gesamtcholesterin- und LDL-Cholesterinwerte im Serum beobachtet wurden. Die niedrigen Cholesterinserumwerte könnten ein Trigger für eine erhöhte hepatische Cholesterinbiosynthese und Sekretion in die Gallengänge sein. Man vermutet also, dass die p.D19H-Variante eine „Gain-of-function“-Mutation darstellt, die zu einer gesteigerten Elimination von Cholesterin aus dem Körper führt. Somit werden auch die Plasmalipidkonzentrationen und die Cholesterinsättigung der Galle beeinflusst, was wiederum das Risiko zur Bildung von Cholesterinsteinen erhöht⁵³. Es zeigte sich zudem, dass die p.D19H- mit der p.R51C-Variante im *ABCG5*-Gen kodiert im Kopplungsgleichgewicht liegt³⁰.

1.5.3 Die ABCB4/ ABCB11-Transporter

Die ABCB4- und ABCB11-Transporter gehören ebenfalls zur großen Subfamilie der ATP-abhängigen ABCB-Transporter und werden hauptsächlich auf der apikalen kanalikulären Seite der Hepatozyten exprimiert. ABCB4 sezerniert dabei Lecithin in die Gallenwege, wohingegen ABCB11 für die Sekretion der Gallensalze verantwortlich ist.

Das *ABCB4*-Gen, welches auch als „multi drug resistance“-Gen (*MDR3* beim Menschen, *Mdr2* in Mäusen) bekannt ist, trägt bei Punktmutationen jeglicher Art zu einem vermehrten Anfall von Gallensteinen bei. Klinische Untersuchungen in Patientenpopulationen^{54,55} und Studien im Tierversuch bei *Abcb4*-defizienten Mäusen⁵⁶ zeigten auf, dass es zur Cholelithiasis infolge verminderter Lecithinkonzentrationen kommt (Low Phospholipid Associated- Cholelithiasis). Diese Variante des Gallensteinleidens tritt v.a. bei jüngeren (Symptombeginn <40 Jahre) Patienten auf und geht mit intrahepatischer Mikrolithiasis, extrahepatischen Cholesterinsteinen und Symptomrezidiven nach Cholezystektomie einher. Erklärt wird dies durch die verringerte Menge von Lecithin, dass normalerweise benötigt wird um Cholesterin in den gemischten Mizellen zu lösen⁵⁵. Ein GWAS für Gallensteinleiden bei 8.258 isländischen Patienten zeigte eine signifikante Assoziation sowohl für ein missense-SNP p.G622E als auch

für die frameshift-Insertion p.L445GfsX22 ins *ABCB4*-Gen. Zusätzlich zeigte sich, dass diese beiden *ABCB4*-Varianten nicht nur mit intrahepatischer Schwangerschaftscholestase, sondern auch mit Leberzirrhose und –krebs assoziiert sind^{57,58}.

Mutationen im *ABCB11*-Gen, welches sich im *Lith1*-Locus auf Chromosom 2 befindet, führen zu fortschreitender familiärer intrahepatischer Cholestase Typ 2 oder zur benignen rekurrenden intrahepatischen Cholestase (BRIC), die nicht zur Leberzirrhose fortschreitet⁵⁹. Eine niedrige Expression von *ABCB11* vermindert die Gallensalzsekretion in die Galle und somit den Gallensalzpool sowie den gallensäureabhängigen Gallefluss. BRIC-Patienten mit *ABCB11*-Mutationen entwickeln häufiger Gallensteine⁶⁰, und eine Studie von Pan *et al.*⁶¹ konnte einen Nachweis von einzelnen Punktmutationen im *ABCB11*-Gen bei Patienten mit intrahepatischen Steinen erbringen.

2 Ziel der Arbeit

Die Grundlage der vorliegenden Doktorarbeit war die Identifizierung von lithogenen Kandidatengen durch Kreuzversuche und Genomanalysen im Mausmodell sowie im weiteren Verlauf die Auswertung von genomweiten Assoziationsstudien beim Menschen. Es wurden mehrere zu Gallsteinen prädisponierende Varianten identifiziert, wobei für die Mutation p.D19H des hepatischen und intestinalen Transporters ABCG5/G8 die häufigsten und stärksten Effekte nachgewiesen wurden.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, in einem transgenen Mausmodell die Auswirkung der homozygoten und heterozygoten *Abcg8* p.D19H-Variante auf die hepatische Cholesterinsekretionsrate und die Gesamtlipidkonzentration *in vivo* zu untersuchen. Dieser Fragestellung lag die Hypothese zugrunde, dass es durch die *Abcg8* p.D19H-Variante verursachte Funktionssteigerung des Transporters zu einer gesteigerten Cholesterinsekretion und in Folge dessen zu einer Cholesterinübersättigung kommt.

Im zweiten Teil sollen erstmals die Auswirkungen des gewebsspezifischen Knock-out von *Abcg5/g8* im Darm auf die hepatische Lipidsekretion ermittelt werden.

Zur Genotypisierung der Tiere sind Polymerasekettenreaktionen und allelische Diskriminierungen durchzuführen. Zur Gewinnung der Gallenproben ist es notwendig, den Mäusen nach einer modifizierten Methode nach Wang *et al.* akute Gallenfisteln in Narkose unter dem Mikroskop anzulegen. Durch photometrische Untersuchungen können dann die biliären Lipidkonzentrationen von Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin in der hepatischen Galle bestimmt werden. Durch statistische Analysen können anschließend die Sekretionsraten für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin ermittelt werden. Anhand linearer Regressionsanalysen und hyperboler Sättigungsbindungskurven lassen sich so Aussagen zu den Unterschieden von Sekretionsraten und zu Funktionsveränderungen des ABCG5/G8-Transporters treffen.

Die Aufklärung und Charakterisierung der Auswirkungen von lithogenen Kandidatengen sowie das bessere Verständnis des intestinalen Cholesterintransports eröffnen Möglichkeiten für neue Ansätze zur Risikoabschätzung, Prävention und Therapie des Gallensteinleidens.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Produkte und Hersteller

Produkt	Hersteller
<u>Genotypisierung:</u>	
Aqua ad iniectabilia	B. Braun
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit, Cat. No. 07-KK7352-02	PeqLab
– KAPA2G Fast Hot Start Genotyping Mix with dye (2x)	
– KAPA Express Extract Enzyme (1 u / µl)	
– KAPA Express Extract Buffer (10x)	
Dimethyl Sulfoxide (DSMO)	Sigma Aldrich
HPLC-H ₂ O LiChrosolv®	Merck KGaA
10x PCR Rxn Buffer (-MgCl ₂)	Invitrogen
50 mM MgCl ₂	"
Taq DNA Polymerase Recombinant 50 U (5 u/µl)	"
GTXpress™ Mastermix	"
10 nM dNTPs	"
6x MassRuler DNA Loading Dye	Thermo Scientific
MassRuler DNA Ladder, Mix ready-to-use 103ng/µl	"
Midory Green Advance DNA Stain	NIPPON Genetics Europe GmbH
LE Agarose Pulver	Biozym Biotech Trading GmbH
1% TAE-Puffer	"
<u>Narkose und Operation:</u>	
Rompun 2% Injektionslösung	Bayer
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	"
Ketavet 100mg/ml Injektionslösung	Pfizer
B506 Forene 100% (V/V) Isofluran	Abbott
Seide USP 6/0 schwarz geflochten	SUPRAMA™
Polyethylene Tubing PE 10	INTRAMEDIC™
<u>Cholesteringehalt- Bestimmung:</u>	

Cholesterol Enzymatic Endpoint Method REF CH200 <u>Phospholipidgehalt- Bestimmung:</u> Phospholipids Cat. No. 555-752	Randox Laboratories Limited MTI- Diagnostics GmbH
<u>Gallensäuregehalt- Bestimmung:</u> Total Bile Acids (TBA) Cat. No. BI 3863	Randox Laboratories Limited
<u>Sonstiges:</u> NaCl 0,9% AnalaR NORMAPUR Methanol Roti-Histofix Formaldehydlösung 4% Falcon Tubes 15 ml 0,5-2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße Pipettenspitzen Nadeln 26G x ½ 0,45mm x 13 mm Luer 1ml Mikrotestplatten 96 Well, R Wattetupfer	B.Braun VWR Chemicals Carl Roth Greiner Sarstedt Sarstedt BD Mircolance™ 3 BD Plastipak™ Sarstedt

3.2 Instrumente

Tabelle 2: Instrumente und Hersteller

Geräte	Hersteller
Thermomixer	Eppendorf
C1000 Touch Thermal Cycler	BIORAD
Electrophoresis Power Supply – EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech
Fusion SL Vilber Lourmat	PeqLab
Mikrowelle	Panasonic
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Bioystems
Zentrifuge 4 – 15 C	Sigma
Waage	VWR science education
Leica M50 Mikroskop	Leica
Leica DM5000 Mikroskop	Leica
KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Leica
Wärmelampe	

Pinzetten	B.Braun Aesculap Division
Mikroschere	F.S.T
Zentrifuge 4517 R	Eppendorf
Inkubator	Memmert
Sunrise Magellan	Tecan

3.3 Primer

Abcg5/g8 Knock-in:

- Primer 1: 5' - AAGGTCAGTGAGCAGAATGCAAAGT - 3'
- Primer 2: 5' - CTTGTCTGGCTGCCAATAGAACCTA - 3'
- Primer 3: 5' - TTCTCAGCCTCACACAGAGACCTTT - 3'

Cre:

- Cre forward: 5' - CCACGACCAAGTGACAGCAATG - 3'
- Cre reverse: 5' - CAGAGACGGAAATCCATCGCTC - 3'

Allelische Diskriminierung g5:

- Mutante Sonde VIC: 5' – CCTTTAAAGCAACAGTGT - 3'
- Wildtyp Sonde FAM: 5' – CCTTTAAAGCAACGGTGT - 3'
- Primer forward: 5' - CCTTTGCCCTTGTGGGATT - 3'
- Primer reverse: 5' - GCATGATTTGATGTTCCACCAA - 3'

Allelische Diskriminierung g8:

- Mutante Sonde VIC: 5' – CTGTA CTTCAGCATGCTT C - 3'
- Wildtyp Sonde FAM: 5' - CTGTA CTTCAGGATGCTTC - 3'
- Primer forward: 5' - GAGACCCAGCTGTGGAATGG - 3'
- Primer reverse: 5' - CCTGTGGTAGGAAAGAAAAGTCAGT - 3'

3.4 Mäuse

3.4.1 Genotypen

Die Mäuse wurden selbst nach der Methode von Capecchi MR (1989) generiert. In Zusammenarbeit mit Gene Bridges (Heidelberg, GER) wurde ein Konstrukt erstellt, welches den Knock-in und zusätzlich LoxP-Sequenzen für eine Cre-gerichtete Rekombinante enthielt. Diese wurden in Zusammenarbeit mit EMBLEM (Monterotondo, IT) in embryonale Stammzellen elektroportiert, diese wurden selektioniert und der rekombinante Klon wurde in Blastozysten injiziert, welche in scheinchwangere Mäuse transferiert wurde. Daraus

erhielt man chimäre Mäuse, die nach weiteren Verpaarungen mit C57BL/6J die genetisch veränderte Mauslinie bildeten. Durch weitere Verpaarungen wurde eine homozygote (Mut) Variante von *Abcg8* p.D19H und heterozygote (Het) Varianten des Knock-in von p.R50C für *Abcg5* und p.D19H für *Abcg8* in weiblichen und männlichen Mäusen gezüchtet. Als Wurfkontrollen galten männliche und weibliche Wildtypmäuse (WT), die keine der beiden Varianten tragen.

Zur Untersuchung der Funktion des *Abcg5/g8*-Transporter in Darm bedient man sich des Cre/loxP-Systems. Das Cre/loxP-System ist ein Rekombinations-System, das das gezielte Entfernen von DNA-Sequenzen in lebenden Organismen ermöglicht. Dadurch entstehen gewebsspezifische Knock-out- Mäuse, die keinen *Abcg5/g8*-Transporter im Darm aufweisen (im Folgenden „VilCre“ genannt).

3.4.2 Haltung und Fütterung

Die Haltung erfolgte zu jeweils 1-5 Tieren in einzeln belüfteten Käfigen bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Ein zwölfstündiger Tag-Nacht Zyklus (5 Uhr – 17 Uhr) wurde eingehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (normales Futter oder lithogene Diät) über den Zeitraum der Haltung. Die Fütterung der lithogenen Diät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, GER) begann im Alter von acht Wochen und setzte sich aus 15% Butterfett, 1% Cholesterin 0,5% Cholsäure, 2% Maisöl, 50% Rohrzucker, 20% Kasein, essenziellen Mineralien und Vitaminen zusammen. Die Fütterung erfolgte über 84 Tage in denen regelmäßig die Nahrungsmenge und das Körpergewicht kontrolliert wurden. Die Tiere mit Standarddiät wurden gleichfalls regelmäßig kontrolliert und frühestens nach 3 Monaten der OP zugeführt.

Alle Experimente wurden gemäß §8a des Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes genehmigt (Aktenzeichen TV 28/2012).

3.5 Genotypisierung

3.5.1 DNA-Isolierung

Im Alter von 21 Tagen wurden die Mäuse von der Mutter abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und ein kleines Stück Gewebe am Ende des noch nicht verknorpelten Schwanzes entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße bei -20°C gelagert. Die DNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit (PeqLab, Erlangen, GER).

Pro Gewebe ergibt sich folgende Zusammensetzung:

- +88 µl H₂O
- +10 µl KAPA Express Extract Buffer
- +2 µl KAPA Express Extract Enzyme

Anschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße in den Thermomixer gestellt und 10 min bei 75°C und nochmals 5 min bei 95°C inkubiert.

3.5.2 Polymerasekettenreaktion

Zur künstlichen Vervielfältigung von DNA bediente man sich der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction). Um eine eindeutige Genotypisierung der Tiere zu gewährleisten wurden mehrere PCR-Protokolle herangezogen.

Tabelle 3: PCR-Protokoll für Abcg5/g8-Knock-in (Mut, Het, WT)

Produkt	Stoffmenge	Menge (µl/Probe)
HPLC-H ₂ O LiChrosolv®		5
KAPA Fast Hot Genotyping Mix with dye (2x)		12,5
DSMO		1,5
Primer 1	10 µM	2,5
Primer 2	10 µM	1,25
Primer 3	10 µM	1,25
DNA		1

95°C 3 min

95°C 15 sec

58°C 15 sec

72°C 20 sec 35 Zyklen

72°C 7 min

4° C Pause

Tabelle 4: PCR-Protokoll für gewebsspezifischen Knock-out (VilCre)

Produkt	Stoffmenge	Menge (µl/Probe)
HPLC-H ₂ O LiChrosolv®		17,25
10x PCR Rxn Buffer (-MgCl ₂)		2,5

MgCl ₂	50 mM	1
dNTPs	10 mM	0,5
Primer CRE forward	10 µmol	0,5
Primer CRE reverse	10 µmol	0,5
Taq DNA Polymerase Recombinant 50 U (5 u/µl)		0,25
DNA		2,5

94 °C 45 sec

56°C 30 sec 35 Zyklen

72 °C 45 sec

3.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine biochemische und molekularbiologische Methode, in der Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) durch eine Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt werden. Um ihre Größe zu bestimmen, werden sie mit DNA-Strängen bekannter Größe verglichen.

Tabelle 5: Protokoll zum Herstellen eines 2% Agarose-Gel

Produkt	Menge/Gel
LE Agarosepulver	6 g
1% TAE-Puffer	300 ml
Midory Green Advance DNA Stain	15 µl

Das Agarosepulver wurde abgewogen und zusammen mit dem TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine vollständige Lösung eingetreten war. Bei 60°C Abkühlung wurde Midory-Green zugeführt, und das Gel wurde dann in die vorbereitete Kammer gegossen. Durch Abkühlung bildete sich ein hartes Agarosegel. Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden zu jeder Probe 4,16 µl (entspricht 1/6 des Gesamtvolumens) 6× MassRuler Liquid Dye (LD) zugegeben. Dies ist ein mit anionischen Farbstoffen und Glycerin versetzter Puffer, der die Laufmittelfront markiert und das Absinken der Proben in die Agarosegeltaschen gewährleistet.

Für die Gelelektrophorese der *Abcg5/g8*- Knock-in Linie werden folgende Kontrollen in die Kammern pipettiert:

1. MassRuler DNA Ladder, Mix ready-to-use 103 ng/ μ l
2. *Abcg8* p.D19H Heterozygot (Het): Fragment 548 bp + Fragment 445 bp
3. *Abcg8* p.D19H Homozygot (Mut): Fragment 445 bp
4. *Abcg5* p.R50C Heterozygote (Het): Fragment 445 bp + Fragment 338 bp
5. Wildtyp (WT): Fragment 338 bp

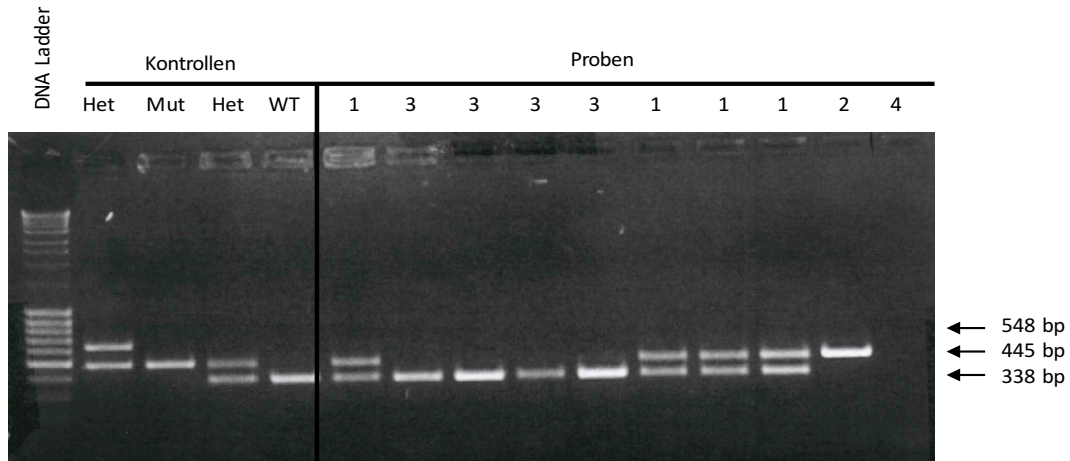


Abbildung 4: Gelelektrophorese von *Abcg5/g8* Knock-in: 1 = Heterozygot (Het); 2 = Homozygot (Mut); 3 = Wildtyp (WT); 4 = Wasserkontrolle

In der Gelelektrophorese zum Nachweis der darmspezifischen Rekombinase (Cre) zur Identifizierung der Knock-out-Tiere, wurden folgende Kontrollen in die Kammern pipettiert:

1. MassRuler DNA Ladder, Mix ready-to-use 103 ng/ μ l
2. Cre (+): Fragment 373 bp
3. Cre (-): kein Fragment nachweisbar

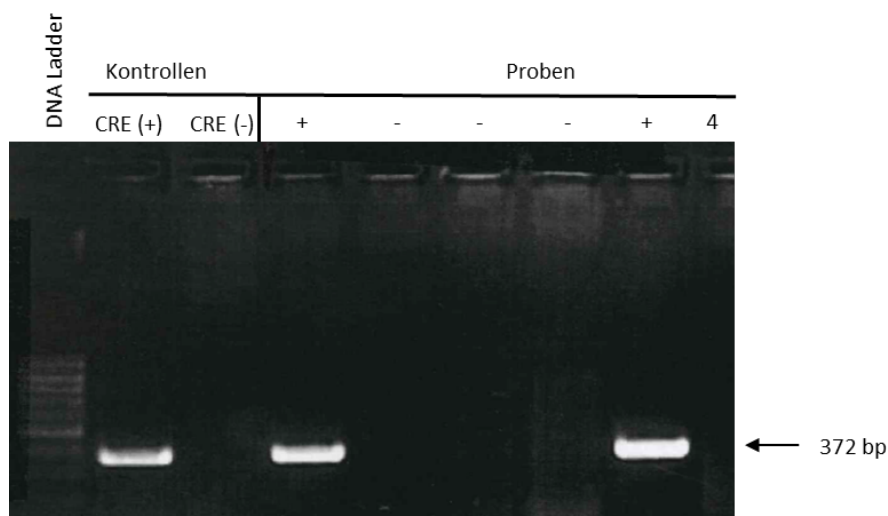


Abbildung 5: Gelelektrophorese zum Nachweis der *Abcg5/g8* Knock-out darmspezifischen Rekombination: + = darmspezifische Rekombination nachgewiesen, - = darmspezifische Rekombinante nicht nachgewiesen; 4 = Wasserprobe

Die Elektrophorese dauerte jeweils 1 h, danach wurde die Beleuchtung des Agarosegels mit UV-Licht durchgeführt und das Gel fotodokumentiert.

3.5.4 Allelische Diskriminierung

Um Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in der DNA nachzuweisen, bedient man sich der Methode der allelischen Diskriminierung. Ein Fragment in dem der Polymorphismus liegt, wird mit einem spezifischen Primerpaar amplifiziert. Das PCR-Produkt wird mittels zwei fluoreszenzmarkierter Sonden (VIC/FAM), jede spezifisch für ein Allel, fluorimetrisch nachgewiesen. Dabei wird die Nuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase ausgenutzt, indem die Sonden während der Polymerisation gespalten und dadurch der fluoreszierende Farbstoff vom Quencher (MGB[®]) getrennt werden. Die Zunahme der Fluoreszenz-Signale ist proportional zur Anzahl der der amplifizierten DNA Fragmente. Am Ende der Reaktion wird die Endfluoreszenz gemessen. Über die beiden allelischen Sonden lässt sich nun an Hand der amplifizierten Messung festlegen, welches Allel vorliegt bzw. welche DNA-Probe beide Allele trägt.

Tabelle 6: TagMan-Protokoll für *Abcg8* p.D19H

Produkt	Stoffmenge	Menge (µl/Probe)
GTX press Mastermix		5
Sonde VIC	10 µM	0,2
Sonde FAM	10 µM	0,2
Primer forward G8	10 µM	0,9
Primer reverse G8	10 µM	0,9
HPLC-H ₂ O LiChrosolv [®]		0,8
DNA		2

95°C 10 min

92°C 15 sec

60°C 1 min 40 Zyklen

Tabelle 7: TagMan-Protokoll für *Abcg5* p.R50C

Produkt	Stoffmenge	Menge (µl/Probe)
GTX press Mastermix		5
Sonde VIC	10 µM	0,2
Sonde FAM	10 µM	0,2

Primer forward G5	10 µM	0,9
Primer reverse G5	10 µM	0,9
HPLC-H ₂ O LiChrosolv®		0,8
DNA		2

95°C 10 min

92°C 15 sec

60°C 1 min 40 Zyklen

3.6 Anlage einer akuten Gallenfistel und Probengewinnung

Die Mäuse wurden einen Tag vor der Operation ab 17 Uhr über Nacht gefastet. Der freie Zugang zu Wasser blieb gewährleistet. Die Operation startete am darauffolgenden Tag um 9 Uhr. Die Mäuse wurden gewogen und das exakte Endgewicht wurde dokumentiert. Die Tiere wurden anhand ihres Gewichtes mit einer intraperitonealen Injektion anästhesiert.

Tabelle 8: Narkoseprotokoll

Produkt	Wirkstoff	Menge (mg/kg KG)
Ketavet 100 g/ml	Ketamin	90-120
Rompun 2%	Xylazin	6-8

Der volle Narkoseeintritt war nach 10-15 min zu erwarten und wurde mit fehlendem Auftreten des Zehenreflexes überprüft. Zur Vertiefung der Narkose wurden den Tieren mit Isofluran getränkte Wattetupfer vor die Nase gehalten und fünf Atemzüge inhalativ verabreicht. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen-Salbe bedeckt. Die Operation wurde unter dem Leica M50 Mikroskop bei semisterilen Bedingungen durchgeführt. Die Laparotomie wurde durch Anheben der Haut mit der Pinzette und einer medianen Inzision vom Bauchnabel bis zum Sternum begonnen. Es folgte die Eröffnung des Peritoneums mit einer Mikroschere, die Mobilisation der Leber nach kranial und das Aufsuchen und Freipräparieren des Ductus choledochus. Die Leber und die Gallenblase wurden hinsichtlich des Auftretens von Fettleber, Gallensteinen und Mucin untersucht. Zur Induktion einer Cholestase wurde der Ductus choledochus mittels eines Seide-USP-Fadens umschlungen. Die Leber wurde rückmobilisiert, und das Ligamentum teres hepatis wurde durchtrennt. Die Gallenblase wurde freigelegt, und eine Schlaufe mit dreifach gewundenem Knoten wurde um den Corpus vorgelegt. Zu Anlage der akuten Gallenfistel wurden mittels

einer Mikroschere eine Inzision an der Gallenblasenspitze vorgenommen und der PE-10 Polyethylene-Tubing Katheter eingebracht. Dieser besaß eine Länge von 10 cm, einen Innendurchmesser von 0,28 mm und einen Außendurchmesser von 0,61 mm. Nach erfolgreicher Kanülierung wurde zur Fixierung des Katheters in der Gallenblase die vorgelegte Schlaufe festgezogen. Direkt mit Einlage des Katheters in die Gallenblase startete auch die Gewinnung der Galle mittels Schwerkraft in Eppendorf-Reaktionsgefäße. Der Wechsel der Reaktionsgefäße erfolgte innerhalb der ersten Stunde des Versuches alle 15 min und danach jede Stunde für bis zu 6 Stunden. Nach Volumenbestimmung und mikroskopischer Untersuchung von nativer Galle wurden die Proben eingefroren und bei -80°C für weitere Lipidanalysen gelagert. Während der Operation und Gallegewinnung wurde die Körpertemperatur bei $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ mittels einer Wärmelampe gehalten und anhand eines Thermometers überprüft. Den Tieren wurde jede Stunde eine weitere intraperitoneale Injektion des Anästhetikums, sowie alle zwei Stunden eine intraperitoneale Gabe ($\sim 25 \mu\text{l}$) 0,9% NaCl verabreicht um eine ausreichende Hydratation zu gewährleisten. Das Gallevolumen wurde durch Wiegen der Probe und Subtraktion des leeren Reaktionsgefäßgewichtes bestimmt. Nach 6 h wurde den Tieren Blut, Leber, Milz und Darm zu weiteren Analyse entnommen, der Tod der Tiere erfolgte durch die Blutgewinnung.

3.7 Mikroskopische Untersuchung

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die ersten $5 \mu\text{l}$ Galle verwendet, die initial nach Anlage der akuten Gallefistel gewonnen wurden. Bei Raumtemperatur ($\sim 22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) wurden $5 \mu\text{l}$ Galle auf einen Objektträger gegeben und mit dem Leica DM5000 Mikroskop bei einer 200x Vergrößerung im Hellfeld begutachtet. Danach wurde auf den Tropfen Galle ein Deckglas gelegt und mittels Polarisationsmikroskopie erneut untersucht. Die Bewertung der Mikroskopiebefunde wurde anhand der Einteilung von Wang *et al.*⁶² vorgenommen.

3.8 Chemische und biochemische Analyse der nativen Galle

Es wurden Mikrottestplatten (96 Well R, Sarstedt, Nürmbrecht, GER) verwendet um Proben von mehreren Tieren pro Platte vergleichen zu können. Alle Bestimmungen wurden im Doppelansatz durchgeführt, und deren Ergebnisse wurden gemittelt.

3.8.1 Cholesterin

Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration in hepatischer Gallen erfolgte nach einer enzymatischen Endpunktmessung mittels Photometrie, die erstmal von Allain *et al.* und Röschlau *et al.*^{63 64} publiziert wurde. Der Gehalt an Cholesterin wird nach enzymatischer

Hydrolyse und Oxidation bestimmt. Der Indikator Quinonimin wird durch Wasserstoffperoxid und 4-Aminantipyrin in Gegenwart von Phenol und Peroxidase gebildet.

Die Bestimmung erfolgte mit dem Kit „Cholesterol Enzymatic Endpoint Method REF CH200“ von Randox Laboratories Limited (Crumlin, UK).

Tabelle 9: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Cholesterinkonzentration

	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
ddH ₂ O	2 µl	-	-
Standard	-	2 µl	-
Probe	-	-	2 µl
Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl

Es folgte eine Inkubation der Platte bei 37°C für 5 min. Die Messung erfolgte bei 492 nm im Spektralphotometer.

Als Standard wurden Verdünnungen von 1:1 → 1:6 einer Cholesterinlösung mit einer Konzentration von 5,36 mmol/l mitgeführt. Die Extinktionswerte daraus waren die Grundlage zur Erstellung einer Standardkurve, die zur Berechnung der Werte der Proben (in mmol/l) diente.

3.8.2 Lecithin

Bei der Bestimmung der Phospholipidkonzentration in der Galle handelt es sich um eine enzymatische Photometrie, entsprechend einer modifizierten Methode nach Takayama *et al.*⁶⁵ Die Phospholipide hydrolysieren in Gegenwart von Phospholipase D zu Cholin und Phosphatidsäuren. Die Choline bilden nach Oxidation durch Cholin-Oxidase Betain und Wasserstoffsuperoxid. In der Anwesenheit von Peroxidase reagiert Wasserstoffsuperoxid mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu einem roten Chinonimin. Die Intensität der Farbe ist proportional der Menge an Phospholipiden in der Probe.

Die Bestimmung erfolgte mit dem Kit „Phospholipide Cat. No. 555-752“ von Mti-Diagnostics GmbH (Idstein, GER). Die Proben wurden aufgrund der Linearität des Testes bis zu einer Phospholipidkonzentration von 1000 mg/dl (12,9 mmol/l) jeweils 1:3, 1:4, 1:6 oder 1:10 mmol/l verdünnt.

Tabelle 10: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Lecithinkonzentration

	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
ddH ₂ O	1 µl	-	-
Standard	-	1 µl	-
Probe	-	-	1 µl
Reagenz	150 µl	150 µl	150 µl

Es folgte eine Inkubation der Platte bei 37°C für 15 min. Die Messung erfolgte bei 492 nm im Spektralphotometer.

Als Standard wurden Verdünnungen von 1:1 → 1:5 einer Phospholipidlösung mit einer Konzentration von 3,87 mmol/l mitgeführt. Die Extinktionswerte daraus waren die Grundlage zur Erstellung einer Standardkurve, die zur Berechnung der Werte der Proben (in mmol/l) diente.

3.8.3 Gallensäuren

Die modifizierte Methode nach Komiyama *et al.*⁶⁶ beruht auf folgendem Prinzip: In Gegenwart von Thio-NAD konvertiert das Enzym 3 α -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 α -HSD) Gallensäuren zu 3-Keto-Steroiden und Thio-NADH. Diese Reaktion steht im Reaktionsgleichgewicht und ist reversibel, sodass der Anteil von Thio-NADH bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden kann. Die Bestimmung der Gallensäurekonzentration erfolgte mit dem Kit „Total Bile Acids (TBA) Cat. No. BI 3863“ von Randox Laboratories Limited (Crumlin, UK). Die Proben wurden aufgrund der Linearität des Tests bis zu einer Gallensäurekonzentration von 160 µmol/l jeweils 1:200/ 1:300 oder 1:400 verdünnt.

Tabelle 11: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Gallensäurekonzentration (Schritt 1)

	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
ddH ₂ O	1,5 µl	-	-
Standard	-	1,5 µl	-
Probe	-	-	1,5 µl
Reagenz 1	100 µl	100 µl	100 µl

Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 5 min. Des Weiteren wurde zu jedem Slot Reagenz 2 hinzugefügt.

Tabelle 12: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Gallensäurekonzentration (Schritt 2)

	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
Reagenz 2	30 µl	30 µl	30 µl

Eine Extinktionsmessung (A_1) erfolgte initial nach 1 Minute, die zweite Messung (A_2) erfolgte nach weiteren 2 Minuten. ΔA ergab sich aus der Subtraktion von $A_2 - A_1$. Als Standard wurden Verdünnungen von 1:1 \rightarrow 1:4 einer Lösung mit einer Konzentration von 3,87 mmol/l mitgeführt. Die Extinktionswerte daraus waren die Grundlage zur Erstellung einer Standardkurve, die zur Berechnung der Werte der Proben (in mmol/l) diente.

3.9 Berechnungen

3.9.1 Gallefluss

Der Gallenfluss beschreibt ein Volumen, das eine fiktive Maus von 100 g pro Stunde produzieren würde ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$). Dies dient zum Vergleich des Gallenflusses zwischen den einzelnen Tieren und gibt Auskunft darüber, ob dieser während der Dauer des Versuches zu- oder abnimmt.

3.9.2 Gesamtlipidkonzentration

Die gemessenen Gallensäuren-, Phospholipid- und Cholesterinkonzentrationen bildeten die Grundlage zur Berechnung der Gesamtlipidkonzentration, sowohl in mmol/l als auch in g/dl⁶⁷. Dafür wurde die Summe der einzelnen Anteile unter Berücksichtigung der Molmassen (Gallensäuren 537, Phospholipide 775 und Cholesterin 387) gebildet. In Bezug auf die Gesamtlipidkonzentration (TL) wurde der prozentuale Anteil von Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin berechnet. Die angegebenen Werte sind in Mol% angegeben.

3.9.3 Cholesterinsättigungsindex

Der Cholesterinsättigungsindex (CSI) beschreibt das Verhältnis der Cholesterinkonzentration einer Gallenprobe zu der maximalen Cholesterinkonzentration in einer Modellgalle. Diese muss die gleiche Konzentration der Hauptlipide wie in der Gallenprobe aufweisen. Der CSI wird bestimmt, um das Maß der Cholesterinsättigung anzugeben und Rückschlüsse auf die potenzielle Steinbildungsbereitschaft der Galle zu ziehen.

Zur Berechnung des CSI wurden die von Carey *et al.*⁶⁸ erstellten „kritischen Tabellen“ herangezogen. Als Berechnungsgrundlage wurde die Gesamtlipidkonzentration in g/dl und der relative Cholesterinanteil daran in Mol% benötigt. Der γ -Wert (N) wurde aus dem Verhältnis von Phospholipiden zu der Summe aus Gallensäuren und Phospholipiden

angegeben. Der x-Wert (B) war die Gesamtlipidkonzentration. Der Schnittpunkt dieser beiden Werte ergab den Tafelwert (t). Da jedoch die berechneten Werte der Gallenproben nicht den Werten in der Tabelle entsprachen, musste zwischen vier Werten interpoliert werden. Daraus ergab sich der Wert des maximal löslichen Cholesterins (MLC) der Probe. Der prozentuale Anteil des Cholesterins an der Gesamtlipidkonzentration dividiert durch den errechneten Wert des MLC ergab den CSI der jeweiligen Probe.

3.9.4 Output- und Sekretionsraten

Die Output- bzw. Sekretionsrate stellt das Verhältnis zwischen der Menge von Cholesterin, Lecithin oder Gallensäuren ($\mu\text{mol/l}$) zu dem sezernierten Gallenvolumen pro Stunde und dem Körpergewicht der Maus dar⁶⁷. Die Sekretionsrate wurde dabei auf das Körpergewicht pro 100 g, die Outputrate auf das Körpergewicht pro kg bezogen. Durch Angabe des Output bzw. der Sekretion können verschiedene Zeitpunkte im Versuch, einzelne Tiere und Gruppen miteinander verglichen werden. Zudem sind Aussagen über die Korrelation zwischen Gallefluss, Cholesterin-, Lecithin- und Gallensäuresekretion möglich.

3.10 Statistische Methoden

Alle Daten sind als Mittelwerte und deren \pm SEM gezeigt. Um phänotypische Parameter (quantitative Merkmale) zu gleichen Zeitpunkten zwischen den verschiedenen Gruppen zu vergleichen, wurde der Student's *t*-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für Vergleiche eines Parameters zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurde der Student's *t*-Test für abhängige/ verbundene Stichproben herangezogen.

Um Abhängigkeiten zwischen zwei Variablen zu untersuchen wurden lineare, Regressionsanalysen durchgeführt⁶⁹. R^2 ist die erklärende Varianz des Regressionsmodells. Ein *p*-Wert <0.05 in der ANOVA-Analyse zeigt eine signifikante Abhängigkeit zwischen den beiden Variablen für jeden einzelnen Genotyp an. Modelle für Sättigungsbindungskurven wurden nach den Berechnungen von Mazer *et al.*⁶⁹ entwickelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Signifikanzniveau mit $p = 0,05$ definiert. Als Software wurden für alle statistische Kalkulationen und die Erstellung von Diagrammen IBM SPSS Statistics 20 oder GraphPad PRISM 5.0 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Gruppen

Im Rahmen der Studie wurden zwei verschiedene Mausmodelle gegen die Kontrollgruppe Wildtyp (WT) verglichen. Zum einen untersuchten wir die Auswirkung der *Abcg8* p.D19H-Variante in homozygoten (Mut) und *Abcg8* p.D19H bzw. *Abcg5* R50C heterozygoten (Het) Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (WT). Jede dieser Genotypen wurde sowohl für normale Diät als auch für „Western Type Diet“ (lithogene Diät) analysiert. In einem anderen Mausmodell untersuchten wir den gewebespezifischen Knock-out des *Abcg5/g8*-Transporters im Darm (VilCre). Auch in diesem Mausmodell wurden abhängig von der Fütterungsart zwei Gruppen gebildet.

Daraus ergaben sich 8 unterschiedliche Gruppen. Tabelle 13 fasst die Anzahl der in den Versuch eingeschlossenen Tiere zusammen.

Tabelle 13: Gruppeneinteilung und Anzahl (N) der in den Versuch eingeschlossenen Tiere.

Diät		Genotyp							
		Wildtyp (WT)		<i>Abcg8</i> p.D19H- homozygot (Mut)		<i>Abcg8</i> p.D19H/ <i>Abcg5</i> p.R50C heterozygot (Het)		<i>Abcg5/g8</i> - gewebespezifischer Knock-Out (VilCre)	
N normale Diät		14		16		17		16	
Männlich	Weiblich	7	7	7	9	11	6	9	7
N lithogene Diät		12		15		18		18	
Männlich	Weiblich	5	7	7	8	10	8	10	8

4.2 Körpergewicht und Lebergewicht

Während der Fütterungsperiode von 84 Tagen nahmen die Tiere aller Genotypen mit normaler und lithogener Diät regelrecht zu. Alle Tiere wirkten gesund und äußerliche Unterschiede konnte nicht festgestellt werden. Das Körpergewicht wurde vor Anlage der akuten Gallenfistel, das Lebergewicht nach Entnahme der Organe bestimmt.

Die Tiere der Kontrollgruppe (WT) erreichten ein Körpergewicht von $23,4 \pm 1,2$ g. Keine der anderen Genotypen (Mut, Het, VilCre) zeigten einen Unterschied. Männliche Tiere waren mit einem Gewicht von $25,7 \pm 0,5$ g um 34% ($p < 0,05$) schwerer als die weiblichen Tiere. Das Lebergewicht der WT-Mäuse betrug $0,9 \pm 0,06$ g. Auch hier zeigten die anderen Genotypen

(Mut, Het, VilCre) keinen Unterschied. Das Lebergewicht der männlichen Tiere betrug im Mittel $1,0 \pm 0,03$ g, das der weiblichen Tiere $0,8 \pm 0,02$ g ($p < 0,05$).

Beim relativen Körpergewicht zeigte ausschließlich die Gruppe VilCre einen Unterschied ($p < 0,05$) zum WT. Dieses war mit $4,7 \pm 0,1\%$ höher als das der WT- Gruppe mit $3,9 \pm 0,1\%$. Der Vergleich von Mut und Het sowie der Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen zeigte keine Unterschiede im relativen Lebergewicht.

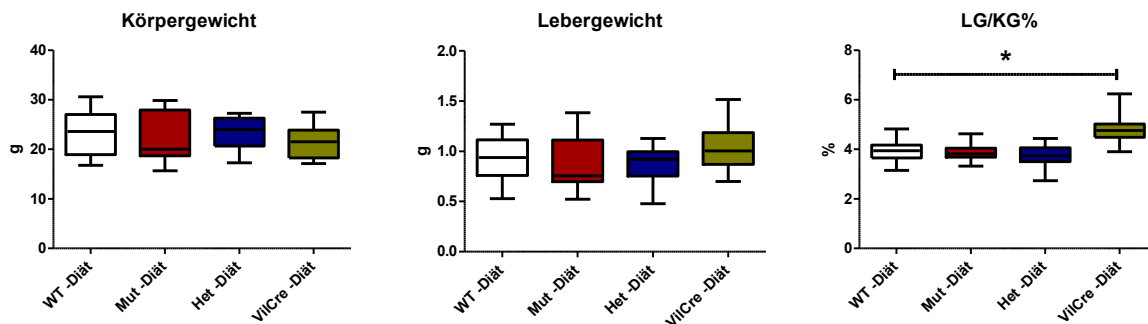


Abbildung 6: Körpergewicht, Lebergewicht und relatives Lebergewicht von WT-, Mut-, Het- und VilCre- Mäusen unter normaler Diät (-Diät).

Bei Fütterung mit lithogener Diät betrug das Körpergewicht der WT $25,4 \pm 1,1$ g. Im Vergleich zeigte sich kein Unterschied der Tiere der Gruppen Mut, Het und VilCre. Die männlichen Tiere waren mit einem Körpergewicht von $28,2 \pm 0,3$ g um 21% ($p < 0,05$) schwerer als die weiblichen Tiere ($23,3 \pm 0,5$ g). Das Lebergewicht der WT-Mäuse betrug $1,7 \pm 0,7$ g. Lediglich die Leber des VilCre war mit $3,9 \pm 0,3$ g ($p < 0,05$) schwerer. Auch zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte hier kein Unterschied festgestellt werden.

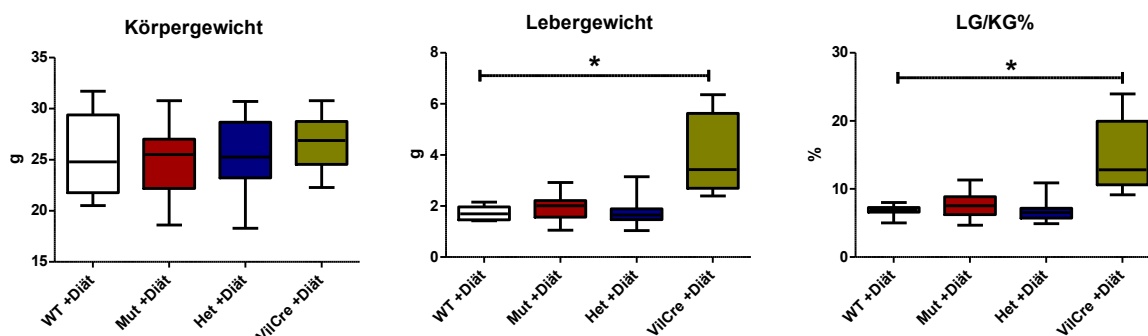


Abbildung 7: Körpergewicht, Lebergewicht und relatives Lebergewicht von WT-, Mut-, Het- und VilCre- Mäusen unter lithogener Diät (+ Diät).

4.3 Makro- und mikroskopische Phänotypisierung der Organe und Galle

4.3.1 Makroskopie

In den Gruppen mit normaler Diät zeigten alle Genotypen einen unauffälligen Befund der Leber. Bei makroskopischer Betrachtung fanden sich keine Steine in der Gallenblase. Die Galle war zu jedem Zeitpunkt klar von hell- bis dunkelgelber Farbe. Im Gegensatz dazu fanden sich in den Gruppen bei lithogener Diät deutliche Abweichungen. In 58% der Fälle fand sich beim WT eine Fettleber. Bei Mut und Het zeigte sich in bis zu 80% und bei VilCre in bis zu 90% der Fälle eine Fettleber.

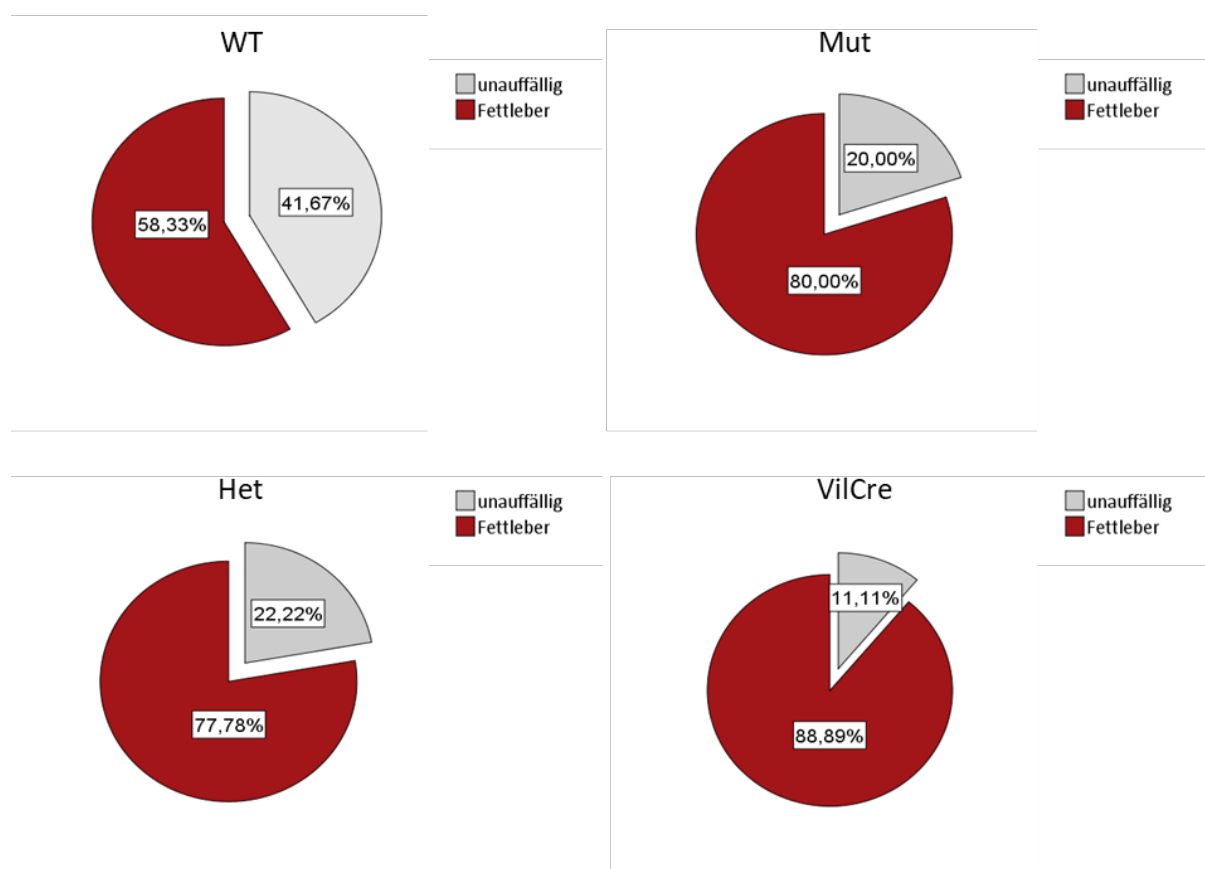


Abbildung 8: Prozentuale Häufigkeit von Fettleber bei WT-, Mut-, Het- und VilCre- Mäusen nach Fütterung einer lithogenen Diät.

Makroskopisch konnten in den Gruppen mit lithogener Diät unterschiedliche Ausprägungen der Gallensteinbildung festgestellt werden. In bis zu 80% der Fälle (Mut) war die Galle klar, jedoch präzipitierten die Gruppen WT und Mut sowohl kleine Steine (<1 mm Durchmesser) unterschiedlicher Anzahl als auch große Steine (>1 mm Durchmesser). In den Gruppen Het und VilCre fanden sich ausschließlich Steine mit einem Durchmesser <1 mm von variabler Anzahl. Den höchsten Anteil an soliden Steinen hatte die Kontrollgruppe mit 42%, gefolgt

von VilCre 22% und Mut (20%). Am seltensten fanden sich solide Steine bei heterozygoten Tieren (11%), jedoch zeigte dieser Genotyp den höchsten Anteil an Mucin/Sludge (22%), der in den anderen Genotypen nur in geringen Ausprägung zu finden war.

4.3.2 Mikroskopische Betrachtung der Lebergalle

Für die mikroskopische Untersuchung wurde die Lebergalle aus den ersten 5 Minuten nach Anlage des Katheters bei Tieren mit lithogener Diät verwendet. Die Einteilung der Mikroskopiebilder erfolgte nach Wang *et al.*⁶⁷ In allen Genotypen konnten typische Cholesterinkristalle mit 79,2° und 100,8° Winkeln nachgewiesen werden. In den Gruppen WT und Mut fanden sich diese bei bis zu 45%, bei VilCre sogar bis zu 65% der untersuchten Tiere. Bei VilCre-Mäusen präzipitieren in ähnlich hohem Anteil (76%) solide Kristalle wie in der Kontrollgruppe.

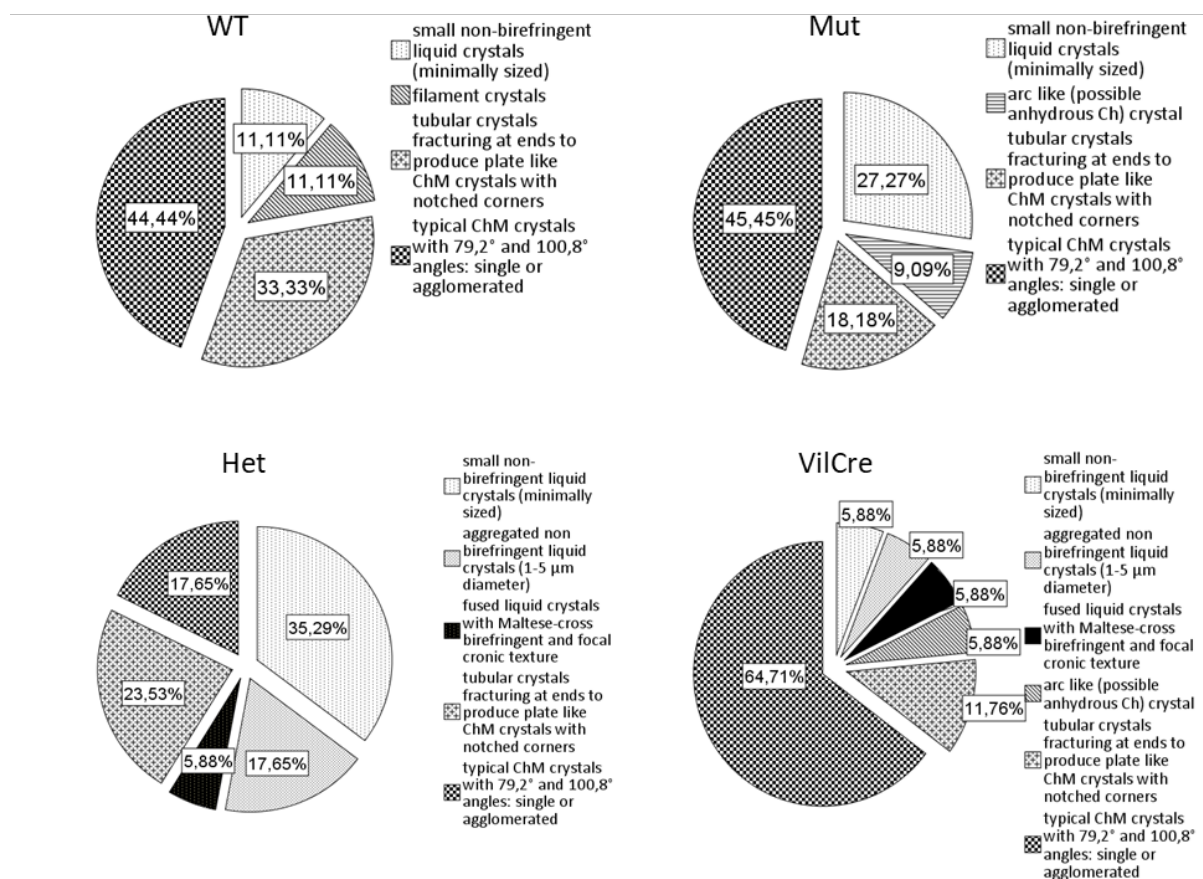


Abbildung 9: Mikroskopische Einteilung der Galle bei Tieren, gefüttert mit lithogener Diät.

Um den Zusammenhang zwischen dem Auftreten und von soliden Gallensteinen und dem mikroskopischen Befund herzustellen, wurden beide Auswertungen innerhalb eines Diagramms (Abb. 10) kombiniert. Es zeigte sich, dass bei allen Genotypen der Befund mit

makroskopisch klarer Galle, jedoch durch Mikroskopie nachweisbaren soliden Kristallen am häufigsten auftrat (29-61%). Interessanterweise waren solide Steinen mit gleichzeitiger Präzipitation von festen Kristallen in der Kontrollgruppe am häufigsten (44%).

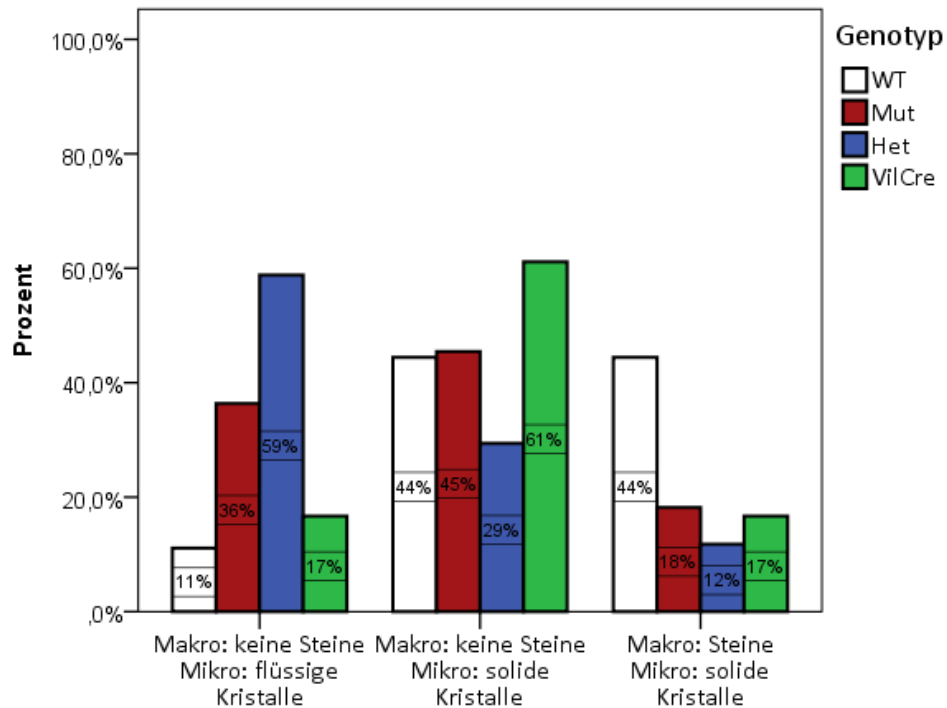


Abbildung 10: Verteilung der Präzipitation von Gallesteinen unter lithogener Diät bei den Genotypen WT, Mut, Het und VilCre.

4.4 Ergebnisse *Abcg8* p.D19H-Varinate

Im Nachfolgenden wurde das Mausmodell mit *Abcg8* p.D19H-Variante in homozygoten (Mut) und heterozygoten (Het) Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT) untersucht.

4.4.1 Gallefluss

Bei Betrachtung der Gruppen mit normaler Diät zeigte der WT einen signifikanten ($p < 0,05$) zeitabhängigen Anstieg des Galleflusses von $354,8 \pm 20,4$ auf $566,0 \pm 49,8$ $\mu\text{l/hr}/100\text{g}$ in der 1. Stunde. Ab der 1. Bis zur 3. Stunde blieb der Gallefluss statistisch unverändert hoch. Im Vergleich zum WT zeigten weder Tiere der Gruppe Mut noch der Gruppe Het Abweichungen in der Höhe und Dynamik des Galleflusses über die ersten drei Stunden.

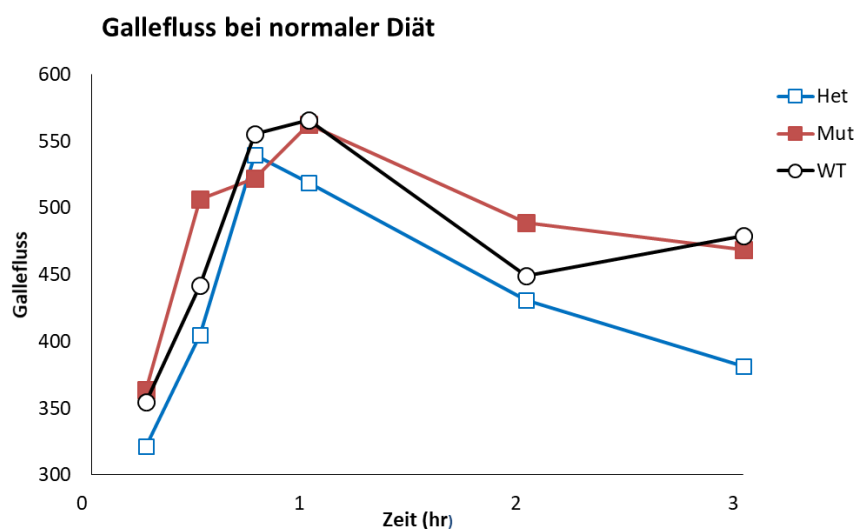


Abbildung 11: Absoluter Gallefluss ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) bei normaler Diät der ersten drei Stunden. Signifikanter Anstieg des Galleflusses über die erste Stunde in allen betrachteten Genotypen.

Bei WT-Tieren unter lithogener Diät kam es zu keiner Veränderung des Galleflusses innerhalb der 1. Stunde. Jedoch konnte ein signifikanter ($p < 0,05$) zeitabhängiger Anstieg des Gallenflusses innerhalb der 1. Stunde sowohl für Mut ($335,3 \pm 33,5 - 581,3 \pm 48,6$ $\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) als auch für Het ($430,1 \pm 48,9$ $\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) nachgewiesen werden.

Im WT blieb der Gallefluss bis zum Ende der 3. Stunde stabil. In der Gruppe Mut fiel der Gallefluss signifikant um 125,7 auf $452,5 \pm 45,9$ $\mu\text{l/hr}/100\text{g}$. Auch in der Gruppe Het kam es zu einer Reduktion um 149,3 auf $470,1 \pm 36,1$ $\mu\text{l/hr}/100\text{g}$.

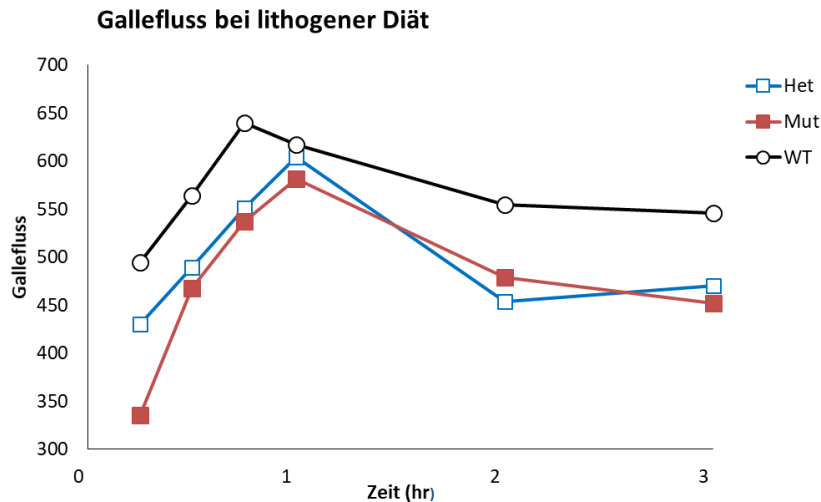


Abbildung 12: Absoluter Gallefluss ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) bei lithogener Diät über die ersten drei Stunden. Signifikanter Anstieg in den Gruppen Mut und Het über die erste Stunde.

Sowohl bei den Tieren mit normaler Diät als auch bei den Tieren mit lithogener Diät konnte kein Einfluss des Geschlechts auf den Gallefluss bis zum Ende der 3. Stunde beobachtet werden. Auch zeigte sich im Vergleich der einzelnen Genotypen untereinander kein Einfluss der lithogenen Diät auf den Gallefluss in den ersten drei Stunden.

4.4.2 Biliäre Lipidzusammensetzung

Die Abbildungen 13 und 14 fassen die Zusammensetzung der biliären Lipide in Mol% sowie die Gesamtlipidkonzentration in g/dl und den daraus berechneten CSI für den Wert der 1. Stunde nach Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes zusammen.

Im WT mit normaler Diät betrug die Gesamtlipidkonzentration (TL) $1,5 \pm 0,1$ g/dl. Es zeigte sich kein Unterschied für die Gruppen Mut ($1,4 \pm 0,1$ g/dl) und Het ($1,4 \pm 0,2$ g/dl). Der Mittelwert des CSI für die 1. Stunde nach Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes für den WT betrug $0,9 \pm 0,1$. Im Vergleich mit den anderen Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) für Mäuse, die die homozygote Variante *Abcg8* p.D19H trugen ($1,4 \pm 0,2$). Für den Het konnte dieser Unterschied zum WT nicht nachgewiesen werden.

Im WT betrug der prozentuale Anteil an der TL für Mol%-Gallensäuren $78,4 \pm 1,5\%$. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zeigten sich im Vergleich hierzu für die Gruppe Het ($70,1 \pm 3,1\%$). Bei der Gruppe Mut konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden.

Im WT betrug der prozentuale Anteil des Cholesterins an der TL $3,4 \pm 0,4\%$. Hierfür zeigte sich bei allen Mäusen mit der *Abcg8*-Variante ein signifikanter Unterschied. Die Mol%-Cholesterin bei Mut waren mit $4,7 \pm 0,4\%$ und bei Het mit $6,5 \pm 1,1\%$ deutlich erhöht.

Die Mol% für das Lecithin betragen im WT $18,2 \pm 1,3\%$ an der Gesamtlipidkonzentration. Keine der untersuchten Genotypen zeigte eine Abweichung von diesem relativen Anteil.

Beim Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen konnte innerhalb der Gruppe mit normaler Diät ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) für die Gesamtlipidkonzentration festgestellt werden. Die weiblichen Tiere zeigten mit einer TL von $1,6 \pm 0,4$ g/dl eine deutlich höhere Konzentration, als die männlichen Tiere mit $1,2 \pm 0,5$ g/dl. Für die Mol% für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin, sowie den CSI zeigte sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied.

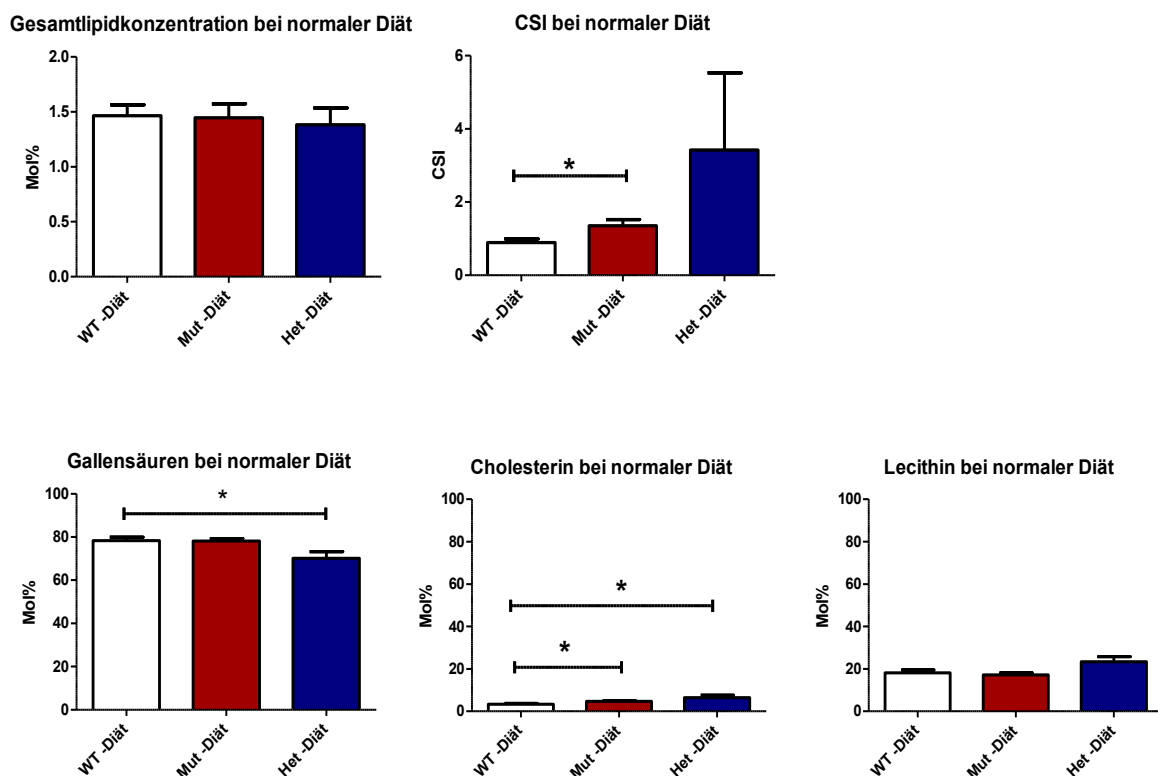


Abbildung 13: Biliäre Lipidzusammensetzung bei normaler Diät.

Bei Fütterung mit lithogener Diät betrug die Gesamtlipidkonzentration (TL) für den WT $3,4 \pm 0,2$ g/dl. Weder die Gruppe Mut ($3,1 \pm 0,2$ g/dl), noch die Gruppe Het ($3,6 \pm 0,3$ g/dl) wich von diesem Wert ab. Der Mittelwert des CSI für die 1. Stunde nach Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes für WT betrug $1,9 \pm 0,2$. Beim Vergleich mit den beiden p.D19H-Varianten bei lithogener Diät zeigte sich kein Unterschied. Im WT betrug der

prozentuale Anteil an der TL für Gallensäuren $58,5 \pm 3,0\%$. Auch hier zeigte sich kein Unterschied für die beiden p.D19H-Varianten.

Im WT betrug der Mol%-Cholesterin $12,9 \pm 1,2\%$. Die Mol%-Cholesterin in den Gruppen Mut ($13,3 \pm 1,2\%$) und Het ($10,9 \pm 1,2\%$) unterschieden sich nicht. Die Mol% für Lecithin betragen im WT $28,7 \pm 2,3\%$. Ein Unterschied konnte für Mut und Het nicht nachgewiesen werden.

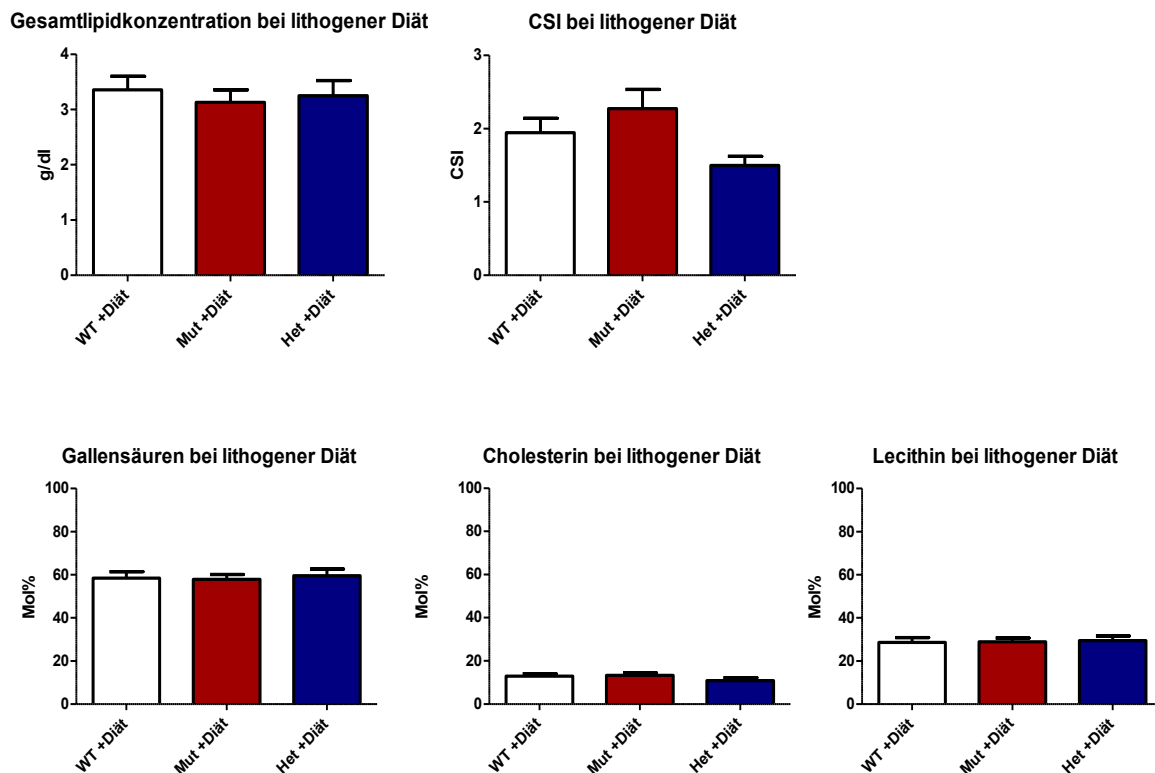


Abbildung 14: Biliäre Lipidzusammensetzung bei lithogener Diät.

Beim Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Mäusen konnte innerhalb der Gruppen mit lithogener Diät ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) für die TL festgestellt werden. Die weiblichen Tiere zeigten mit einer TL von $3,3 \pm 0,2$ g/dl eine höhere Konzentration, als die männlichen Tiere mit $2,7 \pm 0,2$ g/dl. Für die Mol% der Gallensäuren, des Cholesterins und des Lecithins sowie den CSI zeigte sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern.

Somit spiegelt sich dasselbe Bild der geschlechtsspezifischen Verteilung für die normale und lithogene Diät wieder. Hierbei weisen die weiblichen Tiere jeweils die höheren Gesamtlipidkonzentrationen unabhängig von der Diät auf.

Im Vergleich der Gruppen mit normaler Diät gegen die Gruppen mit lithogener Diät konnte ein deutlicher signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den TL der 1. Stunde festgestellt

werden. Die Tiere bei normaler Diät ($1,34 \pm 0,07$ g/dl) wiesen eine deutlich geringere TL als die Tiere bei lithogener Diät ($3,02 \pm 0,12$ g/dl) auf. Auch die Mol% des Cholesterin ($5,7 \pm 0,5\%$ vs. $13,1 \pm 0,7\%$) unterschieden sich signifikant zwischen beiden Diäten.

4.4.3 Regressionsanalyse des Galleflusses

Da der Gallefluss entscheidend von der Sekretion der Gallensäuren abhängig ist, wird diese Beziehung mithilfe einer linearen Regressionsanalyse verdeutlicht⁶⁹. Dabei stellt die Gallensäuren-Sekretionsrate (GS-Sekretion) die unabhängige Variable auf der Abzisse dar, wohingegen der Gallefluss die abhängige Variable auf der Ordinate abgebildet. Der gallensäureabhängige Gallefluss wird durch die Steigung der Geraden definiert. Der gallensäureunabhängige Gallefluss ist als Y-Achsenabschnitt bestimmbar. Für die Regressionsanalyse wurden die Viertelstundenwerte der 1. Stunde, sowie die stündlich erhobenen Werte für die 2.- und die 3. Stunde verwendet. Jedes Tier brachte somit bis zu sechs Datenpunkte in die Regressionsanalyse ein. Jeder Punkt repräsentiert dabei den Gallenfluss und die Gallensäuren-Sekretion einer Probe, die innerhalb der ersten 3 Stunden des Versuches bestimmt wurde.

Die linearen Gleichungen der Regressionsgeraden für den gallensäureabhängigen Gallefluss der analysierten Genotypen bei **normaler Diät** sind:

- WT N=79: $y = 229 (\pm 30) + 22,5 (\pm 2,43)x$ ($R^2=0,53$; $p<0,05$)
- Mut N=92: $y = 315 (\pm 24) + 15,1 (\pm 1,8)x$ ($R^2=0,44$; $p<0,05$)
- Het N=99: $y = 270 (\pm 27) + 24,3 (\pm 3,2)x$ ($R^2=0,40$; $p<0,05$)

Der Gallefluss ist bei Genotyp von der Gallensäuren-Sekretion abhängig ($p<0.05$). Im Vergleich der Steigungen zwischen WT und Mut zeigt sich ein signifikanter ($p = 0,007$) Unterschied und somit ein geringerer gallensäureabhängigen Gallefluss bei Mut ($15,1 \pm 1,8$ $\mu\text{mol/hr/100g}$) als in der Kontrollgruppe ($22,5 \pm 2,4$ $\mu\text{mol/hr/100g}$). Zwischen WT und Het bestand kein Unterschied zwischen den Steigungen und damit auch kein Unterschied des gallensäureabhängigen Galleflusses.

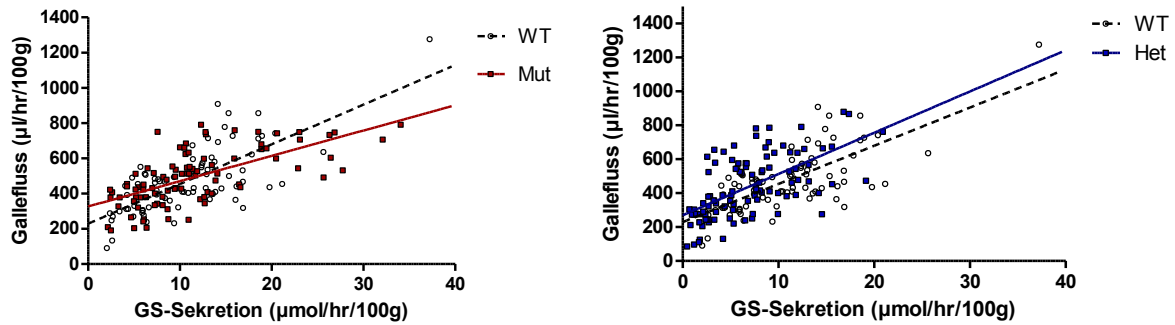


Abbildung 15: Lineare Regression des Galleflusses ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) in Abhängigkeit von der Gallensäuren (GS)-Sekretion ($\mu\text{mol/hr}/100\text{g}$) der ersten drei Stunden bei Fütterung mit normaler Diät.

Der gallensäureunabhängige Gallefluss beträgt in der Kontrollgruppe $229 \pm 30 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$, in Mut-Mäusen $315 \pm 24 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ und in Het-Mäusen $270 \pm 27 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$. Damit zeigte sich sowohl in der homozygoten als auch in der heterozygoten Variante ein deutlicher Unterschied des gallensäureunabhängigen Galleflusses im Vergleich zum WT.

Die linearen Gleichungen der Regressionsgeraden für den gallensäureabhängigen Gallefluss der analysierten Genotypen bei **lithogener Diät** lauten:

- WT N=68: $y = 460,4 (\pm 42,1) + 6,1 (\pm 2,1)x$ ($R^2=0,114$; $p<0,05$)
- Mut N=82: $y = 369,1 (\pm 40,05) + 7,2 (\pm 2,4)x$ ($R^2=0,099$, $p<0,05$)
- Het N=108: $y = 382,3 (\pm 28,05) + 7,1 (\pm 1,4)x$ ($R^2=0,205$; $p<0,05$)

Bei Fütterung mit lithogener Diät blieb der Gallefluss bei allen Genotypen ebenfalls von der Gallensäuren-Sekretion abhängig ($p<0,05$). Es zeigte sich, dass weder die Steigung der Mut- noch der Het-Mäuse sich der Kontrollgruppe unterschieden und so der gallensäureabhängige Gallefluss in allen Gruppen gleich war.

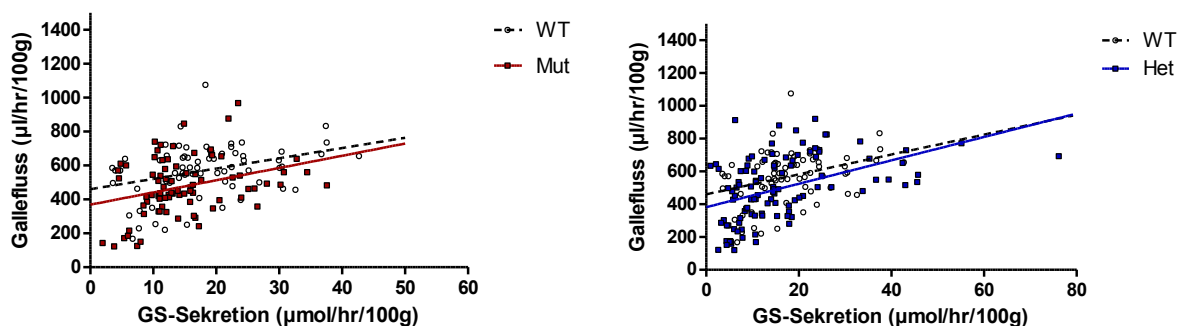


Abbildung 16: Lineare Regression des Galleflusses ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) in Abhängigkeit der Gallensäuren (GS)-Sekretion ($\mu\text{mol/hr}/100\text{g}$) der ersten drei Stunden bei Fütterung mit lithogener Diät.

Bei der Betrachtung der Y-Achsenabschnitte und damit auch des gallensäureunabhängigen Gallflusses, ergab sich für beide p.D19H-Varianten ein signifikanter Unterschied zum WT. Der gallensäureunabhängige Gallefluss des WT betrug $460 \pm 42 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$, im Mut $369 \pm 40 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ ($p = 0,006$) und bei Het $382 \pm 28 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ ($p = 0,02$).

4.4.4 Biliäre Outputraten für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin

Im Folgenden wurden die biliären Lipid-Outputraten der 1. Stunde verglichen. Der WT wies bei normaler Diät eine Outputrate von $124,6 \pm 18,7 \mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Gallensäuren, $4,8 \pm 0,8 \mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Cholesterin und $27,7 \pm 3,7 \mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Lecithin auf. Weder für Mut noch Het konnte ein Unterschied in den Lipid-Outputraten für Gallensäuren, Cholesterin oder Lecithin nachgewiesen werden.

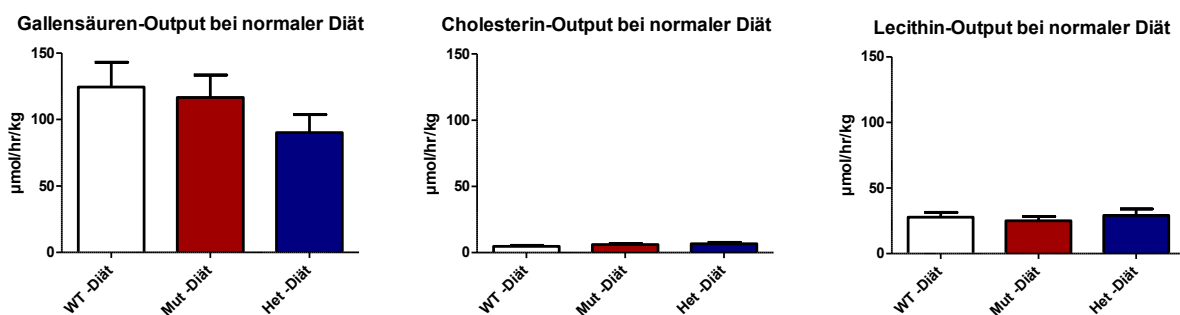


Abbildung 17: Biliäre Outputraten in $\mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin zum Zeitpunkt der 1. Stunde bei normaler Diät.

Bei lithogener Diät konnte im WT eine Outputrate von $202,9 \pm 20,9 \mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Gallensäuren, $43,3 \pm 4,7 \mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Cholesterin und $95,5 \pm 8,1 \mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Lecithin nachgewiesen werden. Hier zeigte sich kein Unterschied in den Lipid-Outputraten von Mut und Het.

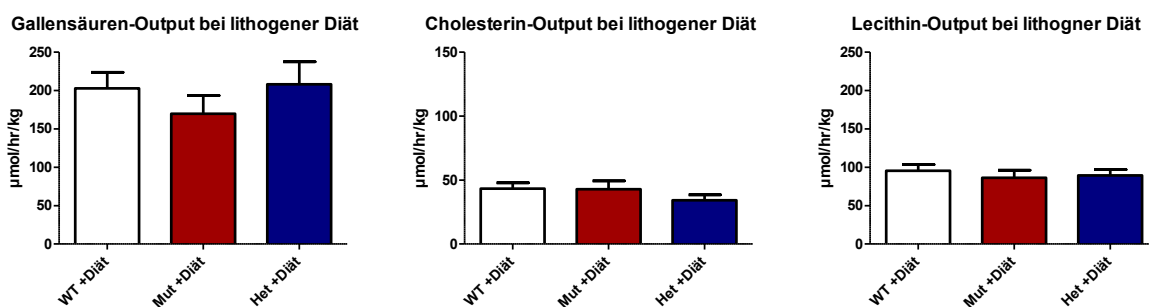


Abbildung 18: Biliäre Outputraten in $\mu\text{mol/hr}/\text{kg}$ für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin zum Zeitpunkt der 1. Stunde bei lithogener Diät.

Bei Betrachtung der Lipid-Outputraten in den einzelnen Genotypen bei normaler vs. lithogener Diät konnten folgende Unterschiede festgestellt werden: Im WT unterschieden sich sowohl die Gallensäuren-Outputrate ($124,6 \pm 18,7$ vs. $202,9 \pm 20,9$ $\mu\text{mol/hr/kg}$), die Cholesterin-Outputrate ($4,8 \pm 0,8$ vs. $43,3 \pm 4,6$ $\mu\text{mol/hr/kg}$) und die Lecithin-Outputrate ($27,7 \pm 3,7$ vs. $95,5 \pm 8,3$ $\mu\text{mol/hr/kg}$) zwischen beiden Diätmodellen signifikant ($p < 0,05$). Die Gruppe Mut und Het zeigten im Vergleich der beiden Diätmodelle die gleichen Charakteristika wie der WT. Bei lithogener Diät konnten jeweils signifikant ($p < 0,05$) höhere Lipid-Outputraten festgestellt werden.

4.4.5 Regressionsanalyse der Cholesterinsekretion

Um die Abhängigkeit zwischen der Cholesterin-Sekretion (Ch-Sekretion) und der Gallensäuren-Sekretion (GS-Sekretion) zu untersuchen, wurden lineare Regressionsanalysen für die einzelnen Genotypen mit unterschiedlicher Fütterung durchgeführt⁶⁹. Dabei stellt die Gallensäuren-Sekretion die unabhängige Variable auf der Abzisse dar. Die Cholesterin-Sekretion wird als abhängige Variable auf der Ordinate aufgetragen.

Die Gleichungen der Regressionsgeraden für die Cholesterin-Sekretion für die verschiedenen Genotypen bei **normaler Diät** lauten:

- WT N=79: $y = 0,15 (\pm 0,07) + 0,03 (\pm 0,006)x$ ($R^2=0,268$, $p < 0,05$)
- Mut N=92: $y = 0,29 (\pm 0,07) + 0,03 (\pm 0,005)x$ ($R^2=0,272$, $p < 0,05$)
- Het N=99: $y = 0,45 (\pm 0,08) + 0,02 (\pm 0,01)x$ ($R^2=0,059$, $p < 0,05$)

In allen Gruppen war die Cholesterin-Sekretion signifikant ($p < 0,05$) abhängig von der Gallensäuren-Sekretion. Die Steigung unterschied sich sowohl für Mut und Het vom WT nicht ($p > 0,05$). Interessanterweise zeigte sich, dass der Ordinatenabschnitt der Cholesterinsekretion für beide p.D19H-Varianten signifikant gegenüber dem WT unterschied: Sowohl bei Mut mit $0,29 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/hr/100g}$ ($p = 0,026$) als auch bei Het mit $0,45 \pm 0,08$ $\mu\text{mol/hr/100g}$ ($p = 0,0003$) war er höher als im WT.

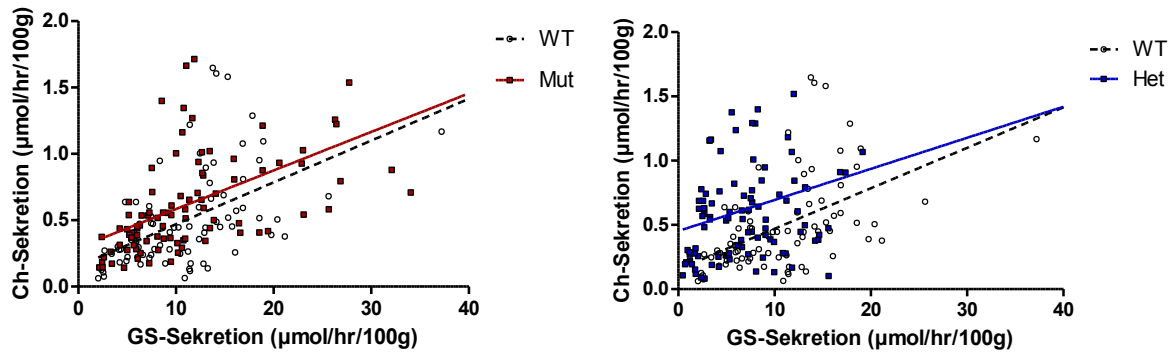


Abbildung 19: Lineare Regression der Cholesterin (Ch)-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren (GS)-Sekretion der ersten drei Stunden bei Fütterung mit normaler Diät.

Die Gleichungen der Regressionsgeraden für die Cholesterin-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren-Sekretion für die verschiedenen Genotypen bei **lithogener Diät** lauten:

- WT N=68: $y = 3,88 (\pm 0,55) + 0,03 (\pm 0,03)x$ ($R^2=0,023$; $p>0,05$)
- Mut N=82: $y = 1,51 (\pm 0,51) + 0,16 (\pm 0,03)x$ ($R^2=0,248$; $p<0,05$)
- Het N=105: $y = 2,88 (\pm 0,42) + 0,05 (\pm 0,02)x$ ($R^2=0,059$; $p<0,05$)

Im WT konnte kein Zusammenhang zwischen der Gallensäuren-Sekretion und der Cholesterin-Sekretion nachgewiesen werden. Für Mut und Het konnte dieser Zusammenhang weiterhin gezeigt werden ($p<0,05$).

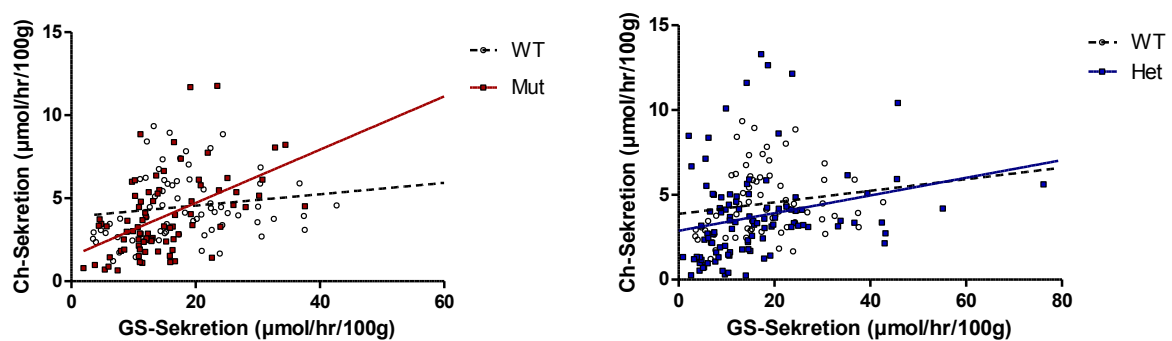


Abbildung 20: Lineare Regression der Cholesterin-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren-Sekretion der ersten drei Stunden bei Fütterung mit lithogener Diät.

4.4.6 Regressionsanalyse der Lecithin-Sekretion

Die Abhängigkeit zwischen Gallensäuren-Sekretion (GS-Sekretion) und Lecithin-Sekretion (Lec-Sekretion) wurde als „Curvilinear“ beschrieben. Die mathematische Gleichung dieser Abhängigkeit entspricht einer rechteckigen Hyperbel (Bindungsisotherme/

Sättigungsbindungskurve)^{69 70}. B_{max} gibt dabei die maximale Anzahl an Bindungsstellen an und K_d ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante, die das Vorliegen des Substrats bezüglich des dissoziierten oder undissoziierten Zustands bei halbmaximaler Sättigung des Transporters beschreibt. $y = \frac{B_{max} * x}{K_d + x}$

Hier stellt die Gallensäuren-Sekretion ebenfalls die unabhängige Variable der Abzisse dar, wohingegen die Lecithin-Sekretion auf der Ordinate als abhängige Variable geführt wird.

Die Gleichungen der Sättigungsbindungskurven für die Genotypen bei **normaler Diät** lauten:

- WT N = 79: $y = \frac{11,19 * x}{31,58 + x}$ ($R^2 = 0,525$; $K_d: p < 0,05$)
- Mut N = 91: $y = \frac{8,13 * x}{21,21 + x}$ ($R^2 = 0,523$; $K_d: p < 0,05$)
- Het N = 99: $y = \frac{5,17 * x}{6,04 + x}$ ($R^2 = 0,288$; $K_d: p < 0,05$)

Da in allen Gleichungen K_d ein $p < 0,05$ aufzeigt, muss angenommen werden, dass die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante relevant ist und sich zudem bei den verschiedenen Genotypen unterscheidet. Zusätzlich zeigt sich, dass B_{max} variiert und somit eine unterschiedliche Anzahl an Bindungsstellen vorhanden ist.

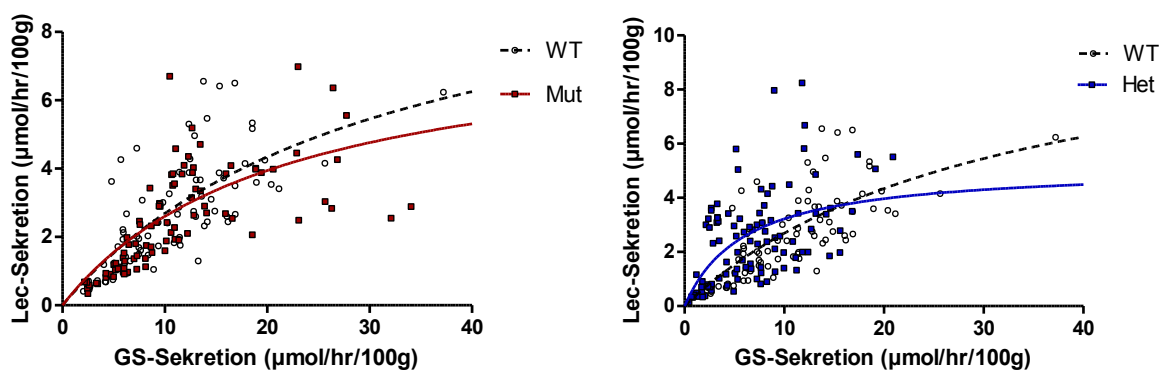


Abbildung 21: Sättigungsbindungskurve der Lecithin (Lec)-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren (GS)-Sekretion der ersten drei Stunden bei normaler Diät.

Die Gleichungen für die Sättigungsbindungskurven für die Genotypen bei **lithogener Diät** lauten:

- WT N=67: $y = \frac{12,24 * x}{4,41 + x}$ ($R^2 = 0,137$; $K_d: p < 0,05$)
- Mut N=81: $y = \frac{18,90 * x}{19,74 + x}$ ($R^2 = 0,244$; $K_d: p < 0,05$)
- Het N= 104: $y = \frac{14,00 * x}{9,89 + x}$ ($R^2 = 0,267$; $K_d: p < 0,05$)

Auch bei lithogener Diät zeigt sich, dass die Gleichgewichtskonstante K_d bei allen Genotypen nicht limitiert ist und somit jeden Wert annehmen kann ($p < 0,05$).

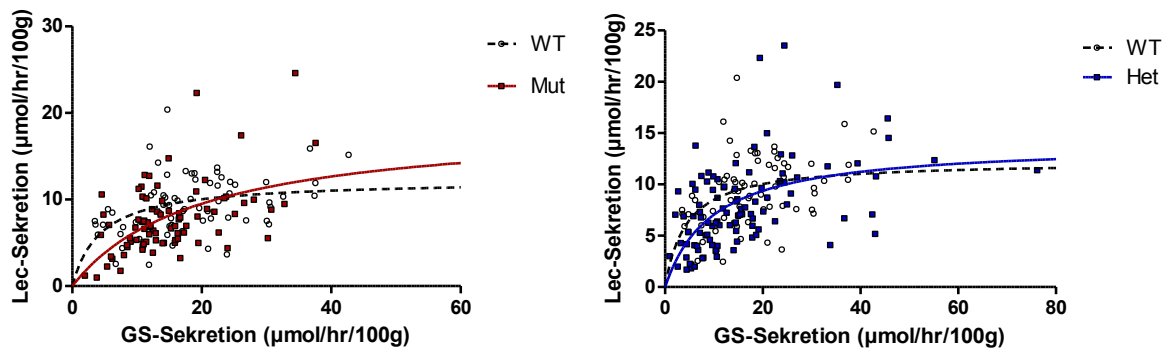


Abbildung 22: Sättigungsbindungskurve der Lecithin (Lec)-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren (GS)-Sekretion der ersten drei Stunden bei lithogener Diät.

4.5 Ergebnisse des *Abcg5/g8*- gewebespezifischen Knock-out im Darm

Im Nachfolgenden wurde das Mausmodell mit dem *Abcg5/g8*-gewebespezifischen Knock-out im Darm (VilCre) mit der Kontrollgruppe (WT) bei normaler und lithogener Diät verglichen.

4.5.1 Gallefluss

Bei Betrachtung der Gruppen mit normaler Diät zeigte der VilCre einen signifikanten ($p < 0,05$) zeitabhängigen Anstieg des Galleflusses von $385,7 \pm 25,1$ auf $637,8 \pm 65,6 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ in der ersten Stunde. Bis zur dritten Stunde blieb der Gallefluss auf stabil hohem Niveau. Im Vergleich zum WT zeigte sich keine Auswirkung des Knock-outs auf den Gallefluss.

Dasselbe Bild zeigte sich für VilCre mit lithogener Provokationsdiät. Es kam zu einem Anstieg ($p < 0,05$) des Galleflusses innerhalb der ersten Stunde von $403,7 \pm 31,9$ auf $517,7 \pm 49,8 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$. Ein Anstieg oder Abfall konnte über die erste Stunde hinaus nicht festgestellt werden. Im Vergleich zum WT unterschied sich die Höhe des Galleflusses bei den VilCre-Mäusen nicht. Weder das Geschlecht noch die lithogene Diät hatten eine Auswirkung auf den Gallefluss der Knock-out VilCre-Mäuse.

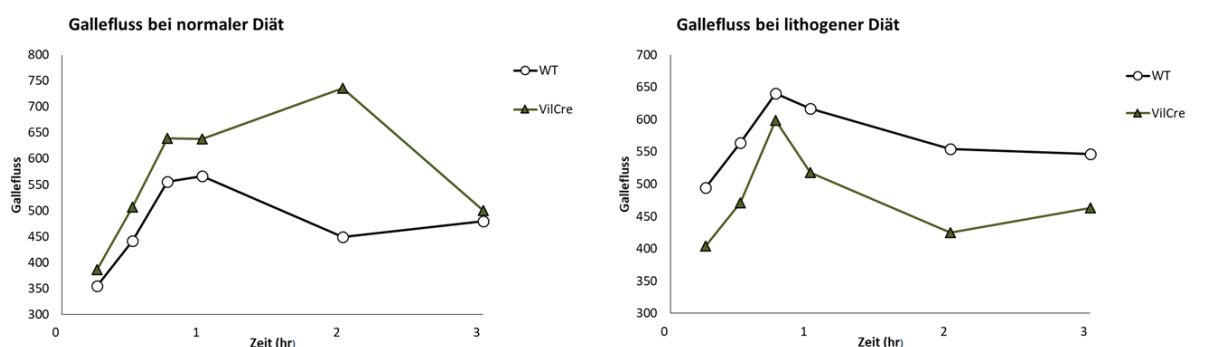


Abbildung 23: Gallefluss bei normaler und lithogener Diät des WT und des VilCre. Betrachtet wurde der Verlauf über die ersten drei Stunden nach Anlage der akuten Gallefistel.

4.5.2 Biliäre Lipidzusammensetzung

Die Abbildung 24 und 25 fassen die biliären Lipidzusammensetzungen in Mol% sowie die Gesamtlipidkonzentration (TL) in g/dl und den daraus berechneten CSI für den Wert der 1. Stunde nach Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes zusammen. Bei Fütterung mit normaler Diät zeigte sich ein signifikanter Unterschied der TL zwischen VilCre und WT ($1,1 \pm 0,1$ vs. $1,5 \pm 0,1$ g/dl). An der TL nahmen die Mol% der Gallensäuren $69,5 \pm 3,3\%$ ein und waren damit in der VilCre-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) niedriger als im WT ($78,4 \pm 1,5\%$). Die Mol% des Cholesterins betrug $8,1 \pm 1,0\%$ an der TL und war signifikant ($p < 0,05$) erhöht gegenüber des WT ($3,4 \pm 0,4\%$). Die Mol% des Lecithins waren $22,4 \pm 2,5\%$ und damit

unverändert gegenüber dem WT ($18,2 \pm 1,3\%$). Damit zeigte sich für den CSI mit einem Wert von $2,1 \pm 0,3$ ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied gegenüber im WT mit $0,9 \pm 0,1$.

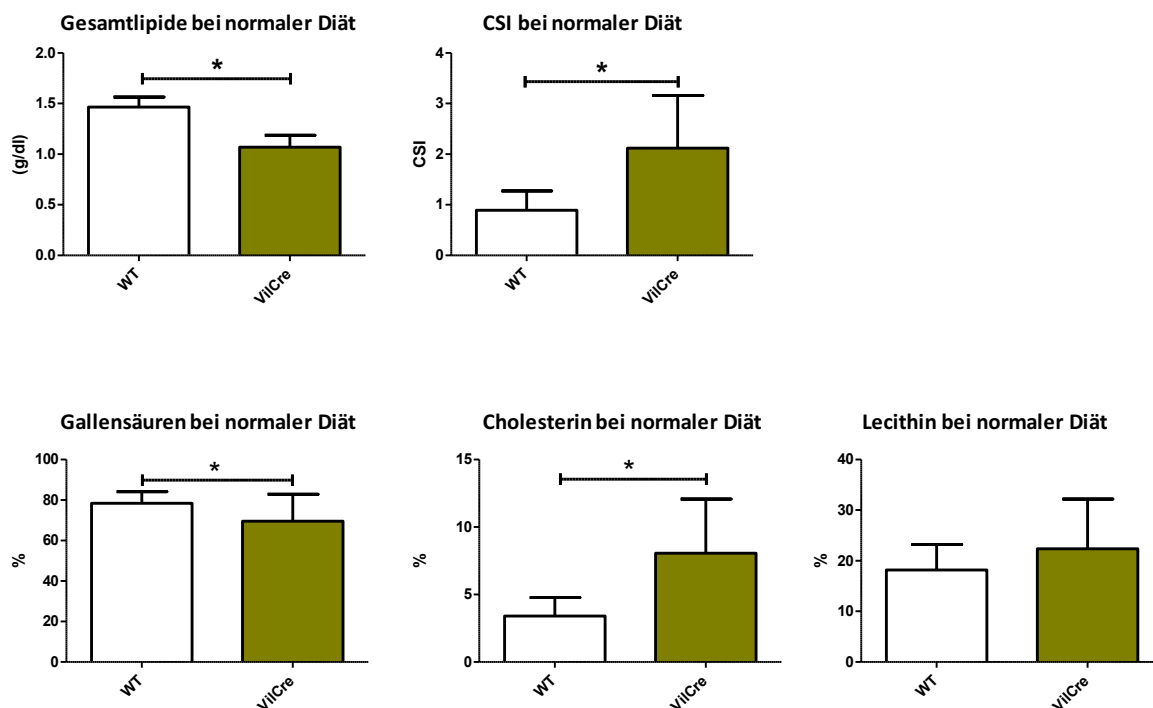


Abbildung 24: Biliäre Lipidzusammensetzung von WT und VilCre bei normaler Diät.

Bei Fütterung mit lithogener Diät konnte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der TL zwischen VilCre und WT festgestellt werden ($2,4 \pm 0,1$ vs. $3,6 \pm 0,2$ g/dl). Die Mol% der Gallensäuren der VilCre betrug $48,7 \pm 2,3\%$ und war signifikant ($p < 0,05$) niedriger als im WT ($58,5 \pm 3,0\%$). Die Mol% des Cholesterins der VilCre nahmen $15,3 \pm 1,9\%$ an der TL ein und waren mit denen des WT ($12,9 \pm 1,2\%$) vergleichbar. Dafür zeigte sich eine signifikante Erhöhung ($p < 0,05$) der Mol% Lecithin ($36,0 \pm 1,3\%$) gegenüber der Kontrollgruppe mit $28,7 \pm 2,3\%$. Der Mittelwert des CSI für die erste Stunde nach Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufes für den WT betrug $1,9 \pm 0,2$. Der CSI der Tiere des VilCre war mit $2,4 \pm 0,8$ signifikant ($p < 0,05$) erhöht.

Im Vergleich des VilCre mit normaler Diät gegenüber der Gruppe mit lithogener Diät konnte ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den TL der 1. Stunde festgestellt werden. Die Tiere bei normaler Diät wiesen eine deutlich geringere TL ($1,1 \pm 0,1$ g/dl) als die Tiere unter lithogener Diät ($2,4 \pm 0,1$ g/dl) auf. Sowohl für Mol% Gallensäuren als auch für Cholesterin und Lecithin bestanden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen beiden Diäten. Beim CSI

der Tiere mit normaler Fütterung ($2,1 \pm 0,3$) und mit lithogener Diät ($2,4 \pm 0,8$) war dagegen kein Unterschied zu sehen.

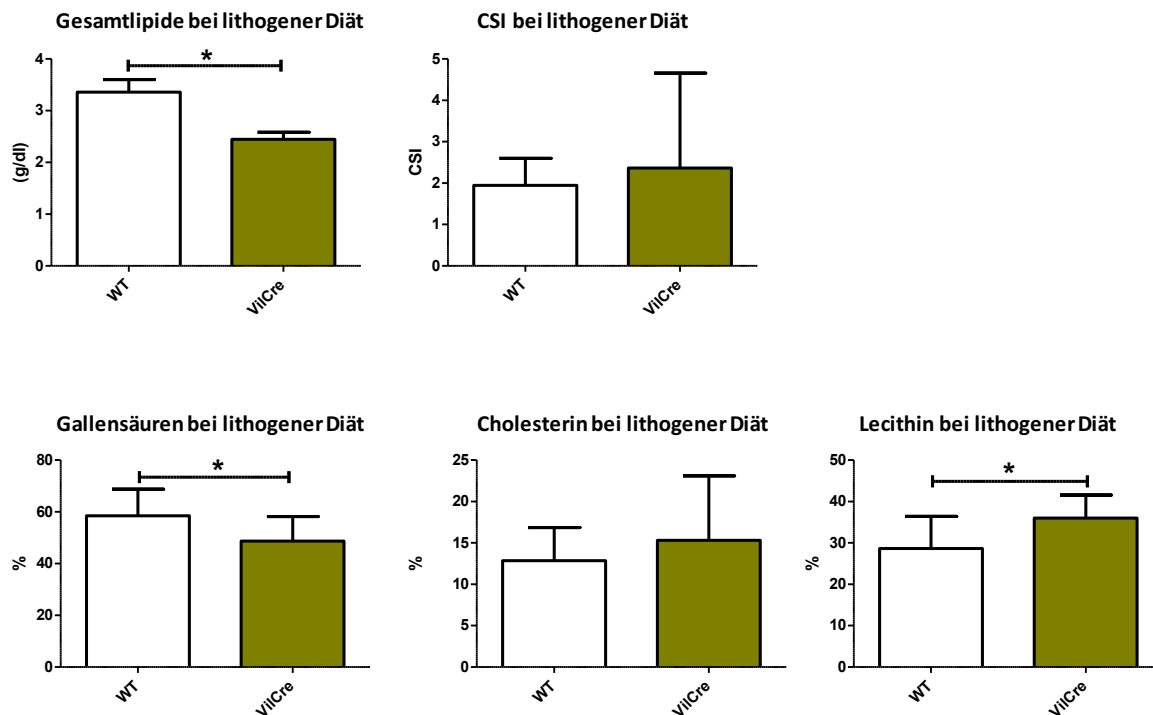


Abbildung 25: Biliäre Lipidzusammensetzungen des WT und VilCre bei lithogener Diät.

4.5.3 Regressionsanalyse des Galleflusses

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Gallensäuren-Sekretion wurde bereits in Kapitel 4.4.3 beschrieben. Die linearen Gleichungen der Regressionsgeraden für den gallensäureabhängigen Gallefluss des WT und des VilCre bei **normaler Diät** sind:

- WT N=79: $y = 229,0 (\pm 30,2) + 22,5 (\pm 2,4)x$ ($R^2=0,53$; $p<0,05$)
- VilCre N=92: $y = 424,0 (\pm 70,9) + 20,5 (\pm 8,5)x$ ($R^2=0,061$; $p<0,01$)

Damit zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuren-Sekretion ($p<0,05$) in beiden Gruppen. Der gallensäureabhängige Gallefluss (durch die Steigung der beiden Geraden verdeutlicht) war in beiden Gruppen identisch ($p>0,05$). Der gallensäureunabhängige Gallefluss betrug für VilCre $424 \pm 71 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ und für die Kontrollgruppe $229 \pm 30 \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ und zeigte damit einen signifikanten ($p = 0,0002$) Unterschied.

Die linearen Gleichungen der Regressionsgeraden für den galle Säureabhängigen Gallefluss der Kontrollgruppe und des Knock-out VilCre bei **lithogener Diät** lauten:

- WT N=72: $y = 460,4 (\pm 42,0) + 6,1 (\pm 2,1)x$ ($R^2=0,114$; $p<0,05$)
- VilCre N=98: $y = 345,4 (\pm 52,1) + 14,8 (\pm 4,9)x$ ($R^2=0,087$; $p<0,05$)

Somit bestand auch bei lithogener Diät eine signifikante Abhängigkeit zwischen dem Gallefluss und der Gallensäuren-Sekretion in beiden Gruppen. Jedoch konnte weder für die Steigung noch für den y-Achsenabschnitt, und damit den galle Säureabhängigen- und den galle Säureunabhängigen Gallefluss, ein Unterschied festgestellt werden.

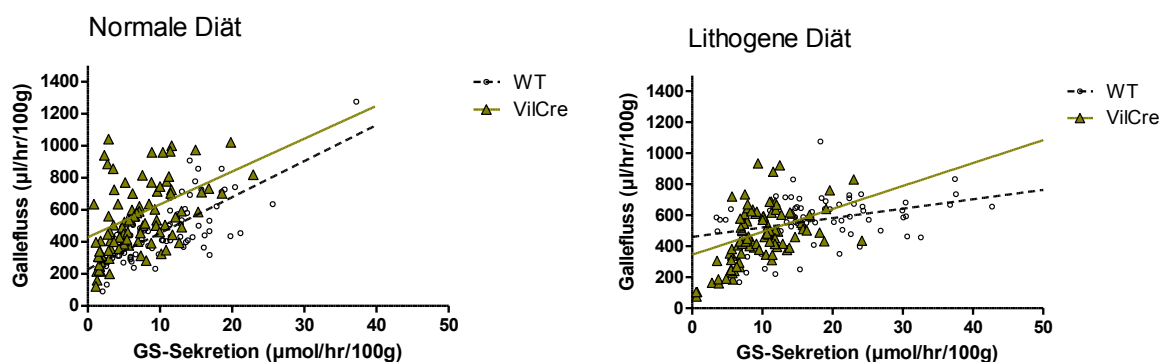


Abbildung 26: Lineare Regression des Galleflusses ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) in Abhängigkeit von der Gallensäuren-Sekretion der ersten drei Stunden für WT und VilCre bei normaler und lithogener Diät.

4.5.4 Biliäre Outputraten für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin

Die Höhe der einzelnen Lipidkomponenten der 1. Stunde werden zwischen dem WT und der VilCre-Gruppe verglichen. Bei normaler Diät zeigte VilCre eine Outputrate (1. Stunde) von $84,3 \pm 13,2 \mu\text{mol/hr/kg}$ für Gallensäuren, $9,4 \pm 2,0 \mu\text{mol/hr/kg}$ für Cholesterin und $25,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/hr/kg}$ für Lecithin. Es konnten keine Unterschiede zum WT festgestellt werden.

Bei lithogener Diät konnte im VilCre eine Outputrate von $103,5 \pm 11,6 \mu\text{mol/hr/kg}$ für Gallensäuren, $32,7 \pm 5,9 \mu\text{mol/hr/kg}$ für Cholesterin und $72,7 \pm 6,6 \mu\text{mol/hr/kg}$ für Lecithin festgestellt werden. Die Gallensäuren-Outputrate war signifikant ($p<0,05$) niedriger als im WT ($202,9 \pm 20,8 \mu\text{mol/hr/kg}$). Ebenso war die Lecithin-Outputrate signifikant ($p<0,05$) niedriger als im WT ($95,5 \pm 8,1 \mu\text{mol/hr/kg}$). Lediglich die Cholesterin-Outputrate zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

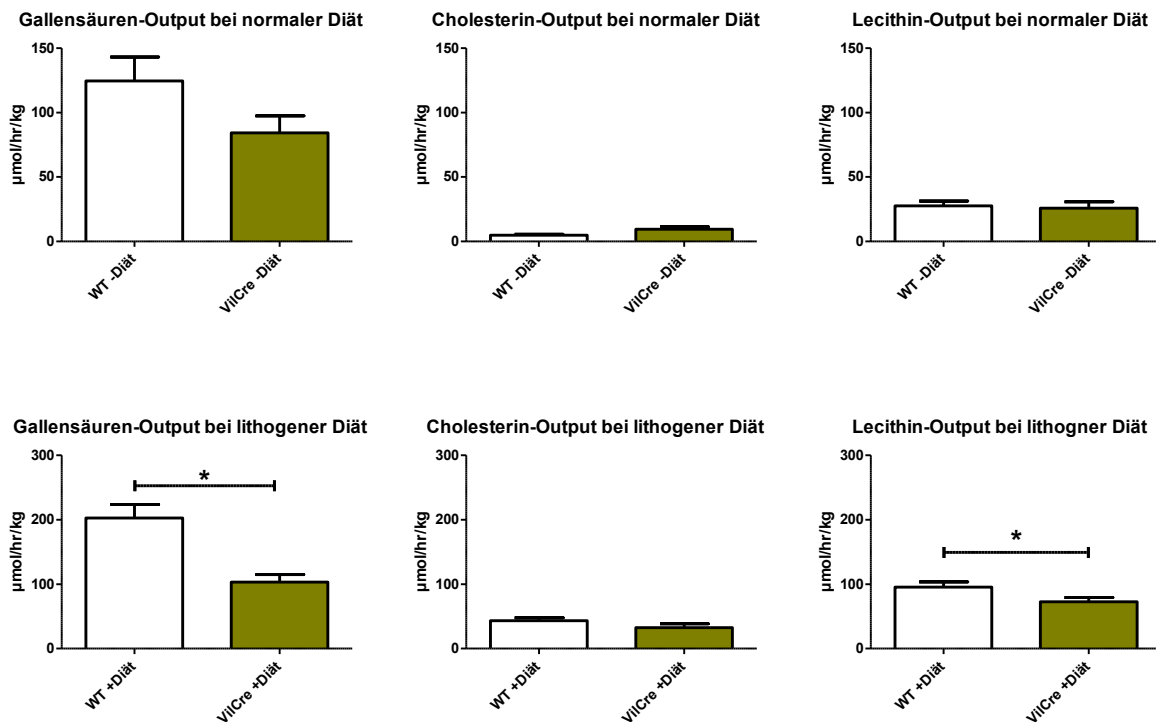


Abbildung 27: Biliäre Outputraten in $\mu\text{mol/hr/kg}$ für Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin zum Zeitpunkt der 1. Stunde für WT und VilCre bei normaler und lithogener Diät.

Die Analyse innerhalb der VilCre-Tiere zeigte, dass es unter lithogener Diät zu einer signifikant ($p < 0,05$) erhöhten Cholesterin-Outputrate ($32,7 \pm 5,9$ vs. $9,4 \pm 2,0 \mu\text{mol/hr/kg}$) kam. Ebenso war die Lecithin-Outputrate mit $72,7 \pm 6,6 \mu\text{mol/hr/kg}$ bei lithogener Diät signifikant höher als bei normaler Diät ($25,8 \pm 5,1 \mu\text{mol/hr/kg}$), wohingegen sich die Gallensäuren - Outputraten nicht unterschieden.

4.5.5 Regressionsanalyse der Cholesterin-Sekretion

Um die Anhängigkeit zwischen der Cholesterin-Sekretion (Ch-Sekretion) und der Gallensäuren-Sekretion (GS-Sekretion) zu untersuchen wurden lineare Regressionsanalysen für VilCre und WT mit unterschiedlicher Fütterung durchgeführt⁶⁹ (vgl. Kapitel 4.4.5).

Die Gleichungen der Regressionsgeraden für die Cholesterin-Sekretion für die verschiedenen Genotypen bei **normaler Diät** lauten:

- WT N=79: $y = 0,15 (\pm 0,07) + 0,03 (\pm 0,006)x$ ($R^2=0,269$, $p < 0,05$)
- VilCre N= 92: $y = 0,30 (\pm 0,10) + 0,07 (\pm 0,001)x$ ($R^2=0,199$, $p < 0,05$)

Es zeigte sich, dass sowohl die Steigung ($0,03 \pm 0,006$ vs. $0,07 \pm 0,001$) zwischen WT und VilCre signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich war, als auch der y-Achsenabschnitt ($0,15 \pm 0,07$ vs. $0,30 \pm 0,10$) signifikant variierte ($p < 0,05$).

Die Gleichungen der Regressionsgeraden für die Cholesterin-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren-Sekretion für die verschiedenen Genotypen bei **lithogener Diät** lauten:

- WT N=68: $y = 3,88 (\pm 0,55) + 0,03 (\pm 0,03)x$ ($R^2=0,023$; $p > 0,05$)
- VilCre N=98: $y = 2,20 (\pm 0,66) + 0,12 (\pm 0,06)x$ ($R^2=0,038$; $p > 0,05$)

Weder für den WT noch für die VilCre-Gruppe konnte eine Abhängigkeit zwischen der Cholesterin- und der Gallensäuren-Sekretion festgestellt werden.

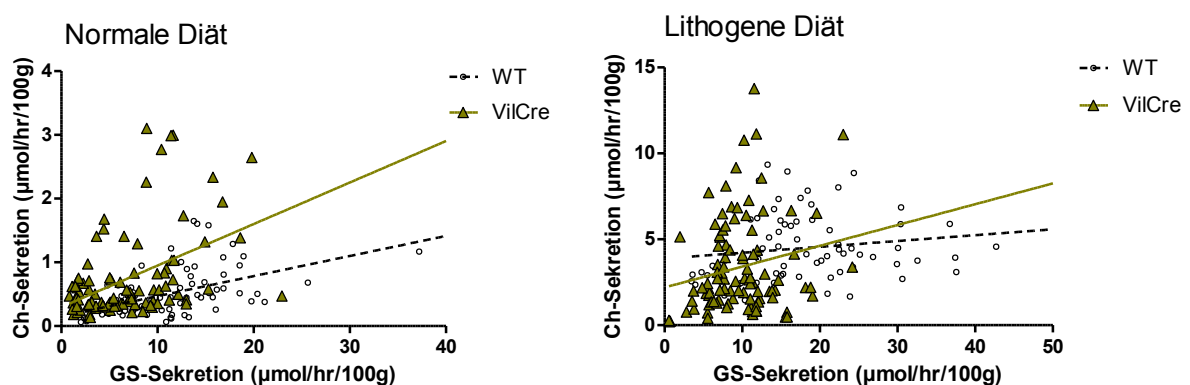


Abbildung 28: Lineare Regression der Cholesterin (Ch)-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren (GS)-Sekretion der ersten drei Stunden von WT und VilCre bei normaler und lithogener Diät.

4.5.6 Regressionsanalyse der Lecithin-Sekretion

Die Abhängigkeit zwischen Gallensäuren-Sekretion (GS-Sekretion) und Lecithin-Sekretion (Lec-Sekretion) wurde bereits in Kapitel 4.4.6 beschrieben.

Die Gleichungen der Sättigungsbindungskurven für die Genotypen bei **normaler Diät** lauten:

- WT N = 79: $y = \frac{11,19 \cdot x}{31,58 + x}$ ($R^2 = 0,525$; $K_d: p < 0,05$)
- VilCre N = 92: $y = \frac{6,48 \cdot x}{12,60 + x}$ ($R^2 = 0,293$; $K_d: p < 0,05$)

Da in beiden Gleichungen K_d ein $p < 0,05$ aufzeigt, beeinflusst die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante die Lecithin-Sekretion. Es zeigen sich zudem unterschiedliche Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_d) für den WT und die VilCre-Gruppe. Auch für die

Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} kann angenommen werden, dass diese im WT in höherer Anzahl vorhanden sind als in der VilCre- Gruppe.

Die Gleichungen der Sättigungsbindungskurve für die beiden Genotypen bei **lithogener Diät** lauten:

○ WT N = 67: $y = \frac{12,24 * x}{4,41 + x}$ ($R^2 = 0,137$; K_d : $p < 0,05$)

○ Mut N = 98: $y = \frac{9,01 * x}{2,54 + x}$ ($R^2 = 0,168$; K_d : $p < 0,05$)

Bei lithogener Diät besteht ebenfalls eine höhere Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_d) für den WT als für die VilCre-Gruppe. Auch bei der maximalen Anzahl der Bindungsstellen weist der WT einen höheren Wert als die VilCre-Gruppe auf.

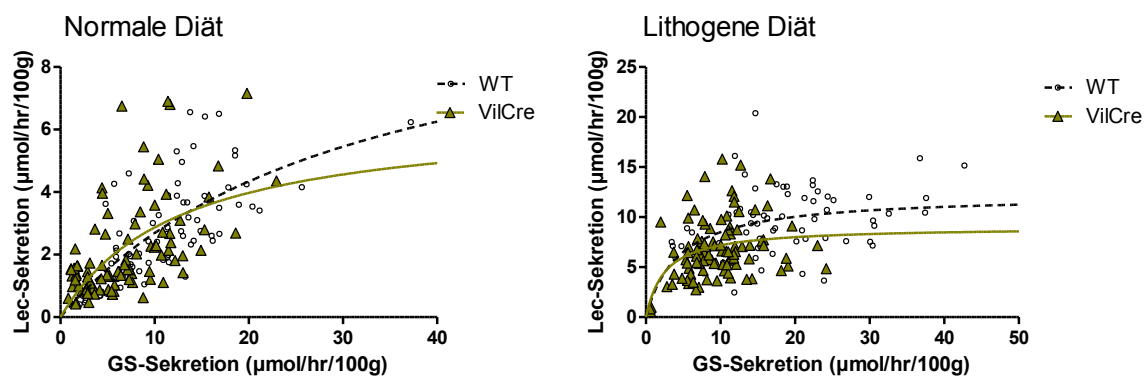


Abbildung 29: Sättigungsbindungskurve der Lecithin (Lec)-Sekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuren (GS)-Sekretion in den ersten drei Stunden von WT und VilCre bei normaler und lithogener Diät.

5 Diskussion

Cholesteringallensteine stellen ein weltweites gesundheitliches Problem dar, das durch multiple interagierende genetische und äußerliche Faktoren bedingt wird. Die Pathogenese des Gallensteinleidens stellt sich als komplexe Interaktion dar, bei der Veränderungen der Cholesterin- Phospholipid- und Gallensäuresekretion, Kristallisations- und Nukleationsprozesse, die Beeinträchtigung der intestinalen Gallenblasenmotilität und eine veränderte Mucinsekretion in der Gallenblase eine Rolle spielen. Vor allem das Wissen um die molekulargenetische Pathogenese hat sich in den letzten Jahrzehnten entscheidend erweitert. Über die Beschreibung von exogenen Risikofaktoren und diätischen Ursachen hinaus beschäftigten sich viele Analysen mit der Identifizierung potenzieller Kandidatengene, die zu einem Ungleichgewicht der biliären Lipidkomponenten führen. Epidemiologische Studien zeigten sowohl geographische als auch epidemiologische Unterschiede in der Gallensteinprävalenz, für die sowohl Nahrungsangebot und Ernährungsgewohnheiten, als auch der genetische Pool verantwortlich sein können.

Der Zusammenhang zwischen lithogenen (*Lith*) Genloci und der Gallesteinbildung wurde in einer Reihe von Quantitative Trait Locus (QTL)-Analysen im Mausmodell aufgezeigt^{16 67 32}. Um diese Ergebnisse in experimentellen Kreuzungen gallensteinsuszeptibler und –mutierter Inzuchtmauslinien in humanen Populationen zu überprüfen, bediente man sich großer genomweiter Assoziationsstudien (GWAS). Die erste GWAS für Gallensteine zeigte eine hochsignifikante Assoziation mit der p.D19H-Variante von *ABCG8*⁵¹. Weltweit wurde diese Variante durch weitere GWAS des hepatobiliären Cholesterintransporters als häufigster genetischer Risikofaktor für die Gallensteinentstehung bestätigt.

Tabelle 14: Studien zur Rolle von *ABCG8* p.D19H

Referenz	Jahr	Population	N	Odds Ratio	Risikoallelfrequenz
Buch <i>et al.</i> ⁵¹	2007	Deutschland	1832	2.2, 7.1	5.0%
		Chile	167	1.9	7.0%
Grünhage <i>et al.</i> ⁵²	2007	Rumänien	178	3.0	8.5%
Kuo <i>et al.</i> ⁷¹	2008	China	74	3.5	1.4%
Katsika <i>et al.</i> ³⁰	2010	Schweden	341	2.5	6.8%
Siddapuram <i>et al.</i> ⁷²	2010	Indien	226	2.3	8.2%
Stender <i>et al.</i> ⁷³	2010	Dänemark	3124	1.9, 3.3	6.4%

Xu <i>et al.</i> ⁷⁴	2011	China	429	2.3	6.5%
Renner <i>et al.</i> ⁷⁵	2013	Deutschland	168	2.9	6.9%

Über 5% der Europäer tragen die p.D19H-Mutation des *ABCG8*-Gens. Eine Studie bei adipösen Frauen über 60 Jahren zeigte auf, dass homozygote Trägerinnen des p.D19H-Risikoallels ein absolutes 10-Jahresrisiko von 13% für die Entwicklung symptomatischer Gallensteine aufweisen. Im Vergleich dazu hatten Nichtträgerinnen bei gleichem BMI nur ein 10-Jahresrisiko 2-4%⁷³. Hepatische Sekretion, intestinale Aufnahme und fäkale Cholesterinausscheidung beeinflussen die Cholesterinbiosynthese. Da der Körper keine Pflanzensterole synthetisieren kann, nutzt man diesen Zustand zur Erforschung der durch die p.D19H-Variante hervorgerufenen Funktionsveränderungen des intestinal und hepatisch exprimierten Cholesterintransporters, aus. Pflanzensterole werden über den NPC1L1-Transporter in den Enterozyten aufgenommen und über ABCG5/G8 wieder in den Darm sezerniert. Somit geben die Pflanzensterolkonzentrationen (v.a. Sitosterol und Campesterol) einen indirekten Einblick auf die Nettocholesterinabsorption im Darm, wohingegen der Cholesterinvorläufer Lathosterol im Serum einen indirekten Hinweis auf die *de novo* Synthese gibt. *In vivo* Studien bei Gallensteinpatienten zeigten eine verringerte Konzentrationen von Pflanzensterolen im Serum, was auf eine erhöhte intestinale Elimination durch den luminalen ABCG8-Transporter schließen lässt⁵³. Zusätzlich fand man erhöhte Cholesterinvorläuferkonzentrationen im Serum, die auf eine erhöhte Cholesterin *de novo*-Synthese und Sekretionsrate durch die p.D19H-Variante von *ABCG8* in der Leber hinweisen^{76 53}. Kampen *et al.* zeigte mittels [³H]-Cholesterinexport-Assays *in vitro*, dass die p.D19H-Variante zu einer erhöhten Transporteraktivität führt⁷⁷. Daher, könnte die *ABCG8* p.D19H- Variante eine „Gain of function“-Mutation darstellen, die zu einer erhöhten Cholesterin-Clearance und damit zu einem vermehrten Auftreten von Cholesterinsteinen durch Übersättigung der hepatischen Galle führt. Im Einklang mit dieser Hypothese steht die Erkenntnis, dass dieser Genotyp durch die verringerte Cholesterinkonzentrationen im Serum einen Schutz gegen die Entwicklung von Arteriosklerose bieten und mit einem verringerten Risiko zum Auftreten von ischämischen Gefäßerkrankungen (IVD) einhergehen könnte^{78 79 80}. *ABCG8* p.D19H nimmt also eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Cholelithiasis ein und, obwohl viele indirekte Nachweise über die Funktionsveränderung durch p.D19H erbracht wurden, steht der direkte Nachweis *in vivo* durch Veränderung der Cholesterinsekretionsraten und der Lipidzusammensetzung der Galle über die Zeit, die die

Überfunktion des ABCG5/G8- Transporters hinreichend bestätigen, aus. Um diese Lücke zu schließen, wurde ein neues Versuchsmodell entwickelt, in dem p.D19H-transgene Mäuse (homozygot und heterozygot) und Wildtypkontrollen miteinander verglichen wurden. Des Weiteren sollte durch einen gewebspezifischen Knock-out die Funktion des ABCG5/G8-Transporters im Darm untersucht werden. Um den Effekt einer lithogenen Diät, wie sie in Industrie- und Schwellenländern üblich ist, nachzubilden, wurde zusätzlich eine weitere Versuchsreihe mit hochkalorischer Fütterung charakterisiert.

Abcg8 p.D19H verursacht eine höhere Cholesterinsättigung der Galle

Es zeigte sich, dass die p.D19H-Variante keine Auswirkung auf das Körpergewicht, das Lebergewicht und das relative Lebergewicht sowohl bei normaler als auch lithogener Diät hat. Wie jedoch zu erwarten war, hatten die Tiere mit lithogener Fütterung in allen Genotypen ein höheres Körper- und Lebergewicht. Auch zeigten diese Tiere einen höheren Anteil an Fettleber und vermehrt Gallensteine. Es ist fraglos, dass eine enge Assoziation zwischen einer hochkalorischen Ernährung, Fettleibigkeit und der Entwicklung einer Fettleber und Gallensteinen besteht⁸¹⁻⁸³. Jedoch kann durch den Aufbau der Studie keine Aussage darüber getroffen werden, ob die p.D19H-Variante bei einer lithogenen Diät diese Entwicklung beschleunigt. Dafür wäre ein Versuchsaufbau mit unterschiedlichen Fütterungsperioden und -mengen notwendig.

Für die Gewinnung der Galleproben, die Messung der molaren Lipidkonzentrationen und der Bestimmung der Sekretionsdaten wurde das Versuchsmodell der akuten Gallefistel gewählt. Die Konsequenz des operativen Vorgehens ist die vollständige Unterbindung der enterohepatischen Gallensäurezirkulation⁶⁷, sodass für den weiteren gallensäureabhängigen Gallefluss nur die bereits im Körper zirkulierenden bzw. durch *de novo* Synthese entstehenden Gallensäuren zur Verfügung stehen.

Nach einer anfänglichen Erhöhung des absoluten Galleflusses ($\mu\text{l/hr}/100\text{g}$) in der ersten Stunde blieb dieser für mindestens weitere drei Stunden auf hohem Niveau bei allen Mäusen stabil, unabhängig von Geschlecht, Genotyp oder Diät. In anderen Mausmodellen, die mit einer ähnlichen Methode untersucht wurden, zeigte sich diesbezüglich bereits ein Abfall oder ein Stagnieren auf gleichem Niveau über die Zeit^{67,84,85}. Jedoch variiert der methodische Ansatz bezüglich Operationsmethode, Untersuchungsintervall oder durchgeführten Interventionen. Eine Aussage, inwieweit die Katheterisierung über die Gallenblase Einfluss auf den absoluten Gallefluss hat, bleibt zu klären. Aufgrund dessen

wurden zur Analyse der Lipidkomponenten die Proben der 1. Stunde analysiert, in der ein stabiler Gallefluss vorhanden war.

Es zeigte sich, dass im Vergleich mit den Wildtypmäusen sowohl homozygote als auch heterozygote Träger der p.D19H-Variante eine erhöhte Cholesterinsättigung der Galle bei normaler Diät aufweisen. Unverändert dazu bleiben jedoch die Gallensäuren- und Lecithinkonzentrationen der Galle. Diese Konstellation führt zu einem erhöhten CSI bei p.D19H-transgenen Mäusen. Hobbs *et al.*⁴⁶ zeigte 2002 bei transgenen Mäusen, die *Abcg5/g8* überexprimierten, vergleichbare Lipidkonstellationen in der Gallenblasengalle. Die Überexpression des Transporters führt zu fünffach erhöhte Cholesterin- aber unveränderten Gallensäuren- und Lecithinkonzentrationen in der Gallenblase. Expressionsanalysen (unveröffentlichte Daten C.Rebholz, S. Weber, F. Lammert) zeigen, dass sich die Expression von *Abcg5/g8* in Leber und Darm bei p.D19H- transgenen Mäusen nicht gegenüber dem Wildtyp unterscheidet. Diesbezüglich belegen die hier vorgestellte Ergebnisse der Cholesterinübersättigung und die erhöhten CSI-Werte in der hepatischen Galle die Funktionsveränderung des ABCG5/G8-Transporters durch das Einbringen der Mutation.

Bei der Zufuhr von lithogener Nahrung zeigten sich wie erwartet höhere Gesamtlipidkonzentrationen in allen Linien, die sich jedoch in ihrer prozentualen Zusammensetzung von Gallensäuren, Cholesterin und Lecithin deutlich gegenüber der mit normaler Diät gefütterten Tiere unterschieden. Mit steigendem prozentualen Anteil des Cholesterins kam es zu einem Abfall der Gallensäuren. Zusätzlich nahm der CSI in allen Mäusen zu und war bei transgenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen höher. Jedoch konnte der bei normaler Diät gezeigte Unterschied in der Cholesterinsättigung jetzt nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Beobachtung zeigt, dass die lithogene Diät als Umweltfaktor zumindest in großem Maße die genetischen Unterschiede zwischen den Linien „überschreiben“ kann. Inwieweit der lithogene Phänotyp und die genetische Veranlagung zur Bildung von Gallensteinen bereits in der Kindheit vorhanden sind und die Ernährung eine untergeordnete Rolle spielen, untersuchte eine Follow-up Studie von Nissinen *et al.*⁸⁶ Die Studie analysierte Cholesterinvorläuferkonzentrationen im Serum bei Kindern und Jugendlichen, die 1980 in Finnland in ein Register eingebunden worden waren. Im Vergleich zu Probanden ohne Gallensteine in der gleichen Kohorte zeigte sich, dass diejenigen, die bis zur Nachuntersuchung Gallensteine entwickelt hatten, niedrigere Pflanzensterol- und Cholestanolkonzentrationen im Serum bereits in der Kindheit aufwiesen. Zusätzlich wurden

höhere Quotienten von Cholesterinvorläufern zu Pflanzensterolen dedektiert, was darauf hinweisen könnte, dass mehr Cholesterin synthetisiert und weniger Cholesterin auf Darmniveau absorbiert wird. In Regressionsanalysen waren Serummarker der Cholesterinabsorption und eine cholesterinreichen Ernährung im Erwachsenenalter mit einem erhöhten Gallensteinrisiko verbunden.

Abcg8 p.D19H fördert die hepatische Cholesterinsekretion

Die kanalikuläre Gallebildung wird in zwei Komponenten eingeteilt: Auf der einen Seite steht der gallensäurenabhängige Gallefluss. Auf der anderen Seite der gallensäureunabhängige Gallefluss. Die Regressionsanalysen bestätigen, dass der Gallefluss von der Gallensäurensekretion in allen Linien abhängt und dass der gallensäureunabhängige Gallefluss bei normal gefütterten p.D19H-transgenen Mäusen höher ist als im Wildtyp. Daher wäre eine kompensatorische Adaptation des gallensäureunabhängigen Galleflusses zur gesteigerten Cholesterinsekretion im Hepatozyten denkbar. Studien von Wang *et al.*⁶⁷ zeigten, dass Inzuchtmauslinien für *Lith*-Gene vergleichsweise höhere gallensäureunabhängige Gallenflüsse aufweisen als die Kontrollgruppe.

In Übereinstimmung mit der erhöhten Cholesterinsättigung bei normaler Diät sind die biliären Cholesterin-Sekretionsraten bei den p.D19H-transgenen Mäusen gesteigert. Dies lässt sich sowohl in der homozygoten als auch in der heterozygoten Variante durch die höhere Ausgangssekretion (gallensäureunabhängige Cholesterin-Sekretion) im Regressionsmodell nachweisen. Eine Modellierung der Sättigungskinetik zeigt zusätzlich eine kleinere Gleichgewichts-Dissoziationskonstante bei halber Maximalsättigung des Cholesterintransporters in den p.D19H-tragenden Varianten. Somit liegt Cholesterin vermehrt in der undissoziierten Form vor, was für einen schnelleren Transport über ABCG5/G8 spricht (unveröffentlichte Daten C.Rebholz, S.Weber, F.Lammert). Im Gegensatz dazu zeigt die Regressionsanalyse der Lecithin-Sekretion keinen Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Dies untermauert, dass die p.D19H-tragende Variante primär zu einer erhöhten Cholesterinsekretion in die Galle führt.

An dieser Stelle ist die Funktion der HMG-CoA-Reduktase, des geschwindigkeitslimitierenden Enzyms der Cholesterin *de novo* Synthese in der Leber zu beachten⁸⁷. Vorausgegangene Studien beschreiben, dass die p.D19H-Variante mit einer gesteigerte Synthese von Cholesterin in der Leber einhergeht^{53,88}. Es gibt jedoch auch kontroverse Daten einer älteren Studie aus Japan, die eine verringerte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase bei

Gallensteinträgern feststellte⁸⁹. Weiterführende Analysen der hier untersuchten transgenen Mauslinien bei normaler Diät zeigen, dass die Expression der HMG-CoA-Reduktase in der Leber gegenüber den Kontrollen unverändert bleibt (unveröffentlichte Daten C.Rebholz, S.Weber, F.Lammert). Daher bedarf es weiterer Untersuchungen des Gallensäurenmetabolismus. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Gallensäurenbiosynthese ist die Cholesterin-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) der Leber. Der Gehalt an Gallensäuren im enterohepatischen Kreislauf wird durch den intestinalen Rezeptor FXR bestimmt, der die Expression des Transkriptionsfaktors FGF-15 (Maus) bzw. FGF-19 (Mensch) reguliert. Dieser steuert die Aktivität der CYP7A1 und schlussendlich die *de novo* Synthese von Gallensäuren in der Leber über negative Rückkopplung^{90,91}. In *Abcg5/g8* Knock-out Mäusen wurde eine höhere mRNA-Expression von *CYP7A1* beobachtet⁴³. Die Bestimmung der mRNA-Expression von *CYP7A1* in der Leber und FGF-15 im Darm sind deshalb Ziele zukünftiger Untersuchungen.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Cholesterinhomöostase ist das Zusammenspiel der in ihrer Funktion gegenseitig aufgestellten Transporter ABCG5/G8 und NPC1L1. NPC1L1 übernimmt dabei die Aufgabe der intestinalen und hepatobiliären Cholesterinabsorption⁹². Studien zeigen, dass genetische Varianten von *NPC1L1* mit einer "Loss-of-function"-Mutation assoziiert sind, was zu einer geringeren intestinalen Cholesterinabsorption mit Veränderungen des LDL-Plasmaspiegels im Serum führt. Derselbe Effekt wird durch Ezetimib erreicht, ein Medikament, das zu einer Hemmung von NPC1L1 führt. NPC1L1 ist jedoch möglicherweise auch für die Absorption von überschüssigem Cholesterin aus der Galle verantwortlich. In einer kürzlich durchgeführten Studie von Wu *et al.*⁹³ in einer chinesischen Population wurde bei symptomatischen Gallensteinträgern im Vergleich zu Patienten ohne Gallensteine vermehrt ein Polymorphismus von *NPC1L1* g-1679C>G (rs2072183) nachgewiesen. Darüber hinaus wurde dies mit einer niedrigeren hepatischen *NPC1L1*-mRNA-Expression und höheren biliären Cholesterinkonzentrationen und CSI-Werten assoziiert. In einer Follow-up Studie aus Dänemark⁸⁰ bei 67.385 Personen der Allgemeinbevölkerung wurde publiziert, dass genetische Varianten von *NPC1L1* mit verminderten LDL-Cholesterinspiegel im Plasma assoziiert sind, was einen Schutz vor ischämischen Gefäßerkrankungen darstellt. Jedoch scheint die Hemmung von NPC1L1 nicht nur zu einer verminderten Cholesterinabsorption im Darm, sondern auch zu einer verminderten Cholesterinabsorption aus der Galle zu führen, was wiederum das Risiko für die

symptomatische Gallensteinerkrankung erhöht. Diese Assoziation wurde noch stärker, wenn Varianten von *NPC1L1* und *ABCG8* zu einem Phänotyp kombiniert wurden. Somit können anscheinend sowohl die „Gain of function“ von *ABCG8*, als auch die „Loss of function“ von *NPC1L1* die Cholesterinsättigung der Galle und dadurch das Risiko zur Präzipitation von Gallensteinen erhöhen.

Abbildung 30 fasst die Erkenntnisse der vorgelegten Studie und Ergebnisse aus anderen Arbeitsgruppen zusammen und zeigt die vermuteten Auswirkungen der „Gain of function“ Mutation von *ABCG8*. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die p.D19H-Variante durch ihre gesteigerte Transporter-Substrat-Umsetzung zu einer gesteigerten Sekretionsrate von Cholesterin in die Galle führt und eine erhöhte Cholesterinsättigung der Galle zur Folge hat. Die Funktionssteigerung von *ABCG5/G8* im Darm wurde in dieser Versuchsreihe nicht untersucht.

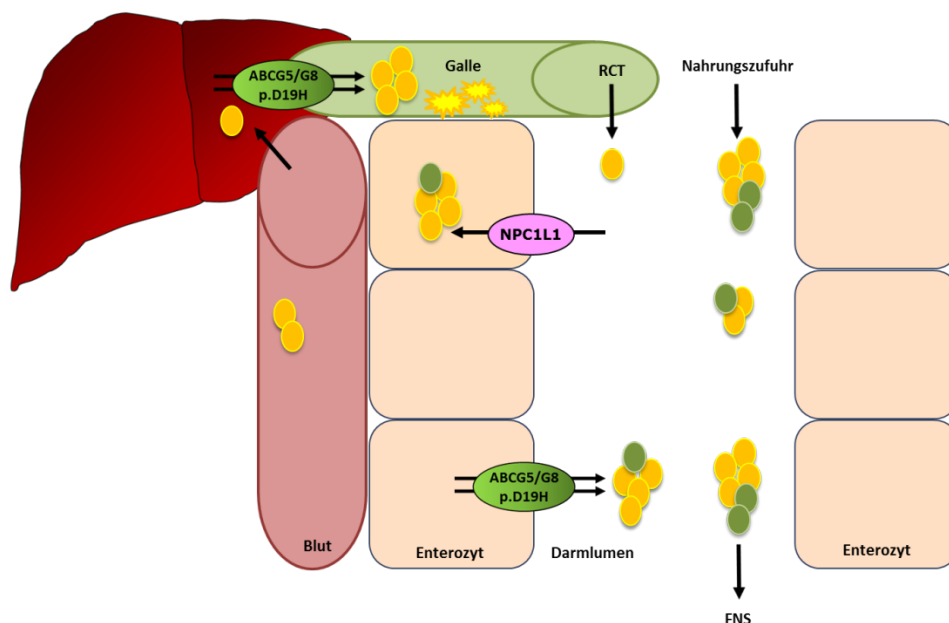


Abbildung 30: Konzept zur Auswirkung von *Abcg5/g8* p.D19H mit Steigerung der Cholesterinsekretion in die Galle und Exkretionssteigerung in den Darm.

Klassischerweise umfasst der Reverse-Cholesterin-Transport (RCT) den Transport von überschüssigem Cholesterin aus Körperzellen zurück zur Leber, weiter über die hepatobiliäre Sekretion in die Galle, um schlussendlich über den Fäzes eliminiert werden zu können. Dabei steht die Leber im Zentrum des Stoffwechselprozesses. Jedoch nehmen Studien der letzten Jahrzehnte auch immer mehr das enge Zusammenspiel zwischen Darm und Leber in

den Fokus. Cholesterin(re)absorption und –exkretion stellen dabei Schlüsselmechanismen dar. Ein viel diskutierter sekundärer reverser transintestinaler Cholesterintransport vom Blut über den Enterozyt in das Darmlumen (im Englischen transintestinal cholesterol excretion = TICE) stellt dabei ein Modell zur nicht biliären Exkretion dar⁹⁴. Kürzlich deckten Jakulj *et al.*⁹⁵ dabei auf, dass über die transintestinale Cholesterinexkretion und die anschließende fäkale Cholesterinausscheidung bis zu 35% der Gesamtcholesterinhomöostase reguliert wird. Des Weiteren scheint eine Inhibition von NPC1L1 durch Ezetimib diese Art der Elimination über ABCG5/G8 noch weiter steigern zu können. Die molekularen und zellulären Mechanismen, die die Rolle der TICE bei der Regulierung der RCT erklären könnten, sind jedoch weiter unklar. Auch ist nicht bekannt, wie die Cholesterinmoleküle vom extrahepatischen Geweben über das Blut zum Darm transportiert werden und wie Cholesterin in den Enterozyten von der basolateralen Membran zur apikalen Membran übertragen wird, um durch ABCG5/G8-vermittelten Efflux ins Darmlumen zu gelangen. Voneinander unabhängige Studien zeigen, dass sowohl *ABCG8* p.D19H^{53,88} als auch die Überexpression von NPC1L1 im Darm⁹⁶ bzw. die Minderexpression in der Leber⁹⁷ mit einem erhöhten Risiko zur Gallensteinentstehung assoziiert sind. Inwieweit der ABCG5/G8-Transporter im Darm Auswirkungen auf die Cholesterinsättigung der Galle hat wurde im Mausmodell des gewebsspezifischen Knock-outs von *Abcg5/g8* im Darm (*VilCre*) untersucht. Die aufgestellte Hypothese war, dass durch das Fehlen von ABCG5/G8 die Cholesterinexkretion verringert wird und dadurch vermehrt Cholesterin über den enterohepatischen Kreislauf in die Galle gelangt.

Der darmspezifische Knock out von *Abcg5/g8* führt zu einer erhöhten Cholesterinsättigung der Galle bei verminderter Gesamtlipidkonzentration

Es zeigte sich, dass der darmspezifische Knock-out von *Abcg5/g8* keine Auswirkung auf das Körpergewicht und das Lebergewicht bei normaler Diät hat. Bei lithogener Diät nehmen jedoch das Lebergewicht und das relative Lebergewicht zu. Passend dazu findet sich bei diesen Tieren eine makroskopische Fettleber. Obwohl Dikkers *et al.*⁹⁸ in ihren Mausmodellen ausschließlich den Knock out von *Abcg5* untersuchten zeigten sich auch hier höhere Werte für das relative Lebergewicht. Ein komplettes Fehlen von *Abcg5/g8*, wie es Yu *et al.*⁴³ untersuchten, verdeutlicht die Bedeutung der Cholesterinelimination über den Darm. Dies führt zu drastisch verminderten Cholesterinkonzentrationen in der Galle und gleichzeitig erhöhten Serumcholesterin- und Pflanzensterolwerten und so zur Sitosterolämie^{43,99}. Durch den in dieser Studie untersuchten gewebsspezifischen Knock out von *Abcg5/g8* im Darm

besteht jedoch weiterhin die Möglichkeit der Cholesterinelimination aus der Leber via RCT. Bei Messung der Lipidkonzentrationen aus den Proben der ersten Stunde konnte eine verminderte Gesamtlipidkonzentration in der Galle der VilCre-Tiere festgestellt werden, wohingegen die Cholesterinsättigung und der CSI-Wert ansteigen. Die dargestellten Ergebnisse rechtfertigen die Annahme, dass die Übersättigung der Galle mit Cholesterin und der Anstieg des CSI direkte Auswirkungen des Knock-outs sind. Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der transintestinalen Cholesterinexkretion hin. Interessanterweise fallen mit der Cholesterinübersättigung der Galle die Gesamtlipid- bzw. Gallensäurenkonzentration. Daher wäre es aufschlussreich, die mRNA-Expression von *CYP71a* in der Leber oder die Expression von *Fgf-15* im Darm zu untersuchen. Des Weiteren könnte eine Messung der HMG-CoA-Reduktase Auskunft über die Cholesterinsynthese geben, da diese in *Abcg5/g8* Knock out Mäusen vermindert war⁴³.

Der darmspezifische Knock out von *Abcg5/g8* führt zu einem gesteigerten Gallefluss und einer erhöhten Cholesterinsekretion bei vermindertem absoluten Output von Gallensäuren in die Galle

Sowohl bei normaler Diät als auch bei lithogener Diät besteht eine Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion. Trotz vergleichsweise zum Wildtyp verringertem Gallensäure-Output in der ersten Stunde findet sich ein höherer gallensäureabhängiger- und unabhängiger Gallefluss bei VilCre. Diese Daten zur Gallesekretion bei darmspezifischem Knock out von *Abcg5/g8* liegen in der Literatur bisher nicht vor. Passend zu den erhöhten CSI-Werten konnte bei normaler Diät eine gesteigerte Cholesterinsekretion festgestellt werden. Somit scheint die Leber das durch die unterbundene Exkretion im Darm anfallende Cholesterin über die Galle zu eliminieren. Da bei Knock out *Abcg5/g8* diese Möglichkeit nicht gegeben ist, kehrt das Cholesterin zur Leber zurück^{43 100}. Die Fütterung mit lithogener Diät führte dazu, dass diese Unterschiede nicht mehr nachweisbar sind.

Ausblick: Entwicklung und klinische Anwendbarkeit

Die vorliegende Studie ist die erste *in vivo* Untersuchung der Lipidsekretionsraten bei *Abcg8* p.D19H transgenen Mäusen und die erste Studie überhaupt zur Auswirkung des gewebsspezifischen Knock out von *Abcg5/g8* im Darm auf die Cholesterinsekretion der Leber.

Die in dieser Studie vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die genetische Variante *Abcg5/g8* p.D19H direkten Einfluss auf die Funktion des ABCG5/G8-Transporters nimmt und durch eine gesteigerte Cholesterinsekretion eine Übersättigung der Galle mit Cholesterin zur Folge hat. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den genomweiten Studien, die p.D19H als Risikogen für Gallensteine identifiziert haben. Da das feine Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Faktoren das Gleichgewicht der Gallebildung und die Cholesterinhomöostase bestimmt, ist ein molekularer Therapieansatz anspruchsvoll. Da eine komplette Hemmung des Transporters zu einer Akkumulation von Cholesterin, aber auch toxischen Pflanzensterolen führen würde⁹⁹, wäre eine selektive Hemmung des Transporters in der Leber notwendig, um eine erhaltende Elimination der Substrate über den Darm zu gewährleisten. Krawczyk *et al.*⁵³ zeigten, dass in Kohorten mit Gallensteinpatienten die hepatische Cholesterinsynthese erhöht ist. Somit könnte ein Therapieansatz bei Trägern der p.D19H-Variante auch eine Hemmung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine sein. Schon 2009 zeigte eine umfangreiche epidemiologische Fall-Kontroll-Studie von Bodmer *et al.*¹⁰¹ einen negativen Zusammenhang zwischen der Cholezystektomie und einer vorausgegangenen Therapie mit Statinen anhand der britischen General Practice Research Database (GPRD). Anhand einer hohen Korrelation zwischen Dauer und Dosis der Statineinnahme und der Risikoreduktion zur Entwicklung von symptomatischen Gallensteinen mit konsekutiver Cholezystektomie ist es wahrscheinlich, dass die medikamentöse Therapie einen rein protektiven Effekt hat. Daher stellt sich die Frage, warum die mögliche protektive Wirkung noch nicht in größeren randomisierten klinischen Studien, insbesondere bei genetisch prädisponierten Individuen, untersucht wurde. Nichtsdestotrotz ist der Einfluss der Ernährung nicht zu übersehen. Bei hochkalorischer Ernährung verschwinden die aufgedeckten Unterschiede infolge eines Anstiegs der biliären Lipidkonzentrationen, vor allem aber durch die Cholesterinübersättigung des Blutes und der Galle. Eine ausreichende Clearance des Körpers, bei „Gain of function“-Mutation in *Abcg5/g8* scheint nicht mehr möglich. Wie bei der Arteriosklerose erhöht sich das Risiko einer Gallensteinerkrankung beim metabolischen Syndrom^{28,102}. Nachweislich ist eine Hyperinsulinämie mit einer erhöhten Aufnahme und Sekretion von hepatischem Cholesterin, sowie einer Hypersekretion von Gallensäuren verbunden¹⁰³. Eine faserarme Diät verlängert den Darmtransit der Nahrung und erhöht dadurch die Synthese der lithogenen hydrophoben Gallensäure Deoxycholsäure durch Darmbakterien⁷. Körperliche Inaktivität¹⁰⁴, die Ernährung mit langkettigen Fettsäuren¹⁰⁵,

sowie Adipositas¹⁰² wurden zusätzlich in großen prospektiven Studien als exogene Risikofaktoren für Gallensteine identifiziert. Mit Zunahme der Risikofaktoren im Alter steigt dadurch auch die Inzidenz von Gallensteinen. Mit der Identifizierung des lithogenen Genotyps im jungen Erwachsenenalter könnten frühzeitig präventive Maßnahmen wie Ernährungsberatung, sportliche Betätigung und eventuell medikamentöse Ansätze angeregt werden.

Evolutionsbiologisch gesehen können Mutationen Vor- und Nachteile haben. Was für das einzelne Individuum von Nachteil sein könnte, kann im Sinne der Evolutionslehre jedoch vorteilhaft sein, da die Varianten zur Weiterentwicklung und Adaptation an Umweltbedingungen beitragen oder einen Schutz gegen Erkrankungen darstellen können. Beispiele sind die heterozygote Form der Sichelzellanämie bei Malaria¹⁰⁶ oder die homozygote CCR5- Δ -32-Variante, die eine Immunität gegenüber HIV vermittelt¹⁰⁷. Da die *Abcg8* p.D19H-Variante nicht nur zu einer erhöhten Sekretion von Cholesterin aus der Leber, sondern auch zu einer erhöhten Exkretion zurück in das Darmlumen führt, stellt sie somit angesichts von verminderten LDL-Konzentrationen im Serum einen protektiven Genotyp mit vermindertem Risiko zur Entstehung der Atherosklerose dar⁷⁹. Die Ergebnisse des darmspezifischen Knock-outs von *Abcg5/g8* zeigen, dass die Elimination von Cholesterin über den Darm eine wichtige Rolle für die Cholesterinhomöostase besitzt und dass sowohl die Leber als auch der Darm im Fokus weiterer Studien zur Gallesteinentstehung und -behandlung stehen sollten.

Literaturverzeichnis

1. Eckart, W. U. *Geschichte, Theorie und Ethik der Medizin*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013).
2. Hohenheim, T. von. Das Buch von den tartarischen Krankheiten nach dem alten Namen vom Stein/Sand und Grieß. in *Ander Theil der Bücher und Schrifften des Philippi Theophrasti Bombast von Hohenheim/ Paracelsi* (ed. Brisgoius, I. H.) 246–50 (Conrad Waldkirch, 1589).
3. Statistisches Bundesamt. Available at: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/Diagnosen.html>.
4. Piper, W. *Innere Medizin*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013).
5. Ransohoff, D. F., Gracie, W. A., Wolfenson, L. B. & Neuhauser, D. Prophylactic cholecystectomy or expectant management for silent gallstones. A decision analysis to assess survival. *Ann. Intern. Med.* **99**, 199–204 (1983).
6. BQS Institut für Qualität & Patientensicherheit GmbH. BQS-Bundesauswertung 2008 Cholezystektomie. (2008).
7. Lammert, F. & Sauerbruch, T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 423–433 (2005).
8. Kirsch, J. Hepatobiliäres System. in *Duale Reihe Anatomie* (ed. Herausgeber: Aumüller, Gerhard; Aust, Gabriela; Engele, Jürgen; Kirsch, Joachim; Maio, Giovanni; Mayerhofer, Artur; Mense, Siegfried; Reißig, Dieter; Salvetter, Jürgen; Schmidt, Wolfgang; Schmitz, Frank; Schulte, Erik; Spanel-Borowski, Katharina; Wennemut, H.-G. ;) (Thieme Verlagsgruppe, 2014). doi:10.1055/b-002-99154
9. Zweers, S. J. L. B. *et al.* The human gallbladder secretes fibroblast growth factor 19 into bile: Towards defining the role of fibroblast growth factor 19 in the enterobiliary tract. *Hepatology* **55**, 575–583 (2012).
10. Boyer, J. L. Bile Formation and Secretion. in *Comprehensive Physiology* (John Wiley & Sons, Inc., 2013). doi:10.1002/cphy.c120027
11. Carey, M. C. & Lamont, J. T. Cholesterol gallstone formation. 1. Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. *Prog. Liver Dis.* **10**, 139–63 (1992).
12. Leipziger, J. Ernährung, Verdauung und Absorption, Leber (II). in *Duale Reihe Physiologie* (ed. Behrends, Jan C.; Bischofberger, Josef; Deutzmann, Rainer; Ehmke, Heimo; Frings, Stephan; Grissmer, Stephan; Hoth, Markus; Kurtz, Armin; Leipziger, Jens; Müller, Frank; Pedain, Claudia; Rettig, Jens; Wagner, Charlotte; Wischmeyer, E.) 488–511 (Thieme Verlagsgruppe, 2017). doi:10.1055/b-004-132217
13. Moc, I. Die Leber. in *Biochemie des Menschen* (ed. Armbruster, Marco; Berghold, Silke; Blaeschke, Franziska; Grillhösl, Christian; Harrasser, Simone; Koch, Daniel; Moc, Isabelle; Nassrallah, Jan; Otte, Bettina; Pritsch, Michael; Schneider, Nadine; Schröder, Laura; Ziegler, P.) 649–674 (Thieme Verlagsgruppe, 2015). doi:10.1055/b-003-125849

14. Wittenburg, H. *et al.* FXR and ABCGs/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology* **125**, 868–881 (2003).
15. Moschetta, A., Bookout, A. L. & Mangelsdorf, D. J. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nat. Med.* **10**, 1352–1358 (2004).
16. Lammert, F., Carey, M. C. & Paigen, B. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: A murine gallstone map. *Gastroenterology* **120**, 221–238 (2001).
17. Rosmorduc, O. *et al.* ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* **125**, 452–9 (2003).
18. Paumgartner, G. & Sauerbruch, T. Gallstones: pathogenesis. *Lancet* **338**, 1117–1121 (1991).
19. Metzger, A. L., Heymsfield, S. & Grundy, S. M. The lithogenic index--a numerical expression for the relative lithogenicity of bile. *Gastroenterology* **62**, 499–501 (1972).
20. Carey, M. C. & Small, D. M. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J. Clin. Invest.* **61**, 998–1026 (1978).
21. Wang, D. Q. & Carey, M. C. Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic b. *J. Lipid Res.* **37**, 606–30 (1996).
22. Paigen, B. & Carey, M. C. Gallstones. In *The genetic basis of common diseases* (King RA *et al.*). London Oxford Univ. Press 298–335 (2002).
23. Wang, D. Q. H., Schmitz, F., Kopin, A. S. & Carey, M. C. Targeted disruption of the murine cholecystinin-1 receptor promotes intestinal cholesterol absorption and susceptibility to cholesterol cholelithiasis. *J. Clin. Invest.* **114**, 521–528 (2004).
24. Wang, H. H., Afdhal, N. H., Gendler, S. J. & Wang, D. Q.-H. Targeted disruption of the murine mucin gene 1 decreases susceptibility to cholesterol gallstone formation. *J. Lipid Res.* **45**, 438–47 (2004).
25. Stokes, C. S., Krawczyk, M. & Lammert, F. Gallstones: Environment, lifestyle and genes. *Dig. Dis.* **29**, 191–201 (2011).
26. Vitek, L. & Carey, M. C. New pathophysiological concepts underlying pathogenesis of pigment gallstones. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **36**, 122–9 (2012).
27. Méndez-Sánchez, N., Zamora-Valdés, D., Chávez-Tapia, N. C. & Uribe, M. Role of diet in cholesterol gallstone formation. *Clin. Chim. Acta.* **376**, 1–8 (2007).
28. Grundy, S. M. Cholesterol gallstones: a fellow traveler with metabolic syndrome? *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 1–2 (2004).
29. Miquel, J. F. *et al.* Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology* **115**, 937–46 (1998).
30. Katsika, D. *et al.* Gallstone disease in Swedish twins: Risk is associated with ABCG8

- D19H genotype. *J. Intern. Med.* **268**, 279–285 (2010).
31. Katsika, D. *et al.* Genetic and environmental influences on symptomatic gallstone disease: a Swedish study of 43,141 twin pairs. *Hepatology* **41**, 1138–43 (2005).
 32. Lammert, F. *et al.* Lith genes control mucin accumulation, cholesterol crystallization, and gallstone formation in A/J and AKR/J inbred mice. *Hepatology* **36**, 1145–1154 (2002).
 33. Paigen, B. *et al.* Quantitative trait loci mapping for cholesterol gallstones in AKR/J and C57L/J strains of mice. *Physiol. Genomics* **4**, 59–65 (2000).
 34. Khanuja, B. *et al.* Lith1, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7729–33 (1995).
 35. Lammert, F. *et al.* Gallstones. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16024 (2016).
 36. Stokes, C. S. & Lammert, F. Transporters in cholelithiasis. *Biol. Chem.* **393**, 3–10 (2012).
 37. Graf, G. A. *et al.* ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion. *J. Biol. Chem.* **278**, 48275–48282 (2003).
 38. Brown, J. M. & Yu, L. Protein mediators of sterol transport across intestinal brush border membrane. *Subcell. Biochem.* **51**, 337–80 (2010).
 39. Graf, G. A. *et al.* Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J. Clin. Invest.* **110**, 659–69 (2002).
 40. Yang, C. *et al.* Disruption of cholesterol homeostasis by plant sterols. *J. Clin. Invest.* **114**, 813–22 (2004).
 41. Solca, C., Tint, G. S. & Patel, S. B. Dietary xenosterols lead to infertility and loss of abdominal adipose tissue in sterolin-deficient mice. *J. Lipid Res.* **54**, 397–409 (2013).
 42. McDaniel, A. L. *et al.* Phytosterol Feeding Causes Toxicity in ABCG5/G8 Knockout Mice. *Am. J. Pathol.* **182**, 1131–1138 (2013).
 43. Yu, L. *et al.* Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 16237–42 (2002).
 44. Plösch, T. *et al.* Sitosterolemia in ABC-Transporter G5-Deficient Mice Is Aggravated on Activation of the Liver-X Receptor. *Gastroenterology* **126**, 290–300 (2004).
 45. Wang, H. H., Patel, S. B., Carey, M. C. & Wang, D. Q.-H. Quantifying anomalous intestinal sterol uptake, lymphatic transport, and biliary secretion in Abcg8^{-/-} mice. *Hepatology* **45**, 998–1006 (2007).
 46. Yu, L. *et al.* Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J. Clin. Invest.* **110**, 671–680 (2002).
 47. Duan, L.-P., Wang, H. H. & Wang, D. Q.-H. Cholesterol absorption is mainly regulated by the jejunal and ileal ATP-binding cassette sterol efflux transporters Abcg5 and Abcg8 in mice. *J. Lipid Res.* **45**, 1312–23 (2004).
 48. Temel, R. E. *et al.* Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *J. Clin. Invest.* **117**, 1968–78 (2007).

49. Langheim, S. *et al.* ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile. *J. Lipid Res.* **46**, 1732–8 (2005).
50. Krawczyk, M., Wang, D. Q. H., Portincasa, P. & Lammert, F. Dissecting the genetic heterogeneity of gallbladder stone formation. *Semin. Liver Dis.* **31**, 157–172 (2011).
51. Buch, S. *et al.* A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat. Genet.* **39**, 995–999 (2007).
52. Grünhage, F. *et al.* Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology* **46**, 793–801 (2007).
53. Krawczyk, M. *et al.* Phytosterol and cholesterol precursor levels indicate increased cholesterol excretion and biosynthesis in gallstone disease. *Hepatology* **55**, 1507–1517 (2012).
54. Rosmorduc, O. & Poupon, R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J. Rare Dis.* **2**, 29 (2007).
55. Denk, G. U. *et al.* ABCB4 deficiency: A family saga of early onset cholelithiasis, sclerosing cholangitis and cirrhosis and a novel mutation in the ABCB4 gene. *Hepatol. Res.* **40**, 937–41 (2010).
56. Lammert, F. *et al.* Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2^{-/-} mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* **39**, 117–28 (2004).
57. Gudbjartsson, D. F. *et al.* Large-scale whole-genome sequencing of the Icelandic population. *Nat. Genet.* **47**, 435–444 (2015).
58. Mhatre, S. *et al.* Common genetic variation and risk of gallbladder cancer in India: a case-control genome-wide association study. *Lancet. Oncol.* **18**, 535–544 (2017).
59. Strubbe, B., Geerts, A., Van Vlierberghe, H. & Colle, I. Progressive familial intrahepatic cholestasis and benign recurrent intrahepatic cholestasis: a review. *Acta Gastroenterol. Belg.* **75**, 405–10 (2012).
60. van Mil, S. W. C. *et al.* Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology* **127**, 379–84 (2004).
61. Pan, S. *et al.* Variations of ABCB4 and ABCB11 genes are associated with primary intrahepatic stones. *Mol. Med. Rep.* **11**, 434–46 (2014).
62. Wang, D. Q., Paigen, B. & Carey, M. C. Determine Susceptibility To Cholesterol Cholelithiasis in Inbred Mice : Physical-Chemistry of Gallbladder Bile1. **38**, 1395–1411 (1997).
63. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. & Fu, P. C. Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol. *Clin. Chem.* **20**, (1974).
64. Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W. [Enzymatic determination of total cholesterol in serum (author's transl)]. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **12**, 403–7 (1974).
65. Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T. & Tanimizu, I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta.* **79**, 93–8

- (1977).
66. Komiya, Y. *et al.* Microassay of serum bile acids by an enzymatic cycling method. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **30**, 3796–9 (1982).
 67. Lammert, F., Wang, D. Q., Paigen, B. & Carey, M. C. Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice : integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes 1. *J lipid Res* **40**, 2080–2090 (1999).
 68. Carey, M. C. Saturation of Native Bile. **19**, 945–955 (1978).
 69. Mazer, N. a & Carey, M. C. Mathematical model of biliary lipid secretion: a quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species. *J. Lipid Res.* **25**, 932–53 (1984).
 70. Groen, A. K., Oude Elferink, R. P. J. & Tager, J. M. Control Analysis of Biliary Lipid Secretion. *J. Theor. Biol.* **182**, 427–436 (1996).
 71. Kuo, K.-K. *et al.* Significant association of ABCG5 604Q and ABCG8 D19H polymorphisms with gallstone disease. *Br. J. Surg.* **95**, 1005–11 (2008).
 72. Siddapuram, S. P. *et al.* Hepatic cholesterol transporter ABCG8 polymorphisms in gallstone disease in an Indian population. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **25**, 1093–1098 (2010).
 73. Stender, S., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G. & Tybjaerg-Hansen, A. Sterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G8, gallstones, and biliary cancer in 62,000 individuals from the general population. *Hepatology* **53**, 640–8 (2011).
 74. Xu, H.-L. *et al.* Cholesterol metabolism gene polymorphisms and the risk of biliary tract cancers and stones: a population-based case-control study in Shanghai, China. *Carcinogenesis* **32**, 58–62 (2011).
 75. Renner, O. *et al.* Role of the ABCG8 19H risk allele in cholesterol absorption and gallstone disease. *BMC Gastroenterol.* **13**, 30 (2013).
 76. von Kampen, O. *et al.* Genetic and functional identification of the likely causative variant for cholesterol gallstone disease at the ABCG5/8 lithogenic locus. *Hepatology* **57**, 2407–17 (2013).
 77. von Kampen, O. *et al.* Genetic and functional identification of the likely causative variant for cholesterol gallstone disease at the ABCG5/8 lithogenic locus. *Hepatology* **57**, 2407–17 (2013).
 78. Szilvási, A. *et al.* Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **14**, 667–72 (2010).
 79. Koeijvoets, K. C. M. C. *et al.* ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **204**, 453–8 (2009).
 80. Lauridsen, B. K., Stender, S., Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B. G. & Tybjærg-

- Hansen, A. Genetic variation in the cholesterol transporter NPC1L1, ischaemic vascular disease, and gallstone disease. *Eur. Heart J.* **36**, 1601–8 (2015).
81. Shabanzadeh, D. M., Skaaby, T., Sørensen, L. T., Eugen-Olsen, J. & Jørgensen, T. Metabolic biomarkers and gallstone disease – a population-based study. *Scand. J. Gastroenterol.* **52**, 1270–1277 (2017).
 82. Di Ciaula, A. *et al.* The Role Of Diet In The Pathogenesis Of Cholesterol Gallstones. *Curr. Med. Chem.* **24**, (2017).
 83. Camilleri, M., Malhi, H. & Acosta, A. Gastrointestinal Complications of Obesity. *Gastroenterology* **152**, 1656–1670 (2017).
 84. Wang, H. H., Lammert, F., Schmitz, A. & Wang, D. Q.-H. Transgenic overexpression of Abcb11 enhances biliary bile salt outputs, but does not affect cholesterol cholelithogenesis in mice. *Eur. J. Clin. Invest.* **40**, 541–551 (2010).
 85. Oude Elferink, R. P. *et al.* Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *J. Lipid Res.* **37**, 1065–75 (1996).
 86. Nissinen, M. J. *et al.* Low Childhood Cholesterol Absorption Predisposes to Gallstone Disease: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **64**, 418–424 (2017).
 87. Goedeke, L. & Fernández-Hernando, C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 915–930 (2012).
 88. Renner, O. *et al.* Role of the ABCG8 19H risk allele in cholesterol absorption and gallstone disease. *BMC Gastroenterol.* **13**, 30 (2013).
 89. Shoda, J. *et al.* Increase of deoxycholate in supersaturated bile of patients with cholesterol gallstone disease and its correlation with de novo syntheses of cholesterol and bile acids in liver, gallbladder emptying, and small intestinal transit. *Hepatology* **21**, 1291–302 (1995).
 90. Kliewer, S. A. & Mangelsdorf, D. J. Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway. *Dig. Dis.* **33**, 327–331 (2015).
 91. Inagaki, T. *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217–225 (2005).
 92. Betters, J. L. & Yu, L. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett.* **584**, 2740–2747 (2010).
 93. Wu, J. *et al.* The NPC1L1 Polymorphism 1679C>G Is Associated with Gallstone Disease in Chinese Patients. *PLoS One* **11**, e0147562 (2016).
 94. Cohen, D. E. Of TICE in Men. *Cell Metab.* **24**, 773–774 (2016).
 95. Jakulj, L. *et al.* Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. *Cell Metab.* **24**, 783–794 (2016).
 96. Jiang, Z.-Y. *et al.* Increased NPC1L1 and ACAT2 expression in the jejunal mucosa from Chinese gallstone patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 49–54 (2009).

97. Cui, W. *et al.* Decreased NPC1L1 expression in the liver from Chinese female gallstone patients. *Lipids Health Dis.* **9**, 17 (2010).
98. Dijkers, A., Freak de Boer, J., Annema, W., Groen, A. K. & Tietge, U. J. F. Scavenger receptor BI and ABCG5/G8 differentially impact biliary sterol secretion and reverse cholesterol transport in mice. *Hepatology* **58**, 293–303 (2013).
99. Yu, L., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Hobbs, H. H. & Cohen, J. C. Selective sterol accumulation in ABCG5/ABCG8-deficient mice. *J. Lipid Res.* **45**, 301–307 (2004).
100. Plösch, T. *et al.* Sitosterolemia in ABC-Transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor. *Gastroenterology* **126**, 290–300 (2004).
101. Bodmer, M., Brauchli, Y. B., Krähenbühl, S., Jick, S. S. & Meier, C. R. Statin Use and Risk of Gallstone Disease Followed by Cholecystectomy. *JAMA* **302**, 2001 (2009).
102. Aune, D. & Vatten, L. J. Diabetes mellitus and the risk of gallbladder disease: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *J. Diabetes Complications* **30**, 368–373 (2016).
103. Biddinger, S. B. *et al.* Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat. Med.* **14**, 778–782 (2008).
104. Völzke, H. *et al.* Independent Risk Factors for Gallstone Formation in a Region with High Cholelithiasis Prevalence. *Digestion* **71**, 97–105 (2005).
105. Tsai, C.-J., Leitzmann, M. F., Willett, W. C. & Giovannucci, E. L. Long-chain saturated fatty acids consumption and risk of gallstone disease among men. *Ann. Surg.* **247**, 95–103 (2008).
106. Luzzatto, L. Sick cell anaemia and malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **4**, e2012065 (2012).
107. Mitsuyasu, R. Curing HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* **8**, 224–229 (2013).

Publikationen

Annika Bohner, Charlotte Rebholz, Rabea Hall, Frank Lammert, Susanne Weber. Die lithogene Variante D19H im Cholesterintransporter Abcg8 führt zu verminderter Phospholipidsekretion in Mäusen. Z Gastroenterol 2015; 53 (12): 1559 (DGVS 2015, Leipzig)

Charlotte Rebholz, Rabea Hall, Marcin Krawczyk, Frank Lammert, Susanne Weber. The lithogenic variant D19H of the cholesterol transporter ABCG8 leads to increased cholesterol to phospholipid coupling in mice. J Hepatol 2016; 64 (Suppl. 2): S648 (EASL 2016, Barcelona)

Susanne Weber, Charlotte Rebholz, Rabea Hall, Marcin Krawczyk, Frank Lammert. Die lithogene Variante D19H im Cholesterintransporter Abcg8 verändert das biliäre Cholesterin-/Phosphatidylcholin-Verhältnis in Mäusen. Z Gastroenterol 2016; 54 (8): 907 (DGVS 2016, Hamburg)

Marcin Krawczyk, Susanne Weber, Olga Niewiadomska, Krzysztof Jankowsky, Charlotte Rebholz, Friederike Poppenborg, Irena Jankowska, Jolanta Gozdowska, Dariusz Lebensztejn, Sabina Wiecek, Dieter Lütjohann, Piotr Socha, Frank Lammert. Early onset gallstone formation due to the variant p.D19H of the sterol transporter ABCG8: analysis of children with gallstones and humanized knock-in mice. Hepatology 2017; 66 (Suppl. 1): 231A-232A (AASLD 2017, Washington)

Charlotte Rebholz, Marcin Krawczyk, Frank Lammert. Genetics of gallstone disease. Eur J Clin Invest 2018; 48: e12935 (1-7) (Impact Factor 3,1)

Charlotte Rebholz, Annika Bohner, Marcin Krawczyk, Frank Lammert, Susanne Weber. Intestine-specific deletion of Abcg5/g8 leads to hepatobiliary cholesterol overload: pathophysiology of biliary lipid secretion. J Hepatol 2018; 68 (Suppl. 1): S7 (EASL 2018, Paris)

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Danke

Mein besonderer Dank geht an erster Stelle an meinen Doktorvater Herr Professor Dr. med. Lammert für die Überlassung des Projektes, die ausgezeichnete Zusammenarbeit, sowie die exzellente Betreuung. Für die stetig gewährte Diskussionsbereitschaft über Methoden und Ergebnisse, der Vorbereitung und Durchsicht von Präsentationen, Postern und Paper, der unerlässliche Ansporn in Durststrecken und schlussendlich der kritischen Durchsicht dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich ganz herzlich Frau Dr. rer. nat. Susanne Weber für die besondere und wertschätzende Betreuung und Zusammenarbeit im Labor und an dieser Arbeit. Der stetige Wissensaustausch mit dir, die Beantwortung aller meiner Fragen, die Durchsicht der Daten und deren kritischen Betrachtung, sowie die wunderbare Aufnahme in das Laborteam haben die Arbeit dort für mich ganz besonders gemacht.

Ein großer Dank geht auch an Frau Annika Bohner für die anfängliche methodische Einarbeitung und die große Hilfe an den *in vivo* Untersuchungen. Für deine Geduld und Genauigkeit danke ich dir.

Danke sagen möchte ich auch dem ganzen Laborteam der Arbeitsgruppe Professor Lammert. Ihr alle haben zum Entstehen dieser Arbeit im Kleinen und Großen beigetragen. Danke für eure Ratschläge und Tipps, Korrekturvorschläge und Mut machenden Worte: Frau Irina Nowak, Frau Friederike Reuner, Frau Rabea Hall und Herrn Dr. Marcin Krawzyk.

Das Anfang und das Ende gebühren meiner Familie und Freunden. Danke für eure Wegbegleitung, die lauten und leisen Töne des Lebens, das Mut machen und der feste Glaube an das Ziel. Ihr seid großartig.