

Aus der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. H. L. Fehm

**Untersuchungen zur Cholesteringallensteinbildung
und Lipidsekretion an Inzuchtmausstämmen -
Expression hepatozellulärer
Plasmamembrantransporter**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– **Aus der Medizinischen Fakultät** –

vorgelegt von
Oliver Müller
aus Radautz/ Rumänien

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Michael Fuchs.....

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Zähringer.....

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2004.....

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 20.08.2004.....

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
-der Dekan der Medizinischen Fakultät-

Der liebevollen Unterstützung meiner Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>6</u>
1.1	EPIDEMIOLOGIE UND GENETIK DER CHOLESTERINGALLENSTEINERKRANKUNG	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Humane Gallensteingene	7
1.2	MOLEKULARE MECHANISMEN DER GALLEBILDUNG	9
1.3	PATHOPHYSIOLOGIE DER CHOLESTERINGALLENSTEINBILDUNG	12
1.4	DAS TIERMODELL DER GALLENSTEINMAUS	19
1.4.1	Bedeutung von Inzuchtmausstämmen	19
1.4.2	Murine Gallensteingene	20
1.5	FRAGESTELLUNG	23
<u>2</u>	<u>MATERIAL</u>	<u>24</u>
2.1	GERÄTE	24
2.2	TESTKITS	25
2.3	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	26
2.4	CHEMIKALIEN UND SONSTIGE REAGENTIEN	26
2.5	TIERE	28
2.6	SOFTWARE	28
<u>3</u>	<u>METHODEN</u>	<u>29</u>
3.1	TIERHALTUNG UND STANDARDDIÄT	29
3.2	OPERATIONSTECHNIK	29
3.3	BESTIMMUNG DES HEPATISCHEN GESAMTCHOLESTERINGEHALTES	31
3.4	ANALYSE DER HEPATISCHEN GALLE	31
3.4.1	Konzentrationsbestimmung für Cholesterin, Phospholipide und Gallensäuren	31
3.4.2	Gallefluss und Lipidsekretionsraten	32
3.5	REVERSE-TRANSKRIPTIONS-POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)	32
3.5.1	Isolierung hepatischer Gesamt-RNA	33
3.5.2	Bestimmung des RNA-Gehaltes	34
3.5.3	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	35
3.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.5.5	Quantifizierung des PCR-Produktes	38
3.6	ISOLATION VON PLASMAMEMBRANEN UND WESTERNBLOT	38
3.6.1	Isolation hepatischer Plasmamembranen, Bestimmung der Proteinkonzentration	38

3.6.2	SDS-PAGE und Immunoblotting	40
3.6.3	Visualisierung und Quantifizierung	41
3.7	STATISTIK	42
4	<u>ERGEBNISSE</u>	43
4.1	KÖRPER- UND LEBERGEWICHT, AUFTRETEN VON GALLENSTEINEN	43
4.2	HEPATISCHES GESAMTCHOLESTERIN	44
4.3	BILIÄRE LIPIDSEKRETIONS RATEN	44
4.4	EXPRESSION VON TRANSPORTERN DER SINUSOIDALEN PLASMAMEMBRAN	46
4.4.1	Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von Ntcp1	46
4.4.2	Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von Oatp1	48
4.4.3	Steady-state mRNA-Expression von Oct1	51
4.5	EXPRESSION VON TRANSPORTERN DER KANALIKULÄREN PLASMAMEMBRAN	52
4.5.1	Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von Bsep	52
4.5.2	Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von Mdr2	55
4.5.3	Steady-state mRNA-Expression von Mrp2	57
5	<u>DISKUSSION</u>	58
5.1	EINFLUSS DER CHOLESTERINREICHEN DIÄT AUF DEN LEBERCHOLESTERINGEHALT	58
5.2	BILIÄRE LIPIDSEKR. UND EXPRESSION SINUSOIDALER MEMBRANTRANSPORTER	58
5.3	BILIÄRE LIPIDSEKR. UND EXPRESSION KANALIKULÄRER MEMBRANTRANSPORTER	59
5.4	MECHANISMUS DER GALLENSTEINBILDUNG BEI C57L/J-INZUCHTMÄUSEN	61
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	64
6.1	DEUTSCH	64
6.2	ENGLISCH	65
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	66
8	<u>VERZEICHNISSE</u>	80
8.1	ABKÜRZUNGEN	80
8.2	ABBILDUNGEN	82
8.3	TABELLEN	83
	<u>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</u>	84
	<u>DANKSAGUNG</u>	85
	<u>LEBENS LAUF</u>	86

1 Einleitung

Gallensteine werden in Cholesterinsteine, Pigmentsteine oder Mischformen beliebiger Zusammensetzung eingeteilt. Cholesterinsteine bestehen zu mehr als 70% aus Cholesterin und machen in der westlichen Gesellschaft bis zu 80% aller Gallensteine aus. Demgegenüber handelt es sich bei bis zu 20% aller Gallensteine um Pigmentsteine. Die Steinformen unterscheiden sich unter anderem bezüglich Epidemiologie und Genetik. Die vorliegende Arbeit befasst sich ausschließlich mit Cholesteringallensteinen.

1.1 Epidemiologie und Genetik der Cholesteringallensteinerkrankung

1.1.1 Epidemiologie

Gallensteine sind in der westlichen Bevölkerung (Europa, USA) häufig anzutreffen. In den USA wurden in Autopsien (Altersgruppe > 40 Jahre) bei 8% der Männer und bei 20% der Frauen Gallensteine nachgewiesen (1). Etwa 10% der US-amerikanischen Bevölkerung, das heißt ca. 25 Millionen Menschen, haben Gallensteine (2). Obgleich weniger als die Hälfte der Steinträger symptomatisch werden, liegt die Anzahl der in den USA jährlich durchgeführten Cholezystektomien bei über 700000. Dies führt zu einer Belastung des Gesundheitssystems mit 8-10 Milliarden \$ pro Jahr, was 1,5% des gesamten Budgets ausmacht (3). Im Alter von 75 Jahren haben 20% der Männer und 35% der Frauen Gallensteine (4). Die Prävalenz bei beiden Geschlechtern erhöht sich mit dem Alter. Eine prospektive Studie aus Dänemark (5) geht von einer Erhöhung der Prävalenz um 3% alle 5 Jahre aus.

Die Prävalenz der Gallensteinerkrankung variiert weltweit deutlich. In Deutschland scheint sie zwischen 6% und 9% (6; 7) zu liegen. Allgemein sind Gallensteine in Europa häufig, wie in zahlreichen Studien gezeigt wurde (8-13). Noch häufiger leiden *Mexican-Americans* unter Gallensteinen (14), auch wenn mit dem Gallensteinleiden assoziierte Faktoren wie z.B. Adipositas, Diabetes mellitus und Alter berücksichtigt werden (15). Die höchsten Prävalenzraten sind für die Pima-Indianer (16) und die Navajo (17) aus Arizona beschrieben, sowie für zahlreiche andere Indianergruppen Nordamerikas (18-20). Im Gegensatz dazu entwickeln zentralafrikanische Massai (21) und Amerikaner schwarzer

Hautfarbe (22) fast nie Gallensteine. In der Zusammenschau sprechen diese Prävalenzunterschiede für eine – allen Völkergruppen gemeinsame – genetische Prädisposition zur Entwicklung von Cholesteringallensteinen. Evolutionsbiologisch kann diese gut durch die Völkerwanderung erklärt werden. Während früher für die Bevölkerungsgruppen der nördlichen Hemisphäre die Neigung zur Fettleibigkeit mit der Möglichkeit zur Anlage großer Fettkalorienspeicher unter den kargen Ernährungsbedingungen der letzten Eiszeit einen Selektionsvorteil darstellte, äußert sie sich heute in einer Prädisposition zur Gallensteinerkrankung (23-25).

1.1.2 Humane Gallensteingene

Deutliche Hinweise auf eine polygene Vererbung der Prädisposition zur Gallensteinerkrankung stammen aus zahlreichen Familien- und Zwillingsstudien. So belegen jeweils mehrere Untersuchungen das familiär gehäufte Auftreten von Cholesteringallensteinen (26-28), sowie eine etwa fünffach erhöhte Gallensteinprävalenz bei mit Gallensteinträgern erstgradig Verwandten (29-32). Von besonderer Bedeutung scheint hierbei die Cholesterinübersättigung der Galle zu sein. So zeigen beispielsweise eineiige Zwillinge bezüglich dieses Parameters Konkordanz (33), und auch bei gesunden Schwestern weiblicher Gallensteinpatienten findet man häufig eine Cholesterinübersättigung der Galle (34).

Während die epidemiologischen Studien und die Familien- und Zwillingsstudien eine generelle genetische Prädisposition für einen Phänotyp dokumentieren, versuchen Assoziationsstudien einen direkten Zusammenhang zwischen Gallensteinphänotypen und einzelnen Genen herzustellen. Für die Cholelithiasis konnten bisher sechs Kandidatengene durch Untersuchungen bei Gallensteinpatienten identifiziert werden (Tabelle 1, S. 8).

Tabelle 1: Humane Gallensteingene.

Gensymbol (neue Nomenklatur)	Funktion bzw. Transkript	Chromosom
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	1
<i>ABCB4</i>	Phospholipid-Flippase (MDR3)	7
<i>SLC10A2</i>	Ilealer Gallensäuretransporter (IBAT)	13
<i>APOB</i>	Apolipoprotein B	2
<i>CETP</i>	Cholesterinester-Transferprotein	16
<i>CYP7A1</i>	Cholesterin 7 α -Hydroxylase	8

Bisher bekannte genetische Risikofaktoren für die Cholesterin-Cholelithiasis des Menschen, modifiziert nach Figge et al. (35).

Apolipoprotein E (APOE) ist der bekannteste genetische Risikofaktor für die Cholesterin-Cholelithiasis. Es gibt drei häufige, kodominant vererbte APOE-Allele (ϵ 2, ϵ 3 und ϵ 4), die mittels isoelektrischer Fokussierung typisiert werden können, wobei sechs mögliche Isoformen entstehen (36). Die Studie von Bertomeu et al. (37) zeigt, dass das ϵ 4-Allel nicht nur mit dem Morbus Alzheimer, sondern auch mit Cholesteringallensteinen assoziiert ist, während das ϵ 2-Allel einen Schutz vor Gallensteinen zu bieten scheint (38). Patienten mit APOE4-Isoformen und Gallensteinen hatten in einer finnischen Studie (39) eine schnellere Cholesterinkristallisation und eine größere Zahl von Steinen, die zudem einen höheren Cholesteringehalt aufwiesen. Die in den Studien beobachteten Assoziationen könnten auf eine höhere intestinale Cholesterinabsorption und schnellere Chylomikronenclearance bei Patienten mit der APOE4-Isoform zurückzuführen sein, da die erhöhte hepatische Cholesterinaufnahme aus Chylomikronen-Remnants zur Repression der Cholesterin- und Gallensäurenbiosynthese führt (40). Da in der Galle Holo-APOE vorhanden ist (39), könnte es alternativ als Inhibitor- oder als Promotorprotein die Cholesterinkristallisation modulieren (41).

Interessanterweise konnten kürzlich bei Patienten mit Gallenblasensteinen und intrahepatischen Cholesterinsteinen *Nonsense*- und *Missense*-Mutationen im Gen des kanalikulären Phosphatidycholin-Transporters der Leber (MDR3; entspricht MDR2 bei der

Maus) identifiziert werden (42). Zudem wurde bei japanischen Patienten mit intrahepatischen Cholesterinsteinen eine verminderte hepatische MDR3-Expression und bei Patienten mit Mikrolithiasis eine um 53% reduzierte biliäre Phospholipidkonzentration beschrieben (43; 44). Bei diesen Untersuchungen ging man von der Beobachtung aus, dass zwei durch MDR3-Mutationen bedingte cholestatische Erkrankungen, die progressive familiäre intrahepatische Cholestase und die intrahepatische Schwangerschaftscholestase, mit Gallensteinen assoziiert sind (45-47). Damit ist die MDR3-Defizienz die erste gesicherte genetisch bedingte Form der Cholesterin-Cholelithiasis.

1.2 Molekulare Mechanismen der Gallebildung

Galleflüssigkeit besteht aus folgenden Komponenten: Wasser (82%), Gallensäuren (12%), Lecithin und anderen Phospholipiden (4%), sowie nicht-verestertem Cholesterin (0,7%) (48). Weitere Bestandteile sind konjugiertes Bilirubin, verschiedene Proteine, Elektrolyte und Mucin. In der Gallenblase findet durch Wasserentzug eine Konzentrierung der hepatischen Galle auf das bis zu Zehnfache statt.

Eine ungestörte Gallesekretion erfüllt eine Reihe physiologisch wichtiger Funktionen. Dies ist zum einen die für die intestinale Lipidabsorption und Chylomikronenbildung wichtige Wirkung als Detergenz (49). Zum anderen wird Cholesterin aus dem Körper im Wesentlichen über die Gallenflüssigkeit durch Sekretion in den Darm eliminiert (50). Dabei stellt der Metabolismus zu Gallensäuren beim Menschen den bedeutendsten Abbauweg für Cholesterin dar (51; 52). Schließlich werden auch andere endogene und exogene amphipathische Substanzen wie z.B. Stoffwechselendprodukte, Medikamente und Toxine in die Galle sezerniert (53).

Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert und im Rahmen einer enterohepatischen Zirkulation sehr effizient im Organismus konserviert. Ein transhepatischer Gallensäurenflux von ca. 1 g/h stimuliert beim Menschen die biliäre Sekretion von bis zu 2 g Cholesterin und maximal 12 g Phosphatidylcholin (50). Phosphatidylcholin macht dabei mit mehr als 95% den bei weitem größten Anteil biliär sezernierter Phospholipide aus.

Gallefluss und biliäre Lipidsekretion hängen in erheblichem Maße von der koordinierten Aktivität hepatozellulärer Transportproteine ab, welche teils in der sinusoidalen, teils in der kanalikulären Plasmamembran lokalisiert sind (Abbildung 1, S. 12).

Auch beeinflusst die Gallensäureausscheidung den Gallefluss, welcher in eine gallensäurenabhängige und eine gallensäurenunabhängige Fraktion eingeteilt wird (54). Die gallensäurenabhängige Sekretion erklärt sich durch die bei hoher Gallensäurenkonzentration gesteigerte hepatische Aufnahme, was letztlich die Sekretion in die Gallenkanälchen vorantreibt. Der Gallensäuretransporter BSEP ist für die kanalikuläre Sekretion monoanionischer Gallensäuren wie z.B. Taurocholsäure verantwortlich, und stellt das wesentliche Effluxsystem für Gallensäuren dar (55; 56).

MRP2, ein weiteres kanalikulär lokalisiertes Transportprotein (57-62), befördert organische Anionen wie Glutathionkonjugate, Glukuronide, Leukotrien C4 und divalente Gallensäurekonjugate, nicht aber monovalente Gallensäuren (63). Von besonderer Bedeutung ist hierbei die MRP2-vermittelte kanalikuläre Exkretion von reduziertem Glutathion, der treibenden Kraft des gallensäurenunabhängigen Galleflusses (64). Beide Transporter arbeiten ATP-abhängig.

Phosphatidylcholin (PC) macht mehr als 95% der biliär sezernierten Phospholipide aus. Der konstante Wechsel von PC-Molekülen zwischen den Schichten der doppelschichtigen Plasmamembran wird durch so genannte „Flippasen“ vermittelt, die teils ATP-unabhängig (65-67), teils ATP-abhängig sind. Bei der ATP-abhängigen Flippase MDR2 handelt es sich um ein 170 kD Protein der kanalikulären Membran (68). MDR2 entspricht beim Menschen dem Protein MDR3 (69).

Ein weiterer ATP-abhängiger Transporter der kanalikulären Membran, ABCG5/G8, wurde zwischenzeitlich identifiziert und scheint von besonderer Bedeutung für die biliäre Cholesterinsekretion zu sein (70; 71).

Die Transporter der sinusoidale Plasmamembran, welche die Aufnahme von Gallensäuren und anderen organischen Anionen vermitteln, können in Na⁺-abhängige und Na⁺-unabhängige Systeme unterteilt werden (56). Der Na⁺-abhängige Transport wird angetrieben durch den Na⁺-Gradienten, den die Na⁺/K⁺-ATPase der basolateralen Plasmamembran aufrechterhält. Die Na⁺-unabhängigen Systeme werden primär durch Anionen-Austauschmechanismen angetrieben. An der sinusoidalen Plasmamembran des

Hepatozyten erfolgt die Aufnahme konjugierter Gallensäuren wie Taurocholsäure zu mehr als 80% über Na^+ -abhängige Transportwege. Dabei stellt das Na^+ -abhängige Taurocholat-Cotransportierende Protein 1 (NTCP1), welches ausschließlich in der Leber exprimiert wird, das wichtigste Transportsystem dar (72). Erwähnenswert ist die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen NTCP1 und dem intestinalen Gallensäuretransporter (IBAT), welcher ebenfalls die Na^+ -abhängige Aufnahme von Gallensäuren vermittelt (73) und neben dem terminalen Ileum auch in der Niere (74) und in Cholangiozyten (75) exprimiert wird.

Die Na^+ -unabhängige Aufnahme von Gallensäuren wird durch eine Familie von Transportern vermittelt, zu der das Organische Anionen-Transportierende Polypeptid 1 (OATP1) gezählt wird. Neben der hepatozellulären Aufnahme von Gallensäuren vermittelt OATP1 auch die Aufnahme konjugierter Steroide und verschiedener Medikamente.

Organische Kationen wie Cholin, das für die Synthese von Phosphatidylcholin benötigt wird, werden durch das Organische Kationen-Transportierende Protein 1 (OCT1) in den Hepatozyten aufgenommen.

Die Aufnahme von Cholesterin erfolgt rezeptorvermittelt, wobei der LDL-Rezeptor (76), der HDL-Rezeptor (SR-BI) (77) und der Chylomikronen-Remnant-Rezeptor (78) beteiligt sind.

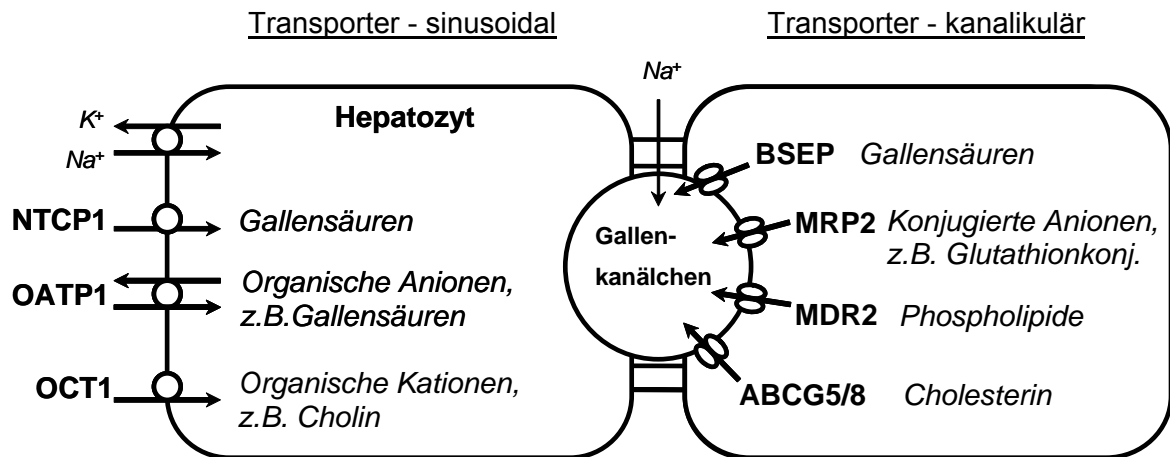


Abbildung 1: Hepatozelluläre Transportsysteme.

Dargestellt sind die untersuchten Transportsysteme der sinusoidalen (links) bzw. kanalikulären (rechts) Plasmamembran des Hepatozyten und die jeweils transportierten Moleküle. Nicht untersucht wurde hierbei ABCG5/8, dessen Bedeutung zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente noch unklar war. Abkürzungen: NTCP1 (Na^+ -abhängiges Taurocholat-Cotransportierendes Protein 1); OATP1 (Organische Anionen-Transportierendes Polypeptid 1); OCT1 (Organische Kationen-Transportierendes Protein 1); BSEP (*bile salt export pump*); MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2*); MDR2 (*multidrug resistance p-glycoprotein 2*), ABCG5/8 (*ATP-binding cassette g5/g8*).

1.3 Pathophysiologie der Cholesteringallensteinbildung

Das pathophysiologische Konzept der Cholelithiasis hat sich im Laufe des letzten Jahrzehntes – nicht zuletzt aufgrund molekularbiologischer Grundlagenforschung – gewandelt (Abbildung 2, S. 13). Man geht für die Cholesterinsteinentstehung von einem gleichzeitigen Vorliegen mehrerer Defekte aus. Diese sind im Einzelnen: (I) Eine Übersättigung der Galle mit Cholesterin bei (II) eingeschränkter Gallenblasenkontraktilität, sowie (III) eine beschleunigte Nukleation von Cholesterinmonohydratkristallen mit (IV) gesteigerter Mucinsekretion als wichtigstem nukleationsfördernden Faktor (79). Auch dürfte (V) eine Verkleinerung des Gallensäurenpools bei (VI) gesteigerter Konversion von Cholsäure zu Desoxycholsäure mit entsprechender Erhöhung des Desoxycholsäure-Pools zur Cholesterinübersättigung der Galle beitragen. Das Ausmaß der genannten Veränderung variiert bei Gallensteinträgern erheblich, so dass es bislang nur in Ansätzen gelungen ist, einen direkten Zusammenhang zwischen den einzelnen Defekten herzustellen. Es wird

postuliert, dass die Hypersekretion von Cholesterin den primären pathophysiologischen Defekt darstellt, welcher eine Cholesterinübersättigung der Galle zur Folge hat. Die anderen genannten Defekte lassen sich hieraus vergleichsweise gut ableiten und sind somit wahrscheinlich sekundärer oder gar tertiärer Art.

Defekte

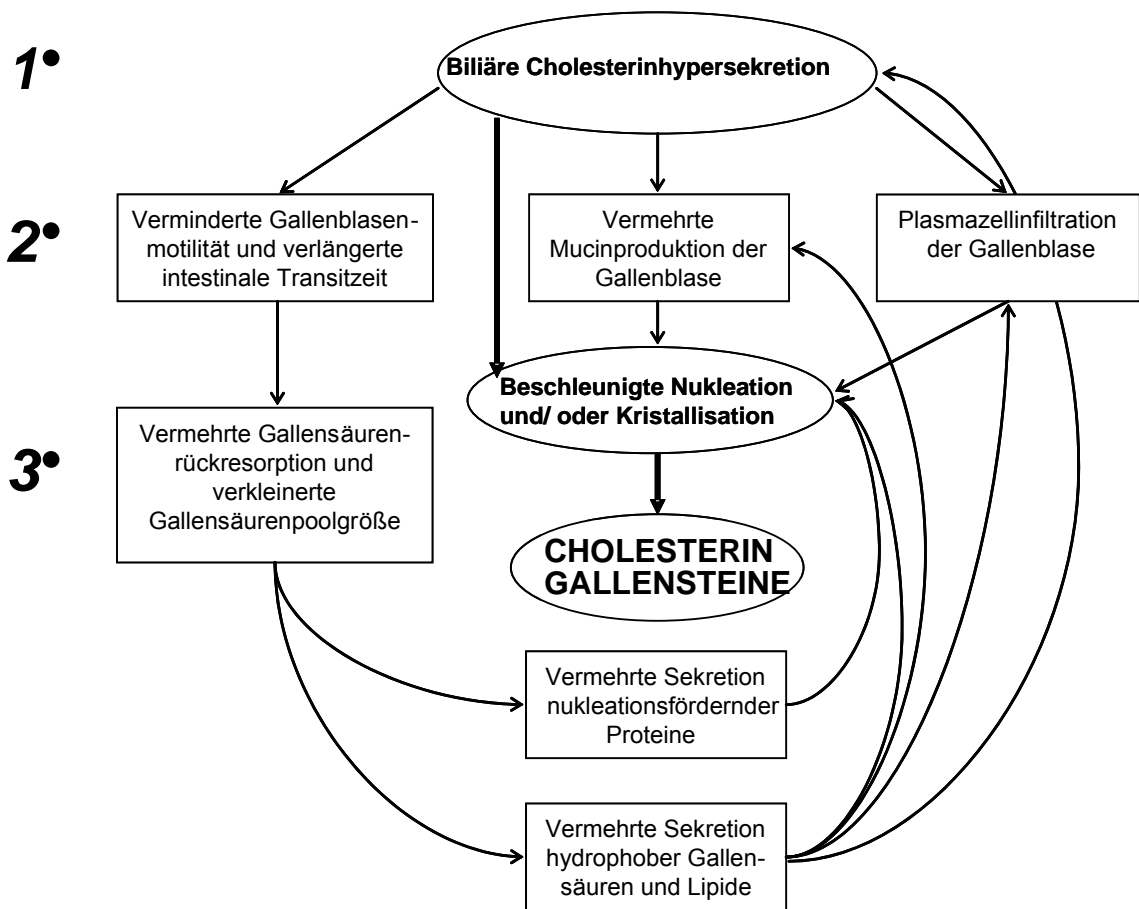


Abbildung 2: Hypothetisches Modell der Bildung von Cholesteringallensteinen.

Die biliäre Cholesterinhypersekretion wird als primärer Defekt angesehen, welcher eine Reihe sekundärer Defekte auslöst. So diffundieren beispielsweise aus der übersättigten Gallenblasengalle Cholesterinmoleküle rasch in die Gallenblasenwand und führen zu einer muskulären Dysfunktion. Die verschlechterte Gallenblasenmotilität ist Ursache einer biliären Stase, die die biliäre Cholesterinkristallisation beschleunigt. Die Cholesterinüberladung der glatten Muskelzellen zieht entzündliche Veränderungen der Gallenblasenwand in Form einer Plasmazellinfiltration nach sich, wobei die sezernierten Immunglobuline potente Kristallisationsfaktoren darstellen. Abbildung modifiziert nach Apstein und Carey (79).

Tabelle 2: Cholesterinsteinbildung - Risikofaktoren und pathophysiologische Mechanismen.

Risikofaktoren	Pathophysiologische Mechanismen	Folgen
Adipositas	HMG-CoA-Reduktase-Aktivität ↑	Cholesterinsynthese und -abgabe in die Galle ↑
starke Gewichtsreduktion (Fasten)	<ul style="list-style-type: none"> • Mobilisation von Cholesterin aus den Speicherformen ↑, enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren ↓, Gallensäurensynthese ↓ • Gallenblasenmotilität ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Cholesterinsekretion ↑, Gallensäurenssekretion ↓
totale parenterale Ernährung	Gallenblasenmotilität ↓	
entzündliche Erkrankungen (Morbus Crohn) oder Resektion des terminalen Ileums	enteraler Gallensäurenverlust, unzureichende Neusynthese, Gallensäurenpool ↓	Gallensäurenssekretion ↓
weibliches Geschlecht, Schwangerschaft, Therapie mit Östrogenen bzw. Gestagenen		
<ul style="list-style-type: none"> • Östrogene 	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation hepatischer Lipoproteinrezeptoren, dadurch hepatische Cholesterinaufnahme ↑ • 12α-Hydroxylase-Aktivität ↓, dadurch Syntheserate und Poolgröße von Chenodesoxycholsäure ↓, Cholatanteil im Gallensäurenpool ↑; nach Dehydroxylierung von Cholat im Darm: Desoxycholanteil und -sekretion ↑ 	<ul style="list-style-type: none"> • Cholesterinsekretion ↑ • Cholesterinsekretion ↑ (die hydrophobe Desoxycholsäure führt zu einer stärkeren Stimulation der Cholesterinsekretion als Cholsäure oder Chenodesoxycholsäure)
<ul style="list-style-type: none"> • Gestagene 	<ul style="list-style-type: none"> • ACAT-Aktivität ↓, dadurch Überführung von Cholesterin in die Esterform ↓ • Gallenblasenmotilität ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Cholesterinsekretion ↑

Tabelle 2: (Fortsetzung)

Risikofaktoren	Pathophysiologische Mechanismen	Folgen
<p>Gallenblasenhypomotilität <u>Ursachen:</u> Fasten, totale parenterale Ernährung, Gestagene, Somatostatinanaloga, IgG-Einlagerung bei Entzündung, autonome Neuropathie bei Diabetes mellitus</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Angebot zirkulierender Gallensäuren durch Retention eines wesentlichen Anteils des Pools in der Gallenblase ↓ • Verweildauer der Galle in der Gallenblase ↑, dadurch Eindickung und Durchmischungsstörung 	<ul style="list-style-type: none"> • Gallensäuresekretion ↓ • lokaler Gallensäuremangel, Begünstigung von Vesikelbildung, –aggregation und –fusion sowie der Nukleation
<p>Medikamente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Clofibrat • Somatostatinanaloga • Cyclosporin A 	<ul style="list-style-type: none"> • ACAT-Aktivität ↓, dadurch Überführung von Cholesterin in die Esterform ↓ • 7α-Hydroxylase-Aktivität ↓, → Gallensäuresynthese ↓ • Gallenblasenmotilität ↓ • Gallensäuresynthese, Rückresorption im terminalen Ileum und Aufnahme durch die Leber ↓ 	<ul style="list-style-type: none"> • Cholesterinsekretion ↑ • Gallensäuresekretion ↓ Cholesterinsekretion ↑ • Gallensäuresekretion ↓

Nicht erwähnt sind die genetischen Risikofaktoren (siehe 1.1.2, S. 7) sowie Fettstoffwechselstörungen und Diabetes mellitus, welche ebenfalls zur Cholesterinsteinbildung prädisponieren.

Grundsätzlich kann eine vermehrte Cholesterinsekretion (Abbildung 3, S. 18) bedingt sein durch: (I) eine gesteigerte hepatische Aufnahme von durch Lipoproteine transportiertem Cholesterin unter Beteiligung des LDL-Rezeptors (76), des HDL-Rezeptors (SR-BI) (77) und des ChR-Rezeptors (78); (II) eine vermehrte Cholesterinsynthese bedingt durch Erhöhung der Aktivität der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMG-CoA-R), das Schlüsselenzym der *de novo* Cholesterinbiosynthese (80); (III) eine reduzierte Veresterung freien Cholesterins, vermittelt durch die Acyl-CoA:Cholesterinacyltransferase (ACAT) (81) bzw. (IV) eine gesteigerte, durch die Cholesterin-Ester-Hydrolase (CEH) katalysierte, Hydrolyse von Cholesterinestern (82); (V) eine verminderte Nutzung von Cholesterin für die Gallensäurensynthese, bedingt durch Verminderung der Aktivität der Cholesterin 7 α -Hydroxylase (CYP7A1) (83), das Schlüsselenzym der Gallensäurensynthese; schließlich (VI) eine Steigerung des cytosolischen Cholesterintransportes zur kanalikulären Membran zur Sekretion in die Galle, woran das Sterol Carrier Protein 2 (SCP2) beteiligt ist (84; 85).

Zahlreiche Untersuchungen an menschlichen Cholesteringallensteinträgern befassten sich mit dem zweitgenannten Punkt (s.o., II), der hepatischen Cholesterinbiosynthese. Hierbei ergab sich bislang jedoch kein eindeutiges Bild. Während einige Untersuchungen bei Gallensteinträgern eine erhöhte HMG-CoA-Reduktase-Aktivität (86-89) bzw. das Unvermögen zur Reduktion der Enzymaktivität als Reaktion auf eine cholesterinreiche Diät zeigten (90), fanden anderen Studien keine Unterschiede (91-93), oder gar erniedrigte Werte (52; 94). Ähnlich widersprüchlich ist die Datenlage für die Cholesterin 7 α -Hydroxylase (85-87; 89; 93).

In vorangegangenen Untersuchungen fanden wir für *Acat-2* in dem eingesetzten Mausmodell (nähere Erläuterung: 1.4, S. 19) bei beiden Mausstämmen eine vergleichbare Steigerung der mRNA-Expression um 70% (AKR/J) bzw. 90% (C57L). Im Gegensatz hierzu zeigte sich für das Enzym CEH bezüglich mRNA-Expression und Proteinexpression lediglich bei den gallensteinempfindlichen Tieren des Stammes C57L ein signifikanter Anstieg (95). Interessanterweise war bei dieser Gruppe von Tieren auch die Expression des HDL-spezifischen Rezeptors SR-BI (s.o., I) auf mRNA-Ebene um das 2,5-fache und auf Proteinebene um das zweifache gesteigert. Dies ging einher mit erniedrigten HDL-Cholesterinwerten im Blut der betroffenen Tiere. HDL-Partikel erfüllen die Aufgabe des so genannten umgekehrten Cholesterintransportes (*reverse cholesterol transport*) und

transportieren aus extrahepatischen Geweben stammendes Cholesterin in veresterter Form zur Leber (96). Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor wird SR-BI nicht in den Hepatozyten internalisiert (97). Es kommt lediglich zu einer Interaktion mit HDL, welche die Aufnahme von Cholesterinestern in den Hepatozyten ermöglicht (98; 99). Zusammenfassend könnte dem umgekehrten Cholesterintransport eine bedeutende Rolle bei der Bildung von Cholesteringallensteinen zukommen, da zum einen bei Tier und Mensch bis zu 90% des biliären Cholesterins aus Lipoproteinen stammt (100; 101), zum anderen *de novo* Cholesterin bei Ratte und Hamster nur in geringen Mengen in die Galle sezerniert wird (102; 103). Allerdings transportiert der Mensch Cholesterin überwiegend in LDL, während sich bei Nagetieren der Großteil des transportierten Cholesterins in den HDL-Partikeln befindet (101; 104; 105). Schließlich gibt es deutliche Hinweise, dass eine Steigerung des hepatischen Cholesterintransportes (s.o., VI), welcher zumindest teilweise durch SCP2 vermittelt wird, zur Cholesterinhypersekretion beiträgt. So fand man bei C57L/J-Mäusen im Gegensatz zu AKR/J-Tieren nach 4-wöchiger lithogener Diät einen Anstieg der SCP2 Proteinexpression um ca. 60% (84). Die mRNA-Expression stieg in vergleichbarem Maße an, was als Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation der SCP2 Proteinexpression gewertet werden kann.

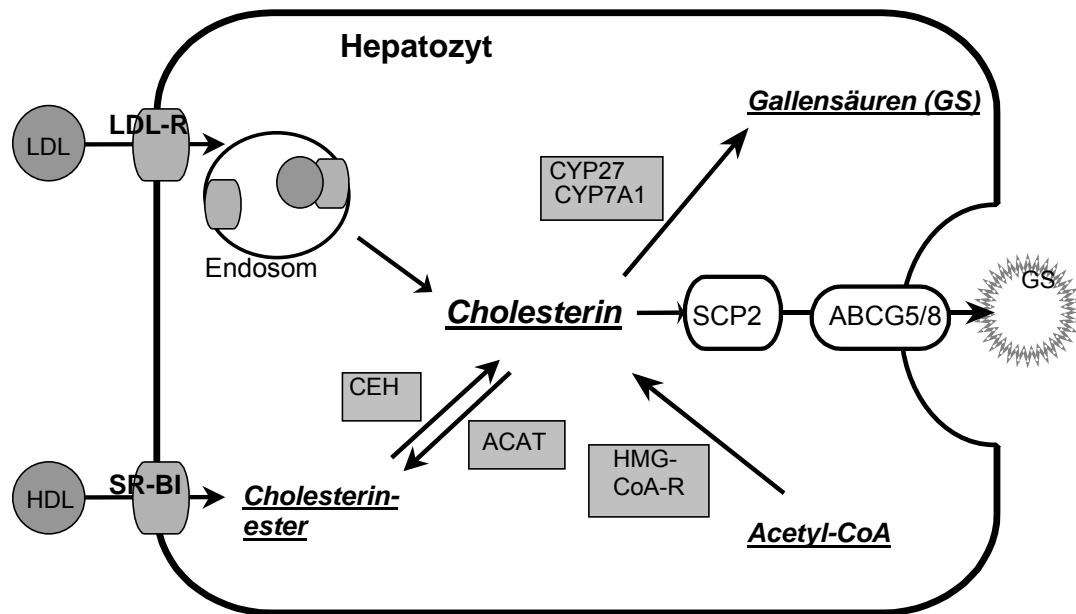


Abbildung 3: Cholesterinaufnahme, -stoffwechsel und -transport.

Erläuterung im Text. Abkürzungen: LDL (*low density lipoprotein*); HDL (*high density lipoprotein*); SRB1 (*scavenger receptor class b type 1*); CEH (Cholesterin-Ester-Hydrolase); ACAT (Acyl-CoA:Cholesterinacyltransferase); HMG-CoA-R (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase); CYP27 (27-Hydroxylase); CYP7A1 (Cholesterin 7 α -Hydroxylase); SCP2 (*sterol carrier protein 2*); ABCG5/8 (*ATP-binding cassette g5/g8*); GS (Gallensäuren).

Die Hypersekretion von Cholesterin und die daraus resultierende Cholesterinübersättigung der Galleflüssigkeit ist von fundamentaler Bedeutung für die Entstehung von Cholesteringallensteinen. Cholesterin liegt in der Galle zu über 95% in freier, nicht-veresterter Form vor (106). Die Löslichkeit des stark hydrophoben Cholesterins wird in der Galleflüssigkeit durch drei verschiedene Aggregatformen bzw. Carrier vermittelt (107). Hierzu rechnet man (I) unilamelläre Vesikel, welche wie die Plasmamembran aus zwei Lipidschichten aufgebaut sind und neben Phospholipiden vergleichsweise viel Cholesterin enthalten (108). Weitere Aggregatformen sind (II) aus Gallensäuren und vergleichsweise wenig Cholesterin aufgebaute einfache Mizellen und (III) gemischte Mizellen, die zusätzlich aus Phosphatidylcholin bei geringerem Gallensäurenanteil bestehen. In den Mizellen richten sich die hydrophoben Molekülanteile zum Zentrum hin aus, was deren Kontakt zum umgebenden Wasser als polarem Lösungsmittel minimiert und daher

thermodynamisch am günstigsten ist (109). Somit ist für die Löslichkeit des Cholesterins nicht nur dessen Konzentration in der Galle bedeutsam, sondern auch die Konzentration von Phospholipiden und Gallensäuren. Dieser Zusammenhang wird im Löslichkeitsschema der Gallenbestandteile nach Carey illustriert (110). Unter physiologischen Bedingungen sind einfache und gemischte Mizellen in der Lage, eine Kristallisation von Cholesterin praktisch vollständig zu verhindern. Bei Störung des Gleichgewichtes zwischen Cholesterin, Phospholipiden und Gallensäuren kommt es zur Cholesterinübersättigung von Mizellen und insbesondere Vesikeln, was eine Cholesterinumverteilung sowohl innerhalb dieser beiden Lipidaggregate, als auch zwischen diesen zur Folge hat. Man nimmt an, dass durch die Aggregation dieser an Cholesterin reichen Vesikel zu so genannten multilamelläre Vesikeln die Cholesterinnukleation eingeleitet wird (107). Schließlich kommt es bei Überschreitung der Löslichkeitsgrenze zum Ausfallen von Cholesterinmonohydratkristallen, welche die Vorstufe der Cholelithiasis darstellen.

1.4 Das Tiermodell der Gallensteinmaus

1.4.1 Bedeutung von Inzuchtmausstämmen

Die klassische Stammbaumanalyse nach Mendel untersucht einfache rezessive oder dominante Erbgänge, die auf einen einzigen Genlocus zurückzuführen sind. Bei polygenen Erkrankungen wird die genetische Analyse durch Interaktionen zwischen Genen und exogenen Faktoren bzw. zwischen den Genen untereinander (Epistase), unterschiedliche Erbgänge, genetische Heterogenität sowie inkomplette Penetranz erschwert. Um polygene Merkmale beim Menschen zu untersuchen, muss auf betroffene Geschwisterpaare oder große Stammbäume zurückgegriffen werden.

In einer solchen Situation stellen experimentelle Kreuzungen von Inzuchtmausstämmen ein geeignetes Tiermodell zur Genomanalyse dar (111). Ein Mausstamm gilt nach 20 Generationen der Geschwisterverpaarung – wenn er für alle Genloci homozygot ist – als Inzuchtmausstamm. Inzuchtmäuse als Modellorganismen umgehen das Problem der genetischen Heterogenität und eröffnen vielfältige Möglichkeiten, pathophysiologische Zusammenhänge durch genetische Veränderungen (Knock-out- und transgene Mäuse) zu überprüfen (112). Zudem bestehen die Vorteile der Maus für den Experimentator in ihrer

raschen Geschlechtsreife, zahlreichen Nachkommenschaft, sowie der Möglichkeit einer genauen Kontrolle der Umwelteinflüsse.

Die Fütterung von Inzuchtmausstämmen mit einer lithogenen Diät, die neben einem 15%-igen Fettanteil 1% Cholesterin und 0,5% Cholsäure enthielt (113), führte bei 80% der C57L/J-Inzuchtmäuse zu Gallensteinen, während andere Stämme (AKR/J, A/J, SWR/J) in deutlich geringerem Maße (0-44 %) Gallensteine entwickelten. AKR/J-Inzuchtmäuse zeigten sich gallensteinresistent. Der Gallensteinbildung in der C57L/J-Gallensteinmaus ging – wie bei Gallensteinpatienten – die Bildung von Cholesterinmonohydratkristallen in einem viskösen Mucingel, das die vergrößerten und hypomotilen Gallenblasen auskleidete, voraus. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Khanuja et al. (114).

1.4.2 Murine Gallensteingene

Für die Kartierung von Genen, die für eine polygene Erkrankung verantwortlich sind, müssen zwei Inzuchtstämme verfügbar sein: Ein Stamm, der für die Entstehung dieses Merkmals nach Einfluss von Umweltfaktoren prädisponiert ist, sowie ein resistenter Stamm. Die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen sollten quantitativ messbar sein, z.B. Blutdruck oder Serumglukose. In der ersten Kreuzung zwischen den beiden Stämmen (F1-Generation) kann der Vererbungsmodus des Merkmals ermittelt werden.

Für die Kartierung der verantwortlichen Gene werden die F1-Nachkommen untereinander gekreuzt oder mit dem prädisponierten Stamm rückgekreuzt. Die Tiere der zweiten Generation werden eine variable Ausprägung des Merkmals zeigen. Ohne Einfluss von Umweltfaktoren ist eine den Mendelschen Regeln entsprechende Aufspaltung der Allele in der F2-Generation nur dann zu beobachten, wenn lediglich ein Locus für die Ausprägung eines Merkmals verantwortlich ist. Bereits bei zwei Loci kommt es zu einer quantitativen Verteilung: die einzelnen Merkmale sind um so weniger voneinander abzugrenzen, je mehr Genloci beteiligt sind, so dass bei polygenen Erkrankungen häufig eine Normalverteilung resultiert (115).

Um die krankheitsrelevanten Gene zu identifizieren, werden die F2-Tiere hinsichtlich des quantitativen Merkmals phänotypisiert und für genetische Marker, die das gesamte Genom mit hoher Dichte (durchschnittlich 1 Marker/10-20 cM) gleichmäßig abdecken, typisiert.

Während nicht gekoppelte Genloci unabhängig voneinander in diesen F2-Tieren segregieren, werden Marker, die in der Nachbarschaft der verantwortlichen Gene liegen, gekoppelt mit dem untersuchten Merkmal vererbt. Durch spezielle statistische Analysen (z.B. Intervallkartierung) wird die signifikante Koppelung dieses Merkmals an die Marker in einer chromosomalen Region ermittelt (116). Die chromosomale Region wird dann als QTL (*quantitative trait locus*) bezeichnet, wenn ein statistischer Schwellenwert (*LOD-Score*) überschritten wird. Die durch die Genomprojekte in dieser Region bereits lokalisierten Gene können anschließend auf Expressionsunterschiede und Mutationen getestet werden, um ihre physiologische Relevanz zu belegen.

Untersuchungen an gallensteinempfindlichen Mäusen konnten zeigen, dass so genannte *Lith*-Gene die Gallensteinentstehung beeinflussen. Khanuja et al. (114) identifizierten einen Genabschnitt auf Mauschromosom 2 mit dominanter Vererbung, der regulatorisch die hepatische HMG-CoA-Reduktase auf Chromosom 13 beeinflusst. Dabei zeigte sich in der Gruppe gallensteinempfindlicher Mäuse (C57L) unter lithogener Diät keine, bei den gallensteinresistenten Stämmen (AKR) dagegen die erwartete negative Rückkopplung auf die HMG-CoA-Reduktase. Dies unterstreicht einerseits die Bedeutung der Cholesterinhypersekretion für die Cholesteringallensteinbildung, gibt aber andererseits eindeutige Hinweise auf die große Bedeutung genetischer Faktoren im Cholesterinstoffwechsel der Maus.

Durch weiterführende Untersuchungen an gallensteinempfindlichen und -resistenten Inzuchtmausstämmen wurden weitere Kandidatengene identifiziert (117). Einige dieser Gene kolokalisieren mit klassischen Kandidatengen für die Gallensteinbildung, wie der HDL-Rezeptor SR-BI auf Chromosom 5 und APOE auf Chromosom 7.

Tabelle 3: Murine Gallensteingene.

Gallenstein-Kandidatengen	Funktion bzw. Transkript	Chromosom
<i>Apoe</i>	Apolipoprotein E	7
<i>Bsep</i>	Gallensäurenexportpumpe	2
<i>Cckar</i>	Cholecystokinin A-Rezeptor	5
<i>Fabp6</i>	Ileales Gallensäuren bindendes Protein	11
<i>Gsta</i>	Glutathion-S-Transferase	9
<i>Lcat</i>	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase	8
<i>Lipc</i>	Hepatische Lipase	9
<i>Lpl</i>	Lipoproteinlipase	8
<i>Mrp2</i>	Multipezifischer Anionentransporter	19
<i>Nsdhl</i>	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	X
<i>Oct1</i>	Apikaler Kationentransporter	17
<i>Pctp</i>	Phosphatidylcholin- Transferprotein	11
<i>Scap</i>	SREBP- Cleavage-Activation-Peptide	9
<i>Srb1</i>	HDL-Rezeptor	5
<i>Srebfl</i>	Sterol Regulatory Element Binding Protein1 (SREB1)	8

Einige der aufgeführten Gallenstein-Kandidatengene lassen sich fünf so genannten lithogenen Loci (*Lith* 1-5; siehe auch 5.4, S. 61) zuordnen, welche mittels QTL-Analyse (*quantitative trait locus analysis*) identifiziert wurden (35). Die Maus verfügt über 20 Chromosomen.

1.5 Fragestellung

Für die in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurde mit gallensteinempfindlichen C57L/J- und gallensteinresistenten AKR/J-Mäusen ein etabliertes Mausmodell der Cholesteringallensteinerkrankung eingesetzt.

Ziel der Arbeit war es, die biliären Sekretionsraten für Cholesterin, Phospholipide und Gallensäuren beider Mausstämme mit der Genexpression für die Gallebildung relevanter Transportproteine der Leberplasmamembran zu korrelieren.

Im Einzelnen wurden folgende Transporter der kanalikulären Plasmamembran untersucht:

- Die Gallensäurenexportpumpe BSEP
- Der Anionentransporter MRP2
- Der Phospholipidtransporter MDR2

Die untersuchten Transporter der sinusoidalen Plasmamembran waren im Einzelnen:

- Der Gallensäuretransporter NTCP1
- Der Anionentransporter OATP1
- Der Kationentransporter OCT1

2 Material

2.1 Geräte

Analysenwaage 1265 MP	Sartorius, Göttingen
Biofuge pico	Heraeus instruments GmbH, Hamburg
Blot Transfer System 20-25 und 11-14	GibcoBRL, Karlsruhe
Chromatographiesäule Superose TM 6	Bio-Rad, München
Easy-Cast Electrophoresis Systeme	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Penguin TM , Doppelgelsystem P8DS	Peqlab, Erlangen
Gel Air Dryer	Bio-Rad, München
Gelgießstand Joey TM JGC-4	Peqlab, Erlangen
Gewebe-Handhomogenisator Wheaton-Potter- Elvehjem	Neolab, Heidelberg
GS-700 Imaging Densitometer	Bio-Rad, München
Infrarotlampe Inframed Type 810	Schott, Mainz
Inkubator	WTB Binder, Tuttlingen
Kaltlichtlampe KL 750	Schott, Mainz
Lab Therm zu Lab Shaker	B.Braun, Melsungen
Milton Roy Spectronic 1001 plus	Omnilab, Hamburg
Minifuge RF	Heraeus instruments GmbH, Hamburg
Peltier Thermal Cycler PTC 200	MJ Research Inc., Massachusetts, USA
Power Pac 200	Bio-Rad, München
Power Pac 3000	Bio-Rad, München
RED ROLLER II Hybridization Oven	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Rotor Sorvall SM-24	Du Pont Nemours GmbH, Bad Nauheim
Rotor Sorvall T-1270	Du Pont Nemours GmbH, Bad Nauheim
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
Sorvall RC 28S Zentrifuge	Du Pont Nemours GmbH, Bad Nauheim
Sorvall Ultrazentrifuge OTD-C	Du Pont Nemours GmbH, Bad Nauheim
T8.01 Netzgerät	IKA Labortechnik, Staufen
Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech, Freiburg
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Vacman Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Heidelberg

2.2 Testkits

Cholesterin-20 Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gallensäure Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
GeneClean-II Kit	Bio 101, Vista, USA
Phospholipid Kit	Wako Chemicals, Neuss
Protein Assay	Bio-Rad, München
Random Primer Labeling Kit	GibcoBRL, Karlsruhe
Super-Script II Pre-amplification System	GibcoBRL, Karlsruhe
TA-Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Westernblot chemiluminescence reagents	NEN Life Science Products, Boston, USA
Wizard Plus Mini-/Maxiprep DNA Purification System	Promega, Mannheim

2.3 Sekundärantikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG	DAKO Chemicals, Hamburg
Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG	DAKO Chemicals, Hamburg

2.4 Chemikalien und sonstige Reagentien

2-Mercaptoethanol	Gibco Laboratories, Eggenstein
5-Cholestan-3-ol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Acrylamid/bis (30%)	Bio-Rad, München
Agarose	Difco Laboratories, Augsburg
Albumin, Bovine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto-peptone	Difco Laboratories, Augsburg
Bacto-yeast extract	Difco Laboratories, Augsburg
Bakterienfilter, rund, 0,2 µm, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Bis-Trimethylsilyl-trifluoroacetamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bromphenol blue	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Denhardts Solution	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Molekular Weight Marker II/ VI	Boehringer, Mannheim
Ethanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gel Blotting Papier	Schleicher und Schüll, Dassel

Gene Screen Plus Membran	NEN Life Science Products, Boston, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Herring Sperm DNA, DNA Typing Grade	GibcoBRL, Karlsruhe
Intramedic Polyethylene Tubing 0,61 mm	Clay Adams
Isofluran	Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen
Luria-Bertani-Agar	GibcoBRL, Karlsruhe
Methanol	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt
Molecular Weight Marker SDS 70L	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Morpholino propanesulfonic acid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Nitrocellulose (0,45 µm)	Bio-Rad, München
QuantumRNA 18S Internal Standards	Ambion, Wiesbaden
RNA Molecular Weight Marker I	Boehringer, Mannheim
SDS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Skim milk	Difco Laboratories, Augsburg
Standardfutter Altromin 1314	Altromin GmbH, Lage
Sukrose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Taq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TRIzol Reagenz	Life Technology GmbH, Karlsruhe
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.5 Tiere

AKR/J	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
C57L/J	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

Tierversuchsantrag: Aktenzeichen X330a-72241.122-4(57-7/97), 19. Dezember 1997.

2.6 Software

Adobe®Acrobat® 5.0	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Microsoft® Excel	Microsoft Corporation, Mountain View, CA, USA
Microsoft® Internet Explorer	Microsoft Corporation, Mountain View, CA, USA.
Microsoft® PowerPoint	Microsoft Corporation, Mountain View, CA, USA
Microsoft® Word	Microsoft Corporation, Mountain View, CA, USA
Molecular Analyst Version 7.0	Bio-Rad, München
SigmaStat Version 2.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
Vector NT 4.0 Deluxe	Infor Max Inc., N. Bethesda, MD, USA

3 Methoden

3.1 Tierhaltung und Standarddiät

Die dargestellten Untersuchungen zum biliären Lipidstoffwechsel und den molekularen Mechanismen der Cholesteringallensteinbildung wurden an einem etablierten Mausmodell durchgeführt (114). Die Tiere der Inzuchtmausstämme AKR/J und C57L/J stammten ursprünglich aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) und wurden zur Anzucht unserer eigenen Mauskolonie herangezogen. Männliche Tiere beider Stämme im Alter von 10-12 Wochen erhielten über einen Zeitraum von 4 Wochen entweder, wie bereits zuvor, eine cholesterinarme Kontrolldiät (Standardfutter Altromin 1314) mit einem Cholesteringehalt $< 0,02\%$, oder eine lithogene Diät (ICN, Eschwege). Letztere enthielt 15% Fett, 1% Cholesterin sowie 0,5% Cholsäure zur Steigerung der intestinalen Cholesterinabsorption (118). Unter lithogener Diät entwickelten während dieses Zeitraumes C57L/J- (gallensteinempfindlich) nicht aber AKR/J-Tiere (gallensteinresistent) Gallensteine. Cholestase und relevante Erkrankungen der Leber wurden mittels Leberhistologie und Bestimmung hepatischer Enzyme im Serum ausgeschlossen. Die Tiere wurden in einem temperaturkontrollierten Raum (21-23 °C) mit gleich bleibendem Tag-Nacht-Zyklus (Licht von 6:00 bis 18:00 Uhr) und freiem Zugang zu Wasser und jeweiligem Futter gehalten. Eine artgerechte Tierhaltung war dabei zu jedem Zeitpunkt gewährleistet.

3.2 Operationstechnik

Nach Abschluss der 28-tägigen Fütterungsperiode wurden am Morgen des Operationstages jeweils 6 Tiere eines Stammes, die entweder eine lithogene Diät oder weiterhin cholesterinarme Kontrolldiät erhalten hatten, gewogen und mittels intraperitonealer Injektion von Pentobarbital (35 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Die Laparotomie erfolgte über einen mittleren Oberbauchschnitt unter keimarmen Bedingungen. Leber und Gallenblase wurden genau inspiziert, wobei sich die bei einem Teil der Tiere vorhandenen

Gallensteine gut durch die Gallenblasenwand abzeichneten und somit problemlos für das bloße Auge erkennbar waren. Im Anschluss wurde nach Ligation des Ductus cysticus und Cholezystektomie der Ductus choledochus intubiert (PE-10 Polyethylenkatheter, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm) und hepatische Galle über einen Zeitraum von einer Stunde gesammelt. Nach Bestimmung von Gewicht und Volumen wurde die so gewonnene Galle bei -20 °C gelagert. Die operativ entfernte Gallenblase wurde umgehend eröffnet, um auch eine Cholelithiasis geringen Ausmaßes auszuschließen bzw. zu erkennen. Während des gesamten Eingriffs wurden den Tieren zur Stabilisierung des Flüssigkeitshaushaltes geringe Mengen 0,9%-iger Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht und ein Abfall der Körpertemperatur mittels Wärmelampe verhindert. Zudem wurde, sofern erforderlich, die Narkose mittels Isofluran aufrechterhalten. Schließlich wurde die Leber der Tiere entnommen, gewogen, und ein kleiner Anteil davon (ca. 150-250 mg) mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolation von Gesamt-RNA (siehe 3.5.1) bei -80 °C gelagert. Das restliche Lebergewebe von jeweils 4 Tieren wurde gepoolt und zur Isolation von Plasmamembranen (siehe 3.6.1) herangezogen.

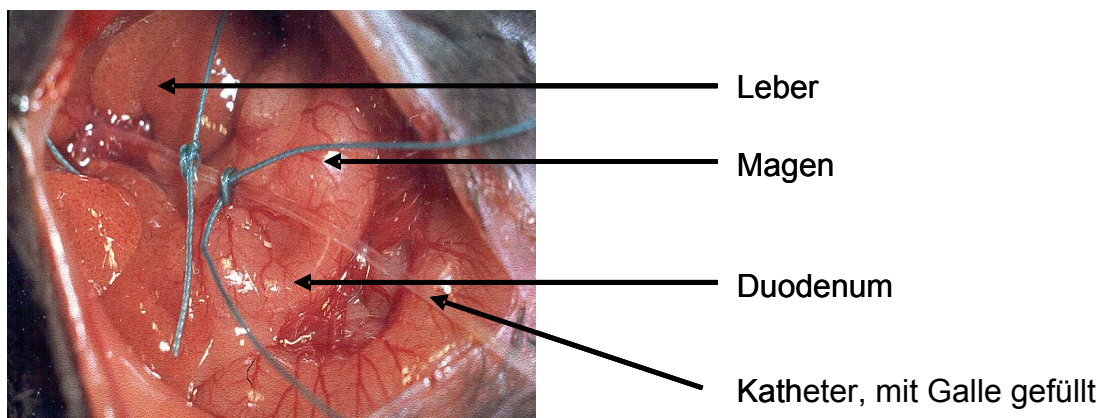


Abbildung 4: Operationssitus.

3.3 Bestimmung des hepatischen Gesamtcholesteringehaltes

Zur Bestimmung des hepatischen Gesamtcholesteringehaltes wurden die Lipide aus je 100 mg Lebergewebe extrahiert (119). Hierzu wurde das Lebergewebe in 1 ml Homogenisationspuffer (Zusammensetzung: 0,01 M Tris, pH 7,0; 0,25 M Sukrose) mittels elektrischem Handhomogenisator auf Eis homogenisiert. Dem Homogenat (1 ml) wurden Chloroform und Methanol zugesetzt, wobei ein Verhältnis von 0,8 : 1 : 2 eingehalten wurde. Anschließend wurde für 15 s geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde erneut mit je 1 ml Chloroform und 0,15 M NaCl-Lösung versetzt, gemischt und 5 min bei 2000 Umin^{-1} und $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Es bildete sich eine Dreischichtung bestehend aus einer oberen wässrigen Phase, einer am Boden befindlichen Chloroformphase, welche die Lipide einschließlich des Cholesterins enthielt, und einer Proteininterphase. Die Chloroformphase wurde in ein neues, gläsernes Reaktionsgefäß überführt und das Chloroform eingedampft. Durch kurzes Zentrifugieren sammelten sich die Lipide am Boden. Nach Aufnahme in 200 μl Isopropanol wurden Aliquote unmittelbar zur Bestimmung des Gesamtcholesterins mittels eines enzymatischen Testkits (Cholesterin-20) herangezogen.

3.4 Analyse der hepatischen Galle

3.4.1 Konzentrationsbestimmung für Cholesterin, Phospholipide und Gallensäuren

Die Bestimmung der Cholesterin-, Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration in der über eine Stunde abgeleiteten hepatischen Galle erfolgte in Aliquoten von 5-20 μl . Hierzu kamen an anderer Stelle ausführlich beschriebene Standardmethoden (84; 100) unter Verwendung enzymatischer Kits zum Einsatz.

3.4.2 Gallefluss und Lipidsekretionsraten

Um den Gallefluss [$\mu\text{l/h}$] zu ermitteln wurde die über eine Stunde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgeleitete Galle ausgewogen. Es wurde eine Dichte der Galle von 1 g/ml angenommen und auf ein Körpergewicht von 1 kg bezogen. Somit ergab sich die Einheit [$\mu\text{l/h}\times\text{kg}$]. Unter Berücksichtigung von Cholesterin-, Phospholipid- bzw. Gallensäurenkonzentration [$\mu\text{mol}/\mu\text{l}$] ließen sich mit Hilfe des Galleflusses die jeweiligen Lipidsekretionsraten [$\mu\text{mol/h}\times\text{kg}$] berechnen.

3.5 Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine molekularbiologische Methode zum qualitativen und, bei entsprechendem Einsatz, semiquantitativen Nachweis der Expression von mRNA. Durch sie ist es möglich, selbst kleinste Mengen mRNA selektiv zu vervielfältigen und nachzuweisen. Dazu wird die zuvor isolierte RNA (siehe auch 3.5.1) zunächst als Matrize zur Reversen Transkription (RT) komplementärer DNA (cDNA) benutzt (siehe auch 3.5.3). Im nächsten Schritt wird unter Verwendung von sequenzspezifischen Primermolekülen die nachzuweisende Region der cDNA selektiv amplifiziert (siehe auch 3.5.4). Um eine semiquantitative Aussage bezüglich der Expression der interessierenden mRNA treffen zu können ist es möglich, im selben PCR-Ansatz ein Kontrollgen mit vergleichsweise konstanter Expression zu amplifizieren. Anschließend werden die amplifizierten PCR-Produkte im Agarosegel durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung aufgetrennt bzw. identifiziert. Über die densitometrische Auswertung der fluoreszierenden Banden kann eine semiquantitative Aussage zur mRNA-Expression des untersuchten Genes getroffen werden (siehe auch 3.5.5).

Ein Zyklus einer PCR läuft in drei Reaktionsschritten ab. Der erste Schritt besteht in der bei 95 °C ablaufenden Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, die im weiteren Reaktionsverlauf als Matrize dienen.

Im zweiten Schritt hybridisieren die beiden Primer mit dem jeweiligen Matrizenstrang. Eine zu hohe Hybridisierungstemperatur würde das Anheften der Primer verhindern, eine

zu niedrige zu Fehlpaarungen führen. Die optimale Temperatur hängt von der Sequenz und Länge der spezifischen Primer ab. Die Länge des Primers ist so zu wählen, dass nur eine Anheftungsstelle im Genom in Frage kommt.

Der dritte Schritt besteht in der Kettenverlängerung (DNA-Synthese) und findet bei 72 °C und damit in Nähe des Temperaturoptimums der hitzestabilen Taq-Polymerase (DNA-Polymerase I, isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) statt. Mehrfache Wiederholung (Richtwert: 20-40 Zyklen) führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der zwischen den beiden Primern gelegenen DNA-Region, welche Teil des gesuchten Zielgenes ist. Somit wird ein Rückschluss auf dessen Expression möglich.

Die PCR ist ein äußerst empfindliches Verfahren. Bei allen Arbeitsschritten sind gewaschene Einmal-Latexhandschuhe zu tragen, um eine Kontamination des PCR-Ansatzes mit Handschuhpuder, das die magnesiumabhängige Taq-Polymerase hemmen kann, zu vermeiden. Um einer möglichen Kontamination anderer Ansätze durch Aerosolbildung vorzubeugen, sollten beim Pipettieren gestopfte Pipettenspitzen verwendet werden. Alle Ansätze müssen auf Eis pipettiert werden, um die PCR einheitlich zu starten und somit die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte zu vermeiden. Zwischen Prä-PCR-Labor (RT-Ansatz und PCR-Ansatz) und Post-PCR-Labor (Amplifikation und Gelelektrophorese) ist eine strikte räumliche Trennung einzuhalten, um die Kontaminationsgefahr der PCR durch bereits amplifizierte PCR-Produkte zu minimieren.

3.5.1 Isolierung hepatischer Gesamt-RNA

Zumal RNA leicht durch RNasen zerstört wird, müssen sämtliche Arbeitsschritte unter streng RNase-freien Bedingungen durchgeführt werden. Daher wurden alle verwendeten Lösungen mit 0,02% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, welches zu einer unspezifischen Alkylierung und damit weitestgehenden Inaktivierung der RNasen führt. Die verwendeten Plastik- und Glasmaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw. für mindestens 6 h auf 160 °C erhitzt. Bei allen Arbeiten wurden Einmal-Latexhandschuhe getragen.

Die Isolierung der RNA aus jeweils ca. 100 mg Lebergewebe von 6 Tieren eines jeden Mausstammes, welche über 28 Tage entweder eine cholesterinreiche lithogene Diät oder Kontrolldiät erhalten hatten, für den Einsatz in der RT-PCR erfolgte mittels TRIzol auf Basis der Methode nach Chomczynski et al. (120). Dabei dienen das im Reagenz enthaltene Phenol und Guanidin-Isothiocyanat dem Schutz der RNA vor Degradation durch RNasen. Sämtliche im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte fanden unter Eiskühlung statt. Zunächst wurde das Lebergewebe (ca. 100 mg) in einem 10 ml Plastikröhrchen, welches 2 ml TRIzol-Reagenz enthielt, homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 0,4 ml Chloroform zugesetzt, gevortext (15 s) und erneut 3 min inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (12000g, 4 °C für 15 min) die Phasentrennung erreicht, wobei die obere (farblose) Phase die RNA enthielt, während sich in der unteren (rötlichen) Phase Phenol und Chloroform sammelten (ca. 1/3 des Gesamtvolumens). Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und zur Präzipitation der RNA mit 1 ml Isopropanol versetzt und kurz gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation pelletierten wir die RNA durch Zentrifugation (12000g, 4 °C für 10 min) und dekantierten den Überstand vorsichtig ab. Nach Waschung mit 2 ml 75%-igem Ethanol folgte eine dritte Zentrifugation (7500g, 4 °C für 5 min). Der resultierende Überstand wurde verworfen. Die so gereinigte Probe wurde in 100 µl DEPC-Wasser gelöst und nach photometrischer Bestimmung von RNA-Konzentration und Reinheitsgrad bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren bzw. umgehend weiterverarbeitet.

3.5.2 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Durch spektralphotometrische Messung der optischen Dichte lassen sich sowohl die Menge als auch die Reinheit der zuvor isolierten RNA quantifizieren. Viele Biomoleküle absorbieren Licht bei charakteristischen Wellenlängen. Während Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm ein Maximum Ihrer Lichtabsorption aufweisen, befindet sich das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Die absolute Extinktion der Lösung gegen Wasser bei 260 nm ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz linear vom RNA-Gehalt abhängig. Die photometrische Bestimmung (Ultrospec 1000) der Extinktion erfolgte in

einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm, wobei gegen ddH₂O-DEPC gemessen wurde. Hierzu wurde 1 µl RNA-Probe mit 199 µl ddH₂O-DEPC verdünnt.

Der Quotient beider Extinktionswerte stellt ein Maß für die Kontamination der Probe mit Proteinen dar. Der Quotient (260 nm/280 nm) lag bei den für die weiteren Experimente verwendeten RNA-Proben zwischen 1,7 und 2,0, so dass nur RNA-Präparationen hohen Reinheitsgrades zum Einsatz kamen.

3.5.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Bei der Reversen Transkription wird die im Ansatz vorhandene RNA durch das Enzym Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben, wodurch der umgekehrte Weg der Genexpression in der Zelle beschritten wird. Der cDNA-Herstellung diente das *SuperScript II Preamplification System Kit (Gibco) – random hexamer preparation*. Die cDNA-Synthese wurde durch das Enzym *SuperScript II Rnase H Reverse Transcriptase* katalysiert. Die RNase H-Aktivität des Enzyms wurde ausgeschaltet, um ein Maximum an cDNA mit hoher Kettenlänge zu erzielen. Als Primer kamen hierbei so genannte *random hexamers* zum Einsatz, welche aufgrund Ihrer vergleichsweise geringen Spezifität im Vergleich mit oligo dT-Oligonukleotiden eine praktisch vollständige RNA-Kopie liefern. Die Angaben des Herstellers wurden strikt befolgt.

Hepatische Gesamt-RNA (7,5 µg), *random hexamers* (2 µl; 50 ng/µl) und DEPC-H₂O (20 µl) wurden in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und im Anschluss auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von je 4 µl PCR-Puffer, MgCl₂ (25 mM), dNTP-Mix (10 mM) und DTT (0,1 M) wurde für 5 min bei 25 °C inkubiert. Nun folgte die Zugabe der *SuperScript II Rnase H Reverse Transcriptase* (2 µl, entsprechend 400 Einheiten). Nach zwei Inkubationsschritten (10 min bei 25 °C und 50 min bei 42 °C) wurde der Reaktionszyklus durch Erhitzen auf 70 °C über 15 min beendet. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch kurz auf Eis gekühlt und je Ansatz 1 µl RNaseH hinzugefügt und für 20 min auf 37 °C erwärmt. Der letztgenannte Schritt hatte die Entfernung des RNA-Matrizenstranges und damit die Erhöhung der Sensitivität der nachfolgenden PCR zum Ziel. Die so präparierte cDNA wurde zur sofortigen Amplifikation des Zielfragmentes genutzt oder für maximal 7 Tage bei –20 °C aufbewahrt.

3.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dem Design der Primer diente das Programm Vector NT 4.0 Deluxe. Die Nukleotidsequenzen der Zielgene wurden der Genbank® entnommen. Die verwendeten Primerpaare und die jeweilige Zugangsnummer der Genbank sind in Tabelle 4 (S. 37) aufgeführt.

Zunächst wurde für jedes Fragment die Zyklenzahl ermittelt, bei der die Amplifizierung in einem linearen Bereich ablief. Diese lag jeweils zwischen 20 und 40 Zyklen. Der für das jeweilige Fragment optimale Bereich wurde nach Ethidiumbromid-Agarosegelelektrophorese densitometrisch bestimmt. Als Hybridisierungstemperatur wurde die im jeweiligen Primer-Synthese-Report empfohlene Temperatur gewählt. Als interner Standard wurden Fragmente gewählt, deren densitometrisch ermittelte Bandenintensität unter den jeweiligen Bedingungen ebenfalls im linearen Bereich lag. Zum Einsatz kam entweder das Primerpaar der Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) mit einer Fragmentgröße von 586 bp, oder ribosomale RNA (*QuantumRNA 18S Internal Standards*) bei Verwendung von 18S-Primern (Fragmentgröße 324 bp, *18S-Mix Alternate Standard* oder 488bp, *18s-Mix classic*) unter Zugabe eines so genannten *18S-competimers*. Den Anweisungen des Herstellers folgend wurde das passende Verhältnis (1 : 10, 1 : 5 oder 3 : 10) von Primer und *competimer* jeweils experimentell ermittelt, um die erhaltene Bandenintensität an die des Zielfragmentes anzugleichen. Der *18S-competimer* weist ein modifiziertes 3'-Ende auf, welches die DNA-Polymerase blockiert. Auf diese Weise wird das Ausmaß der Amplifizierung reduziert. Die PCR erfolgte in einem 50 µl-Ansatz bestehend aus PCR-Puffer, MgCl₂ (25 mM), dNTP-Mix (10 mM), Primerpaar des jeweiligen Standards, Primerpaar des Zielgenes, 0,5 µl (2,5 Einheiten) Taq-DNA-Polymerase und 4 µl cDNA-Präparation.

Die ermittelten PCR-Bedingungen lauteten wie folgt: **Bsep**: 95 °C für 5 min, 95 °C für 30 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 30 s; Zyklenzahl: 29; terminale Elongation bei 72 °C für 10 min. **Mrp2**: 94 °C für 5 min, 94 °C für 1 min, 55 °C für 1 min, 72 °C für 2 min; Zyklenzahl: 23; terminale Elongation bei 72 °C für 10 min. **Mdr2**: 95 °C für 5 min, 95 °C für 30 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 30 s; Zyklenzahl: 29; terminale Elongation bei 72 °C für 10 min. **Ntcp1**: 95 °C für 5 min, 95 °C für 30 s, 57 °C für 30 s, 72°C für 30 s; Zyklenzahl: 21; terminale Elongation bei 72 °C für 10 min. **Oatp1**: 95 °C für 5 min, 95 °C für 1 min,

55 °C für 1 min, 72 °C für 1 min; Zyklenzahl: 22; terminale Elongation bei 72 °C für 10 min. **Oct1**: 94 °C für 2 min, 94 °C für 1 min, 60 °C für 1 min, 72 °C für 1 min; Zyklenzahl: 27; terminale Elongation bei 72 °C für 10 min. **Gapdh**: Bedingungen je nach Zielfragment wechselnd.

Tabelle 4: Sequenzen der eingesetzten PCR-Primer.

Gen; Fragment- länge (bp)	Primer- paar	Primersequenz	Genbank® Accession no.
<i>Bsep</i> (<i>Abcb11</i>); 414	<i>sense</i>	5'-GAGGTTACTTAATAGCCTACG	AF133903
	<i>antisense</i>	5'-CATCTATCATCACAGTTCCC	
<i>Mrp2</i> (<i>Abcc2</i>); 277	<i>sense</i>	5'-CCTAGACAGCGGCAAGATTGT	AF227274
	<i>antisense</i>	5'-TTACAGGGTGGTTGAGACCAG	
<i>Mdr2</i> (<i>Abcb4</i>); 138	<i>sense</i>	5'-AAGAATTTGAAGTTGAGCTAAGTGA	NM_008830
	<i>antisense</i>	5'-TGGTTTCCACATCCAGCCTAT	
<i>Ntcp1</i> (<i>Slc10a1</i>); 492	<i>sense</i>	5'-GGTTCTCATTCTTGCGCCA	U95131
	<i>antisense</i>	5'-GCATCTTCTGTTGCAGCAGC	
<i>Oatp1</i> (<i>Slc21a1</i>), 450	<i>sense</i>	5'-AATGCCCAAGAGACAAATGC	AB031959
	<i>antisense</i>	5'-CAGGTTCTGGGTTTCCTTCA	
<i>Oct1</i> (<i>Slc22a1</i>); 589	<i>sense</i>	5'-GCGGTGTGGCTGGAGCCCGGCAGAGGA	AF010259
	<i>antisense</i>	5'-GGCCACCCAGCAAGCCCCACTAGCC	
<i>Gapdh</i> ; 576	<i>sense</i>	5'-CCATCATCATCTTCCAGGAG	NM_008084
	<i>antisense</i>	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG	

Die verwendeten Gensymbole folgen der Standardnomenklatur für Mausgene des "International Committee on Standardized Genetic Nomenclature in Mice", wobei die Angaben in Klammern der neuen Nomenklatur entsprechen. Die Internetadresse der Genbank lautet: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/.

3.5.5 Quantifizierung des PCR-Produktes

Nach Abschluß der PCR wurden jeweils 16 µl des PCR-Produktes für 5 min bei 65 °C denaturiert und unter Zugabe von je 2 µl 6-fach konzentrierter Färbelösung in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, welches mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt war. Das Gel wurde fotografiert und das Bild mit Hilfe des GS-700 Densitometers der Firma Bio-Rad unter Verwendung der Software *Molecular Analyst* eingescannt und ausgewertet. Der Quotient aus dem Signal der Bande des Zielgenes und der des internen Standards ergab einen relativen Zahlenwert, welcher eine semiquantitative Aussage zur mRNA-Expression des gesuchten Genabschnittes ermöglichte.

3.6 Isolation von Plasmamembranen und Westernblot

3.6.1 Isolation hepatischer Plasmamembranen, Bestimmung der Proteinkonzentration

Jeweils 4 Tiere eines Maustammes, welche über 28 Tage entweder eine cholesterinreiche lithogene Diät oder Kontrolldiät erhalten hatten, wurden ab 18:00 Uhr des Vortages nüchtern gelassen. Nach intraperitonealer Betäubung mittels Pentobarbital (35 mg/kg KG) und einstündiger Ableitung hepatischer Galle wurden die Lebern der Tiere entnommen und umgehend in eisgekühlte Pufferlösung (1 mM NaHCO₃/ pH 7,4 mit 17 mg/l PMSF = Phenylmethylsulfonyl-Fluorid) getaucht, kurz über sterilem Filterpapier abgetropft und gewogen. Ein etwa 250 mg schweres Fragment wurde in einem kältestabilen Gefäß mit Schraubverschluss umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C unter anderem für die Isolierung hepatischer Gesamt-RNA konserviert, falls letztere nicht gleich im Anschluss wie oben beschrieben (3.5.1) erfolgte. Das verbleibende Lebergewebe von jeweils 4 Tieren wurde gepoolt und zur Isolation von Plasmamembranen mit Anreicherung sinusoidaler respektive kanalikulärer Membranfraktionen herangezogen (121; 122). Es wurden pro Gruppe 4 Membranpräparationen durchgeführt. Hierzu wurde das gepoolte Lebergewebe von jeweils 4 Tieren bei 4 °C klein geschnitten, in 25 ml Pufferlösung (s.o.) mittels Handhomogenisator nach Potter homogenisiert. Das Homogenat wurde durch eine Lage

einer sterilen Mullkomresse filtriert und auf ein Volumen von 35 ml verdünnt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1500g und 4 °C wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 35 ml NaHCO₃-Puffer resuspendiert und bei 1000g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Letztgenannter Zentrifugationsschritt wurde zweimal wiederholt. Das verbleibende Pellet wurde in 3,6 ml NaHCO₃-Puffer resuspendiert und 10 ml 62,2%-ige Sukrose (Angaben je in Gewichtsprozent) unter leichtem Rühren zugegeben. Diese Suspension wurde gleichmäßig auf zwei Gefäße zur Ultrazentrifugation verteilt und überschichtet mit drei Schichten Sukrose fallender Konzentration (6 ml/ 44,7%; 8 ml/ 40,8%; 6 ml/ 37%). Zur vollständigen Füllung der Zentrifugationsgefäße wurde 0,25 M Sukrose zugegeben. Es folgte eine Gradientenzentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 90000g für 1,5 h. Die mit Plasmamembranen angereicherten Banden (je oberhalb der 40,8%- und 44,7%-igen Sukroseschicht) wurden gewonnen, jeweils gepoolt und um den Faktor 4 mit Puffer verdünnt. Anschließend Zentrifugation bei 7500g für 15 min und Resuspension des Pellets in 40 ml NaHCO₃-Puffer mit einem abschließenden Zentrifugationsschritt bei 2500g für 10 min. Das so gewonnene Membranpellet wurde mit einem Puffer aus 300 mM Sukrose, 0,2 mM CaCl₂, 10 mM MgSO₄ und 10 mM Hepes (pH 7,5) resuspendiert und mittels handelsüblicher Injektionsnadel (G1) und Spritze homogenisiert (50x). Die Membranpräparation wurde umgehend auf flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (123) mit Hilfe eines Protein Assay Kit der Firma Bio-Rad. Diesem liegt das Prinzip zugrunde, dass sich das Absorptionsmaximum in saurer Lösung, welche *Coomassie Brilliant Blue G-250* enthält, nach Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm ändert. Dabei steigt der Extinktionskoeffizient linear zur Proteinkonzentration. Zur Erstellung einer Standardkurve diente Rinderserumalbumin-Lösung. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen für Standard und Membranpräparation durchgeführt.

Um eine Aussage bezüglich des Anreicherungsgrades an Proteinen der sinusoidalen respektive kanalikulären Plasmamembranen in den jeweiligen Membranpräparationen zu erhalten, wurde zur Validierung der Isolierungsmethode die Enzymaktivität der Markerenzyme Na⁺/K⁺-ATPase (sinusoidale Membran) bzw. alkalische Phosphatase (AP, kanalikuläre Membran) bestimmt. Die Werte wurden zu den entsprechenden Aktivitäten im Homogenat ins Verhältnis gesetzt.

Es zeigten sich für sämtliche Membranpräparationen Anreicherungen der Markerenzyme auf das 11 bis 14-fache, wie bereits vorbeschrieben (121).

3.6.2 SDS-PAGE und Immunoblotting

Gleiche Ausgangsmengen an Protein (50 bis 100 µg) wurden mittels Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 10-12%-igen Gel aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Durch Färbung der Membran mit Ponceau S und anschließender Waschung mit ddH₂O (1 min) wurde die Effizienz (Gleichmäßigkeit) des Transfers gesichert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran über 3 h mit 5% (Gewichtsprozent) fettfreier Milch und 0,1% (Volumenprozent) TWEEN® 20 in TBS (*Tris-buffered saline*, pH 7,4) geblockt. Zur Detektion des Zielantigens wurde der spezifische Primäantikörper (Tabelle 5, S. 41) in entsprechender Verdünnung zugegeben, welche jeweils in Vorversuchen ermittelt wurde. Nach 1- bis 2-stündiger Inkubation wurde die Membran in TBS gewaschen (1 h) und erneut mit 1% Milch in TBS geblockt (1 h). Es folgte die Zugabe des enzymgekoppelten Sekundäantikörpers (siehe 3.6.3) in 50000-facher Verdünnung mit TBS unter Verwendung eines *goat-anti-rabbit* bzw. *rabbit-anti-goat* Antikörpers. Die Inkubationszeit betrug 1 h.

Tabelle 5: Primärantikörper.

Antikörper	Besonderheit	Verdün- nung	Bezugsquelle
Anti-NTCP1	polyklonal	1:1000	B. Stieger, Universitätsspital Zürich, Schweiz
Anti-OATP1	polyklonal	1:5000	B. Stieger, Universitätsspital Zürich, Schweiz
Anti-MDR2	polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-BSEP	polyklonal	1:500	R.M. Green, University of Chicago, IL, USA
Anti-DPP IV	polyklonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Na/K-ATPase-1	monoklonal	1:1000	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA

3.6.3 Visualisierung und Quantifizierung

Die Visualisierung der gebundenen Primärantikörper erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion, in der das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) durch Katalisation der Oxidation von Luminol eine Lichtemission mit einer Wellenlänge von 428 nm hervorruft. Dabei waren die sekundären Antikörper mit HRP markiert und ermöglichten somit die „indirekte“ Visualisierung des Zielantigens. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran kurz gewaschen. Anschließend kam das *Westernblot Chemiluminescence-Kit* der Firma NEN zum Einsatz, wobei die Herstellerempfehlungen strikt befolgt wurden.

Je gleiche Volumina an *Chemiluminescence-Reagent 1* (Luminol) und 2 (oxidierendes Reagenz) wurden unmittelbar vor Platzierung der Membran auf dem Röntgenfilm auf die Membran gegeben und für genau eine Minute inkubiert. Die Lichtemission konnte auf

Kodak *X-OMAT Blue Autoradiography* Filmen dargestellt und anschließend densitometrisch quantifiziert werden. Die optimalen Expositionszeiten wurden individuell ermittelt.

Die Blots wurden jeweils *gestrippt* und mit einem weiteren spezifischen Antikörper (Sinusoidale Membran: Anti-Na/K-ATPase- α -1; Kanalikuläre Membran: Anti-DPP IV) inkubiert, um Variationen in der Proteinanreicherung der entsprechenden Membranpräparationen zu berücksichtigen.

3.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung kam SigmaStat Version 2.0 mit dem *Student's t-test* zur Anwendung. Die Ergebnisse wurden in Form des arithmetischen Mittels \pm 1 Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Bei einem $p < 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen.

4 Ergebnisse

4.1 Körper- und Lebergewicht, Auftreten von Gallensteinen

Nach 28-tägiger Fütterung einer lithogenen Diät entwickelten 5 von 6 untersuchten Tieren des Stammes C57L Gallensteine, welche makroskopisch gut durch die Gallenblasenwand erkennbar waren. Demgegenüber entwickelte keines der AKR-Tiere Gallensteine. Bei keinem der Tiere zeigten sich für das bloße Auge erkennbare Steine im Ductus choledochus. Die Veränderungen des Körper- und Lebergewichtes ist Tabelle 6 zu entnehmen. Hierbei sollen folgende Punkte hervorgehoben werden:

1. Makroskopisch war das Erscheinungsbild der Lebern aller Tiere unter Kontrolldiät identisch.
2. Demgegenüber waren die Lebern der AKR-Tiere unter lithogener Diät zum einen stärker vergrößert als bei den C57L-Tieren (Lebergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe 42% höher, $p < 0,01$. Lediglich 33%-ige Zunahme in der gallensteinempfindlichen Gruppe, $p > 0,05$).
3. Zum anderen zeigte sich in mittels Hämatoxylin-Eosin gefärbten Leberschnitten ausschließlich bei den AKR-Tieren nach lithogener Diät eine geringgradige Steatose.

Tabelle 6: Diät, Gallensteinentstehung, Körper- und Lebergewicht.

Mausstamm	Diät (28 Tage)	Tiere/Gruppe	Cholelithiasis	Körpergew. (g)	Lebergew. (g)
AKR	Kontrolldiät	6	0	27 ± 1,0	1,2 ± 0,06
	Lithogene Diät	6	0	35 ± 1,0*	1,7 ± 0,20*
C57L	Kontrolldiät	6	0	24 ± 0,5	0,9 ± 0,06
	Lithogene Diät	6	5	26 ± 1,0	1,2 ± 0,03

Die Tiere waren ab 18:00 Uhr des Tages vor Laparotomie nüchtern. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± 1SEM. * $p < 0,01$ im Vergleich zur Gruppe unter Kontrolldiät.

4.2 Hepatisches Gesamtcholesterin

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen war der Gesamtcholesteringehalt [mg/g Lebergewebe] in den Lebern der AKR-Tiere mit $4,0 \pm 0,5$ gegenüber $2,7 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) höher als bei den C57L-Tieren (Abbildung 5). Erwartungsgemäß stieg der Gehalt an hepatischem Gesamtcholesterin in beiden Gruppen unter cholesterinreicher Diät auf Werte von $12,3 \pm 1,5$ ($p < 0,01$; AKR-Stamm) bzw. $9,2 \pm 1,7$ ($p < 0,05$; C57L-Stamm) an.

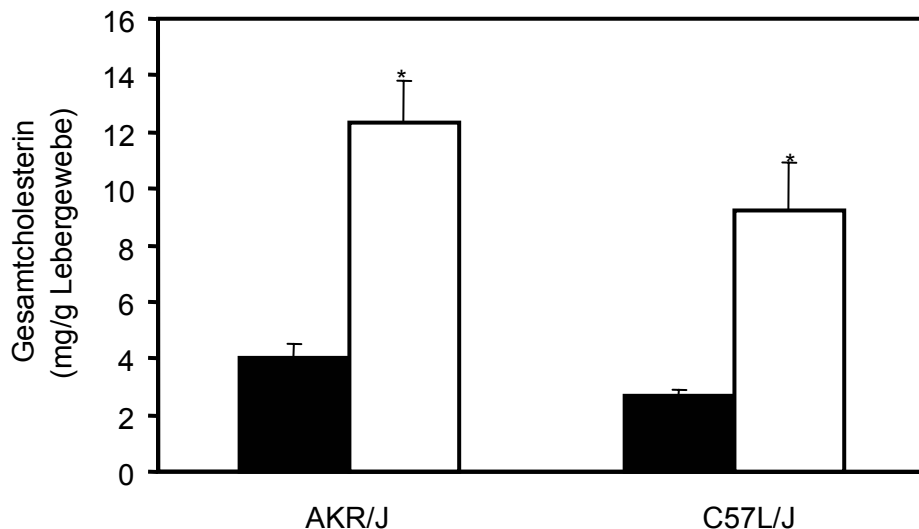


Abbildung 5: Hepatische Gesamtcholesterinkonzentration.

Dargestellt ist der hepatische Gesamtcholesteringehalt für gallensteinresistente AKR- (linkes Säulenpaar) und gallensteinempfindliche C57L-Mäuse (rechtes Säulenpaar) unter Kontrolldiät (■schwarz) und nach 28-tägiger Fütterung einer lithogenen Diät (□weiß). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD ($n = 6$ Tiere pro Gruppe).

4.3 Biliäre Lipidsekretionsraten

Zur Bestimmung der biliären Lipidsekretionsraten wurde die hepatische Galle des Versuchstieres über eine akute Gallenfistel für eine Stunde abgeleitet. Die für die jeweiligen Gruppen nach 4-wöchiger Fütterung einer cholesterinarmen Kontrolldiät (K) respektive

einer lithogenen Diät (L) ermittelten Lipidskretionsraten [$\mu\text{mol}/\text{kg}\times\text{h}$] sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Sekretionsraten für Cholesterin, Phospholipide und Gallensäuren lagen bei den Tieren des Stammes C57L durchweg über denen des Stammes AKR (jeweils $p < 0,05$). Unter lithogener Diät stiegen die Cholesterin- und Phospholipidsekretionsraten der C57L-Tiere signifikant ($p < 0,05$) auf Werte von 22 ± 7 (Cholesterin) bzw. 50 ± 10 (Phospholipide) an. Geringere, jedoch gleichermaßen signifikante Anstiege wurden für die AKR-Tiere beobachtet, wobei die erreichten Werte bei 9 ± 2 (Cholesterin) bzw. 26 ± 7 (Phospholipide) lagen. Die Gallensäuresekretionsrate der C57L-Gruppe unter Kontrolldiät war mit 153 ± 34 etwa 50% höher als in der AKR-Gruppe (101 ± 28). Bei keinem der beiden Stämme zeigten sich hier signifikante Unterschiede zwischen den Diätgruppen.

Basierend auf den dargestellten Sekretionsraten wurde das Cholesterin-/Phospholipidverhältnis als Maß der Lipidzusammensetzung an der kanalikulären Hepatozytenmembran sezernierter Vesikel berechnet. Interessanterweise blieb dieses Verhältnis lediglich bei den Tieren des AKR-Stammes unter lithogener Diät unverändert ($0,35 \pm 0,1$). Demgegenüber ergab sich für die C57L-Gruppe nach lithogener Diät mit $0,44 \pm 0,1$ ein signifikant ($p < 0,05$) höherer Wert als in der Gruppe unter Kontrolldiät ($0,35 \pm 0,1$).

Tabelle 7: Biliäre Lipidsekretionsraten und Cholesterin (Ch)/ Phospholipid-Verhältnis.

Mausstamm	Diät	Cholesterinsekretion [$\mu\text{mol}/\text{kg}\times\text{h}$]	Phospholipidsekretion [$\mu\text{mol}/\text{kg}\times\text{h}$]	Gallensäuresekretion [$\mu\text{mol}/\text{kg}\times\text{h}$]	Ch/Phospholipide
AKR	K	5 ± 1	14 ± 2	101 ± 28	$0,35 \pm 0,1$
	L	$9 \pm 2^*$	$26 \pm 7^*$	95 ± 36	$0,35 \pm 0,1$
C57L	K	8 ± 2	23 ± 7	153 ± 34	$0,35 \pm 0,1$
	L	$22 \pm 7^*$	$50 \pm 10^*$	162 ± 40	$0,44 \pm 0,1^*$

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm 1SEM. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Gruppe unter Kontrolldiät. K = Kontrolldiät; L = lithogene Diät.

4.4 Expression von Transportern der sinusoidalen Plasmamembran

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben zeigten C57L/J-Mäuse im Vergleich mit Tieren des Stammes AKR/J deutlich höhere Sekretionsraten für Cholesterin, Phospholipide und Gallensäuren. Nach Fütterung der lithogenen Diät waren diese Unterschiede – mit Ausnahme der jeweils nahezu unveränderten Gallensäuresekretionsraten – noch deutlicher ausgeprägt. Es wurde untersucht, inwieweit diese Unterschiede von – möglicherweise ursächlichen – Variationen in der Genexpression von Transportproteinen der sinusoidalen und kanalikulären Leberzellmembran begleitet wurden.

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression für *Ntcp1*, *Oatp1* und *Oct1* ermittelt. Zur Standardisierung wurde hierbei im jeweils selben Ansatz die 18S rRNA-Expression bestimmt, auf welche die densitrometischen Daten der spezifischen Transkripte bezogen wurden.

Durch Westernblot wurde die Proteinexpression von NTCP1 und OATP1 bestimmt. Ein Antikörper gegen OTC1 war nicht verfügbar. Die Blots wurden jeweils gestrippt und mit Antikörpern gegen die Na/K-ATPase der basolateralen Plasmamembran reinkubiert, um eventuelle Unterschiede in der Anreicherung sinusoidal lokalisierter Proteine in den untersuchten Membranpräparationen zu berücksichtigen.

4.4.1 Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von *Ntcp1*

Nach Fütterung der lithogenen Diät zeigte sich bei keinem der beiden Maustämme eine signifikante Änderung der mRNA-Expression von *Ntcp1* (Abbildung 6, S. 47).

Abbildung 7 (S. 48) zeigt den im Gegensatz hierzu bei beiden Mausstämmen nach lithogener Diät beobachteten Abfall der NTCP1 Proteinexpression um jeweils 32% ($p < 0,05$).

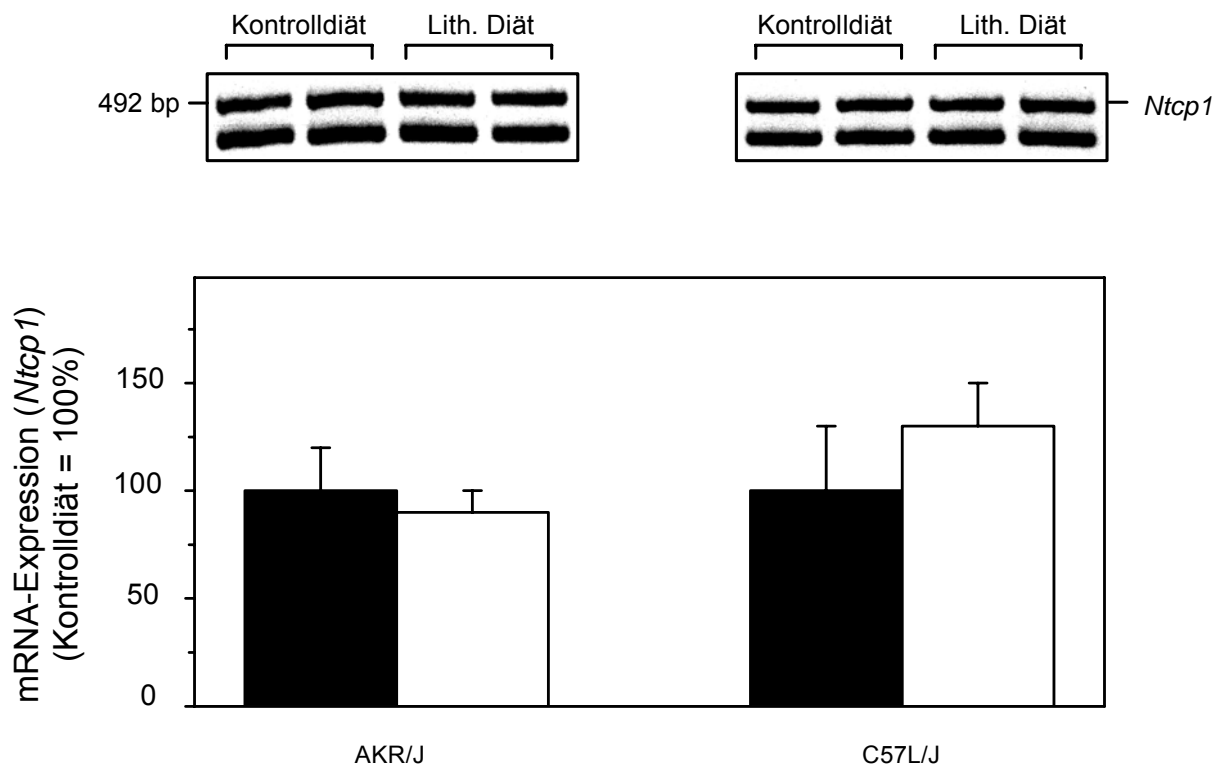


Abbildung 6: Effekt der lithogenen Diät auf die *Ntcp1* mRNA-Expression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der *Ntcp1* mRNA-Expression bei gallensteinresistenten AKR/J- und gallensteinempfindlichen C57L/J-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD.

Oberhalb des Säulendiagrammes sind repräsentativ die mRNA-Banden von jeweils 4 Tieren eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Tiere Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die untere Bande repräsentiert 18S rRNA, auf welche die densitometrisch bestimmte Intensität der *Ntcp1*-Bande bezogen wurde.

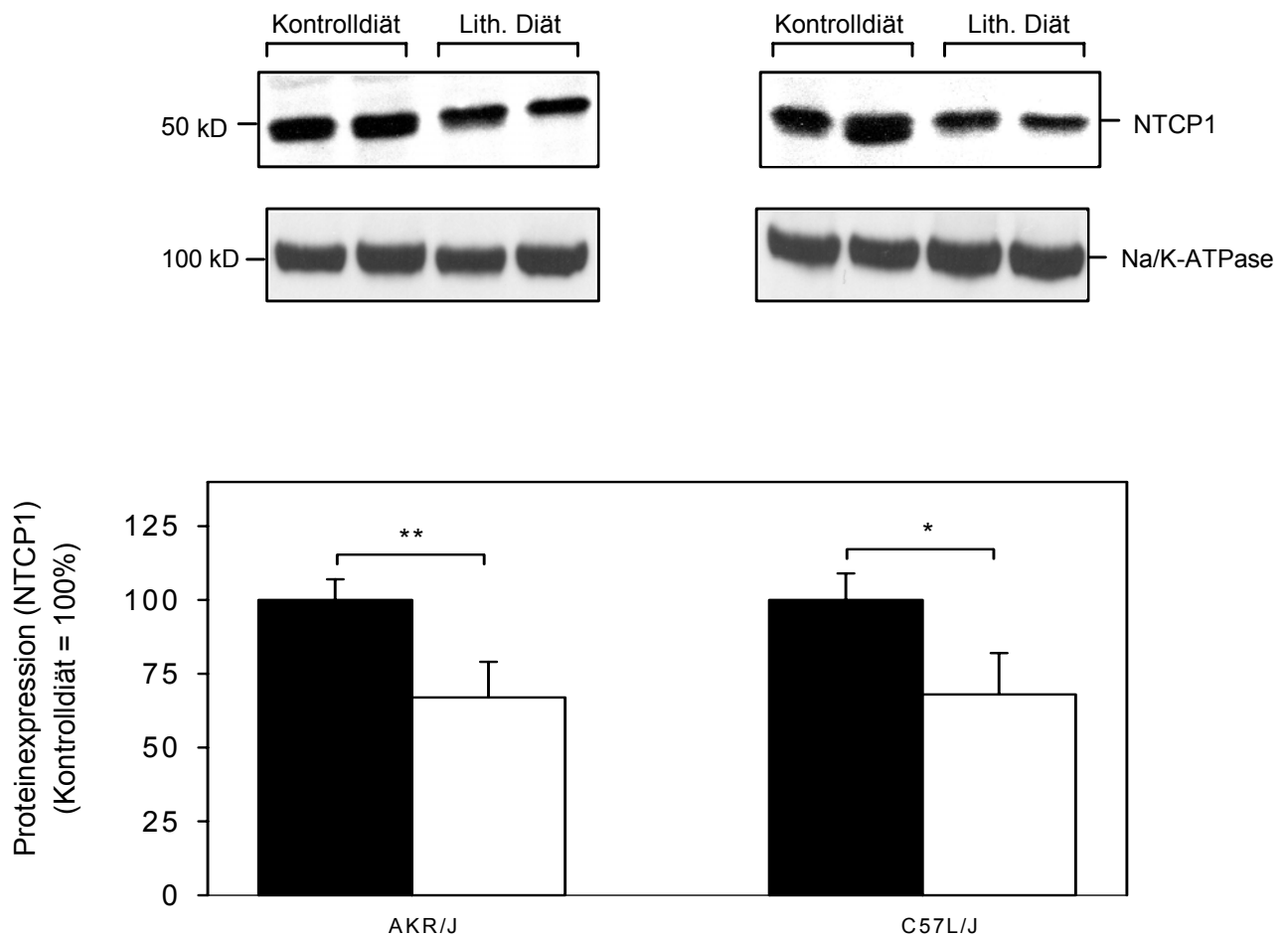


Abbildung 7: Effekt der lithogenen Diät auf die NTCP1 Proteinexpression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der NTCP1 Proteinexpression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Oberhalb des Säulendiagrammes ist ein repräsentativer Westernblot mit jeweils 4 Membranpräparationen eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Gruppen Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die Blots wurden jeweils gestrippt und mit Antikörpern gegen die Na/K-ATPase der basolateralen Plasmamembran reinkubiert (untere Bande), um eventuelle Unterschiede in der Anreicherung sinusoidal lokalisierter Proteine in den untersuchten Membranpräparationen zu berücksichtigen.

4.4.2 Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von *Oatp1*

Die Fütterung der lithogenen Diät erbrachte für *Oatp1* (Abbildung 8) bei keinem der beiden Maustämme eine signifikante Änderung der mRNA-Expression.

Auch führte die lithogene Diät weder bei den Tieren der AKR/J-Gruppe, noch bei denen der C57L/J-Gruppe zu einer signifikanten Änderung der OATP1 Proteinexpression (Abbildung 9, S. 50).

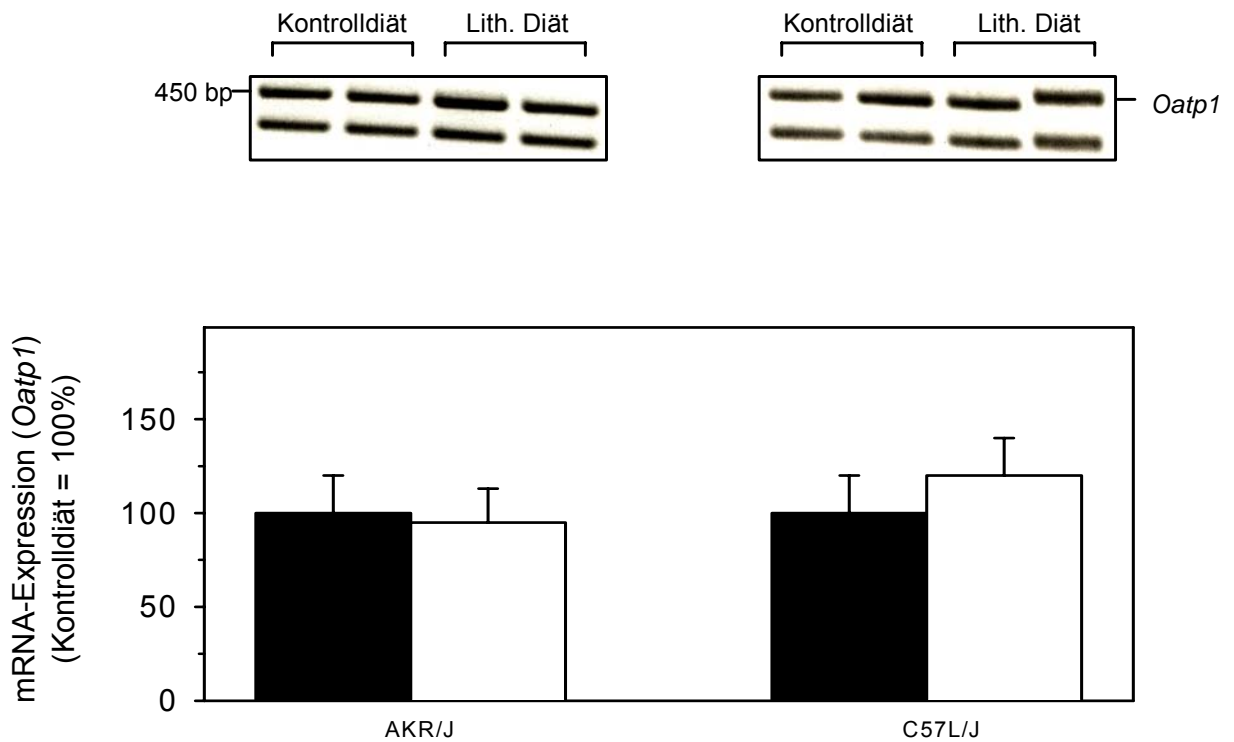


Abbildung 8: Effekt der lithogenen Diät auf die *Oatp1* mRNA-Expression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der *Oatp1* mRNA-Expression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD.

Oberhalb des Säulendiagrammes sind repräsentativ die mRNA-Banden von jeweils 4 Tieren eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Tiere Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die untere Bande repräsentiert 18S rRNA, auf welche die densitometrisch bestimmte Intensität der *Oatp1*-Bande bezogen wurde.

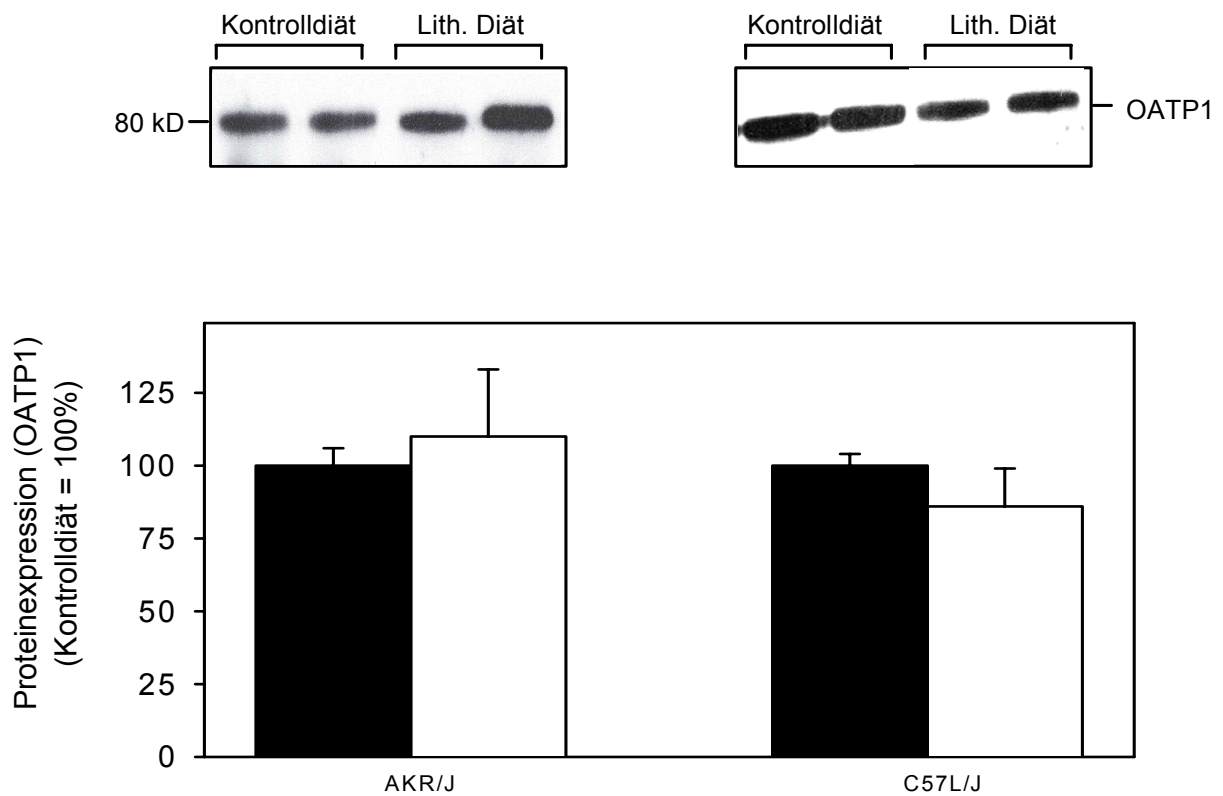


Abbildung 9: Effekt der lithogenen Diät auf die OATP1 Proteinexpression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der OATP1 Proteinexpression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD.

Oberhalb des Säulendiagrammes ist ein repräsentativer Westernblot mit jeweils 4 Membranpräparationen eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Gruppen Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die Blots wurden jeweils gestrippt und mit Antikörpern gegen die Na/K-ATPase der basolateralen Plasmamembran reinkubiert (nicht abgebildet), um eventuelle Unterschiede in der Anreicherung sinusoidal lokalisierter Proteine in den untersuchten Membranpräparationen zu berücksichtigen.

4.4.3 Steady-state mRNA-Expression von *Oct1*

Unter lithogener Diät stieg die *Oct1* mRNA-Expression (Abbildung 10) bei beiden Gruppen auf das 2,5-fache (AKR/J, $p < 0,01$) bzw. 2,1-fache (C57L/J, $p < 0,05$) des Wertes unter Kontrolldiät an.

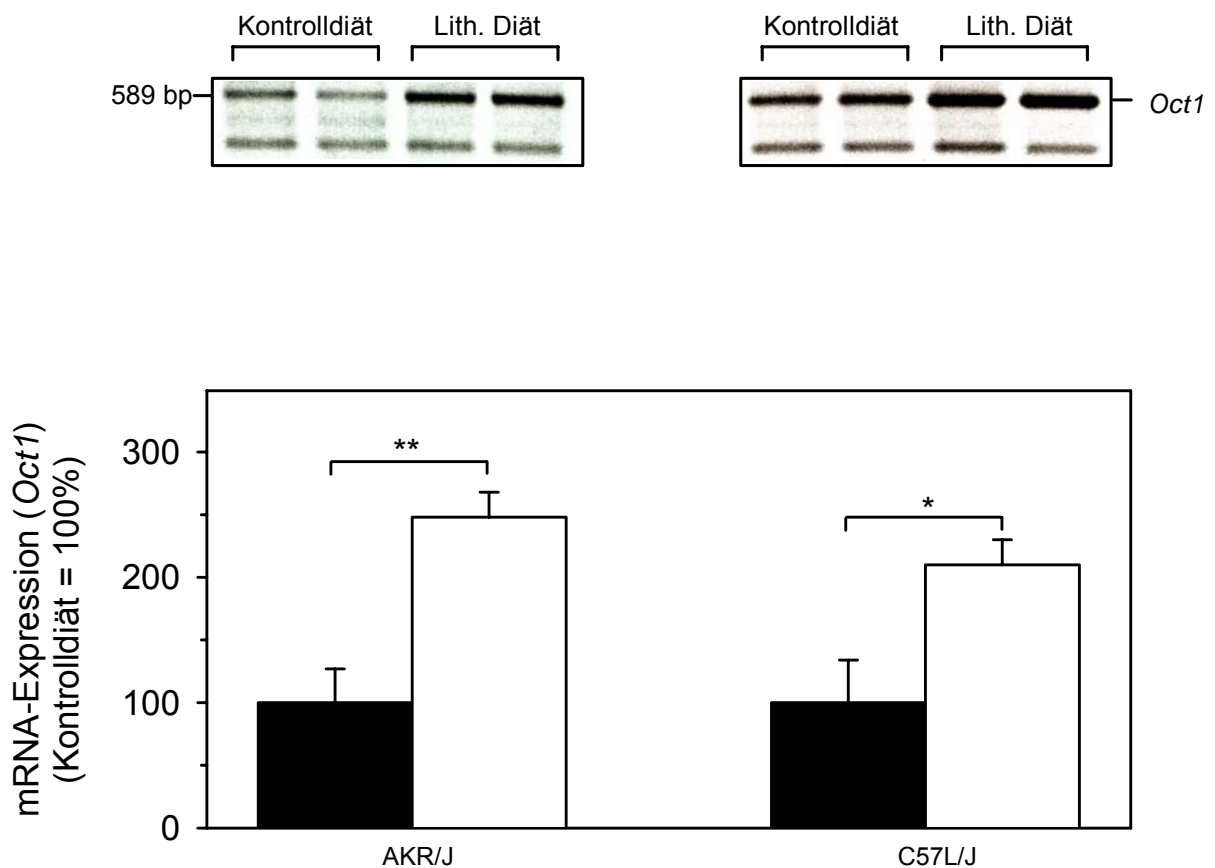


Abbildung 10: Effekt der lithogenen Diät auf die *Oct1* mRNA-Expression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der *Oct1* mRNA-Expression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Oberhalb des Säulendiagrammes sind repräsentativ die mRNA-Banden von jeweils 4 Tieren eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Tiere Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die untere Bande repräsentiert 18S rRNA, auf welche die densitometrisch bestimmte Intensität der *Oct1*-Bande bezogen wurde.

4.5 Expression von Transportern der kanalikulären Plasmamembran

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expression für *Bsep*, *Mdr2* und *Mrp2* ermittelt. Zur Standardisierung wurde hierbei im jeweils selben Ansatz die *Gapdh* mRNA-Expression bestimmt, auf welche die densitrometischen Daten der spezifischen Transkripte bezogen wurden.

Mittels Westernblot wurde die Proteinexpression von BSEP und MDR2 bestimmt. Ein Antikörper gegen MRP2 war nicht verfügbar. Die Blots wurden jeweils gestrippt und mit Antikörpern gegen das kanalikuläre Markerprotein DPP IV (Dipeptidylpeptidase IV) reinkubiert, um eventuelle Unterschiede in der Anreicherung kanalikulärer Proteine in den untersuchten Membranpräparationen zu berücksichtigen.

4.5.1 Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von Bsep

In Reaktion auf die lithogene Diät zeigte sich bei beiden Stämmen ein signifikanter Anstieg ($p < 0,001$) der *Bsep* mRNA-Expression auf das 4- (AKR/J) bzw. 5-fache (C57L/J) des Ausgangswertes (Abbildung 11).

Trotz der bei beiden Stämmen nach lithogener Diät deutlich gesteigerten *Bsep* mRNA-Expression, zeigte sich auf Proteinebene (Abbildung 12) lediglich ein moderater Anstieg um 45% (AKR/J, $p > 0,05$) bzw. 30% (C57L/J, $p > 0,05$). Der Effekt war jeweils nicht statistisch signifikant.

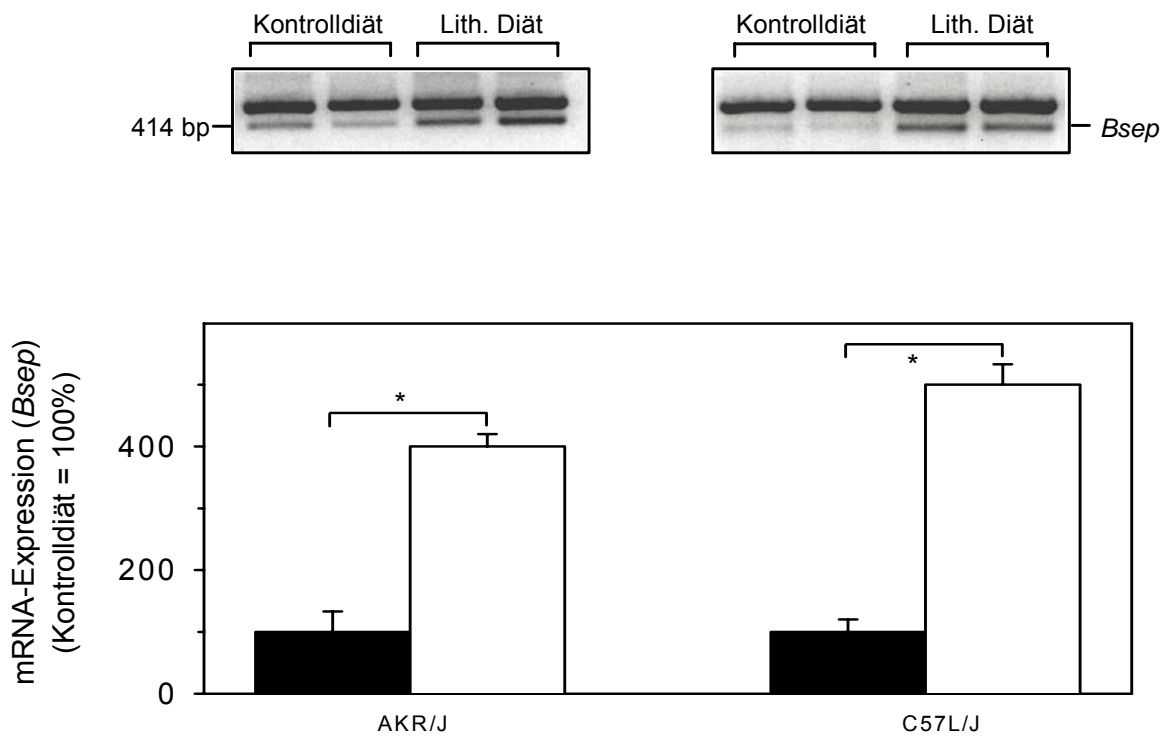


Abbildung 11: Effekt der lithogenen Diät auf die *Bsep* mRNA-Expression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der *Bsep* mRNA-Expression bei gallensteinresistenten AKR- (linkes Säulenpaar) und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen (rechtes Säulenpaar) nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD. * $p < 0,001$.

Oberhalb des Säulendiagrammes sind repräsentativ die mRNA-Banden von jeweils 4 Tieren eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Tiere Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die obere Bande repräsentiert *Gapdh*, auf welche die densitometrisch bestimmte Intensität der *Bsep*-Bande bezogen wurde.

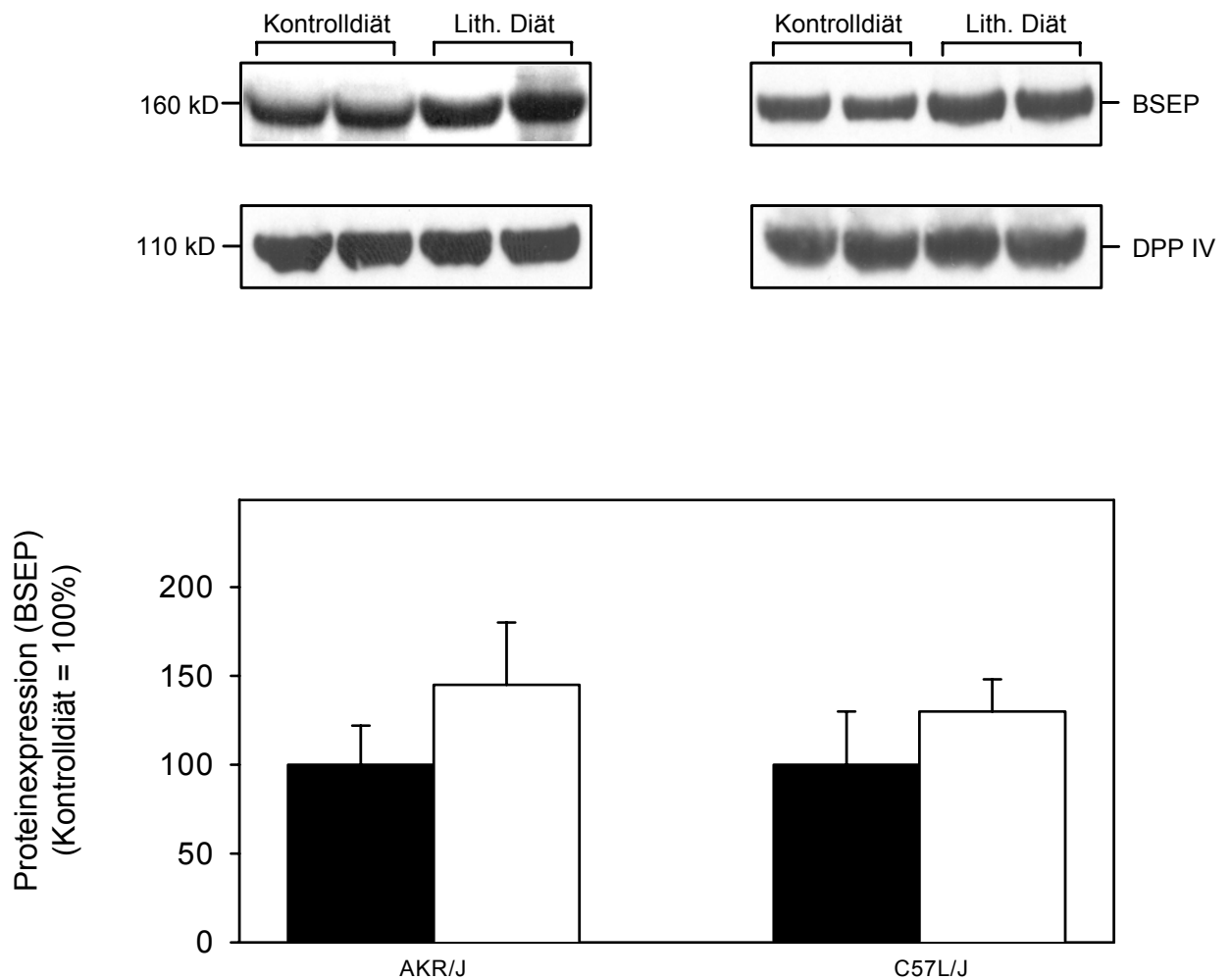


Abbildung 12: Effekt der lithogenen Diät auf die BSEP Proteinexpression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der BSEP Proteinexpression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD.

Oberhalb des Säulendiagrammes ist ein repräsentativer Westernblot mit jeweils 4 Membranpräparationen eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Gruppen Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die Blots wurden jeweils gestrippt und mit Antikörpern gegen das kanalikuläre Markerprotein DPP IV (Dipeptidylpeptidase IV) reinkubiert (untere Bande), um eventuelle Unterschiede in der Anreicherung kanalikulärer Proteine in den untersuchten Membranpräparationen zu berücksichtigen.

4.5.2 Steady-state mRNA-Expression und Proteinexpression von *Mdr2*

Die mRNA-Expression von *Mdr2* (Abbildung 13) blieb nach lithogener Diät bei beiden Stämmen nahezu unverändert. Demgegenüber stieg die Proteinexpression von MDR2 (Abbildung 14, S. 56) nach lithogener Diät bei den Tieren des Stammes AKR/J auf das 1,8-fache ($p < 0,05$) und bei denen des Stammes C57L auf das 2,5-fache ($p < 0,001$) an.

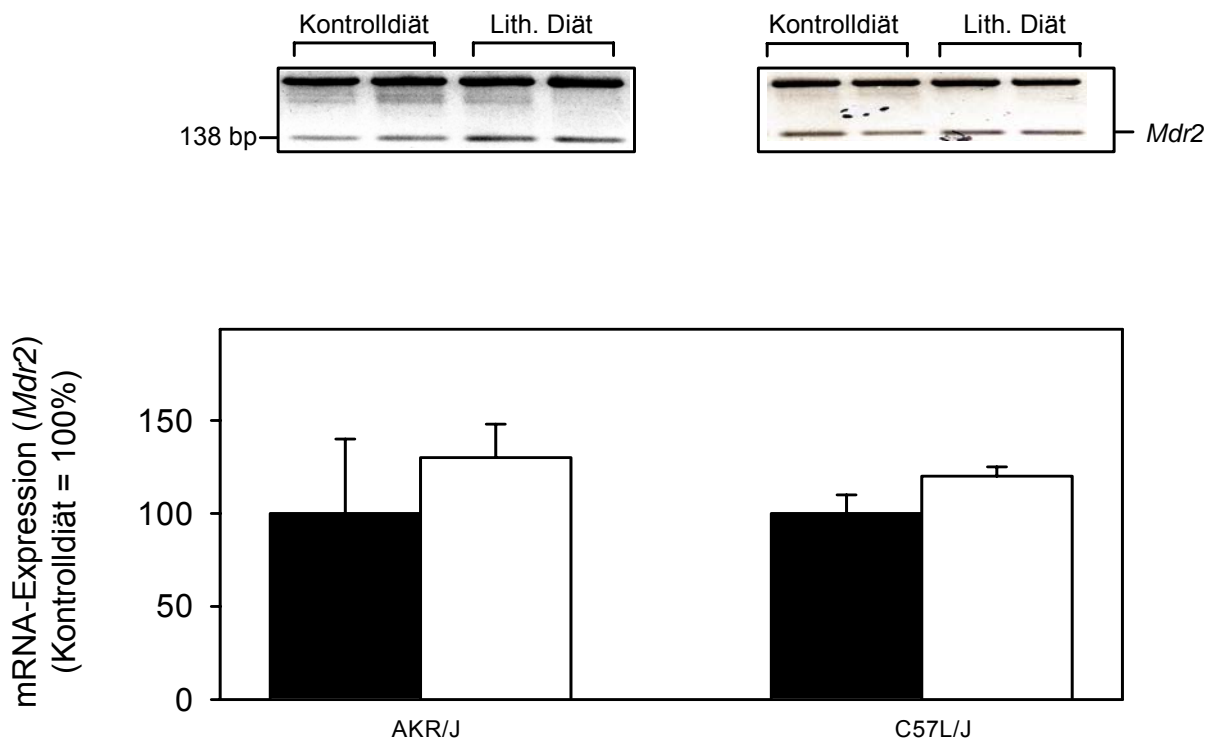


Abbildung 13: Effekt der lithogenen Diät auf die *Mdr2* mRNA-Expression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der *Mdr2* mRNA-Expression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD.

Oberhalb des Säulendiagrammes sind repräsentativ die mRNA-Banden von jeweils 4 Tieren eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Tiere Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die obere Bande repräsentiert *Gapdh*, auf welche die densitometrisch bestimmte Intensität der *Mdr2*-Bande bezogen wurde.

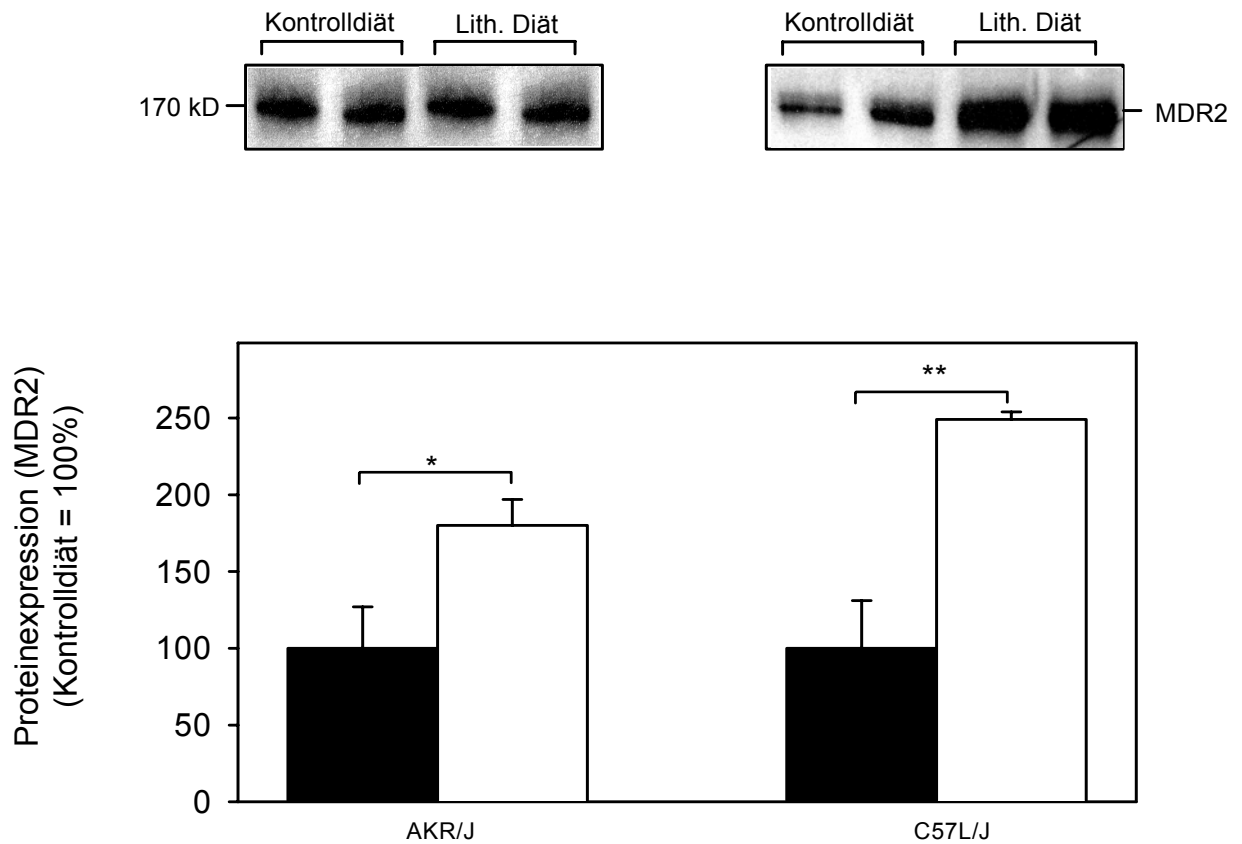


Abbildung 14: Effekt der lithogenen Diät auf die MDR2 Proteinexpression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der MDR2 Proteinexpression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Oberhalb des Säulendiagrammes ist ein repräsentativer Westernblot mit jeweils 4 Membranpräparationen eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Gruppen Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die Blots wurden jeweils gestrippt und mit Antikörpern gegen das kanalikuläre Markerprotein DPP IV (Dipeptidylpeptidase IV) reinkubiert (nicht abgebildet), um eventuelle Unterschiede in der Anreicherung kanalikulärer Proteine in den untersuchten Membranpräparationen zu berücksichtigen.

4.5.3 Steady-state mRNA-Expression von *Mrp2*

Die mRNA-Expression von *Mrp2* (Abbildung 15) änderte sich unter lithogener Diät bei keinem der beiden Mausstämme signifikant.

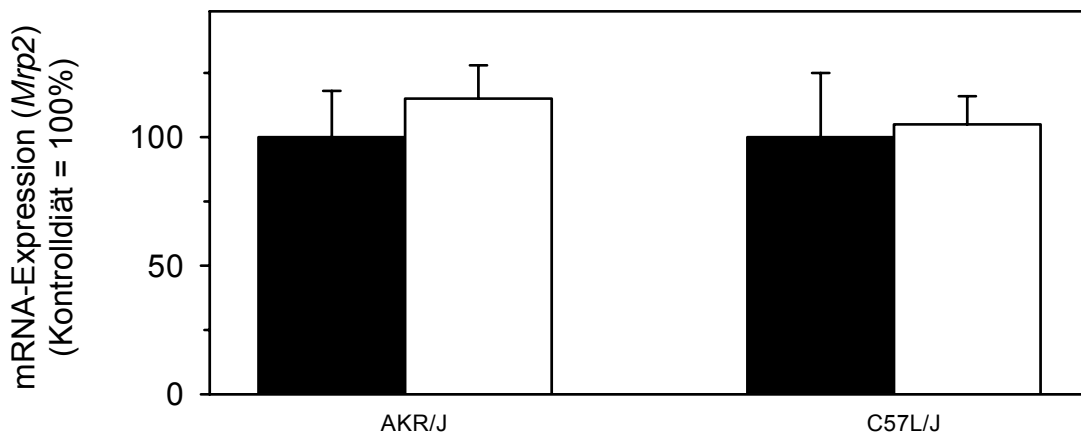
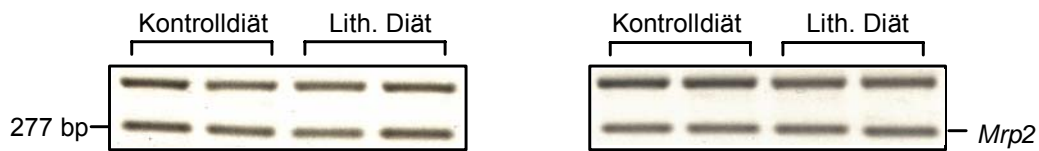


Abbildung 15: Effekt der lithogenen Diät auf die *Mrp2* mRNA-Expression.

Dargestellt ist die relative Veränderung der *Mrp2* mRNA-Expression bei gallensteinresistenten AKR- und gallensteinempfindlichen C57L-Mäusen nach 28-tägiger Fütterung der lithogenen Diät (□weiß) im Vergleich zur Kontrolldiät (■schwarz, als 100% gesetzt). Es handelt sich um Mittelwerte \pm 1SD.

Oberhalb des Säulendiagrammes sind repräsentativ die mRNA-Banden von jeweils 4 Tieren eines jeden Stammes abgebildet, von denen die ersten beiden Tiere Kontrolldiät, die anderen beiden lithogene Diät erhalten hatten. Die obere Bande repräsentiert *Gapdh*, auf welche die densitometrisch bestimmte Intensität der *Mrp2*-Bande bezogen wurde.

5 Diskussion

Unterschiede des Galleflusses und der biliären Lipidsekretion zwischen gallensteinempfindlichen C57L/J-Mäusen und gallensteinresistenten AKR/J-Mäusen könnten mit einer abweichenden Expression von Transportern der Leberplasmamembran in Zusammenhang stehen. Daher untersuchten wir auf mRNA- und Proteinebene sinusoidal und kanalikulär lokalisierte Membrantransporter, die für die Gallebildung in C57L/J- und AKR/J-Mäusen während der Cholesteringallensteinbildung von Bedeutung sind.

5.1 Einfluss der cholesterinreichen Diät auf den Lebercholesteringehalt

Die lithogene Diät wurde von allen Tieren gut toleriert. Interessanterweise kam es trotz diätetischer Zufuhr von Cholsäure bei keinem der Tiere zum Auftreten einer chologenen Diarrhöe. Erwartungsgemäß stieg der Gehalt an hepatischem Gesamtcholesterin in beiden Gruppen unter cholesterinreicher Diät an, wobei die gallensteinresistenten Tiere des AKR/J-Stammes höhere Werte erreichten. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Lammert et al. (124), welche die Fütterungsperiode auf bis zu 56 Tage ausdehnten. Auch konnte bereits vorher gezeigt werden, dass lediglich die Tiere des gallensteinresistenten Stammes eine Steatose mit charakteristischem histologischen Bild entwickeln (114; 125). Der erhöhte Gehalt an hepatischem Cholesterin spricht für eine Speicherung von Cholesterinestern, zumal etwa 90% des hepatischen Cholesterins in veresterter Form vorliegt (126).

5.2 Biliäre Lipidsekretion und Expression sinusoidaler Membrantransporter

Die bei beiden Mausstämmen vergleichbare mRNA-Expression von *Ntcp1* und *Oatp1* legt die Vermutung nahe, dass die basolaterale Aufnahme und der transhepatische Fluß von Gallensäuren nicht zu den beobachteten Unterschieden in den Gallensäuresekretionsraten

beitragen. Als Reaktion auf die lithogene Diät blieb die *steady-state* OATP1 Proteinexpression unverändert, wohingegen die NTCP1 Proteinexpression abnahm, ohne dass eine begleitende Abnahme der *Ntcp1* mRNA-Expression nachweisbar war. Obwohl eine Abnahme an NTCP1 Protein eine Neigung zur Cholestase vermuten lässt, fand sich bei den Tieren unter Berücksichtigung von Gallefluss, biliären Lipidsekretionsraten, Serum-Transaminasen und Leberhistologie kein Hinweis auf Cholestase. Diese Beobachtung erinnert an die Situation bei *Mdr2*-defizienten Mäusen (121) und könnte eine Anpassungsreaktion der Leber zum Schutz vor einer intrazellulären Überladung mit hydrophoben Gallensalzen darstellen (127).

Cholin, ein essentielles Substrat für die Phospholipidsynthese, wird durch die Aktivität von OCT1 aus dem Blut entfernt. Bei AKR/J- und C57L/J-Mäusen, welche Kontrolldiät erhalten hatten, sind ähnliche *steady-state Oct1* mRNA-Mengen indirekte Beweise dafür, dass erhöhte biliäre Phospholipidsekretionsraten bei C57L Mäusen nicht in Zusammenhang mit einer erhöhten Phospholipidsynthese stehen. Die Hochregulation der *Oct1* mRNA unter lithogener Diät zeigt höchstwahrscheinlich eine erhöhte hepatische Aufnahme von Cholin an (128; 129), wodurch ausreichend Substrat für die Phospholipidsynthese unter den Bedingungen einer biliären Phospholipidhypersekretion zur Verfügung gestellt wird.

5.3 Biliäre Lipidsekretion und Expression kanalikulärer Membrantransporter

In Reaktion auf die lithogene Diät, welche große Mengen Cholsäure enthielt, blieben die jeweiligen Gallensäuresekretionsraten praktisch gleich, wohingegen Phospholipid- und Cholesterinsekretionsraten zunahm (siehe Tabelle 7, Seite 45). Angesichts der unter Kontrolldiät 1,5-fach höheren Gallensäuresekretionsrate und des größeren Gallensäurepools in C57L/J-Mäusen erwarteten wir bei diesem Stamm eine höhere *steady-state* BSEP Proteinexpression. Interessanterweise fanden sich nicht nur vergleichbare BSEP Proteinmengen, sondern auch eine ähnliche *Bsep* mRNA-Expression

bei AKR/J- und C57L/J-Mäusen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mutationen im *Bsep*-Gen die Gallensäuresekretionsraten beeinträchtigen (130; 131). Daher erscheint es möglich, dass eine so genannte *gain of function*-Mutation im *Bsep*-Gen der Tiere des Stammes C57L/J mit erhöhter Transportaktivität für den Unterschied in der Gallensäuresekretionsrate verantwortlich sein könnte. Allerdings führten die bislang vorliegenden Sequenzierdaten nicht zur Identifizierung einer Mutation in der für das *Bsep*-Gen codierenden Region. Es wäre auch denkbar, dass ein zweiter (bislang nicht identifizierter) kanalikulärer Gallensäuretransporter zu den Unterschieden beiträgt. Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen von Wang et al. (132) welche zeigten, dass die gezielte Inaktivierung des *Bsep*-Gens eine Hemmung der Gallensäuresekretion lediglich um maximal 60% zur Folge hatte. Erhöhte *Bsep* mRNA-Spiegel zusammen mit leicht erhöhter BSEP Proteinexpression sprechen eindeutig für eine transkriptionelle Regulation (133) unter Beteiligung eines gallensäurenempfindlichen Elementes und des Farnenoid-X-Rezeptor/Retinoid-X-Rezeptor (FXR/RXR). Die offensichtliche Diskrepanz zwischen substanziiell erhöhter *Bsep* mRNA und nur schwach erhöhten BSEP Proteinmengen impliziert eine zusätzliche posttranskriptionelle Regulation. Eine starke Hemmung der Gallensäurebildung als Reaktion auf die lithogene Diät könnte ebenso zu diesem Ergebnis beigetragen haben.

Bei Mäusen, welche mit lithogener Diät gefüttert wurden, bestimmt der zirkulierende hydrophobe Gallensäurepool die Menge der in die Galle sezernierten Phospholipide (134) und erklärt wahrscheinlich die erhöhte biliäre Phospholipidsekretion (95; 127). Widererwarten waren die *Mdr2* mRNA-Spiegel unverändert trotz erhöhter MDR2 Proteinexpression. Dies überrascht, da für Mäuse, welche eine Diät angereichert mit 0,1% Gallensäuren erhielten, von einer transkriptionellen Hochregulation von *Mdr2* – möglicherweise durch eine Aktivierung der Proteinkinase C (135) vermittelt durch Gallensäuren – berichtet wurde (136). Womöglich könnte diätetisches Cholesterin unter Beteiligung so genannter Sterol-regulatorischer Elemente (137) die Menge an *Mdr2* mRNA verringern. Da die lithogene Diät sowohl Gallensäuren als auch Cholesterin in hohen Konzentrationen enthielt, könnten somit gegensätzliche Effekte dieser diätetischen Komponenten auf die transkriptionelle Regulation von *Mdr2* unsere Beobachtung einer unveränderten *steady-state Mdr2* mRNA-Expression erklären.

C57L-Mäuse zeigten einen ca. doppelt so hohen Gallefluss wie AKR-Mäuse, wodurch eine erhöhte Glutathionsekretion in die Galle widergespiegelt wird. Im *steady-state* konnten von uns ähnliche mRNA-Mengen von *Mrp2* in C57L/J und AKR/J-Mäusen entsprechend früherer Beobachtungen bestätigt werden. Da die Regulation des *Mrp2*-Gens in Mäusen offensichtlich auf der Transkriptionsebene stattfindet, wären ähnliche steady state MRP2 Proteinmengen zu erwarten. Tatsächlich wurden diese vor kurzem beschrieben. (138). Erhöhter Gallefluss ohne Steigerung der hepatischen MRP2 Proteinexpression scheint *Mrp2*-Gen-Mutationen mit beeinträchtigter Proteinreifung oder apikaler Sortierung, wie man sie in Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom findet, auszuschließen. Man könnte deshalb vermuten, dass eine so genannte *gain of function*-Mutation im *Mrp2*-Gen in C57L-Mäusen mit erhöhter Transportaktivität in Zusammenhang steht. Tatsächlich wurde bereits ein Polymorphismus im *Mrp2*-Gen gefunden, der zu einem Aminosäureaustausch innerhalb der ersten Nukleotid-bindenden Domäne führt (139).

5.4 Mechanismus der Gallensteinbildung bei C57L/J-Inzuchtmäusen

Genetische Untersuchungen zeigten, dass *Bsep*, *Oct1* und *Mrp2* drei Kandidaten *Lith*-Gene auf den Chromosomen 2, 17 und 19 darstellen (117). Auf der Basis unserer Ergebnisse und der verfügbaren Literatur schlagen wir ein pathophysiologisches Modell vor, welches die Cholesterin-Gallensteinbildung bei C57L/J-Mäusen (Abbildung 16, S. 62) zumindest zum Teil erklären könnte. Cholesterin erreicht die kanalikuläre Leberplasmamembran von C57L/J-Mäusen unter Bedingungen einer lithogenen Diät kontinuierlich im Überfluss. Dies ist das Ergebnis unterschiedlicher Mechanismen, welche (I) eine verstärkte intestinale Cholesterinabsorption und hepatische Aufnahme von Chylomikronen-Remnants, (II) die erhöhte Aufnahme von HDL via SR-BI, (III) eine verringerte Gallensäurensynthese, (IV) einen erhöhten intrazellulären Cholesterintransport via SCP2 und (V) das Unvermögen, die Cholesterinsynthese ausreichend zu drosseln, beinhalten. Ein größerer Gallensäurepool mit normaler enterohepatischer Zirkulation, welcher durch die erhöhte *Bsep* Genexpression widergespiegelt wird, fördert die Sekretion von Cholesterin aus der kanalikulären Membran in die Galle. Da die lithogene Diät mit der

Zeit zu einem hydrophoberen Gallensäurepool führt, wird die biliäre Cholesterinsekretion weiter verstärkt. Eine Mutation im *Mrp2*-Gen von C57L-Mäusen könnte den erhöhten Gallefluss erklären, welcher die Cholesterinhypersekretion durch Entkopplung von Gallensäure- und Phospholipidsekretion aufgrund der Bindung von Anionen an die Gallensäuremoleküle fördern würde. Unter solchen Bedingungen könnten Vesikel für längere Zeit an die kanalikuläre Membran gebunden bleiben und somit als Abfluss für den erhöhten Cholesterinpool der kanalikulären Membran fungieren.

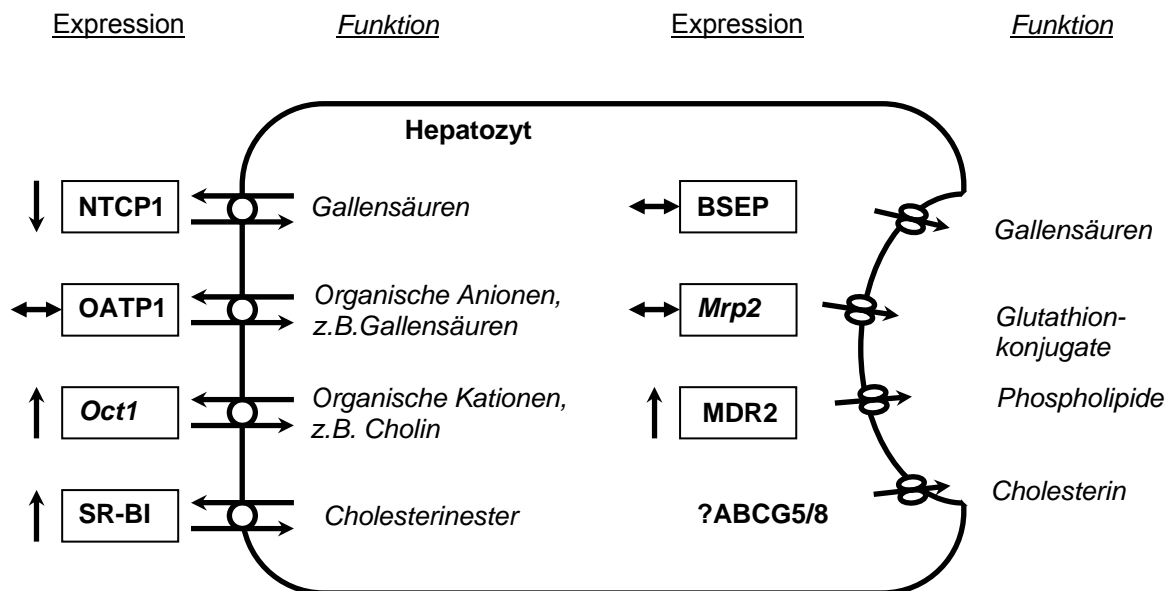


Abbildung 16: Änderung der Expression hepatozellulärer Plasmamembrantransporter bei gallensteinempfindlichen C57L- Mäusen nach lithogener Diät.

An der kanalikulären Membran ging die erhöhte Proteinexpression von BSEP (Gallensäureexportpumpe) und MDR2 (Phosphatidycholin-Transporter) bei unveränderter *Mrp2* (Multispezifischer Anionentransporter) mRNA-Expression mit einer biliären Hypersekretion von Gallensäuren und Phospholipiden bei gesteigertem Gallefluss einher. An der sinusoidalen Membran könnte die verminderte Proteinexpression von NTCP1 (Na^+ -abhängiges Taurocholat-Cotransportierendes Protein 1) bei unveränderter OATP1 (Organische Anionen-Transportierendes Polypeptid 1) Expression den Schutz der Leberzelle vor toxischen Gallensäurekonzentrationen zum Ziel haben. Die erhöhte *Oct1* (Organische Kationen-Transportierendes Protein 1) mRNA-Expression kann als Hinweis auf eine erhöhte Aufnahme von Cholin für eine gesteigerte Phospholipidsynthese bei erhöhter biliärer Phospholipidsekretion gewertet werden. Die Steigerung der SR-BI (HDL-Rezeptor) Expression in Verbindung mit einer erhöhten biliären Cholesterinsekretion konnte für das untersuchte Mausmodell bereits gezeigt werden (95).

Da dieses Mausmodell die molekularen Mechanismen der Cholesteringallensteinbildung bei Adipositas widerspiegeln könnte, sollten in Zukunft Untersuchungen sowohl der Genexpression als auch der Proteinfunktion von Transportern der Leberplasmamembran bei adipösen Menschen durchgeführt werden. Derartige Untersuchungen sollten klären, inwieweit dieses Konzept auf den Menschen übertragbar ist.

6 Zusammenfassung

6.1 Deutsch

Wir überprüften die Hypothese, dass eine unterschiedliche Expression von Transportern der Leberplasmamembran für Variationen der biliären Lipidsekretionsraten zwischen gallensteinempfindlichen C57L/J- und gallensteinresistenten AKR/J-Mäusen verantwortlich sind. Hierzu isolierten wir Plasmamembranfraktionen und Gesamt-RNA aus Lebern von Tieren der oben genannten Mausstämmen, welche entweder eine cholesterinarme Kontrolldiät oder eine lithogene Diät (15% Fett, 1,25% Cholesterin, 0,5% Cholsäure) über jeweils 4 Wochen erhalten hatten, und bestimmten die *steady-state* Genexpression hepatobiliärer Transportsysteme für Gallensäuren (*Ntcp1*, *Oatp1* und *Bsep*), Phospholipide (*Mdr2*), organische Anionen (*Mrp2*) und organische Kationen (*Oct1*). Unabhängig von der Diät fanden sich für die *steady-state* Genexpression der untersuchten hepatobiliären Transportsysteme zwischen den beiden Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede. Trotz eines höheren basalen Galleflusses und erhöhter Gallensäuresekretionsraten bei C57L/J- Mäusen unterschieden sich die Expressionsraten für *Mrp2* und *Bsep* zwischen den beiden Stämmen nicht signifikant. Eine gesteigerte biliäre Phospholipidsekretion als Reaktion auf die lithogene Diät ging mit einer erhöhten MDR2 Proteinexpression einher. In diesem Zusammenhang kann die Induktion von *Oct1* als Hinweis auf eine gesteigerte Cholinaufnahme zur verstärkten Phospholipidsynthese gelten. Als Antwort auf die lithogene Diät fand sich eine lediglich geringfügige Steigerung der BSEP Proteinexpression und die Gallensäuresekretion blieb nahezu unverändert. Die verminderte NTCP1 Proteinexpression könnte den Schutz der Leberzelle vor toxischen Gallensäurenkonzentrationen zum Ziel haben. Wir folgern, dass überwiegend Unterschiede der Proteinfunktion und nicht solche der Genexpression von Transportern der hepatischen Plasmamembran für Variationen der biliären Lipidsekretionsraten verantwortlich sein dürften. Unsere Ergebnisse stützen das Konzept, dass die Bildung einer lithogenen Galle durch eine Hypersekretion von Gallensäuren, welche eine gesteigerte Cholesterinsekretion an der kanalikulären Membran zur Folge hat, mitverursacht wird. Verstärkend wirkt hierbei möglicherweise eine Entkopplung der Gallensäuren- und Phospholipidsekretion bedingt durch einen gesteigerten Gallefluss.

6.2 Englisch

We tested the hypothesis that differential expression of liver plasma membrane transporters might account for variations in biliary lipid secretion rates between gallstone-susceptible C57L/J and gallstone-resistant AKR/J mice. Plasma membrane fractions and total RNA isolated from livers of mice fed with a control or lithogenic (15% fat/ 1.25% cholesterol/ 0.5% cholic acid) diet were used for measurements of steady-state gene expression of hepatobiliary transport systems for bile salts (*Ntcp1*, *Oatp1* and *Bsep*), phospholipids (*Mdr2*), organic anions (*Mrp2*) and organic cations (*Oct1*). Irrespective of the diet, the steady-state gene expression of hepatobiliary transporters did not differ significantly between the two strains. Despite a higher basal bile flow and bile-salt secretion in C57L mice, *Mrp2* and *Bsep* expression did not differ between the two strains. Elevated biliary phospholipid secretion in response to the lithogenic diet was linked to increased MDR2 protein expression, whereas the induction of *Oct1* might reflect an enhanced uptake of choline for augmented phospholipid synthesis. In response to the lithogenic diet, BSEP protein expression was up-regulated only marginally and bile salt secretion did not increase. The down-regulation of NTCP1 protein expression might protect hepatocytes from high intracellular bile-salt loads. We conclude that variations in protein function rather than in the gene expression of liver plasma membrane transporters might account for variations in biliary lipid secretion rates. Our findings support the concept that the formation of lithogenic bile is caused by the hypersecretion of bile salts as a result of augmented availability of canalicular membrane cholesterol, possibly amplified by bile-salt - phospholipid uncoupling due to the increased bile flow.

7 Literaturverzeichnis

- [1]**Johnston DE, Kaplan MM.** Pathogenesis and treatment of gallstones. *N Engl J Med* 1993; 328:412-421.
- [2]**Diehl AK.** Epidemiology and natural history of gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20:1-19.
- [3]**Carey MC, Paigen B.** Gallstones. In: King RA, Rotter JF, Motulsky AG (eds); The genetic basis of common diseases. *Oxford University Press* (2001), New York, USA.
- [4]**Ransohoff DF, Gracie WA.** Treatment of gallstones. *Ann Intern Med* 1993; 119:606-619.
- [5]**Jensen KH, Jorgensen T.** Incidence of gallstones in a Danish population. *Gastroenterology* 1991; 100:790-794.
- [6]**Kratzer W, Kachele V, Mason RA, Hill V, Hay B, Haug C et al.** Gallstone prevalence in Germany: the Ulm Gallbladder Stone Study. *Dig Dis Sci* 1998; 43(6):1285-1291.
- [7]**Brett M, Barker DJ.** The world distribution of gallstones. *Int J Epidemiol* 1976; 5:335-341.
- [8]**Bainton D, Davies GT, Evans KT, Gravelle IH.** Gallbladder disease. Prevalence in a South Wales industrial town. *N Engl J Med* 1976; 294(21):1147-1149.
- [9]**Barbara L, Sama C, Labate AMM, Taroni F, Rusticali AG, Festi D et al.** A Population study on the prevalence of gallstone disease: The sirmione study. *Hepatology* 1987; 7:29-33.
- [10]**Martinez dP, Carballo F, Horcajo P, Aldeguer M, de IV, I, Nieto E et al.** Prevalence and associated factors for gallstone disease: results of a population survey in Spain. *J Clin Epidemiol* 1997; 50:1347-1355.

- [11]**Glabek I, Kvaale G, Arnesjo B, Soreide O.** Prevalence of gallstones in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22:1089-1094.
- [12]**Jorgensen T.** Gallstones and plasma lipids in a Danish population. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24:916-922.
- [13]**Kratzer W, Kachele V, Mason RA, Hill V, Hay B, Haug C et al.** Gallstone prevalence in Germany: the Ulm Gallbladder Stone Study. *Dig Dis Sci* 1998; 43:1285-1291.
- [14]**Tseng M, Williams RC, Maurer KR, Schanfield MS, Knowler WC, Everhart JE.** Genetic admixture and gallbladder disease in Mexican Americans. *Am J Phys Anthropol* 1998; 106:361-371.
- [15]**Diehl AK, Stern MP.** Special health problems of Mexican-Americans: obesity, gallbladder disease, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Adv Intern Med* 1989; 34:73-96.
- [16]**Sampliner RE, Bennett PH, Comess LJ, Rose FA, Burch TA.** Gallbladder disease in pima indians. Demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. *N Engl J Med* 1970; 283:1358-1364.
- [17]**Nelson BD, Porvaznik J, Benfield JR.** Gallbladder disease in Southwestern American Indians. *Arch Surg* 1971; 103:41-43.
- [18]**Thistle JL, Eckhart KL, Jr., Nensel RE, Nobrega FT, Poehling GG, Reimer M et al.** Prevalence of gallbladder disease among Chippewa Indians. *Mayo Clin Proc* 1971; 46:603-608.
- [19]**Williams CN, Johnston JL, Weldon KL.** Prevalence of gallstones and gallbladder disease in Canadian Micmac Indian women. *Can Med Assoc J* 1977; 117:758-760.
- [20]**Young TK, Roche BA.** Factors associated with clinical gallbladder disease in a Canadian Indian population. *Clin Invest Med* 1990; 13:55-59.
- [21]**Ho KJ, Biss K, Mikkelson B, Lewis LA, Taylor CB.** The Masai of East Africa: some unique biological characteristics. *Arch Pathol* 1971; 91:387-410.

[22]**Sichieri R, Everhart JE, Roth HP.** Low incidence of hospitalization with gallbladder disease among blacks in the United States. *Am J Epidemiol* 1990; 131:826-835.

[23]**Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, Mingrone G, Greco AV, Puglielli L et al.** Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology* 1998; 115:937-946.

[24]**Lowenfels AB.** Gallstones and glaciers: the stone that came in from the cold. *Lancet* 1988; 1:1385-1386.

[25]**Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL.** A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 2000; 100:391-398.

[26]**Durst RY, Burvin R, Eitan A, Barzilay A.** A familial risk factor in cholesterol gallstone disease. *J Clin Gastroenterol* 1996; 23:289-291.

[27]**Jackson CE, Gay BC.** Inheritance of gall-bladder disease. *Surgery* 1959; 46:853-857.

[28]**van der Linden W, Lindelöf G.** The familial occurrence of gallstone disease. *Acta Genet* 1965; 15:159-164.

[29]**Gilat T, Feldman C, Halpern Z, Dan M, Bar Meir S.** An increased familial frequency of gallstones. *Gastroenterology* 1983; 84:242-246.

[30]**Jorgensen T.** Gallstones in a Danish population: familial occurrence and social factors. *J Biosoc Sci* 1988; 20:111-120.

[31]**Sarin SK, Negi VS, Dewan R, Sasan S, Saraya A.** High familial prevalence of gallstones in the first-degree relatives of gallstone patients. *Hepatology* 1995; 22(1):138-141.

[32]**Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A.** A survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 1988; 48:1936-1942.

[33]**Antero Kesaniemi Y, Koskenvuo M, Vuoristo M, Miettinen TA.** Biliary lipid composition in monozygotic and dizygotic pairs of twins. *Gut* 1989; 30:1750-1756.

- [34]**Danzinger RG, Gordon H, Schoenfield LJ, Thistle JL.** Lithogenic bile in siblings of young women with cholelithiasis. *Mayo Clin Proc* 1972; 47:762-766.
- [35]**Figge A, Matern S, Lammert F.** Molecular genetics of cholesterol cholelithiasis: identification of human and murine gallstone genes. *Z Gastroenterol* 2002; 40:425-432.
- [36]**Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Stengard JH et al.** Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *Am J Hum Genet* 2000; 67:881-900.
- [37]**Bertomeu A, Ros E, Zambon D, Vela M, Perez-Ayuso RM, Targarona E et al.** Apolipoprotein E polymorphism and gallstones. *Gastroenterology* 1996; 111(6):1603-1610.
- [38]**Niemi M, Kervinen K, Rantala A, Kauma H, Paivansalo M, Savolainen MJ et al.** The role of apolipoprotein E and glucose intolerance in gallstone disease in middle aged subjects. *Gut* 1999; 44(4):557-562.
- [39]**Juvonen T, Kervinen K, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Kesaniemi YA.** Gallstone cholesterol content is related to apolipoprotein E polymorphism. *Gastroenterology* 1993; 104:1806-1813.
- [40]**van Erpecum KJ, Carey MC.** Apolipoprotein E4: another risk factor for cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* 1996; 111:1764-1767.
- [41]**Busch N, Matern S.** Current concepts in cholesterol gallstone pathogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:453-460.
- [42]**Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R.** MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2001; 120:1459-1467.
- [43]**Shoda J, Oda K, Suzuki H, Sugiyama Y, Ito K, Cohen DE et al.** Etiologic significance of defects in cholesterol, phospholipid, and bile acid metabolism in the liver of patients with intrahepatic calculi. *Hepatology* 2001; 33:1194-1205.

- [44]**Fracchia M, Pellegrino S, Secreto P, Gallo L, Masoero G, Pera A et al.** Biliary lipid composition in cholesterol microlithiasis. *Gut* 2001; 48:702-706.
- [45]**Jacquemin E.** Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis* 2001; 21:551-562.
- [46]**Bahar RJ, Stolz A.** Bile acid transport. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:27-58.
- [47]**Lammert F, Marschall HU, Glantz A, Matern S.** Intrahepatic cholestasis of pregnancy: molecular pathogenesis, diagnosis and management. *J Hepatol* 2000; 33:1012-1021.
- [48]**Carey MC.** Pathogenesis of gallstones. *Am J Surg* 1993; 165:410-419.
- [49]**Carey MC, Hernell O.** Digestion and absorption of fat. *Seminars in Gastrointestinal Disease* 1992; 3:189-208.
- [50]**Carey MC.** The enterohepatic circulation. In: Arias IM, Popper H, Schachter D Shafritz DA (eds). *The liver: biology and pathobiology. Raven Press (1988), New York, USA; 429-465.*
- [51]**Turley SD, Dietschy JM.** The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (eds). *The liver: biology and pathobiology. Raven Press (1988), New York; 617-641.*
- [52]**Angelin B, Backman L, Einarsson K, Eriksson L, Ewerth S.** Hepatic cholesterol metabolism in obesity: activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Lipid Res* 1982; 23:770-773.
- [53]**Oude Elferink RP, Meijer DK, Kuipers F, Jansen PL, Groen AK, Groothuis GM.** Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1241:215-268.
- [54]**Nathanson MH, Boyer JL.** Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 1991; 14:551-566.

[55]**Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J et al.** The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998; 273:10046-10050.

[56]**Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G.** Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 2000; 32 Suppl 1:3-18.

[57]**Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL et al.** Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996; 271:1126-1128.

[58]**Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T et al.** cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271:15091-15098.

[59]**Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ.** Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 1997; 406:75-78.

[60]**Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T et al.** cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271:15091-15098.

[61]**Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ.** Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 1997; 406:75-78.

[62]**Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M et al.** A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res* 1996; 56:4124-4129.

[63]**Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y.** Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J Biol Chem* 1998; 273:1684-1688.

[64]**Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P et al.** Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 1999; 338:393-401.

[65]**Fuchs M, Carey MC, Cohen DE.** Evidence for an ATP-independent long-chain phosphatidylcholine translocator in hepatocyte membranes. *Am J Physiol* 1997; 273:G1312-G1319.

[66]**Berr F, Meier PJ, Stieger B.** Evidence for the presence of a phosphatidylcholine translocator in isolated rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1993; 268:3976-3979.

[67]**Kullak-Ublick GA, Gerloff T, Hagenbuch B, Berr F, Meier PJ, Stieger B.** Expression of a rat liver phosphatidylcholine translocator in *Xenopus laevis* oocytes. *Hepatology* 1996; 23:1254-1259.

[68]**Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L et al.** Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75(3):451-462.

[69]**Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ et al.** The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett* 1994; 354:263-266.

[70]**Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H et al.** Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001; 27:79-83.

[71]**Wittenburg H, Carey MC.** Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin Invest* 2002; 110:605-609.

[72]**Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H, Meier PJ.** Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10629-10633.

- [73]**Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawson PA.** Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 1994; 269:1340-1347.
- [74]**Craddock AL, Love MW, Daniel RW, Kirby LC, Walters HC, Wong MH et al.** Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium- dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 1998; 274:G157-G169.
- [75]**Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine S et al.** Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 1997; 100:2714-2721.
- [76]**Brown MS, Goldstein JL.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.
- [77]**Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M.** Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996; 271:518-520.
- [78]**Cooper AD.** Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38:2173-2192.
- [79]**Apstein MD, Carey MC.** Pathogenesis of cholesterol gallstones: a parsimonious hypothesis. *Eur J Clin Invest* 1996; 26(5):343-352.
- [80]**Goldstein JL, Brown MS.** Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res* 1984; 25:1450-1461.
- [81]**Smith JL, Madden LJ, De Jersey J.** Effect of exogenous cholesterol and dithiothreitol on the activity of human liver microsomal acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT). *Clin Chim Acta* 1996; 256:13-25.
- [82]**Ghosh S, Mallonee DH, Hylemon PB, Grogan WM.** Molecular cloning and expression of rat hepatic neutral cholesteryl ester hydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259:305-312.

[83]**Fuchs M, Stange EF.** Metabolism of bile acids. In: Bircher J, Benhamou JP, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J (eds). *Oxford Textbook of Clinical Hepatology. Oxford University Press (1997).*

[84]**Fuchs M, Lammert F, Wang DQ, Paigen B, Carey MC, Cohen DE.** Sterol carrier protein 2 participates in hypersecretion of biliary cholesterol during gallstone formation in genetically gallstone- susceptible mice. *Biochem J 1998; 336:33-37.*

[85]**Puglielli L, Rigotti A, Amigo L, Nunez L, Greco AV, Santos MJ et al.** Modulation of intrahepatic cholesterol trafficking: evidence by in vivo antisense treatment for the involvement of sterol carrier protein-2 in newly synthesized cholesterol transport into rat bile. *Biochem J 1996; 317:681-687.*

[86]**Salen G, Nicolau G, Shefer S, Mosbach EH.** Hepatic cholesterol metabolism in patients with gallstones. *Gastroenterology 1975; 69:676-684.*

[87]**Coyne MJ, Bonorris GG, Goldstein LI, Schoenfield LJ.** Effect of chenodeoxycholic acid and phenobarbital on the rate-limiting enzymes of hepatic cholesterol and bile acid synthesis in patients with gallstones. *J Lab Clin Med 1976; 87:281-291.*

[88]**Maton PN, Ellis HJ, Higgins JP, Dowling RH.** Hepatic HMG-CoA reductase in human cholelithiasis: effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. *Eur J Clin Invest 1980; 10:325-332.*

[89]**Key PH, Bonorris GG, Marks JW, Chung A, Schoenfield LJ.** Biliary lipid synthesis and secretion in gallstone patients before and during treatment with chenodeoxycholic acid. *J Lab Clin Med 1980; 95:816-826.*

[90]**Kern F, Jr.** Effects of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid homeostasis in patients with cholesterol gallstones. *J Clin Invest 1994; 93:1186-1194.*

[91]**Carulli N, De Leon MP, Zironi F, Pinetti A, Smerieri A, Iori R et al.** Hepatic cholesterol and bile acid metabolism in subjects with gallstones: comparative effects of short term feeding of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid. *J Lipid Res 1980; 21:35-43.*

[92]**Ahlberg J, Angelin B, Einarsson K.** Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and biliary lipid composition in man: relation to cholesterol gallstone disease and effects of cholic acid and chenodeoxycholic acid treatment. *J Lipid Res* 1981; 22:410-422.

[93]**Reihner E, Angelin B, Björkhem I, Einarsson K.** Hepatic cholesterol metabolism in cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res* 1991; 32:469-475.

[94]**Shoda J, He BF, Tanaka N, Matsuzaki Y, Osuga T, Yamamori S et al.** Increase of deoxycholate in supersaturated bile of patients with cholesterol gallstone disease and its correlation with de novo syntheses of cholesterol and bile acids in liver, gallbladder emptying, and small intestinal transit. *Hepatology* 1995; 21:1291-1302.

[95]**Fuchs M, Ivandic B, Müller O, Schalla C et al.** Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRBI. *Hepatology* 2001; 33:1451-1459.

[96]**Pittman RC, Steinberg D.** Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1984; 25:1577-1585.

[97]**Krieger M.** The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: a tale of two receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:4077-4080.

[98]**Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH.** Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 1996; 98:984-995.

[99]**Xu S, Laccotripe M, Huang X, Rigotti A, Zannis VI, Krieger M.** Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J Lipid Res* 1997; 38(7):1289-1298.

[100]**Empen K, Lange K, Stange EF, Scheibner J.** Newly synthesized cholesterol in human bile and plasma: quantitation by mass isotopomer distribution analysis. *Am J Physiol* 1997; 272:G367-G373.

[101]**Botham KM, Bravo E.** The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Prog Lipid Res* 1995; 34:71-97.

[102]**Scheibner J, Fuchs M, Schiemann M, Tauber G, Hörmann E, Stange EF.** Bile acid synthesis from newly synthesized vs. preformed cholesterol precursor pools in the rat. *Hepatology* 1993; 17:1095-1102.

[103]**Scheibner J, Fuchs M, Hörmann E, Tauber G, Stange EF.** Biliary cholesterol secretion and bile acid formation in the hamster: The role of newly synthesized cholesterol. *J Lipid Res* 1994; 35:690-697.

[104]**Schwartz ChC, Berman M, Vlahcevic ZR, Swell L.** Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. *J Clin Invest* 1982; 70:863-876.

[105]**Schwartz ChC, Zech LA, van den Broek JM, Cooper PS.** Cholesterol kinetics in subjects with bile fistula. Positive relationship between size of the bile acid precursor pool and bile acid synthetic rate. *J Clin Invest* 1993; 91:923-938.

[106]**Ito T, Kawata S, Imai Y, Kakimoto H, Trazskos JM, Matsuzawa Y.** Hepatic cholesterol metabolism in patients with cholesterol gallstones: enhanced intracellular transport of cholesterol. *Gastroenterology* 1996; 110:1619-1627.

[107]**Carey MC, LaMont JT.** Cholesterol gallstone formation. 1. Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. *Prog Liver Dis* 1992; 10:139-163.

[108]**Neese RA, Faix D, Kletke C, Wu K, Wang AC, Shackleton CHL et al.** Measurement of endogenous synthesis of plasma cholesterol in rats and humans using MIDA. *Am J Physiol* 1993; 264:E136-E147.

[109]**Hofmann AF, Small DM.** Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Annu Rev Med* 1967; 18:333-376.

[110]**Carey MC, Small DM.** The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J Clin Invest* 1978; 61:998-1026.

[111]**Paigen K.** A miracle enough: the power of mice. *Nat Med* 1995; 1:215-220.

[112]**Lander ES, Schork NJ.** Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994; 265:2037-2048.

- [113]**Wang DQ, Paigen B, Carey MC.** Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: physical-chemistry of gallbladder bile. *J Lipid Res* 1997; 38:1395-1411.
- [114]**Khanuja B, Cheah YC, Hunt M, Nishina PM, Wang DQ, Chen HW et al.** Lith1, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:7729-7733.
- [115]**Hillebrandt S, Bock HH, Matern S, Lammert F.** Polygene diseases: use of inbred mice for identification of disease-relevant genes. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126:17-19.
- [116]**Lander E, Kruglyak L.** Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995; 11(3):241-247.
- [117]**Lammert F, Carey MC, Paigen B.** Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 2001; 120:221-238.
- [118]**Wang DQ, Lammert F, Cohen DE, Paigen B, Carey MC.** Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276:G751-G760.
- [119]**Bligh EG.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biol Physiol* 1959; 37:911-917.
- [120]**Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
- [121]**Koopen NR, Wolters H, Voshol P, Stieger B, Vonk RJ, Meier PJ et al.** Decreased Na⁺-dependent taurocholate uptake and low expression of the sinusoidal Na⁺-taurocholate cotransporting protein (Ntcp) in livers of mdr2 P-glycoprotein-deficient mice. *J Hepatol* 1999; 30(1):14-21.
- [122]**Emmelot P, Bos CJ, van Hoeven RP, van Blitterswijk WJ.** Isolation of plasma membranes from rat and mouse livers and hepatomas. *Methods Enzymol* 1974; 31:75-90.

- [123]**Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [124]**Lammert F, Wang DQ, Paigen B, Carey MC.** Phenotypic characterization of Lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes. *J Lipid Res* 1999; 40:2080-2090.
- [125]**Nishina PM, Wang J, Toyofuku W, Kuypers FA, Ishida BY, Paigen B.** Atherosclerosis and plasma and liver lipids in nine inbred strains of mice. *Lipids* 1993; 28:599-605.
- [126]**Reihner E, Stahlberg D.** Lithogenic diet and gallstone formation in mice: integrated response of activities of regulatory enzymes in hepatic cholesterol metabolism. *Br J Nutr* 1996; 76:765-772.
- [127]**Wang DQ, Lammert F, Paigen B, Carey MC.** Phenotypic characterization of lith genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice. Pathophysiology Of biliary lipid secretion. *J Lipid Res* 1999; 40:2066-2079.
- [128]**Green RM, Lo K, Sterritt C, Beier DR.** Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter. *Hepatology* 1999; 29:1556-1562.
- [129]**Schweifer N, Barlow DP.** The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters. *Mamm Genome* 1996; 7:735-740.
- [130]**Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ et al.** Hepatocanalicuar bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1999; 117:1370-1379.
- [131]**Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H et al.** A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998; 20(3):233-238.

[132]Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ et al. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:2011-2016.

[133]Warskulat U, Kubitz R, Wettstein M, Stieger B, Meier PJ, Haussinger D. Regulation of bile salt export pump mRNA levels by dexamethasone and osmolarity in cultured rat hepatocytes. *Biol Chem* 1999; 380(11):1273-1279.

[134]Verkade HJ, Vonk RJ, Kuipers F. New insights into the mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion. *Hepatology* 1995; 21:1174-1189.

[135]Gupta S, Todd SR, Pandak WM, Muller M, Reno VZ, Hylemon PB. Regulation of multidrug resistance 2 P-glycoprotein expression by bile salts in rats and in primary cultures of rat hepatocytes 239. *Hepatology* 2000; 32:341-347.

[136]Frijters CM, Ottenhoff R, Van Wijland MJ, Van Nieuwkerk CM, Groen AK, Oude Elferink RP. Regulation of mdr2 P-glycoprotein expression by bile salts. *Biochem J* 1997; 321:389-395.

[137]Hooiveld GJ, Vos TA, Scheffer GL, Van Goor H, Koning H, Bloks V et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) induce hepatic expression of the phospholipid translocase mdr2 in rats. *Gastroenterology* 1999; 117:678-687.

[138]Bouchard G, Carey MC and Paigen, B. In the genetic locus containing the second cholesteryl gallstone gene *Lith2*, an *Mrp2* polymorphism is linked to heightened secretion of organic anions. *Gastroenterology* 2000; 108:A3724.

[139]Bouchard G, Casavant S, Korstanje R et al. Overactivity of ABCC2 is a major determinant of murine Cholesterol gallstone risk as evidenced by positional cloning, sequencing, and gene-targeted deletion. *DDW 2003, Abstract*.

8 Verzeichnisse

8.1 Abkürzungen

Anmerkung: Der Konvention entsprechend wurden die Gene der Maus in Kursivschrift geschrieben (Beispiel: *Bsep*). Menschliche Gene sind ebenfalls kursiv und in Großbuchstaben dargestellt (Beispiel: *BSEP*). Für die jeweiligen Proteine besteht in der Schreibweise kein Unterschied zwischen Mensch und Maus. Es werden jeweils Großbuchstaben verwendet (Beispiel: BSEP).

ABCG5/G8	ABC (<i>ATP-binding cassette</i>) Transporter G5/G8
ACAT	Acyl-CoA:Cholesterinacyltransferase
AKR/J	AKR/Jackson-Inzuchtmausstamm
AP	alkalische Phosphatase
APOE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSEP	Gallensäurenexportpumpe (<i>bile salt export pump</i>)
C57L/J	C57L/Jackson-Inzuchtmausstamm
cDNA	Komplementäre (<i>complementary</i>) Desoxyribonukleinsäure
CEH	Cholesterin-Ester-Hydrolase
Ch	Cholesterin
ChR	Chylomikronen-Remnants
cM	centi-Morgan
CoA	Coenzym A
CYP27	27-Hydroxylase
CYP7A1	Cholesterin 7 α -Hydroxylase
CYP8B1	12 α -Hydroxylase
DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
ddH ₂ O	doppelt demineralisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy-ribonuclein acid</i>)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol

ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GS	Gallensäure(n)
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
kD	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MDR2	Phosphatidycholin-Transporter, Maus (<i>multidrug resistance p-glycoprotein 2</i>)
MDR3	Phosphatidycholin-Transporter, Mensch (<i>multidrug resistance p-glycoprotein 3</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MRP2	Multispezifischer Anionentransporter(<i> multidrug resistance associated protein 2</i>)
NTCP1	Na ⁺ -abhängiges Taurocholat-Cotransportierendes Protein 1
OATP1	Organische Anionen-Transportierendes Polypeptid 1
OCT1	Organische Kationen-Transportierendes Protein 1
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonuclein acid</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
SCP2	<i>sterol carrier protein 2</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)

SR-BI	HDL-Rezeptor (<i>scavenger receptor class b type 1</i>)
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBS	Tris-Puffer (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Umin ⁻¹	Umdrehungen pro Minute

8.2 Abbildungen

1: Hepatozelluläre Transportsysteme.	12
2: Hypothetisches Modell der Bildung von Cholesteringallensteinen.	13
3: Cholesterinaufnahme, -stoffwechsel und -transport.	18
4: Operationssitus.	30
5: Hepatische Gesamtcholesterinkonzentration.	44
6: Effekt der lithogenen Diät auf die <i>Ntcp1</i> mRNA-Expression.	47
7: Effekt der lithogenen Diät auf die NTCP1 Proteinexpression.	48
8: Effekt der lithogenen Diät auf die <i>Oatp1</i> mRNA-Expression.	49
9: Effekt der lithogenen Diät auf die OATP1 Proteinexpression.	50
10: Effekt der lithogenen Diät auf die <i>Oct1</i> mRNA-Expression.	51
11: Effekt der lithogenen Diät auf die <i>Bsep</i> mRNA-Expression.	53
12: Effekt der lithogenen Diät auf die BSEP Proteinexpression.	54
13: Effekt der lithogenen Diät auf die <i>Mdr2</i> mRNA-Expression.	55
14: Effekt der lithogenen Diät auf die MDR2 Proteinexpression.	56
15: Effekt der lithogenen Diät auf die <i>Mrp2</i> mRNA-Expression.	57
16: Änderung der Expression hepatozellulärer Plasmamembrantransporter bei gallensteinempfindlichen C57L- Mäusen nach lithogener Diät.	62

8.3 Tabellen

1: Humane Gallensteingene.	8
2: Cholesterinsteinbildung - Risikofaktoren und pathophysiologische Mechanismen.	14
3: Murine Gallensteingene.	22
4: Sequenzen der eingesetzten PCR-Primer.	37
5: Primärantikörper.	41
6: Diät, Gallensteinentstehung, Körper- und Lebergewicht.	43
7: Biliäre Lipidsekretionsraten und Cholesterin (Ch)/ Phospholipid-Verhältnis.	45

Eigene Veröffentlichungen

ORIGINALARBEITEN

Müller O, Schalla C, Scheibner J, Stange EF and Fuchs M. Expression of liver plasma membrane transporters in gallstone-susceptible and gallstone-resistant mice. *Biochem J* 2002; 36:673-679.

Fuchs M, Ivandic B, Müller O, Schalla C, Scheibner J, Bartsch P and Stange EF. Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the HDL receptor SRBI. *Hepatology* 2001; 33:1451-1459.

VORTRÄGE/

POSTERPRÄSENTATIONEN

Posterpräsentation von Teilen der Promotionsarbeit anlässlich der "Third International Conference on Gallstones", Tiberias, Israel (10.- 14. Okt. 1999):

Müller O, Schalla C, Bartsch P, Scheibner J, Ivandic B, Stange EF, Fuchs M. Cholesterol trafficking in mouse liver: Avenues for the development of novel strategies to prevent cholesterol gallstone formation.

Vorstellung von Teilen der Promotionsarbeit in Vortragsform anlässlich der "7th United European Gastroenterology Week", Rom, unter oben genanntem Titel. Auszeichnung mit dem Preis für den besten Abstrakt (13.- 17. Nov. 1999). *Gut* 45:A1203.

ABSTRACTS

Fuchs M, Steimann G, Müller O, Stange EF. Hepatische Überexpression des high density Lipoprotein (HDL)-Rezeptors (Srb1) im Rahmen der genetisch bedingten Gallensteinbildung bei Mäusen. *Z Gastroenterol* 1998; 36:358.

Fuchs M, Steimann G, Müller O, Schalla C, Bartsch P and Stange EF. Hepatic overexpression of Class B scavenger receptor (SR-BI) during cholesterol (Ch) gallstone formation in inbred mice. *Hepatology* 1998; 28:A502.

Fuchs M, Schalla C, Müller O, Stange EF. Caveolin-1 levels are upregulated during biliary cholesterol hypersecretion: implications for bile formation. *Gastroenterology* 1999; 116:L0143.

Fuchs M, Xu G.-Q., Müller O, Scheibner J, Ivandic B, Stange EF. Differential expression of sterol regulatory element binding proteins may contribute to gallstone susceptibility in mice. *Hepatology* 2000; 30:A1078.

Danksagung

Die vorgelegte Arbeit entstand in der Medizinischen Klinik I (Bereich Gastroenterologie) der Universität zu Lübeck. Den Mitarbeitern der Abteilung danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn PD Dr. Michael Fuchs für die Vergabe des Themas der Dissertation und seine einzigartige Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Seine mitreißende Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten und seine stetige Unterstützung gingen weit über das übliche Maß hinaus.

Meinem Chef **Herrn Prof. Dr. Eduard F. Stange** für seine jederzeit großzügige leitende Betreuung der Arbeit sowie ständige Verfügbarkeit. Seine kompetente und konstruktive Kritik und sein vorbildliches Interesse an der Fertigstellung der Arbeit waren von unschätzbarem Wert.

Frau **Nadine Katzberg** und Frau **Garnet Steimann** für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit und das stets herzliche Arbeitsklima.

Herrn **Dr. Jürgen Scheibner** für seine stetige Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich meiner Mitdoktorandin **Carmen Geisler (vormals Schalla)** für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei all jenen Freunden und Kollegen, die mich tatkräftig unterstützt und phasenweise auch tapfer ertragen haben. Eine namentliche Auflistung würde den Rahmen sprengen.

Die Versuche wurden mit finanzieller Unterstützung durch die **Deutsche Forschungsgemeinschaft** (Fu 288/2), die **Freunde und Förderer der Universität zu Lübeck** und die **Reinhold Jarchow-Stiftung** durchgeführt.

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Oliver Müller
Geburtstag und -ort: 21. Dezember 1973 in Radautz/ Rumänien
Adresse und Email: Yitzhak-Rabin-Str. 3 in 70376 Stuttgart; oliver.mueller@rbk.de

Schulen:

08/1986-06/ 1988 Hofmann von Fallersleben Gymnasium in Braunschweig
08/1988-05/1993 Graf-Friedrich-Schule (Gymnasium) in Diepholz, Abitur

Grundwehrdienst:

07/1993-09/1993 Grundausbildung, Sanitätsschule der Luftwaffe, Giebelstadt
10/1993-06/1994 Bundeswehrkrankenhaus Bad Zwischenahn

Studium:

1994-2001 Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
09/1996 Ärztliche Vorprüfung
08/1997 I. Staatsexamen, Humanmedizin
03/1998 Workshop für Evidence Based Medicine unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
03/2000 II. Staatsexamen, Humanmedizin
08/2000-07/2001 Praktisches Jahr:
1. Department of General Surgery, MSH and TGH, Toronto
2. Department of General Surgery, Manly Hospital, Sydney
3. Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein - Campus Lübeck
4. Klinik für Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Süd, Lübeck
10/2001 III. Staatsexamen, Humanmedizin

Promotion:

11/1997–02/2001 Experimentelle Durchführung an der Medizinischen Klinik I,
Direktor: Prof. Dr. H. L. Fehm

Beruf:

12/2001-05/2003 Arzt im Praktikum am Robert Bosch Krankenhaus in Stuttgart,
Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie
(Zentrum für Innere Medizin I),
Leiter: Prof. Dr. E.F. Stange, Chefarzt
Seit 06/2003 Assistenzarzt am Robert Bosch Krankenhaus in Stuttgart, Zentrum
für Innere Medizin