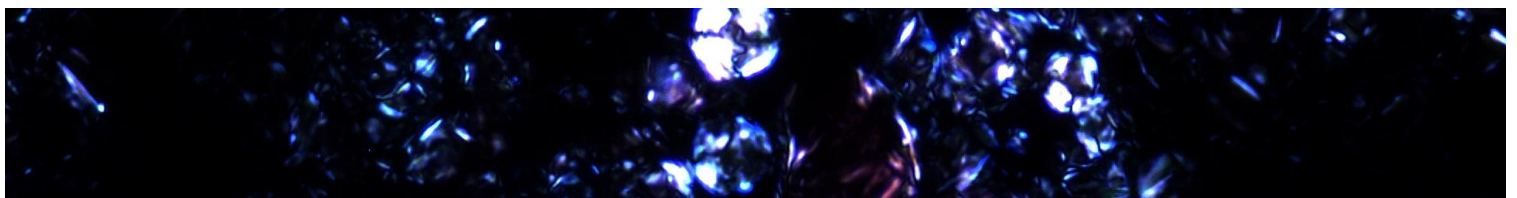
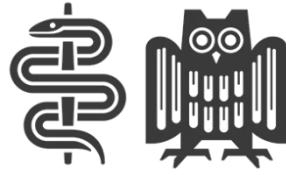


# Die Rolle von hepatischen Cholesterinkristallen und des NLRP3-Inflammasoms in transgenen Abcg5/g8-Mäusen

Johanna Inkermann





Aus der Klinik für Gastroenterologie und Endokrinologie,  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Marcin Krawczyk

# **Die Rolle von hepatischen Cholesterinkristallen und des NLRP3-Inflammasoms in transgenen Abcg5/g8-Mäusen**

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

2022

vorgelegt von Johanna Inkermann  
geboren am 08.05.1996 in 32657 Lemgo

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2023  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger  
Erstberichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert  
Zweitberichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Boehm

für Erika

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>4</b>
2.1	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung .....	4
2.2	Lipidstoffwechsel .....	7
2.2.1	Fettsäuren und Triacylglyceride .....	8
2.2.2	Cholesterin.....	9
2.2.3	Regulation des Lipidstoffwechsels .....	13
2.3	ABCG5/G8-Transporter .....	14
2.4	NLRP3-Inflammasom .....	16
2.5	Zielsetzung .....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
3.1	<i>Abcg5/g8</i> -Mausmodell .....	20
3.2	Histologie .....	21
3.2.1	Anfertigung der Kryostatschnitte .....	22
3.2.2	HE-Färbung .....	23
3.2.3	Oil Red O-Färbung .....	24
3.2.4	Polarisationsmikroskopie .....	25
3.3	Genexpressionsanalyse.....	26
3.3.1	RNA-Isolation aus Lebergewebe.....	26
3.3.2	cDNA-Synthese.....	28
3.3.3	$\beta$ -Actin PCR und Gelelektrophorese .....	29
3.3.4	Genexpression .....	32

---

3.4	Serumparameter .....	35
3.5	Lipidomanalyse .....	37
3.6	Statistische Auswertung .....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
4.1	Histologie .....	39
4.1.1	HE-Färbung .....	39
4.1.2	Oil Red O-Färbung .....	41
4.1.3	Polarisationsmikroskopie .....	44
4.2	Genexpressionsanalyse.....	50
4.3	Serumparameter .....	55
4.4	Lipidomanalyse .....	57
4.4.1	Multivariate Datenanalyse.....	57
4.4.2	Univariate Datenanalysen.....	59
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>102</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATION.....</b>	<b>103</b>
<b>12</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>103</b>
<b>13</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>104</b>

# 1 Zusammenfassung

Die nicht-alkoholische Fettleber ist eine Erkrankung, die aktuell eine steigende Prävalenz zeigt und in der Zukunft eine wachsende Bedeutung haben wird. Aufgrund der Assoziation zum metabolischen Syndrom und dessen kardiovaskulären Komplikationen ist die Erkrankung mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden. Bisher werden für die Ätiologie neben diätischen und genetischen Aspekten eine Vielzahl an Faktoren verantwortlich gemacht, welche eine Dysbalance der Lipidhomöostase auslösen. Insbesondere werden genetischen Varianten im Cholesterinstoffwechsel eine besondere Bedeutung zugeschrieben. Hier hat der ABCG5/G8-Transporter, welcher an der apikalen Membran von Enterozyten und Hepatozyten lokalisiert ist, eine hohe Relevanz. ABCG5/G8 sezerniert Sterole und ist aufgrund häufiger genetischer Polymorphismen, welche mit der Bildung von Gallensteinen assoziiert sind, klinisch besonders relevant.

Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis des ABCG5/G8-Transporters zu erweitern und zu untersuchen, welche Rolle dieser Transporter in der Pathophysiologie des Lipidstoffwechsels der Leber einnimmt. Dafür wurden zwei durch Cre-loxP Rekombinationen in Mäusen generierte gewebsspezifische Knock-Out Linien verwendet, bei welchen der Transporter entweder im Darm oder in der Leber ausgeschaltet wurde. Bei einer weiteren Mauslinie wurde der Einzelnukleotidpolymorphismus p.D19H, der beim Menschen mit Gallensteinen assoziiert ist, mittels BAC-Rekombination in das *Abcg8*-Gen integriert. Weiterhin wurden die Tiere in zwei Fütterungsgruppen eingeteilt, wobei eine Gruppe eine Standardfütterung und die andere eine fett- und cholesterinreiche Diät erhielt. Histologische Leberpräparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin zur Übersicht, weitere mit Oil red O zur Darstellung von Neutralfetten gefärbt und zusätzlich konnten Cholesterinkristalle in nativen Schnitte unter polarisiertem Licht sichtbar gemacht werden. Genexpressionsanalysen des NLRP3-Inflammasoms und des Effektorzytokins Interleukin-1 $\beta$  sollten Aufschluss über eine cholesterinkristallinduzierte Entzündungsreaktion geben. Um den Einfluss der Transportermodifikationen auf den Lipidstoffwechsel zu charakterisieren, wurden weitere Genexpressionsanalysen von regulatorischen Proteinen und Enzymen sowie eine Lipidomanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass die beiden gewebsspezifischen Knock-Out Linien zu einer Fettleber neigen. Diese Steatose ist durch eine Triacylglycerid- und Cholesterinakkumulation sowie eine beginnende Cholesterinkristallisation gekennzeichnet. Die Lipidom- und Genexpressionsanalyse ergaben, dass die Triacylglyceridsteatose nicht auf eine gesteigerte De-novo-Lipogenese, sondern möglicherweise auf ein gestörtes Lipidremodeling zurückzuführen ist. Die lithogene Diät führte zum

histologischen Bild einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis, zusätzlich wurden solide Cholesterinkristalle im Lebergewebe detektiert. In Zusammenschau mit Genexpressionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass die Cholesterinkristallbildung mit einer erhöhten *Nlrp3*- sowie *Il-1 $\beta$*  Expression und folglich einer Entzündungsreaktion der Leber assoziiert war. Die Analysen ergaben weiterhin, dass der Knock-Out des Transporters entweder im Darm oder der Leber ausreicht, um die Veränderungen hervorzurufen. Die bisher postulierte Transporterüberfunktion durch den p.D19H-Polymorphismus des *Abcg8*-Gens konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Daten deuten eher auf eine Unterfunktion hin, da sich dieser Phänotyp wie eine milde Form des Knock-Outs präsentiert.

Aufgrund eines Mangels an zugelassenen medikamentösen Therapien hat die Identifizierung von Risikopatienten einen hohen Stellenwert. Patienten mit genetischen Varianten, die zu einer ABCG5/G8-Unterfunktion führen, sollte zu präventiven Maßnahmen wie sportlicher Betätigung und einer fett- und insbesondere cholesterinarmen Diät geraten werden. Pharmakologische Angriffspunkte bieten mit Ezetimib oder Statinen Cholesterinresorption und -synthese. Insgesamt kann dem ABCG5/8-Transporter eine protektive Rolle in der NAFLD-Entwicklung zugeschrieben werden, sodass der Knock-Out ein neues Mausmodell für die Fettleberkrankung darstellt.

## Abstract

Non-alcoholic fatty liver is a disease that is currently showing an increasing prevalence and is expected to become even more important in the future. As it is associated with metabolic syndrome and cardiovascular complications, the disease reaches a high mortality rate. To date, in addition to dietary and genetic aspects, a variety of factors relating to the imbalance of lipid homeostasis are understood to be part of the aetiology. Particular importance is attributed to cholesterol metabolism due to genetic causes. Here, the ABCG5/G8 transporter, which is localised at the apical membrane of enterocytes and hepatocytes, plays an important role. ABCG5/G8 secretes sterols and became clinically relevant due to genetic polymorphisms associated with the formation of gallstones.



The aim of this work was to expand the knowledge about the ABCG5/G8 transporter to better understand its role in the pathophysiology of liver diseases. To this end, two tissue-specific knock-out lines were generated by Cre-loxP recombinations in mice, in which the transporter was deleted either in the intestine or in the liver. In a third mouse line, the single nucleotide polymorphism p.D19H, which is associated with increased risk of gallstone disease in humans, was integrated by BAC recombination in the *Abcg8* gene. Furthermore, animals were divided into different feeding groups, one receiving a standard chow and the other a lithogenic diet. A portion of the histological liver sections were stained with haematoxylin-eosin for overview, others with Oil red O to detect neutral lipids, and additional native sections were viewed under polarised light to visualise cholesterol crystals. Gene expression analyses of the NLRP3 inflammasome and the effector cytokine Interleukin-1 $\beta$  should provide insight into a cholesterol crystal-induced inflammatory response. To characterise the influence of the transporter modifications on lipid metabolism, further gene expression analyses of regulatory proteins and enzymes as well as a lipidome analysis were performed.

The results of the work showed that the two tissue-specific knock-out lines tended to develop fatty liver. This steatosis is characterised by an accumulation of triacylglycerides and cholesterol as well as by incipient cholesterol crystallization. Lipidome and gene expression analyses further revealed that triacylglyceride steatosis was not due to an increase in de novo lipogenesis but possibly to impaired lipid remodeling. The lithogenic diet resulted in histological defined non-alcoholic steatohepatitis; in addition, solid cholesterol crystals were detected in liver tissue. In combination with gene expression analyses it could be shown that cholesterol crystal formation was associated with increased *Nlrp3* and *Il-1 $\beta$*  expression and consequently with an inflammatory reaction of the liver. The analyses also demonstrated that the transporter knock-out in either the intestine or the liver is sufficient to induce the changes. The previously postulated transporter gain-of-function due to the p.D19H polymorphism of the *Abcg8* gene could not be confirmed in this work. The data rather suggests a loss-of-function, as this phenotype presents like a weaker form of knock-out.

Due to a lack of approved therapeutic options, the identification of patients at risk of developing non-alcoholic fatty liver is of high importance. Patients with genetic polymorphisms leading to ABCG5/G8 hypofunction should be advised to take preventive measures such as exercise and a low-fat and especially low-cholesterol diet. Regarding drug interventions, cholesterol absorption and synthesis provide pharmacological targets for ezetimibe or statins. Overall, a protective role in NAFLD development can be attributed to the ABCG5/8 transporter and knock-out can continue to serve as a mouse model of fatty liver disease.

## 2 Einleitung

### 2.1 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung

Die Homöostase des Lipidstoffwechsels ist essenziell für die Funktion und Erhaltung des Organismus, denn Dysregulationen führen zu Imbalancen und können sich als Krankheiten manifestieren. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) ist eine übergreifende Bezeichnung für zwei Krankheitsbilder: die nicht-alkoholische Fettleber (NAFL) und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH). Sie wird durch eine nachweisliche hepatische Steatose bei gleichzeitiger Abwesenheit von Risikofaktoren wie Alkoholkonsum, Infektions- oder Lebererkrankungen anderer Genese definiert [27]. Der Begriff schließt die Lebererkrankungen mit histologischen Merkmalen einer einfachen Steatose über eine hepatische Entzündungsreaktion bis hin zur Entwicklung einer Fibrose ein, wie Arguello et al. [6] zusammenfassten.

Weltweit ist die NAFLD mit einer Prävalenz von durchschnittlich 20% vertreten, wobei sich unterschiedliche Werte bezogen auf verschiedenen Risikogruppen ergeben. In Kohorten aus Patienten mit Fettleibigkeit oder Diabetes mellitus Typ 2 liegt die Prävalenz bei bis zu 70% bzw. 98%, wie Vernon et al. [143] in einer Übersichtsarbeit zusammenfassten. Dies verdeutlicht die Assoziation zum metabolischen Syndrom. Die „American Association for the Study of Liver Diseases“ beschreibt in ihrer Praxisleitlinie die klinische Relevanz der Erkrankung durch eine erhöhte Mortalitätsrate aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse bei NAFLD-Patienten [27]. Eine exakte Inzidenz ist unbekannt. Eine Studie aus England berichtet über eine Inzidenz von 29 auf 100.000 [147]. Die Erkrankung der NAFLD manifestiert sich zunächst mit einer einfachen Steatose, welche sich bei einem Teil dieser Patienten zu einer NASH weiterentwickeln kann. Diese prädisponiert schließlich für den Progress zu einer Zirrhose und das hepatozelluläre Karzinom. Histologisch kann die NAFLD in vier Stadien eingeteilt werden: Grad 1 ist durch eine einfache Steatose, Grad 2 durch eine Steatose mit einer Inflammation und Grad 3 und 4 sind zusätzlich durch eine verstärkte Entzündungsreaktion mit hepatozellulärem Ballooning und Fibrose gekennzeichnet. Grad 1 und 2 sowie Grad 3 und 4 lassen sich im Hinblick auf die klinische Entwicklung zusammenfassen, da letztere ein erhöhtes Risiko der Zirrhoseentwicklung und eine erhöhte leberspezifische Mortalitätsrate aufweisen [93]. Eine hohe klinische Relevanz erhält die Fettlebererkrankung als unabhängiger Risikofaktor für Komorbiditäten auf kardiovaskulärer Ebene [80]

und diverse Tumorentitäten [58] sowie durch die metabolische Inflammation [38]. Eine kausale Beziehung zur Insulinresistenz und Hyperinsulinämie konnten Hebbard et al. [51] im Tiermodell herstellen. Auch Gehrke et al. [38] wiesen auf die Zusammenhänge von NAFLD und Aktivierung von Kupffer-Zellen hin, welche ihrerseits direkt die Insulinsensitivität der Hepatozyten beeinflussen.

Die NAFL ist definiert als eine einfache Steatose mit der Abwesenheit von einer Entzündungsreaktion und Fibrose und stellt das erste Stadium der NAFLD dar. Die Verfettung wird entweder durch einen Gehalt an hepatischen Triacylglyceriden (TG) oberhalb der 95. Perzentile oder durch Lipidtropfen, welche mehr als 5% des Hepatozyten einnehmen, beschrieben [135]. Ein gewisser Grad an Entzündung darf im Lebergewebe bei der Diagnose vorhanden sein [74]. Die Genese der Erkrankung führten Cohan et al. [29] auf die Imbalancen zwischen der Triacylglyceridaufnahme und -abgabe zurück. Die hepatischen TG, welche die Steatose charakterisieren, stammen zu zwei Dritteln aus freien Fettsäuren aus dem Blut, der Rest wird durch De-novo-Lipogenese synthetisiert, und ein kleinerer Teil wird durch die Nahrung aufgenommen [33]. Die NAFL ist per se für den Organismus nicht schädlich und weist einen geringen Krankheitsprogress auf [143]. Ioannou et al. [63] beschrieben, dass sich jedoch bei 10-30% dieser Patienten die Erkrankung zur nächsten Stufe, der NASH, weiterentwickeln kann.

Die NASH ist eine Entzündung der Leber, welche nicht auf infektiös bedingte, alkoholische oder andere Ursachen zurückzuführen ist. Sie lässt sich histologisch anhand des NAFLD-Aktivitäts-Scores diagnostizieren, welcher den Ausprägungsgrad vierer Merkmale beinhaltet: Es wurden der Steatosegrad, die Schwere der Entzündung sowie das hepatozelluläre Ballooning und der Fibrosegrad berücksichtigt [73]. Die klinische Relevanz der Erkrankung ergibt sich aus der Beobachtung, dass sich diese in einem Progress zur Zirrhose und darauf folgend zu einem hepatozellulären Karzinom weiterentwickeln kann [6]. Dieser Progress bestimmt die leberspezifische Mortalität bei der NAFLD [27]. Weiterhin wird die NASH heutzutage nicht nur isoliert auf der Ebene der Leber betrachtet, sondern vielmehr als eine Multisystemerkrankung angesehen. Welche Faktoren zur NASH Entwicklung beitragen, ist bisher noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnten Studien genetische Risikofaktoren sowie diätische Einflüsse feststellen. Ioannou et al. [62] fassten die Informationen über Gene zusammen, deren Polymorphismen mit einer NASH-Entwicklung assoziiert sind, und stellten fest, dass sie alle für Proteine des Cholesterinstoffwechsels kodieren, was die Rolle des Cholesterins in der Pathophysiologie hervorhebt. Kandidatengene sind z.B. das *PNPLA3*-Gen, bei welchem der „Single nucleotide polymorphism“ (SNP, engl. für Einzelnukleotidpolymorphismus) p.I148M mit einer Fettleber und Entzündungsreaktion bis hin zum hepatozellulären Karzinom assoziiert ist [124]. Das Gen kodiert für das Enzym „Patatin-like phospholipase domain-containing protein“ (PNPLA3), das durch seine TG-Hydrolaseaktivität am Lipidremodelling beteiligt ist [50]. Li et al. [86] fassten die Evidenz zusammen, dass ein weiterer SNP, p.E16K, des Gens, welches für das „Transmembrane 6 superfamily 2“-Protein (TM6SF2) kodiert, durch dessen Rolle bei der „Very low density lipoprotein“ (VLDL)-Sekretion der Leber mit einer NASH

vergesellschaftet ist. Im Rahmen der familiären Hypobetalipoproteinämie führt ein Gendefekt des Apolipoproteins B zu einer NAFLD [25]. Neben genetischen Prädispositionen können weiterhin Lipide toxische Einflüsse auf die Hepatozyten ausüben. Dies rückt die Auswirkungen diätischer Fette in den Fokus. Ioannou et al. [62] beschrieben die Auswirkungen einer dysregulierten Cholesterinhomöostase auf die NAFLD-Entwicklung und fassten zusammen, dass Cholesterin diese durch seine lipotoxischen Eigenschaften fördert. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass das Vorhandensein von Cholesterinkristallen (CC) ein Unterscheidungsmerkmal zwischen der NASH und der NAFL ist [60]. Neben dem Cholesterin haben auch freie Fettsäuren eine schädigende Wirkung auf die Leber, indem sie über die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) eine Entzündungsreaktion vorantreiben, die mitochondriale Funktion stören und Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) auslösen [2].

Cohen et al. [29] fassten zusammen, dass 10-30% aller NASH-Erkrankten innerhalb von 10 Jahren eine Zirrhose entwickeln. Für die Progression werden ebenfalls CC verantwortlich gemacht, welche Kupffer-Zellen und ihrerseits die hepatischen Sternzellen aktivieren, was eine Fibroseentwicklung zur Folge hat [62]. Bis zu einem Viertel der NAFLD-bedingten Zirrhosepatienten entwickeln ein hepatozelluläres Karzinom [29], und Piñero et al. [113] konnten bei dieser Erkrankung eine steigende Inzidenz beobachten. Klinisch bedeutsam ist die Tatsache, dass das Überleben von Patienten mit einem NASH-HCC kürzer ist, als bei einem HCC anderer Genese [146].

Der Goldstandard in der Diagnostik der NAFLD ist die Leberbiopsie, da die Diagnose histologisch gestellt wird [27]. Aufgrund der Invasivität, der Komplikationsraten und der Kosten sollte an weitere diagnostische Möglichkeiten gedacht werden. Da die Aminotransferaseaktivität im Serum auch bei den verschiedenen Stadien einer NAFLD normwertig sein kann [97] und gängige Methoden wie Ultraschall, CT oder MRT eine NAFLD nicht zuverlässig diagnostizieren können [27], kommt anderen nicht-invasiven Methoden eine wachsende Bedeutung zu. Die Elastographie, welche die Lebersteifigkeit misst, konnte in einer Metaanalyse mit einer hohen Sensitivität und Spezifität die NAFLD-Fibrose detektieren [26]. Sandrin et al. [126] zeigten, dass diese Methode gut mit den Ergebnissen aus einer Leberbiopsie korreliert. Zusätzlich wurde ein NAFLD-Fibrosescore entwickelt, welcher zur nichtinvasiven Einschätzung geeignet ist. Er beinhaltet die Faktoren Alter, Größe, Gewicht, Diabetes, Aminotransferasen, Thrombozyten und Serumalbumin. Da die Fibrose ein späteres Stadium der Erkrankung darstellt und keine zuverlässigen diagnostischen Methoden etabliert sind, welche die NAFLD frühzeitig erkennen, haben die Identifizierung und das Screening von Risikopatienten eine große Bedeutung. Bei Patienten, die bereits an der NAFLD in fortgeschrittenen Stadien erkrankt sind, sind Früherkennungsuntersuchungen für das hepatozelluläre Karzinom zu empfehlen [19].

Bisher gibt es keine kausale Therapie der NAFLD. Die Schwerpunkte in der Behandlung liegen lediglich auf Lifestyle Änderungen wie Gewichtsreduktion durch Diät. Chalasani et al. [27] fassten zusammen, dass eine Gewichtsabnahme von 3-5% eine Steatose vermindert, jedoch eine NASH nur mit einem

Verlust von 10% des Körpergewichts verbessert werden kann. Über einen Nutzen von körperlicher Betätigung ist die Studienlage nicht eindeutig. Bei der Ernährung sollte auf eine mediterrane Diät geachtet werden, welche einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren aufweist. Diese Fette führten in Studien zur Senkung der hepatischen Steatose [157]. In diversen Studien wurden Medikamente zur Behandlung von NAFLD untersucht, jedoch gibt es aktuell keine zugelassene medikamentöse Therapie [62]. Ein moderater Gebrauch von Vitamin E-Präparaten kann bei Patienten mit biopsiegesicherter NAFLD ohne Zirrhose oder Diabetes mellitus empfohlen werden. Die Verbesserung der Leberentzündung wird auch durch Insulin-Sensitizer wie Pioglitazon erreicht, die jedoch unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen. [27] Aufgrund des Fehlens einer kausalen Therapie der NAFLD-Erkrankung haben das Erkennen von Risikopatienten, deren Screening und die Etablierung von Präventionsmaßnahmen einen hohen Stellenwert.

## 2.2 Lipidstoffwechsel

Lipide lassen sich in verschiedene Gruppen unterteilen und sie können diverse Funktionen struktureller oder hormoneller Art im Organismus haben. Sie dienen als Energiespeicher oder Botenstoffe und sind Teil von Signaltransduktionskaskaden. Die Fette können im Darm aus der Nahrung resorbiert und gespeichert, aber auch vom Körper synthetisiert werden. In dieser Arbeit liegt ein besonderes Augenmerk auf den freien Fettsäuren, den Triacylglyceriden und den Sterolen.

Bei der Lipidresorption werden in den Enterozyten Chylomikronen hauptsächlich aus Triacylglyceriden und Apolipoproteinen gebildet. Sie gelangen über die Lymphbahn in den Blutkreislauf und dienen der Verteilung der Nahrungslipide. Im peripheren Gewebe hydrolysiert die membranständige Lipoproteinlipase (LPL) die TG in Glycerin und freie Fettsäuren, welche resorbiert werden. Die verbleibenden cholesterinreichen „Remnants“ gelangen zur Leber und werden über den „Low density lipoprotein“ (LDL)-Rezeptor in die Hepatozyten aufgenommen. Von der Leber synthetisierte TG und verestertes Cholesterin werden als VLDL in den Blutkreislauf abgegeben. Die TG werden von LPL hydrolysiert, und der prozentuale Gehalt an Cholesterin im Lipoprotein nimmt zu, sodass diese erst zu einem „Intermediate density lipoprotein“ (IDL) und später zu LDL werden. Die Funktion der LDL liegt in der Verteilung der Cholesterinester im Körper. Das gesamte Lipoprotein wird über rezeptorvermittelte Endozytose vom peripheren Gewebe aufgenommen. Dabei bestimmen die Expression und die Membranfusion des Rezeptors das Ausmaß der Resorption. Cholesterinester können vom peripheren Gewebe in das Blut abgegeben und über „High density Lipoproteine“ (HDL) im Blut zur Leber oder zu steroidhormonproduzierenden Zellen transportiert werden. [120]

### 2.2.1 Fettsäuren und Triacylglyceride

Triacylglyceride gehören zu den zusammengesetzten Lipiden und bestehen aus einem Glycerinmolekül, welches mit drei Fettsäuren verestert ist. Die TG und Fettsäuren haben im Körper vielfältige Aufgaben. Neben der Funktion der TG als Energiespeicher sind Fettsäuren der Hauptbestandteil biologischer Membranen und deren Derivate können als Botenstoffe oder Hormone agieren [12].

Die Lipide, welche mit der Nahrung aufgenommen werden, gelangen zunächst in den Magen, wo die Magenlipase die Fette emulgiert. Für die weitere Emulgation und Bildung von Mizellen sind das Gallen- und Pankreassekret notwendig. Die Gallensäuren wirken als Detergenzien und lösen die Lipide aus den Nahrungsbestandteilen heraus. Sie sind zusammen mit Cholesterin, 2-Monoacylglycerinen (MG) und Phospholipiden Bestandteile der gebildeten Mizellen. Dabei entstehen nach Hydrolyse durch die Pankreaslipase aus den TG die 2-Monoacylglycerine. Ein weiteres Enzym, die Phospholipase A<sub>2</sub> des Pankreas, hydrolysiert die letzte Fettsäurebindung, sodass das Glycerinmolekül und die Fettsäuren frei in Lösung vorliegen. In den Enterozyten der oralen Dünndarmanteile lagern sich die kurzkettigen Fettsäuren in die Zellmembran ein und können über einen Flip-Flop Mechanismus in das Zellinnere gelangen. Für langkettige Fettsäuren und das Glycerin existieren Transporter, welche die Resorption ermöglichen. Alle Fettsäuren werden im Enterozyten erneut mit Glycerin zu TGs verestert und über die o.g. Mechanismen in die Lymphe abgegeben [120].

Die Speicherung der TG erfolgt im Körper in Zellen des Fettgewebes - den Adipozyten - von welchen sie nach vorheriger Hydrolyse durch LPL aus dem Blut aufgenommen werden. Wenn der Körper mangels externer Energiezufuhr seinen Bedarf nicht deckt, kann er auf die internen Speicher zurückgreifen, und die TG werden in Fettsäuren und Glycerin hydrolytisch gespalten. An Albumin gebunden, werden diese Hydrolyseprodukte im Blut transportiert und das Glycerin in der Leber in die Glykolyse sowie die Fettsäuren im Mitochondrium der Zielzelle in die  $\beta$ -Oxidation gespeist. Bei diesem Prozess wird die Kohlenstoffkette zyklusweise verkürzt, und es entstehen Energieäquivalente, welche ihre Elektronen an die Atmungskette abgeben, um Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren. Bei einem Substrat- und Energieüberschuss können TG von der Leber und dem Fettgewebe synthetisiert werden. Grundbaustein der Fettsäuresynthese ist das Acetyl-CoA, welches aus dem Citratzyklus über die ATP-Citrat-Lyase in die Fettsäurebiosynthese eingeführt wird. Das synthetisierende Enzym stellt die Fettsäuresynthase dar, die zyklisch die Kohlenstoffkette verlängert. Dabei kann es nur Fettsäuren mit einer Länge von 16C-Atomen synthetisieren. Enzyme, welche der Elongation der 16C-Fettsäure zu langkettigen Fettsäuren dienen, heißen Elongasen [12,120]. Dabei hat das Enzym „Elongation of very long chain fatty acids protein 5“ (ELOVL5) eine Schlüsselfunktion in der Synthese langkettiger Fettsäuren [45]. Der Einbau von Doppelbindungen in die Kohlenstoffkette wird durch Desaturasen katalysiert. Die Stearoyl-CoA-Desaturase kann Doppelbindungen in 16C- und 18C-Fettsäuren einbauen. In mehreren Schritten verestern weitere Enzyme ein zuvor aktiviertes Glycerin mit den

Fettsäuren. Das synthetisierte Triacylglycerin wird im Adipozyten in Lipidtropfen des Zytosols gespeichert oder in der Leber an VLDL gebunden ins Blut abgegeben, um eine Akkumulation zu verhindern [12,120]. Die Biosynthese der Fettsäuren und TGs sowie der Abbau durch die  $\beta$ -Oxidation wird auf diversen Ebenen reguliert, um die Lipidhomöostase aufrecht zu erhalten. Eine Störung der Fettsäurenelongation kann zu einer hepatischen Steatose beitragen [98].

## 2.2.2 Cholesterin

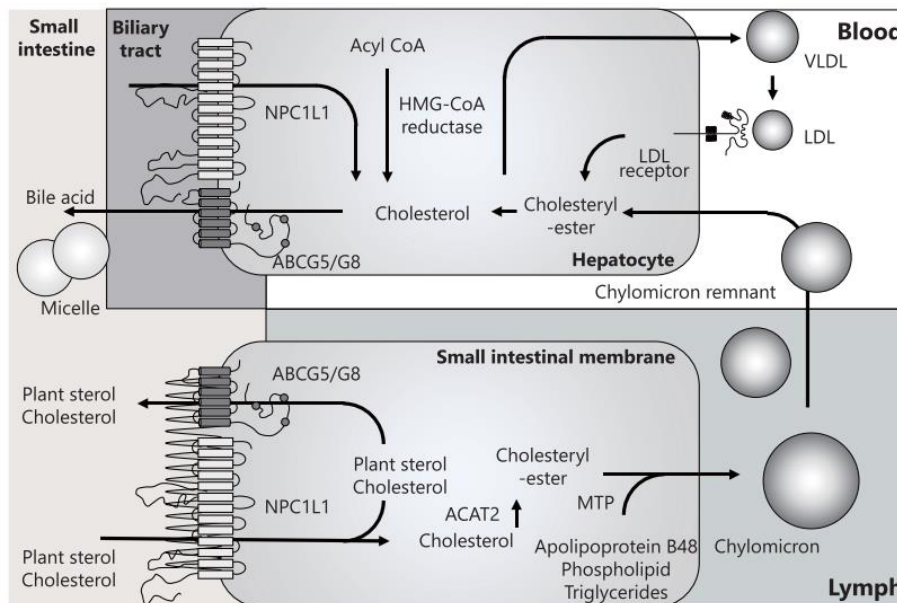
Cholesterin gehört zur Lipidklasse der Sterole und hat im menschlichen Organismus zahlreiche Funktionen. So ist es Membranbestandteil und verleiht dieser Fluidität, und dient als Grundbaustein zur Synthese weiterer Moleküle, wie z.B. Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren. [120]

### **Cholesterinstoffwechsel**

Im Darm werden die mit der Nahrung aufgenommenen Cholesterinester durch die Cholesterin-Esterase hydrolysiert und das Cholesterin wie auch pflanzliche Sterole durch den Niemann-Pick C1 like 1-Transporter (NPC1L1) über die apikale Membran in die Enterozyten aufgenommen. Bei einem Resorptionsüberschuss können diese über den „ATP-binding cassette subfamily G member 5 and 8“-Transporter (ABCG5/G8) in das Darmlumen zurückgegeben werden [137]. Cholesterin wird in der Darmmukosa erneut mit einer Fettsäure verestert, an Chylomikronen gebunden, in die Lymphe abgegeben und über das Blut zu den Zielorganen transportiert. Von der Leber werden die cholesterinreichen Chylomikronen-„Remnants“ sowie HDL und LDL aufgenommen und die Cholesterinester hydrolysiert. Das freie Cholesterin steht nun für den Transport über VLDL in die Peripherie oder die Gallensäuresynthese zur Verfügung, da ein Abbau zur Energiegewinnung nicht möglich ist [120] (Abbildung 1).

Bei einem Bedarf kann der Körper in vielen Zellen, jedoch hauptsächlich in der Leber Cholesterin synthetisieren. Acetyl-CoA liefert den Grundbaustein, wobei mehrere Moleküle in einzelnen Schritten zu einem Sterolgrundgerüst zusammengesetzt werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird von der Hydroxy-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMG-CoA) katalysiert und ist pharmakologischer Angriffspunkt zur Senkung des Cholesterinspiegels durch Statine [120]. In der Leber dient Cholesterin als Ausgangsmolekül für die Gallensäuresynthese. Dabei werden beim ersten Schritt in den Hepatozyten die primären Gallensäuren gebildet. Sie entstehen in mehreren Reaktionen durch enzymatische Modifikation des Cholesterins. Durch die Konjugation mit den Aminosäuren Glycin oder Taurin entstehen die konjugierten Gallensäuren. [120] Diese werden durch den ATP-

abhängigen ABCB11-Transporter an der kanalikulären Hepatozytenmembran gegen den Konzentrationsgradienten in die Gallenkanälchen abgegeben [39].



**Abbildung 1: Rolle der ABCG5/G8- und NPC1L1-Transporter im Sterolmetabolismus.** In der apikalen Membran der Enterozyten dient der NPC1L1-Transporter der Resorption von Sterolen und der ABCG5/G8-Transporter kann diese zurück in das Darmlumen sezernieren. Sterole werden in der Darmmukosa an Chylomicronen gebunden in die Lymphe abgegeben und gelangen anschließend in das Blut. Von der Leber werden diese sowie zirkulierende LDL-Partikel aufgenommen, und die Sterole können über den ABCG5/G8-Transporter in die Galle abgegeben werden. Der NPC1L1-Transporter kann in der kanalikulären Membran Sterole erneut in die Hepatozyten aufnehmen. [137]

### Gallensäurenstoffwechsel und enterohepatischer Kreislauf

Neben dem ABCB11-Protein, welches Gallensäuren transportiert, gibt es weitere hepatobiliäre Transporter die der Exkretion von Gallebestandteilen dienen. Phospholipide werden über den ABCB4- [131], freies Cholesterin über den ABCG5/G8- [154] und konjugiertes Bilirubin über den ABCC2-Transporter [66] neben Ionen und H<sub>2</sub>O ebenfalls in die Gallenkanälchen sezerniert. Die dadurch gebildete Lebergalle gelangt zur Speicherung in die Gallenblase und wird durch Konzentrierung zur Blasengalle [108]. Nach der Nahrungsaufnahme wird die Gallenflüssigkeit in das Duodenum abgegeben. Im Darm werden die primären Gallensäuren durch Enzyme des Darmmikrobioms zu sekundären Gallensäuren gespalten. Sie bilden Mizellen und wirken als Detergenzien, um Lipide aus den Nahrungsbestandteilen in Lösung zu halten. Über den enterohepatischen Kreislauf werden 90% der Gallensäuren im terminalen Ileum resorbiert und durch die Pfortader zur Leber transportiert. Dort resorbieren die Hepatozyten die Sterolderivate, welche erneut in die Kanälkuli sezerniert werden können [120].



## Pathophysiologie des Cholesterins

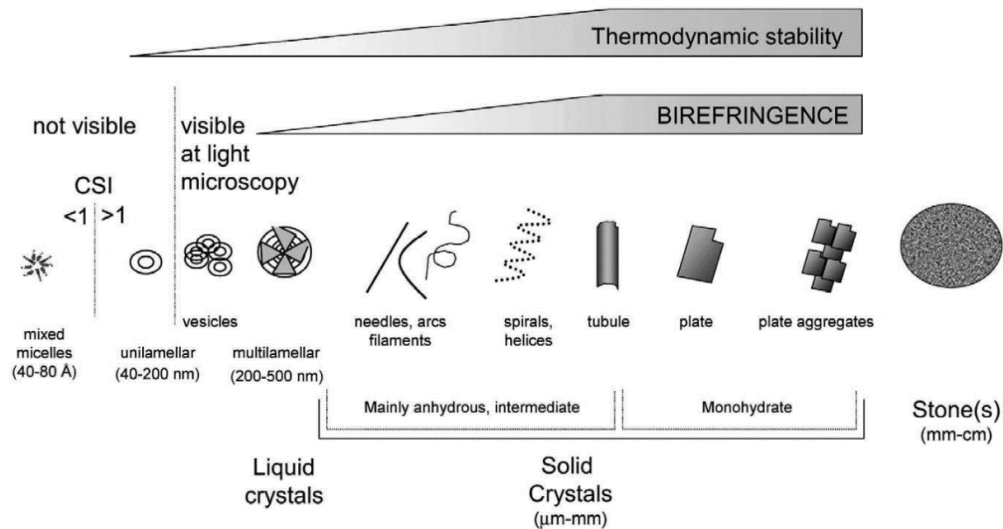
Neben seinen physiologischen Funktionen nimmt Cholesterin ebenfalls eine große Rolle in der Pathophysiologie von Krankheiten ein. Es kann an der Bildung von Gallensteinen, der familiären Hypercholesterinämie oder Pathogenese von Atherosklerose beteiligt sein. Dabei wird die variable Pathogenität durch eine übermäßige Akkumulation verursacht.

Die familiäre Hypercholesterinämie zeigt, wie essenziell die einzelnen Schritte im Cholesterinmetabolismus für den Organismus sind. Diese autosomal-dominant vererbte Erkrankung geht mit erhöhtem LDL-Cholesterin im Serum einher und kann auf der Veränderung unterschiedlicher Proteine im Cholesterinstoffwechsel beruhen [35]. In den meisten Fällen ist das Gen mutiert, welches für den LDL-Rezeptor kodiert [11]. Durch die verminderte LDL-Resorption steigt die LDL-Konzentration und mit ihm das Cholesterin im Blut an. Eine Mutation im Gen für das Apolipoprotein B führt ebenfalls zu einer verminderten Rezeptorbindung [104], und eine „Gain-of-function“-Mutation im Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (PCSK9)-Gen erhöht die Affinität von PCSK9 zum LDL-Rezeptor, sodass dieser vermindert in der Membran präsent ist und weniger LDL internalisiert werden kann [99]. Die Folge der erhöhten Cholesterinkonzentration im Blut ist die Bildung von atherosklerotischen Läsionen [69].

Die Atherosklerose ist eine klinisch relevante Manifestation und Ursache einer Vielzahl an Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), Herzinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit [11]. In der westlichen Welt ist die KHK die häufigste Todesursache [3]. Die Atherosklerose weist weiterhin auf die Bedeutung einer Cholesterinkristallbildung bei der Pathogenese und der Entwicklung systemischer Entzündungsreaktionen hin. Die klassische Theorie besagt, dass cholesterinreiche Lipoproteine an Stellen geschädigten Endothels die Barriere überwinden und sich in die Intima, der innersten Schicht der Gefäßwand, einlagern. Dies führt zur Einwanderung zirkulierender Monozyten in das Gewebe, wo sie zu ortsständigen Makrophagen werden, welche die LDL- und VLDL-Partikel internalisieren [120]. Es konnte gezeigt werden, dass freies Cholesterin in den Makrophagen in Form solider Cholesterinkristalle akkumuliert [139]. Dadurch wandeln sich diese in Schaumzellen um und geben Entzündungsmediatoren ab, die weitere Monozyten rekrutieren. Es erfolgt ein Umbau der Gefäßwand mit Einwanderung von glatten Muskelzellen und Bildung von Kollagen. Im Verlauf der Krankheitsprogression enthalten die gebildeten größtenprogreredienten Plaques einen nekrotischen Kern aus Schaumzellen und CC [120].

Ein alternativer Weg wurde von Baumer et al. [9] vorgeschlagen. In Zellkultur mit humanen Aortenendothelzellen sowie in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen unter hypercholesterinämischen Bedingungen konnten sie bereits nach einer Woche CC in Endothelzellen detektieren, noch bevor Makrophagen eingewandert waren. Sie gehen davon aus, dass die Endothelzellen die LDL-Partikel prozessieren und die intrazelluläre Cholesterin-Flüssigkristallbildung die Integrität beeinflusst, was die

Makrophageninvasion in das Gewebe erleichtern und die Atherosklerose vorantreiben könnte. Schon Sarig et al. [127] stellten 1995 fest, dass LDL-Partikel in der Gefäßwand zur Bildung von Flüssigkristallen führen. Freigang et al. [37] konnten zeigen, dass CC eine Entzündung über die Aktivierung des NLRP3 („NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3“-Inflammasoms und des für oxidativen Stress sensiblen Transkriptionsfaktors Nrf2 vorantreiben.



**Abbildung 2: Cholesterinkristallisation in der Gallenflüssigkeit.** Darstellung der verschiedenen Cholesterinkristallarten in der Gallenflüssigkeit nach Größe und Eigenschaft der Doppelbrechung unter polarisiertem Licht [116].

Die Entstehung der CC ist im Rahmen der Cholezystolithiasis - einer Erkrankung, bei der Cholesterin ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt - genauer untersucht worden. Hier geht die Pathogenität von festen Kristallen aus. Umweltfaktoren sowie genetische Risikovarianten führen zur Gallensteinerkrankung, bei welcher neben der Übersättigung der Galle mit Cholesterin auch die Gallenblasenhypomotilität und Proteine der Galle ursächlich sind [110]. Admirand und Small konnten schon 1968 zeigen, dass der physikalische Zustand der Galle von den Konzentrationen der Einzelkomponenten abhängig ist und von diesen die Löslichkeit des Cholesterins bestimmt wird [1]. Eine Messgröße ist der Cholesterinsättigungsindex (CSI), welcher durch das Verhältnis der Cholesterinkonzentration einer Galleprobe und des maximal löslichen Cholesterins in einer Modellgalle bestimmt wird. Portincasa et al. [116] beschrieben die verschiedenen Arten der Cholesterinkristallisation anhand ihrer mikroskopischen Kristallisation, welche von der Gallenzusammensetzung abhängig ist (Abbildung 2). Dabei können je nach Gallenzusammensetzung die unterschiedlichen Kristalle zeitgleich vorliegen oder auseinander hervorgehen. Ist der CSI Wert  $<1$ , so liegen die Gallenkomponenten physiologisch in mizellarer Form vor. Wenn der CSI über 1 steigt, z.B. durch vermehrte Cholesterinsekretion oder verminderte Gallensäuren- oder Phospholipidsekretion, beginnt die Kristallisation. Flüssigkristalle bestehen aus unilamellären Aggregaten, welche sich im Mikroskop mit

einer charakteristischen Doppelbrechung als „Malteserkreuze“ darstellen. Aus diesen bilden sich feste Cholesterinmonohydrat-Kristalle die mit Nadeln, Röhren oder Platten im Mikrometerbereich bis hin zu mehreren Zentimetern großen Gallensteinen verschiedene Formen annehmen können.

Neben der Gallensteinpathologie konnte in Studien gezeigt werden, dass die Cholesterinakkumulation auch in der Leber eine schädigende Wirkung ausübt. Oren et al. [106] und Arguello et al. [6] arbeiteten verschiedene Mechanismen heraus, wie Cholesterin eine NASH-Entwicklung begünstigt. Die Cholesterinakkumulation führt zu einer „Sterol regulatory element-binding protein“ (SREBP-2)-Aktivierung, welche die Entzündungsentwicklung und hepatische Fibrose fördert. Dieser Effekt kommt auch durch die Stimulation von hepatischen Sternzellen und Kupffer-Zellen durch freies Cholesterin zustande. Über die Anreicherung in Mitochondrien bewirkt es eine Verminderung des mitochondrialen Glutathions, ein Antioxidanz welches reaktive Sauerstoffspezies verhindert und die Zelle vor Organellendysfunktion und Zelltod schützt. Dies hat zur Folge, dass die Hepatozyten vermehrt oxidativem Stress und insbesondere die Mitochondrien oxidiertem Cardiolipin ausgesetzt sind, das über weitere Proteinkaskaden den Zelltod auslösen kann. In einer weiteren Zellorganelle, dem ER, löst akkumuliertes Cholesterin ER-Stress, eine dysregulierte Calcium-Homöostase und Apoptose aus. Unabhängig von Organellen konnte gezeigt werden, dass Cholesterin in der Leber weiterhin zur HIF-1 $\alpha$ -Aktivierung (engl. „Hypoxia-inducible factor“) führt, das inflammatorische Prozesse in der Zelle induziert. Der hypoxiesensible Transkriptionsfaktor wird durch einen verminderten Sauerstoffgehalt aktiviert, welcher durch den erhöhten Cholesteringehalt in der Zellmembran bedingt ist, der die Löslichkeit und Diffusion von Sauerstoff durch die Membran erschwert. Ioannou et al. [60,63] konnten in ihren Studien zeigen, dass CC, welche sich in der Leber durch eine cholesterinreiche Diät bilden, zu Entzündungsreaktionen führen und somit die NASH von der Steatose abgrenzen.

### 2.2.3 Regulation des Lipidstoffwechsels

Für die Homöostase des Lipidstoffwechsels ist ein Gleichgewicht zwischen der Synthese und dem Abbau von Fetten essenziell. Die Regulation kann dabei auf hormoneller Ebene via Insulin und Glukagon oder auf transkriptioneller Ebene der beteiligten Enzyme stattfinden. Hormone wie Glukagon oder Adrenalin führen im Stoffwechsel zu katabolen Vorgängen, und Insulin stimuliert als Reaktion auf einen Energieüberschuss die anabolen Stoffwechselwege [120]. Auf transkriptioneller Ebene übernehmen bestimmte Proteine regulatorische Funktionen, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

Zentrales Element ist SREBP, welches als Transkriptionsfaktor neben den Enzymen der Fettsäuresynthese auch die Transkription der Gene der Cholesterinbiosynthese reguliert [18]. Die Signalkaskade läuft dabei wie folgt ab: Das Vorläuferprotein wird synthetisiert und in der Membran des ER verankert. Über einen vesikulären Transport erreicht es den Golgi-Apparat und wird als Reaktion

auf Stimuli durch Proteasen abgespalten. Das SREBP-Molekül gelangt nun in den Zellkern, kann an das „Sterol regulatory element“ auf der DNA vor bestimmten Genabschnitten binden und die Transkription initiieren. [120] Zur SREBP-Familie gehören drei Proteine: SREBP-1a, -1c und -2, welche von zwei verschiedenen Genen transkribiert werden und unterschiedliche Stoffwechselwege beeinflussen [18]. SREBP-1c ist als regulatorischer Transkriptionsfaktor an der Fettsäurebiosynthese beteiligt und wird durch Insulin über den „Liver-X-receptor“ (LXR) stimuliert [128]. Die chronische Überexpression von SREBP-1a führte in einem Mausmodell zur hepatischen Steatose, die durch erhöhte Konzentrationen an TG und Cholesterinestern in der Leber charakterisiert ist [129]. SREBP-2 beeinflusst hauptsächlich Gene, welche für Enzyme des Cholesterinstoffwechsels kodieren und wird durch den Gehalt an Cholesterin in der Zelle reguliert. Ein Cholesterinüberschuss unterbindet die Abspaltung und somit die Translokation in den Zellkern, was die Cholesterinbiosynthese und die LDL-Aufnahme inhibiert. [18] Zentraler Angriffspunkt ist das Gen der HMG-CoA-Reduktase, des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese [12].

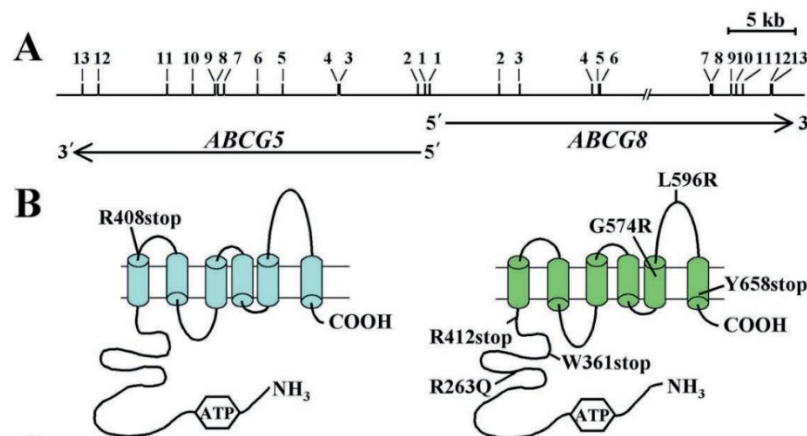
Das „Carbohydrate response element-binding protein“ (ChREBP) wird vom *Mlxipl*-Gen (MLX interacting protein like) kodiert und ist ein Transkriptionsfaktor, welcher neben dem Lipidstoffwechsel auch im Kohlenhydratstoffwechsel regulatorische Funktionen ausübt. Er bindet an das „Sterol regulatory element“ von diversen Genen im Kohlenhydratstoffwechsel, aber auch von Genen des Lipidstoffwechsels, welche die ATP-Citrat-Lyase, Fettsäuresynthase, Acetyl-CoA-Carboxylase und Stearoyl-CoA-Desaturase kodieren. Auf die Bedeutung für den Stoffwechsel weist eine hepatische Steatose hin, die durch eine *ChREBP*-Überexpression hervorgerufen werden kann [10].

## 2.3 ABCG5/G8-Transporter

Der heterodimere ABCG5/G8-Transporter gehört zur Familie der ABC-Transporter und dient der Exkretion von Sterolen [154]. Er wird in drei verschiedenen Organen im Körper exprimiert. In der Leber befindet er sich in der kanalikulären Membran des Hepatozyten und transportiert Sterole in die Gallenflüssigkeit. Weiterhin wird er im Epithel der Gallenblase exprimiert, wobei seine Lokalisation nicht strikt apikal ist. Im Darm ist der Transporter an der apikalen Membran im Bürstensaum der Enterozyten für die Exkretion von Sterolen verantwortlich. [75]

Das Homodimer eines ABC-Transporters besteht aus vier Domänen, wobei zwei in der Membran lokalisiert sind und zwei weitere auf der zytosolischen Seite der ATP-Bindung dienen. Diese sind als „ATP-binding cassettes“ (ABC) namensgebend für den Transporter. ABC-Transporter können bei Eukaryoten unter Energieverbrauch eine Vielzahl an Stoffen von intra- nach extrazellulär schleusen, von Ionen bis hin zu komplexeren Molekülen wie Proteinen, Zuckern oder Lipiden [67]. Die ABCG-

Transporter bilden eine Untergruppe der ABC-Transporter, von denen es beim Menschen weitere fünf Untergruppen gibt. Die beiden ABCG5- und ABCG8-Halbtransporter bestehen aus jeweils einer Transmembrandomäne und einer ATP-Bindungsdomäne [13]. Sie formen ein Heterodimer, welches für die Funktion essenziell ist (Abbildung 3) [41]. Dieser wird im ER synthetisiert und transzellulär über das Golgi-Netzwerk zur apikalen Membran transportiert [40]. Dass die Heterodimerisation für den ER-Exit notwendig ist, konnten Hirata et al. zeigen [55]. Auch Graf et al. [41] gingen von einer für die Funktion wichtigen Heterodimerisation der beiden Transporter aus, jedoch berichteten Klett et al. [75] auch über eine homodimere Lokalisation innerhalb der Zelle.



**Abbildung 3: Struktur des ABCG5/G8-Transporters.** **A:** Lokalisation des *ABCG5*- und *ABCG8*-Gens auf Chromosom 21 in einer Kopf-an-Kopf Position mit einem Abstand von 374 Basenpaaren und einem gemeinsamen bidirektionalen Promoter. **B:** Schematische Struktur der zwei Halbtransporter mit jeweils einer Transmembrandomäne und einer N-terminalen ATP-Bindungsdomäne. Mutationen bei Patienten mit Sitosterolämie sind schematisch im *ABCG5*-Transporter (blau) und *ABCG8*-Transporter (grün) gekennzeichnet. [13]

Die klinische Relevanz des ABCG5/G8-Transporters erklärt sich durch seine Funktion diätische und eigens synthetisierte Sterole auszuschleiden [154]. Ein kompletter Transporter Knock-Out im Tiermodell zeigt die Auswirkungen eines Fehlen des Transporters auf den Organismus: Er führt im Darm zu einer zwei- bis dreifach gesteigerten Absorption von Pflanzensterolen und daraus resultierend zu erhöhten Pflanzensterolkonzentrationen im Serum sowie in der Leber zu einer Cholesterinakkumulation und verminderter Cholesterinkonzentration in der Gallenflüssigkeit [154]. Das phänotypische Erscheinungsbild des Transporterdefektes ist die autosomal-rezessiv vererbte Sitosterolämie, welche erstmals 1974 von Bhattacharyya und Connor beschrieben wurde [14]. Neben der oben erläuterten Lipiddysbalance im Serum der Patienten zeichnen sich diese durch das Auftreten von Xanthomen aus [137]. Im kardiovaskulären System manifestiert sich die Sitosterolämie durch eine frühzeitige Atherosklerose [8]. Bisher sind nur 100 Fälle bekannt, die Dunkelziffer ist aber wahrscheinlich hoch, sodass die Prävalenz auf 1:200.000 geschätzt wird [136]. Auf der Suche nach dem genetischen Ursprung konnten Patel et al. [109] durch Genotypisierung von zehn betroffenen Familien den Chromosomenabschnitt 2p21 als ursächlich lokalisieren. Weitere Untersuchungen von Berge et al. [13]

rückten „Nonsense“- und „Missense“-Mutationen des dort lokalisierten ABCG5/G8-Transporters in den Fokus. Aktuell sind über 80 verschiedene Varianten bei Sitosterolämie-Patienten bekannt, wie Bastida et al. [8] zusammenfassten.

Neben der Sitosterolämie sind weitere Erkrankungen mit Polymorphismen des *ABCG5/G8*-Gens bekannt, wobei die p.D19H-Variante besondere klinische Relevanz als Risikofaktor für Gallensteine hat. Eine genomweite Assoziationsstudie zur Identifizierung von SNPs bei Gallensteinleiden von Buch et al. [20] und Kopplungsanalysen bei betroffenen Geschwistern von Grünhage et al. [46] konnten diese Variante (rs11887534) im *ABCG8*-Gen als Risikomutation für die Bildung von Gallensteinen identifizieren. Studien weisen auf eine „Gain-of-function“ hin, welche zu einer erhöhten Cholesterinsekretionsrate in die Galle und das Intestinum führt [46,121]. Die erhöhte Sterolkonzentration in der Gallenflüssigkeit begünstigt die Gallensteinbildung. Neben dem Gallensteinrisiko konnten Koeijvoets et al. [77] dieser Variante ein erhöhtes Risiko für die koronare Herzkrankheit zuschreiben.

Die Studien zu den verschiedenen Erkrankungen unterstreichen die Bedeutung des ABCG5/G8-Transporters für die Sterolexkretion im Organismus und zeigen auf, dass eine Transporterdysfunktion sich auf unterschiedliche Art und Weise manifestieren kann.

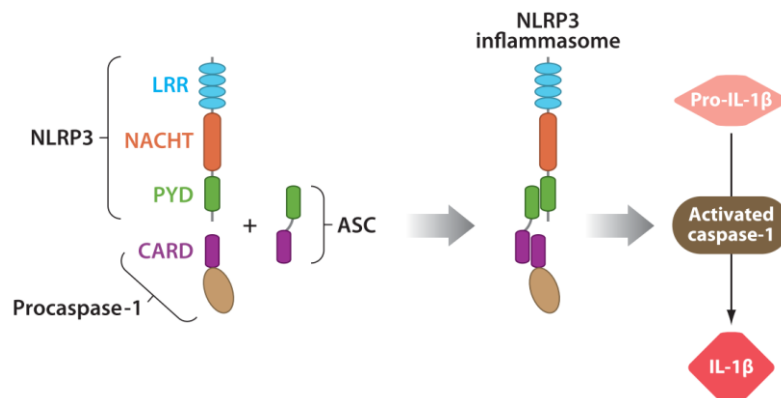
## 2.4 NLRP3-Inflammasom

In der Leber spielt die sterile Entzündungsreaktion eine Rolle bei der Pathogenese der NASH. Kupffer-Zellen, die leberspezifischen Makrophagen, sind ein wichtiger Produzent von Caspase-1 bei der NASH [32]. Über Genexpressionsanalysen konnten Wree et al. [49,149] zeigen, dass das NLRP3-Inflammasom sowie die Effektorzytokine Il-1 $\beta$  und Il-18 in der Leber bei der NASH vermehrt exprimiert werden und dass die Inflammasomaktivierung zu einer verstärkten Entzündung durch Neutrophilen-Einwanderung führt [150]. Umgekehrt konnte ein NLRP3 Knock-Out eine NASH in Zellkultur verhindern [22]. Dass dieser Knock-Out ebenfalls antiinflammatorische Effekte hat [149], zeigt, dass die sterile Entzündungsreaktion am Progress der NASH und der Fibrogenese beteiligt ist.

Das NLRP3-Inflammasom ist der zentrale Mediator der sterilen Entzündungsreaktion. Nicht nur in der Leber, auch in vielen weiteren Organen wie Gehirn, Lunge, Gefäße und Gelenke ist die sterile Entzündung ein entscheidender Punkt in der Pathogenese von Krankheiten. Neben der infektiösen Entzündungsreaktion, welche der Inaktivierung und Elimination von Krankheitserregern dient, kann die Reaktion auf sterile Reize ebenfalls eine schädigende Wirkung auf den Organismus ausüben. Sterile Substanzen schädigen per se oftmals den Wirt nicht, können jedoch selten erfolgreich eliminiert werden,

wodurch eine inflammatorische Reaktion angestoßen wird, die auf gesunde Zellen übergreifen kann. Das Resultat sind chronische Entzündungen, welche Erkrankungen induzieren oder diese aggravierern. [123]

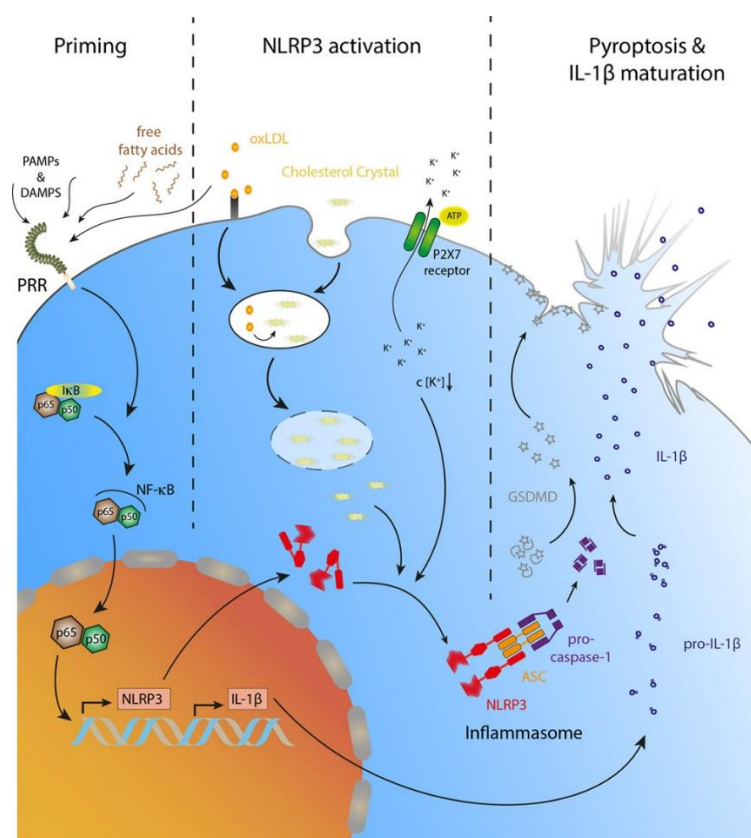
Im Rahmen von Entzündungsreaktionen im menschlichen Organismus spielen Zytokine als Mediatoren des Immunsystems eine wichtige Rolle. Das Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ist dabei für die Fieberreaktion sowie Aktivierung von Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen verantwortlich [17]. Es wird von verschiedenen Zellen wie Monozyten, gewebsspezifischen Makrophagen, dendritischen Zellen sowie von B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert [31]. Immunantworten unterliegen physiologisch einer strengen Kontrolle, die auf verschiedenen Ebenen greift. Die Kontrolle des IL-1 $\beta$  erfolgt bei der Genexpression, Proteinmodifikation, Prozessierung und Sekretion [31]. Die Prozessierung von inaktivem Pro-IL-1 $\beta$  zu biologisch aktivem IL-1 $\beta$  wird dabei durch Caspase-1 katalysiert (Abbildung 4).



**Abbildung 4: NLRP3-Inflammasom.** Der Multiproteinkomplex besteht aus dem NLRP3-Sensorprotein („NOD-, LLR- and pyrin domain-containing protein 3“), der Pro-Caspase-1 und dem ASC-Protein (engl. „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“). Das Sensorprotein besteht aus einer „leucin-rich repeat region“ (LRR), der NACHT und einer Pyrin-Domäne (PYD). Bei Aktivierung bindet NLRP3 über PYD an ASC und bindet seinerseits über CARD (engl. „caspase activation and recruitment domain“) die Pro-Caspase-1. Die Selbstspaltung des Pro-Enzyms führt zur aktiven Form, welche Pro-IL-1 $\beta$  in das aktive IL-1 $\beta$  überführt [123].

Dieses Enzym ist in seiner inaktiven Form, der Pro-Caspase-1, Teil eines zytosolischen Multiproteinkomplexes, dem NLRP3-Inflammasom. Das Inflammasom besteht aus drei Proteinmolekülen, welche bei Aktivierung ein Multimer bilden. Neben der Pro-Caspase-1 gehören das NLRP3-Sensorprotein und das Adapterprotein ASC (engl. „apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“) dazu. Das Sensorprotein, welches durch intra- oder extrazelluläre Trigger aktiviert werden kann, bindet dabei das ASC-Protein mit seiner Pyrin-Domäne (PYD). Es rekrutiert wiederum über CARD (engl. „caspase activation and recruitment domain“) die Pro-Caspase-1. Dieser Schritt führt zur Selbstspaltung und Aktivierung des Enzyms [84].

Neben Infektionen oder einem Gewebeschaden können Metaboliten die Inflammasom-Assemblierung initiieren. Dabei sind zwei Schritte notwendig: Zunächst muss ein „Priming“ der Zelle erfolgen, damit diese im zweiten Schritt adäquat auf diverse Trigger reagieren kann [84] (Abbildung 5). Die Induktion der Genexpression von NLRP3 und Pro-IL-1 $\beta$  wird dabei durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (engl. „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells“) stimuliert. NF- $\kappa$ B wird seinerseits durch Ligandenbindung an diverse membranständige Rezeptoren wie TLR, den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptor oder den IL-1-Rezeptor (IL-1R) aktiviert [134]. Das posttranskriptionelle „Priming“ erfolgt über TLR- und durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-induzierte Deubiquitinierung, welches den Abbau über das Proteasom verhindert [68]. Im zweiten Schritt wird das NLRP3-Inflammasom über diverse Substanzen aktiviert. Zu den exogenen Aktivatoren zählen Bakterien, Viren, extrazelluläres ATP und Poren-formende Toxine [141].



**Abbildung 5: Aktivierungsmechanismen des NLRP3-Inflammasoms.** Für die Inflammasom-Aktivierung sind zwei Signale notwendig: Das erste „Priming“ induziert die Transkription und Translation von *NLRP3*- sowie *IL-1 $\beta$*  und wird ausgelöst durch PAMPs (engl. „pathogen-associated molecular pattern“) oder DAMPs (engl. „damage-associated molecular pattern“), welche an PRR (engl. „pattern-recognition-receptor“) binden und über NF- $\kappa$ B (engl. „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells“) die Kaskade initiieren. Das zweite Signal induziert die NLRP3-Assemblierung und wird durch diverse Substanzen, u.a. Kristalle, induziert. Der Effekt ist die Spaltung von Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form. [44]

Kristalle, welche phagozytiert wurden, stellen endogene Stimuli dar. Im Rahmen der Gichtkrankung konnte gezeigt werden, dass Uratkristalle das NLRP3-Inflammasom aktivieren [91]. Silikat und Asbest



induzieren ebenfalls über NLRP3 eine Il-1 $\beta$  Antwort [24]. In Makrophagen können Cholesterinkristalle über eine lysosomale Schädigung und Cathepsin B-Austritt ins Zytosol zur Inflammasom-Aktivierung führen [34,118]. Dies zeigt, dass die Kristalle nicht direkt das Inflammasom aktivieren, sondern weitere Schritte zwischengeschaltet sind. Neben der bereits erwähnten lysosomalen Destabilisierung und Cathepsin wurde von Zhou et al. [156] ROS und der mitochondrialen Dysfunktion eine wichtige Rolle zugeschrieben. Weiterhin konnte der Porenbildner Pannexin-1 als notwendig für die Prozessierung von Caspase-1 identifiziert werden [111].

Neben den Aktivatoren des Inflammasoms gibt es auch Mechanismen, welche die Inflammasom-Kaskade reprimieren. Latz et al. [84] berichteten, dass T-Zellen über die Interferon- $\gamma$  Produktion die NO-Synthase stimulieren und das gebildete Stickstoffmonoxid die NLRP3-Aktivität hemmt. Neben endogenen Inhibitoren stellt das NLRP3-Inflammasom auch ein pharmakologisches Ziel im Rahmen von entzündlichen Krankheiten dar. Bei autoinflammatorischen Erkrankungen, bei denen Bestandteile des NLRP3-Inflammasom mutiert und überaktiv sind, können Il-1-Rezeptorantagonisten (Anakinra) oder Antikörper gegen Il-1 $\beta$  (Canakinumab) eingesetzt werden [79,81].

## 2.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Verständnis über den ABCG5/G8-Transporter dahingehend auszubauen, welche Funktion der intestinale und hepatische Transporter sowie die p.D19H-Variante, die mit der Bildung von Gallensteinen assoziiert ist, ausüben. Sie kann als Grundlage dienen, um für Patienten mit einem hohen Gallensteinrisiko gezielte Präventionsmaßnahmen und Therapiemöglichkeiten zu etablieren. Dabei sollen im Tiermodell gewebsspezifische Transporter Knock-Outs und der p.D19H-Polymorphismus des *Abcg8*-Gens untersucht werden. Um einen Einfluss der Ernährung festzustellen, werden die transgenen Mäuse in zwei Fütterungsgruppen eingeteilt, wobei eine Gruppe die normale Fütterung und die andere eine fettreiche Diät erhält. Die Auswirkung der Transportermodifikation auf histologischer Ebene soll anhand der Lebergewebestruktur, der Neutralfettakkumulation und der Bildung von Cholesterinkristallen untersucht werden. Genexpressionsanalysen des NLRP3-Inflammasoms und des Zytokins Interleukin-1 $\beta$  sowie die Analyse von Serum-surrogatmarkern für die Leberschädigung dienen dazu, die Auswirkungen der Kristallbildung auf die sterile Entzündungsreaktion zu determinieren. Um das Verständnis über den Einfluss der Transportermodifikation auf den Lipidstoffwechsel und die Lipidzusammensetzung der Leber zu erweitern, werden eine Lipidomanalyse und eine Genexpressionsanalyse der regulatorischen Proteine und Schlüsselenzyme des Lipidstoffwechsels durchgeführt.

## 3 Material und Methoden

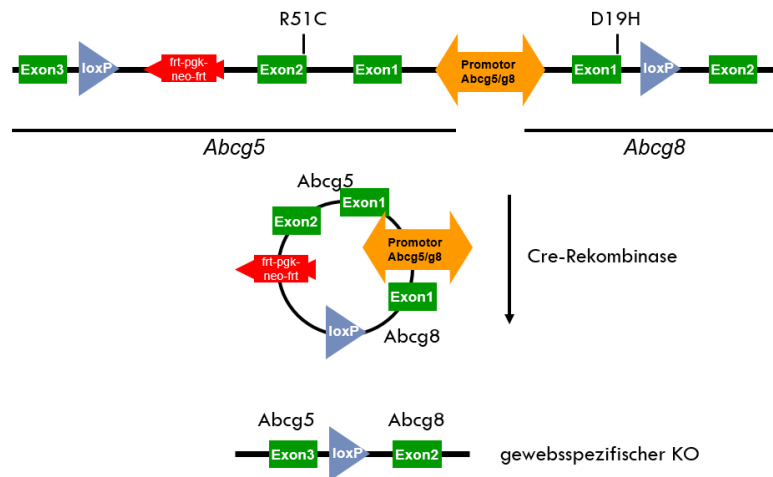
### 3.1 *Abcg5/g8*-Mausmodell

In dieser Arbeit wurden verschiedene transgene *Abcg5/g8*-Mausmodelle auf dem C57Bl/6J-Hintergrund verwendet. Dabei kamen folgende Mauslinien zum Einsatz, welcher in der Arbeitsgruppe generiert wurden:

- Leberspezifisch defiziente *Abcg5/g8*-Mäuse (HepKO)
- Dünndarmspezifisch defiziente *Abcg5/g8*-Mäuse (IntKO)
- *Abcg5/g8*-Knock-In Mäuse (KI)
- C57Bl/6J Wildtyp Mäuse als Kontrollen (WT)

Um die gewebsspezifischen Knock-Out Mäuse zu generieren, wurde das Prinzip der Cre-loxP Rekombination genutzt. Cre-Rekombinase spezifische Erkennungssequenzen (loxP-Sequenzen) wurden im *Abcg5*-Gen zwischen Exon 2 und 3 und im *Abcg8*-Gen zwischen Exon 1 und 2 eingebracht. Das Enzym schneidet das DNA-Segment zwischen zwei Sequenzen heraus. Um die gewebsspezifische Exzision des *Abcg5/g8*-Gens zu erreichen, wurde für den hepatischen Knock-Out das Gen für die Cre-Rekombinase in das Albumin-Gen eingebracht. Ein in das Villin-Gen eingebrachtes Cre-Rekombinase-Gen führte zum intestinalen Knock-Out. Dadurch wird das DNA exzidierende Enzym nur in den Geweben exprimiert, in welchen Albumin bzw. Villin ebenfalls exprimiert werden. Dies ist das Prinzip der konditionalen Mutagenese [43].

Die *Abcg5/g8*-Knock-In Maus stellt die dritte transgene Linie dar. Mit diesem Modell wurde die menschliche Genommutationsvariante p.D19H im *Abcg8*-Gen simuliert, welche signifikant mit dem Gallensteinleiden assoziiert ist [28]. Über BAC (engl. bacterial artificial chromosome)-vermittelte Rekombination wurden zwei SNP in das *Abcg5/g8*-Gen eingebracht. Im Exon 2 des *Abcg5*-Gens befindet sich der Polymorphismus p.R51C und im Exon 1 des *Abcg8*-Gens liegt der Polymorphismus p.D19H (Abbildung 6). Nach Einbringen des Vektors über Elektroporation in embryonale Stammzellen und Injektion der selektierten Klone in Blastozysten wurden diese in pseudoschwangere Mäuse implantiert. Die chimären Nachkommen wurden in mehreren Schritten verpaart, und es entstanden die homozygoten Knock-In Mäuse. (Abbildung 6)



**Abbildung 6: Lokalisation der eingebrachten p.R51C und p.D19H Polymorphismen im *Abcg5/g8*-Gen.** Die Cre-Rekombinase erkennt spezifisch die loxP Sequenzen und exzidiert den dazwischenliegenden DNA-Abschnitt. Quelle: Dr. S. Weber

In dieser Arbeit wurden für die Untersuchungen jeweils 12 Tiere pro Genotyp (WT, IntKO, HepKO, KI) und Fütterung (Chow oder lithogene Diät) herangezogen. Die Haltungstemperatur lag bei  $22\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , und es wurde ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus festgelegt (5-17 Uhr). Ab dem Zeitpunkt des Absetzalters von 21 Tagen begann die spezielle Fütterung der Mäuse in der Diät-Gruppe. Das verwendete Futter wurde von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest hergestellt. Es enthielt 15 % Butterfett, 1 % Cholesterin, 0,5 % Cholsäure, 2 % Maisöl, 50 % Rohrzucker, 20 % Kasein, Mineralien und Vitamine. Die Mäuse wurden 12 Wochen lang mit dieser Diät gefüttert und im Alter von 15 Wochen getötet.

### 3.2 Histologie

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen wurden aus dem Lebergewebe von drei männlichen sowie drei weiblichen Mäusen pro Genotyp und Fütterung (insgesamt 48 Tiere) Kryostatschnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte mit Haematoxylin und Eosin gefärbt, um die Leberstruktur zu beurteilen. Weitere Schnitte wurden mit Oil Red O (ORO) gefärbt, um Neutralfette sichtbar zu machen und zusätzlich wurden die Nativpräparate unter polarisiertem Licht betrachtet. Dabei wurden CC in Form von Malteserkreuzen erkennbar. Alle Präparate wurden mit dem Mikroskop DM5000 B (Leica) betrachtet und mit der Kamera DFC420 C von Leica fotografiert. Die Bilder wurden durch das Programm Leica Application Suite 4.5 verarbeitet und die Bildanalyse erfolgte durch die Software Fiji (ImageJ).

### 3.2.1 Anfertigung der Kryostatschnitte

Eine Art der Gewebefixierung stellt das Gefrieren dar. Dabei werden die biochemischen Vorgänge direkt unterbrochen, und die Architektur bleibt weitestgehend erhalten. Wichtig ist das unmittelbare Einfrieren des Gewebes, um Prozesse wie Autolyse, Austrocknung und Änderungen des Milieus zu verhindern. Diese würden sich negativ auf die Präparatqualität auswirken. Das schnelle Gefrieren vermeidet ebenfalls die Bildung von Eiskristallen. Die Technik des Gefrierschnittes, bei welcher das eingebettete Gewebe in einem gekühlten Mikrotom geschnitten wird, findet heutzutage als Schnellschnitt Einsatz in der Histopathologie [102].

	Produktname	Hersteller
<b>Geräte</b>	Kryomikrotom CM1950	Leica
<b>Reagenzien</b>	O.C.T. <sup>TM</sup> Compound	Tissue-Tek <sup>®</sup>
<b>Material</b>	Cryomold <sup>®</sup> Einbettschälchen	Tissue-Tek <sup>®</sup>
	SuperFrost <sup>®</sup> Plus Objektträger	R.Langenbrinck GmbH

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Materialien zur Anfertigung der Kryostatschnitte.**

Teil der Arbeit war es, die Leberstruktur, CC und Neutralfettverteilung zu beurteilen. Bei der Anfertigung der Kryostatschnitte wurde zunächst ein Teil der gefrorenen Leber umgebettet und im Kryomikrotom in 5 µm dünne Schnitte geschnitten. Während der Umbettung lagerten die Organe in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Zunächst wurde ein Skalpell mit DEPC-Wasser gereinigt und durch leichten Druck auf das gefrorene Lebergewebe ein ca. 1 cm<sup>3</sup> großes Stück abgetrennt. Dieses wurde mit OCT-Medium in einer Cryomold<sup>®</sup> Schale eingebettet. Es war darauf zu achten, dass das OCT-Medium das Gewebe vollständig bedeckt und keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Dieses Gefriermedium eignet sich besonders, da es bei niedrigen Temperaturen das Gewebe stabilisierte, wasserlöslich war und keinen Einfluss auf die Färbung hatte [83]. Die Schale wurde in Aluminiumfolie verpackt, bei -20 °C heruntergekühlt und anschließend langsam in flüssigen Stickstoff getaucht. Zwischen den einzelnen Proben wurde das Skalpell mit DEPC-Wasser gereinigt. Eine Lagerung der Blöcke erfolgte bei -80 °C im Gefrierschrank.

Für die Herstellung der Dünnschnitte wurde mit -21 °C in der Mikrotomkammer eine optimale Arbeitstemperatur geschaffen. Der Gewebeblock wurde auf dem Gefriertisch mit OCT-Medium befestigt und für einige Minuten temperiert. Nach dem Schneiden in 5 µm dünne Schnitte wurden diese auf einen ungekühlten SuperFrost<sup>®</sup>Plus Objektträger übernommen und für ca. 30 min an der Luft

getrocknet. Pro Probe wurden 5 Objektträger mit jeweils 2 Schnitten belegt. Die Objektträger wurden bei -80 °C bis zur Färbung oder direkten mikroskopischen Betrachtung gelagert.

### 3.2.2 HE-Färbung

Die Färbung von Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin wurde 1876 von Wissowsky etabliert und ist eine Übersichtsfärbung zur Beurteilung von Gewebestruktur, Zellkern und Zytoplasma [83]. Die Färbung besteht aus Eosin, welches Zytoplasma, Bindegewebe und Kollagen rot anfärbt, und aus Hämatoxylin. Der färbende Stoff beim Hämatoxylin ist allerdings eine Komplexverbindung aus Alaunsalzen und Hämatein, dem Oxidationsprodukt des Hämatoxylins. Erhältlich ist das saure Hämalaun nach Mayer, welches zu einer selektiven blauen Kernfärbung führt [102].

Reagenz	Hersteller
Aceton	Otto Fishar GmbH
0,2% Eosin-Färbelösung (0,2 g Eosin G in 100 ml dest. H <sub>2</sub> O)	Roth
Hämalaun nach Mayer	Sigma
Isopropanol (100%, 96%, 70%)	Sigma
Xylol	Otto Fishar GmbH
Entellan	Roth
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck

**Tabelle 2: Übersicht über die bei der HE-Färbung verwendeten Reagenzien.**

Zu Beginn wurden die Schnitte 5 min lang in Aceton fixiert. Darauf folgte eine dreiminütige Färbung in Hämalaun nach Mayer. Um ein Ausflocken des Farbstoffes aufgrund der großen anhaftenden Menge zu verhindern, wurden die Objektträger anschließend kurz in dest. H<sub>2</sub>O getaucht. Danach wurden sie für 15 min in warmem Leitungswasser gewaschen. Dabei wurde alle 3-5 min das Wasser gewechselt. Hierbei kommt es aufgrund der pH-Wert Änderung von sauer zu neutral bis basisch zu einem Farbumschlag von rotbraun zu blau. Daher erhält dieser Schritt den Namen „Bläuen“. Gleichzeitig ändert sich die Löslichkeit des Farbstoffes, der im neutralen Milieu schlecht wasserlöslich ist und die Farbe ist fixiert [102]. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 30 s mit Eosin, welches vorher durch Eisessig angesäuert wurde, gefärbt. Nach anschließendem Waschen mit dest. H<sub>2</sub>O durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe mit Isopropanol (1 min 70%, 2 min 96%, 2 min 100%). Zuletzt wurden die Schnitte zweimal für eine Minute in Xylol getaucht, damit der Alkohol vollständig verdrängt wurde.

Die gefärbten Schnitte konnten nun mit Entellan bedeckt, einem Deckgläschen versehen und bei Raumtemperatur gelagert werden.

### 3.2.3 Oil Red O-Färbung

Mit der ORO-Färbung sollen Neutralfette wie Triacylglyceride nachgewiesen werden. Ölrot ist ein Azofarbstoff und färbt leuchtend rot. Das Prinzip der Färbung beruht hier nicht auf einer direkten Bindung. Vielmehr ist die Löslichkeit des ORO in lipidhaltigen Gewebestandteilen größer als im Reagens. Es diffundieren die Farbstoffe entlang des Konzentrationsgradienten vom Reagens in das Gewebe, was als physikalische Färbung bezeichnet wird [83].

	Produktname	Hersteller
<b>Reagenzien</b>	Oil Red O	Sigma
	Isopropanol (100%, 60%)	Sigma
	Hämalaun nach Mayer	Sigma
	Aquatex ®	Merck
<b>Material</b>	Folded qualitative filter paper, 303	VWR™

**Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Materialien bei der Oil Red O-Färbung.**

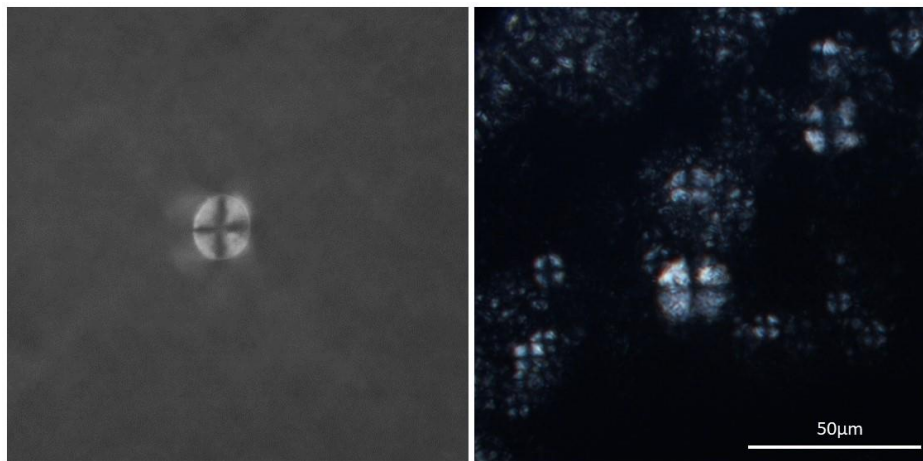
Die Oil Red O-Färbelösung wurde zunächst aus 100 ml 100% Isopropanol und 300 mg Oil Red O angesetzt und nach ausreichendem Schwenken durch ein Filterpapier gefiltert. Bei Bedarf wurde das Papier während des Durchlaufs gewechselt. Aus dem Filtrat wurde nun eine Stocklösung aus ORO und dest. H<sub>2</sub>O im Verhältnis 7:5 hergestellt. Die Lösung ist nur frisch angesetzt zur Färbung geeignet. Im ersten Schritt der Färbung wurden die Schnitte 5 min in 60% Isopropanol getaucht. Danach erfolgte die 10-minütige Färbung mit ORO. Im Anschluss daran wurden die Schnitte zweimal für je 3 min durch 60% Isopropanol und zweimal je 1 min durch dest. H<sub>2</sub>O geführt. Um neben der Färbung der Neutralfette auch eine Kernfärbung zu erhalten, wurden sie im Anschluss mit Hämalaun nach Mayer für 3 min gefärbt. Nach anschließendem kurzen Waschen in dest. H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte dreimal für je 1 min in kaltem Leitungswasser gebläut. Das Eindecken erfolgte mit dem wässrigen Aquatex ® -Medium und die Objektträger wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Bei der Auswertung der Färbung wurden die Präparate unter dem Hellfeld des Mikroskops betrachtet. Von jedem Schnitt wurden zehn verschiedene Blickfelder mit einer Belichtung von 33 ms und einer

Sättigung von 2 fotografiert. Mit dem Programm Fiji (ImageJ) konnte der prozentuale Anteil der gefärbten Fläche ausgerechnet werden. Dabei wurde der Farbschwellenwert individuell gewählt und von den 10 Bildern pro Schnitt ein Mittelwert gebildet. Diese Auswertung erfolgte mit dem Programm Excel 365. Für die weitere statistische Analyse der Daten wurde das Programm GraphPad Prism 8 verwendet.

### 3.2.4 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie kommt in der Kristallographie zum Einsatz und dient der Darstellung von anisotropen (doppelbrechenden) Strukturen [47,102]. Das Phänomen der Doppelbrechung besteht darin, dass eine Struktur ein eintretendes Lichtbündel in zwei zueinander senkrechte schwingende Anteile spaltet. Dabei bestimmen Brechungsindex und Dicke des Materials die Stärke der Anisotropie. Eine niedrige Doppelbrechung findet man in vielen biologischen Materialien. Besonders ausgeprägt ist sie jedoch in Flüssigkristallen oder Kristallen. Um dieses Phänomen sichtbar zu machen, verwendet man ein Polarisationsmikroskop dessen zwei Polarisationsfilter in ihrer Ausrichtungen senkrecht zueinander stehen. Befindet sich ein optisch isotropes (nicht doppelbrechendes) Objekt zwischen diesen Filtern, wird das hindurchtretende Licht vollständig ausgelöscht. Nur wenn ein anisotropes Material das Licht in der Polarisations Ebene ändert und dieses durch den zweiten Filter hindurchtreten kann, wird es nicht mehr ausgelöscht und somit sichtbar [102]. Für die Flüssigkristalle ergibt sich die charakteristische Form eines Malteserkreuzes. (Abbildung 7)



**Abbildung 7: Exemplarisches Bild von Cholesterinflüssigkristallen aus Lipidtropfen in Lebergewebe.** Unter polarisiertem Licht erscheinen die Flüssigkristalle wie Malteserkreuze.

Im Rahmen der Arbeit sollten CC im Lebergewebe dargestellt werden. Zum Einsatz kamen erneut Kryostatschnitte, da die Präparate kein anisotropes Paraffin enthalten durften [102]. Hierbei ist keine spezielle Färbung der Gewebe erforderlich gewesen, und die Schnitte wurden nativ unter dem Polarisationsmikroskop betrachtet. Von jeder Maus wurde ein Kryoschnitt betrachtet, und es wurden 10

Bilder von unterschiedlichen Präparatabschnitten aufgenommen. Die Bilder wurden jeweils mit 500 ms belichtet. Um das Auftreten von CC in der Leber quantifizieren zu können, erfolgte eine Messung der prozentualen Fläche der aufleuchtenden Kristalle unter zu Hilfenahme des Programms Fiji. Dabei wurde der Helligkeitsschwellenwert auf 200-255 festgelegt. Die weitere Auswertung erfolgte durch die Programme Microsoft Excel 365 und Graphpad Prism 8.

### 3.3 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse dient der quantitativen Analyse der Expression bestimmter Gene. Dabei wird zunächst Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Gewebe isoliert, welche das Expressionsniveau der Zellen zum Entnahmezeitpunkt widerspiegelt. Anschließend wird die RNA mittels reverser Transkription in cDNA (engl. „complementary desoxyribonucleinacid“) umgeschrieben und zur Erfolgskontrolle eine  $\beta$ -Actin- Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und Gelelektrophorese durchgeführt. Zum Abschluss erfolgt die eigentliche Genexpressionsanalyse durch quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR). Die Analyse wurde mit 12 Gewebeproben pro Genotyp und Fütterung durchgeführt. Dabei wurden jeweils sechs männliche und sechs weibliche Tiere ausgewählt. Bei der Genexpressionsanalyse wurden folgende Gene getestet: Die Gene der am Fettstoffwechsel beteiligten Enzyme Fettsäuresynthase (*Fasn*), ATP-Citrat Lyase (*Acly*), Acetyl-CoA Carboxylase (*Acaca*), Stearoyl-CoA Desaturase 1 (*Scd1*) sowie regulatorische Proteine wie das „Carbohydrate responsive element-binding protein“ (*Mlxipl*) und das „Sterol regulatory element-binding protein“ (*Srebf1*) wurden analysiert. Des Weiteren erfolgte die Expressionsanalyse der Gene, welche die sterile Entzündungsreaktion betreffen. Das *Nlrp3*-Gen kodiert für das NLRP3-Inflammasom und das *Il-1 $\beta$*  Zytokin wird vom *Il-1 $\beta$*  Gen kodiert.

#### 3.3.1 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Bei der RNA-Isolation wurde das Gewebe zunächst homogenisiert und die Zellen lysiert. Die selektive Bindung der RNA an einer Säule erlaubt die Auswaschung der restlichen Strukturen. Aufgrund der reversiblen Bindungseigenschaften kann die RNA zum Schluss eluiert werden.

Zu Beginn wurde ein Lyse-Mastermix aus 20  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol pro 1 ml TRK Lyse-Puffer hergestellt. Nach Reinigung von Pinzette und Skalpell mit DEPC-Wasser wurden vom gefrorenen Lebergewebe 5 mg auf der Feinwaage abgewogen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden eine Metallkugel und 350  $\mu$ l Lyse-Mastermix hinzugefügt und das Gewebe im TissueLyser LT bei 50 Hz für 30 s homogenisiert.



	Produktname	Hersteller
<b>Geräte</b>	Feinwaage	Sartorius
	Tissue Lyser LT	Quiagen
	Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
	Nano Drop 1000	Peqlab
<b>Reagenzien</b>	peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit	VWR™
	DEPC-Wasser aus	
	- 2 ml Diethylpyrocarbonat	AppliChem
	- 1 l Aqua	Braun
<b>Programme</b>	NanoDrop 1000 Operating Software, Version 3.8.1	VWR™

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der RNA-Isolation.**

Nach abschließendem Abzentrifugieren (13000 g / 2 min) wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, dasselbe Volumen 70%igen Ethanol hinzupipettiert und gut vermischt. Das gesamte Lysat konnte nun auf die pepGOLD Microspin LE RNA Column überführt und bei 13000 g für 15 s bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Das Filtrat wurde verworfen und das Auffangröhrchen gewechselt. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl RWF Waschpuffer und zweimal mit 500 µl 80%igem Ethanol gewaschen und nach jedem Waschschrift jeweils für 30 s bei 13000 g zentrifugiert. Jedes Mal wurde das Filtrat verworfen. Als Letztes wurde die Säule zum Trocknen erneut für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Um die an der Säule gebundene RNA zu lösen, wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und nach Zugabe von 20 µl Nuklease-freiem Wasser 1 min zentrifugiert.

Um die Qualität und die Quantität der isolierten RNA zu überprüfen, wurde sie im Spektrophotometer NanoDrop 1000 gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm für Nukleinsäuren ( $OD_{260}$ ), einen Verdünnungsfaktor ( $V$ ) und einem speziellen Multiplikationsfaktor ( $F$ ) von 40 µg/ml für RNA [101].

$$c \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

Um eine Proteinkontamination der Probe auszuschließen, wurde der Quotient aus der  $OD_{260\text{nm}}$  und der  $OD_{280\text{nm}}$  gebildet. Ein Ergebnis von 1,8-2,0 schließt eine Verunreinigung der Probe aus [101]. Bei der Messung wurde der NanoDrop zunächst mit dest. H<sub>2</sub>O kalibriert und anschließend der Leerwert mit dem

bei der RNA-Isolation verwendeten Nuklease freien Wasser bestimmt. Die RNA wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.3.2 cDNA-Synthese

Um aus der RNA als Ausgangsmaterial cDNA herzustellen, nutzt man das Prinzip der reversen Transkription. Dabei kommt das Enzym reverse Transkriptase zum Einsatz, welche als RNA-abhängige DNA-Polymerase den RNA-Matrizenstrang in einen cDNA-Strang transkribieren kann. Der Vorteil der cDNA gegenüber einer RNA ist die höhere Stabilität. Sie dient als Ausgangsmaterial der Genexpressionsanalyse.

	Produktname	Hersteller
<b>Geräte</b>	Thermocycler T3	Biometra
<b>Reagenzien</b>	High-capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit	Applied Biosystems™
	RNase OUT, rekombinanter Ribonuklease Hemmer	Invitrogen™
	DNase I	Invitrogen™
	DEPC-Wasser	

**Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der cDNA-Synthese.**

Zur Vorbereitung der cDNA-Synthese wurde Eis bereitgestellt, auf welchem die Proben und Reagenzien gelagert wurden. Damit bei allen Proben zur cDNA-Synthese von einer gleichen RNA Ausgangskonzentration ( $1000\text{ ng}/\mu\text{l}$ ) ausgegangen werden konnte, wurde die RNA entsprechend ihrer Konzentration mit DEPC-Wasser in einem  $0,5\text{ ml}$  Reaktionsgefäß auf ein Gesamtvolumen von  $7\text{ }\mu\text{l}$  gebracht. Die Berechnung des zu pipettierenden RNA Volumens erfolgte anhand folgender Formel:

$$RNA - \text{Volumen } [\mu\text{l}] = 1000\text{ ng} \times \frac{1}{RNA - \text{Konzentration } \left[ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]}$$

Anschließend wurde in einem weiteren Reaktionsgefäß ein Mastermix aus  $1\text{ }\mu\text{l}$  DNase Puffer und  $1\text{ }\mu\text{l}$  DNase I pro Probe angesetzt und gut durchmischt.  $2\text{ }\mu\text{l}$  des Mastermix wurden nun zu der RNA hinzupipettiert, das Reaktionsgefäß gemischt und  $15\text{ min}$  bei Raumtemperatur inkubiert. Der Schritt diente dem enzymatischen Verdau potentieller DNA in der Probe. Im folgenden Schritt wurde die DNase inaktiviert, damit sie im weiteren Verlauf die cDNA nicht abbaut. Dafür wurden dem

Reaktionsgefäß 1 µl 25 mM EDTA hinzugefügt, die Flüssigkeiten vermischt und im Thermocycler bei 65 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der Mastermix II mit folgenden Reagenzien pro Probe angesetzt:

- 3,2 µl RNase-freies Wasser
- 2 µl RT Puffer
- 2 µl RT Random Primer
- 0,8 µl dNTPs (bestehend aus dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 1 µl Reverse Transkriptase
- 1 µl RNase OUT

10 µl des Mastermix II wurden nun zur RNA gegeben und in den Thermocycler eingesetzt. Die Proben durchliefen folgende drei Zyklen: 10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C und 5 min bei 85 °C. Dabei synthetisiert die reverse Transkriptase anhand der RNA-Matrize mit den Nucleotiden einen komplementären DNA-Strang. Die Proben wurden bis zu weiteren Analysen bei -20 °C gelagert.

### 3.3.3 β-Actin PCR und Gelelektrophorese

Die β-Actin PCR dient der Erfolgskontrolle der cDNA-Synthese und besteht aus einer PCR mit anschließender Gelelektrophorese. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Amplifikation eines spezifischen Gensegments, bei welchem bekannt ist, dass es in allen eukaryotischen Zellen gleichermaßen exprimiert wird. Verwendet wurde β-Actin, ein „Housekeeping“-Gen, welches eine wichtige Rolle im Zytoskelett und somit in der Zellform, -migration und -teilung einnimmt [72]. Die Gelelektrophorese dient dem Nachweis und der Längenbestimmung der amplifizierten cDNA. Dabei wandert das Amplikon als Polyanion in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsstrecke wird dabei durch die Länge der Nucleinsäure bestimmt. Je kürzer das Molekül, desto weiter wandert es in einer festgelegten Zeit.

	Produktname	Hersteller
<b>Geräte</b>	Thermal Cycler C1000Touch	Biorad
	Owl A2 Gelelektrophorese System	Thermo Scientific™
	Fusion SL Vilber Lourmat	Peqlab
<b>Reagenzien</b>	Taq Polymerase	Invitrogen™

dNTPs (Nukleotide)	Applied Biosystems
Primer für $\beta$ -Actin PCR F: 5'-CCA TCC TGC GTC TGG ACC TG-3' B: 5'-GTA ACA GTC CGC CTA GAA GC-3'	Invitrogen™
LE-Agarose	Biozym
TAE-Puffer	
- 2 M Trizma® base	- Sigma
- 1 M Essigsäure 100%	- Merck
- 0,5 M EDTA, pH 8.0	- Invitrogen
- 1 l dest. H <sub>2</sub> O	
Midori-Green	Nippon Genetics Europe
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Invitrogen™
<b>Programme</b>	
Fusion Capt Advance	Peqlab

**Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der  $\beta$ -Actin PCR und Gelelektrophorese.**

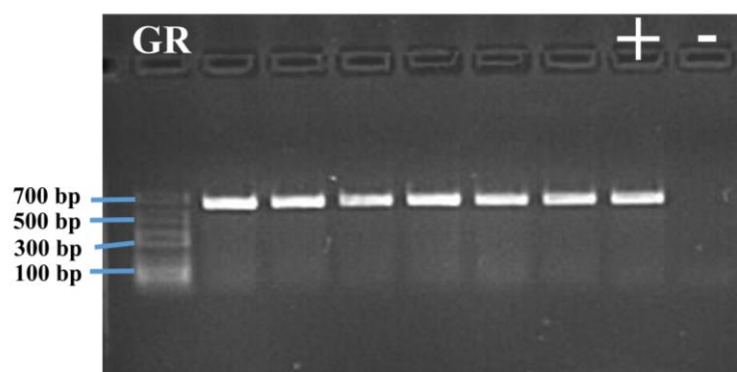
Während des Pipettierens wurden die Proben und Reagenzien auf Eis gelagert. Zunächst wurde der Mastermix mit folgenden Reagenzien pro Probe in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt und vermischt.

- 17,75  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 2,5  $\mu$ l 10x PCR-Puffer
- 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- 0,5  $\mu$ l dNTPs 10 mM
- 0,5  $\mu$ l forward Primer 10  $\mu$ mol
- 0,5  $\mu$ l reverse Primer 10  $\mu$ mol
- 0,25  $\mu$ l Taq-Polymerase

Pro Probe wurden 23  $\mu$ l des Mastermix in die PCR-Streifen pipettiert, und 2  $\mu$ l cDNA hinzugefügt. Zusätzlich zu den zu testenden Proben wurden eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine bekannte und zuvor schon erfolgreich synthetisierte cDNA und 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Nach Durchmischen und Abzentrifugieren der PCR Streifen

wurden sie in den Thermocycler gesetzt. Zu Beginn wurden die Proben für 2 min auf 94 °C aufgeheizt. Anschließend durchliefen sie 25 Zyklen. Ein Zyklus beginnt mit der Denaturierung für 2 min bei 94 °C. Dabei trennen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Strängen, und die Einzelstränge liegen frei vor. Darauf folgt der Schritt der Primerhybridisierung bei 59 °C für 30 s. Hier lagern sich die Primer an die Einzelstränge an. Der letzte Schritt ist die Elongation, bei welcher die Proben auf 72 °C für 50 s erwärmt werden. Der Taq-Polymerase wird dadurch ihr Temperaturoptimum geschaffen, und sie synthetisiert aus den dNTPs einen zur Matrize komplementären DNA-Strang. Durch den mehrfachen Zyklusdurchlauf steigt die Anzahl der cDNA Fragmente exponentiell. Zum Abschluss der PCR bleibt die Temperatur von 72 °C für 5 min erhalten. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C.

Der PCR schloss sich die Gelelektrophorese an. Hierfür wurde zunächst das 2%ige Agarosegel hergestellt. 6 g LE-Agarose wurden mit 300 ml 1x TAE-Puffer unter Schwenken aufgeköcht und anschließend auf 60 °C abgekühlt. Um die DNA später sichtbar zu machen, wurden 15 µl Midori-Green hinzugefügt. Dieser nicht kanzerogene Stoff interkaliert in die DNA und macht sie unter Anregung mit UV-Licht sichtbar. Das Gel wurde in die Gießkammer gefüllt, und die Probenkämme eingesetzt. Nach einer halben Stunde war das Gel ausgehärtet, konnte zugeschnitten und in das Owl A2 Gelelektrophorese-System gelegt werden. Die Kammer wurde mit TAE-Puffer so weit befüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Vor Pipettieren der Proben in die einzelnen Geltaschen wurde ihnen noch 2,5 µl Blaumarker hinzugefügt. Eine zusätzliche Tasche wurde mit 5 µl des Längenmarkers GeneRuler befüllt. Dieser enthält definierte verschieden lange DNA-Fragmente und dient der Längenzuordnung der Proben. An das Gelelektrophorese-System wurde für 40 min eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde die Gelplatte im Fusion unter UV-Licht mit Hilfe des Programmes FusionCapt Advance SL2 Xpress fotografiert. Das Amplifikationsprodukt sollte eine Länge von 620 Basenpaaren (bp) haben.



**Abbildung 8: Agarosegel der Gelelektrophorese nach beta-Actin PCR.** Größe des PCR-Produkts: 620 Basenpaare (bp). Links: GeneRuler (GR), rechts: Positiv- (+) und Negativkontrolle (-).

### 3.3.4 Genexpression

Die Analyse der Genexpression beruht auf dem TaqMan-Prinzip RT-qPCR. Sie nutzt die Kombination aus PCR-Gerät und Fluoreszenz-Detektion und ermöglicht dadurch die Analyse der Reaktion in Echtzeit. Die cDNA-Probe durchläuft die Zyklen der Denaturierung, der Primerhybridisierung sowie der Elongation während der PCR, wobei die eingesetzten spezifischen Primer das zu untersuchende Gen umschließen. Dadurch ergibt sich eine selektive Amplifikation des zu analysierenden Gens. Während der Primerhybridisierung kommt das TaqMan-Prinzip zum Einsatz. Die TaqMan-Sonden sind Oligonukleotide und nutzen die Möglichkeit des Resonanz-Energie-Transfers: An die Sonde sind ein Fluorochrom am 5'-Ende sowie ein nicht fluoreszierender Quencher am 3'-Ende gebunden. Befinden sich diese beiden Farbstoffe in unmittelbarer Nähe, so wird das emittierte Fluoreszenzsignal des Fluorochroms vom „Quencher“ absorbiert. Während der zweiten Zyklusphase binden nicht nur die Primer an die Einzelstränge, auch die Sonden paaren sich mit SNP-Bereichen auf der cDNA-Matrize. Im nächsten Schritt synthetisiert die Taq-Polymerase den komplementären Strang. Neben ihrer DNA-abhängigen DNA-Polymerase Eigenschaft hat sie eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und baut die Sonden während der Elongation ab. Durch die neue örtliche Trennung von Fluorochrom und „Quencher“ kann dieser das emittierte Signal des Fluorochroms nicht mehr absorbieren, und das Licht wird vom Fluoreszenz-Detektor registriert. Mit jedem Zyklusdurchlauf steigt die Anzahl der synthetisierten cDNA exponentiell. Gegen Ende der 40 Zyklen flacht die Kurve wieder ab, sodass sich ein sigmoidaler Verlauf ergibt (Abbildung 9) [101]. In der Analyse wird die Expression der Gene nicht absolut, sondern mittels eines Referenzgens normiert. Das Gen der Glycerin-Aldehy-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) fungiert als „Housekeeping“-Gen, wird in allen Zellen gleichermaßen exprimiert und dient bei der RT-qPCR als Referenz [87,130].

Für die Genexpressionsanalyse wurde zunächst Eis bereitgestellt, auf welchem die Proben und Reagenzien gelagert wurden. Im ersten Schritt wurde der Mastermix aus 5 µl 2x Fast Mastermix Invitrogen, 0,5 µl Genexpressionsassay und 3,5 µl DEPC-Wasser pro Probe hergestellt. Für jedes Zielgen wurde dabei ein eigener Ansatz pipettiert. Es galt zu beachten, dass jede Probe dreimal analysiert wurde und zusätzlich jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt werden musste. Für diese wurde DEPC-Wasser verwendet. Als erstes wurden 9 µl Mastermix in die Vertiefungen der 96-Well-Platte und anschließend 1 µl Proben-cDNA hinzupipettiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde eine ausreichende Durchmischung der Probe erreicht. Nach Abschluss der Plattenbelegung wurde die Platte mit Folie verschlossen und für 1 min bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert. Unmittelbar danach begann die RT-qPCR im QuantStudio 5. Die Proben durchliefen das PCR-Programm TaqMan mit 40 Zyklen bestehend aus 20 s bei 95 °C, 3 s bei 95 °C und abschließenden 30 s bei 60 °C. Durch die QuantStudio™ Design & Analysis Software wurden der Auftrag am Computer erstellt und die

Analyseergebnisse angezeigt. Weitere Berechnungen erfolgten durch das Programm Microsoft Excel 365.

	Produktname	Hersteller
<b>Geräte</b>	QuantStudio 5	Applied Biosystems™
	4-15C Zentrifuge	Sigma
<b>Reagenzien</b>	TaqMan® Gene Expression Assays	Applied Biosystems™
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Gapdh</i> Assay ID: Mm99999915_g1</li> <li>- <i>Nlrp3</i> Assay ID: Mm00434228_m1</li> <li>- <i>Il-1β</i> Assay ID: Mm00840904_m1</li> <li>- <i>Acly</i> Assay ID: Mm01302282_m1</li> <li>- <i>Acaca</i> Assay ID: Mm01304277_m1</li> <li>- <i>Scd1</i> Assay ID: Mm00772290_m1</li> <li>- <i>Mlxipl</i> Assay ID: Mm02342723_m1</li> <li>- <i>Srebfl</i> Assay ID: Mm00550338_m1</li> <li>- <i>Fasn</i> Assay ID: Mm01253292_m1</li> </ul>	
	TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix, AmpErase™ UNG	Applied Biosystems™
<b>Programme</b>	QuantStudio™ Design&Analysis Software, Version 1.5.1	Thermo Fisher Scientific™
	Excel 365	Microsoft

**Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der RT-qPCR.**

Die Auswertung erfolgte mit der  $\Delta\Delta C_t$  – Methode [119]. Der  $C_t$ -Wert stellt die Zykluszahl dar, bei welcher das exponentielle Wachstum des Fluoreszenzsignals beginnt. Hier erreicht das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert. [101] (Abbildung 9) Aus den drei  $C_t$ -Werten pro Probe wurde der Mittelwert ( $C_{t \text{ Mean}}$ ) gebildet und im nächsten Schritt die Expression auf das Referenzgen normiert:

$$\Delta C_t = C_{t \text{ Mean}} (\text{Zielgen}) - C_{t \text{ Mean}} (\text{Referenzgen})$$

Darauffolgend wurde der  $\Delta\Delta C_t$ -Wert aus der  $\Delta C_t$ -Wert Differenz der Interventionsgruppe (z.B. HepKO, IntKO oder Knock-In) und der Kontrollgruppe (WT) gebildet:

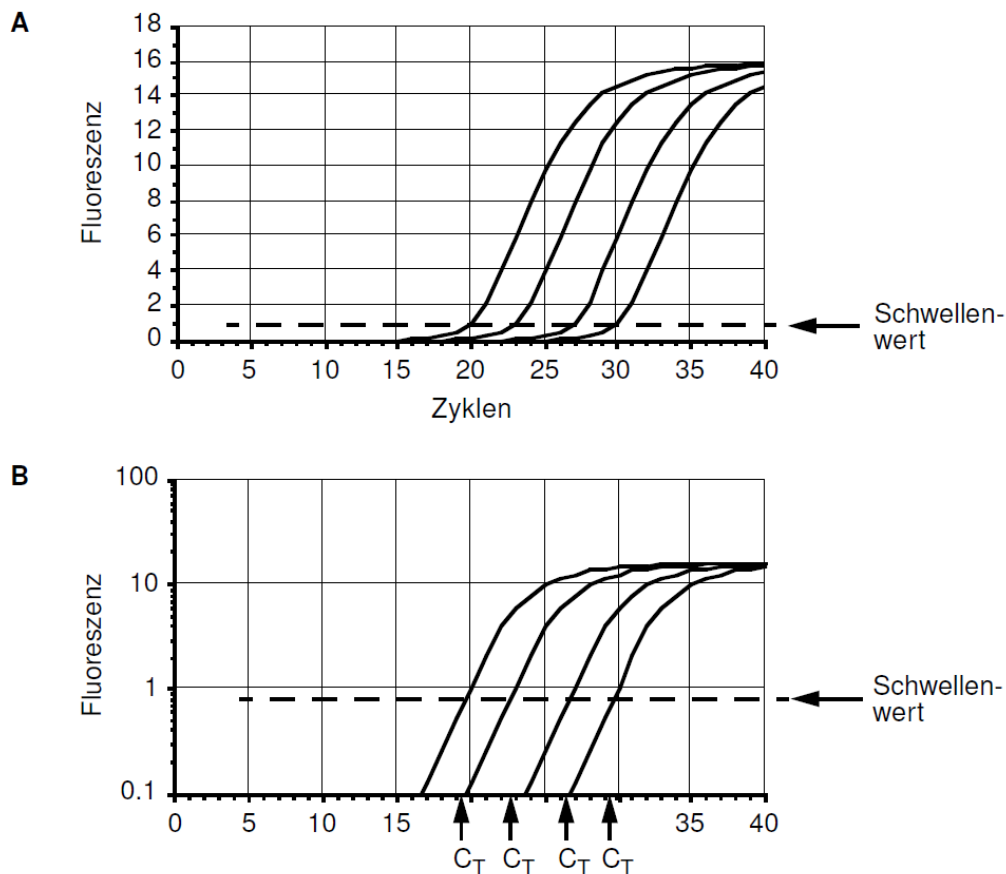
$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Interventionsgruppe}) - \Delta C_t (\text{Kontrollgruppe})$$

Es schloss sich die Berechnung des RQ-Wertes an, welcher den relativen Genexpressionsunterschied zwischen den zwei Gruppen angibt [112]:

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

Um die RQ-Werte abschließend zu normieren, wurden die Werte der einzelnen Proben durch den  $RQ_{\text{Mean}}$  der Kontrollgruppe geteilt:

$$RQ_n = \frac{RQ (\text{Interventionsgruppe})}{RQ_{\text{Mean}} (\text{Kontrollgruppe})}$$



**Abbildung 9: Graphische Auswertung der RT-qPCR.** **A:** Sigmoider Kurvenverlauf des detektierten Fluoreszenzsignals im Verlauf der PCR-Zyklen. **B:** Logarithmische Auftragung der Fluoreszenz gegen die PCR-Zyklen. Der  $C_t$ -Wert bezeichnet den Zyklus, bei welchem das exponentielle Wachstum beginnt. [101]



### 3.4 Serumparameter

Im Rahmen dieser Arbeit sollten leberspezifische Enzyme im Serum der verschiedenen transgenen Mäuse analysiert werden, um Aussagen über eine Leberschädigung zu treffen. Dafür wurden die Enzymaktivitäten der alkalischen Phosphatase (AP), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) bestimmt.

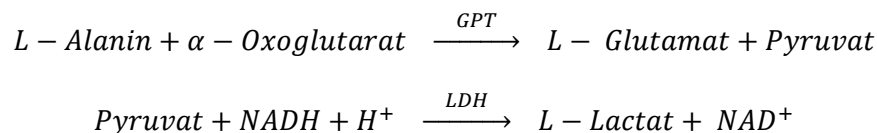
	Produktname	Hersteller
<b>Geräte</b>	AU 480 Chemistry Analyzer	Beckman Coulter
	Cobas ® modular platform	Roche
<b>Reagenzien</b>	0,9% NaCl	Braun
	ALT analysis reagents OSR6107	Beckman Coulter
	AST analysis reagents OSR6209	Beckman Coulter
	05531462 190 Alanine Aminotransferase	Cobas ®

**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der Serumanalyse.**

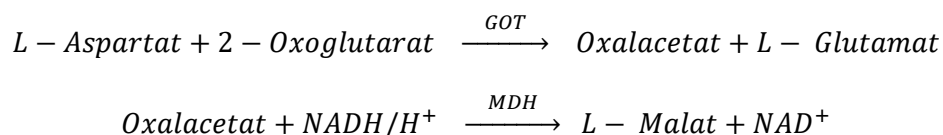
Für die AP-Messung wurden die Seren der verschiedenen transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse verwendet. Pro Genotyp und Fütterung kamen sechs Proben (jeweils 3 männliche sowie drei weibliche Tiere) zum Einsatz. Bei der Bestimmung von GPT und GOT wurden Seren von anderen *Abcg5/g8*-Mäusen, welche nur die Chow Fütterung erhielten und praemortem keiner Intervention unterlagen, verwendet. Dabei wurden 12 Proben pro Genotyp (6 männliche und 6 weibliche Tiere) verwendet.

Die Serumanalyse für GPT und GOT wurde mit freundlicher Unterstützung durch das Labor der Inneren Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt. Das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes führt die Analyse der CARDn Phosphatase durch. Das eingesetzte Volumen betrug 100 µl. Dabei ist das Serum 1:10 mit 0,9%igem NaCl verdünnt worden. Es kamen ebenfalls unverdünnte Proben mit einem Volumen von 80 µl zum Einsatz. Vorherige Vergleichsanalysen lieferten mit beiden Probenansätzen annähernd gleiche Ergebnisse. Das Prinzip der Enzymaktivitätsbestimmung liegt in der Extinktionsmessung mittels Photometrie eines bei der Enzymreaktion verbrauchten Edukts oder entstehenden Produkts. Diese Extinktionsab- oder zunahme verhält sich proportional zur Enzymaktivität.

Die GPT ist ein hauptsächlich in der Leber vorkommendes Enzym, welches im Zytosol lokalisiert ist. Steigt seine Aktivität im Serum an, so ist sie als spezifischer Basisparameter ein Indikator für eine Leberzellschädigung [16]. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden die Reaktionen der GPT mit der der Laktatdehydrogenase (LDH) gekoppelt und die Abnahme der Extinktion von NADH (Nikotinamadeninindinukleotid) bei 340 nm gemessen. Diese ist proportional zur Enzymaktivität. Der Referenzbereich für GPT bei C57Bl/6J Mäusen, angegeben als zweifache Standardabweichung vom Mittelwert, liegt bei 14-94 U/l [107].



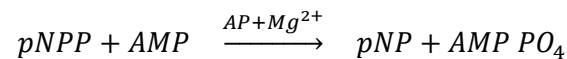
Die GOT ist ein omnipräsentes Enzym welches am stärksten in Leber, Niere sowie Herz- und Skelettmuskel vorkommt. Wenn eine Lebererkrankung neben der GPT weiter untersucht wird, dient die GOT als differenzialdiagnoscher Marker und erlaubt die Beurteilung des Schweregrades der Schädigung. [16] Die Analyse der Enzymaktivität erfolgte ebenfalls durch die Kopplung der Reaktion der GOT mit der Reaktion der Malatdehydrogenase (MDH). Es wurde die Abnahme der Extinktion von NADH bei 340 nm gemessen. Der Referenzbereich für GOT bei C57Bl/6J Mäusen, angegeben als zweifache Standardabweichung vom Mittelwert, liegt bei 32-122 U/l [107].



Möchte man eine Aussage über den Schweregrad der Leberzellschädigung treffen, bildet man den De-Ritis-Quotienten aus GOT/GPT. Der Quotient nutzt die Eigenschaft von GOT aus, dass nur 30% im Zytosol, jedoch 80% in den Mitochondrien strukturell gebunden vorliegen. Je stärker die Leberschädigung ist, desto mehr mitochondriale Enzyme werden freigesetzt. Ein Quotient < 1 weist auf einen moderaten Leberschaden hin, wie er bei Entzündungen oder akuten Hepatitiden anzufinden ist. Ein Quotient > 1 spricht für eine schwerwiegendere Schädigung [107].

Die AP ist ein Enzym, welches zur Diagnostik von hepatobiliären Erkrankungen verwendet wird. Abflusshindernisse in den Gallenwegen induzieren dieses Enzym. Aufgrund der Lokalisation an der apikalen Membran kann dieses durch Phospholipasen abgespalten werden und ins Plasma übertreten. Betrachtet man die Enzymaktivität in Zusammenhang mit der Aktivität der Aminotransaminasen, deutet ein verhältnismäßig hoher Wert auf eine Cholestase hin. [16] Das Prinzip beruht auf der Umwandlung

von p-Nitrophenolphosphat (pNPP) in Anwesenheit von 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) zu p-Nitrophenol. Die Änderung der Absorption durch dieses Produkt wird bei 410/480 nm gemessen und ist proportional zur Enzymaktivität. Der Referenzbereich für die AP bei C57Bl/6J Mäusen, angegeben als zweifache Standardabweichung vom Mittelwert, liegt bei 68-184 U/l [107].



### 3.5 Lipidomanalyse

Die Analyse des Lipidoms dient der Aufschlüsselung der Lipidzusammensetzung des Lebergewebes. Neben den analysierten Fetten können anhand von Mengenverhältnissen der verschiedenen Lipide Rückschlüsse auf Enzymaktivitäten bzw. die Stoffwechselsituation gezogen werden.

Die Lipidomanalyse wurde durch das Biotechnologieunternehmen OWL Metabolomics (Bizkaia, Spanien) durchgeführt. Dabei wurden aus der Gruppe der Mäuse, welche die Chow-Diät erhielten, die Lebern von je drei männlichen und weiblichen Tieren eines jeden Genotyps analysiert. Das Lipidomprofil wurde mittels Ultra high performance liquid chromatography / mass spectrometry (UHPLC/MS) erstellt. Durch die Kombination der zwei Verfahren konnten das Lipidgemisch zunächst durch die UHPLC aufgetrennt und die einzelnen Fette dann mittels Massenspektrometrie detektiert werden. Für eine detaillierte Erläuterung der Probenhandhabung und Durchführung der Analyse wird auf Barr et. al [7] verwiesen. Durch OWL Metabolomics wurden die Rohdaten weiter prozessiert sowie multi- und univariate Datenanalysen durchgeführt. Für eine ausführliche Information zu der Datenverarbeitung wird auf Martínez-Arranz et al. [90] verwiesen. Bei der univariaten Datenanalyse, t-Tests und Ermittlung der relativen Unterschiede wurden die einzelnen Metaboliten betrachtet und direkte Vergleiche zwischen den Genotypen aufgestellt. Die Principal component analysis (PCA, Hauptkomponentenanalyse) war ein Teil der multivariaten Datenanalyse und diente der Erfassung der Zusammenhangsstruktur der Messwerte. Es wurde analysiert, welche Metaboliten den größten Anteil an der Varianz des Datensatzes haben.

## 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse erfolgte durch die Programme Microsoft Excel 365 und GraphPad Prism 8. Die Auswertung der Genexpressionsanalyse und der histologischen Flächenauswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (analysis of variance), wodurch mehrere Gruppen untereinander verglichen werden konnten und die robust gegen nichtnormalverteilte Gruppen war. Bei den Genexpressionsanalysen wurden Ausreißer bereits bei der dreifachen Bestimmung der  $C_t$ -Werte eliminiert und der Mittelwert der verbliebenden Werte ermittelt. In der weiteren Auswertung aller Ergebnisse sind die Ausreißer verblieben, da sie auf Extremwerte zurückzuführen waren. Sofern zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, kamen der t-Test für normalverteilte Stichproben oder der Mann-Whitney U-Test für nicht normalverteilte Stichproben zum Einsatz. Die Auswertung der Lipidomanalyse erfolgte durch t-Tests für ungepaarte Stichproben und Ermittlung der relativen Unterschiede als univariate Datenanalyse sowie durch eine PCA als multivariate Analyse. Einzelne Metabolite wurden getrennt durch One-way- bzw. Two-way ANOVA analysiert. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% ( $p < 0,05$ ) festgelegt. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden Punktediagramme verwendet, und der Mittelwert wurde als horizontaler Strich  $\pm$  Standardfehler (SEM) als Whisker angegeben. Die Signifikanzen wurden wie folgt in den Abbildungen dargestellt: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

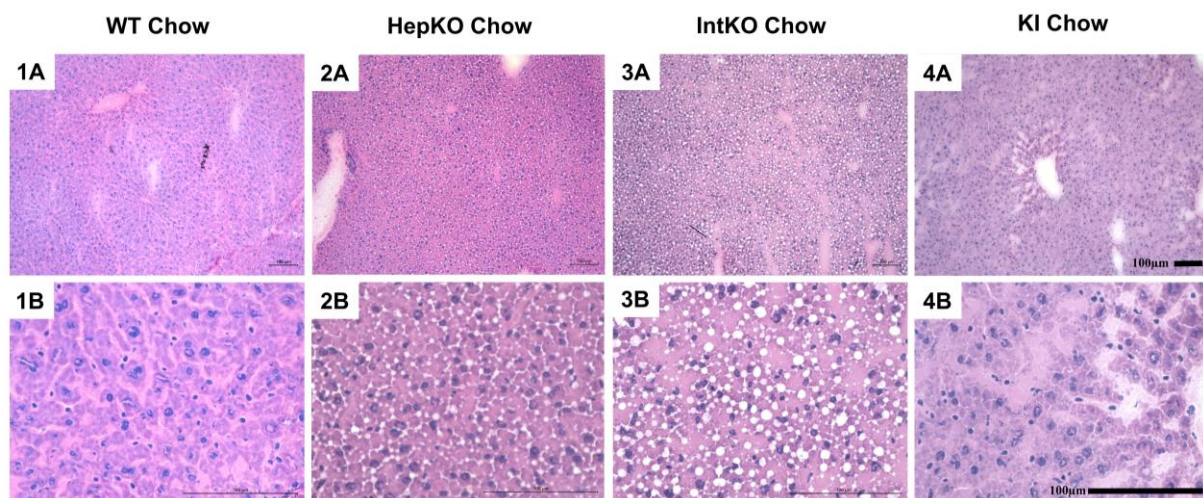
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Histologie

Im Rahmen der histologischen Untersuchungen sollte das Lebergewebe der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse durch eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung auf ihre Struktur und Verfettung, durch die Oil Red O (ORO)-Färbung auf die Verteilung und den Gehalt an Neutralfetten sowie durch die Polarisationsmikroskopie auf das Vorkommen von Cholesterinkristallen (CC) untersucht werden.

#### 4.1.1 HE-Färbung

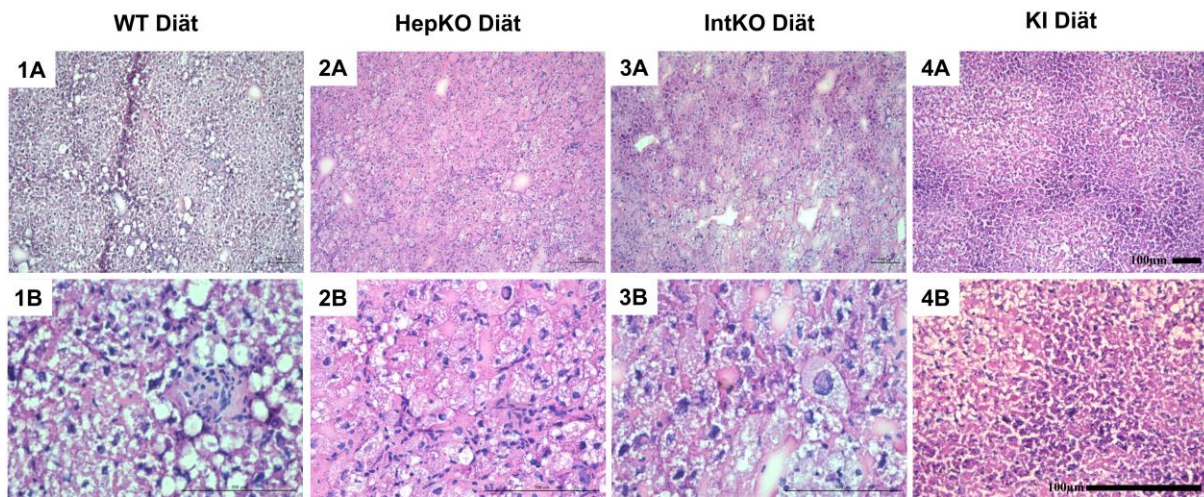
Die Färbung der Kryostatschnitte mit HE diente als Übersichtsfärbung zur Beurteilung der Struktur des Lebergewebes.



**Abbildung 10: Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse, welche Chow Futter erhielten.** 1: WT (Wildtyp), 2: HepKO (hepatischer Knock-Out), 3: IntKO (intestinaler Knock-Out), 4: KI (Knock-In). A: 100x Vergrößerung, B: 400x Vergrößerung.

Die Lebern der Wildtyp-Mäuse (WT) (1A/1B), welche Chow Futter (Abbildung 10) erhielten, stellten sich mit einer klassischen Läppchenstruktur dar. Das Parenchym wies ein kompaktes, kohäsives Bälkchensystem auf, und die Leberparenchymzellen hatten eine einheitliche Größe. Die Zellkerne der Hepatozyten waren ebenfalls gleich groß, und es zeigte sich eine physiologische Kern-Plasma Relation. Dieses histologische Erscheinungsbild fand sich ebenfalls bei den Lebern der Knock-In (KI) Mäuse

(4A/4B) und den männlichen Individuen der hepatischen Knock-Out Mäuse (HepKO) (2A/2B). Die weiblichen Tiere des hepatischen Knock-Out Modells sowie die gesamte Gruppe der intestinalen Knock-Out Mäuse (IntKO) (3A/3B) wiesen hingegen ein aufgelockertes Trabekelsystem auf. Zahlreiche nicht gefärbte Tropfen mit intrazellulärer Lage waren hier zu erkennen (3B). Die histologische Leberarchitektur blieb jedoch erhalten.



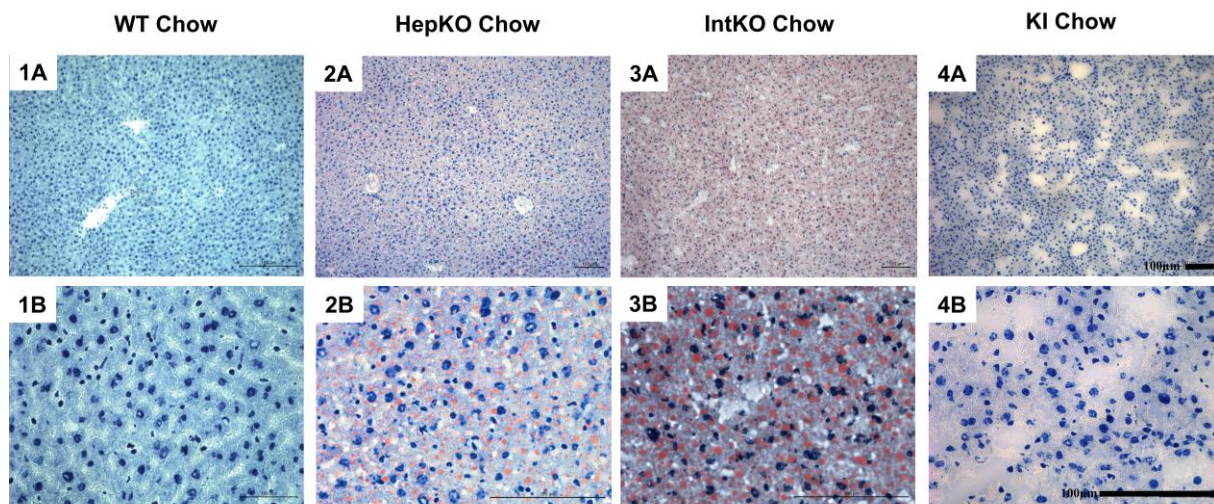
**Abbildung 11: Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten. 1: WT (Wildtyp), 2: HepKO (hepatischer Knock-Out), 3: IntKO (intestinaler Knock-Out), 4: KI (Knock-In). A: 100x Vergrößerung, B: 400x Vergrößerung.**

In der Gruppe der transgenen Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten, (Abbildung 11) stellte sich die Histologie wie folgt dar: Der Wildtyp (1A/1B) zeigte eine aufgelockerte Läppchenstruktur mit einer milden Steatose, erkennbar an den vereinzelt großen Lipidtropfen, welche den Zellkern an den Rand der Zelle drängten. Die Hepatozyten hatten eine einheitliche Größe, und Lymphozyten infiltrierten das Gewebe teilweise. Derselbe Befund zeigte sich auch bei der Gruppe der KI-Mäuse (4A/4B). Die Tiere aus der Gruppe der gewebsspezifischen Knock-Outs (2A/2B, 3A/3B) wiesen ebenfalls eine aufgelockerte Leberarchitektur auf. Die Morphologie der Hepatozyten unterschied sich nicht nur durch die Größenvariabilität deutlich vom WT, sie zeigten auch eine starke Ballonierung. Diese war durch eine abgerundete Zellform, eine 1,5-2-fache Größenzunahme, ein blass gefärbtes Zytoplasma und durch unterschiedlich große mikroversikuläre Fetttropfen gekennzeichnet [23]. Der Zellkern blieb mittelständig. Diese Ballonierung ist das histopathologische Korrelat einer Leberzellschädigung aufgrund von Lipotoxizität [30]. Insgesamt zeigten diese beiden Mausgruppen eine stärkere Steatose gegenüber dem WT. Auch hier wurde das Lebergewebe von Lymphozyten infiltriert, und Fibroblasten waren im Parenchym außerhalb der Glisson-Trias lokalisiert. Die Qualität der Lipidakkumulation konnte mit der HE-Färbung nicht definiert werden, weshalb eine Färbung der Neutralfette erfolgte.



### 4.1.2 Oil Red O-Färbung

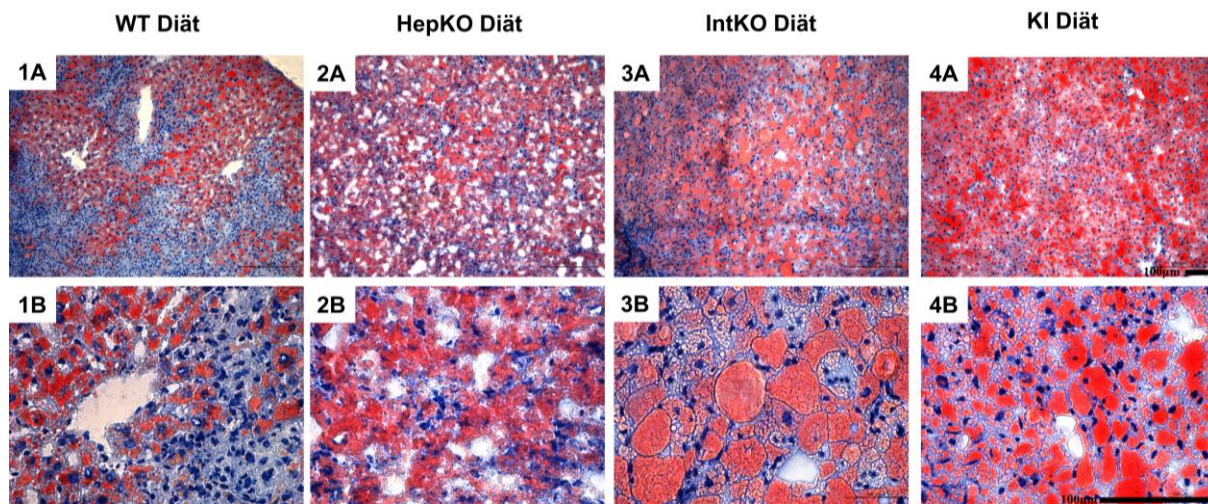
Die Färbung der Kryostatschnitte mit ORO diente der Charakterisierung der Verteilung von Neutralfetten wie Triacylglyceriden in der Leber. Sie stellen sich histologisch blass bis starkrot gefärbt dar. Durch die Bildanalyse-Software ImageJ erfolgte die Quantifizierung der Neutralfettakkumulation.



**Abbildung 12: Mit Oil Red O gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse, welche das Chow Futter erhielten. 1: WT (Wildtyp), 2: HepKO (hepatischer Knock-Out), 3: IntKO (intestinaler Knock-Out), 4: KI (Knock-In). A: 100x Vergrößerung, B: 400x Vergrößerung.**

Die Mäuse aus der Gruppe des Wildtyps (1A/1B), welche die Chow-Fütterung erhielten (Abbildung 12), wiesen keine mit TG gefüllten Lipidtropfen auf. Mit der gleichen Histologie stellten sich die KI-Mäuse sowie die männlichen HepKO-Mäuse dar. Es konnte auf eine intrazelluläre Lage der Vesikel geschlossen werden. Alle Tiere des intestinalen Knock-Outs sowie die weiblichen Mäuse des hepatischen Knock-Outs wiesen blass gefärbte TG-haltige Lipidtropfen auf. Als einzige Gruppe zeigten Individuen des IntKO eine intensive Rotfärbung, was für einen hohen Gehalt an TG spricht. Das Leberparenchym war insgesamt gleichmäßig mit Fetttropfen durchsetzt, und die Vesikel waren unterschiedlich groß, wobei sie die Größe des Zellkerns nicht überschritten.

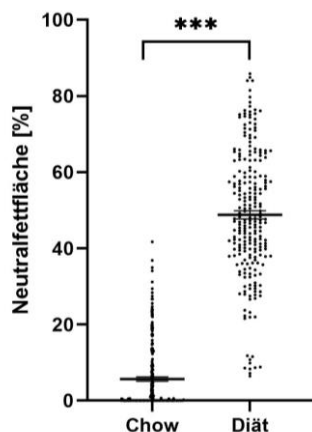
Alle Tiere, welche die lithogene Diät erhielten (Abbildung 13), enthielten im histologischen Leberschnitt mit ORO angefärbte Lipidtropfen. Die Hepatozyten fassten meist mehrere Vesikel mit unterschiedlicher Größe. Sie erstreckten sich teilweise so weit, dass sie die Größe des Zellkerns überschritten. Wenn die Hepatozyten TG enthielten, füllten diese die Zelle nahezu vollständig aus und verdrängten das Zytoplasma. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Lipidtropfen eine unterschiedlich starke Färbung unabhängig von ihrer Größe zeigten. Dies deutet auf variable Lipidzusammensetzungen der Vesikel hin. Sofern nicht das gesamte Leberparenchym TG-Vesikel enthielt, zeigte sich eine zonale Fettverteilung innerhalb eines Leberläppchens (1A).



**Abbildung 13: Mit Oil Red O gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten. 1: WT (Wildtyp), 2: HepKO (hepatischer Knock-Out), 3: IntKO (intestinaler Knock-Out), 4: KI (Knock-In). A: 100x Vergrößerung, B: 400x Vergrößerung.**

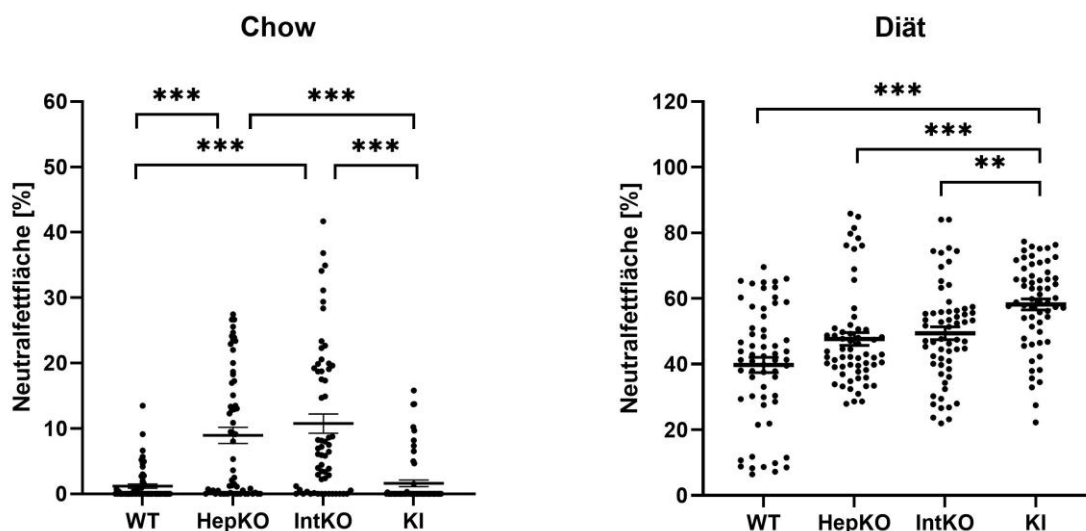
Der perizentralvenöse Bereich (Zone 3 eines Leberazinus) wies die stärkste Lipidakkumulation auf, wohingegen das Parenchym periportal (Zone 1) frei von TG-Vesikeln war. Diese Verteilung ist das histologische Korrelat der Lokalisation physiologischer Vorgänge innerhalb eines Leberazinus. In der Zone 3 wurden höhere Aktivitäten von Enzymen der Liponeogenese detektiert und in einem Tiermodell mit „high-fat“ Diät trat dort die Fettakkumulation auf, wie Hijmans et al. in einer Übersichtsarbeit darstellten [54]. Die Gruppe der WT-Mäuse (1A/1B) zeigte eine verhältnismäßig milde Steatose, sodass die zonale Gliederung der Lipidakkumulation erkennbar blieb. Die TG gefüllten Vesikel waren im Gegensatz zu den anderen Gruppen kleiner, füllten das Zytoplasma nicht gänzlich aus und waren gelblich bis blassrot gefärbt. In der Gruppe der HepKO-Mäuse (2A/2B) traten ballonierete Hepatozyten auf, deren Zytoplasma vollständig von multiplen kleinen Lipidtropfen verdrängt wurde. Die Farbintensität unterschied sich dabei nicht von der WT. Eine stärkere Anfärbung der Lipidtropfen war bei den Mäusen des intestinalen Knock-Outs erkennbar (3A/3B). Hier traten intensiver rot gefärbte Vesikel auf, jedoch blieb die Heterogenität der Farbintensitäten erhalten. Wie auch bei den HepKO-Mäusen traten hier vorwiegend bei den weiblichen Mäusen ballonierete Hepatozyten auf, deren Zytoplasma vollständig durch blassrote Lipidtropfen verdrängt wurde. Am intensivsten ließen sich die Lipidtropfen der KI-Mäuse anfärben. Sie präsentierten sich unabhängig vom Geschlecht stark rot.





**Abbildung 14: Prozentualer Anteil der mit Oil Red O angefärbten Fläche an der Gesamfläche eines Blickfelds der *Abcg5/g8*-Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät.** Ein Punkt in der Graphik repräsentiert den prozentualen Neutralfettflächenanteil eines mikroskopischen Blickfeldes in 200facher Vergrößerung.

Im Folgenden wurde der histologische Neutralfettgehalt der verschiedenen transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse durch die Analysesoftware ImageJ quantifiziert. Abbildung 14 stellt die durch ORO angefärbte Fläche der zwei Fütterungsgruppen Chow und Diät gegenüber. Die Flächenauswertung ergab, dass sich die beiden Gruppen im Hinblick auf ihre mit ORO angefärbte Fläche signifikant ( $p < 0,001$ ) voneinander unterschieden. Die Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten, wiesen einen höheren TG Gehalt auf. Aufgrund der ausgeprägten Spannweite der Messwerte wurden nun die Unterschiede zwischen den einzelnen transgenen *Abcg5/g8*-Mäusen herausgearbeitet.



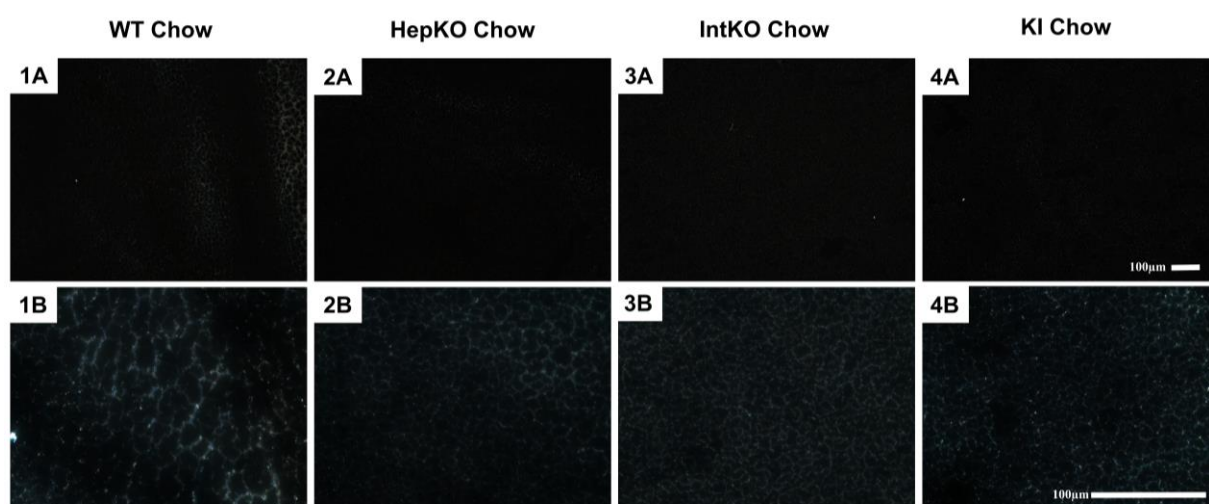
**Abbildung 15: Prozentualer Anteil der mit Oil Red O angefärbten Fläche an der Gesamfläche eines Blickfelds der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wiltyp (WT).** A: Transgene *Abcg5/g8*-Mäuse unter Chow-Fütterung. B: Transgene *Abcg5/g8*-Mäuse unter lithogener Diät. Ein Punkt in der Graphik repräsentiert den prozentualen Neutralfettflächenanteil eines mikroskopischen Blickfeldes in 200facher Vergrößerung.

Abbildung 15 zeigt unter A den Vergleich der Neutralfettfläche der Tiergruppen, welche die Chow-Fütterung erhielten. Die Gruppe der WT- und KI-Mäuse unterschied sich nicht voneinander. Beide Genotypen wiesen jedoch gegenüber den zwei gewebsspezifischen KO-Gruppen einen signifikant ( $p < 0,001$ ) geringeren TG-Gehalt auf. Die HepKO und IntKO Tiere unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Diagramm B der Abbildung 15 zeigt die Unterschiede der Neutralfettfläche der Gruppen, welche die lithogene Diät erhielten. Die Knock-Ins hatten die größte Neutralfettfläche und wiesen gegenüber jeder anderen Gruppe signifikante ( $p < 0,001$ ) Unterschiede auf. Zwischen dem Wildtyp mit dem geringsten Gehalt, den Mäusen des hepatischen und intestinalen Knock-Outs waren keine Unterschiede zu vermerken.

Zusammenfassend führte unter normaler Fütterung der gewebsspezifische *Abcg5/g8*-Knock-Out zu einer TG-haltigen Fetteinlagerung in die Hepatozyten. Eine starke TG-Akkumulation wurde bei allen Genotypen durch die lithogene Diät verursacht, wobei der Knock-In durch einen besonders hohen Gehalt herausstach.

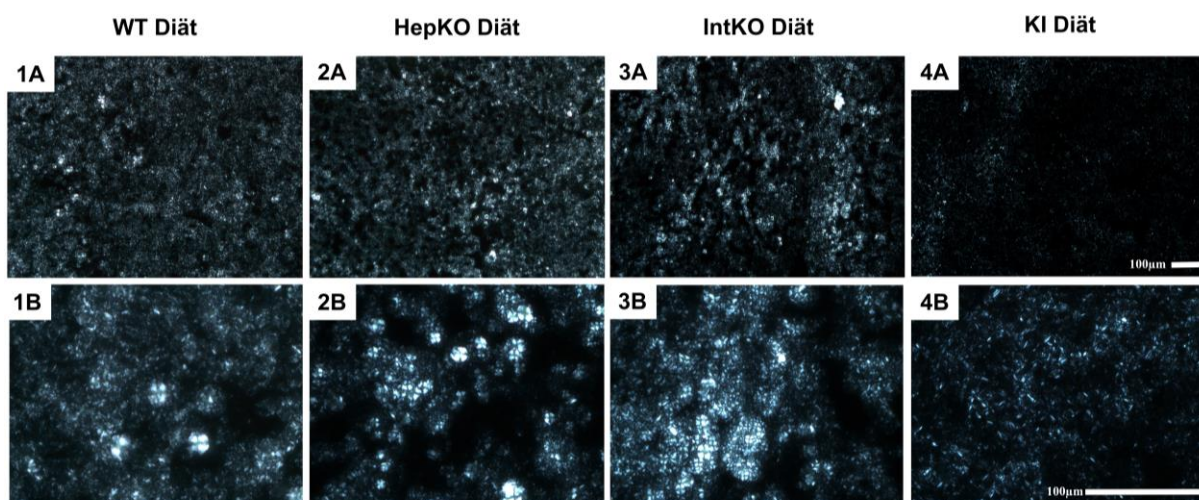
#### 4.1.3 Polarisationsmikroskopie

Mit Hilfe der Betrachtung der histologischen Leberschnitte im Mikroskop unter polarisiertem Licht sollten CC sichtbar gemacht und die doppelbrechende Fläche durch die Analysesoftware ImageJ quantifiziert werden.



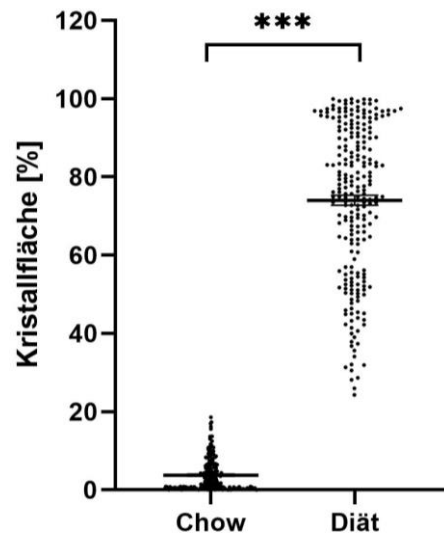
**Abbildung 16:** Unter polarisiertem Licht betrachtete, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse, welche die Chow-Fütterung erhielten. 1: WT (Wildtyp), 2: HepKO (hepatischer Knock-Out), 3: IntKO (intestinaler Knock-Out), 4: KI (Knock-In). A: 100x Vergrößerung, B: 400x Vergrößerung.

Abbildung 16 stellt die Polarisationsaufnahmen der Leberschnitte der *Abcg5/g8*-Mäuse dar, welche die Chow-Fütterung erhielten. Bei keiner dieser Mäuse waren manifeste CC sichtbar. Das histologische Bild der WT-, männlichen HepKO- sowie KI-Mäuse stellte sich wie folgt dar: Entlang der Zellgrenzen waren unspezifische doppelbrechende Strukturen erkennbar, welche auf Membranen zurückzuführen waren. Ein anderes Bild zeigte sich bei den gewebsspezifischen Knock-Out Mäusen. Alle intestinalen KO sowie die weiblichen HepKO-Mäuse zeigten eine beginnende Cholesterinkristallisation wie von Ioannou et al. beschrieben [63]. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass sich dünne, leuchtende Ringe mit einer so genannten Malteserkreuz-Aussparung darstellten. Im Abschnitt zur Abbildung 20 wird darauf näher eingegangen.



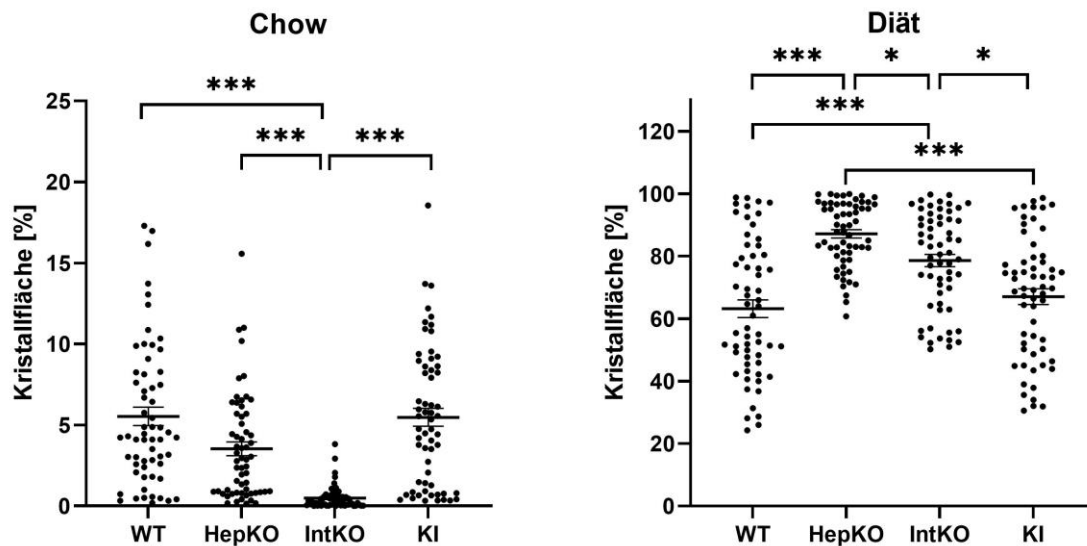
**Abbildung 17:** Unter polarisiertem Licht betrachtete, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten. 1: WT (Wildtyp), 2: HepKO (hepatischer Knock-Out), 3: IntKO (intestinaler Knock-Out), 4: KI (Knock-In). A: 100x Vergrößerung, B: 400x Vergrößerung.

Bei allen Tieren, welche die Diät erhielten (Abbildung 17), waren diese doppelbrechenden Flüssigkristalle sichtbar. Neben den Malteserkreuzen, welche Größen von bis zu 25 µm einnahmen, waren zahlreiche Cholesterinnadeln vorhanden. Es zeigte sich ein heterogenes Bild aus anfänglicher und fortgeschrittener Cholesterinkristallisation sowie flüssige und solide Kristalle. Die Mäuse des Wildtyps sowie des Knock-Ins zeigten eine verhältnismäßig geringe Menge an Kristallen. Die gewebsspezifischen Knock-Out Mäuse stellten sich hingegen mit einem größeren Flächenanteil von doppelbrechenden Strukturen dar. Es traten vermehrt Malteserkreuze auf, und die relative Fläche mit fortgeschrittener Cholesterinkristallisation nahm hier zu.



**Abbildung 18:** Prozentualer Anteil der unter polarisiertem Licht aufleuchtenden Kristallfläche an der Gesamtfläche eines Blickfeldes der *Abcg5/g8*-Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät. Ein Punkt in der Graphik repräsentiert den prozentualen Kristallflächenanteil eines mikroskopischen Blickfeldes in 200facher Vergrößerung.

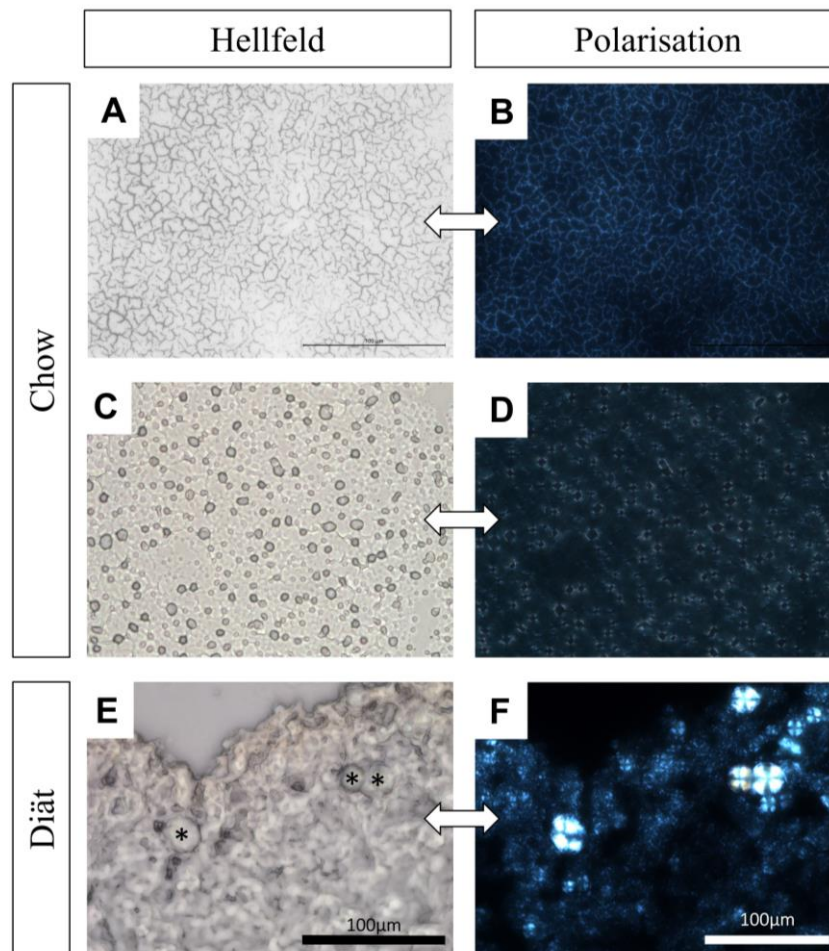
Abbildung 18 stellt den Vergleich der Kristallfläche zwischen den transgenen *Abcg5/g8*-Mäusen der Gruppe der Chow-Fütterung und der lithogenen Diät dar. Die Tiere der lithogenen Diät zeigten eine signifikant ( $p < 0,001$ ) größere unter polarisiertem Licht aufleuchtende Fläche. Dies spricht für einen deutlich höheren Gehalt an CC.



**Abbildung 19:** Prozentualer Anteil der unter polarisiertem Licht aufleuchtenden Kristallfläche der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wiltyp (WT). A: Transgene *Abcg5/g8*-Mäuse unter Chow-Fütterung. B: Transgene *Abcg5/g8*-Mäuse unter lithogener Diät. Ein Punkt in der Graphik repräsentiert den prozentualen Kristallflächenanteil eines mikroskopischen Blickfeldes in 200facher Vergrößerung.

Im Folgenden wurden die Unterschiede der prozentualen Kristallfläche der verschiedenen transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse dargestellt. Diagramm A aus Abbildung 19 stellte diese innerhalb der Mausgruppen dar, welche die Chow-Fütterung erhielten. Die Tiere des Wildtyps unterschieden sich nicht von den Knock-In Mäusen. Beide Gruppen zeigten jedoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Werte gegenüber den beiden gewebsspezifischen Knock-Out Mäusen. Die Gruppe der intestinalen Knock-Out Mäuse hatte insgesamt den niedrigsten prozentualen Kristallflächenanteil und unterschied sich signifikant ( $p < 0,001$ ) von jeder anderen Gruppe. Im Diagramm B der Abbildung 19 wurden die Unterschiede der transgenen Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten, dargestellt. Es zeigte sich, dass sich der Wildtyp auch hier nicht vom Knock-In unterschied. Die zwei gewebsspezifischen Knock-Out Gruppen unterschieden sich im Gegensatz zu den Tieren der Chow Fütterung dahingehend, dass sie signifikant (HepKO vs. WT/KI =  $p < 0,001$ ; IntKO vs. WT =  $p < 0,001$ ; IntKO vs. KI =  $p < 0,05$ ) höhere Kristallflächenanteile gegenüber dem WT und KI zeigten. Die Gruppe der HepKO Mäuse wies die größte Kristallfläche auf, und diese war gegenüber jeder anderen Gruppe signifikant (HepKO vs. WT =  $p < 0,001$ ; HepKO vs. IntKO =  $p < 0,05$ ; HepKO vs. KI =  $p < 0,001$ ) erhöht.

Abbildung 20 zeigt native Leberpräparate der Mäuse mit Chow-Fütterung und lithogener Diät. Es wurde derselbe Präparatausschnitt unter Hellfeld und polarisiertem Licht gegenübergestellt. A und B zeigen den Wildtypen. Unter Hellfeld waren die Membranen der einzelnen Hepatozyten sichtbar. Durch das polarisierte Licht leuchteten diese hell auf. Das unter Hellfeld betrachtete native Präparat des intestinalen Knock-Outs (C) zeigte multiple und homogen über das Leberparenchym verteilte vesikuläre Strukturen, die auf kleine Lipidtropfen zurückzuführen waren. Dies deckte sich mit den bereits beschriebenen Beobachtungen der HE- und ORO-Färbungen. Unter polarisiertem Licht (D) war erkennbar, dass nur diese Vesikel eine Doppelbrechung aufwiesen. Die Lipidtropfen leuchteten mit Aussparung eines Kreuzes hell auf. Dieses Bild stellt den Beginn der Cholesterinkristallisation und die Bildung von Flüssigkristallen dar. Die Präparate E und F zeigten das Lebergewebe einer HepKO-Maus, welche mit lithogener Diät gefüttert wurde. Unter Hellfeld betrachtet waren mehrere Lipidtropfen (beispielhaft mit Stern gekennzeichnet) im Nativpräparat sichtbar. Diese großen und kleinen Vesikel erschienen unter polarisiertem Licht vollständig ausgefüllt mit reifen CC in Form von Malteserkreuzen. Nur in solchen Lipidtropfen waren Malteserkreuze sichtbar. Das umliegende Leberparenchym wies eine diffuse Doppelbrechung mit mehreren kleinen, als Malteserkreuzen sichtbaren Cholesterinflüssigkristallen auf.

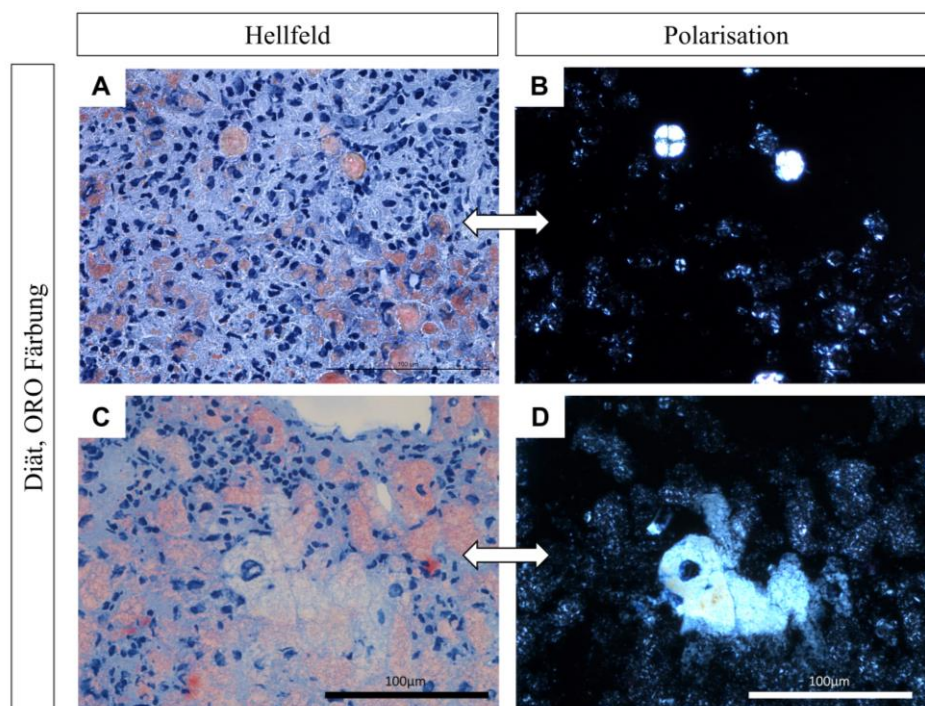


**Abbildung 20: Gegenüberstellung der Hellfeldmikroskopie eines ungefärbten Leberpräparats (A, C, E) und einer Belichtung mit polarisiertem Licht (B, D, F) des selben Präparatausschnitts.** A, B entstammen einer Wildtyp-Maus, C und D stellen Leberpräparate aus der Gruppe der IntKO-Mäuse dar. Die HepKO-Mäuse der Präparate E und F wurden mit lithogener Diät gefüttert und exemplarische Lipidtropfen mit einem Stern gekennzeichnet.

Abbildung 21 stellt mit ORO angefärbte, unter Hellfeld und polarisiertem Licht betrachtete Leberparenchymausschnitte gegenüber. Eine milde Steatose war auf Bild A erkennbar. Das homogene Leberparenchym wurde von großen Lipidtropfen durchzogen, welche die Größe der Hepatozyten überstiegen. Alle Lipidtropfen färbten sich mit ORO an, wiesen aber bemerkenswerterweise eine unterschiedlich starke Farbintensität auf. Während sich einige tiefrot darstellten, färbten sich andere nur blass an. Dies deutete auf einen voneinander abweichenden TG-Gehalt der Lipidtropfen hin. Im Vergleich zum Präparat unter polarisiertem Licht im Bild B erschienen nicht in allen Lipidtropfen die CC. Malteserkreuze waren nur in Lipidtropfen sichtbar, welche schwach mit ORO angefärbt waren. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Triacylglyceride alleine nicht zu einer Kristallisation führten. Dieser Befund spricht dafür, dass andere Lipide wie Cholesterin, welches durch die lithogene Diät in hohem Maße den Mäusen gefüttert wurde, für die Kristallisation verantwortlich sein können. Ein gewisser Anteil an TG in den Kristallen war jedoch nicht auszuschließen. C und D zeigten einen



Leberschnitt mit starker Steatose. Das Parenchym stellte sich mit einer mikrovesikulären Fetteinlagerung in den Hepatozyten dar. ORO färbte die Lipidtropfen rot, und unter polarisiertem Licht zeigten diese Gewebsabschnitte eine diffuse Kristallisation. In der Mitte des Präparates lag ein ballonierter Hepatozyt. Erkennbar war dieser durch seine Größenzunahme im Vergleich zu den umliegenden Hepatozyten, dem zentral liegenden Zellkern und den zahlreichen mikrovesikulären Fetttröpfchen, welche das Zytoplasma vollständig verdrängten. In der ORO-Färbung war diese Zelle schwächer angefärbt als die sie umgebenden Zellen. Dies ließ hier auf einen geringeren Anteil von TG in den Lipidtropfen schließen. Den größeren Anteil musste demnach ein anderes Lipid ausmachen. Unter polarisiertem Licht war zu erkennen, dass der ballonierte Hepatozyt mit Ausnahme des Zellkerns vollständig aufleuchtete. Dies wurde durch das Vorhandensein von CC verursacht, welche auf eine starke Cholesterinakkumulation zurückzuführen waren. Anhand dieses Bildvergleichs ließ sich aussagen, dass eine übermäßige Cholesterinakkumulation durch eine lithogene Diät in Hepatozyten zu einer Cholesterinkristallisation führte. Diese Kristallisation stand im Zusammenhang mit dem Ballooning – dem histopathologischen Korrelat der Lipotoxizität.

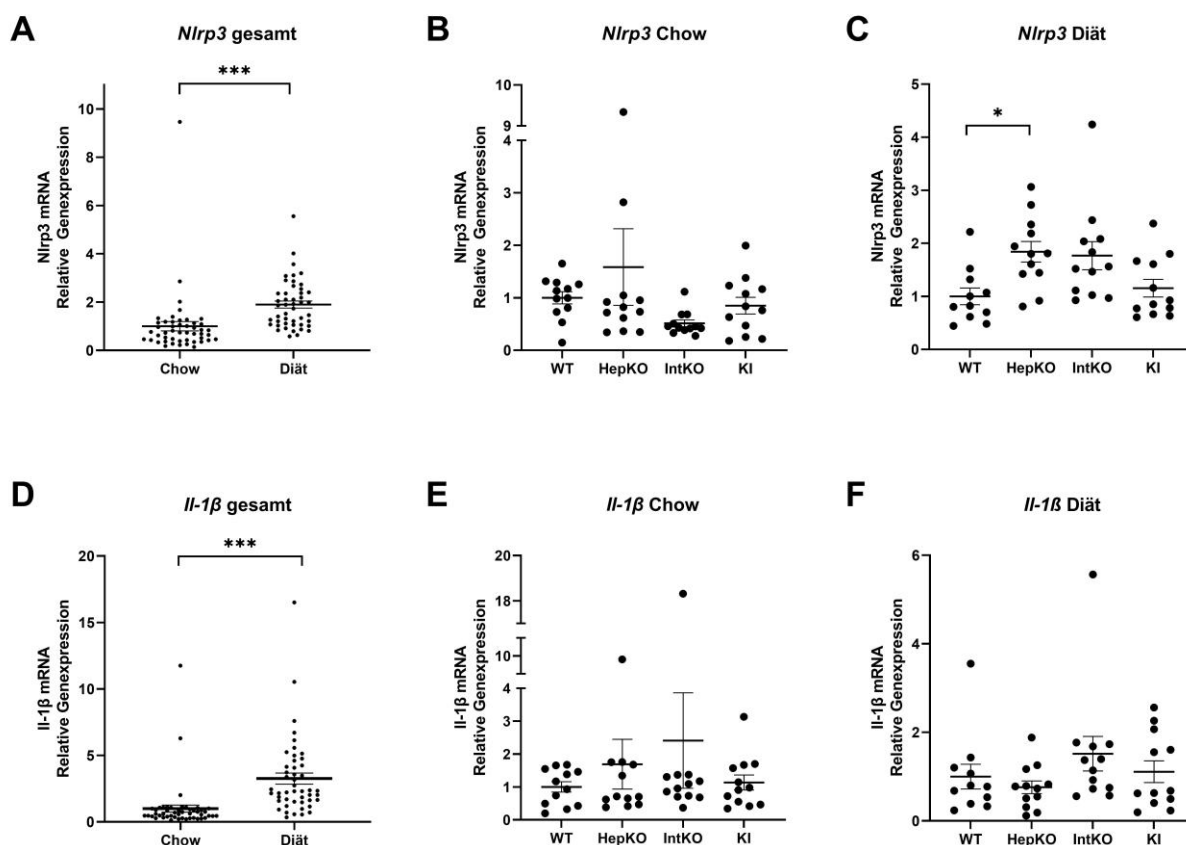


**Abbildung 21: Gegenüberstellung der Hellfeldmikroskopie eines mit Oil Red O-gefärbten Präparats (A, C) und der Belichtung mit polarisiertem Licht (B, D) des selben Präparatausschnitts. Die Präparate A&B entstammen einer WT-Maus und C&D einer KI-Maus. Alle Tiere wurden mit lithogener Diät gefüttert.**

Es stellte sich weiterführend die Frage, ob die Lipotoxizität im *Abcg5/g8*-Mausmodell nicht nur auf das Lebergewebe, sondern auch auf den gesamten Organismus in Form einer sterilen Entzündungsreaktion eine Auswirkung hatte. Daher wurden darauf aufbauend Genexpressionsanalysen (s.u.) durchgeführt.

## 4.2 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse soll neben dem inflammatorischen Geschehen im Lebergewebe der verschiedenen transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse auch eine Aussage über die Situation des Lipidstoffwechsels treffen. Dabei wurde das mRNA Expressionsniveau des an der sterilen Entzündung beteiligten NLRP3-Inflammasoms und des Zytokins *Il-1 $\beta$*  gemessen. Die Gene der Enzyme Fettsäuresynthese (*Fasn*), ATP-Citrat-Lyase (*Acly*), Acetyl-CoA Carboxylase (*Acaca*), Stearoyl-CoA Desaturase 1 (*Scd1*) sowie regulatorischer Proteine wie das „Sterol regulatory element-binding protein“ (*Srebf1*) und das „Carbohydrate responsive element-binding protein“ (*Mlxipl*) wurden in ihrem Expressionsniveau gemessen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen als relative Quantifizierung der Genexpression (vgl. Seite 32) angegeben.

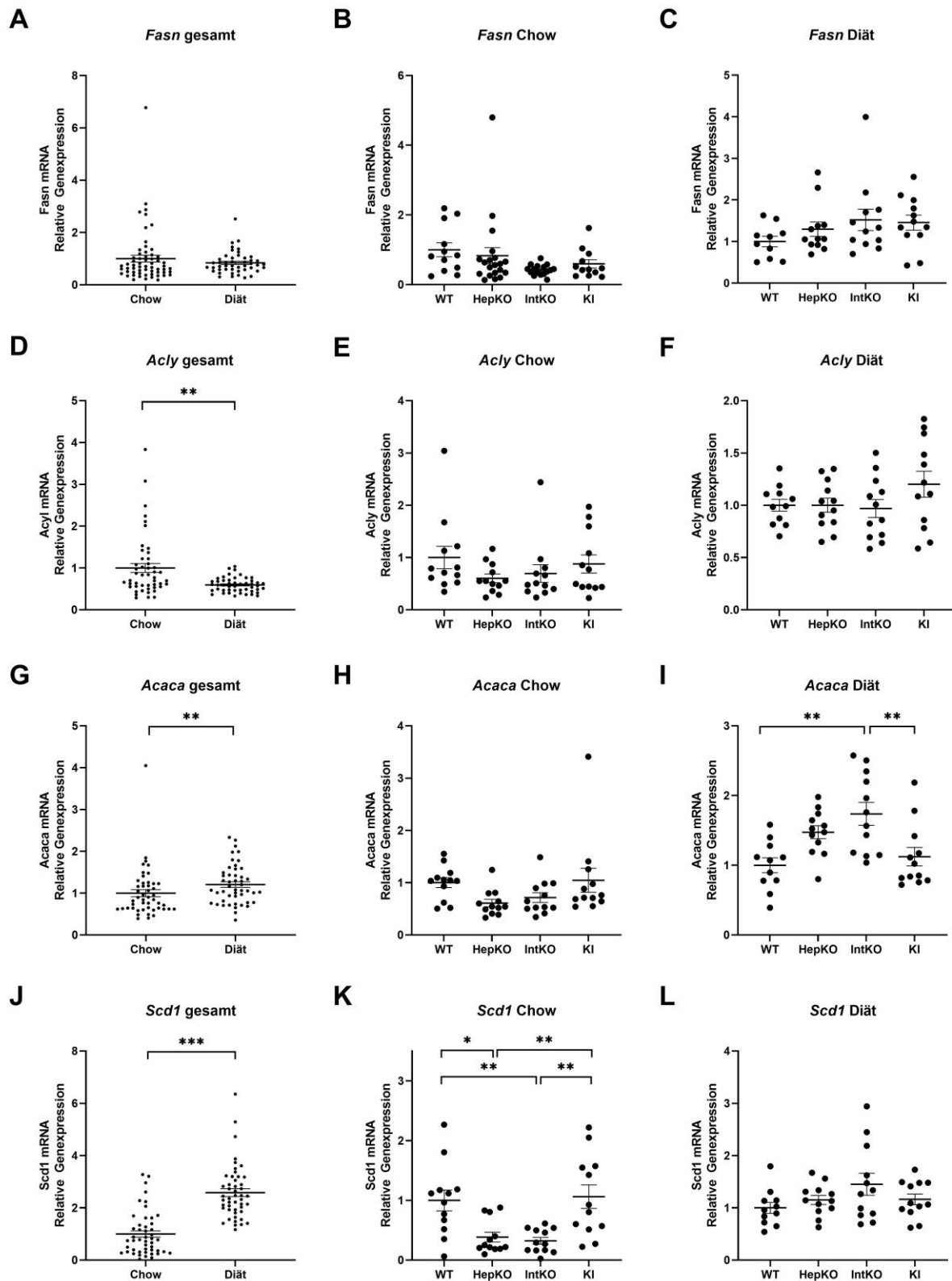


**Abbildung 22: Relative Genexpression (RQn-Werte) von *Nlrp3* und *Il-1 $\beta$* .** A, D: RQn-Werte der Gene aller transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät. B, E: RQn-Werte der Gene der verschiedenen Genotypen unter Chow-Fütterung. C, F: RQn-Werte der Gene der verschiedenen Genotypen unter lithogener Diät.



Wie in Abbildung 22 dargestellt, bestand ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der *Nlrp3*-Genexpression zwischen der Chow-Fütterung und der lithogenen Diät. Die Mäuse unter Diät wiesen eine fast doppelt so hohe Expression gegenüber denen der Chow-Gruppe auf (A). Bei den Tieren, welche die Chow-Fütterung erhielten, zeigten die HepKO- und IntKO-Mäuse eine Tendenz zu niedrigeren Expressionswerten gegenüber dem Wildtyp. Die intestinalen Knock-Outs wiesen das geringste *Nlrp3* Expressionsniveau auf. Einen signifikanten Unterschied zwischen dem Knock-In Modell und dem WT gab es nicht (B). Wurden die Tiere mit einer lithogenen Diät gefüttert, so kehrte sich das Muster um, und die gewebsspezifischen KO- Mäuse hatten tendenziell höhere Expressionsniveaus im Vergleich zum WT. Das Expressionsniveau der hepatischen KO-Tiere war insgesamt am höchsten und unterschied sich signifikant ( $p < 0,05$ ) vom WT. Die intestinalen KO-Tiere lagen mit ihrem Expressionsniveau ebenfalls über dem WT. Ein Unterschied zwischen dem KI-Modell und dem WT lag nicht vor (C).

Bei der Analyse der Genexpression des Zytokins *Il-1 $\beta$*  ergab sich bei Gegenüberstellung der zwei Fütterungsgruppen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ). Die Tiere, welche die lithogene Diät erhielten, wiesen eine deutlich höhere Expression gegenüber den Mäusen der Chow-Gruppe auf (D). Bei der Messung des Genexpressionsniveaus von *Il-1 $\beta$*  bei den vier Genotypen, welche die Chow-Fütterung erhielten, ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die intestinalen Knock-Out-Mäuse wiesen eine Tendenz zu höheren RQn-Werten gegenüber den Wildtypen auf. Keinen Unterschied gab es zwischen WT und KI (E). Bei der Mauskohorte, welche die lithogene Diät erhielt, zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Hier wiesen nur die intestinalen Knock-Out Tiere eine Tendenz zu einer höheren und die hepatischen Knock-Out Tiere eine zu einer niedrigeren *Il-1 $\beta$*  Genexpression (F) auf.



**Abbildung 23: Relative Genexpression (RQn-Werte) der Fettsäuresynthese (*Fasn*), ATP-Citrat-Lyase (*Acly*), Acetyl-CoA Carboxylase (*Acaca*) und Stearoyl-CoA Desaturase (*Scd1*).** A, D, G, J: RQn-Werte der Gene aller transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät. B, E, H, K: RQn-Werte der Gene der verschiedenen Genotypen unter Chow-Fütterung. C, F, I, L: RQn-Werte der Gene der verschiedenen Genotypen unter lithogener Diät.

Die Genexpressionsanalyse der Fettsäuresynthase (A in Abbildung 23) wurde von der Fütterungsart nicht beeinflusst. Bei der Betrachtung der einzelnen Genotypen einer Fütterungsgruppe (B, C) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Jedoch wiesen die Knock-Out und Knock-In Tiere aus der Chow-Fütterungsgruppe eine Tendenz zu niedrigeren und in der Gruppe der lithogenen Diät eine Tendenz zu höheren Expressionsniveaus auf.

Das Gen der ATP-Citrat-Lyase zeigte im Vergleich der beiden Fütterungsgruppen ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau ( $p < 0,01$ ) in der Kohorte, welche die lithogene Diät erhalten hat (D). Die vier Genotypen in den beiden Fütterungsgruppen (E, F) unterschieden sich nicht. Die gewebespezifischen Knock-Out Mäuse wiesen in der Gruppe der Chow-Fütterung jedoch eine tendenziell niedrigere ATP-Citrat-Lyase Expression gegenüber dem WT auf. Die Mäuse des Knock-Ins hatten in der Diät-Gruppe ein vergleichsweise höheres Expressionsniveau gegenüber den anderen drei Genotypen.

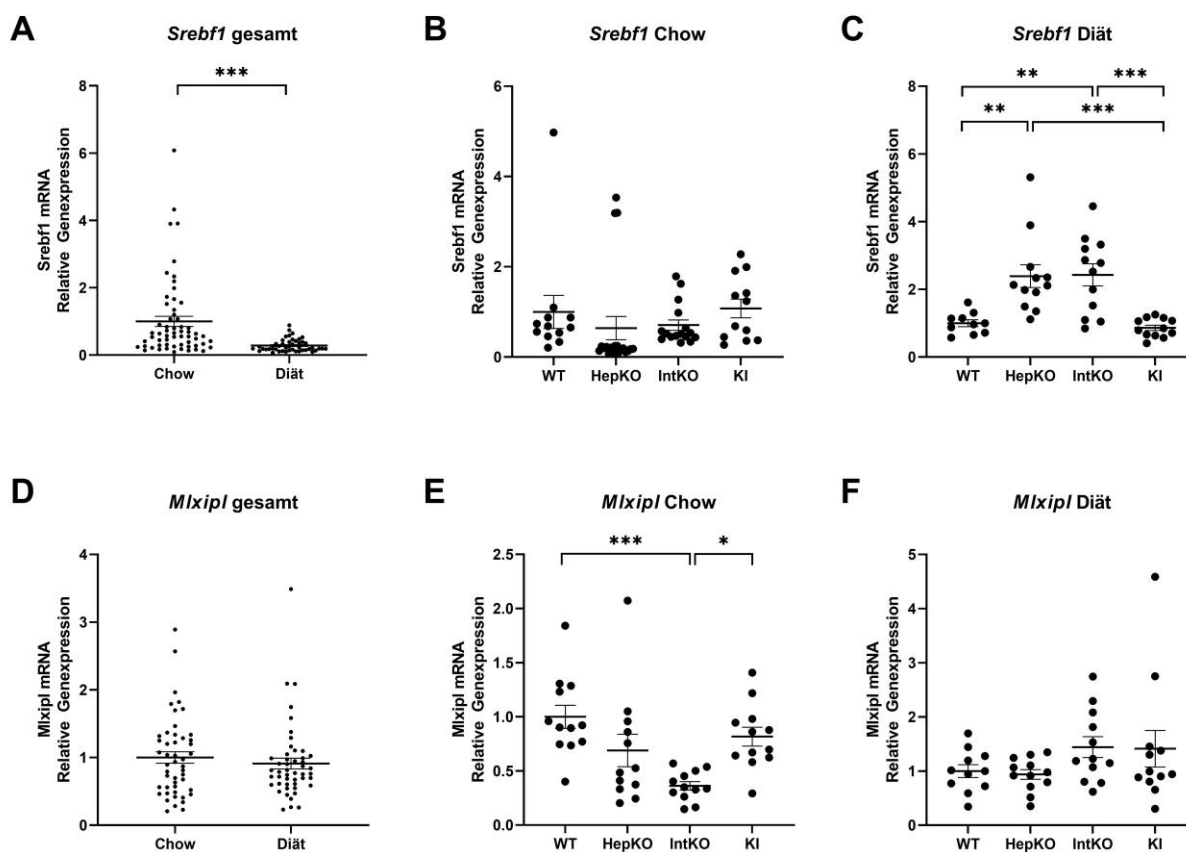
Die Gruppe der Mäuse mit lithogener Diät zeigten signifikant höhere Genexpressionsniveaus ( $p < 0,01$ ) der Acetyl-CoA Carboxylase gegenüber den Mäusen mit Chow-Fütterung (G). Zwischen den Genotypen der Chow-Tiere gab es keinen Unterschied, jedoch wiesen auch hier die Mäuse der gewebsspezifischen Knock-Outs tendenziell niedrigere RQn-Werte auf (H). Die lithogene Diät führte nur bei den HepKOs und IntKOs zu höheren Genexpressionsniveaus gegenüber dem WT (I). Beim intestinalen Knock-Out wurde die Acetyl-CoA Carboxylase gegenüber dem WT und dem Knock-In Modell sogar signifikant verstärkt exprimiert (jeweils  $p < 0,01$ ).

Die Expression der Stearoyl-CoA Desaturase war in der Gruppe der lithogenen Diät gegenüber den Mäusen, welche die Chow Fütterung erhielten, signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ) (J). Die gewebsspezifischen Knock-Outs der Chow-Mäuse führten zu einer signifikant verminderten Genexpression gegenüber dem WT und dem KI-Modell (IntKO vs. WT =  $p < 0,01$ ; IntKO vs. KI =  $p < 0,01$ ). Die KI-Mäuse unterschieden sich nicht vom WT (K). Keine Unterschiede ergaben sich bei den Mäusen mit Fütterung der lithogenen Diät. Hier zeigten die gewebsspezifischen Knock-Out Tiere, insbesondere der IntKO, eine Tendenz zu höheren Expressionswerten (L).

Abbildung 24 stellt die Genexpressionsergebnisse der beiden am Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel beteiligten regulatorischen Gene *Srebf1* und *Mlxipl* dar. Die Fütterung mit einer lithogenen Diät führte zu einem signifikant geringeren Expressionsniveau ( $p < 0,001$ ) von *Srebf1*. Keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine vergleichsweise niedrigere Expression wiesen die gewebsspezifischen Knock-Out Mäuse auf, welche die Chow-Fütterung erhielten. Die lithogene Diät führte dazu, dass das Expressionsniveau bei den gewebsspezifischen Knock-Outs signifikant gegenüber dem WT und dem KI anstieg (HepKO vs. WT =  $p < 0,01$ ; HepKO vs. KI =  $p < 0,001$ ; IntKO vs. WT =  $p < 0,01$ ; IntKO vs. KI =  $p < 0,001$ ). Einen Unterschied zwischen dem WT und dem KI ergab sich nicht. Das Expressionsniveau von *Mlxipl* wurde von der Art der Fütterung nicht beeinflusst. Innerhalb der

Chow-Fütterung zeigten jedoch die Mäuse des intestinalen Knock-Outs eine signifikant (IntKO vs. WT =  $p < 0,001$ ; IntKO vs. KI =  $p < 0,05$ ) geringere Expression im Vergleich zum WT und zum KI. Bei den HepKO-Tieren war *Mlxipl* tendenziell vermindert exprimiert. In der Gruppe der Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten, zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen, das Expressionsniveau der IntKO-Tiere war jedoch vergleichsweise erhöht.

Insgesamt stellte sich die Fettstoffwechsellage der Mäuse, welche die Chow-Fütterung erhielten so dar, dass die gewebsspezifischen Knock-Outs im Vergleich zum WT eine verminderte Expression von Genen für Enzyme und regulatorische Proteine der De-novo-Lipogenese aufwiesen.

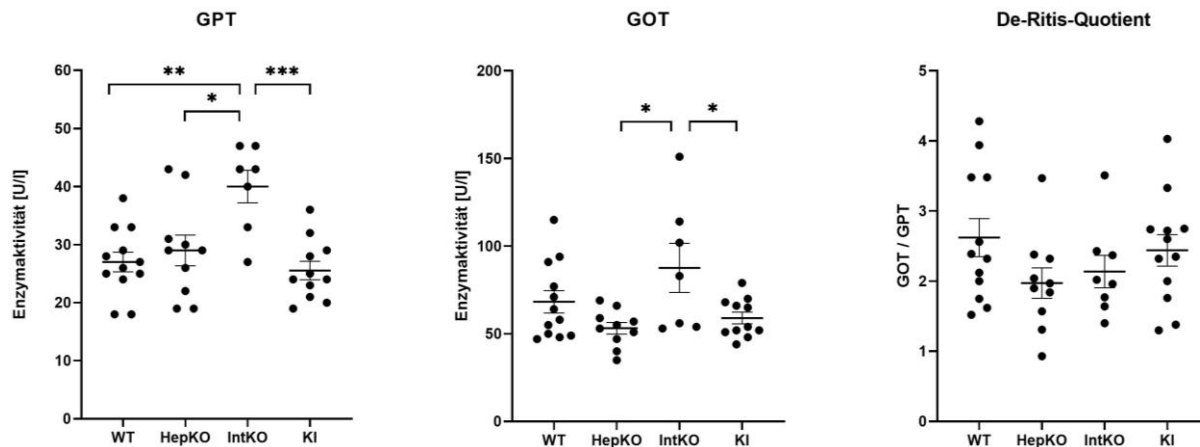


**Abbildung 24: Relative Genexpression (RQn-Werte) des Sterol regulatory element-binding protein (*Srebf1*) und des Carbohydrate responsive element-binding protein (*Mlxipl*).** A, D: RQn-Werte der Gene aller transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät. B, E: RQn-Werte der verschiedenen Genotypen unter Chow-Fütterung. C, F: RQn-Werte der verschiedenen Genotypen unter lithogener Diät.

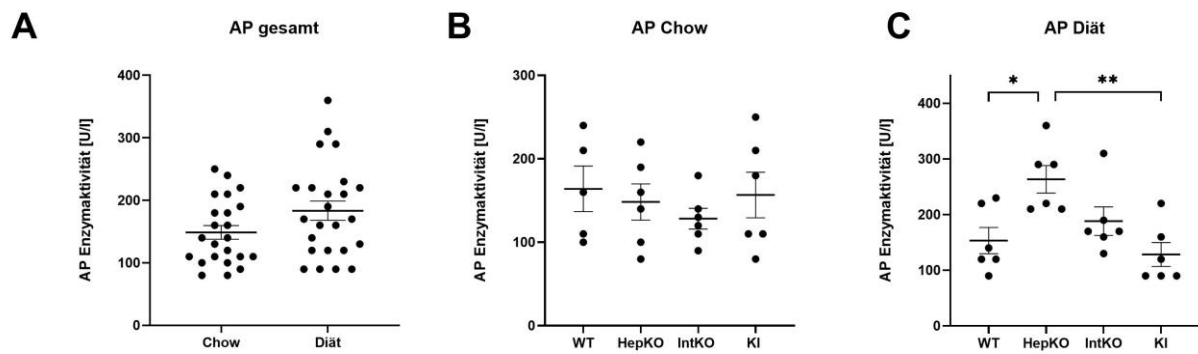
### 4.3 Serumparameter

Die Enzyme GPT und GOT stellen einen wichtigen diagnostischen Marker für eine Leberzellschädigung dar. Abbildung 25 zeigt die Serumaktivitäten der beiden Enzyme aus den Gruppen der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse. Die Auswertung ergab, dass die GPT Enzymaktivitäten aller untersuchten Mäuse im unteren Normbereich von 14-94 U/l lagen. Die GPT Aktivitäten der Mäuse des intestinalen Knock-Outs waren gegenüber jeder weiteren Gruppe signifikant erhöht (IntKO vs. WT =  $p < 0,01$ ; IntKO vs. HepKO =  $p < 0,05$ ; IntKO vs. KI =  $p < 0,001$ ) (A). Die Enzymaktivitäten der GOT lagen ebenfalls alle, bis auf einen Wert aus der Gruppe der IntKO, im Normbereich von 32-122 U/l. Auch hier wies die Gruppe der IntKO Mäuse signifikant (jeweils  $p < 0,05$ ) höhere Enzymaktivitäten gegenüber HepKO und KI, jedoch nicht gegenüber dem WT auf (B).

Der De-Ritis-Quotient ermöglicht es, eine Aussage über die Schwere des Leberschadens zu treffen. Alle Werte des De-Ritis-Quotienten lagen (mit der Ausnahme einer Maus beim HepKO-Mausmodell) deutlich über 1, was für eine Leberschädigung sprach. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen vor. Die HepKO Mäuse sowie die des intestinalen Knock-Out wiesen jedoch tendenziell geringere Werte gegenüber dem Wildtyp auf (C).



**Abbildung 25: Enzymaktivitäten der Serumleberwerte der transgenen *Abcg5/g8*-Mäuse (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wildtyp (WT) unter Chow-Fütterung. A: Enzymaktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). B: Enzymaktivitäten der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT). C: De-Ritis Quotient (GOT/GPT).**



**Abbildung 26: Enzymaktivitäten der alkalkischen Phosphatase im Serum von transgenen *Abcg5/g8*-Mäusen (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wildtyp (WT).** A: Vergleich der zwei Fütterungsgruppen. B: Transgene *Abcg5/g8*-Mäuse unter Chow-Fütterung. C: Transgene *Abcg5/g8*-Mäuse unter lithogener Diät.

Die alkalische Phosphatase als Serummarker für cholestatische Erkrankungen sollte hier neben der Feststellung eines Leberschadens Aufschluss über die Beteiligung der Gallenwege geben. Abbildung 26 zeigt die AP Enzymaktivitäten im Serum aller *Abcg5/g8*-Mäuse im Vergleich zwischen den zwei Fütterungsarten Chow und Diät sowie die Unterschiede innerhalb der Gruppen. Alle Werte lagen im oberen Normbereich (68-184 U/l) oder überschritten diesen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Fütterungsgruppen. Jedoch wiesen die Mäuse, welche eine lithogene Diät erhielten, eine tendenziell höhere AP Aktivität auf (A). Bei den Mäusen, welche die normale Diät erhielten, lagen nur die IntKO Mäuse im Normbereich. Alle anderen Gruppen überschritten zum Teil den oberen Grenzwert. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor. Die HepKO- und IntKO- Mäuse zeigten jedoch eine Tendenz zu niedrigeren Werten gegenüber dem Wildtyp und den KI-Mäusen (B). In der Gruppe der Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten, wiesen die HepKO-Mäuse signifikant höhere AP-Werte gegenüber WT und KI auf (HepKO vs. WT =  $p < 0,05$ ; HepKO vs. KI =  $p < 0,01$ ). Alle Werte der HepKO-Tiere überschritten hier den oberen Grenzwert. Die IntKO-Mäuse wiesen ebenfalls eine Tendenz zu höheren AP-Werten auf (C).

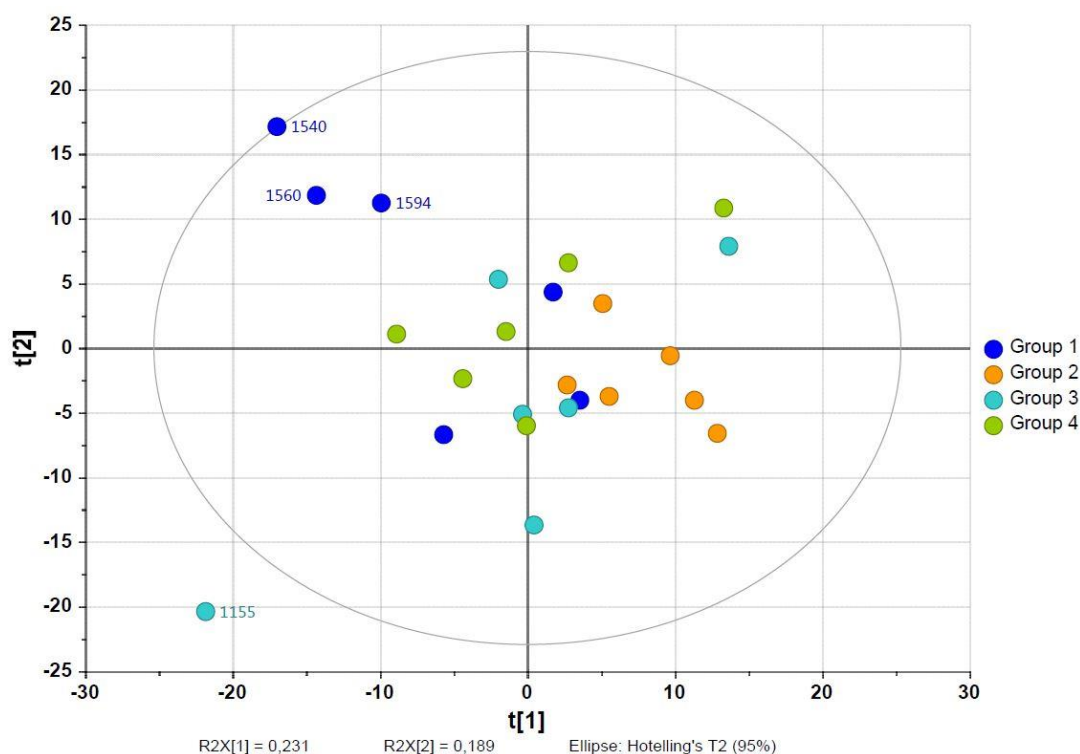
Die Ergebnisse der AP Enzymaktivitäten zeigten zusammengefasst nur beim mit lithogener Diät gefütterten hepatischen Knock-Out einen Hinweis auf eine Cholestase.

## 4.4 Lipidomanalyse

Der Aufschluss des Lipidoms der Leber lieferte Informationen über die Quantität verschiedener Lipide, die Aktivitäten der am Lipidstoffwechsel beteiligten Enzyme sowie die Stoffwechselsituation und zeigte die Auswirkung der *Abcg5/g8*-Transportermodifikation auf die Lipidzusammensetzung der Leber. Dabei wurden aus Lebern der vier Genotypen, welche die Chow-Fütterung erhielten, insgesamt 399 verschiedene Metabolite aus 81 chemischen Klassen des Fettstoffwechsels analysiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der multivariaten und anschließend der univariaten Datenanalyse dargestellt.

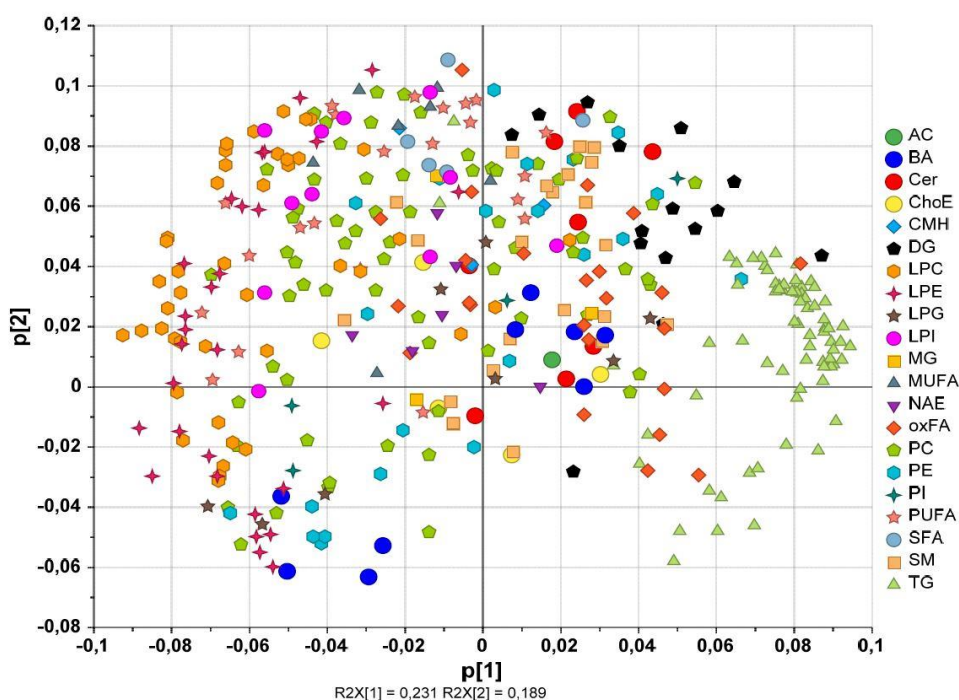
### 4.4.1 Multivariate Datenanalyse

Der Multivariaten Datenanalyse lag die PCA zu Grunde (siehe 37). Das Ziel der Hauptkomponentenanalyse war es, den großen Datensatz zu vereinfachen und die metabolische Clusterbildung zu visualisieren, ohne dabei den Informationsgehalt zu reduzieren. Dabei wurden die Daten auf zwei Hauptkomponenten reduziert. Diese erklärten zu 23% bzw. 19% die Gesamtvarianz des Datensatzes.



**Abbildung 27: Score plot.** Darstellung der durch die zwei Hauptkomponenten  $t[1]$  und  $t[2]$  der PCA beschriebenen Mausproben der vier Genotypen. Group 1 = Wildtyp, Group 2 = HepKO, Group 3 = IntKO, Group 4 = KI

Die Darstellung der metabolischen Clusterbildung der Genotypen auf den Projektionsebenen der PCA, ausgedrückt durch die zwei Hauptkomponenten, erfolgte im Score plot (Abbildung 27). Die Hotelling T2 Ellipse identifizierte einen schwachen Ausreißer aus der Gruppe der IntKO, der jedoch weiterhin in die Auswertung inkludiert wurde. Es war zu erkennen, dass sich keine klare Unterscheidung der Genotypen in der Qualität des Lipidoms durch die PCA ergeben hat, da sich nahezu alle Proben der vier Genotypen in ihrer Lage im Diagramm überschneiden. Jedoch hoben sich die HepKO von den anderen Tieren dahingehend ab, dass sie ausschließlich positiv durch die erste Hauptkomponente beschrieben wurden. Die intestinalen Knock-Outs werden ebenso überwiegend positiv durch diese beschrieben.



**Abbildung 28: Loading plot.** Darstellung der durch die zwei Hauptkomponenten  $t[1]$  und  $t[2]$  der PCA beschriebenen Metabolite der Mausproben. DG = Diacylglyceride, LPC = Lysophosphatidylcholin, LPE = Lysophosphatidylethanolamin, MUFA = einfach ungesättigte Fettsäure, oxFA = oxidierte Fettsäuren, PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA = gesättigte Fettsäure, TG = Triacylglyceride. Weitere Metabolite siehe Abkürzungsverzeichnis.

Um den Einfluss der einzelnen Metabolite auf die Clusterbildung im Score plot und den Trend der Datenmenge zu analysieren, wurde der Loading plot erstellt. (Abbildung 28) Dieses Diagramm stellt die verschiedenen Metabolite einer chemischen Klasse auf den Projektionsebenen der zwei Hauptkomponenten dar. Punkte, welche vom Diagrammzentrum weit entfernt lagen, hatten den größeren Einfluss auf die Varianz des Datensatzes.

Es zeigte sich, dass die TG mit hohen Werten durch die erste Hauptkomponente beschrieben wurden und diese somit für den großen Teil der Varianz des Datensatzes verantwortlich waren. Die Diacylglyceride (DG) und die oxidierten Fettsäuren (oxFA) wurden ebenfalls positiv durch die erste



Hauptkomponente beschrieben. Des Weiteren fiel auf, dass die Lysoglycerophospholipide wie Lysophosphatidylcholin (LPC) und Lysophosphatidylethanolamin (LPE) sehr niedrige Werte der ersten Hauptkomponente annahmen. Die zweite Hauptkomponente beschrieb mit positiven Werten die freien Fettsäuren, vertreten durch die gesättigten Fettsäuren (SFA) sowie die einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA, PUFA).

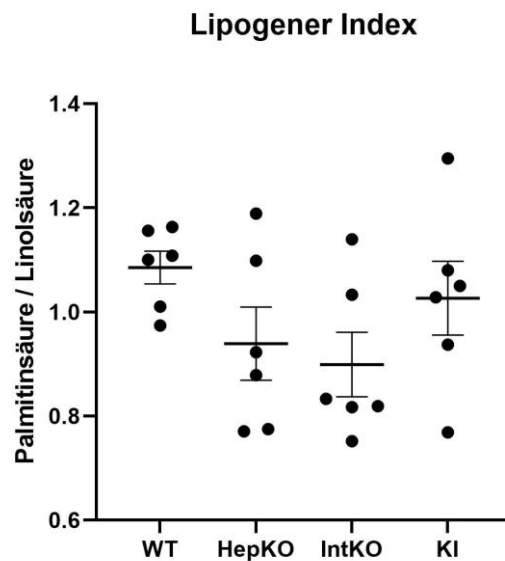
Um Rückschlüsse zu ziehen, wie die Varianzen der einzelnen Metabolite mit den vier Genotypen zusammenhängen und welche Metabolite für die Clusterbildung verantwortlich waren, wurden Score plot und Loading plot miteinander verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Gruppe der HepKO sowie die Triacylglyceride stark positiv durch die erste Hauptkomponente beschrieben wurden und dadurch dieser Genotyp einen höheren Gehalt an TGs in der Leber gegenüber den anderen Genotypen aufwies. Durch die negativen Werte für LPE und LPC der ersten Hauptkomponente wurde verdeutlicht, dass die hepatischen Knock-Outs einen verminderten Gehalt an Lysoglycerophospholipiden hatten. Unter Betrachtung der Tatsache, dass die WT-Mäuse negativ durch die erste Hauptkomponente beschrieben wurden, ließ sich schlussfolgern, dass sie einen erhöhten Gehalt an Lysoglycerophospholipiden aufwiesen.

Die multivariate Datenanalyse ergab, dass sich das Lipidom der vier verschiedenen *Abcg5/g8*-Mausgruppen nicht eindeutig voneinander unterschied. Die größten herausgearbeiteten Unterschiede betrafen den hepatischen Knock-Out, welcher durch einen erhöhten Gehalt an TG sowie DG und einen verminderten Gehalt an Lysoglycerophospholipiden bestimmt war.

#### 4.4.2 Univariate Datenanalysen

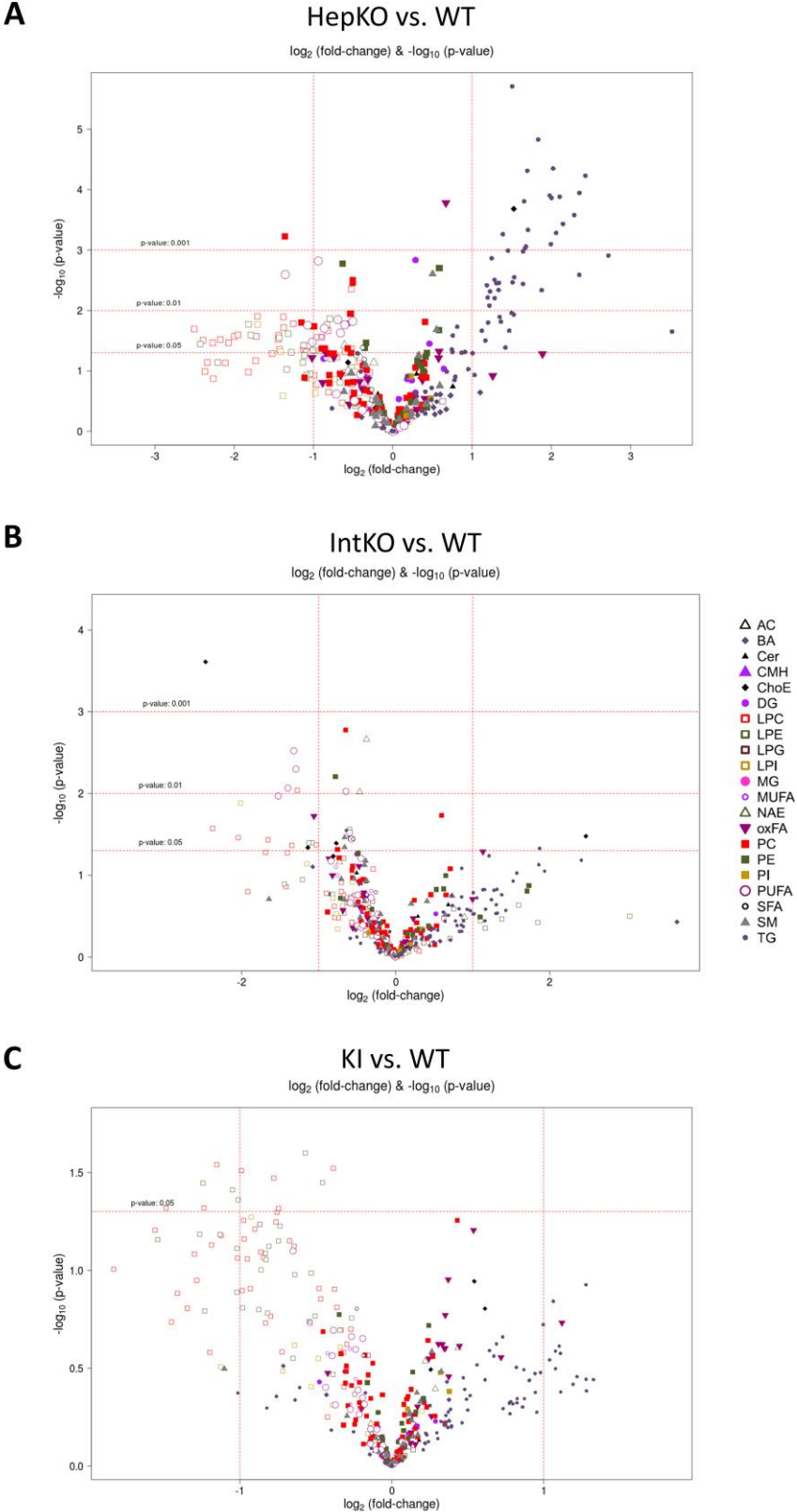
Die univariate Datenanalyse reduzierte den Datensatz nicht, sondern befasste sich mit der Auswertung eines jeden Metaboliten. Neben dem Vergleich der einzelnen Lipide konnten durch ein Verhältnis von Produkt zu Edukt auf die Aktivität bestimmter Enzyme rückgeschlossen und Aussagen über die Stoffwechselsituation der Leber und des Organismus der einzelnen Gruppen getroffen werden. Einen Überblick über die Ergebnisse der univariaten Datenanalyse liefert die „Heatmap“ (Abbildung 36 im Anhang).

Der Quotient aus Palmitinsäure (16:0) und Linolsäure (18:2), welcher als Lipogener Index beschrieben wird, (Abbildung 29) lässt eine Aussage über die Aktivität der De-novo-Lipogenese zu [59]. Die Größe des Quotienten korreliert positiv mit dem Grad der Fettsäurebiosynthese. Beim Vergleich der Genotypen untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Lipogenen Index. Jedoch hatten die gewebsspezifischen Knock-Out Tiere vergleichsweise niedrige Quotienten. Dies spricht dafür, dass der *Abcg5/g8*-Transporter Knock-Out zu einer verringerten De-novo-Lipogenese führt.



**Abbildung 29: Lipogener Index.** Gebildet aus dem Quotienten aus Palmitinsäure (16:0) und Linolsäure (18:2) zur Darstellung der De-novo-Lipogenese der Leber.

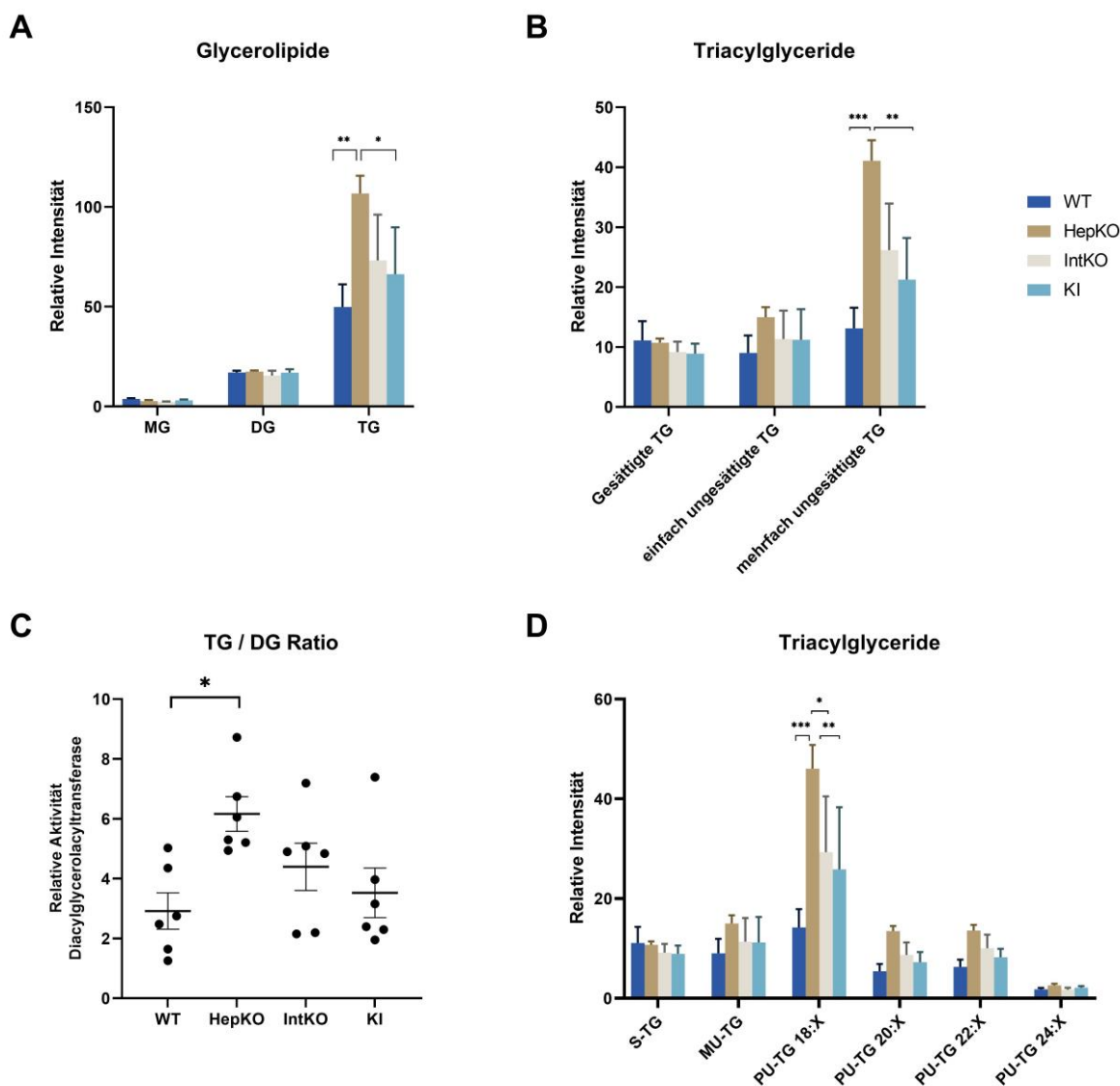
Anhand von Vulcano plots (Abbildung 30) wurden zunächst die wichtigsten Unterschiede zwischen den Genotypen herausgearbeitet. Hierfür wurden jeweils die Gruppen HepKO, IntKO und KI mit dem WT verglichen. Der „fold-change“ diente als Maß der Änderung zwischen zwei Proben, und der T-Test für ungepaarte Stichproben legte die statistische Signifikanz fest. Für eine Heatmap dieser Daten wird auf den Anhang verwiesen. Der Vergleich der einzelnen Metabolite des hepatischen Knock-Outs mit dem WT hat ergeben, dass der HepKO durch signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere TG-Level auffiel. Die DGs und oxFAs zeigten ebenso eine Tendenz zu erhöhten Werten. Dagegen war der Gehalt der Lysoglycerophospholipide LPE und LPC sowie der freien Fettsäuren, insbesondere der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem WT erniedrigt. Die Mäuse des IntKO stellten sich in Bezug auf diese Parameter im Vergleich zum WT wie die des HepKO dar. Sie unterschieden sich lediglich durch niedrigere p-Werte bei den Glycerolipiden und Lysoglycerophospholipiden. Der Knock-In zeigte gegenüber dem WT ebenfalls eine Tendenz zu einem erhöhten TG-Gehalt und verminderten freien Fettsäuren, welche aber nur bei den Lysoglycerophospholipiden signifikant ( $p < 0,05$ ). Insgesamt waren die Unterschiede zwischen WT und KI gering ausgeprägt.



**Abbildung 30: Volcano plots der univariaten Datenanalyse.** Logarithmische Auftragung von log<sub>10</sub> p-Werten aus dem T-Test und dem log<sub>2</sub> fold-change der Vergleiche zwischen jeweils HepKO, IntKO und KI mit dem WT. DG = Diacylglyceride, LPC = Lysophosphatidylcholin, LPE = Lysophosphatidylethanolamin, MUFA = einfach ungesättigte Fettsäure, oxFA = oxidierte Fettsäuren, PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäure, SFA = gesättigte Fettsäure, TG = Triacylglyceride. Weitere Metabolite siehe Abkürzungsverzeichnis.

Im Folgenden wird genauer auf bestimmte chemische Klassen wie Glycerolipide, freie Fettsäuren, Glycerophospholipide und Cholesterinester sowie auf ausgewählte Enzymaktivitäten eingegangen. Diese Ergebnisse geben einen Einblick auf die Auswirkungen der *Abcg5/g8*-Transportermodifikation auf den Lipidstoffwechsel der Leber.

## Glycerolipide



**Abbildung 31:** A: Relative Intensitäten der drei Glycerolipidklassen in der Leber der Genotypen der *Abcg5/g8*-Mäuse. DG = Diacylglycerin, MG = Monoacylglycerin, TG = Triacylglycerin. B: Relative Intensitäten der Triacylglyceride und Unterscheidung der TG in Bezug auf die Veresterung mit gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. C: Verhältnis von TG zu DG. D: Unterscheidung der Glycerolipide anhand des Sättigungsgrads und der Kohlenstoffkettenlänge der veresterten Fettsäuren; S-TG = TG mit ungesättigten Fettsäuren, MU-TG = TG mit einfach ungesättigten Fettsäuren, PU-TG = TG mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei der Analyse des Gehalts von Glycerolipiden in der Leber der vier verschiedenen *Abcg5/g8*-Genotypen (Abbildung 31) ist zunächst aufgefallen, dass sich die vier Gruppen in Bezug auf den Gehalt der Mono- und Diacylglyceride nicht unterschieden. Der Triacylglyceridgehalt wurde jedoch durch die Transportermodifikation beeinflusst. Mäuse des hepatischen Knock-Outs wiesen gegenüber dem Wildtyp und dem Knock-In signifikant höhere TG Level auf (HepKO vs. WT =  $p < 0,01$ ; HepKO vs. KI =  $p < 0,05$ ). Bemerkenswerter Weise zeigten die weiblichen Mäuse gegenüber dem männlichen Geschlecht tendenziell höhere Triacylglyceridwerte. Um der Frage nachzugehen, wie die TG zusammengesetzt waren, wurde diese chemische Klasse nach dem Sättigungsgrad der veresterten Fettsäuren (FA) in gesättigte FA, einfach ungesättigte FA und mehrfach ungesättigte FA weiter unterteilt (B). Hierbei fiel auf, dass die TG, welche mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren verestert waren, den größten Unterschied zwischen den Genotypen aufwiesen. Auch hier führte der hepatische Knock-Out des *Abcg5/g8*-Transporters zu einem signifikant höheren Gehalt gegenüber dem WT und dem KI (HepKO vs. WT =  $p < 0,001$ ; HepKO vs. KI  $p < 0,05$ ). Hinsichtlich des Gehalts an TG mit gesättigten FA und einfach ungesättigten FA unterschieden sich die Genotypen nicht. Da die mit PUFAs veresterten TG zwischen den Genotypen den größten Unterschied ausmachten, wurden diese nach der Kettenlänge der veresterten Fettsäuren weiter unterteilt. Hier zeigte sich, dass bei den HepKOs die TG, welche mit 18C PUFAs verestert waren, signifikant gegenüber allen weiteren Genotypen erhöht waren (HepKO vs. WT =  $p < 0,001$ ; HepKO vs. IntKO =  $p < 0,05$ ; HepKO vs. KI =  $p < 0,01$ ). Anhand des Verhältnisses zwischen TG und DG kann bei hohen Werten eine Aussage über das Vorliegen einer Steatose getroffen werden, da Puri et al. einen signifikanten Anstieg des TG/DG-Quotienten bei Patienten mit NAFLD und NASH nachweisen konnten [117]. Der hepatische Knock-Out zeigte gegenüber dem WT ein signifikant ( $p < 0,05$ ) höheres TG/DG-Verhältnis. Der intestinale Knock-Out hatte ebenfalls diese Tendenz, wohingegen sich der KI nicht signifikant vom WT unterschied.

Dieses Ergebnis der Analyse der Glycerolipide deutet darauf hin, dass der *Abcg5/g8*-Knock-Out zu einer Steatose durch Triacylglycerideinlagerung führt und die TG hauptsächlich mit PUFAs verestert waren.

## Freie Fettsäuren

Da bei der Zusammensetzung der Glycerolipide auffiel, dass die größten Unterschiede zwischen den Genotypen auf die mit PUFAs veresterten TG zurückzuführen waren, werden nun die freien Fettsäuren hinsichtlich des Sättigungsgrades und der Kohlenstoffkettenlänge analysiert. (Abbildung 32) Die Genotypen unterschieden sich nicht durch den Gehalt an SFA. Jedoch wiesen die gewebsspezifischen Knock-Outs einen vergleichsweise geringeren Gehalt auf (A). Diese Tendenz war auch bei der Unterscheidung der SFAs nach Kohlenstoffkettenlänge zu beobachten, jedoch zeigte sie sich unabhängig von der Länge (B). Bei der Analyse der MUFA ergab sich dasselbe Bild wie bei den SFA. Auch hier fielen die zwei Knock-Out Genotypen durch einen relativ niedrigeren Gehalt gegenüber dem WT und dem KI auf (C). Dieser Unterschied war auch bei der Analyse der MUFA nach Kettenlänge konstant zu beobachten. Nur bei der Palmitoleinsäure (16C) ( $p < 0,05$ ) und der Margaroleinsäure (17C) ( $p < 0,05$ ) zeigte der hepatische Knock-Out einen signifikant geringeren Gehalt gegenüber dem WT (D). Die Analyse der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigte ebenfalls einen geringeren Gehalt bei den Knock-Out Tieren. Signifikant verringert ( $p < 0,05$ ) war der Gehalt der PUFAs bei den IntKO-Mäusen (E). Diese Tendenz war jedoch nur bei den C18-C22 Fettsäuren zu beobachten, und signifikante Unterschiede gegenüber WT und KI zeigten sich nur für die C20 Fettsäuren bei den beiden Knock-Out Gruppen (F).

Das Ergebnis der detaillierten Analyse der freien Fettsäuren zeigte, dass der Knock-Out des *Abcg5/g8*-Transporters zu einer Verringerung des Gehalts der freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der 20C FA, führt.

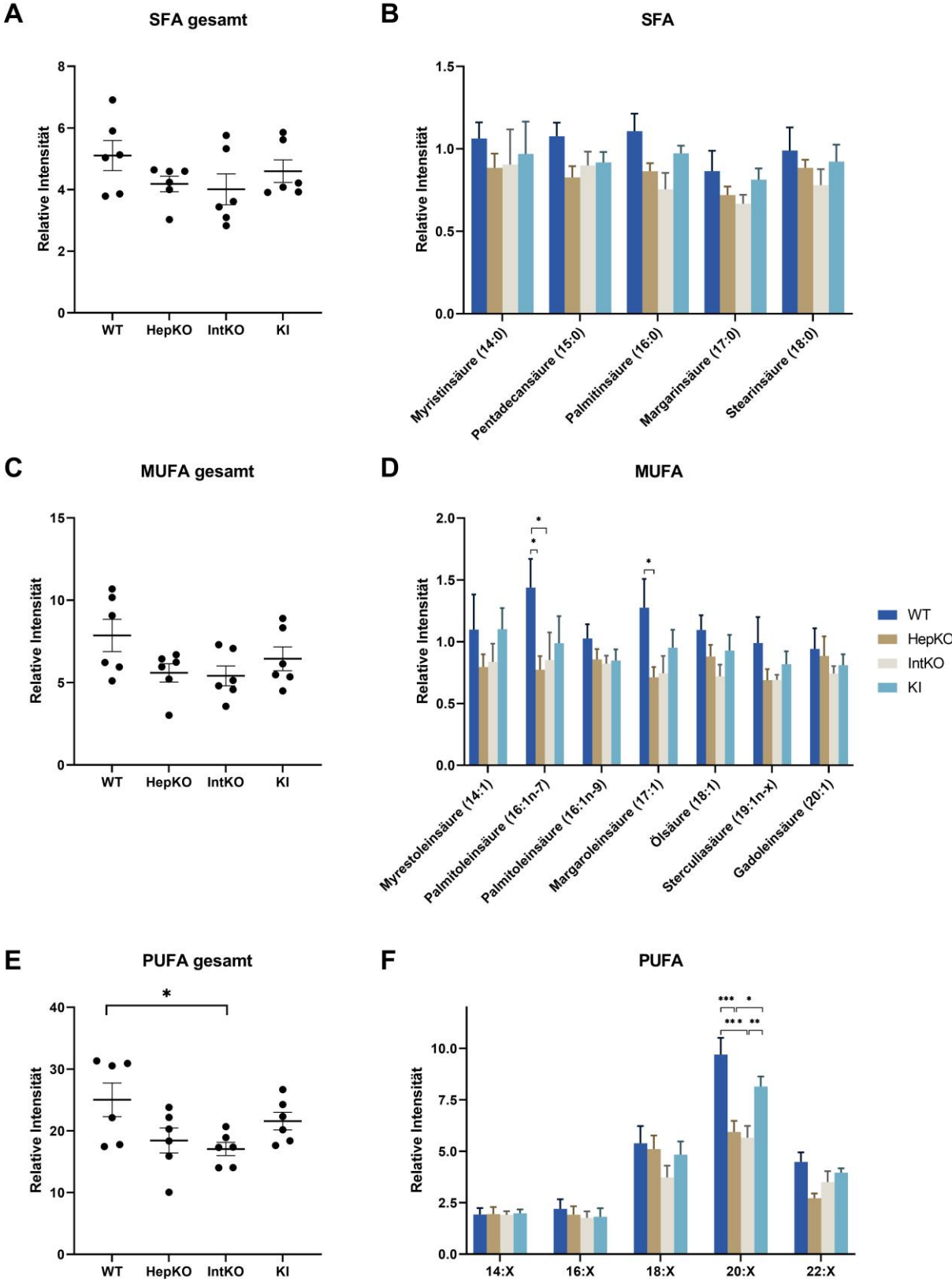
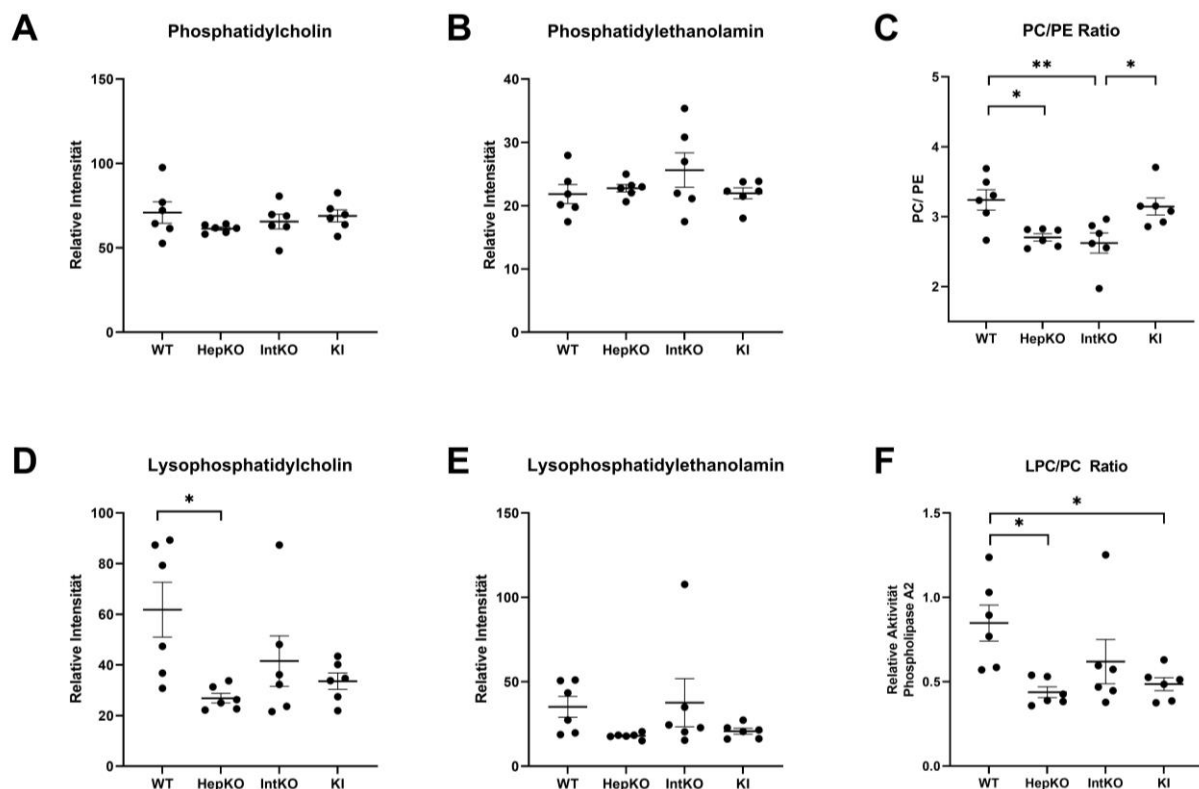


Abbildung 32: Relative Intensitäten der freien Fettsäuren. A: Gesättigte Fettsäuren (SFA), C: einfach ungesättigte Fettsäuren (MUFA), E: mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA). B, D, F: Unterteilung dieser chemischen Klassen anhand der Länge der Kohlenstoffkette.

## Glycerophospholipide

Da neben den Triacylglyceriden auch die Glycerophospholipide für einen Großteil der Varianz des Datensatzes in der Hauptkomponentenanalyse verantwortlich waren, wurden diese nun ergänzend dargestellt. (Abbildung 33) Die *Abcg5/g8*-Transportermodifikation hatte keinerlei Auswirkungen auf den Gehalt von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) (A, B), jedoch zeigten sich Unterschiede zwischen den Genotypen bei der Quotientenbildung aus PC und PE. Die beiden Knock-Out Modelle hatten ein gegenüber dem WT ein signifikant erniedrigtes PC/PE-Verhältnis (HepKO vs. WT =  $p < 0,05$ ; IntKO vs. WT =  $p < 0,01$ ) (C). Arendt et al. konnten zeigen, dass die einfache Steatose sowie die NASH mit einer verringerten PC/PE-Ratio einher geht [5]. Dieses niedrigere Verhältnis deutet darauf hin, dass der *Abcg5/g8*-Transporter Knock-Out mindestens zu einer Steatose/Steatohepatitis führt. Bei der Analyse der Lysoglycerophospholipide LPC und LPE ergab sich eine Tendenz zu einem geringeren Gehalt bei den KO und KI Tieren (D, E). Der hepatische Knock-Out führte zu einem signifikant ( $p < 0,05$ ) geringeren LPC Gehalt gegenüber dem Wildtyp (D). Das Verhältnis von LPC zu PC, welches die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> beschreibt, war beim HepKO ( $p < 0,05$ ) und KI ( $p < 0,05$ ) gegenüber dem WT signifikant verringert (F). Dies bedeutet einen verminderten Abbau von Membranphospholipiden.

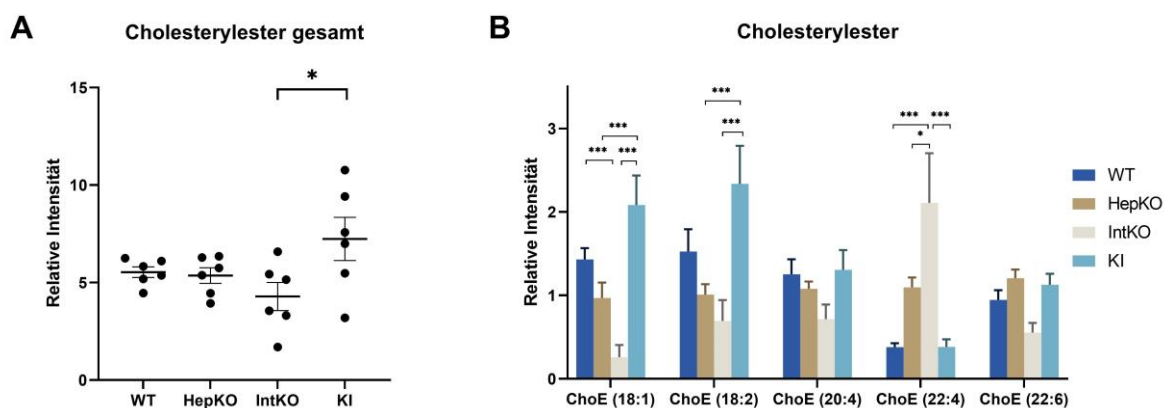


**Abbildung 33: Relative Intensität der Glycerophospholipide und Lysoglycerophospholipide.** A: Phosphatidylcholin (PC), B: Phosphatidylethanolamin (PE), C: Verhältnis von PC zu PE, D: Lysophosphatidylcholin (LPC), E: Lysophosphatidylethanolamin (LPE), F: Relative Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub>, ermittelt durch das Verhältnis von LPC zu PC.



## Cholesterylester

Da der Cholesterinstoffwechsel und die –akkumulation einen besonderen Stellenwert in dieser Arbeit haben, wurden auch die Cholesterylester (ChoE) analysiert. (Abbildung 34) Im Unterschied zu den vorangegangenen Analysen zeigten die Knock-Outs beim Gesamtgehalt der ChoE keine Veränderungen zum WT. Nur der Knock-In hatte im Vergleich zum IntKO einen signifikant ( $p < 0,05$ ) höheren Gehalt (A). Bei der Betrachtung des Gesamtgehalts an ChoE lassen diese Ergebnisse keine großen Differenzen zwischen den einzelnen Genotypen vermuten. Jedoch wurden markante Unterschiede durch Beobachtung der Spezifität der veresterten Fettsäuren deutlich. Die gewebsspezifischen Knock-Out Mäuse haben im Gegensatz zum WT und KI einen geringeren Gehalt an Cholesterin, welches mit Ölsäure (18:1) oder Linolsäure (18:2) verestert wurde, und dieser Unterschied war im Vergleich zum KI signifikant. Einen tendenziell höheren Gehalt dieser ChoE zeigte der KI im Vergleich zum WT. Des Weiteren wies der IntKO in Bezug auf ChoE 22:4 gegenüber den anderen drei Genotypen einen signifikant höheren Gehalt auf (IntKO vs. WT =  $p < 0,001$ ; IntKO vs. HepKO =  $p < 0,05$ ; IntKO vs. KI =  $p < 0,001$ ). Bei den ChoE 20:4 und ChoE 22:6 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen (B).

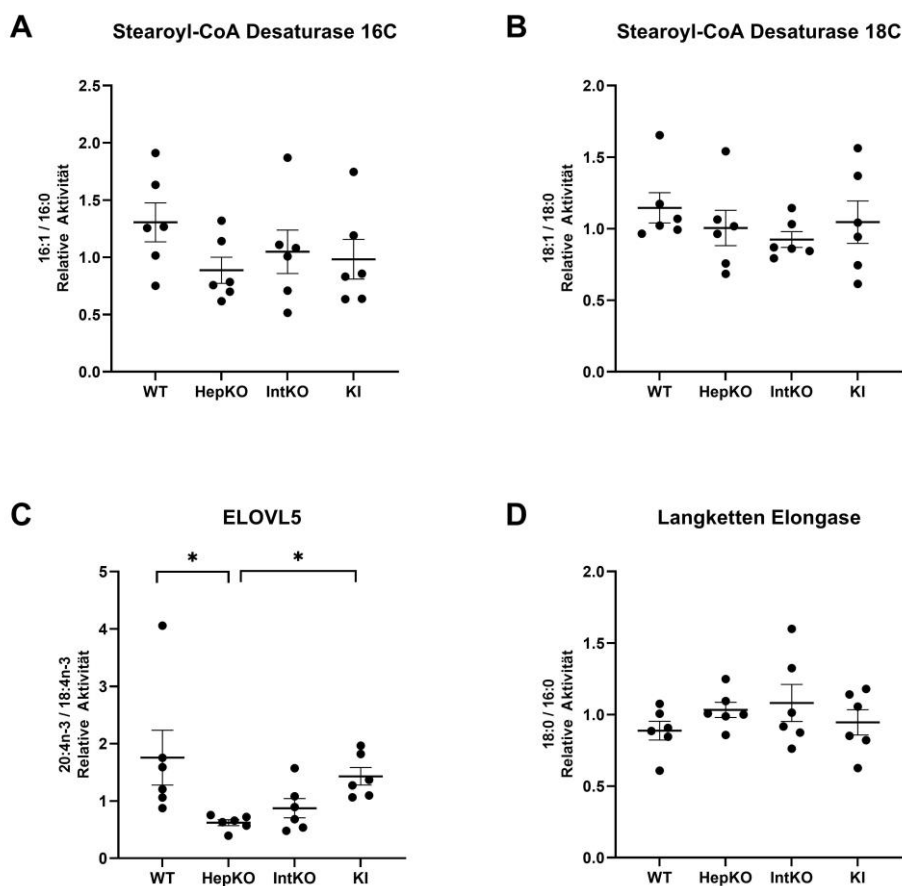


**Abbildung 34: Relative Intensität der Cholesterylester.** A: Cholesterylester gesamt, B: Unterteilung der Cholesterylester (ChoE) nach Kohlenstoffkettenlänge und Sättigungsgrad der veresterten Fettsäure.

## Enzyme

Um über einzelne Metabolite des Lipidstoffwechsels hinaus einen Überblick über die Veränderungen in der De-novo-Lipogenese und Synthese der PUFAs zu erlangen, wurden im Folgenden spezifische Enzyme analysiert. Durch eine Quotientenbildung aus Produkt und Edukt konnte auf die Enzymaktivität rückgeschlossen werden. (Abbildung 35) Die  $\Delta 9$  Stearoyl-CoA Desaturase 16C bzw. 18C ist für den Einbau von Doppelbindungen in Palmitin- bzw. Stearinsäure verantwortlich und der erste Schritt bei der Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren. Die Analyse dieses Enzyms zeigte keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Genotypen. Jedoch wiesen die Knock-Outs und Knock-Ins vergleichsweise geringere Desaturase-Aktivitäten auf (A, B). Das Enzym „Elongation of very long chain fatty acids protein 5“ (ELOVL5) dient der Elongation von langen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Surrogatmarker zeigten an, dass der hepatische und der intestinale Knock-Out zu einer verringerten Enzymaktivität führten, wobei die Gruppe der HepKOs sich signifikant vom WT und KI unterschied (C). Diese Veränderung in den KO-Tieren mit einem durch die verminderte Enzymaktivität korrelierend geringerem Gehalt an langkettigen PUFAs, zeigte sich bereits in der Analyse der PUFAs (Abbildung 32). Für die Elongation der SFA durch die Langkettenelongase konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden. (D)



**Abbildung 35: Relative Aktivität von Enzymen aus dem Lipidstoffwechsel, abgeleitet aus Quotienten von Produkt und Edukt eines jeden Enzyms.** A: Stearoyl-CoA Desaturase 16C, berechnet sich aus dem 16:1/16:0 Fettsäurenverhältnis. B: Stearoyl-CoA Desaturase 18C, berechnet sich durch das 18:1/18:0 Verhältnis. C: Verlängerung der sehr langkettigen Fettsäurenprotein 5 (engl. Elongation of very long chain fatty acids protein 5 = ELOVL5), berechnet sich durch den 20:4n-3/18:4n-3 Quotienten. D: Langketten Elongase, berechnet sich durch den 18:0/16:0 Quotienten.

## 5 Diskussion

Im Rahmen von Untersuchungen zur Ätiologie von Gallensteinerkrankungen wurde der heterodimere Transporter ABCG5/G8 als genetischer Risikofaktor identifiziert. Er ist in den Hepatozyten, Cholangiozyten und Enterozyten lokalisiert und dient der Exkretion von pflanzlichen und tierischen Sterolen. Um das Verständnis der Funktion des Transporters zu erweitern, wurden im Mausmodell ein hepatischer und ein intestinaler *Abcg5/g8*-Knock-Out sowie ein Knock-In mit dem häufigen und zu Gallensteinen prädisponierenden Polymorphismus p.D19H generiert. Auswirkungen der Ernährung konnten durch Untersuchungen von zwei Gruppen, welche eine normale oder eine cholesterinreiche Diät erhielten, beurteilt werden.

Es erfolgt zunächst die Interpretation der Ergebnisse des Knock-Out-Modells, beginnend mit der Leberhistologie, und im Anschluss wird die Bedeutung des Knock-Ins diskutiert.

### **Die gewebsspezifischen *Abcg5/g8*-Knock-Outs induzierten eine hepatische Steatose.**

Bei den Mäusen, die die normale Chow-Fütterung erhielten, fielen die beiden gewebsspezifischen *Abcg5/g8*-Knock-Out-Linien bei erhaltener Leberarchitektur durch zahlreiche Vakuolen auf. Im Vergleich der beiden Knock-Out-Genotypen zeigte der intestinale Knock-Out eine stärkere Ausprägung. Diese Vakuolen deuten auf eine Lipidakkumulation im Sinne einer Leberverfettung hin. Während Su et al. [133] in ihren Studien keine histologischen Unterschiede zwischen dem *Abcg5/g8*-Wildtypen und dem Knock-Out feststellen konnten, beschrieben Nowak et al. [105] Leberareale des hepatischen und intestinalen Knock-Outs mit Chow-Fütterung, welche Lipidtropfen ähnelten. Dies verdeutlicht, dass der *Abcg5/g8*-Transporterdefekt bereits unter einer normalen Fütterung zu einer Veränderung des histologischen Phänotyps führt.

### **Die lithogene Diät kann in den gewebsspezifischen *Abcg5/g8*-Knock-Outs zu einer NASH führen, welche durch hepatozelluläres Ballooning als Ausdruck von Lipotoxizität gekennzeichnet ist.**

Alle Mäuse, welche mit der lithogenen Diät gefüttert wurden, zeigten im Lebergewebe unabhängig vom Genotypen Vakuolen und teilweise eine Lymphozyteninfiltration. Die Lebern der gewebsspezifischen Knock-Out-Tiere zeichneten sich durch zahlreiche mikrovesikuläre Vakuolen und Hepatozytenschwellungen aus. Diese histologischen Merkmale entsprachen einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH). Su et al. [133] konnten eine verstärkte Leberverfettung der *Abcg5/g8*-Knock-

Out-Mäuse unter einer „High-fat“-Diät gegenüber dem Wildtyp feststellen, die sich histologisch sowohl im TG- als auch im Cholesteringehalt der Lebern widerspiegelte. Im Vergleich der beiden Genotypen unter „High-fat“-Diät beschrieben sie, dass auch hier der Knock-Out eine verstärkte Verfettung gegenüber dem WT zeigte, welche mit dem Fettgehalt der Leber korrelierte. Histologische Merkmale für NASH konnten bei den „High-fat“ Knock-Out-Mäusen ebenfalls beobachtet werden. Die Beobachtung von Kleiner et al. [74], dass eine mikrovesikuläre Fetteinlagerung über die NAFL hinaus ein Merkmal einer Leberschädigung ist, stützt die Feststellung, dass der gewebsspezifische *Abcg5/g8*-Knock-Out zu einer NASH führt. Diese ist unabhängig vom Gewebe, in welchem der Transporter-Knock-Out etabliert wurde. Besonderes Augenmerk bei der Diagnose der NASH lag auf dem hepatozellulären Ballooning, welches bei den gewebsspezifischen Knock-Out-Mäusen beobachtet werden konnte. Das Ballooning, als Ausdruck einer Leberzellschädigung, lässt zwischen einer NAFL und NASH differenzieren und wird auch bei der Gradeinteilung der Hepatitis berücksichtigt [26,74]. Magee et al. [88] beschrieben diese Gewebeeränderung als histopathologisches Korrelat der Lipotoxizität, welche zentral für die Zellschädigung durch oxidativen Stress und ER-Stress verantwortlich ist. Dabei können einerseits freie Fettsäuren lipotoxisch wirken, welche über lysosomale Destabilisierung und die Stimulation der TNF- $\alpha$ -Expression zur Zellschädigung führen [36,88,103]. Andererseits ist hepatisches freies Cholesterin ein lipotoxisches Molekül. Marí et al. [89] fanden heraus, dass auch freies Cholesterin über die Sensibilisierung von TNF- und Fas-Signalwegen zu einer Steatohepatitis führt. Wouters et al. [148] beschrieben Cholesterin als Risikofaktor für die Inflammation der Leber und weiterhin konnten lysosomales Cholesterin und die Aktivierung von Kupffer-Zellen (KC) – den leberspezifischen Makrophagen – als zentrale Treiber der NASH identifiziert werden [6,53]. Sphingolipide, Glycerophospholipide [70] und Lysophosphatidylcholine (LPC) [48] sind weitere Lipide mit toxischen Einflüssen auf die Hepatozyten.

### **Der mäßige Anstieg der Serumleberwerte kann Ausdruck einer chronischen Lebererkrankung sein.**

Aufgrund der Leberverfettung bei den Tieren mit Chow-Fütterung und einer NASH bei den Tieren mit lithogener Diät führten wir Serumanalysen durch. Es wurden die Aminotransferasen GOT und GPT als Marker für einen Parenchymschaden, und die AP, welche auf eine Cholestase hinweist, untersucht [16]. Bei allen Tieren mit Chow-Fütterung lagen diese Leberenzyme im Normbereich. Das unterstützt die Beobachtung von Su et al. [133], dass ein *Abcg5/g8*-Transporter-Knock-Out im „Low-fat“-Modell keine Auswirkung auf die Leberenzyme hat. Dies passt ebenfalls zur histologischen Beobachtung einer Steatose bei fehlender Zellschädigung. Dass trotz dessen ein Zusammenhang zwischen dem histologischen Phänotyp und den Enzymaktivitäten besteht, konnte dadurch gezeigt werden, dass der intestinale Knock-Out signifikant höhere Leberwerte und auch eine die anderen Genotypen übersteigende Steatose aufwies. Die Beobachtung von Su et al. [133], dass der Knock-Out im „High-

fat“-Modell zu erhöhten Aminotransferasenaktivitäten im Serum führt, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit um eine gesteigerte AP Aktivität im hepatischen Knock-Out ergänzt werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die normwertigen Enzyme eine Lebererkrankung nicht ausschließen, da bei einer chronischen Erkrankung wie der NASH diese Konstellation nicht ungewöhnlich ist und die Transaminasen keine Aussage mehr über das Ausmaß der Entzündung liefern [16]. Entsprechend ist eine gute Adaptation der Leber an die Veränderungen möglich. Es sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden, wie sich die Leberwerte im Tiermodell unter lithogener Diät verhalten.

### **Der intestinale und hepatische *Abcg5/g8*-Knock-Out prädisponiert zu einer Triacylglycerid-Steatose als Zeichen einer NAFL, welche sich diätinduziert zu einer NASH weiterentwickeln kann.**

Um der Vermutung nachzugehen, dass es sich bei den histologisch sichtbaren Vakuolen in den Lebern der Knock-Out-Mäuse um eine Lipidakkumulation handelt, wurde die ORO-Färbung durchgeführt. Diese bestätigte, dass die Vakuolen mit TG gefüllt waren. Das spricht für die Entwicklung einer Steatose bzw. Fettleber [29].

Der *Abcg5/g8*-KO führte zu einer vermehrten TG-Akkumulation, wobei der intestinale Knock-Out die stärkste Ausprägung zeigte. Für den Organismus reicht also das Fehlen des Transporters in einem der beiden Gewebe (Leber oder Darm) aus, um eine Steatose hervorzurufen. Nowak et al. [105] konnte zeigen, dass die Expression der Phospholipidtransporter *Abcg1* und *Abcb4* im HepKO signifikant gesteigert waren. Dies könnte auf einen vermehrten Lipidefflux von Cholesterin und Phospholipiden und einen schon durch Kennedy et al. [71] diskutierten Schutz vor Lipidakkumulation hinweisen.

Die lithogene Diät führte bei den Mäusen zu einer achtfach gesteigerten TG-Akkumulation. Su et al. [133] konnten ebenfalls im *Abcg5/g8*-Knock-Out den Vakuolen eine TG-Anreicherung nachweisen. Die histologische Steatose bestätigte die von Poppenborg et al. [115] und Rebholz et al. [121] beobachtete makroskopische Fettleber bei den verschiedenen Genotypen. Eine Übersättigung des Organismus mit Lipiden durch die Diät konnte von Poppenborg et al. [115] u.a. durch einen Cholesterinsättigungsindex der Galle von > 1 schon beim Wildtyp dokumentiert werden. Während Su et al. [133] eine Steigerung des TG-Gehalts durch eine „High-fat“-Diät im Wildtypen und Knock-Out mit signifikanten Unterschieden feststellen konnten, waren in dieser Arbeit die genotypspezifischen Unterschiede nicht signifikant. Im Vergleich der beiden Linien ergaben sich zwar keine signifikanten Unterschiede in der Neutralfettfläche, jedoch ist die mikrovesikuläre Steatose, wie sie ubiquitär im hepatischen und intestinalen Knock-Out beobachtet werden konnte, ein Zeichen einer schweren NASH wie von Yeh et al. [153] beschrieben.

Mehrere Gründe lassen die Annahme zu, dass weitere Lipide in den Hepatozyten akkumuliert sein müssen, die zur NASH-Pathologie beitragen. Zum Einen sind TG keine lipotoxischen Moleküle, die die

Entzündung im Diät-Modell erklären könnten [151], zum Anderen zeigte die ORO-Histologie, dass die Größe der Lipidtropfen nicht mit der Farbintensität und somit dem TG-Gehalt korrelierte. Insbesondere die ballonierten Hepatozyten wiesen eine erstaunlich blasse Färbung auf. Dies veranlasste uns, nach lipotoxischem freiem Cholesterin in der Leber zu suchen. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie konnten sich bildende CC visualisiert werden.

**Der gewebsspezifische *Abcg5/g8*-Knock-Out führt zu einer beginnenden Cholesterinkristallisation, und durch die lithogene Diät entstehen manifeste Cholesterinkristalle, welche im Knock-Out verstärkt auftreten.**

Bei keiner der Mäuse, welche die normale Chow-Fütterung erhielten, waren manifeste CC in Form von Malteserkreuzen im Lebergewebe vorhanden. Aufgrund der Beschreibung einer beginnenden Cholesterinkristallisation mit Hilfe der Polarisationslichtmikroskopie durch Ioannou et al. [63], konnten doppelbrechenden Strukturen in der Leber des hepatischen und intestinalen Knock-Outs als eine anfängliche Kristallisation von Cholesterin erkannt werden. In Hinblick auf die Entstehung der Kristalle wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sich die Doppelbrechung am Rande der Lipidtropfen gebildet hat. Ioannou et al. [62] beschrieben ebenfalls den Rand von Lipidtropfen als Ort der beginnenden Kristallisation. Dies stützt den Vorschlag von Varsano et al. [142], dass cholesterinreiche „Lipid rafts“ in Membranen als Kristallisationspunkte dienen können. Es kann alternativ spekuliert werden, dass sich das Cholesterin neben den Lipidtropfen auch im Endosomenkomplex anreichert und dort seine Pathogenität entfaltet. Die Grundlage dafür wird von Maxfield et al. [94] zusammengefasst. Es wurde beschrieben, dass Cholesterin hauptsächlich in der apikalen Membran der polarisierten Hepatozyten lokalisiert, aber ebenfalls in Zellorganellen wie dem ER oder Golgi-Apparat vorhanden ist. Yamazaki et al. [152] berichteten, dass der ABCG5/G8-Transporter neben der Lokalisation in der kanalikulären Membran intrazellulär im ER - seinem Syntheseort – und in weiteren endosomalen Membranen lokalisiert ist. Daher könnte es bei einem KO auch in den Zellorganellen zu einer verminderten Translokation des Cholesterins von der Membraninnen- zur Außenseite kommen, was die Cholesterinkristallisation begünstigen könnte. Die Auswertung des Anteils doppelbrechender Fläche am gesamten mikroskopischen Blickfeld ergab für die beiden Knock-Out-Genotypen jedoch eine verringerte Kristallfläche. Dies erklärt sich durch die konzentrierte Organisation des Cholesterins und die Bildung von Kristallen in der Peripherie der Lipidtropfen mit daraus resultierend verminderter ungeordneter Doppelbrechung im verbleibenden Gewebe. Die Untersuchungen im Mausmodell sprechen insgesamt für eine gesteigerte hepatische Cholesterinkonzentration durch das Fehlen des *Abcg5/g8*-Transporters.

Die lithogene Diät führte bei den Mäusen im Vergleich zur Chow-Fütterung zu einem 20-fachen Anstieg der Kristallfläche. Es zeigten sich manifeste CC in Form von Malteserkreuzen. Die massive

Cholesterinkristallisation ist Ausdruck einer starken Cholesterinakkumulation, ausgelöst durch die lithogene Diät. In der Regel besitzen die Hepatozyten die Fähigkeit, auf ein gesteigertes Lipidangebot mit einer erhöhten Expression des *Abcg5/g8*-Transporters zu reagieren [13]. Jedoch scheint dieser Kompensationsweg bei allen Tieren unter lithogener Diät erschöpft, wie Poppenborg et al. bereits vorschlugen [115]. Im Genotypenvergleich prädisponierten die beiden Knock-Outs, wie bereits unter Chow-Fütterung beobachtet, zur verstärkten Cholesterinkristallisation. Der HepKO zeigte den ausgeprägtesten Phänotyp.

In Zusammenschau der histologischen Befunde, fällt der Zusammenhang zwischen dem Auftreten der NASH-Pathologie und den CC auf. Dass CC in Lipidtröpfchen mit einer NASH assoziiert sind und sie den Progress der Krankheit fördern, konnten Ioannou et al. bei Mäusen und Patienten zeigen [60,64]. Die Mechanismen, wie CC eine Entzündung auslösen, sind vielfältig und Gegenstand aktueller Forschung. Ein wichtiges Bindeglied stellen die KC dar. KC akkumulieren insbesondere um steatotische Hepatozyten mit starker Doppelbrechung und phagozytieren CC [60]. Duewell et al. [34] konnten in Zellkulturen zeigen, dass die phagozytierten CC zu einer lysosomalen Schädigung und Aktivierung der KC führen.

#### **Die Hydrolyse von Cholesterinestern kann eine Cholesterinkristallbildung begünstigen.**

Um der Beobachtung der Cholesterinkristallbildung weiter nachzugehen, lieferte die Lipidomanalyse weitere Erkenntnisse über den Cholesterinstoffwechsel. Bei der Betrachtung der gesamten Cholesterinester ergaben sich keine Unterschiede. Dies konnten auch schon Klett et al. [76] in einem *Abcg8*-Knock-Out-Modell feststellen. Bei der Analyse der unterschiedlichen Fettsäuren, welche mit Cholesterin verestert waren, wurden genotypspezifische Unterschiede deutlich. Ein signifikantes Ergebnis war der verminderte Gehalt an mit 18:1- und 18:2-Fettsäuren verestertem Cholesterin in beiden Knock-Out-Lebergeweben. Dies könnte auf einer gesteigerten Aktivität der Cholesterinesterhydrolase beruhen, wie sie bereits von Min et al. [96] beschrieben wurde. Diese haben einen Zusammenhang zwischen der gesteigerten Genexpression und Proteinmenge der Cholesterinesterhydrolase und der Fettlebererkrankung hergestellt. Ein möglicher Effekt kann eine Akkumulation von freiem Cholesterin sein, welches die zuvor beschriebene CC-Bildung fördert.

Da die Kupffer-Zellen als Teil des Immunsystems die Fähigkeit haben, über das NLRP3-Inflammasom eine Zytokinfreisetzung auszulösen und somit Entzündungsreaktionen in der Leber voranzutreiben, wurde weitergehend die Genexpression von *Nlrp3* und *Il-1 $\beta$*  untersucht, um eine kristallinduzierte Aktivierung der KC im Rahmen der NASH-Induktion zu überprüfen.

**Diätbedingte Cholesterinkristalle können insbesondere im *Abcg5/g8*-Knock-Out über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu einer NASH führen.**

Die lithogene Diät bewirkte eine Steigerung der Genexpression von *Nlrp3* und *Il-1 $\beta$*  im Vergleich zur Chow-Fütterung. Der *Abcg5/g8*-Knock-Out führte unter lithogener Diät zur gesteigerten *Nlrp3* Expression, wobei der Unterschied beim HepKO signifikant war. Dies korrelierte mit dem Auftreten von CC sodass sich vermuten lässt, dass CC in der Leber zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen. Rajamäki et al. [118] konnten diesen Zusammenhang bereits in Zellkultur humaner Makrophagen nachweisen. Im Lebergewebe konnten Ioannou et al. [61] die Aktivierung von NLRP3 durch KC bei der Bildung von „Crown-like structures“ beobachten. Die KC lagern sich hier an die steatotischen Hepatozyten an und phagozytieren die Lipide und Kristalle. Die genauen Mechanismen der Inflammasomaktivierung wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sind aber Gegenstand aktueller Forschung. Es wird von Ioannou bereits vermutet, dass die beginnende Cholesterinkristallisation an der Lipidtropfenmembran zu einer Schädigung dieses Kompartiments führt [62]. Ein weiterer Ansatzpunkt betrifft das Enzym Cathepsin B, welches für die intrazelluläre Proteolyse verantwortlich ist. Rajamäki et al. [118] konnten zeigen, dass CC über eine Destabilisierung der Lysosomenmembran zu einem Cathepsin B-Efflux in das Zytoplasma führen. Weiterhin zeigten Tang et al. [138] umgekehrt, dass eine Inhibition von Cathepsin B die NLRP3-abhängige Entwicklung von NASH verhindert. Neben dieser lysosomalen Protease könnte auch der Kalium-Efflux nach extrazellulär ein Signal für die CC-induzierte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung zu sein [118].

Neben der Erkenntnis, dass CC im Lebergewebe zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen, stellt sich die Frage, ob das erhöhte Genexpressionsniveau des Inflammasoms und des Zytokins *Il-1 $\beta$*  zur Entzündungsreaktion bei NASH beitragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten durch das gleichzeitige Auftreten einer histologischen NASH-Pathologie und des erhöhten Expressionsniveaus von *Nlrp3* im *Abcg5/g8*-KO auf einen Zusammenhang hin. In einem NLRP3 Knock-In Mausmodell konnten Wree et al. [150] zeigen, dass die erhöhte NLRP3-Aktivität zur Leberentzündung und -fibrose beiträgt. Umgekehrt wurde bei Patienten mit NASH eine gesteigerte Expression von *Nlrp3* und *Il-1 $\beta$*  gemessen [49]. Ebenso konnte in Studien nach Deletion von *Nlrp3* oder *Caspase-1/11* – einem Effektormolekül im NLRP3 Kaskadeweg – eine Verringerung der hepatischen Inflammation und NASH-Progression detektiert werden [22,52,100]. Die Zusammenschau der Ergebnisse legt nahe, dass die diätinduzierten CC über die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung insbesondere im hepatischen *Abcg5/g8*-KO zur NASH beitragen können.

Bei einer gesteigerten *Nlrp3* Genexpression in beiden KO-Modellen wäre ebenfalls eine gesteigerte *Il-1 $\beta$*  Genexpression zu erwarten. Su et al. [133] konnten diesen Effekt zeigen, wohingegen er in dieser Arbeit nicht nachweisbar war. Neben *Il-1 $\beta$*  könnte *Il-18* maßgeblich an der NAFLD Entwicklung beteiligt sein [56]. Dies kann in weiteren Analysen aufgegriffen und untersucht werden.



Während bisherige Studien nur getrennt von einer CC-induzierten NLRP3-Aktivierung und einer NLRP3-induzierten NASH berichteten, konnte diese Arbeit erstmals Hinweise auf die Sequenz einer CC-bedingten NLRP3-Aktivierung und daraus resultierender NASH liefern. Der hepatische Knock-Out führt dabei zu einem ausgeprägteren Phänotyp.

Die Histologie der CC und die durch sie induzierte Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zeigte in dieser Arbeit, welche Mechanismen beim *Abcg5/g8*-Knock-Out zur NASH-Pathologie beitragen. Es blieb offen, welche Mechanismen spontan die histologisch sichtbare Steatose im Knock-Out-Modell hervorgerufen haben. Dies gab den Anstoß zu Lipidom- und zu Expressionsuntersuchungen von Enzymen, die am Fettstoffwechsel beteiligt sind. Bei der Lipidomanalyse wurden das Lipidom der Leber aufgeschlossen, einzelne Metabolite analysiert und relativ quantifiziert. Dadurch konnten Rückschlüsse auf Enzymaktivitäten und den Lipidstoffwechsel gezogen werden.

### **Die Lipidomanalyse bestätigt die triacylglyceridhaltige Steatose im gewebsspezifischen *Abcg5/g8*-Knock-Out.**

Die multivariate Datenanalyse identifizierte die Triacylglyceride als die Lipide, welche die größten Unterschiede des gesamten Datensatzes ausmachten. Dass der HepKO zu einem gesteigerten TG-Gehalt in der Leber führt, konnte durch die univariate Datenanalyse bestätigt werden. Die gemessene TG-Akkumulation ist hier Ausdruck einer NAFLD [33]. Während Su et al. [133] nur Unterschiede im TG-Gehalt beim *Abcg5/g8*-KO unter „High-fat“-Diät erkennen konnten, beobachteten wir, dass bereits der HepKO unter Chow-Fütterung zu einer Leberverfettung führt. Die größte Veränderung zeigten die mit 18C mehrfach ungesättigten Fettsäuren veresterten TG. Auf den Gehalt an MG und DG hatte die Transportermodifikation dagegen keinen Einfluss. Dadurch ergab sich das im HepKO gesteigerte TG/DG-Verhältnis, welches die Aktivität der Diacylglycerol-Acyl-Transferase (DGAT) widerspiegelt. Diesem Enzym wird eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer NAFLD zugeschrieben [117]. Neben dem TG-Gehalt spiegelte sich die Steatose auch in einer verminderten PC/PE-Ratio wieder, wie sie bei Patienten mit einer NAFLD beschrieben wurde [5]. Über den TG-Gehalt der Leber hinaus konnten Klett et al. [76] in einem *Abcg8*-Knock-Out-Modell den Einfluss des Transporter-Knock-Outs weiter klären. Sie fanden heraus, dass die Konzentration der TG im Plasma und die Anreicherung der LDL-Partikel mit TG erhöht waren.

### **Der gewebsspezifische *Abcg5/g8*-Knock-Out führt zu einer verminderten De-novo-Lipogenese.**

Es wird vermutet, dass die TG-Akkumulation auf einer gesteigerten Expression der Gene *Srebf1* und *Mlxipl* sowie den nachgeschalteten Enzymen mit der Folge einer gesteigerten De-novo Lipogenese beruht. SREBP1 ist ein wichtiges regulatorisches Protein im Lipidstoffwechsel, auf das der Transporter Knock-Out Einfluss nehmen könnte.

Die Hypothese konnte nicht bestätigt werden, da in den gewebsspezifischen KO-Mäusen unter Chow-Fütterung ein vergleichsweise niedriges Expressionsniveau der regulatorischen Proteine SREBP1 und ChREBP gemessen wurde. Dies hat diverse Auswirkungen auf den Organismus: Es führt im Fettgewebe zu einer verminderten De-novo-Lipogenese und TG-Synthese, im Lebergewebe zu einer reduzierten Lipogenese und Glykolyse sowie zu einer Repression der Cholesterinbiosynthese. Dieser Effekt konnte zum Einen durch einen verminderten De-novo-Lipogenese-Index in beiden KO, gebildet aus dem Quotienten von Palmitinsäure und Linolsäure [59], und zum Anderen durch die Expressionsanalysen weiterer Enzyme bestätigt werden. Es wird vermindert Acetyl-CoA aus dem Citratzyklus über die ATP-Citratlyase für die Fettsäuresynthese bereitgestellt. Die Knock-Out Tiere zeigten zudem eine verminderte Expression der Fettsäuresynthase in der Leber. Dieses Enzym ist für die Synthese von Palmitinsäure (16:0) verantwortlich und bildet die Fettsäure, auf deren Basis alle weiteren Fettsäuren synthetisiert werden. Passend zu diesem Ergebnis war auch die Acetyl-CoA Carboxylase, welches das erste Enzym der Fettsäurebiosynthese darstellt und gleichzeitig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert, vermindert exprimiert. Weiterhin werden die synthetisierten gesättigten Fettsäuren durch eine herabgesetzte Expression der Stearoyl-CoA Desaturase 1 vermindert in gesättigte Fettsäuren umgewandelt. Die reduzierte Expression der Gene für die De-novo-Lipogenese erklärt sich durch den „Feedback“-Mechanismus des Cholesterinstoffwechsels. Der *Abcg5/g8*-Knock-Out führt zu einem Cholesterinüberschuss in der Zelle, welcher SREBP1 reprimiert, einerseits durch Endprodukthemmung auf Transkriptionsebene [18] und andererseits durch Blockade des intrazellulären SREBP-Scap-Komplex aufgrund der erhöhten Cholesterinkonzentration im ER [128]. Das im IntKO vermindert exprimierte ChREBP, welches für anabole Enzyme einen Transkriptionsfaktor darstellt, spricht ebenfalls für eine verminderte De-novo-Lipogenese. Unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe weisen zudem darauf hin, dass auch das *Srebp2*-Gen in beiden Knock-Out Modellen vermindert exprimiert war. Dieses Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor SREBP2 und spielt eine zentrale Rolle im Cholesterinstoffwechsel. Hier ist die Repression der Genexpression ebenfalls als Folge der Cholesterinüberschuss-bedingten „Feedback“-Hemmung anzusehen.

Die Lipidomanalyse lieferte weitere Hinweise für die verminderte De-novo-Lipogenese. Der gesamte Gehalt an freien Fettsäuren blieb primär durch den KO unbeeinflusst. Méndez-González et al. [95] konnten in einem *Abcg5/g8*-KO-Mausmodell ebenfalls keine Änderungen im FFA-Gehalt ausmachen und auch Puri et al. [117] zeigten dies bei Patienten mit NAFLD. Reduktionen im Fettsäuregehalt waren jedoch bei den langkettigen mehrfach ungesättigten freien Fettsäuren (LC-PUFA) der beiden Knock-Outs zu beobachten. Dass diese Beobachtung mit NAFLD assoziiert ist, konnten diverse Studien zeigen [4,117,140].

Es wird vorgeschlagen, dass neben einer defekten Desaturaseaktivität auch eine gesteigerte Peroxidation der Fettsäuren durch oxidativen Stress ursächlich ist [4,144]. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen diese

Hypothese. Es zeigten sich eine verminderte Expression des *Scd1* Gens in den Knock-Out Modellen mit Chow-Fütterung, und auch die Lipidomanalyse weist auf eine verminderte Aktivität der Stearoyl-CoA Desaturase. Dass für die verminderte Desaturasenaktivität eine verminderte SREBP1-Aktivität ursächlich ist, wird dadurch untermauert, dass SREBP1 die Expression der  $\Delta^6$  und  $\Delta^5$  Desaturasen beeinflusst [92]. Neben der verminderten Desaturaseaktivität kann auch die Elongation von Fettsäuren zu LC-PUFA reprimiert sein, was die Ergebnisse der Lipidomanalyse nahelegen. Die Aktivität des Enzyms ELOVL5, welches die Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysiert, war im HepKO reduziert [85]. Yamaguchi et al. [151] schlagen vor, dass die TG-Akkumulation ein Schutzmechanismus der Zelle vor lipotoxischen freien Fettsäuren ist. Die verminderten LC-PUFAs und die erhöhten TG, welche mit LC-PUFA verestert wurden, deuten auf einen Shift der langkettigen Fettsäuren in Richtung Glycerolipide hin. Dies kann ein Hinweis auf einen protektiven Effekt der TG sein.

Das Überangebot an Lipiden durch die lithogene Diät hat generell eine Repression der *Srebf1* Genexpression und folglich der von diesem Transkriptionsfaktor regulierten Enzyme zur Folge. *Mlxipl* blieb durch die Diät unbeeinflusst. Im Vergleich der Genotypen der Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten, zeigte sich jedoch eine gesteigerte Expression des *Srebf1* bei den gewebsspezifischen Knock-Outs. Dies führte zu einer erhöhten Expression von Enzymen der De-novo-Lipogenese, der TG-Synthese und Glykolyse sowie Cholesterinsynthese. Diese Beobachtung kann Folge einer Fehlregulation mit nicht ausreichender Reprimierung der Expression und Anpassung an die abnorme Stoffwechsellage sein. Eine weitere Erklärung für die in den Knock-Outs vermindert reprimierte Fettsäurebiosynthese ist, dass das überschüssige Cholesterin mit Fettsäuren für Transport oder Einlagerung verestert wird. Cholesterin kann die Expression von *Scd1* spezifisch in der Leber positiv beeinflussen [82]. Dabei kodiert das Gen für das Enzym Stearoyl-CoA Desaturase, welches den Einbau von Doppelbindungen für die Synthese von Ölsäure, der bevorzugten Fettsäure für die Veresterung mit Cholesterin, katalysiert [122]. Die Ergebnisse der erhöhten Genexpression von *Scd1* unter der lithogenen Diät sowie Analysen von Su et al. [133] bekräftigen dieses Konzept.

### **Die Neutralfett-Akkumulation im gewebsspezifischen *Abcg5/g8*-Knock-Out kann auf einem fehlerhaften TG-Remodeling beruhen.**

Es wird postuliert, dass die TG-Steatose im *Abcg5/g8*-Knock-Out auf eine verminderte Aktivität des Enzyms „Patatin-like phospholipase domain-containing 3 protein“ (PNPLA3) zurückzuführen ist. PNPLA3 ist ein Enzym mit einer Hydrolaseaktivität, welches die Hydrolyse von TG in DG und FA katalysiert und in der Zelle den Fluss der PUFA von TG auf Membranphospholipide fördert [50,125]. Dadurch wird diesem Enzym eine Rolle beim Lipidremodeling zugeschrieben. Unveröffentlichte Analysen der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass der Knock-Out von *Abcg5/g8* im Darm und in der

Leber zu einer verminderten Expression des Gens *Pnpla3* führt. Die Lipidomanalyse im Knock-Out ergänzte diese Daten durch einen unveränderten Gehalt an Membranphospholipiden als Hinweis auf ein fehlerhaftes Lipidremodeling. Die relative Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub>, welche für die Bildung des Membranlipids Phosphatidylcholin aus Lysophosphatidylcholin und einer freien Fettsäure verantwortlich ist, war in beiden Knock-Out Modellen dagegen vermindert. Als Ursache der verminderten PNPLA3 Expression kann die verminderte SREBP-Expression angesehen werden, da das Enzym dessen direktes Target ist [57]. Studien belegen, dass die PNPLA3-Genvariante p.I148M mit NAFLD assoziiert ist [50,124,132]. Dieser Polymorphismus geht mit einem Funktionsverlust („loss of function“) des Enzyms einher [114]. Durch den Funktionsverlust ist die Remodelingfähigkeit defekt, und es kommt zur TG-Akkumulation [50,125].

### **Der leber- und darmspezifische *Abcg5/g8*-Knock-Out unterscheiden sich im Phänotyp nur geringfügig.**

Im Rahmen dieser Arbeit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den experimentellen Untersuchungen zwischen dem HepKO und IntKO. Dies spricht dafür, dass der Funktionsverlust des Transporters in einem der beiden Gewebe ausreicht, um die Veränderungen der Phänotypen hervorzurufen und die Exkretionsleistung des jeweiligen anderen Transporters nicht ausreichend ist, um die Cholesterinhomöostase zu gewährleisten. In der Leber führt der Knock-Out zu einer verminderten biliären Exkretion, während im Darm eine gesteigerte Absorption von Cholesterin die Folge ist. Schon Poppenborg et al. [115] berichten von einem ähnlichen Phänotyp des HepKO und IntKO und der HepKO zeigt von beiden den ausgeprägteren Phänotyp. Die geringere Merkmalsausprägung vom IntKO ist möglicherweise auf eine Kopplung mit dem NPC1L1-Transporter zurückzuführen [65]. Dieser Transporter dient der Cholesterinaufnahme in die Enterozyten und könnte aufgrund des Cholesterinüberschusses im IntKO eine verminderte Kapazität haben.

### **Die p.D19H Varianten des *Abcg8*-Gens kann zu einer Transporterunterfunktion führen.**

Die Untersuchungen des Knock-In Mausmodells in dieser Arbeit sollten der Frage nachgehen, welche Auswirkungen die p.D19H Variante des *Abcg8*-Gens auf den Organismus hat. Die bisherige Studienlage ist hierzu nicht eindeutig. Für eine Überfunktion des Transporters sprachen die gesteigerte hepatobiliäre Cholesterinsekretion im Tiermodell und bei Patienten [46,78,121] mit der Folge einer erhöhten Cholesterinkonzentration in der Galle und die Prädisposition zur Bildung von Gallensteinen [78,145]. Bopp postulierte aufgrund der erhöhten Phytosterinkonzentrationen in Leber und Serum eine Unterfunktion des Transporters [15]. Koeijvoets et al. [77] konnten zeigen, dass p.D19H Träger ein erhöhtes Risiko für die koronare Herzkrankheit und andere kardiovaskuläre Erkrankungen und

aufweisen. In weiten Bereichen dieser Arbeit unterschied sich der Knock-In nur geringfügig vom Wildtyp und ordnete sich phänotypisch zwischen dem Wildtyp und den Knock-Out Mäusen ein. Dies betraf die HE-Histologie, die CC, die Serumleberwerte und den Fettstoffwechsel. Dadurch können diese Ergebnisse die Vermutung der Transporterüberfunktion nicht stützen, sondern geben vielmehr weitere Hinweise auf einen Funktionsverlust. Auch Bopp bezeichnete den Knock-In als „Minorform“ des Knock-Outs [15].

Es kann vermutet werden, dass ein Polymorphismus, welcher mit einer Unterfunktion einhergeht, mit einer veränderten intrazellulären Lokalisation des ABCG8-Proteins einhergehen könnte. Die beiden Halbtransporter ABCG5 und ABCG8 werden im ER synthetisiert, und eine Heterodimerisation ist für den transzellulären Transport zur apikalen Membran unabdingbar [41]. Schon Graf et al. [42] zeigten in ihrer Arbeit, dass Missense-Mutationen einen Einfluss auf die Heterodimerisation im ER haben können und die Glykosylierung, welche für das Verlassen des ER notwendig ist, bei diesen Mutationen verändert sein kann. Weiterhin wurde von Hirata et al. [55] beschrieben, dass sich Homodimere (ABCG5/5 oder ABCG8/8) bilden und die Nukleotidbindedomäne auf der zytoplasmatischen Seite für den Verbleib im ER notwendig ist. Sie diskutierten weiterhin, dass diese Homodimere oder Monomere bei fehlender Heterodimerisation im ER rasch von Proteasomen abgebaut werden. Dies führt dazu, dass weniger funktionale Heterodimere gebildet und diese fehlerhaft intrazellulär transportiert werden. Durch den folglich verminderten Einbau in die apikale Membran wird der Efflux von Lipiden beeinträchtigt, und diese akkumulieren in der Zelle [42].

Eine bemerkenswerte Beobachtung war die signifikant gesteigerte TG-Akkumulation in der Leber bei den Mäusen unter lithogener Diät, die sogar das Maß der Knock-Outs übertraf. Ein möglicher Grund dafür kann die phytosterinbedingte Hemmung der Bildung und Abgabe von VLDL ans Blut infolge einer Suppression von *Acat2* sein [155], wie es Bopp bereits diskutierte [15]. Dieses Gen kodiert für die Acyl-CoA-Acyltransferase und ist sowohl für die intrazelluläre Veresterung von Cholesterin verantwortlich als auch an der Sekretion von den Cholesterinestern über Lipoproteine beteiligt [21]. Die Gene *Acat2* und *Tm6sf2* sind am Lipoproteinstoffwechsel beteiligt und dienen der Bildung und Abgabe von VLDL aus den Hepatozyten sowie Chylomikronen aus den Enterozyten ans Blut. Insbesondere dem Protein TM6SF2 wird von Li et al. [86] dadurch eine wichtige Rolle im Lipoproteinstoffwechsel zugeschrieben. Bopp konnte eine reduzierte *Acat2* und *Tm6sf2* Genexpression im Knock-In-Modell dokumentieren [15]. Die TG akkumulieren folglich im Hepatozyten, was insbesondere unter lithogener Diät erfolgt. Diese Zusammenhänge erklären die verstärkte TG-Steatose, wie sie unter lithogener Diät im Mausmodell auftrat.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit den ABCG5/G8-Transporter weiter charakterisieren und die Auswirkungen des Transporter-Knock-Outs sowie des Knock-Ins auf den Lipidstoffwechsel zeigen. Weitere Untersuchungen können sich dieser Arbeit anschließen, um die Cholesterinakkumulation in der Leber näher zu beschreiben. Eine Filipin-Färbung dient der Darstellung von freiem Cholesterin, und es kann in Zusammenschau mit HE- und ORO-Färbungen auf die Verteilung des Cholesterins in der Zelle geschlossen werden. Genauer sollten Mechanismen für die Kristallisation und ihren Beginn an Lipidtropfenmembran untersucht werden, um einen möglichen Ansatzpunkt für Prävention und Therapie zu detektieren. Außerdem kann die Lipidomanalyse durch die Bestimmung des Gehalts an freiem Cholesterin die Histologie ergänzen, und eine Leberanalyse der Mäuse, welche eine lithogene Diät erhalten haben, gäbe Aufschluss über die Auswirkungen der Ernährung auf die qualitative und quantitative Lipidzusammensetzung unter Transportermodifikation.

Aufgrund der fehlenden medikamentösen Therapie der NASH kommt der Erkennung von Risikopatienten und der Prävention eine besondere Bedeutung zu. Risikopatienten mit genetischen Polymorphismen, welche zu einer Unterfunktion des ABCG5/G8-Transporters führen, kann geraten werden, sich sportlich zu betätigen und auf eine sterolarme Diät zu achten. Besonders die sportliche Betätigung stellt zusammen mit dem Gewichtsverlust eine Möglichkeit dar, eine bereits bestehende Steatose zu vermindern. Die Diät kommt - nach Erkenntnissen dieser Arbeit – ebenfalls ein sehr hoher Stellenwert bei der Entwicklung einer NASH zu. Ergänzend könnte pharmakologisch mit Ezetimib über eine verminderte Sterolresorption oder mit Statinen über eine Repression der Sterolbiosynthese dem erhöhten Cholesteringehalt entgegengewirkt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Admirand WH, Small DM (1968) The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 47:1043–1052
2. Alkhoury N, Dixon LJ, Feldstein AE (2009) Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Exper Rev Gastroenterol Hepatol* 3:445–451
3. Arastéh K (2018) *Duale Reihe Innere Medizin*. 4th edition. Thieme Verlag KG, Stuttgart
4. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J (2004) Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci* 106:635–643
5. Arendt BM, Ma DWL, Simons B, Noureldin SA, Therapondos G, Guindi M, Sherman M, Allard JP (2013) Nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic and erythrocyte ratios of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine. *Appl Physiol Nutr Metab* 38:334–340
6. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S (2015) Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1852:1765–1778
7. Barr J, Caballería J, Martínez-Arranz I, Alonso C, Muntané J, Pérez-Cormenzana M, García-Monzón C, Mayo R, Martín-Duce A (2012) Obesity dependent metabolic signatures associated with nonalcoholic fatty liver disease progression. *J Proteome Res* 11:2521–2532
8. Bastida JM, Benito R, González-Porras JR, Rivera J (2021) ABCG5 and ABCG8 gene variations associated with sitosterolemia and platelet dysfunction. *Platelets* 32:573–577
9. Baumer Y, McCurdy S, Weatherby TM, Mehta NN, Halbherr S, Halbherr P, Yamazaki N, Boisvert WA (2017) Hyperlipidemia-induced cholesterol crystal production by endothelial cells promotes atherogenesis. *Nat Commun* 8:1–14
10. Benhamed F, Denechaud PD, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratzui V, Serfaty L, Housset C, Capeau J, Girard J, Guillou H, Postic C (2012) The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J Clin Invest* 122:2176–2194
11. Benito-Vicente A, Uribe KB, Jebari S, Galicia-Garcia U, Ostolaza H, Martin C (2018) Familial hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *Int J*

- Mol Sci 19:3426
12. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2015) Stryer Biochemie. 8th edition. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg
  13. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin N V., Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH (2000) Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* (80- ) 290:1771–1775
  14. Bhattacharyya AK, Connor WE (1974)  $\beta$ -Sitosterolemia and Xanthomatosis: A newly described lipid storage disease in two sisters. *J Clin Invest* 53:1033–1043
  15. Bopp C (2021) Phänotypisierung des Abcg8 p.D19H transgenen Mausmodells. Medizinische Doktorarbeit, Universität des Saarlandes
  16. Brade V, Braden B, Böddinghaus B, Borgmann S, Bruhn HD, Buer J, Caspari G, Doerr H w (2020) Labor und Diagnose. URL: <https://labor-und-diagnose-2020.de/>
  17. Bröker B, Schütt C, Fleischer B (2019) Grundwissen Immunologie. 4th edition. Berlin
  18. Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89:331–340
  19. Bruix J, Sherman M (2011) AASLD PRACTICE GUIDELINE Management of Hepatocellular Carcinoma: An Update. *Hepatology* 53:1020–1022
  20. Buch S, Schafmayer C, Völzke H, Becker C, Franke A, Brosch M, Lammert F, Eller-eberstein H Von, Kluck C, Ba I, Miquel JF, Nervi F, Wittig M, Roskopf D, Timm B, Ho C, Fo UR, Seeger M, Elsharawy A, Lu T, Egberts J, Fa F, Hampe J (2007) A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet* 39:995–999
  21. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, Turley S, Farese R V. (2000) Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* 6:1341–1347
  22. Cai C, Zhu X, Li P, Li J, Gong J, Shen W, He K (2017) NLRP3 Deletion Inhibits the Non-alcoholic Steatohepatitis Development and Inflammation in Kupffer Cells Induced by Palmitic Acid. *Inflammation* 40:1875–1883
  23. Caldwell S, Lackner C (2017) Perspectives on NASH Histology: Cellular Ballooning. *Ann Hepatol* 16:182–184
  24. Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, Sadler JJ, Colegio OR, Tephly LA, Carter AB, Rothman PB, Flavell RA, Sutterwala FS (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of



- silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9035–9040
25. Cefalu A, Pirruccello JP, Noto Da, Gabriel S, Valenti V, Gupta N, Spina R, Tarugi P, Katherisan S, Averna M (2013) A Novel APOB Mutation Identified by Exome Sequencing Cosegregates With Steatosis, Liver Cancer, and Hypocholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol Vasc Biol* 33:2021–2025
  26. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ (2012) The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 55:2005–2023
  27. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ (2018) The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 67:328–357
  28. Chauhan T, Mittal RD, Mittal B (2020) Association of Common Single Nucleotide Polymorphisms of Candidate Genes with Gallstone Disease: A Meta-Analysis. *Indian J Clin Biochem* 35:290–311
  29. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011) Human fatty liver disease: Old questions and new insights. *Science* (80- ) 332:1519–1523
  30. de Oliveira DG, de Faria Ghetti F, Moreira APB, Hermsdorff HHM, de Oliveira JM, de Castro Ferreira LEVV (2019) Association between dietary total antioxidant capacity and hepatocellular ballooning in nonalcoholic steatohepatitis: a cross-sectional study. *Eur J Nutr* 58:2263–2270
  31. Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519–550
  32. Dixon LJ, Berk M, Thapaliya S, Papouchado BG, Feldstein AE (2012) Caspase-1-mediated regulation of fibrogenesis in diet-induced steatohepatitis. *Lab Invest* 92:713–723
  33. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343–1351
  34. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Vladimer G, Nunez G, Schnurr M, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease. *Nature* 464:1357–1361

35. Etxebarria A, Benito-Vicente A, Palacios L, Stef M, Cenarro A, Civeira F, Ostolaza H, Martin C (2015) Functional characterization and classification of frequent low-density lipoprotein receptor variants. *Hum Mutat* 36:129–141
36. Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ (2004) Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- $\alpha$  expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 40:185–194
37. Freigang S, Ampenberger F, Spohn G, Heer S, Shamshiev AT, Kisielow J, Hersberger M, Yamamoto M, Bachmann MF, Kopf M (2011) Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis. *Eur J Immunol* 41:2040–2051
38. Gehrke N, Schattenberg JM (2020) Metabolic Inflammation—A Role for Hepatic Inflammatory Pathways as Drivers of Comorbidities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease? *Gastroenterology* 158:1929-1947.e6
39. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273:10046–10050
40. Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC, Hobbs HH (2002) Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest* 110:659–669
41. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH (2003) ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion. *J Biol Chem* 278:48275–48282
42. Graf GA, Cohen JC, Hobbs HH (2004) Missense mutations in ABCG5 and ABCG8 disrupt heterodimerization and trafficking. *J Biol Chem* 279:24881–24888
43. Graw J (2015) *Genetik*. 6th edition. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg
44. Grebe A, Hoss F, Latz E (2018) NLRP3 inflammasome and the IL-1 pathway in atherosclerosis. *Circ Res* 122:1722–1740
45. Green CD, Ozguden-Akkoc CG, Wang Y, Jump DB, Olson LK (2010) Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species. *J Lipid Res* 51:1871–1877
46. Grünhage F, Acalovschi M, Tirziu S, Walier M, Wienker TF, Ciocan A, Mosteanu O, Sauerbruch T, Lammert F (2007) Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology* 46:793–801

47. Haller T, Cerrada A, Pfaller K, Braubach P, Felder E (2018) Polarized light microscopy reveals physiological and drug-induced changes in surfactant membrane assembly in alveolar type II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1860:1152–1161
48. Han MS, Park SY, Shinzawa K, Kim S, Kun WC, Lee JH, Choon HK, Lee KW, Lee JH, Cheol KP, Woo JC, Jae SH, Yan JJ, Song DK, Tsujimoto Y, Lee MS (2008) Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J Lipid Res* 49:84–97
49. He K, Zhu X, Liu Y, Miao C, Wang T, Li P, Zhao L, Chen Y, Gong J, Cai C, Li J, Li S, Ruan XZ, Gong J (2017) Inhibition of NLRP3 inflammasome by thioredoxin-interacting protein in mouse Kupffer cells as a regulatory mechanism for non-alcoholic fatty liver disease development. *Oncotarget* 8:37657–37672
50. He S, McPhaul C, Li JZ, Garuti R, Kinch L, Grishin N V., Cohen JC, Hobbs HH (2010) A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 285:6706–6715
51. Hebbard L, George J (2011) Animal models of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8:35–44
52. Hendriks T, Bieghs V, Walenbergh SMA, Van Gorp PJ, Verheyen F, Jeurissen MLJ, Steinbusch MMF, Vaes N, Binder CJ, Koek GH, Stienstra R, Netea MG, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R (2013) Macrophage specific caspase-1/11 deficiency protects against cholesterol crystallization and hepatic. *PLoS One* 8:e78792
53. Hendriks T, Walenbergh SMA, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R (2014) Lysosomal cholesterol accumulation: Driver on the road to inflammation during atherosclerosis and non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Rev* 15:424–433
54. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK (2014) Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 96:121–129
55. Hirata T, Okabe M, Kobayashi A, Ueda K, Matsuo M (2009) Molecular mechanisms of subcellular localization of ABCG5 and ABCG8. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:619–626
56. Hohenester S, Kanitz V, Schiergens T, Einer C, Nagel J, Wimmer R, Reiter FP, Gerbes AL, De Toni EN, Bauer C, Holdt L, Mayr D, Rust C, Schnurr M, Zischka H, Geier A, Denk G (2020) IL-18 but not IL-1 signaling is pivotal for the initiation of liver injury in murine non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 21:8602
57. Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH (2010) A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:7892–7897

58. Huber Y, Labenz C, Michel M, Wörns MA, Galle PR, Kostev K, Schattenberg JM (2020) Tumor incidence in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Dtsch Arztebl Int* 117:719–724
59. Hudgins LC, Hellerstein M, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsch J (1996) Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *J Clin Invest* 97:2081–2091
60. Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, Savard C (2013) Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res* 54:1326–1334
61. Ioannou GN, Van Rooyen DM, Savard C, Haigh WG, Yeh MM, Teoh NC, Farrell GC (2015) Cholesterol-lowering drugs cause dissolution of cholesterol crystals and disperse Kupffer cell crown-like structures during resolution of NASH. *J Lipid Res* 56:277–285
62. Ioannou GN (2016) The Role of Cholesterol in the Pathogenesis of NASH. *Trends Endocrinol Metab* 27:84–95
63. Ioannou GN, Subramanian S, Chait A, Haigh WG, Yeh MM, Farrell GC, Lee SP, Savard C (2017) Cholesterol crystallization within hepatocyte lipid droplets and its role in murine NASH. *J Lipid Res* 58:1067–1079
64. Ioannou GN, Landis CS, Jin G, Haigh WG, Farrell GC, Kuver R, Lee SP, Savard C (2019) Cholesterol Crystals in Hepatocyte Lipid Droplets Are Strongly Associated With Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatol Commun* 3:776–791
65. Jakulj L, van Dijk TH, de Boer JF, Kootte RS, Schonewille M, Paalvast Y, Boer T, Bloks VW, Boverhof R, Nieuwdorp M, Beuers UHW, Stroes ESG, Groen AK (2016) Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. *Cell Metab* 24:783–794
66. Jemnitz K, Heredi-Szabo K, Janossy J, Ioja E, Vereczkey L, Krajcsi P (2010) ABCG2/Abcg2: A multispecific transporter with dominant excretory functions. *Drug Metab Rev* 42:402–436
67. Jones PM, George AM (2004) The ABC transporter structure and mechanism: Perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 61:682–699
68. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES (2012) Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 inflammasome Activation. *J Biol Chem* 287:36617–36622
69. Kannel W, Castelli W, Gordon T (1979) Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med* 90:85–91
70. Kartsoli S, Kostara CE, Tsimihodimos V, Bairaktari ET, Christodoulou DK (2020) Lipidomics

- in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol* 12:436–450
71. Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán Á, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA (2005) ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* 1:121–131
  72. Khan SA, Tyagi M, Sharma AK, Barreto SG, Sirohi B, Ramadwar M, Shrikhande S V., Gupta S (2014) Cell-type specificity of  $\beta$ -actin expression and its clinicopathological correlation in gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 20:12202–12211
  73. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313–1321
  74. Kleiner DE, Makhlof HR (2016) Histology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clin Liver Dis* 20:293–312
  75. Klett EL, Lee MH, Adams DB, Chavin KD, Patel SB (2004) Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol* 4:
  76. Klett EL, Lu K, Kusters A, Vink E, Lee MH, Altenburg M, Shefer S, Batta AK, Yu H, Chen J, Klein R, Looije N, Oude-Elferink R, Groen AK, Maeda N, Salen G, Patel SB (2004) A mouse model of sitosterolemia: Absence of *Abcg8/sterolin-2* results in failure to secrete biliary cholesterol. *BMC Med* 2:5
  77. Koeijvoets KCMC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Mensink RP, Kastelein JJP, Sijbrands EJG, Plat J (2009) ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 204:453–458
  78. Krawczyk M, Lütjohann D, Schirin-Sokhan R, Villarroel L, Nervi F, Pimentel F, Lammert F, Miquel JF (2012) Phytosterol and cholesterol precursor levels indicate increased cholesterol excretion and biosynthesis in gallstone disease. *Hepatology* 55:1507–1517
  79. Kümmerle-Deschner JB, Tyrrell PN, Koetter I, Wittkowski H, Bialkowski A, Tzaribachev N, Lohse P, Koitchev A, Deuter C, Foell D, Benseler SM (2011) Efficacy and safety of anakinra therapy in pediatric and adult patients with the autoinflammatory Muckle-Wells syndrome. *Arthritis Rheum* 63:840–849
  80. Labenz C, Huber Y, Michel M, Nagel M, Galle PR, Kostev K, Schattenberg JM (2020) Impact of NAFLD on the Incidence of Cardiovascular Diseases in a Primary Care Population in Germany. *Dig Dis Sci* 65:2112–2119

81. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P, Gitton X, Widmer A, Patel N, Hawkins PN (2009) Use of Canakinumab in the Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome. *N Engl J Med* 360:2416–2425
82. Landau JM, Sekowski A, Hamm MW (1997) Dietary cholesterol and the activity of stearyl CoA desaturase in rats: Evidence for an indirect regulatory effect. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 1345:349–357
83. Lang G. (2013) *Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. 2nd edition. SpringerWienNewYork, Wien, New York
84. Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13:397–411
85. Leonard AE, Bobik EG, Dorado J, Kroeger PE, Chuang LT, Thurmond JM, Parker-Barnes JM, Das T, Huang YS, Mukerji P (2000) Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem J* 350:765–770
86. Li TT, Li TH, Peng J, He B, Liu LS, Wei DH, Jiang ZS, Zheng XL, Tang ZH (2018) TM6SF2: A novel target for plasma lipid regulation. *Atherosclerosis* 268:170–176
87. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408
88. Magee N, Zou A, Zhang Y (2016) Pathogenesis of Nonalcoholic Steatohepatitis: Interactions between Liver Parenchymal and Nonparenchymal Cells. *Biomed Res Int* 2016:5170402
89. Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C (2006) Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 4:185–198
90. Martínez-Arranz I, Mayo R, Pérez-Cormenzana M, Mincholé I, Salazar L, Alonso C, Mato JM (2015) Enhancing metabolomics research through data mining. *J Proteomics* 127:275–288
91. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237–241
92. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hastay AH, Tamura Y, Osuga JI, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N (2002) Dual regulation of mouse  $\Delta$ 5- and  $\Delta$ 6-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR $\alpha$ . *J Lipid Res* 43:107–114
93. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Yao Chang Liu, McCullough AJ (1999) Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity.

- Gastroenterology 116:1413–1419
94. Maxfield FR, Wüstner D (2002) Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* 110:891–898
  95. Méndez-González J, Julve J, Rotllan N, Llaverias G (2011) ATP-binding cassette G5 / G8 deficiency causes hypertriglyceridemia by affecting multiple metabolic pathways. *BBA - Mol Cell Biol Lipids* 1811:1186–1193
  96. Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, Kellum J, Warnick R, Contos MJ, Sanyal AJ (2012) Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 15:665–674
  97. Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fisher RA, Luketic VA, Sterling RK, Shiffman ML, Stravitz RT, Sanyal AJ (2003) Clinical and Histologic Spectrum of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Associated With Normal ALT Values. *Hepatology* 37:1286–1292
  98. Moon YA, Hammer RE, Horton JD (2009) Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res* 50:412–423
  99. Mousavi SA, Berge KE, Leren TP (2009) The unique role of proprotein convertase subtilisin/kexin 9 in cholesterol homeostasis. *J Intern Med* 266:507–519
  100. Mridha AR, Wree A, Robertson AAB, Yeh MM, Johnson CD, Van Rooyen DM, Haczeyni F, Teoh NCH, Savard C, Ioannou GN, Masters SL, Schroder K, Cooper MA, Feldstein AE, Farrell GC (2017) NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice. *J Hepatol* 66:1037–1046
  101. Mühlhardt C (2009) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 6th edition. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
  102. Mulisch M, Welsch U (2015) *Romeis Mikroskopische Technik*. 19th edition. Springer Spektrum, Berlin Heidelberg
  103. Neuschwander-Tetri BA (2010) Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 52:774–788
  104. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, Hegele RA, Raal FJ, Defesche JC, Wiegman A, Santos RD, Watts GF, Parhofer KG, Hovingh GK, Kovanen PT, Boileau C, Averno M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AFH, Stroes E, Taskinen MR, Tybjaerg-Hansen A (2013) Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease. *Eur Heart J*

- 34:3478–3490
105. Nowak I (2020) Charakterisierung des Cholesterintransporter Abcg5/g8 in genetisch modifizierten Mausmodellen.
  106. Oren T (2018) Hypoxic Signaling and Cholesterol Lipotoxicity in Fatty Liver Disease Progression. *Oxid Med Cell Longev* 2018:2548154
  107. Otto GP, Rathkolb B, Oestereicher MA, Lengger CJ, Moerth C, Micklich K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wolf E, De Angelis MH (2016) Clinical chemistry reference intervals for C57BL/6J, C57BL/6N, and C3HeB/FeJ mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55:375–386
  108. Pape H-C, Kurzt A, Silbernagl S (2019) *Physiologie*. 9th edition. Thieme Verlag KG, Stuttgart
  109. Patel SB, Salen G, Hidaka H, Kwiterovich PO, Stalenhoef AFH, Miettinen TA, Grundy SM, Lee MH, Runenstein JS, Polymeropoulos MH, Brownstein MJ (1998) Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *J Clin Invest* 102:1041–1044
  110. Paumgartner G, Sauerbruch T (1991) Gallstones: pathogenesis. *Lancet* 338:1117–1121
  111. Pelegrin P, Surprenant A (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 $\beta$  release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 25:5071–5082
  112. Pfaffl MW, Riedmaier I (2011) Evaluierung der qPCR: Die Real-Time-RT-PCR-Datenanalyse im Fokus der MIQE-Richtlinie. *BioSpektrum* 17:295–297
  113. Piñero F, Pages J, Marciano S, Fernández N, Silva J, Anders M, Zerega A, Ridruejo E, Ameigeiras B, D'Amico C, Gaite L, Bermúdez C, Cobos M, Rosales C, Romero G, McCormack L, Reggiardo V, Colombato L, Gadano A, Silva M (2018) Fatty liver disease, an emerging etiology of hepatocellular carcinoma in Argentina. *World J Hepatol* 10:41–50
  114. Pirazzi C, Adiels M, Burza MA, Mancina RM, Levin M, Ståhlman M, Taskinen MR, Orholm-Melander M, Perman J, Pujia A, Andersson L, Maglio C, Montalcini T, Wiklund O, Borén J, Romeo S (2012) Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (PNPLA3) I148M (rs738409) affects hepatic VLDL secretion in humans and in vitro. *J Hepatol* 57:1276–1282
  115. Poppenborg F (2019) Biliäre Lipidsekretion bei leberspezifischem Knock-out des Cholesterintransporters ABCG5/G8. Medizinische Doktorarbeit, Universität des Saarlandes
  116. Portincasa P, Moschetta A, Van Erpecum KJ, Calamita G, Margari A, VanBerge-Henegouwen GP, Palasciano G (2003) Pathways of cholesterol crystallization in model bile and native bile. *Dig Liver Dis* 35:118–126
  117. Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ,



- Sanyal AJ (2007) A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 46:1081–1090
118. Rajamäki K, Lappalainen J, Öörni K, Välimäki E, Matikainen S, Kovanen PT, Kari EK (2010) Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: A novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One* 5:e11765
119. Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X (2013) An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath* 3:71–85
120. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2016) *Duale Reihe Biochemie*. 4th edition. Thieme Verlag KG
121. Rebholz C (2019) Biliäre Lipidsekretion bei Abcg8 p.D19H-transgenen und intestinalen Abcg5/g8 Knockout-Mäusen. Medizinische Doktorarbeit, Universität des Saarlandes
122. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JMA, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Genes Dev* 14:2819–2830
123. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H (2010) The Sterile Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol* 28:321–342
124. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH (2008) Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40:1461–1465
125. Ruhanen H, Perttilä J, Hölttä-Vuori M, Zhou Y, Yki-Järvinen H, Ikonen E, Käkälä R, Olkkonen VM (2014) PNPLA3 mediates hepatocyte triacylglycerol remodeling. *J Lipid Res* 55:739–746
126. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C, Ziol M, Poulet B, Kazemi F, Beaugrand M, Palau R (2003) Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 29:1705–1713
127. Sarig S, Utian WH, Sheean LA, Gorodeski GI (1995) Distribution of unesterified cholesterol-containing particles in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 146:139–147
128. Shao W, Espenshade PJ (2012) Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab* 16:414–419
129. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic

- mice and in cultured cells. *J Clin Invest* 99:846–854
130. Sikand K, Singh J, Ebron JS, Shukla GC (2012) Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -Actin Are Targets of miR-644a. *PLoS One* 7:e47510
131. Smit JJM, Groen K, Mel CAAM, Ottenhoff R, Roan MA Van, Valk MA Van Der, Diseases L, Centre AM, Schinkel AH, Elferink RPJO, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhoff R, van der Lugt NMT, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P (1993) Homozygous disruption of the murine MDR2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451–462
132. Sookoian S, Pirola CJ (2011) Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 53:1883–1894
133. Su K, Sabeva NS, Liu J, Wang Y, Bhatnagar S, Van Der Westhuyzen DR, Graf GA (2012) The ABCG5 ABCG8 sterol transporter opposes the development of fatty liver disease and loss of glycemic control independently of phytosterol accumulation. *J Biol Chem* 287:28564–28575
134. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL (2014) Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 1319:82–95
135. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL (2005) Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:462–468
136. Tada H, Nohara A, Inazu A, Sakuma N, Mabuchi H, Kawashiri M (2018) Sitosterolemia, Hypercholesterolemia, and Coronary Artery Disease. *J Atherosclerosis Thromb* 25:783–789
137. Tada H, Nomura A, Ogura M, Ikewaki K, Ishigaki Y, Inagaki K (2021) Diagnosis and Management of Sitosterolemia 2021. *J Atheroscler Thromb* 28:791–801
138. Tang Y, Cao G, Min X, Wang T, Sun S, Du X, Zhang W (2018) Cathepsin B inhibition ameliorates the non-alcoholic steatohepatitis through suppressing caspase-1 activation. *J Physiol Biochem* 74:503–510
139. Tangirala RK, Jerome WG, Jones NL, Small DM, Johnson WJ, Glick JM, Mahlberg FH, Rothblat GH (1994) Formation of cholesterol monohydrate crystals in macrophage-derived foam cells. *J Lipid Res* 35:93–104
140. Valenzuela R, Videla LA (2011) The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-

- 6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct* 2:644–648
141. Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA (2015) Mechanisms of inflammasome activation: Recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* 25:308–315
142. Varsano N, Fargion I, Wolf SG, Leiserowitz L, Addadi L (2015) Formation of 3D cholesterol crystals from 2D nucleation sites in lipid bilayer membranes: Implications for atherosclerosis. *J Am Chem Soc* 137:1601–1607
143. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM (2011) Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 34:274–285
144. Videla LA, Rodrigo R, Araya J, Poniachik J (2004) Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med* 37:1499–1507
145. von Kampen O, Buch S, Nothnagel M, Azocar L, Molina H, Brosch M, Erhart W, von Schönfels W, Egberts J, Seeger M, Arlt A, Balschun T, Franke A, Lerch MM, Mayerle J, Kratzer W, Boehm BO, Huse K, Schniewind B, Tiemann K, Jiang ZY, Han TQ, Mittal B, Srivastava A, Fenger M, Jørgensen T, Schirin-Sokhan R, Tönjes A, Wittenburg H, Stumvoll M, Kalthoff H, Lammert F, Tepel J, Puschel K, Becker T, Schreiber S, Platzer M, Völzke H, Krawczak M, Miquel JF, Schafmayer C, Hampe J (2013) Genetic and functional identification of the likely causative variant for cholesterol gallstone disease at the ABCG5/8 lithogenic locus. *Hepatology* 57:2407–2417
146. Weinmann A, Alt Y, Koch S, Nelles C, Düber C, Lang H, Otto G, Zimmermann T, Marquardt JU, Galle PR, Wörns MA, Schattenberg JM (2015) Treatment and survival of non-alcoholic steatohepatitis associated hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 15:1–9
147. Whalley S, Puvanachandra P, Desia A, Kennedy H (2007) Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med (Northfield Il)* 7:119–124
148. Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lütjohann D, Kerksiek A, van Kruchten R, Maeda N, Staels B, van Bilsen M, Shiri-Sverdlov R, Hofker MH (2008) Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48:474–486
149. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, Messer K, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE (2014) NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis

- development in NAFLD. *J Mol Med* 92:1069–1082
150. Wree A, Eguchi A, Mcgeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE (2014) NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 59:898–910
  151. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Xing XY, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM (2007) Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 45:1366–1374
  152. Yamazaki Y, Yasui K, Hashizume T, Suto A, Mori A, Murata Y, Yamaguchi M, Ikari A, Sugatani J (2015) Involvement of a cyclic adenosine monophosphate-dependent signal in the diet-induced canalicular trafficking of adenosine triphosphate-binding cassette transporter g5/g8. *Hepatology* 62:1215–1226
  153. Yeh MM, Brunt EM (2014) Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology* 147:754–764
  154. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH (2002) Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16237–16242
  155. Yuan L, Zhang F, Jia S, Xie J, Shen M (2020) Differences between phytosterols with different structures in regulating cholesterol synthesis, transport and metabolism in Caco-2 cells. *J Funct Foods* 65:103715
  156. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J (2011) A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221–226
  157. Zivkovic AMJ, German B, Sanyal AJ (2007) Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease 1-3. *Am J Clin Nutr* 86:285–300

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rolle der ABCG5/G8- und NPC1L1-Transporter im Sterolmetabolismus.....	10
Abbildung 2: Cholesterinkristallisation in der Gallenflüssigkeit.. .....	12
Abbildung 3: Struktur des ABCG5/G8-Transporters.....	15
Abbildung 4: NLRP3-Inflammasom .....	17
Abbildung 5: Aktivierungsmechanismen des NLRP3-Inflammasoms .....	18
Abbildung 6: Lokalisation der eingebrachten p.R51C und p.D19H Polymorphismen im <i>Abcg5/g8</i> -Gen. .....	21
Abbildung 7: Exemplarisches Bild von Cholesterinflüssigkristallen aus Lipidtropfen in Lebergewebe. .....	25
Abbildung 8: Agarosegel der Gelelektrophorese nach beta-Actin PCR.. .....	31
Abbildung 9: Graphische Auswertung der RT-qPCR. ....	34
Abbildung 10: Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse, welche Chow Futter erhielten. ....	39
Abbildung 11: Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten. ....	40
Abbildung 12: Mit Oil Red O gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse, welche das Chow Futter erhielten. ....	41
Abbildung 13: Mit Oil Red O gefärbte, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten. ....	42
Abbildung 14: Prozentualer Anteil der mit Oil Red O angefärbten Fläche an der Gesamtfläche eines Blickfelds der <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät. ....	43
Abbildung 15: Prozentualer Anteil der mit Oil Red O angefärbten Fläche an der Gesamtfläche eines Blickfelds der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wiltyp (WT)....	43
Abbildung 16: Unter polarisiertem Licht betrachtete, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse, welche die Chow-Fütterung erhielten. ....	44
Abbildung 17: Unter polarisiertem Licht betrachtete, exemplarische Kryostatschnitte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse, welche die lithogene Diät erhielten. ....	45

Abbildung 18: Prozentualer Anteil der unter polarisiertem Licht aufleuchtenden Kristallfläche an der Gesamtfläche eines Blickfeldes der <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse im Vergleich zwischen Chow-Fütterung und lithogener Diät.....	46
Abbildung 19: Prozentualer Anteil der unter polarisiertem Licht aufleuchtenden Kristallfläche der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wiltyp (WT). ....	46
Abbildung 20: Gegenüberstellung der Hellfeldmikroskopie eines ungefärbten Leberpräparats (A, C, E) und einer Belichtung mit polarisiertem Licht (B, D, F) des selben Präparatausschnitts.....	48
Abbildung 21: Gegenüberstellung der Hellfeldmikroskopie eines mit Oil Red O-gefärbten Präparats (A, C) und der Belichtung mit polarisiertem Licht (B, D) des selben Präparatausschnitts. ....	49
Abbildung 22: Relative Genexpression (RQn-Werte) von <i>Nlrp3</i> und <i>Il-1<math>\beta</math></i> .....	50
Abbildung 23: Relative Genexpression (RQn-Werte) der Fettsäuresynthase ( <i>Fasn</i> ), ATP-Citrat-Lyase ( <i>Acly</i> ), Acetyl-CoA Carboxylase ( <i>Acaca</i> ) und Stearoyl-CoA Desaturase ( <i>Scd1</i> ).....	52
Abbildung 24: Relative Genexpression (RQn-Werte) des Sterol regulatory element-binding protein ( <i>Srebf1</i> ) und des Carbohydrate responsive element-binding protein ( <i>Mlxipl</i> ). ....	54
Abbildung 25: Enzymaktivitäten der Serumleberwerte der transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wildtyp (WT) unter Chow-Fütterung.....	55
Abbildung 26: Enzymaktivitäten der alkalkischen Phosphatase im Serum von transgenen <i>Abcg5/g8</i> -Mäusen (HepKO, IntKO, KI) im Vergleich zum Wiltyp (WT). ....	56
Abbildung 27: Score plot. Darstellung der durch die zwei Hauptkomponenten t[1] und t[2] der PCA beschriebenen Mausproben der vier Genotypen. ....	57
Abbildung 28: Loading plot. Darstellung der durch die zwei Hauptkomponenten t[1] und t[2] der PCA beschriebenen Metabolite der Mausproben.....	58
Abbildung 29: Lipogener Index. Gebildet aus dem Quotienten aus Palmitinsäure (16:0) und Linolsäure (18:2) zur Darstellung der De-novo-Lipogenese der Leber. ....	60
Abbildung 30: Vulcano plots der univariaten Datenanalyse.....	61
Abbildung 31: A: Relative Intensitäten der drei Glycerolipidklassen in der Leber der Genotypen der <i>Abcg5/g8</i> -Mäuse.....	62
Abbildung 32: Relative Intensitäten der freien Fettsäuren.....	65
Abbildung 33: Relative Intensität der Glycerophospholipide und Lysoglycerophospholipide.....	66
Abbildung 34: Relative Intensität der Cholesterylester.....	67

Abbildung 35: Relative Aktivität von Enzymen aus dem Lipidstoffwechsel, abgeleitet aus Quotienten von Produkt und Edukt eines jeden Enzyms. .... 68

Abbildung 36: Heatmap der univariaten Datenanalyse der einzelnen Metaboliten. .... 104

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Materialien zur Anfertigung der Kryostatschnitte.....	22
Tabelle 2: Übersicht über die bei der HE-Färbung verwendeten Reagenzien.....	23
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Materialien bei der Oil Red O-Färbung.	24
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der RNA-Isolation. ....	27
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der cDNA-Synthese. ....	28
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der $\beta$ -Actin PCR und Gelelektrophorese.....	30
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der RT-qPCR. ....	33
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Materialien im Rahmen der Serumanalyse.....	35



## 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ABC	ATP-binding cassette
AC	Acylcarnitin
Acaca	Gen der Acetyl-CoA-Carboxylase
Acat2	Gen der Acetyl-CoA Acetyltransferase
Acly	Gen der ATP-Citrat-Lyase
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propanol
ANOVA	Analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosintri-phosphat
BA	Bile acid / Gallensäure
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CC	Cholesterinkristalle
cDNA	complementary desoxyribonucleinacid
Cer	Ceramid
ChoE	Cholesterylester
ChREBP	Carbohydrate response element-binding protein
CMH	Monohexosylceramide
CSI	Cholesterinsättigungsindex
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Diacylglyceride
DGAT	Diacylglycerol Acyl Transferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELOVL5	Elongation of very long chain fatty acids protein 5
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fasn	Gen der Fettsäuresynthase
FA	Fettsäure
GAPDH	Glycerin-Aldehy-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat Transaminase
GR	GeneRuler
HDL	High density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin

HepKO	hepatischer Knock-Out
HIF	Hypoxia-inducible facotr
HMG-CoA	Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A
IDL	Intermediate density lipoprotein
Il-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IntKO	intestinaler Knock-Out
KHK	Koronare Herzkrankheit
KI	Knock-In
KO	Knock-Out
LC-PUFA	Long chain poly unsaturated fatty acid / Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäure
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low density lipoprotein
LPC	Lysophosphatidylcholin
LPE	Lysophosphatidylethanolamin
LPG	Lysophosphatidylglycerol
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPL	Lipoproteinlipase
LXR	Liver-X-Rezeptor
MDH	Malatdehydrogenase
MG	Monoacylglyceride
Mlxipl	MLX interacting protein like (Gen des ChREBP)
MUFA	Monounsaturated fatty acid / einfach ungesättigte Fettsäuren
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NAE	N-Acyl Ethanolamin
NAFL	Nicht-alkoholische Fettleber
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
NPC1L1	Niemann-Pick C1 like 1-Transporter
ORO	Oil Red O
oxFA	oxidierte Fettsäuren
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PC	Phosphatidylcholin
PCA	Principal component analysis, engl. für Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PNPLA3	Patatin-like phospholipase domain-containing protein
pNPP	p-Nitrophenolphosphat
PUFA	Polyunsaturated fatty acid / mehrfach ungesättigte Fettsäure
PYD	Pyrin-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

RQ	Relative Quantifizierung
RT-qPCR	Real Time-quantitative Polymerase chain reaction
Scd1	Gen der Stearoyl-CoA Desaturase 1
SEM	Standard error of mean / Standardfehler
SFA	Saturated fatty acid / gesättigte Fettsäuren
SM	Sphingomyelin
SNP	Single nucleotide polymorphism / Einzelnukleotidpolymorphismus
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TG	Triacylglycerid
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily 2 protein
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
UHPLC/MS	Ultra high performance liquid chromatography / mass spectrometry
VLDL	Very low density lipoprotein / Lipoprotein sehr niedriger Dichte
WT	Wildtyp

## 10 Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Frank Lammert, welcher mir das Thema der Arbeit überließ. Ich bin über den regelmäßigen Austausch von Kritik, Ideen, Anregungen und Fortschritt sowie der kritischen Durchsicht von Postern und dieser Arbeit sehr dankbar gewesen. Er war ein ständiger Ansprechpartner, welcher mit großer Aufmerksamkeit und Begeisterung fokussiert meinen Belangen entgegentrat.

Ein weiterer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Susanne Weber für die umfangreiche Unterstützung. Sie war stets für Fragen offen, konnte mich fachlich unterstützen und war eine kompetente und kritische Person bei der Planung und Durchführung der Forschung sowie Durchsicht der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei B.Sc. Irina Lambert bedanken, welche mich in einem außerordentlichen Maße bei meiner praktischen Tätigkeit im Labor unterstützte. Mit einer besonders herzlichen und gelassenen Art lehrte sie mich die Durchführung der Analysen und Gewebefärbungen und war eine ständige Ansprechpartnerin für fachliche Belange.

Bei der Durchführung der Arbeit war die Kooperation mit den Forschungslaboren der weiteren Klinikabteilungen unabdingbar. Daher gilt mein Dank weiterhin dem Labor der Pulmologie, in welchem ich die Kryostatschnitte anfertigen durfte und dem Labor der Nephrologie, in welchem die Seren mit freundlicher Unterstützung von Frau Wagner analysiert werden konnten. Ebenfalls möchte ich mich bei den MitarbeiterInnen des Zentrallabors des UKS bedanken, welche weitere Serumanalysen anfertigten.

Für die herzliche Aufnahme in das Team möchte ich mich bei allen MitarbeiterInnen und MitdotorandInnen des Forschungslabors der Gastroenterologie bedanken. Ich wurde schnell in die Gruppe integriert und habe eine wunderbare Zeit auch neben dem Fachlichen dort verbracht. Ihr habt die Zeit im Labor zu etwas Besonderem gemacht!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden bedanken, welche stets ein offenes Ohr hatten und mich auf diesem Weg unterstützt haben.

## 11 Publikation

### **Posterpräsentation 37. Jahrestagung der GASL vom 29. – 30.01.2021**

Inkermann J, Lammert F, Weber SN (2021): The role of hepatic cholesterol crystals and NLRP3 inflammasome in ABCG5/G8-deficient mice. Z. Gastroenterol. 2021; 59(01): e31. DOI: 10.1055/s-0040-1722028

## 12 Lebenslauf

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

## 13 Anhang

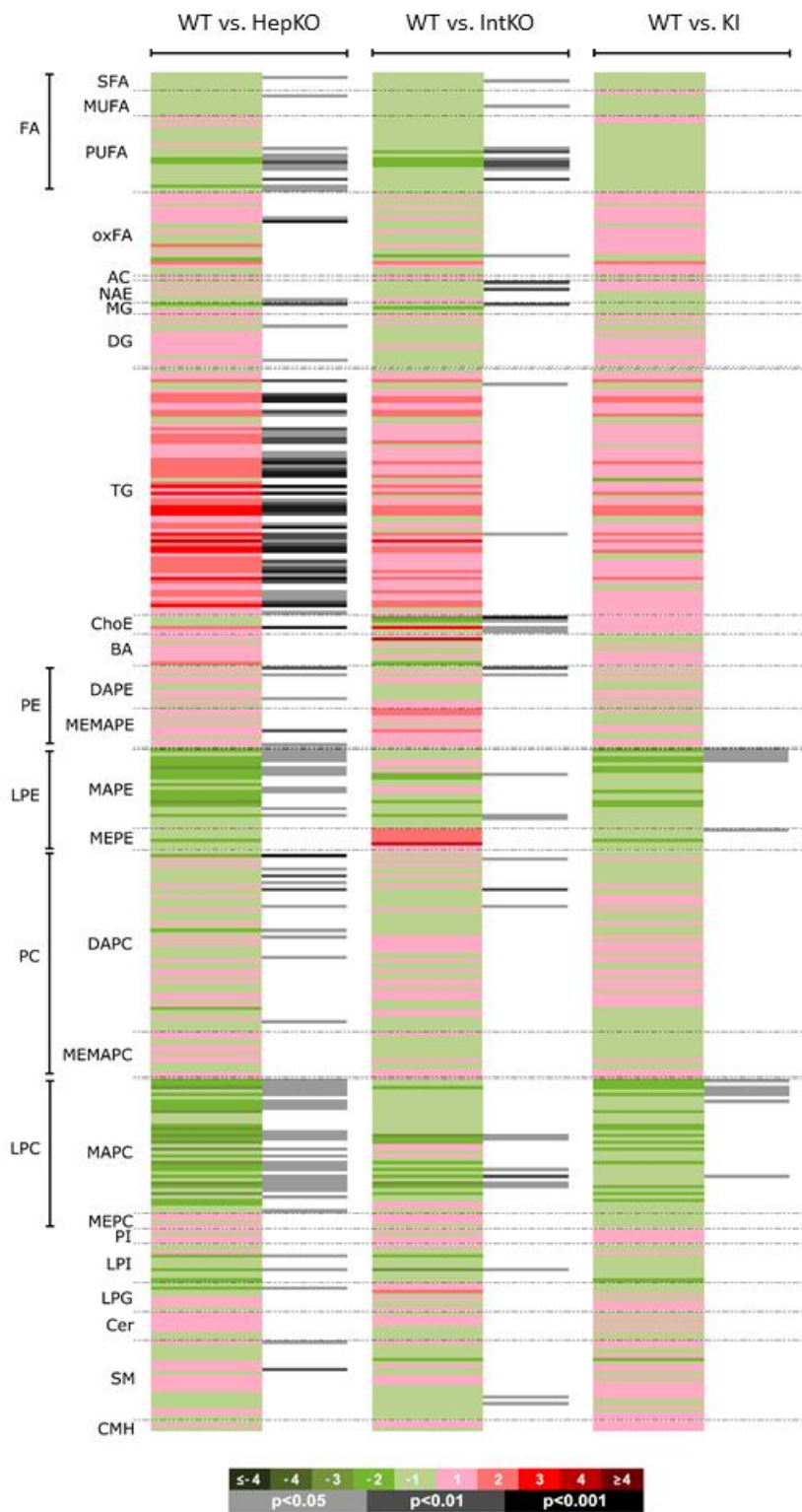


Abbildung 36: Heatmap der univariaten Datenanalyse der einzelnen Metaboliten. Darstellung (grün bis rot) des log<sub>2</sub> „fold-change“ und des t-Testes (Grautöne).