

Aus der Klinik für Innere Medizin II - Gastroenterologie und Endokrinologie  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert

**Biliäre Lipidsekretion bei leberspezifischem Knock-out des  
Cholesterintransporters ABCG5/G8**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2019

vorgelegt von Friederike Poppenborg,  
geboren am 17.12.1984 in Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2020

Erstberichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Lammert

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. sc. nat. ETH Markus Bischoff

# Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung-Abstract. . . . .	1
2 Einleitung und Problemstellung. . . . .	5
3 Theoretischer Hintergrund . . . . .	7
3.1 Physiologie der Gallenbildung . . . . .	7
3.1.1 Anatomie der Leber und der Gallenwege . . . . .	7
3.1.2 Die Galle . . . . .	8
3.2 Pathologie der Gallensteine . . . . .	14
3.2.1 Epidemiologie . . . . .	14
3.2.2 Genetische Prädisposition für eine Cholelithiasis . . . . .	15
3.2.3 Exogene Faktoren . . . . .	16
3.2.4 Verschiedene Gallensteine und ihre Pathologie. . . . .	16
3.3 ABC-Transporter. . . . .	23
3.3.1 ABCB4 und ABCB11 Transporter. . . . .	24
3.3.2 ABCG5/G8 Transporter. . . . .	25
3.3.3 Herstellung der <i>Abcg5/g8</i> Knock-out Mäuse mit dem Cre-lox System. . . . .	25
4 Methodik . . . . .	28
4.1 Mausmodelle . . . . .	29
4.2 Haltung und Fütterung der Mäuse . . . . .	29
4.3 Probengewinnung durch Anlage einer akuten Gallenfistel. . . . .	30
4.4 Analyse der Gallenzusammensetzung. . . . .	30
4.4.1 Cholesterinbestimmung . . . . .	31
4.4.2 Phospholipidbestimmung . . . . .	32
4.4.3 Gallensäurenbestimmung . . . . .	33
4.5 Berechnungen und statistische Methoden . . . . .	34
4.5.1 Berechnungen . . . . .	34
4.5.2 Statistische Methoden . . . . .	35
5 Ergebnisse: Auswirkungen der lithogenen Diät auf die Wildtyp-Mäuse und die AlbCre-Mäuse . . . .	37
5.1 Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	37
5.1.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht . . . . .	37

5.1.2	Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex . . . . .	38
5.1.3	Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion . . . . .	38
5.1.4	Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration . . . . .	41
5.2	Vergleich zwischen AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	43
5.2.1	Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht . . . . .	43
5.2.2	Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex . . . . .	43
5.2.3	Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion . . . . .	44
5.2.4	Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration . . . . .	46
5.3	Zusammenfassung . . . . .	47
6	Ergebnisse: Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	49
6.1	Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler Diät. . . . .	49
6.1.1	Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht . . . . .	49
6.1.2	Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex . . . . .	50
6.1.3	Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion . . . . .	50
6.1.4	Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration . . . . .	53
6.2	Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei lithogener Diät . . . . .	54
6.2.1	Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht . . . . .	54
6.2.2	Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex . . . . .	55
6.2.3	Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion . . . . .	55
6.2.4	Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration . . . . .	58
6.3	Zusammenfassung . . . . .	58
7	Ergebnisse: Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	60
7.1	Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler Diät . . . . .	60
7.1.1	Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht . . . . .	60
7.1.2	Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex . . . . .	61

7.1.3	Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion . . . . .	61
7.1.4	Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration . . . . .	63
7.2	Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei lithogener Diät . . . . .	65
7.2.1	Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht . . . . .	65
7.2.2	Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex . . . . .	65
7.2.3	Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion . . . . .	66
7.2.4	Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration . . . . .	69
7.2.5	Cholesterin/Phospholipid-Verhältnis der VilCre- und AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	70
7.3	Zusammenfassung . . . . .	71
8	Diskussion . . . . .	72
8.1	Auswirkungen der lithogenen Diät auf die Wildtyp-Mäuse und die AlbCre-Mäuse . . . . .	72
8.1.1	Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	72
8.1.2	Vergleich zwischen AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	73
8.2	Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	74
8.3	Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	77
9	Anhang . . . . .	80
10	Literaturverzeichnis . . . . .	81
11	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	94
12	Abbildungsverzeichnis . . . . .	98
13	Tabellenverzeichnis. . . . .	102

Danksagung

Lebenslauf

# 1. Zusammenfassung - Abstract

## Zusammenfassung

Erste Berichte zur genetischen Prädisposition für die Entstehung von Gallensteinen wurden bereits in den 30iger Jahren von Körner et al. [1, 2] veröffentlicht. In Studien an unterschiedlichen ethnischen Gruppen konnten diese Erkenntnisse mehrfach belegt werden [2–10]. Durch weitere Untersuchungen gelang es Buch et al. [2] 2007 den Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) p.D19H im *ABCG8*-Gen zu identifizieren, der signifikant mit der Entwicklung von Gallensteinen assoziiert ist. Bereits ein Jahr zuvor hatten Acalovschi et al. [11] gezeigt, dass genetische Varianten des *ABCG5/G8*-Gens mit veränderten Plasmalipidspiegeln assoziiert sind und dadurch die biliäre Cholesterinkonzentration und die Bildung von Gallensteinen beeinflussen können. Das *ABCG5/G8*-Gen kodiert für einen heterodimeren, ATP-abhängigen Cholesterintransporter, der in der Leber und im Darm exprimiert wird [11]. Weitere Arbeiten [12, 13] hatten zum Ziel, die Auswirkungen des singulären *Abcg5* bzw. *Abcg8* Knock-outs oder des kombinierten *Abcg5/g8* Knock-outs auf den Organismus zu untersuchen. Diese Arbeiten liefern jedoch zum Teil widersprüchliche Aussagen. Wang et al. [14] verfolgten einen anderen Forschungsansatz und untersuchten die organspezifische (hepatische und intestinale) Rolle des *ABCG5/G8* Transporters. Hierbei wurden Wildtyp-Mäuse mit Mäusen, bei denen der *ABCG5/G8* Transporter in der Leber und/oder Darm fehlt, bezüglich bestimmter Parameter untersucht. Dieser experimentelle Ansatz wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Die Auswirkungen einer lithogenen Diät wurden von Wang et al. nicht untersucht, außerdem wurden keine Cholesterinsekretionsraten gemessen und die biliäre Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration, die für die Ermittlung des Cholesterinsättigungsindex (CSI) erforderlich sind, wurden nicht in hepatischer Galle bestimmt. In der vorliegenden Arbeit werden sowohl die Auswirkungen der lithogenen Diät auf die Wildtyp-Mäuse und auf die entsprechenden Knock-out Mäuse, mit Fokus auf den hepatischen Knock-out, analysiert als auch die absoluten Gallensäurensekretionswerte und die CSI-Werte ermittelt. C. Rebholz [15] untersuchte in ihrer Arbeit die Auswirkungen des intestinalen *ABCG5/G8* Knock-outs mit den gleichen Untersuchungsmetho-

den wie in der vorliegenden Arbeit. Daher eignen sich diese Daten für einen Vergleich zwischen intestinale[m] [15] und hepatischem Knock-out.

Der Vergleich der Wildtyp-Mäuse unterschiedlicher Diät zeigt die Auswirkungen der lithogenen Diät auf die Kontrollgruppe. Es wird deutlich, dass die gefütterten Tiere durch eine gesteigerte biliäre Sekretion an Cholesterin und Phospholipiden versuchen, dem Überangebot an Lipiden entgegenzuwirken. Dieser Kompensationsversuch scheint jedoch an seine Grenzen zu kommen, da das Lebergewicht unter lithogener Diät ansteigt und sich makroskopisch eine Leberverfettung entwickelt.

Die Analyse der Sekretionswerte der AlbCre-Mäuse zeigt unerwartete Ergebnisse. Trotz des *Abcg5/g8* Knock-outs in der Leber sind die AlbCre-Mäuse fähig, Cholesterin aus der Leber in die Galle zu sezernieren. Unter normaler Diät haben sie sogar einen höheren absoluten Cholesterinoutput als die entsprechenden Kontrollen. Dies bestätigt die in Wang et al. [16] gemachte Beobachtung, dass ein ABCG5/G8 unabhängiger Sekretionsweg des Cholesterins existiert. Wieso die AlbCre-Mäuse unter normaler Diät sogar mehr Cholesterin als die Wildtyp-Mäuse sezernieren, kann noch nicht erklärt werden. Unter lithogener Diät sind die AlbCre-Mäuse dagegen nicht fähig, die Cholesterinsekretion in der gleichen Weise wie ihre Kontrollgruppe zu steigern. Der ABCG5/G8 unabhängige Sekretionsweg scheint schneller seine Kompensationsgrenze zu erreichen als der ABCG5/G8 abhängige Transportweg. Dies wird durch eine Zunahme des Lebergewichts der AlbCre-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen bei lithogener Diät deutlich.

Auffällig sind weiterhin die geringen Gallensäuresekretionswerte der AlbCre-Mäuse, für die, unabhängig von der Diätform, eine maximale Sekretionsrate zu existieren scheint. Auf welche Art und Weise es zu einer Beeinflussung der Gallensäuresekretion durch den *Abcg5/g8* Knock-out kommt, ist derzeit unklar.

Eine erstaunliche Beobachtung konnte beim Vergleich der AlbCre-Mäuse mit den VilCre-Mäusen gemacht werden. Trotz des unterschiedlichen gewebsspezifischen *Abcg5/g8* Knock-outs zeigen diese beiden Mausmodelle unabhängig von der Diätform im Wesentlichen den gleichen Phänotyp. Sie unterscheiden sich bei normaler und bei lithogener Diät weder im Körper- und Lebergewicht noch in den absoluten Outputwerten der Lipide. Dieses Ergebnis war unerwartet und zeigt, dass die Funktionsweise des Transporters nicht auf ein Gewebe beschränkt ist, sondern vielmehr Wechselwirkungsmechanismen zwischen verschiedenen Transportern existieren. Die zum Teil widersprüchlichen Vorarbeiten hinsichtlich der intestinalen Sterolabsorption bei *Abcg5/g8* Knock-out Mäusen zeigen, dass der genaue Mechanismus des Transporters noch nicht hinreichend verstanden ist. Die experimentellen Daten dieser Arbeit verdeutlichen jedoch, dass nicht von der Annahme einer unabhängigen gewebsspezifischen Funktionsweise dieser Transporter ausgegangen werden kann.

## Abstract

First evidence for genetic susceptibility for gallstone formation was found by Körner et al. in the 1930s [1, 2]. These pieces of evidence were confirmed by studies with different ethnic tribes [2–10]. In 2007 Buch et al. successfully identified a single-nucleotide polymorphism (SNP) in the *ABCG8* gene, resulting in the amino acid substitution p.D19H, which is significantly associated with gallstone formation. Already in 2006, Acalovschi et al. [11] showed that *ABCG5/G8* gene variants modify plasma lipid levels and thereby biliary cholesterol concentration. The *ABCG5/G8* gene codes for the heterodimeric, ATP-dependent, intestinal and hepatic cholesterol transporter. Further analysis aimed to investigate the consequences of a single *Abcg5* or *Abcg8* knock-out and of a combined *Abcg5/g8* knock-out. However, these studies reported inconsistent findings. Wang et al. [14] made use of a different experimental approach and examined the organ- (intestine- or liver-) specific role of the *ABCG5/G8* transporter. They compared wild-type mice with intestine-specific, liver-specific and total knock-out mice. The same approach is used in the present work. The consequences of a lithogenic diet were not investigated by Wang et al.. Furthermore, in Wang et al. [14] no cholesterol secretion rates were measured and no phospholipid and bile acid concentration, which are essential to calculate the cholesterol-saturated fat index (CSI) value, were determined in hepatic bile. In the present work the consequences of a lithogenic diet for wild-type and liver-specific *Abcg5/g8* knock-out mice are analysed and the absolute bile acid secretion rates and CSI values are determined. C. Rebholz [15] investigated the consequences of an intestine-specific knock-out. In her and in the present work the same experimental and analytical methods were used. Therefore, these data are suitable for comparing the intestine- and the liver-specific *Abcg5/g8* knock-out.

The comparison of wild-type mice with and without lithogenic diet reveals the consequences of a lithogenic diet for the control group. The lithogenic diet-fed mice display increased biliary secretion rates of cholesterol and phospholipids for coping with the excessive supply of lipids. However, it seems that this compensation reaches its limit, as reflected by the increased liver weight and fatty liver development.

The analysis of the AlbCre mice secretion rates showed unexpected results. Despite the liver-specific *Abcg5/g8* knock-out, AlbCre mice secrete cholesterol from liver into bile. The AlbCre mice fed with normal diet even reach higher cholesterol output values than the control group. This observation confirms Wang's [16] assumption of an *ABCG5/G8* independent mechanism of cholesterol secretion. The reason why the AlbCre mice, fed with normal diet, even show higher cholesterol secretion rates than wild-type mice has not been identified yet. The lithogenic diet-fed AlbCre mice are not able to increase the cholesterol secretion in the same way as the corresponding wild-type mice. Therefore, it seems as if the *ABCG5/G8* independent



secretion way has a lower compensation level than the ABCG5/G8 dependent mechanism. This is reflected by the increased liver weight of AlbCre mice as compared to the control group.

Furthermore, the low bile acid secretion values of the AlbCre mice are conspicuous, and it seems as if there was a maximal bile acid secretion rate independent of the diet. How the *Abcg5/g8* knock-out modifies bile acid secretion cannot be explained to date.

The comparison between the AlbCre and the VilCre mice resulted in a surprising observation: Despite the tissue-specific *Abcg5/g8* knock-out, both mouse strains exhibit similar phenotypes, independent of the diet. There are no specific differences on normal or lithogenic diet, neither between body and liver weight nor between absolute lipid output. This result was unexpected and demonstrates that the function of the transporter is not restricted to one tissue. In contrast, there must be interaction between the different transporters. The previous, at exact in part contradictory, results concerning the intestinal sterol absorption in *Abcg5/g8* knock-out mice indicate that the exact mechanism of the transporter has not been fully understood by now. The experimental data of the present work demonstrate that an independent tissue-specific mechanism for cholesterol excretion cannot be postulated.

## 2. Einleitung und Problemstellung

Weltweit gesehen entstehen bei bis zu 20 % der Erwachsenen während ihres Lebens Gallensteine, von denen wiederum mehr als 20 % Symptome oder Komplikationen entwickeln [17]. Es ist bekannt, dass Faktoren des metabolischen Syndroms das Risiko für die Entwicklung von Gallensteinen erhöhen. Somit stellen eine gesunde und ausgewogene Ernährung sowie sportliche Aktivität Primärfaktoren in der Prävention der Gallensteinerkrankung dar. Weibliches Geschlecht, Schwangerschaft und höheres Alter sind weitere Risikofaktoren für Gallensteine [17]. 25 % des Gesamtrisikos sind jedoch auf die genetische Veranlagung zurückzuführen [17]. Hierbei wurden vor allem Mutationen im hepatischen *ABCG5/G8* Cholesterin-Transporter als genetische Ursache identifiziert [17]. Durch Forschungsarbeiten in den letzten Jahren konnte ein besseres Verständnis über die Pathophysiologie der Gallensteinentstehung gewonnen werden. Jedoch sind die genetischen Ursachen sowie die genaue Funktion des hepatischen und intestinalen *ABCG5/G8* Transporters und ein eventuelles Zusammenspiel mit anderen Transportern noch nicht vollständig erforscht. Verschiedene Studien konnten bereits belegen, dass insbesondere der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) p.D19H des *ABCG8*-Gens innerhalb unterschiedlicher ethnischer Stämme mit der Bildung von Gallensteinen assoziiert ist [2–10]. Bei der p.D19H-Variante ist im ersten Exon des *ABCG8*-Gens, welches sich auf Chromosom 2p21 befindet, im ersten Basentriplett die Base Guanin zu Cytosin verändert. Durch diesen Tausch kodiert das Basentriplett für die Aminosäure Histidin anstatt für Asparaginsäure [2]. Untersuchungen, inwiefern ein intestinaler oder hepatischer Knock-out dieses Transporters zur Gallensteinbildung beiträgt und welche Auswirkungen ein organspezifischer Knock-out auf den Organismus besitzt, stehen noch am Anfang [14]. Bis jetzt wurde kein Vergleich der absoluten Cholesterinsekretionsraten beider Knock-out Varianten durchgeführt.

In dieser Arbeit werden anhand von genetisch veränderten Mäusen die Auswirkungen des Fehlens des hepatischen *ABCG5/G8* Transporters bei voller Funktion im restlichen Organismus untersucht. Es wird ein Vergleich zwischen diesen Mäusen und Mäusen, bei denen der *ABCG5/G8* Transporter im Darm fehlt, durchgeführt. Die lithogene Diät modelliert dabei unsere heutige westliche Ernährung, sodass zusätzlich

die Auswirkungen dieses Ernährungsstils sowohl auf die genetisch veränderten Mäuse als auch auf die Kontrollmäuse untersucht werden.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, einen genaueren Einblick in die Funktionsweise des ABCG5/G8 Transporters zu gewinnen, um damit ein besseres Verständnis für das genetische Risiko des Gallensteinleidens zu erlangen. Damit erhofft man sich die Entwicklung neuer präventiver Methoden, besonders für Hochrisikopatienten, um der Entstehung von Gallensteinen früh entgegenzuwirken und dadurch den zum heutigen Zeitpunkt häufig unumgänglichen chirurgischen Eingriff zu vermeiden [17].

## 3. Theoretischer Hintergrund

### 3.1 Physiologie der Gallenbildung

#### 3.1.1 Anatomie der Leber und der Gallenwege

Die Leber besteht zu 80% aus Hepatozyten [18] und wird in einzelne Leberläppchen (Lobuli hepatis) unterteilt, die durch Bindegewebe voneinander getrennt sind [19]. Die Lobuli hepatis sind in Längsachse um das zentral abführende Gefäß, die Vena centralis, gruppiert [19]. Innerhalb eines Lobuli hepatis ordnen sich die Hepatozyten radiär um die im Zentrum liegende Vena centralis an [19]. In dem Bereich, wo mehrere Lobuli hepatis aufeinander treffen, befinden sich die Periportalfelder [19]. Dies sind bindegewebige Strukturen, die die Glisson-Trias enthalten [19]. Die Glisson-Trias besteht aus den zuführenden Blutgefäßen, der Vena interlobularis aus der Vena portae hepatis und die Arteria interlobularis aus der Arteria hepatica propria, sowie einem Ast der kleinen ableitenden Gallengänge (Ductus interlobularis) [19]. Innerhalb der Leberläppchen vermischt sich das venöse (ca. 75 %) und arterielle (ca. 25 %) Blut und fließt in den Sinusoiden, zwischen den Wänden der Hepatozyten, zur Vena centralis und weiter in die untere Hohlvene [18] [19]. Die Sinusoide sind mit gefenstertem Endothelzellen ausgekleidet [19]. Zwischen Endothelzellen und der basolateralen Oberfläche der Hepatozyten befindet sich der sogenannte Disse-Raum, durch den der gesamte Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten erfolgt. Zwischen den apikalen Membranen zweier gegenüberliegender Hepatozyten liegen die ca. 1 µm weiten Gallenkanälchen (Canaliculi biliferi) [18]. Aufgrund der Anatomie ist ein vektorieller Transport zwischen Blut und Galle möglich [18]. Die Canaliculi biliferi sind durch Tight Junctions und Desmosomen abgedichtet und besitzen keine eigene Endothelwand [18]. In den Canaliculi biliferi sammelt sich die von den Hepatozyten sezernierte Galle, welche als Primärgalle bezeichnet wird [18]. Sie fließt entgegen dem Blutstrom in die größeren Gallengänge, die Ductuli biliferi interlobulares [18, 19]. Diese befinden sich in den Periportalfeldern und besitzen ein eigenes Epithel aus Cholangiozyten [18, 19]. In den Gallengängen wird die Primärgalle modifiziert und als Lebergalle bezeichnet [18]. Die Galle der einzelnen Leberläppchen sammelt sich schließlich im Ductus hepatici dexter und sinister, die sich außerhalb der Leber zum Ductus hepaticus communis vereinigen [20]. Mit dem Ductus hepaticus communis begin-

nen die extrahepatischen Gallenwege [20], über die täglich etwa 900 ml Galle die Leber verlassen [18]. Vom Ductus hepaticus communis zweigt der Ductus cysticus ab, welcher zur Gallenblase läuft [20]. Der Ductus hepaticus verläuft weiter als Ductus choledochus, vereinigt sich mit dem Ductus pancreaticus des Pankreas und mündet gemeinsam mit diesem auf der Papilla Vateri ins Duodenum [20]. Zu gleichen Anteilen fließt die Galle ins Duodenum und in die Gallenblase, wo sie auf das 10-20 fache konzentriert wird [18].

## 3.1.2 Die Galle

### 3.1.2.1 Bestandteile der Galle

Die Galle besteht im Wesentlichen aus Wasser, welches mit mehr als 80 % den überwiegenden Anteil ausmacht, und den folgenden Hauptbestandteilen: Gallensäuren (67 %), Phosphatidylcholin (Lecithin) und andere Phospholipide (22 %) und Cholesterin (4 %) [20]. Zusätzlich enthält sie Bilirubin sowie weitere Produkte der Biotransformation [18]. Die Zusammensetzung der Galle verändert sich während ihres Weges durch die Gallenwege [18]. In den Canaliculi biliferi spricht man von der Primärgalle, die innerhalb der Leber zur Lebergalle modifiziert wird [18]. Diese unterscheidet sich von der Blasengalle, welche in der Gallenblase gespeichert wird [18]. Cholesterin dient als Ausgangssubstanz in den Hepatozyten für die Bildung der primären (neu synthetisierten), unkonjugierten Gallensäuren [18, 21]. Die bedeutendsten Gallensäuren sind die Cholsäure und die Chenodeoxycholsäure [21]. Die Enzyme, welche die Biosynthese der Gallensäure aus Cholesterin beschleunigen, befinden sich u.a. im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien der Hepatozyten [20]. Der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Hydroxylierung des Cholesterins an Position 7 durch die Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase [20, 21]. Diese wird in Form einer Feedback-Hemmung durch das Endprodukt, die Gallensäuren, gehemmt [20]. Die Gallensäuren stellen somit eine Ausscheidungsform des Cholesterins dar, welches ansonsten in Form von Cholesterin direkt über die Galle mit der Faeces ausgeschieden werden kann [18].

Cholesterin besteht aus 27 C-Atomen [21]. Es ist ein langgestrecktes Molekül, das lediglich am dritten C-Atom eine OH-Gruppe besitzt, wodurch es schwach polar ist [21]. Überwiegend ist es hydrophob und schlecht im Wasser löslich [21]. Gallensäuren gehören wie Cholesterin zu den Steroiden [21]. Sie besitzen eine im Vergleich zum Cholesterin verkürzte Seitenkette und bestehen insgesamt aus 24 C-Atomen [21]. Im Unterschied zum Cholesterin weisen Gallensäuren an der Seitenkette eine Carboxylgruppe auf und besitzen außerdem bis zu drei OH-Gruppen am Steroidringsystem [21]. Im Gegensatz zur *trans*-Stellung des Steroidgerüsts im Cholesterinmolekül ist allen Gallensäuren die *cis*-Verknüpfung der Ringe A/B und die

$\alpha$ -Stellung der OH-Gruppen gemeinsam. Dies verleiht den Gallensäuren ihren amphipathischen Charakter [22, 23].

Die Gallensäuren regulieren zudem die Cholesterinbiosynthese, die primär durch die orale Cholesterinaufnahme gesteuert wird [21]. Durch eine verminderte Gallensäurenresorption im Darm (enterohepatischer Kreislauf) wird die Cholesterinbiosynthese in der Leber gesteigert und gleichzeitig die Cholesterinkonzentration im Blut gesenkt [21]. Durch die geringere Gallensäurenrückresorption im Darm und damit verminderte Gallensäurenkonzentration in der Leber wird in der Leber die Biosynthese von Gallensäuren aus Cholesterin beschleunigt [21]. Die Wechselwirkung zwischen Cholesterinbiosynthese und Gallensäurenresorption zeigt sich auch beim gegenteiligen Effekt, der Hemmung der Cholesterinbiosynthese bei oraler Aufnahme von freien und konjugierten Gallensäuren in hoher Konzentration, wodurch gleichzeitig die Cholesterinausscheidung verringert wird [21].

#### 3.1.2.2 Gallensäurenbildung und enterohepatischer Kreislauf

Die Gallensäuren, welche in den Hepatozyten aus Cholesterin gebildet werden, bezeichnet man als unkonjugierte Gallensäuren [21]. Bevor sie in die Galle sezerniert werden, werden sie mit Taurin, Glycin, Glucuronat oder Sulfat konjugiert [18, 20]. Dadurch wird ihre Wasserlöslichkeit weiter erhöht, sodass sie der Fettabsorption besser dienen können [18, 20]. Die Bestandteile der Galle werden hauptsächlich aktiv von den Hepatozyten sezerniert (s. Abschnitt 3.3) [21]. 50 % der Lebergalle wird in der Gallenblase gespeichert. Die anderen 50 % gelangen in den Darm, wo über 90 % der Gallensäuren im distalen Ileum von den Enterozyten rückresorbiert werden. Sie gelangen, an Albumin gebunden, über das Pfortaderblut zurück zur Leber [18].

An der basolateralen Membran der Hepatozyten werden durch einen sekundär-aktiven  $\text{Na}^+$ -Symport (NTCP: Natrium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide) die Gallensäuren aus dem Blut in die Hepatozyten aufgenommen [21]. Die Sekretion der Bestandteile der Galle an der apikalen Membran der Hepatozyten in die Gallenkanälchen erfolgt vorwiegend durch ATP-abhängige Transporter [21], welche zum Teil in Abschnitt 3.3 genauer erläutert werden. Im unteren Dünndarm kann es zu einer Dekonjugation der primären Gallensalze durch Bakterien kommen [18]. Sie werden als sekundäre Gallensalze bezeichnet. Diese gelangen über das Pfortaderblut und überwiegend durch nicht-ionische Diffusion zurück in die Hepatozyten, wo sie erneut konjugiert werden [18]. Die Zirkulation zwischen Leber und Dünndarm wird als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet [18]. Durch den großen Anteil der Gallensäuren, die den enterohepatischen Kreislauf durchlaufen, werden pro Tag nur ca. 0,6 g Gallensäuren, bei einem im Körper zirkulierenden Gallensäure-Gesamtgehalt von 3 g, neu synthetisiert [18]. Pro Tag werden 12 - 36 g Gallensäuren zur Verdauung der

Lipide benötigt, sodass die Gallensäuren bis zu 12 Mal am Tag den enterohepatischen Kreislauf durchlaufen [18]. Durch die Neusynthese wird lediglich der Verlust über die Faeces kompensiert [21]. Über die Galle werden nicht nur körpereigene Substanzen wie Cholesterin, Bilirubin und Steroidhormone, sondern auch körperfremde Stoffe wie Medikamente ausgeschieden [21].

#### 3.1.2.3 Primärgalle

Die Primärgalle wird über einen aktiven Prozess aus den Hepatozyten sezerniert [18]. Die Gallensäuren stellen dabei den Hauptbestandteil dar [18]. Durch den erzeugten osmotischen Gradienten diffundiert Wasser passiv durch die Tight Junctions in die Canaliculi biliferi und zieht Ionen in Form eines Solvent Drag mit sich [18]. Die Primärgalle ist isoosmotisch und enthält Gallensäuren, Fettsäuren, Bilirubin (das Abbauprodukt des Hämoglobins), Phospholipide, Cholesterin und Proteine [18]. Die Gallensäuren halten wasserunlösliche Substanzen wie Fettsäuren und Cholesterin durch Bildung von Mizellen in Lösung. Diese können auch Phospholipide enthalten, die die Löslichkeit von Cholesterin in den Mizellen erhöhen [18]. Cholesterin lagert sich in den Mizellen ein, sodass es in Lösung gehalten werden kann [18]. Die aktive Sekretion der Gallensäuren fördert gleichzeitig die aktive Sekretion an Phospholipiden und Cholesterin [18]. Wird die Sekretion der Gallensäuren verringert, wird auch die Menge der anderen aktiv sezernierten Substanzen drastisch reduziert [18]. Dadurch sinkt der osmotische Gradient, sodass zusätzlich der passive Wassereinstrom verringert und die Primärgalle auf ein Volumen von 200-250 ml pro Tag reduziert wird [18]. Da diese Gallenbildung unabhängig von der Gallensäuresekretion ist, wird sie als gallensäurenunabhängige Gallesekretion bezeichnet [18]. Umgekehrt steigt durch eine vermehrte Gallensäuresekretion das Volumen der Primärgalle an [18].

#### 3.1.2.4 Lebergalle

In den Gallengängen (Ductuli biliferi interlobulares) der Leber wird die Primärgalle durch die Sekretion von  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  zur Lebergalle modifiziert [18]. Intrazellulär wird  $\text{HCO}_3^-$  durch die Reaktion von  $\text{CO}_2$  und  $\text{OH}^-$  gebildet. Zusätzlich gelangt  $\text{HCO}_3^-$  durch den  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Symporter in die Cholangiozyten [18]. An der apikalen Membran wird  $\text{HCO}_3^-$  über den  $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ -Austauscher in die Gallengänge sezerniert [18].  $\text{Cl}^-$  rezirkuliert wieder aus der Zelle über den Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)- oder den Outwardly Rectifying Chloride Channels (ORCC)- Kanal [18]. Sekretin, Glukagon und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) stimulieren über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) den CFTR-Kanal und fördern damit die  $\text{NaHCO}_3$  Sekretion, wohingegen sie durch Somatostatin gehemmt wird [18].

#### 3.1.2.5 Blasengalle

In der Gallenblase wird die Lebergalle zur Blasengalle modifiziert. Durch isotone Resorption von NaCl und NaHCO<sub>3</sub> wird sie um den Faktor 10-20 konzentriert und eingedickt [18]. Dies geschieht über einen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>- und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>-Austauscher in der apikalen Membran und die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in der basolateralen Membran der Cholangiozyten [18]. Täglich werden ca. 20-50 ml Blasengalle gebildet und in der Gallenblase gespeichert [18]. Bei der intestinalen Verdauung kommt es zur Freisetzung von Cholecystokin (CCK). CCK führt durch Bindung an den Cholecystokin-A-Rezeptor (CCKAR) zur Kontraktion der Gallenblase und gleichzeitig zur Relaxation des Sphinkter Oddi, sodass es zu einer Entleerung der Blasengalle ins Duodenum kommt [18, 24]. Durch Bindung des Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19) an den Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3), welcher sich auf den Muskelzellen der Gallenblasenwand befindet, kommt es zur Relaxation der Gallenblase [24].

#### 3.1.2.6 Lipidresorption und Lipoproteine

Die Gallensäuren unterstützen die Resorption von Lipiden im Darm, indem sie die Lipide aus den Nahrungsbestandteilen herauslösen und emulgieren [21]. Durch die verschiedenen lipidsplattenden Enzyme liegt im intestinalen Lumen ein Verdauungsgemisch der Lipide, bestehend aus Fettsäuren, 2-Monoacylglycerinen und Cholesterin, vor [21]. Diese Substanzen lagern sich mithilfe der Gallensäuren aus der Galle in Mizellen an [21]. Hierbei zeigen die hydrophilen Köpfe der Gallensäuren nach außen, während die hydrophoben Anteile nach innen gerichtet sind [21]. Mizellen bilden sich in wässriger Lösung aus, sobald die Konzentration eines Detergenz seinen charakteristischen Schwellenwert überschreitet, die kritische mizellare Konzentration [25]. Zusätzlich können sich in den Mizellen andere Lipide, die selbst nicht in der Lage sind Mizellen zu bilden (Cholesterin, fettlösliche Vitamine), einlagern und verpackt transportiert werden [21]. Diese Lipidaggregate werden als gemischte Mizellen bezeichnet [21]. Im oberen Dünndarm werden die Mizellen nicht komplett durch Endozytose absorbiert, sondern ihre verschiedenen Bestandteile werden unter Beteiligung mehrerer Zellmembranproteine einzeln resorbiert, nachdem die Mizellen durch Kontakt mit dem Bürstensaum der Mukosa zerfallen sind [21]. Die Gallensäuren werden im distalen Ileum transporterabhängig rückresorbiert [21].

Nach Resorption der Lipide und Sekretion durch die Enterozyten gelangen die Lipide über die Lymphgefäße in das Blut [21]. Im Blut werden die Lipide mithilfe von Lipoproteinen transportiert [21]. Lipoproteine bestehen aus Lipiden, die den hydrophoben Kern bilden, und spezifischen amphiphilen Proteinen, den Apolipoproteinen [21]. Apolipoproteine binden Lipide und sind für die Bindung an die Lipoprotein-



rezeptoren von Zielzellen verantwortlich [21]. Es gibt vier verschiedene Lipoproteinhauptklassen, die sich aufgrund ihrer Dichte unterscheiden. Nach der Resorption im Darm werden im glatten endoplasmatischen Retikulum der Mukosazellen Lipide zu Triacylglycerinen (TAG) resynthetisiert und Cholesterin verestert [21]. Im Golgi Apparat der Mukosazellen werden die TAG und Cholesterinester dann zusammen mit anderen Lipiden an das Apolipoprotein B-48 (ApoB-48) angelagert und bilden Chylomikronen aus [21]. Die Chylomikronen werden in die Lymphgefäße abgegeben und gelangen über den Ductus thoracicus in den Blutkreislauf [21]. Dort nehmen sie von dem Lipoprotein mit der höchsten Dichte, dem High density lipoprotein (HDL), die Apolipoproteine ApoC-II und ApoE auf [21]. ApoC-II vermittelt die Spaltung der TAG der Chylomikronen durch die Lipoproteinlipase [21]. Dadurch verringert sich der Anteil der TAG, wohingegen der Cholesterinanteil in den Chylomikronen ansteigt und sie nun als Remnants (CMR) bezeichnet werden [21]. Über den Blutkreislauf gelangen sie in die Leber, wo sie mithilfe von ApoE durch Bindung an das Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein (LRP1) in die Hepatozyten aufgenommen werden (s. Abb. 3.1) [17, 21].

Die in der Leber synthetisierten TAG werden zusammen mit Cholesterinestern an das ApoB-100 angelagert [21]. Diese Lipoproteine werden als Very low density lipoproteins (VLDL) bezeichnet [21]. Sie nehmen im Blutkreislauf von HDL ApoC-II auf, sodass die TAG innerhalb der VLDL mithilfe der Lipoproteinlipase hydrolysiert werden können und VLDL zu LDL abgebaut werden [21].

Die LDL besitzen nur das Apolipoprotein ApoB-100 und bestehen aus nur wenigen TAG [21]. Dafür enthalten sie von allen Lipoproteinen den größten Anteil an Cholesterin und Cholesterinestern [21]. Ihr Aufgabe ist die Verteilung des Cholesterins im Körper durch Bindung an den LDL-Rezeptor (LDLR) [21]. Wird ein LDL-Partikel nicht von Zellen der peripheren Organe resorbiert, wird es in der Leber aufgenommen (s. Abb. 3.1) [17].

Die HDL bestehen hauptsächlich aus dem Apolipoprotein A-I (ApoA-I), welches von der Leber synthetisiert und sezerniert wird, sowie aus Cholesterin und Phospholipiden [20]. Von anderen Lipoproteinen nehmen sie in der Peripherie ApoE, ApoC, Phospholipide und Cholesterin auf [20]. Ihre Aufgabe ist es, überschüssiges Cholesterin, welches von den Zellen des peripheren Gewebes ins Blut abgegeben wird, aufzunehmen [21]. Das Cholesterin wird im Innern als Cholesterinester gespeichert [20, 21]. Durch Bindung an den Scavenger receptor class B type 1 (SRB1), welche durch die ApoA-I und ApoE vermittelt wird, nehmen Hepatozyten das überschüssige Cholesterin des Körpers in Form von Cholesterinestern der HDL auf (s. Abb. 3.1) [21].

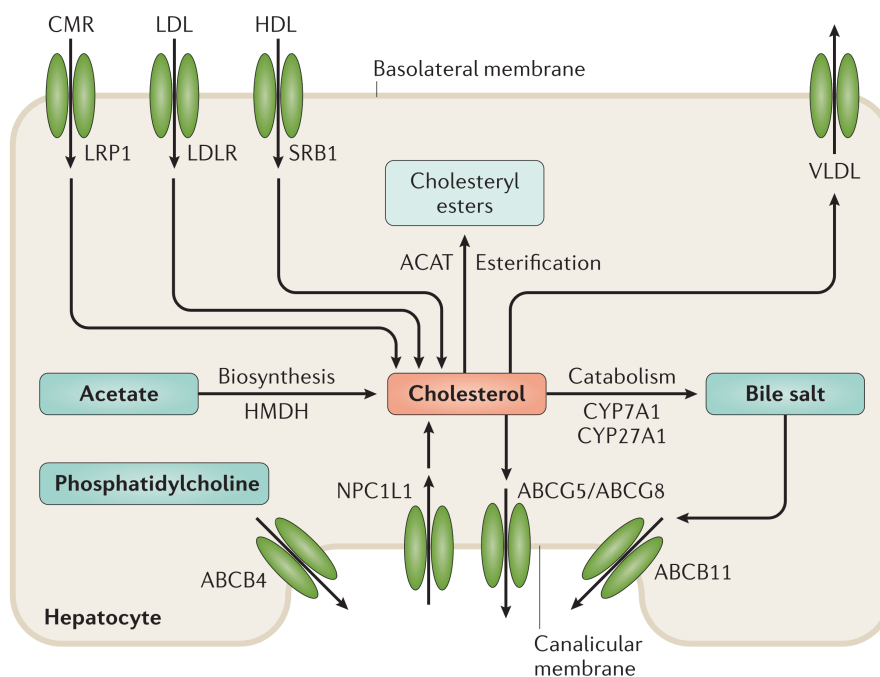


Abbildung 3.1: Metabolisierung von Cholesterin im Hepatozyten [17] (Beschreibung s. Text). CMR: Chylomikron Remnant, LDL: Low density lipoprotein, HDL: High density lipoprotein, LRP1: LDL receptor-related protein 1, LDLR: Low-density lipoprotein receptor, SRB1: Scavenger receptor class B member 1, VLDL: Very low-density lipoprotein, HMDH: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A reduktase, CYP7A1: Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase, CYP27A1: Sterol 27-Hydroxylase, ABCB4: ATP-abhängiger Phosphatidylcholintransporter, Npc111: Niemann-Pick C1-like 1, ABCG5/ABCG8: ATP-abhängiger Cholesterintransporter, ABCB11: ATP-abhängiger Gallensäurentransporter.

### 3.1.2.7 Gallensäuren als Detergenz in der Galle

Innerhalb der Galle wirken Gallensäuren als Detergenz für das in der Gallenflüssigkeit vorhandene Cholesterin [21]. Zwar tritt Cholesterin in der Galle nur zu einem Prozentsatz von 0,26 % bezogen auf die Gesamtgalle auf, jedoch ist es in dieser Konzentration in wässrigen Lösungen praktisch unlöslich [21]. Die Gallensäuren bilden zusammen mit den in der Gallenflüssigkeit vorhandenen Phospholipiden Mizellen, entsprechend der Mizellformation bei der Lipidresorption im Darm [21]. In den Mizellen lagert sich Cholesterin ein [21]. Cholesterin wird so in Lösung gehalten und ein Ausfallen verhindert [21]. Die maximale Löslichkeit des Cholesterins in der Galle mithilfe dieser mizellaren Cholesterinlösung hängt vom Verhältnis der Gallensäuren, der Phospholipide und des Cholesterins zueinander ab [21]. Abbildung 3.2 zeigt die Löslichkeit von Cholesterin in einer 0,15 M NaCl Lösung bei einer Gesamtlipidkonzentration, bestehend aus Cholesterin, Phospholipiden und Gallensäuren, von 7,3 g/dl [26]. Am Boden dieses Dreiecks, eingeschlossen durch eine durchgezogene Linie, befindet sich die physiologische, mizellare Galle. Mischungsverhältnisse außerhalb

des mizellaren Bereichs sind nicht fähig, Cholesterin in Lösung zu halten [21]. Dies führt zum Ausfallen des Cholesterins mit der Bildung von Cholesterinkristallen, die die Basis für die Entstehung von Cholesterinsteinen darstellen (s. Abschnitt 3.2.4.1) [21]. Eine detaillierte Beschreibung des Phasendiagramms findet sich in Abschnitt 3.2.4.1. Im Folgenden werden sowohl die Pathologie der Gallensteinbildung mit Blick auf die Epidemiologie, genetische und exogene Faktoren als auch die verschiedenen Gallensteinarten erläutert.

## 3.2 Pathologie der Gallensteine

### 3.2.1 Epidemiologie

In Europa liegt die mittlere Prävalenz für Gallensteine zwischen 5,9 % und 21,9 % und es zeigen sich große Unterschiede zwischen einzelnen europäischen Staaten. Während die größte Prävalenz für Gallensteine in Norwegen (21,9 %) und Nordostdeutschland (19,7 %) liegt, treten Gallensteine in Italien nur mit einer Rate von 5,9 % auf [27]. Gallensteinerkrankungen, damit sind sonographisch bestätigte symptomatische Gallensteine oder eine bereits durchgeführte Cholezytktomie gemeint, sind bei Frauen häufiger als bei Männern [28]. In Vorpommern findet sich die höchste Rate von Gallensteinerkrankungen bei Frauen im Alter von 70-79 Jahren [28]. Diese ist mit 57,1 % näherungsweise doppelt so hoch wie die Prävalenz bei Männern gleichen Alters [28]. Durch den radikalen Ernährungswandel in der Mitte des 20. Jahrhunderts mit der Verfügbarkeit von hoch-kalorischer, kohlenhydratreicher und faserarmer Diät bzw. Überernährung stieg die Prävalenz von Gallensteinen auch in Bevölkerungspopulationen, die zuvor nur eine geringe Prävalenz für diese Erkrankung zeigten [17, 29]. Darauf weisen große epidemologischen Studien in den USA, Europa, China und Japan hin, die chronische Überernährung als Risikofaktor für die Entstehung von Cholesterin-Gallensteinen bestätigen [29, 30].

Interessanterweise fand Fred Kern jr. in einer Studie im Jahr 1994 [31] heraus, dass durch eine cholesterinreiche Diät zwar die biliäre Cholesterinsekretion bei Gallensteinträgern gesteigert wird, nicht jedoch bei Personen, bei denen keine Gallensteine diagnostiziert wurden. Diese Beobachtung deutet auf eine genetische Prädisposition für die Entstehung von Gallensteinen hin [3, 32]. Die besonders hohe Prävalenz an Gallensteinen bei jungen Hispaniern in Chile lässt eine genetische Prädisposition dieser Bevölkerung für eine Gallensteinerkrankung vermuten [33]. Von Miquel et al. [33] wurde erstmals anhand von mtDNA-Analysen der ethnische Hintergrund von Individuen einer bestimmten Bevölkerung bestimmt. Hierbei wurden hohe biliäre Cholesterinkonzentrationen bei normalgewichtigen Hispaniern in Südamerika gemessen, wodurch die Existenz einer genetischen Prädisposition bei amerikanischer Abstammung gestützt wird [33].

In einer weiteren Studie von Everhart et al. [34] wird die Vermutung der genetische Prädisposition für das Risiko einer Gallensteinerkrankung weiter erhärtet. In dieser Studie wurde eine Erhöhung des Risikos für eine Gallensteinerkrankung mit zunehmender amerikanischer Abstammung entdeckt [34]. Unter den Pima-Indianern im Alter von 45 Jahren litten 56 % der Männer und 76 % der Frauen an einer Gallensteinerkrankung [34]. Hiermit besitzen die amerikanischen Ureinwohner die höchste Prävalenz weltweit für eine Gallensteinerkrankung [34]. Da Gallensteine das Hauptrisiko für Gallenblasenkrebs darstellen, erkrankten entsprechend dieser Studie die amerikanischen Ureinwohner am häufigsten von allen ethnischen Gruppen an Gallenblasenkrebs [34].

#### 3.2.2 Genetische Prädisposition für eine Cholelithiasis

Es wurden bereits mehrere Studien zur Untersuchung der genetischen Ursachen für Gallensteine (Cholelithiasis) durchgeführt. Eine große Zwillingsstudie aus Schweden [6] und eine Familienstudie [35] schreiben den Umweltfaktoren einen Anteil von 75 % zur Entstehung einer Gallensteinerkrankung und der genetischen Prädisposition einen bemerkenswerten Anteil von 25 % bis 29 % zu [3]. Es ist weiterhin Gegenstand aktueller Studien, Gene zu identifizieren, die eine Gallensteinerkrankung verursachen können. Bei genetischen Untersuchungen an Menschen, die an Gallensteinen leiden, konnte keine Beziehung zwischen einem Polymorphismus der Gene, welche für die Apolipoproteine A, B oder E, für die Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase und für das Cholesterin-Ester-Transfer-Protein kodieren, und der Entstehung von Gallensteinen hergestellt werden [3, 30]. Bei Untersuchungen von Mausgenen wurden mehr als 20 Gene identifiziert, die für eine lithogene Galle verantwortlich sind. Insbesondere wurde hierbei das *Abcg5/g8*-Transporter-Gen, welches sich bei der Maus auf *Lith9* befindet, identifiziert [3, 36]. Weitere Studien an Menschen konnten die Bedeutung des ABCG5/G8 Transporters in der Gallensteinbildung bestätigen. So wurde von Grünhage et al. [3] und von Buch et al. [2] sowie in der bereits erwähnten Zwillingsstudie aus Schweden [6] als auch in der von Krawczyk et. al [37] durchgeführten Studie an Kindern, die Genvariante p.D19H, welche im Exon 1 des hepatozellulären Cholesterintransporter ABCG8 lokalisiert ist [3], als Risikofaktor für die Bildung von Gallensteinen identifiziert. Ebenso wurde in einer Studie von Puppala et. al [38] bei der Untersuchung mexikanischer Familien, die an Gallensteinen leiden, ein starker Hinweis für eine Beziehung zwischen Gallensteinleiden und einem Polymorphismus des *ABCG5/G8*-Gens gefunden. Demnach stellen nach Grünhage et al. [3] Varianten des *ABCG5/G8*-Gens den Hauptfaktor der genetischen Prädisposition einiger ethnischer Gruppen für eine Gallensteinerkrankung dar [3]. Um jedoch Mutationen dieses Gens besser zu verstehen

und weitere genetische Risikofaktoren für ein Gallensteinleiden zu identifizieren, sind weitere Forschungsarbeiten notwendig [3, 6].

#### 3.2.3 Exogene Faktoren

In vielen epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass mit der Einführung der "Westernized" Diät, die einer hoch-kalorischen, kohlenhydrat- und fettreichen sowie spurenelement- und faserarmen Ernährung entspricht, die Inzidenz von Gallensteinen angestiegen ist [39]. Das metabolische Syndrom stellt einen Risikofaktor für die Bildung von Gallensteinen dar. Es wurde in mehreren Studien bestätigt, dass Überernährung (hoher BMI-Wert), ein hoher LDL-Spiegel sowie Diabetes mellitus Typ 2, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie Triggerfaktoren für die Bildung von Gallensteinen sind [17, 28, 34]. Außerdem steigt die Prävalenz für Gallensteine in der Schwangerschaft bzw. kurz nach der Entbindung verglichen mit nicht schwangeren Frauen [28, 40]. Die Studien von Banim et al. [41] und Völzke et al. [28] zeigen, dass körperliche Aktivität einen protektiven Effekt auf die Bildung von Gallensteinen besitzt. Ein starker Gewichtsverlust, dies bedeutet eine Gewichtsabnahme von mehr als 1,5 kg in einer Woche (entweder verursacht durch eine geringe kalorische Diät oder aber durch einen gewichtsreduzierenden chirurgischen Eingriff), stellt jedoch einen Risikofaktor für die Entstehung von Gallensteinen dar [42, 43][17]. Das Risiko, aufgrund einer kalorienarmen Diät an einer Cholelithiasis zu erkranken, steigt exponentiell mit steigendem Gewichtsverlust pro Woche [42]. Nach einem gewichtsreduzierenden chirurgischen Eingriff ist eine Cholezystektomie bei 15 % der Patienten notwendig [43]. In einigen Studien wird zudem eine inverse Beziehung zwischen einem kontinuierlichen moderaten Alkoholkonsum und dem Auftreten einer Gallensteinerkrankung postuliert [28, 39, 44]. Zusätzlich führt die Einnahme einiger Medikamente wie Östrogene, Progesteron, das Somatostatinanalogon Octreoid, Calcineurininhibitoren und Fibrate zu einem erhöhten Risiko für die Bildung von Gallensteinen [17, 39]. Östrogene verursachen wie Fibrate eine erhöhte biliäre Cholesterinsekretion, während Progesteron und Octreoid die Gallensteinbildung aufgrund einer Gallenblasenhypomotilität bedingen [17, 39]. Calcineurininhibitoren (Ciclosporin, Tacrolimus) tragen durch Inhibierung der hepatzellulären Exportpumpe für Gallensäuren zur Gallensteinbildung bei [17, 39].

#### 3.2.4 Verschiedene Gallensteine und ihre Pathologie

Die Galle ist eine dunkelgrüne bis gelb-braune Flüssigkeit, die zu mehr als 90 % aus Wasser besteht [17]. Die drei Hauptlipide der Galle sind Cholesterin, Phospholipide und Gallensalze [17]. Die Mehrheit der Gallensteine lässt sich zwei verschiedenen Typen zuordnen, den Cholesterin- oder den Pigmentsteinen. Sie

unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung, ihrem Aussehen und ihrer Entstehung [17]. Generell findet man bei einem Patienten nur einen Gallensteintyp. In den westliche Ländern treten die Cholesteringallensteine mit einer Rate von über 90 % am häufigsten auf [45].

#### 3.2.4.1 Cholesterinsteine

Cholesteringallensteine entstehen, wenn die biliäre Cholesterin-Homeostase gestört ist und Cholesterin nicht durch die Mizellbildung durch Phospholipide und Gallensäuren gelöst werden kann (s. Abschnitt 3.1.2.7). Cholesterinsteine bestehen aus Cholesterinmonohydrat-Kristallen [45]. Etwa 95 % der Cholesterin-Moleküle in der Galle liegen in der unveresterten Form vor [10]. Die Cholesterinkonzentration in der Gallenblase beträgt etwa 390 mg/dL [10]. Klinische Studien und Tierexperimente haben nachgewiesen, dass die Pathogenese der Gallensteinbildung primär durch die Interaktion von fünf Mechanismen bedingt ist [10, 17, 46]. Zusätzlich zu den genetischen Faktoren, die bereits in Abschnitt 3.2.2 diskutiert wurden, sind die folgenden Mechanismen relevant: die hepatische biliäre Cholesterinhypersekretion mit Entstehung einer übersättigten Galle, ein schneller Phasenübergang des biliären Cholesterins, die verminderte Gallenblase-motilität mit einer Hypersekretion von Mucinen und mit immuninduzierter Gallenblasenentzündung und eine hohe intestinale Cholesterinabsorption bzw. eine verlangsamte Darmpassage, welche eine erhöhte Cholesterinabsorption verursacht [10, 17, 46].

Hierbei stellt die **hepatische Hypersekretion** von Cholesterin den Hauptmechanismus bei der Entstehung von Gallensteinen dar [47]. Bei der Bildung der Galle werden die in der Galle gelösten Substanzen aktiv in die Gallengangskanälchen sezerniert, und zwar Cholesterin durch den ABCG5/G8 Transporter, Phospholipide mithilfe des ABCB4 Transporters und die Gallensalze durch den ABCB11 Transporter (s. Abschnitt 3.3) [10]. Hierbei wird postuliert, dass die Funktion des ABCG5/G8 Transporters von einem funktionierenden ABCB4 Transporter abhängig ist [47]. Abbildung 3.1 stellt die einzelnen Mechanismen der biliäre Sekretion im Hepatozyten dar, die entsprechend eines Input-Output-Gleichgewichts für Cholesterin die Cholesterinhomeostase in der Leber gewährleisten [10]. Das Cholesterin, welches in die Galle sezerniert wird, entstammt hauptsächlich der Cholesterin-denovo-Synthese in der Leber sowie der Aufnahme von HDL-Plasmalipoproteinen und Chylomikronen in der Leber (s. Abb. 3.1). Durch eine Desinhibition des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein O1 (FOXO1) bei Insulinresistenz kommt es zu einer gesteigerten Expression des ABCG5/G8 Transporters in den Hepatozyten, verbunden mit einer gesteigerten biliären Cholesterinsekretion [17, 48]. Weiterhin werden die Cholesterinsynthese in der Leber und die biliäre Cholesterinsekretion durch Östrogene, über die Aktivierung des Östrogenrezeptors und des G-Protein gekoppelten

Rezeptors 30, gesteigert [17, 49]. Die biliäre Cholesterinsekretion bzw. die Cholesteringallensteinbildung wird zudem durch die nuklearen Transkriptionsfaktoren Liver X receptor (LXR) und Farnesoid X receptor (FXR) beeinflusst, da sie die Transkription der Transportergene beeinflussen. Bezüglich der Gallensteinbildung verhalten sich diese Transporter gegensätzlich [17, 50, 51]: Während die Expression von ABCB4 und ABCB11 durch FXR kontrolliert wird, wird der ABCG5/G8 Transporter durch den Transkriptionsfaktor LXR reguliert. Somit bewirken FXR-Agonisten durch eine gesteigerte Sekretion von Gallensalzen und Phospholipiden, dass mehr Cholesterin in der Galle gelöst werden kann. Im Gegensatz zu dieser protektiven Wirkung fördern LXR-Agonisten durch Steigerung der biliären Cholesterinsekretion die Cholesteringallensteinbildung [50].

Weiterhin induziert der Transkriptionsfaktor FXR im Menschen den Fibroblast growth factor 19 (FGF19), in der Maus entsprechend FGF15 [52]. FGF19 bzw. FGF15 wird von den Enterozyten sezerniert [52]. FGF19 funktioniert als Hormon, indem es durch einen Rückkopplungsmechanismus bei hohen Gallensäurenkonzentrationen von den Enterozyten sezerniert wird und die Gallensäurensynthese im Hepatozyten, durch Inhibierung von Cytochrom P450 7A1 (CYP7A1), unterdrückt. Zudem führt FGF19 zur Relaxation der Gallenblase. Krawczyk et al. [53] konnten außerdem einen funktionalen Zusammenhang zwischen genetischen Varianten im *FGF19*-Gen und der Entstehung von Gallensteinen aufdecken.

Ein weiterer Transporter, der an der Aufrechterhaltung des Cholesteringleichgewichtes beteiligt ist, ist der Niemann-Pick C1-like 1 (Npc1l1) Transporter. Dieser Transporter findet sich sowohl in der kanalikulären Membran der Hepatozyten als auch in der apikalen Membran der Enterozyten (s. Abb. 3.1) und ist dort für die Aufnahme des Cholesterins in die Zelle zuständig. Im Interstitium wird dieser Transporter beim Menschen wesentlich stärker exprimiert als in der Leber. Daher wird ihm eine geringe Bedeutung in der Regelung der biliären Cholesterolsekretion zugeschrieben. Jedoch können Mutationen in diesem Transporter zu einer gesteigerten intestinalen Cholesterinabsorption führen, wodurch es in der Leber, aufgrund der hohen Cholesterinkonzentrationen, zu einer biliären Cholesterinhypersekretion über den ABCG5/G8 Transporter kommt [17].

Die hepatische biliäre Cholesterinhypersekretion kann begleitet sein von geringen, normalen oder hohen hepatischen biliären Sekretionsraten an Gallensalzen und Phospholipiden. Diese Lipide sorgen dafür, dass Cholesterin in der Galle gelöst werden kann [10]. Von einer mit Cholesterin übersättigten Galle spricht man, wenn das Cholesterin in der Galle nicht mehr durch die Gallensalze und die Phospholipide in Lösung gehalten werden kann [10, 17, 54]. Daher kann es nicht nur durch eine biliäre Cholesterinhypersekretion, sondern auch bei normalen biliären Cholesterinsekretionsraten aufgrund geringer Sekretionsraten an Gallensalzen

und Phospholipiden zu einer mit Cholesterin übersättigten Galle kommen [10, 17].

Lecithin wird durch die Hepatozyten mithilfe der detergenten Wirkung der Gallensäure in die Canaliculi biliferi als unilamelläre Vesikel mit einem Durchmesser von 63-67 nm sezerniert [55]. Das Cholesterin wird durch diese Lipidvesikel aufgenommen [56]. In den Vesikeln beträgt das Cholesterin zu Phospholipidverhältnis in normaler Galle 0,34-0,38 [56]. In lithogener Galle steigt das Verhältnis zugunsten des Cholesterins weiter an [56]. Es kommt zu einer Aggregation oder Fusion der cholesterinreichen Vesikel und es entstehen multilamelläre Vesikel mit zunehmender Größe [56]. Diese multilamellären Partikel entstehen in Systemen mit einem geringen Gallensäure/Lecithin-Quotienten, während Kristallisierungsprozesse in Systemen mit einem hohen Gallensäure/Lecithin-Quotienten auftreten [57].

Das Auftreten von flüssigen Cholesterin-Monophosphat-Kristallen stellt den ersten physikalisch-chemischen Schritt in der Entstehung von Gallensteinen dar [10]. Untersuchungen des Phasenüberganges der Galle ergaben, dass es fünf verschiedene Kristallisationswege der Galle gibt, die abhängig vom Cholesterin-, Phospholipid- und Gallensäure-Verhältnis sind [10, 17, 57]. Das Wachstum der flüssigen Cholesterinkristalle wird durch die Anwesenheit von Mucinen und weiteren nukleationsfördernden Substanzen beschleunigt [10, 58]. Eine übersättigte Galle ist zwar für die Bildung von Gallensteinen notwendig, jedoch tritt eine übersättigte Galle auch bei vielen Personen auf, die keine Gallensteine haben, sodass zusätzlich weitere Faktoren zur Gallensteinbildung beitragen [58]. Eine **beschleunigte Nukleationszeit** der Cholesterinkristalle ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen der mit Cholesterin übersättigten Galle eines Patienten mit und einer Person ohne Gallensteine [59, 60].

Die fünf verschiedenen Kristallisationswege als Funktion der Zeit und als Funktion der Lecithinkonzentration wurden physikalisch-chemisch näher untersucht [26]. Bei der Bildung von Cholesterinsteinen können zwei Schritte unterschieden werden [61]. Im ersten Schritt ist die Kapazität der Galle, Cholesterin zu lösen, überschritten [61]. Damit präzipitieren Teile des Cholesterins in der Galle in Form von Mikrokristallen [61]. Im zweiten Schritt vereinen oder wachsen diese Mikrokristalle und bilden makroskopische Gallensteine [61]. Von Admirand et al. [61] konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Gallensalze und der Phospholipide nicht strikt additiv ist. Aufgrund des ähnlichen Verhaltens einer Modellgalle, die nur aus Gallensäure, Lecithin, Cholesterin und Wasser besteht, verglichen mit der menschlichen Galle lässt sich schließen, dass die Löslichkeit des Cholesterins in der humanen Galle durch das Verhältnis dieser drei Substanzen zueinander bestimmt wird [61]. Abbildung 3.2 zeigt eine Methode zur Darstellung der Gallenzusammensetzung mithilfe eines dreieckigen Koordinatensystems [61]. Die Zusammensetzung einer Galle, deren Summe aus Gallen-



säure, Lecithin und Cholesterin 100 % entspricht, wird durch einen einzigen Punkt in diesem Diagramm repräsentiert [61]. Am Boden dieses Dreiecks, eingeschlossen durch eine durchgezogene Linie, befindet sich die physiologische, mizelläre Galle. Die fünf Kristallisationssequenzen sind durch die Buchstaben A-E gekennzeichnet. Der obere Teil des Dreiecks ist durch zwei durchgezogene und zwei gestrichelte Linien in diese Regionen aufgeteilt. Die Anzahl der Phasen entsprechen dem Zustand im Gleichgewicht [26].

Die Cholesterinlöslichkeit steigt zunächst mit zunehmendem Phospholipidanteil von einer geringen Löslichkeit in reinen Mizellen aus Gallensäuren zu einer höheren Löslichkeit des Cholesterins in gemischten Mizellen [62]. Für mittlere Phospholipidkonzentrationen steigt die Cholesterinlöslichkeit jedoch nicht weiter an, sondern bleibt konstant [62]. Nach dieser Plateauphase nimmt die Löslichkeit des Cholesterins mit steigendem Phospholipidanteil ab und erreicht den Wert null an der mizellaren Phasengrenze [62]. Bei konstanter Temperatur führt eine Zunahme der Gesamtlipidkonzentration zu einem markanten Anstieg der maximalen Cholesterinlöslichkeit [62].

Die einfache flüssige mizellare Phase ist charakterisiert durch eine diffuse Streuung einfallender Röntgenstrahlen [62], ist nicht mit Cholesterin gesättigt und kann somit Cholesterin weiterhin auflösen [63]. Sie entspricht der normalen Galle, welche innerhalb der mizellaren Lösungszone liegt [63]. Mithilfe von Phasenkontrast- und Polarisationsmikroskopie wurden die einzelnen Sequenzen der Cholesterinkristallisation, des Cholesterinkristallwachstums und der Gallensteinbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die im Phasendiagramm links liegende Zweiphasenzone zeigt hingegen zusätzlich in der Röntgenbeugung ein Profil, welches mit der gleichzeitigen Existenz von Cholesterinmonohydratkristallen übereinstimmt [62]. Die in der Mitte des Phasendiagramms liegende Dreiphasenzone besteht aus einem Gemisch von Cholesterinmonohydratkristallen, lamillaren Flüssigkristallen und Mizellen [62]. Die Zweiphasenregion rechts im Phasendiagramm stellt ein flüssig-kristallines Profil mit isotroper Streuung von Röntgenstrahlen dar [62]. Mit Abnahme der Hydrophobizität der konjugierten Gallensäuren wird das Maximum der mizellaren Cholesterinlöslichkeit reduziert [47]. Gleichzeitig schieben sich die mehrphasigen Zustände, welche oberhalb der Mizellenregion im Phasendiagramm liegen, nach links zu kleineren Phospholipid/Gallensäuren-Verhältnissen [47]. Dadurch wird das rechte Zweiphasengebiet, in dem nur flüssige Kristalle existieren (Region E), größer [56]. Dies erklärt, wieso hydrophile Gallensäuren (wie z.B. Ursodeoxycholsäure) die Kristallisation verhindern [56]. Gallensäuren mit einer geringeren Hydrophobizität verringern die Cholesterinkristallisation und die Konzentration von kristallisationsfördernden biliären Proteinen (IgG, IgA, Haptoglobin, Aminopeptidase N u.a.) [56, 64].

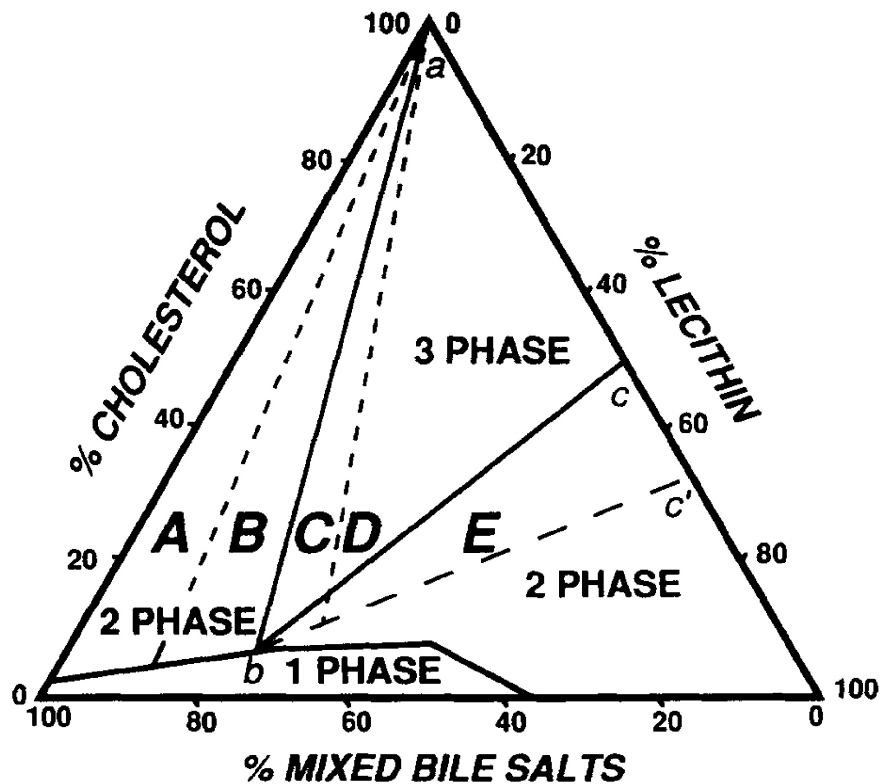


Abbildung 3.2: Gleichgewichtsphasendiagramm eines Gallensäure-Phospholipid-Cholesterin-Systems mit einer Gesamtlipidkonzentration von 7,3 g/dl in einer 0,15 M NaCl-Lösung bei 37 °C und bei einem pH-Wert von 7,0 [26].

Der allgemeine Index zur Beschreibung der Cholesterinübersättigung der Galle ist der Cholesterinsättigungsindex (CSI) [65]. Er ist der Quotient aus der Cholesterinkonzentration der Galle und der maximal löslichen Cholesterinkonzentration in einer Modellgalle identischer Lipidzusammensetzung [65]. Bei einer mit Cholesterin übersättigten Galle beginnt sich zunächst eine große Menge an nicht-doppelbrechendem Gel aus amorphen Mucin im Gallenblasenlumen zu sammeln, woraus sich viele kleine, nicht-doppelbrechende flüssigkristalline Filamente bilden [10]. Diese haben zunächst eine bogenförmige Struktur, welche sich bei weiterem Wachstum zu einer Population aus regelrechten rechtsdrehenden Helices vermehren [57]. Diese Helices weiten sich mit der Zeit auf und formen tubuläre Kristalle. Sie bilden die Strukturen der sogenannten Übergangsphase [57, 66]. Aus diesen Strukturen bilden sich plattenförmige Cholesterinkristalle mit den charakteristischen eingekerbten Ecken [57]. Nach einigen Tagen beginnen diese kleinen Flüssigkristalle sich zu Clustern zusammenzulagern und bilden aggregierte Flüssigkristalle [57]. Mit der Zeit verschmelzen diese Cluster zu typischen Flüssigkristallen, die charakteristische Strukturen wie das Malteserkreuz ausbilden und doppelbrechend sind [57]. Nur diese aggregierten und verschmolzenen Flüssigkristalle entwickeln scharfe

Kanten und bilden sich zu typischen festen Cholesterinmonohydratkristallen aus [57]. Durch weiteres Wachstum der Monohydratkristalle kann sich eine Mikrolithiasis und eventuell später ein makroskopischer Stein entwickeln. Jedoch ist in spektroskopischen Untersuchungen beobachtet worden, dass einige typische plattenförmige Cholesterinkristalle nicht diese Kristallisationspfade durchlaufen [66]. Innerhalb multilamellarer Vesikel, die mit Cholesterin gesättigt sind, bilden sich direkt Cholesterinmonohydratkristalle [66].

Die Kontraktilität und Relaxation von Gallenblasenmuskelzellen bei Patienten mit Gallensteinen ist abnormal verglichen mit der Kontraktilität und Relaxation von Gallenblasenmuskelzellen bei Personen, die keine Gallensteine haben [67]. Die Zellen der Gallenblase absorbieren Cholesterin aus der übersättigten Galle. Das Cholesterin wird verestert und in der Mukosa und Lamina propria der Gallenblasenmuskelzellen gespeichert. Dadurch kommt es zu einer **Gallenblasenhypomotilität** aufgrund einer Versteifung dieser Zellen und einer Entkopplung der Signal-Transduktion, die normalerweise nach Bindung von CCK an den Rezeptor über intrazelluläre G-Proteine erfolgt [17, 67–69]. Weiterhin kann eine Gallenblasenhypomotilität durch eine chronische Entzündung der Gallenblase, die zu einer Fibrosierung der Gallenblasenwand führt, bedingt sein [17]. Diese chronische Entzündung kann durch Bakterien in den Gallenwegen verursacht werden [70]. Durch die verminderte Kontraktionsfähigkeit der Muskelzellen der Galle verbleibt die übersättigte Galle länger in der Gallenblase, sodass eine größere Möglichkeit zur Kristallisation des Cholesterins besteht [17].

Der enterohepatische Pool an Gallensalzen ist bei Patienten mit Morbus Crohn und bei Patienten, bei denen eine intestinale Resektion oder eine Kolektomie durchgeführt wurde, verringert. Diese **intestinalen Faktoren** verringern die biliäre hepatische Sekretion von Gallensalzen, wodurch die Löslichkeit von Cholesterin verringert wird [17]. Im Gegensatz zu Beobachtungen in Tiermodellen haben Patienten mit Gallensteinen im Vergleich zur Kontrollgruppe häufig eine geringere intestinale Cholesterinabsorption, aber eine gesteigerte Cholesterinsynthese [17, 68].

#### 3.2.4.2 Pigmentsteine

Pigmentgallensteine treten wesentlich seltener auf als Cholesteringallensteine [71]. Sie werden in schwarze und braune Pigmentsteine unterschieden und entstehen aufgrund einer Störung im Bilirubin-Metabolismus [17, 71].

Schwarze Pigmentgallensteine werden in nicht infizierter Galle gebildet und befinden sich hauptsächlich in der Gallenblase. Sie entstehen aufgrund der nicht bakteriellen, nicht enzymatischen Hydrolyse von

Bilirubin-Konjugaten [71]. Die Hyperbilirubinämie, die die Ursache für die Bildung schwarzer Pigmentsteine darstellt, kann sich aufgrund einer Hämolyse unterschiedlicher Genese, aufgrund einer ineffektiven Erythropoese, einer Erkrankung des Ileums, einer Ileumresektion oder einer Leberzirrhose entwickeln [17, 71]. Die schwarzen Pigmentsteine bestehen entweder aus reinem Calciumbilirubin oder aus polymerisierten Komplexen, bestehend aus unkonjugiertem Bilirubin, Calciumbilirubin, Calcium und Kupfer [17].

Braune Gallensteine können sowohl in der Gallenblase als auch in den intra- und extrahepatischen Gallengangskanälchen gebildet werden [71]. Sie entstehen sekundär durch eine anaerobe bakterielle Infektion aufgrund einer chronischen Stauung der Galle [71]. Das überschüssige unkonjugierte Bilirubin entsteht durch Hydrolyse der Bilirubinglucuronidase mittels bakterieller  $\beta$ -Glucuronidase [72]. Das unlösliche, unkonjugierte Bilirubin bildet, wie bei den schwarzen Pigmentsteinen, mit Calciumionen Calciumbilirubinate mit einer variablen Menge an Cholesterin, Fettsäuren, Mucin, Glykoproteinen, Gallensalzen und Phospholipiden [17]. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass es eine genetische Prädisposition für die Bildung von Pigmentgallensteinen aufgrund einer Steigerung des im enterohepatischen Kreislauf zirkulierenden Bilirubins gibt, wodurch es zur Bildung dieser Steine bei Mukoviszidose und Sichelzellanämie kommt. [17, 73].

### 3.3 ABC-Transporter

Die ATP-binding cassette (ABC) Transporter stellen die größte Familie der Transmembran-Proteine dar [74]. Etwa 50 ABC-Gene sind bereits im menschlichen Genom identifiziert worden [75]. Die Proteine dieser Transporter-Familie sind an vielen unterschiedlichen Membrantransportprozessen, deren Substrate von kleinen Ionen bis zu großen Polypeptiden und Polysacchariden reichen, beteiligt [76]. Die ABC-Proteine sind durch die Sequenz und die Organisation ihrer ATP-Bindungsstruktur, welche auch als Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) bezeichnet wird, charakterisiert [74]. Das NBD-Gen besteht aus den sogenannten Walker A und Walker B Motiven, welche in der Genstruktur aller ATP-Bindungsproteinen enthalten sind [74]. Walker A und Walker B sind durch eine C-Sequenz voneinander getrennt [74]. Der funktionelle Transporter besteht aus zwei NBD und zusätzlich zwei Transmembrandomänen (TM) [74]. Die ABC-Gene sind bei Eukaryonten entweder als kompletter Transporter mit zwei TM und zwei NBD organisiert oder aber nur als eine Hälfte des funktionellen kompletten Transporters, bestehend aus einer TM und einer NBD [74]. Diese Halb-Transporter können entweder zu Homodimeren oder, durch Zusammenlagerung mit einer anderen Transporterhälfte, zu Heterodimeren oligomerisieren [74]. Diese TM sind hydrophob und bestehen aus jeweils sechs  $\alpha$ -Helices, welche die Membran durchspannen [76]. Sie sind spezifisch für das jeweilige Substrat [76]. Die ATP-Bindungsstrukturen befinden sich peripherer, auf der zytoplasmatischen Seite der

Membran, mit Kontakt zu den TM [76]. Um ihre Substrate über die Membran zu transportieren, wird ATP an den NBD gebunden und hydrolysiert [76]. Die dadurch gewonnene Energie ermöglicht den Transport des Substrates über die Membran [74]. Somit handelt es sich bei den ABC-Transportern um primär aktive Transporter, da sie mithilfe von ATP entgegen dem chemischen Gradienten Substrate transportieren [77]. ABC-Transporter arbeiten unidirektional [74]. In Bakterien sind ABC-Transporter hauptsächlich für den Import wichtiger Substanzen, welche nicht durch Diffusion in die Zelle gelangen können, verantwortlich [74]. Bei Eukaryonten transportieren diese Transporter hingegen Substanzen des Zytoplasmas aus den Zellen heraus bzw. in den Extrazellulärraum [74]. Die humanen ABC-Transporter werden in sieben Subfamilien unterteilt, entsprechend dem Alphabet von ABCA bis ABCG [75]. Die Subfamilien ABCE und ABCF sind, im Gegensatz zu den anderen Subfamilien, nicht in der Membran lokalisiert und nicht an Membrantransportprozessen beteiligt [75]. Die ABCG Subfamilie besteht aus fünf charakteristischen ABC Halb-Transportern: ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 und ABCG8 [75]. ABCG1, ABCG4, ABCG5 und ABCG8 sind für den ATP abhängigen Transport von Steroiden und Lipiden über die Zellmembran verantwortlich [75]. ABCG2 stellt ein Multidrug Resistance Transporter dar, der häufig in Tumorstammzellen exprimiert wird [75]. Hohe ABCG2-Expressionswerte konnten auf Zellen des Retinoblastoms, Lungen-, Leber- und Pankreastumorzellen detektiert werden [75].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem ABCG5/G8 Transporter, sodass der Aufbau dieses Transporters in Abschnitt 3.3.2 näher beschrieben wird. Zudem wird im Folgenden (s. Abschnitt 3.3.1) kurz die Funktionsweise von ABCB4 und ABCB11, zwei Transporter der ABCB Subfamilie, zum besseren Verständnis der Arbeit erläutert.

#### 3.3.1 ABCB4 und ABCB11 Transporter

ABCB4, auch MDR-3 (Multi-Drug Resistance 3) P-Glycoprotein genannt, ist ein Transmembranprotein, welches sich, wie der ABCG5/G8 Transporter, in der kanikulären Membran der Hepatozyten befindet [78, 79]. Er ist spezialisiert auf die Sekretion von Phosphatidylcholin (s. Abb. 3.1) [74, 80]. Genetische Mutationen dieses Transporters verursachen die Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3 (PFIC3), sowie Gallensteine und eine intrahepatische Cholestase bei Schwangeren [79]. *ABCB11* kodiert für ein ATP abhängiges Transmembranprotein, das als Gallensäurenexportpumpe dient (s. Abb. 3.1) [74]. Die Progressive intrahepatische Cholestase Typ 2 (PFIC2) und die Benigne rekurrende intrahepatische Cholestase Typ 2 (BRIC2) sind Krankheiten, die mit Mutationen im *ABCB11* Gen assoziiert sind [81].

### 3.3.2 ABCG5/G8 Transporter

Bei dem ABCG5/G8 Transporter handelt es sich um die zwei Heterodimere ABCG5 und ABCG8 der ABCG Subfamilie, die sich zu einem funktionsfähigen Transporter zusammenlagern [82]. Dieser Transporter findet sich in der kanikulären Membran von Hepatozyten und in der apikalen Membran von Enterozyten [82, 83]. Die *ABCG5*- und *ABCG8*-Gene liegen nebeneinander auf Chromosom 2p21, in einer Kopf-an-Kopf Orientierung [83]. Ihre Translationsstartpunkte sind durch 374 Basenpaare (bp) voneinander getrennt [83]. Beide Gene werden durch 13 Exons kodiert und umfassen ~ 28 kb (Kilo-Basenpaare) [83]. Die Aminosäuresequenz dieser beiden Gene sind zu 28 % identisch und ähneln sich zu 61 % [83]. Sie besitzen einen gemeinsamen bidirektionalen Promotor [83], sodass das *ABCG8*-Gen vom Translationsstartpunkt aus in 5'-3' und das *ABCG5*-Gen in 3'-5' Richtung abgelesen werden [84]. Der ABCG5/G8 Transporter sezerniert Cholesterin und Pflanzensterole entsprechend ihrer Lokalisation in die Gallenkanälchen oder in das Darmlumen [82, 83]. Mutationen in einem dieser Transporter verursachen beim Menschen Sitosterolämia, eine seltene autosomal rezessive Erkrankung [83]. Sie wird durch eine erhöhte Absorption von Pflanzensterolen und Cholesterin im Darm verursacht, führt zur Bildung von Xanthomen und erhöht das Risiko für Arteriosklerose, verbunden mit kardiovaskulären Erkrankungen [85]. Da die Patienten nicht fähig sind, die Sterole auf biliärem Weg auszuscheiden, akkumulieren die Sterole im Gewebe [85].

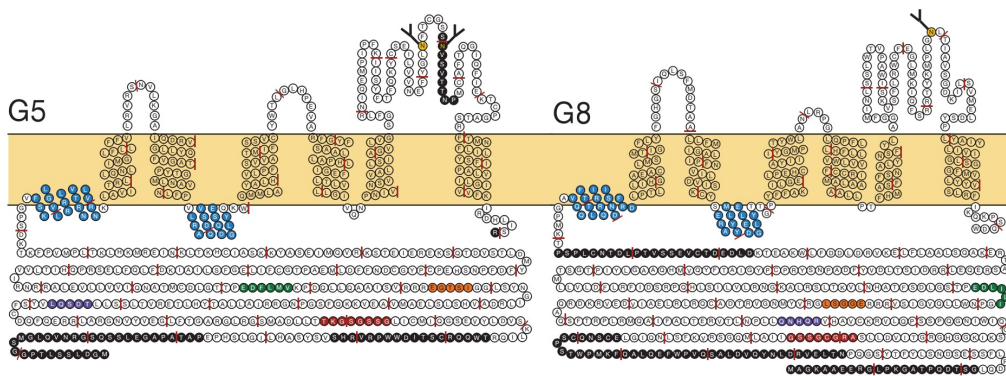


Abbildung 3.3: Struktur des ABCG5/G8 Heterodimers [86].

### 3.3.3 Herstellung der *Abcg5/g8* Knock-out Mäuse mit dem Cre-lox System

Molekulare Techniken ermöglichen heutzutage die präzise genetische Modifikation von Mäusen [87]. Genetische Schalter erlauben die Expression oder Entfernung von bestimmten Genen in bestimmten Geweben zu einer bestimmten Zeit [87]. Mithilfe dieser Techniken kann ein besseres Verständnis der Funktion einzel-

ner Gene in der Pathogenese bestimmter Krankheiten gewonnen werden [87]. Die Cre (cyclische Rekombinase) spezifische DNA der Bakteriophagen P1 stellt ein wichtiges Werkzeug in der Herstellung spezifischer DNA-Rearrangements und genetischer Switches dar, wodurch bestimmte Tiermodelle zur Untersuchung menschlicher Krankheiten generiert werden können [87]. Das ortsfeste Cre-loxP Rekombinase System der Bakteriophagen P1 besteht aus der loxP-Stelle, an der die Rekombinase stattfindet, und aus dem phagenkodierenden Protein Cre, welches die Reaktion vermittelt [88]. Hierbei katalysiert das Cre Enzym die Rekombination zwischen zwei loxP-Erkennungssequenzen (*locus of X-over of P1*, *X-over* steht dabei für *crossover*) [89]. Rekombination meint allgemein die Neukombination von DNA-Sequenzen und setzt zwei grundlegende Prozesse voraus. Dies ist einmal die Aufnahme fremder DNA in die Zelle und zweitens ein Doppelstrangbruch der chromosomalen DNA mit anschließender Neuknüpfung [89]. Das zentrale Element der loxP-Sequenz, welche aus 8 bp besteht, wird von zwei palindromischen Sequenzen eingerahmt, die jeweils 13 bp besitzen [89]. Ein zwischen zwei gleichgerichteten loxP-Sequenzen liegendes DNA-Segment wird durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten und dauerhaft entfernt [89]. Durch gezieltes Einfügen der loxP-Sequenzen in einen Vektor kann eine Wunschsequenz flankiert werden, sodass das Genom dieser Mäuse loxP-flankierte Elemente enthält [89]. Zusätzlich stellt man eine transgene Maus her, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors gewebsspezifisch exprimiert [89]. Durch Kreuzung dieser transgenen Maus mit einer Maus, bei der eine Wunsch-DNA-Sequenz durch loxP-Sequenzen flankiert ist, wird in den Hybriden die mit loxP-flankierte DNA-Sequenz nur in dem Gewebe entfernt, das die Cre-Rekombinase exprimiert. Durch diese „konditionale Mutagenese“ wird eine „loss of function“ Mutation generiert [87]. Beim Ausschneiden der DNA-Sequenz bleibt ein loxP-Element zurück, welches aus je einer Hälfte der beiden ursprünglichen loxP-Sequenzen besteht [89]. Hierdurch können gewebsspezifische Mutationen bzw. Knock-outs untersucht werden, bei welchen das Ausschalten einer Genfunktion im gesamten Organismus nicht mit dem Leben vereinbar wäre [89] oder um die Auswirkungen einer bestimmten Mutation in unterschiedlichen Geweben miteinander zu vergleichen.

Diese Strategie wurde das erste Mal von Gu et al. [90] angewendet, wobei es ihm gelang, die DNA Polymerase  $\beta$  nur in T-Zellen zu inaktivieren. Das gleiche Verfahren wurde auch zur Herstellung der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse, welche in dieser Arbeit verglichen werden, angewendet.

Die loxP-Sequenzen wurden im Intron 2 des *Abcg5*-Gens und im Intron 1 des *Abcg8*-Gens mithilfe eines Oligonukleotidprimers eingefügt. Mithilfe der Elektroporation wurde das Konstrukt in die embryonalen Stammzellen von C57BL/6J Mäusen transduziert [14, 91]. Die embryonalen Stammzellen erhält man aus der inneren Zellmasse früher Mausembryonen [89]. Nach erfolgreicher Transformation der embryonalen

Stammzellen wurden diese in Blastozysten von C57BL/6J Mäusen injiziert. Diese Blastozysten wurden dann in pseudoschwangere Mäuse transferriert [89]. Die homozygot geflochtenen Nachkommen der gewünschten Gensequenz werden mit B6.Cg-Tg(Alb-Cre)21Mgn/J Mäusen zur Herstellung der AlbCre-Mäuse und mit B6.SJL-Tg(Vil-Cre)997Gum/J zur Herstellung der VilCre-Mäuse gekreuzt [14] (s. Abb. 3.4).

Die B6.SJL-Tg(Vil-Cre)997Gum/J transgene Maus besitzt den Villin 1-Promotor, welcher die Expression der Cre-Rekombinase für die epithelialen Zotten- und Kryptenzellen von Dick- und Dünndarm reguliert. Eine Kreuzung dieser Maus mit Mäusen, die *Abcg5/g8* geflochte Gensequenzen besitzen, ergibt intestinale *Abcg5/g8* Knock-out Mäuse, welche im weiteren **VilCre-Mäuse** genannt werden.

Die B6.Cg-Tg(Alb-Cre)21Mgn/J Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Albumin-Promotors. Da Albumin nur in der Leber exprimiert wird, erzeugt diese Kreuzung leberspezifische *Abcg5/g8* Knock-out Mäuse, die im Folgenden als **AlbCre-Mäuse** bezeichnet werden. Durch Kreuzung mit der gewebsspezifischen Cre-Rekombinase, welche die ersten beiden Exons des *Abcg5*-Gens und das erste Exon des *Abcg8*-Gens entfernt, kommt es zu einer gewebsspezifischen Inaktivierung beider Gene.

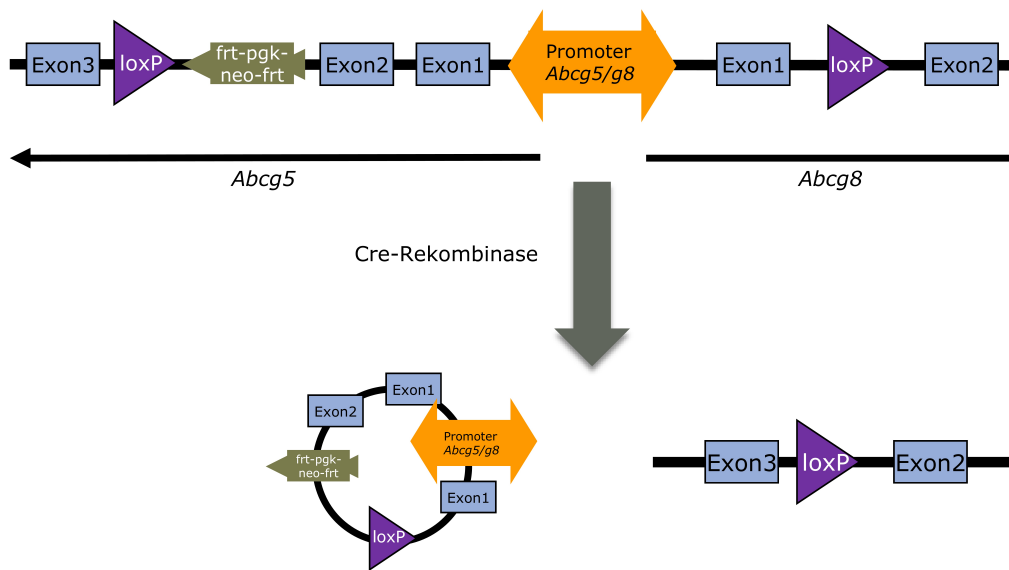


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Herstellung der gewebsspezifischen *Abcg5/g8* Knock-out Mäuse mithilfe des Cre-lox Systems (leberspezifischer *Abcg5/g8* Knock-out: AlbCre-Mäuse, darmspezifischer *Abcg5/g8* Knock-out: VilCre-Mäuse) (modifiziert mit freundlicher Genehmigung von S. Weber).



## 4. Methodik

In diesem Abschnitt sollen sowohl die Messmethoden als auch die zur Auswertung der Daten angewendeten statistischen Modelle und die in dieser Arbeit verwendeten Materialien (s. Tabelle 4.1) erläutert werden.

Die Probengewinnung mit Anlage einer akuten Gallenfistel wird in Abschnitt 4.3 kurz beschrieben. Für eine genaue Beschreibung sowie für eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien verweise ich auch auf die Doktorarbeit von Frau C. Rebholz [15]. Die gewonnenen Proben wurden bei -80 °C aufbewahrt und nur zu Messung aufgetaut. Die Haltung und Fütterung der Mäuse entspricht den gleichen Kriterien wie in der Arbeit von C. Rebholz und wird in Abschnitt 4.2 beschrieben.

Tabelle 4.1: Materialien

Material	Hersteller
Bestimmung der Gallenzusammensetzung	
<b>Cholesterinbestimmung</b> Cholesterol (Chol) Enzymatic Endpoint Method Cat No.:CH200	Randox Laboratories Ltd.
<b>Phospholipidbestimmung</b> Phospholipid Lyo Buffer Ref: ehemals 555-753, jetzt 553-006 u. 006S	mti diagnostics GmbH
<b>Gallensäurenbestimmung</b> Total Bile Acids (TBA) 5 <sup>th</sup> Generation Enzymatic Colorimetric Cat No.:BI3863	Randox Laboratories Ltd.
Photometer	
Sunrise <sup>TM</sup> Seriennr.: 03930001975 Wellenlängenbereich: 340 nm – 750 nm Software: Magellan <sup>TM</sup>	Tecan Trading AG, Switzerland
Mausmodelle	
Wildtyp- (WT-) Mäuse : Kontrollgruppe AlbCre-Mäuse : hepatischer <i>Abcg5/g8</i> Knock-out VilCre-Mäuse : intestinaler <i>Abcg5/g8</i> Knock-out	eigene Zucht eigene Zucht eigene Zucht

## 4.1 Mausmodelle

In dieser Arbeit wurde die Gallenzusammensetzung der AlbCre-Mäuse, die keinen ABCG5/G8 Transporter in der Leber besitzen, gemessen. Hierzu wurden die Messungen entsprechend Abschnitt 4.4 durchgeführt.

C. Rebholz [15] hat in ihrer Arbeit unter anderem die Gallenzusammensetzung der WT-Mäuse und der VilCre-Mäuse, bei denen der ABCG5/G8 Transporter im Darm fehlt, gemessen. Die Daten der WT- und VilCre-Mäuse wurden zum Vergleich mit den gemessenen Werten der AlbCre-Mäuse herangezogen. Die WT-Mäuse dienten als Kontrollgruppe.

## 4.2 Haltung und Fütterung der Mäuse

Die Kriterien der Fütterung und Haltung treffen für die in C. Rebholz [15] und in dieser Arbeit untersuchten WT- und VilCre-Mäusen sowie für die AlbCre-Mäuse, die in der vorliegenden Arbeit im Fokus stehen, zu.

Die Mäuse wurden unabhängig ihres Genotyps in belüfteten Käfigen zu maximal fünf Mäusen gehalten. Die Raumtemperatur betrug  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  und die relative Luftfeuchtigkeit 50 % - 60 %. Durch künstliches Licht wurde den Mäusen ein zwölf-stündiger Tag-Nacht-Rythmus (5 Uhr bis 17 Uhr) vorgegeben. Über den gesamten Zeitraum der Haltung hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und, entsprechend ihrer Einteilung, zu dem für sie vorgesehenen Futter. Im Alter von drei Wochen wurde bei den für die lithogene Diät vorgesehenen Mäusen mit der Fütterung der speziellen Nahrung begonnen, während die anderen Mäuse weiterhin das normale Futter erhielten. Das spezielle Futter der lithogenen Diät wurde von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, [92] auf unseren Wunsch angefertigt und besteht aus 15 % Butterfett, 1 % Cholesterin, 0,5 % Cholsäure, 2 % Maisöl, 50 % Rohrzucker, 20 % Kasein, essenziellen Mineralien und Vitaminen. Die entsprechenden Mäuse erhielten über einen Zeitraum von zwölf Wochen diese lithogene Diät. Während dieser Zeit wurden die Menge der Futteraufnahme und das Körpergewicht der Mäuse regelmäßig kontrolliert. Ebenso wurden die Menge der Futteraufnahme und das Körpergewicht der Mäuse, welche eine normale Diät erhielten, kontrolliert. Bei diesen Mäusen wurde im Alter von ca. drei Monaten die Operation zur Probengewinnung durchgeführt.

Die Haltung der Mäuse sowie alle Experimente an den Mäusen wurden nach §7 und §8 des Tierschutzgesetzes [93] durchgeführt und durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt (Aktenzeichen TV28/2012).

### 4.3 Probengewinnung durch Anlage einer akuten Gallenfistel

Die zur Probengewinnung notwendige Operation der Mäuse wurde von A. Bohner und C. Rebholz durchgeführt. In diesem Abschnitt werden kurz die wichtigsten Schritte dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung findet der interessierte Leser in der Arbeit von C. Rebholz [15], auf die ich mich hier beziehe.

Die Mäuse wurden zunächst durch eine intraperitoneale Injektion und zusätzlich mit fünf Atemzügen Isofluran anästhesiert. Danach wurde mit der Operation, durchgeführt unter semisterilen Bedingungen mit dem Leica M50 Mikroskop, begonnen. Es wurde eine Laparotomie vom Bauchnabel bis zum Sternum durchgeführt, und dann wurde das Peritoneum eröffnet. Die Leber wurde nach kranial mobilisiert, und der Ductus choledochus wurde freigelegt. Dieser wurde mithilfe eines Seide-USP-Fadens (USP = United States Pharmacopeia) abgeschnürt, um eine künstliche Cholestase zu induzieren. Das Erscheinungsbild der Leber wurde subjektiv bezüglich einer Fettleber betrachtet, und die Gallenblase wurde auf Steine und Mucingehalt untersucht. Nach Rückmobilisation der Leber durchtrennte man das Ligamentum teres hepatis, welches den linken Leberlappen vom Lobus quadratus der Leber trennt und nach ventral verläuft [94]. Danach wurde die Gallenblase dargestellt. Vor der Inzision an der Gallenblasenspitze, die zur Einführung des Katheters diente, wurde um den Corpus der Gallenblase eine Schlaufe gelegt. Nach erfolgreicher Kanülierung wurde diese zur Fixierung des Katheters festgezogen. Die Probengewinnung startete, aufgrund der Schwerkraft, direkt mit der Kanülierung in Eppendorf-Reaktionsgefäße. Diese wurden in der ersten Stunde alle 15 Minuten und danach, für maximal weitere fünf Stunden, jede Stunde gewechselt. Das Volumen jeder Probe wurde dokumentiert, und die Gallenflüssigkeit wurde mikroskopisch untersucht. Nach insgesamt sechs Stunden wurde den Mäusen für weitere Analysen Leber, Milz, Darm und Blut entnommen. Während des gesamten Zeitraums der Operation und der Probengewinnung war für eine ausreichende Anästhesie und Hydratation der Mäuse gesorgt.

### 4.4 Analyse der Gallenzusammensetzung

Zur Bestimmung der Gallenzusammensetzung wurden die Konzentrationen von Cholesterin, Phospholipiden und Gallensäuren jeweils photometrisch mithilfe einer enzymatischen Reaktion bestimmt. Dabei misst das Sunrise Photometer der Firma Tecan Group Ltd., Schweiz, [95] die Extinktionswerte. Mithilfe dieser Extinktionswerte wird, bei bekanntem Standard und abzüglich der Leerwertmessung, die jeweilige Lipidkonzentration ermittelt. Die einzelnen Probenansätze wurden in eine Mikrottestplatte 96 Well mit Flachboden der Firma SARSTEDT AG Co. KG, Nümbrecht, [96] pipetiert, in der gleichzeitig 12 x 9 Proben pipettiert

und mit dem Photometer vermessen werden können. Es wurden jeweils Doppelwertmessungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt. Für jede Mikrottestplatte wurden die entsprechenden Lipidkonzentrationen des jeweiligen Standards und als Leerwert die entsprechende Lipidkonzentration von destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) ermittelt. Für jede Maus wurden, sofern vorhanden, vier Gallenproben innerhalb der ersten Stunde (entsprechend nach 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten und 60 Minuten) und darauf jede weitere Stunde eine Gallenprobe vermessen. Die Versuchsdurchführung und die jeweiligen enzymatischen Reaktionen werden im Folgenden kurz erklärt.

##### 4.4.1 Cholesterinbestimmung

Die Gesamtcholesterinkonzentration wurde mithilfe des *Cholesterol (Chol) Enzymatic Endpoint Method* Kit (Cat No: CH200) der Firma Randox Laboratories Ltd., Großbritannien, auf der Basis einer enzymatischen Extinktionsmessung bestimmt [97]. Diese enzymatische Bestimmungsmethode geht auf Allain et al. [98] und Roeschlaw et al. [99] aus dem Jahre 1974 zurück. Aufgrund der in unserem Experiment geringen Gallenmenge je Probe wurde das Versuchsprotokoll der Firma entsprechend Tabelle 4.2 angepasst.

Tabelle 4.2: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Cholesterinkonzentration

Lösung	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
ddH <sub>2</sub> O	2 µl	-	-
Standard	-	2 µl	-
Probe	-	-	2 µl
Reagenz	200 µl	200 µl	200 µl

Cholesterin wird nach enzymatischer Hydrolyse und Oxidation mithilfe der Entstehung von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bestimmt [97]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bildet, in Anwesenheit von Phenol und Peroxidase (POD), aus 4-Aminoantipyrine (PAP) den Indikator Chinonimin, wodurch es zu einer rot-violett Färbung der Probe kommt [97]. Das Ausmaß der Färbung ist somit proportional zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration und damit proportional zur Cholesterinkonzentration. Mithilfe der Extinktionsmessung kann daher die Cholesterinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Die Proben wurden entsprechend dem Pipettierschema aus Tabelle 4.2 in die Mikrottestplatten pipettiert und dann für fünf Minuten bei 37 °C im Inkubator inkubiert [97]. Danach wurde direkt die Extinktionsmessung im Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm durchgeführt. Die gemessenen Extinktionswerte des Sunrise Photometers wurden mit der zugehörigen Magellan<sup>TM</sup> Software [95] ausgelesen und die Werte in Microsoft Excel extrahiert. Die Extinktionswerte der Standardprobe wurden für jede Mikrottestplatte in Abhängigkeit von ihrer Konzentration entsprechend des Verdünnungsgrades

aufgetragen, und dann wurde die lineare Regressionsgerade ermittelt. Mithilfe dieser Geradengleichung und anhand der gemessenen Extinktionswerte wurden für unsere unbekanntenen Proben die Cholesterinkonzentrationen bestimmt.

#### 4.4.2 Phospholipidbestimmung

Die Phospholipidkonzentration wurde mithilfe des *Phospholipid Lyo-Buffer Kits* (ehemals Bestellnummer: 555-752; jetzt Buffer Bestellnummer: 553-006) und dem *Phospholipid [300 mg/dl] Standard* (Bestellnummer: 006S) der Firma mti-diagnostics, Idstein, [100] bestimmt. Hierbei handelt es sich, wie bei der Cholesterinbestimmung, um eine enzymatische Extinktionsmessung basierend auf der Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  [101]. Das Messprotokoll wurde aufgrund der geringen Probenmenge angepasst (s. Tabelle 4.3). In Gegenwart der Phospholipase D hydrolysieren Phospholipide zu Choline und Phosphatid Säure. Nach Oxidation der Choline durch die Cholinoxidase bildet sich  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Betaine.  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert in Anwesenheit von Peroxidase (POD) mit 4-Aminoantipyrine (PAP) und Phenol zum rot-violetten Chinonimin. Die Intensität der roten Farbe des Chinonimin ist proportional zur  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration und daher proportional zur Phospholipidkonzentration. Durch Messung der Extinktion mit dem Sunrise Photometer der Firma Tecan [95] bei einer Wellenlänge von 492 nm kann somit die Phospholipidkonzentration bestimmt werden. Wie bei der Cholesterinbestimmung wurde auch bei der Phospholipidbestimmung für jede Mikrottestplatte eine Leerwertmessung mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und eine Standardverdünnungsreihe als Referenzmessung durchgeführt, mit deren Ausgleichsgerade die unbekanntenen Phospholipidkonzentrationen anhand der gemessenen Extinktionswerte berechnet werden können. Da nach Herstellerangaben ab einer Phospholipidkonzentration größer als 1000 mg/dl (12,9 mmol/l) keine Linearität zwischen Extinktion und Phospholipidkonzentration mehr gegeben ist, wurden die Proben entsprechend 1:3 (normale Diät) bzw. 1:4 (lithogene Diät) verdünnt und die Messwerte mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

Tabelle 4.3: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Phospholipidkonzentration

Lösung	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
ddH <sub>2</sub> O	1 µl	-	-
Standard	-	1 µl	-
Probe	-	-	1 µl
Reagenz	150 µl	150 µl	150 µl

### 4.4.3 Gallensäurenbestimmung

Die Gallensäurenkonzentration wurde mithilfe des *Total Bile Acids (TBA)* Kit der fünften Generation (Cat No.: BI3863) der Firma Randox Laboratories Ltd., Großbritannien, [97] bestimmt. Das Versuchsprotokoll des Herstellers basiert auf einer modifizierten Methode von Komiyama et al. aus dem Jahre 1982 [102] und von Agape et al. aus dem Jahre 1989 [103]. Die Taurochlorsäure wurde mit Methanol verdünnt, und fünf Verdünnungsstufen wurden jeweils im doppelten Ansatz als Standardmessung mitgeführt. Die Gallensäurenkonzentration wird, basierend auf einer enzymatischen Reaktion, durch Messung der Extinktion bestimmt. Bei Anwesenheit von Thio-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Thio-NAD) (Reagenz I) wandelt das Enzym 3- $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase (3- $\alpha$ -HSD) Gallensäure in das 3-Keto Steroid um, wobei Thio-NAD zu Thio-NADH reagiert. Hierbei handelt es sich um eine reversible Reaktion, bei der sich ein Reaktionsgleichgewicht einstellt. Bei einem Überangebot an NADH (Reagenz II) wird die Reaktion effizient, sodass anhand der Bildung von Thio-NADH die vorhandene Gallensäurenkonzentration bestimmt werden kann.

Aufgrund der geringen Probenmenge wurde das Versuchsprotokoll modifiziert (s. Tabelle 4.4). Die Proben wurden mit Methanol 1:200 verdünnt. Nach Zugabe von Reagenz I, welches unter anderem Thio-NAD enthält, wurde die Mikrottestplatte bei 37 °C inkubiert. Danach wurde Reagenz II, welches unter anderem NADH und das Enzym 3- $\alpha$ -HSD enthält, in die Mikrottestplatte pipettiert. Die Extinktion wurde nach einer Minute ( $A_1$ ) und nach weiteren zwei Minuten ( $A_2$ ) mit dem Sunrise Photometer [95] bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Differenz der beiden Extinktionswerte ( $\Delta A = A_2 - A_1$ ) gibt Aufschluss auf die Bildung von Thio-NADH und damit auf die vorliegende Gallensäurenkonzentration. Mithilfe der Ausgleichsgeraden der Standardextinktionswerte können aus den gemessenen Extinktionswerten der Proben die jeweiligen Gallensäurenkonzentrationen ermittelt werden.

Tabelle 4.4: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Gallensäurenkonzentration

Lösung	Reagenz Blank S0	Standard S1	Probe
ddH <sub>2</sub> O	1,5 $\mu$ l	-	-
Standard	-	1,5 $\mu$ l	-
Probe	-	-	1,5 $\mu$ l
Reagenz I	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Reagenz II	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

## 4.5 Berechnungen und statistische Methoden

### 4.5.1 Berechnungen

Die gemessenen Extinktionswerte wurden mithilfe der Magalan Software des Sunrise Photometers der Firma Tecan Group Ltd., Schweiz, [95] ausgelesen und die Werte in Microsoft Excel extrahiert. Anhand der Ausgleichsgeraden der Standardmessungen und nach Abzug des Extinktionswertes der immer mitgeführten Leerwertmessung wurden die jeweiligen Konzentrationen berechnet.

#### 4.5.1.1 Gesamtlipidkonzentration

Die Gesamtlipidkonzentration ist die Summe aus der Cholesterin-, Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration. Sie wird in g/dl angegeben. Die einzelnen Konzentrationen, gemessen in mmol/l, werden durch Multiplikation mit ihrer molaren Masse und Division durch 1000 in g/dl umgerechnet ( $M_{\text{Chol}} = 38,67 \text{ g/mol}$ ,  $M_{\text{PL}} = 77,5 \text{ g/mol}$ ,  $M_{\text{GS}} = 53,77 \text{ g/mol}$ ). Die Angaben der einzelnen Konzentrationen an der Gesamtlipidkonzentration werden in mol % angegeben. Es werden der erste Stundenwert der Gesamtlipidkonzentration und der einzelnen Lipidkonzentrationen der unterschiedlichen Mausreihen miteinander verglichen.

#### 4.5.1.2 Gallefluss

Der Gallefluss wird in  $\mu\text{l/hr}$  auf ein Körpergewicht von 100 g angegeben. Durch Normierung auf 100 g Körpergewicht wird der Gallefluss der Mäuse untereinander vergleichbar.

#### 4.5.1.3 Cholesterinsättigungsindex

Der Cholesterinsättigungsindex (CSI-Wert) einer Gallenprobe entspricht dem Quotienten aus der ermittelten Cholesterinkonzentration und der maximal löslichen Cholesterinkonzentration in dieser Galle. Zur Ermittlung der maximal löslichen Cholesterinkonzentration in der Galle wurden die Tabellen von Carey et al. [104] herangezogen. In den Tabellen wird für verschiedene Gesamtlipidkonzentrationen die maximal lösliche Cholesterinkonzentration in Abhängigkeit vom  $N$ -Wert, welcher dem Quotienten aus der Phospholipidkonzentration und der Summe aus Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration entspricht, aufgelistet. Ein CSI-Wert größer als 1 repräsentiert eine übersättigte Galle. Mithilfe des CSI-Wertes lässt sich die Cholesterinübersättigung quantifizieren und die Gefahr einer Gallensteinbildung quantitativ abschätzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Liste in Microsoft Excel übertragen und graphisch dargestellt. Für jede Gesamtlipidkonzentration wurden die Punkte mit einem Polynom dritten Grades interpoliert. Mithilfe dieser Polynomgleichungen muss für jede beliebige Gesamtlipidkonzentration und für jeden beliebigen  $N$ -Wert (sofern er innerhalb des Wertebereichs liegt) nur noch zwischen zwei statt vier Werten interpoliert werden, um die maximal lösliche Cholesterinkonzentration zu erhalten. Die graphische Darstellung der Tabelle mit Interpolation der einzelnen Punkte entsprechend der Gesamtlipidkonzentration durch ein Polynom dritten Grades findet sich im Anhang (s. Abb. 9.1). Ein CSI-Wert größer als 1 repräsentiert eine übersättigte Galle. Mithilfe des CSI-Wertes lässt sich die Cholesterinübersättigung quantifizieren und die Gefahr einer Gallensteinbildung besser abschätzen.

### 4.5.1.4 Output- und Sekretionswerte

Bei in dieser Arbeit ausgewerteten Outputwerten handelt es sich jeweils um die absoluten Cholesterin-, Phospholipid- bzw. Gallensäurenkonzentrationen der ersten Stunde. Diese Outputkonzentrationen entsprechen dem Mittelwert aus den gemessenen Konzentrationen der Gallenproben, welche nach 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten und nach 60 Minuten gewonnen wurden, normiert auf eine Stunde und auf ein Kilogramm Körpergewicht ( $\mu\text{mol/hr/kg}$ ). Diese Normierung erlaubt den Vergleich der einzelnen Gallenkonzentrationen zwischen den verschiedenen Mausmodellen.

Die Sekretionswerte der einzelnen Konzentrationen werden in  $\mu\text{mol/hr/g}$  angegeben. Hierbei wird nicht der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen aus den Messwerten der ersten Stunde gebildet, sondern die jeweiligen gemessenen Konzentrationen nach 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten und nach 60 Minuten gehen, entsprechend normiert, in die Auswertung ein. Mithilfe dieser Sekretionswerte wird die Abhängigkeit des Galleflusses, der Cholesterin- und der Phospholipidsekretion von der Gallensäuresekretion analysiert.

### 4.5.2 Statistische Methoden

Die Auswertung und Analyse der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 6 für Windows (Version 6.01) [105] durchgeführt.

Die absoluten Werte wie Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW), der Quotient aus Leber- und Körpergewicht, die Gesamtlipidkonzentration, die einzelnen Konzentrationen in mol% sowie der CSI-Wert und die Outputwerte der einzelnen Konzentrationen werden mit ungepaarten  $t$ -Tests auf ein Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  analysiert. Für diese Werte wird jeweils der Mittelwert  $\pm$  SEM (standard error of the mean) angegeben.



Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion wurde mithilfe der linearen Regressionanalyse untersucht. Zunächst wird auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  getestet, ob zwischen diesen Parametern für das jeweilige Mausmodell eine lineare Abhängigkeit besteht. Danach wird untersucht, ob die Ausgleichsgeraden der jeweiligen untersuchten Mausmodelle sich signifikant unterscheiden. Dieses bedeutet, dass ein signifikanter Unterschied in der Steigung und/oder im y-Achsen-schnittpunkt der Ausgleichsgeraden existiert. Zur Prüfung der Abhängigkeit der Phospholipidkonzentration von der Gallensäuresekretion wurde eine nichtlineare Regressionsanalyse mithilfe einer hyperbolischen Fitfunktion auf ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durchgeführt. Diese Fitfunktion wird in Abschnitt 5.1.3 genauer erläutert.

## 5. Ergebnisse: Auswirkungen der lithogenen Diät auf die Wildtyp-Mäuse und die AlbCre-Mäuse

Nachfolgend werden die Auswirkungen der lithogenen Diät im Vergleich zur normalen Diät anhand des WT-Mausmodells und des AlbCre-Mausmodells untersucht.

### 5.1 Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

#### 5.1.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht

Das Lebergewicht und das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht sind bei den WT-Mäusen mit lithogener Diät signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ) höher als die entsprechenden Werte der WT-Mäuse unter normaler Diät. Im Körpergewicht zeigt sich bezüglich der Fütterungsform kein Unterschied (s. Abb. 5.1).

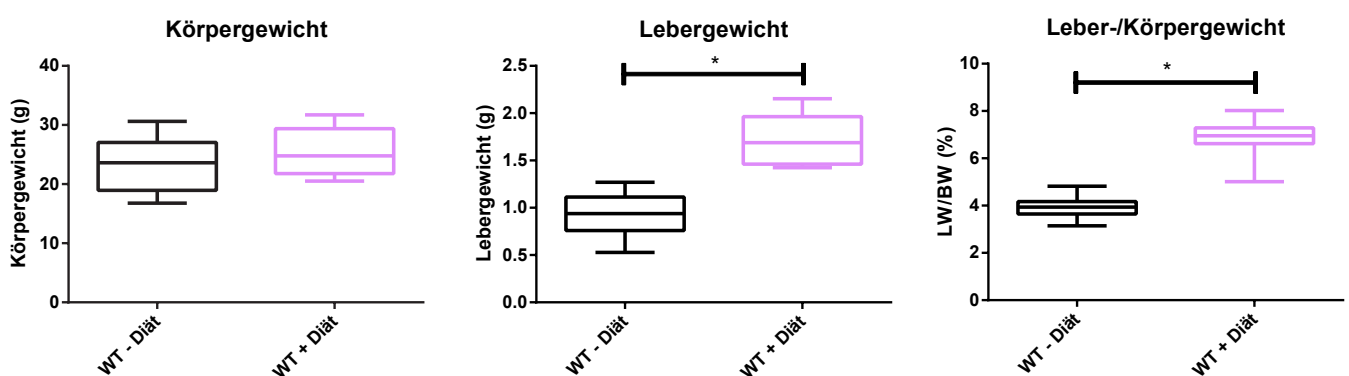


Abbildung 5.1: Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

### 5.1.2 Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex

Die Gesamtlipidkonzentration und der CSI-Wert sind für die WT-Mäuse mit lithogener Diät signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ) höher als die entsprechenden Werte bei normaler Diät (s. Abb. 5.3). Vergleicht man die Cholesterin- ( $p < 0,0001$ ) und Phospholipidkonzentrationen ( $p = 0,0004$ ), jeweils bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration, der WT-Mäuse bei normaler Diät mit denen bei lithogener Diät, so findet sich auch hier ein signifikanter Anstieg dieser Konzentrationen unter lithogener Diät. Die relative Gallensäurenkonzentration ist hingegen unter lithogener Diät signifikant ( $p < 0,0001$ ) geringer als unter normaler Diät (s. Abb. 5.2).

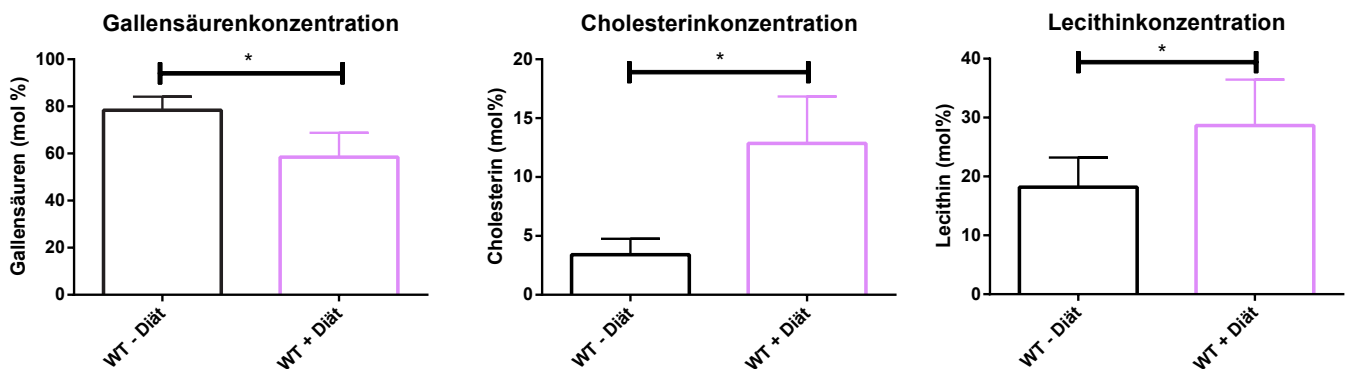


Abbildung 5.2: Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der 1. Stunde in mol % bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration für die WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

### 5.1.3 Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäurensekretion

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäurensekretion wurde jeweils mithilfe einer linearen Regressionsanalyse untersucht (s. Abb. 5.4). Unabhängig von der Fütterungsart, also sowohl für die WT-Mäuse mit normaler Diät ( $p < 0,0001$ ) als auch für die mit lithogener Diät ( $p = 0,005$ ), zeigt sich eine lineare Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäurensekretion. Die Steigungen der beiden Regressionsgeraden unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,0001$ ) mit einer geringeren Steigung für die WT-Mäuse mit lithogener Diät. Aufgrund des linearen Fits ergibt sich für die WT-Mäuse mit litho-

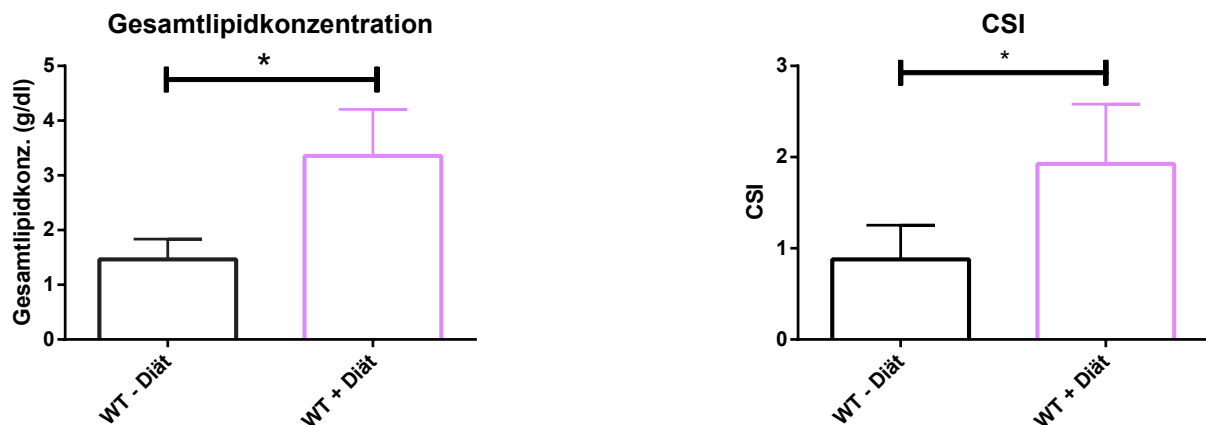


Abbildung 5.3: Gesamtlipidkonzentration und CSI-Wert der 1. Stunde der WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

gener Diät ein gallensäurenunabhängiger Gallefluss von  $GF_{WT+Diät} = (460,50 \pm 42,12) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ , welcher höher ist als der der WT-Mäuse mit normaler Diät ( $GF_{WT-Diät} = (229,00 \pm 30,24) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ ).

► WT - Diät:  $GF_{WT-Diät} = 22,52 (\pm 2,43) \cdot GS_{sec} + 229,00 (\pm 30,24)$

$(R^2 = 0,5268; p < 0,0001)$ ,

► WT + Diät:  $GF_{WT+Diät} = 6,06 (\pm 2,09) \cdot GS_{sec} + 460,50 (\pm 42,12)$

$(R^2 = 0,1134; p < 0,0050)$ .

Die Cholesterinsekretion zeigt bei den WT-Mäusen mit normaler Diät eine lineare Abhängigkeit von der Gallensäurensekretion ( $R^2 = 0,2687, p < 0,0001$ ). Dies trifft jedoch nicht für die WT-Mäuse mit lithogener Diät zu ( $R^2 = 0,0231, p = 0,2164$ ). Vergleicht man dennoch für beide Fütterungsvarianten die Geraden mit den besten Fits, so zeigen beide Ausgleichsgeraden die gleiche Steigung. Die y-Achsenabschnitte der Cholesterinsekretion unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,0001$ ).

► WT - Diät:  $Ch_{secWT-Diät} = 0,03 (\pm 0,01) \cdot GS_{sec} + 0,15 (\pm 0,07)$

$(R^2 = 0,2687); p < 0,0001)$ ,

► WT + Diät:  $Ch_{secWT+Diät} = 0,03 (\pm 0,03) \cdot GS_{sec} + 3,88 (\pm 0,55)$

$(R^2 = 0,0231; p = 0,2164)$ .

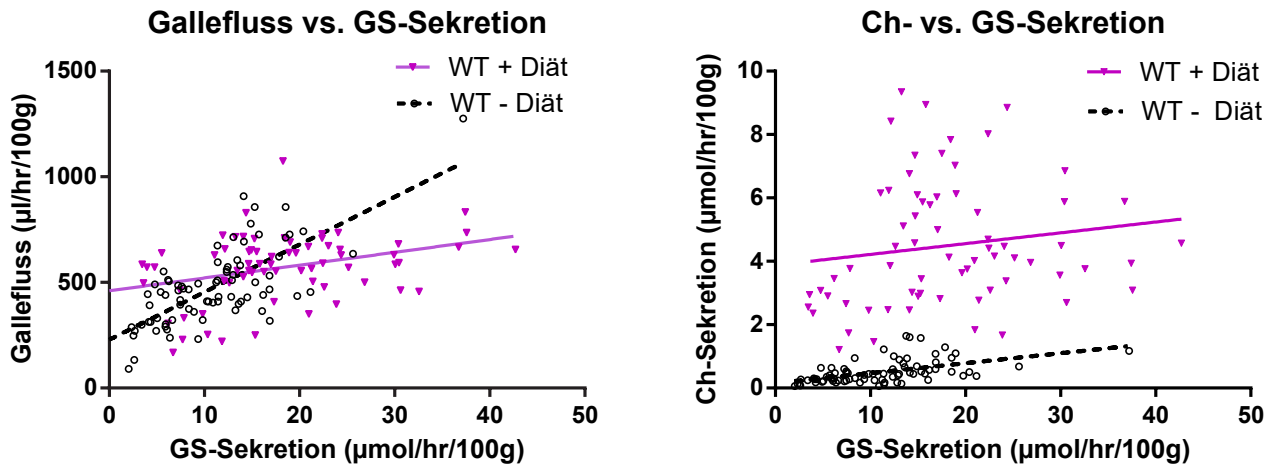


Abbildung 5.4: Darstellung des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) für die WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit des Galleflusses bzw. der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) zeigt einen linearen Fit.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Phospholipidsekretion und Gallensäuresekretion (s. Abb. 5.5) bedient man sich einer rechteckigen Hyperbel nach N. A. Mazer et al. [106], welche durch folgende Gleichung beschrieben wird:

$$Lec_{sec} = \left( \frac{Lec_{sec_{max}}}{K_d + GS_{sec}} \right) \cdot GS_{sec}. \quad (5.1)$$

Diese Gleichung entspricht der Michaelis-Menten Gleichung, welche von Leonor Michaelis und Maud Menten 1913 zur Beschreibung der Beziehung zwischen Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  und Substratkonzentration  $S$  einer enzymatisch katalysierten Reaktion entwickelt wurde:  $v_0 = S/(S+K_M) \cdot v_{max}$  [107]. Hierbei stellt  $K_M$  die Michaelis-Konstante dar. In Gleichung (5.1) entspricht  $v_0$  der Phospholipidsekretion  $Lec_{sec}$ ,  $v_{max}$  der maximalen Phospholipidsekretion  $Lec_{sec_{max}}$ ,  $S$  der Gallensäuresekretion  $GS_{sec}$  und  $K_M$  der Dissoziationskonstanten  $K_d$ .

Für große Gallensäuresekretionswerte verliert die Konstante  $K_d$  in Gleichung (5.1) an Bedeutung und kann vernachlässigt werden, sodass sich der Faktor  $GS_{sec}$  aus dem Bruch kürzen lässt und man folgende Gleichung erhält:  $Lec_{sec} = Lec_{sec_{max}}$ . Die Phospholipidsekretion  $Lec_{sec}$  strebt somit für sehr große Gallen-

säuresekretionswerte einen maximalen Wert  $Lec_{sec_{max}}$  an. Diese Gleichung beschreibt eine Reaktion nullter Ordnung, wobei die Phospholipidsekretion unabhängig von der Gallensäuresekretion ist [107].

Für sehr kleine Gallensäuresekretionswerte,  $GS_{sec} \ll K_d$ , lässt sich Gleichung (5.1) vereinfachen zu  $Lec_{sec} = (Lec_{sec_{max}}/K_d) \cdot GS_{sec}$ . Diese Gleichung beschreibt eine Reaktion erster Ordnung, d.h. die Phospholipidsekretion ist der Gallensäuresekretion direkt proportional, sodass eine lineare Abhängigkeit besteht [107].  $K_d$  entspricht dem Gallensäuresekretionswert, bei welchem die Phospholipidsekretion ihren halbmaximalen Wert erreicht.

Die hyperbolische Regressionsanalyse ergibt für die WT-Mäuse folgende Gleichungen:

$$\begin{aligned} \text{▷ WT - Diät:} \quad Lec_{sec_{WT - Diät}} &= \frac{11,19 (\pm 3,55) \cdot GS_{sec}}{31,58 (\pm 14,46) + GS_{sec}}, \\ \text{▷ WT + Diät:} \quad Lec_{sec_{WT + Diät}} &= \frac{12,24 (\pm 1,30) \cdot GS_{sec}}{4,41 (\pm 2,11) + GS_{sec}}. \end{aligned}$$

Diese Gleichungen zeigen einen signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Unterschied für die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion von der Gallensäuresekretion zwischen den beiden Fütterungsvarianten der WT-Mäuse. Betrachtet man die Phospholipidsekretionswerte für die für uns relevanten Gallensäuresekretionswerte, so zeigen sich deutlich höhere Phospholipidsekretionswerte für die WT-Mäuse mit lithogener Diät als für die mit normaler Diät.

Zur Analyse der Abhängigkeit der Cholesterinsekretion von der Phospholipidsekretion (s. Abb. 5.5) wird auch die hyperbolische Regressionsanalyse benutzt. Mit der Analysesoftware kann jedoch kein Vergleich der Fitfunktionen berechnet werden. Es wird aber deutlich, dass die WT-Mäuse mit normaler Diät, verglichen mit den lithogen gefütterten WT-Mäusen, wesentlich geringere Phospholipidsekretionswerte bei niedrigeren Cholesterinsekretionswerten besitzen.

#### 5.1.4 Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration

Die Output-Werte der Gallensäuren- ( $p = 0,0098$ ), Cholesterin- ( $p < 0,0001$ ) und Phospholipidkonzentration ( $p < 0,0001$ ) der 1. Stunde der WT-Mäuse mit normaler und mit lithogener Diät unterscheiden sich signifikant. Die Konzentrationen sind jeweils für die lithogen gefütterten WT-Mäuse höher als die entsprechenden Werte der WT-Mäuse, die eine normale Diät erhielten (s. Abb. 5.6).

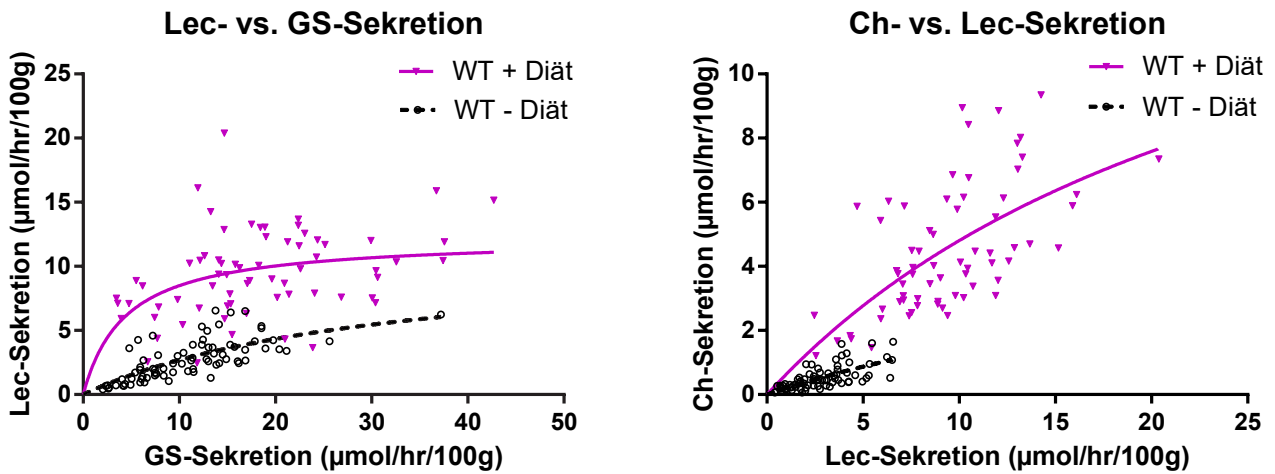


Abbildung 5.5: Darstellung der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) für die WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie die Beziehung zwischen Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) und Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) zeigen einen hyperbolischen Fit.

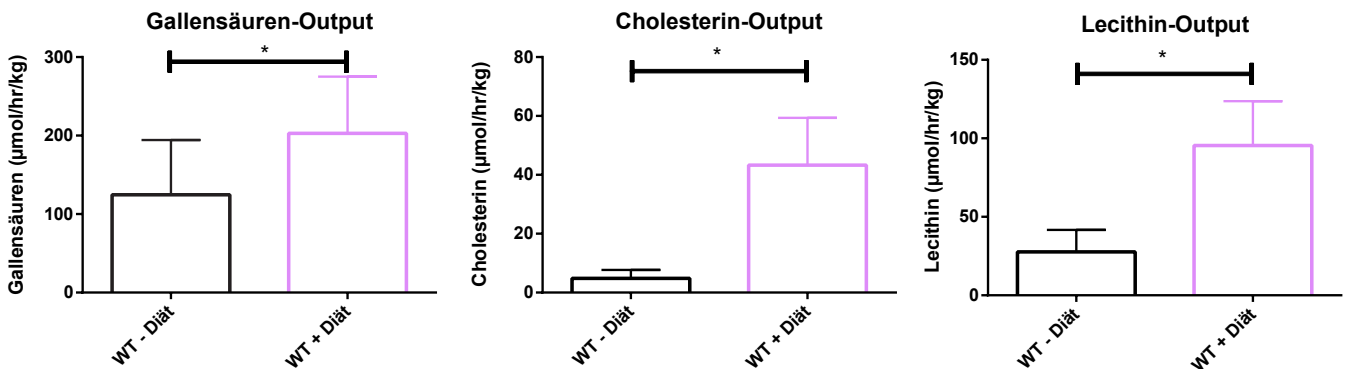


Abbildung 5.6: Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentrationen der WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

## 5.2 Vergleich zwischen AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

### 5.2.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht

Das Körpergewicht ( $p = 0,0045$ ), das Lebergewicht und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (jeweils  $p < 0,0001$ ) sind bei den AlbCre-Mäusen, die eine lithogene Diät erhielten, signifikant höher als die jeweiligen Werte der AlbCre-Mäuse mit normaler Diät (s. Abb. 5.7).

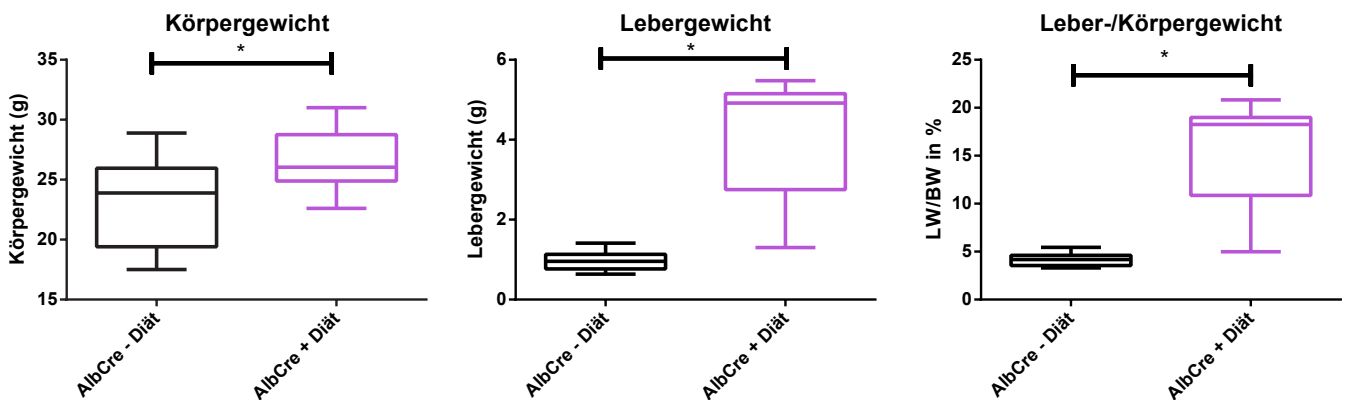


Abbildung 5.7: Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

### 5.2.2 Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex

Die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse unterschiedlicher Diät unterscheiden sich signifikant (s. Abb. 5.8). Während die Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse mit lithogener Diät signifikant (jeweils  $p = 0,0018$ ) höher sind als die der AlbCre-Mäuse mit normaler Diät, ist die Gallensäurenkonzentration der lithogen gefütterten AlbCre-Mäuse signifikant ( $p = 0,0004$ ) geringer als die der normal gefütterten AlbCre-Mäuse. Zudem zeigt sich ein signifikanter ( $p = 0,0002$ ) Unterschied in der Gesamtlipidkonzentration mit höheren Werten für die AlbCre-Mäuse mit lithogener Diät (s. Abb. 5.9). Hinsichtlich des CSI-Wertes unterscheiden sich die beiden AlbCre-Mausgruppen unterschiedlicher Diät nicht (s. Abb. 5.9).



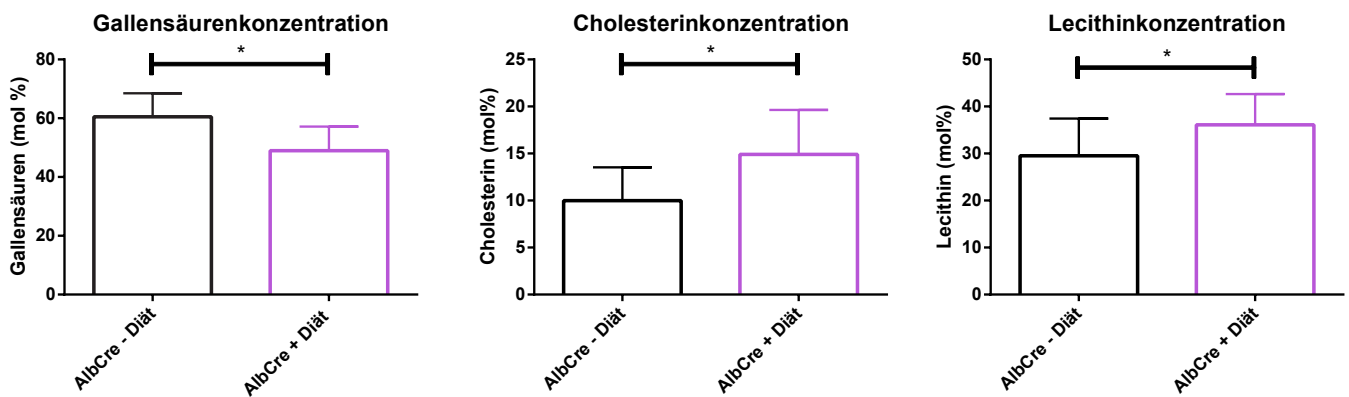


Abbildung 5.8: Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der 1. Stunde in mol % bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

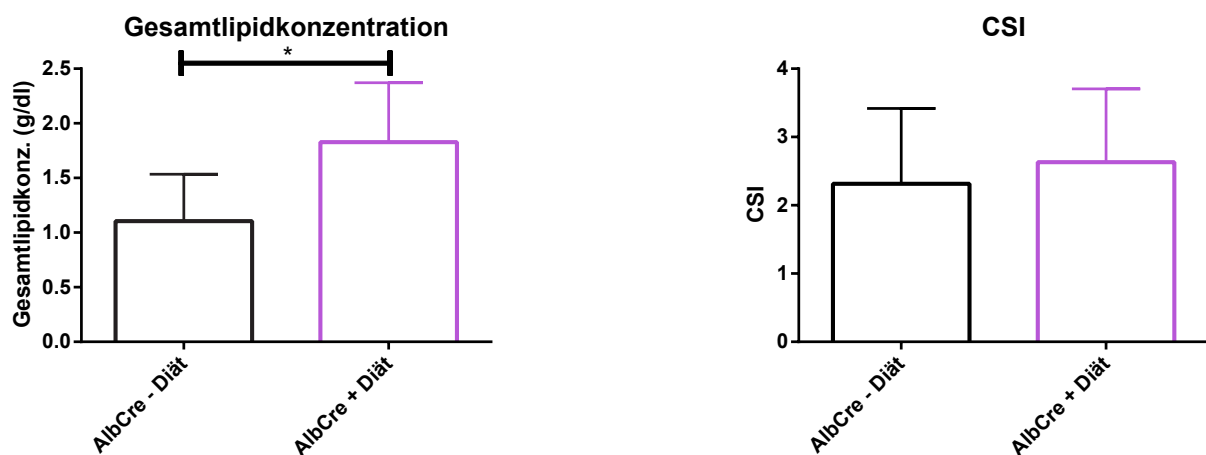


Abbildung 5.9: Gesamtlipidkonzentration und CSI-Wert der 1. Stunde der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät im Vergleich.

### 5.2.3 Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäuresekretion

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion wurde jeweils mithilfe einer linearen Regressionsanalyse untersucht (s. Abb. 5.11). Unabhängig von der Fütterungsart, sowohl für die AlbCre-Mäuse mit normaler Diät ( $p < 0,0001$ ) als auch für die mit lithogener Diät

( $p = 0,0145$ ), zeigt sich eine lineare Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion. Die Steigungen der beiden Regressionsgeraden unterscheiden sich signifikant ( $p = 0,0007$ ), mit einer geringeren Steigung der AlbCre-Mäuse unter lithogener Diät. Da der Unterschied in den Steigungen hoch signifikant ist, ist es der Analysesoftware nicht möglich, auf einen signifikanten Unterschied im gallensäurenunabhängigen Gallefluss zwischen den beiden Diätformen der AlbCre-Mäuse zu testen. Entsprechend dem linearen Fit ergibt sich für die AlbCre-Mäuse mit lithogener Diät ein gallensäurenunabhängiger Gallefluss von  $GF_{\text{AlbCre} + \text{Diät}} = (537,0 \pm 30,75) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ , welcher höher ist als der der AlbCre-Mäuse unter normaler Diät ( $GF_{\text{AlbCre} - \text{Diät}} = (373,3 \pm 36,69) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ ). Zudem fallen die geringen Gallensäuresekretionswerte besonders bei den AlbCre-Mäusen mit normaler Diät auf. Nur bei den AlbCre-Mäusen mit lithogener Diät zeigen einzelne Mäuse Gallensäuresekretionsraten über  $20 \mu\text{mol/hr}/100\text{g}$ .

Die Abhängigkeiten des Galleflusses von der Gallensäuresekretion für die AlbCre-Mäuse werden durch folgenden Gleichungen beschrieben:

► AlbCre - Diät:  $GF_{\text{AlbCre} - \text{Diät}} = 31,05 (\pm 6,76) \cdot GS_{\text{sec}} + 373,30 (\pm 36,69)$

$$(R^2 = 0,1574; p < 0,0001),$$

► AlbCre + Diät:  $GF_{\text{AlbCre} + \text{Diät}} = 6,59 (\pm 2,63) \cdot GS_{\text{sec}} + 537,00 (\pm 30,75)$

$$(R^2 = 0,0761; p = 0,0145).$$

Die Cholesterinsekretion zeigt bei beiden Diätformen, für die AlbCre-Mäuse mit normaler ( $p < 0,0001$ ) und für die mit lithogener ( $p = 0,0005$ ) Diät, eine lineare Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion. Wie bereits beim Vergleich der unterschiedlichen Diätformen innerhalb der WT-Gruppe zu sehen war, besitzen die Ausgleichsgeraden der beiden Diätformen der AlbCre-Mäuse die gleiche Steigung, aber eine signifikant unterschiedliche basale Cholesterinsekretion.

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Phospholipidsekretion und Gallensäuresekretion bedient man sich wieder einer hyperbolischen Fitfunktion (s. Abb. 5.11). Die hyperbolische Regressionsanalyse ergibt folgende Gleichungen:

► AlbCre - Diät:  $Lec_{\text{secAlbCre} - \text{Diät}} = \frac{(8,87 (\pm 3,11) \cdot GS_{\text{sec}}}{11,17 (\pm 5,98) + GS_{\text{sec}}},$

► AlbCre + Diät:  $Lec_{\text{secAlbCre} + \text{Diät}} = \frac{10,12 (\pm 1,15) \cdot GS_{\text{sec}}}{4,35 (\pm 1,46) + GS_{\text{sec}}},$

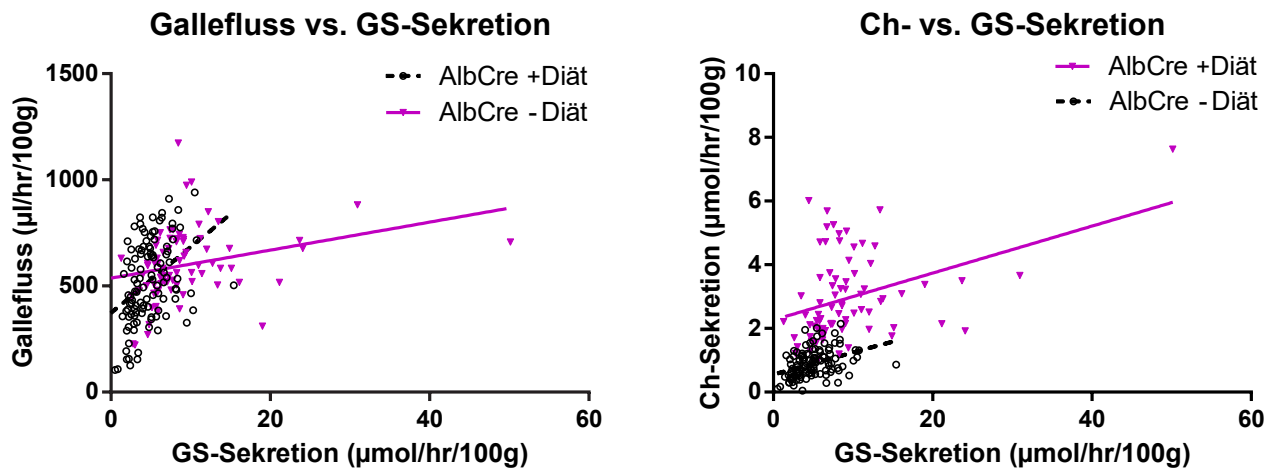


Abbildung 5.10: Darstellung des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) zeigt einen linearen Fit.

die sich signifikant ( $p < 0,0001$ ) voneinander unterscheiden. Der maximale Phospholipidsekretionswert, gegen den die jeweilige Fitfunktion konvergiert, ist für die AlbCre-Mäuse mit lithogener Diät signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher.

Weiterhin lässt sich die Abhängigkeit der Cholesterinsekretion von der Phospholipidsekretion mithilfe der hyperbolischen Fitfunktion analysieren. Auch hier wird ein signifikanter ( $p < 0,0001$ ) Unterschied zwischen den beiden Diätformen der AlbCre-Mäuse mit höheren Werten für die lithogen gefütterten Mäuse beobachtet.

#### 5.2.4 Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration

Die Output-Werte der Cholesterin- und Phospholipidkonzentration sind für die AlbCre-Mäuse mit lithogener Diät signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ) größer als die der AlbCre-Mäuse mit normaler Diät. Für die Gallensäurenkonzentration zeigt sich zwischen den beiden Diätformen der AlbCre-Mäuse kein Unterschied (s. Abb. 5.12).

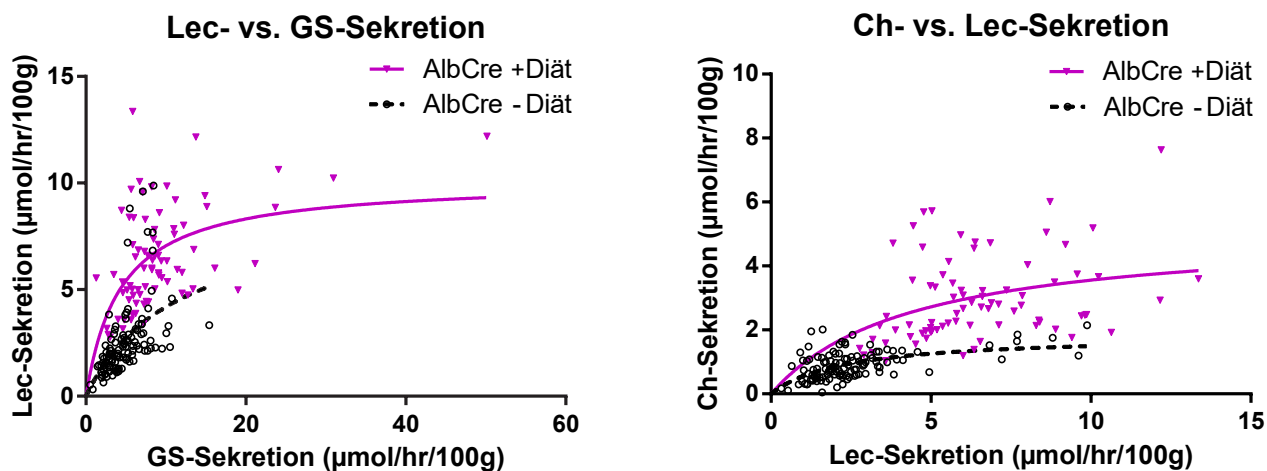


Abbildung 5.11: Darstellung der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie die Beziehung zwischen Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) und Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) zeigen einen hyperbolischen Fit.

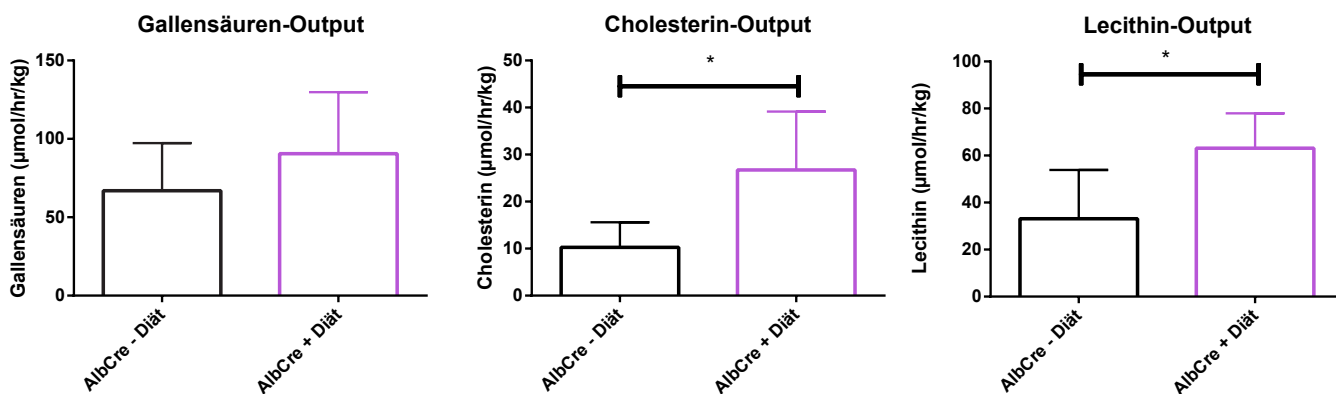


Abbildung 5.12: Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät.

### 5.3 Zusammenfassung

In der Tabelle 5.1 sind die Abweichungen aller untersuchten Parameter der WT-Mäuse und der AlbCre-Mäuse unter lithogener Diät im Vergleich zur normalen Diät dargestellt.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der untersuchten Parameter der WT und AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. Die Pfeile stellen jeweils die Abweichung der Parameter unter lithogener Diät im Vergleich zur normalen Diät des jeweiligen Mausmodells dar. Die fettgedruckten Pfeile stellen die gleiche Tendenz bei den WT-Mäusen und bei den AlbCre-Mäusen dar.

Variable	WT + Diät vs. WT – Diät	AlbCre + Diät vs. AlbCre – Diät
Lebergewicht	↑	↑
LW/BW	↑	↑
Gallensäurenkonzentration	↓	↓
Cholesterinkonzentration	↑	↑
Lecithinkonzentration	↑	↑
Gesamtlipidkonzentration	↑	↑
CSI	↑	↔
Gallefluss	Steigung: ↓ gallensäureunabh. Gallefluss: ↑	Steigung: ↓ gallensäureunabh. Gallefluss: ↑
Cholesterin- vs. Gallensäuresekretion	Steigung: ↔ gallensäureunabh. Gallefluss: ↑	Steigung: ↔ gallensäureunabh. Gallefluss: ↑
Lecithin- vs. Gallensäuresekretion	<i>Lec<sub>max</sub></i> : ↑	<i>Lec<sub>max</sub></i> : ↑
Gallensäurenoutput	↑	↔
Cholesterinoutput	↑	↑
Lecithinoutput	↑	↑

## 6. Ergebnisse: Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

Nachfolgend werden die AlbCre-Mäuse (gewebsspezifischen *Abcg5/g8* Knock-out in der Leber) mit dem WT-Mausmodell (Kontrollgruppe) verglichen. Der Vergleich wird jeweils für die Mäuse mit normaler und mit lithogener Diät durchgeführt.

### 6.1 Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler Diät

#### 6.1.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht

Unter normaler Diät zeigen sich bezüglich Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und dem Quotienten aus Leber- und Körpergewicht keine Unterschiede zwischen den AlbCre-Mäusen und der Kontrollgruppe (s. Abb. 6.1).

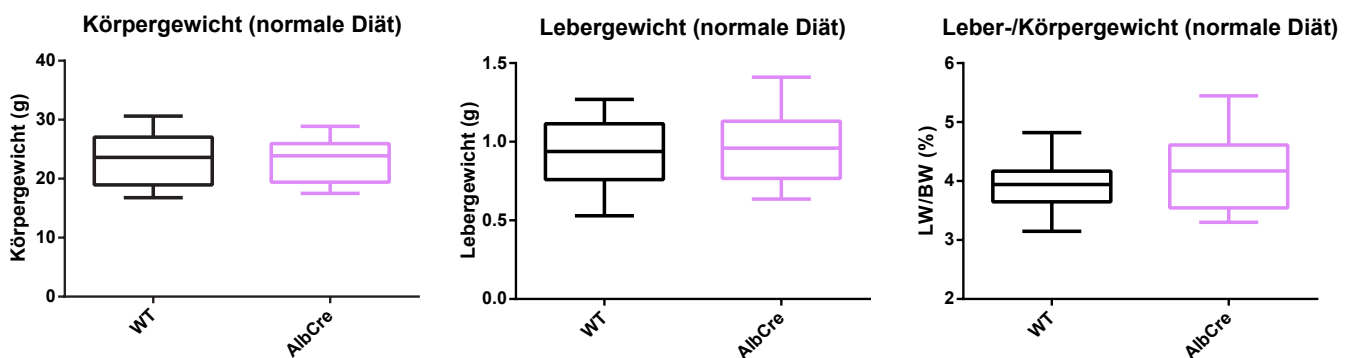


Abbildung 6.1: Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei normaler Diät.

### 6.1.2 Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex

Die beiden Mausmodelle zeigen bei normaler Diät signifikante (jeweils  $p < 0,0001$ ) Unterschiede in der Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, die bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration angegeben werden (s. Abb. 6.2). Zusätzlich zeigt sich ein signifikanter ( $p = 0,0163$ ) Unterschied in der Gesamtlipidkonzentration (s. Abb. 6.3). Die Gesamtlipidkonzentration ist, wie auch die relative Gallensäurenkonzentration, bei den AlbCre-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erniedrigt. Die Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse sind, verglichen mit der Kontrollgruppe, erhöht. Ebenso lässt sich ein signifikanter ( $p < 0,0001$ ) Unterschied im CSI-Wert feststellen ( $p < 0,0001$ ), der für die AlbCre-Mäuse mit  $CSI_{\text{AlbCre - Diät}} = 2,31$  deutlich über einem CSI-Wert von 1 liegt (s. Abb. 6.3).

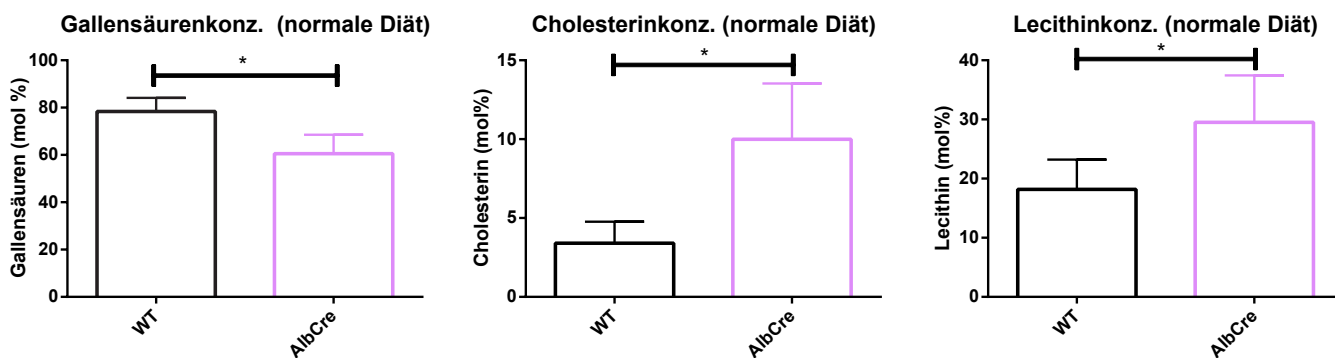


Abbildung 6.2: Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der 1. Stunde in mol % bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei normaler Diät.

### 6.1.3 Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäuresekretion

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion wurde jeweils mithilfe einer linearen Regressionsanalyse untersucht (s. Abb. 6.4). Bei jedem Mausmodell zeigt sich eine lineare Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion ( $p < 0,0001$ ). Anzumerken ist jedoch, dass die Fits mit einem  $R^2 = 0,5268$  für die Kontrollgruppe und mit einem  $R^2 = 0,1574$  für die AlbCre-Mäuse angegeben werden. Die linearen Fits zeigen keinen Unterschied in den Steigungen der Geraden. Der gallensäurenunabhängige Gallefluss der AlbCre-Mäuse ist mit  $GF_{\text{AlbCre - Diät}} = 373,30 (\pm 36,69) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$

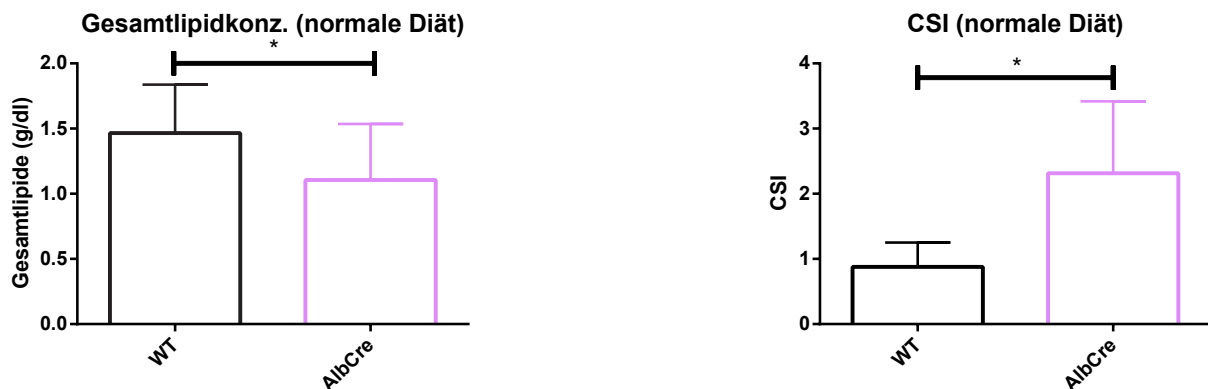


Abbildung 6.3: Gesamtlipidkonzentration und CSI-Wert der 1. Stunde der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei normaler Diät.

signifikant ( $p < 0,0001$ ) höher als der entsprechende Wert der WT-Mäuse ( $GF_{WT - Diät} = 229,00 (\pm 30,24) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ ) ( $p < 0,0001$ ). Zusätzlich stellt sich in diesem Diagramm (s. Abb. 6.4) die bereits gemachte Beobachtung der geringeren Gallensäurenkonzentration bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration dar. Die Gallensäuresekretion der AlbCre-Mäuse scheint auf einen Maximalwert von  $10 \mu\text{mol/hr}/100\text{g}$  beschränkt zu sein, mit zum Teil hohen Galleflussraten. Nachfolgend finden sich die Gleichungen der Ausgleichsgeraden:

- ▶ WT - Diät:  $GF_{WT - Diät} = 22,52 (\pm 2,43) \cdot GS_{sec} + 229,00 (\pm 30,24)$   
 $(R^2 = 0,5268; p < 0,0001),$
- ▶ AlbCre - Diät:  $GF_{AlbCre - Diät} = 31,05 (\pm 6,76) \cdot GS_{sec} + 373,30 (\pm 36,69)$   
 $(R^2 = 0,1574; p < 0,0001).$

Betrachtet man die Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion, besteht auch hier für jedes Mausmodell eine lineare Beziehung ( $p < 0,0001$ ). Die Güte der Fits werden mit einem  $R^2 = 0,1514$  für die AlbCre-Mäuse und mit einem  $R^2 = 0,2687$  für die WT-Mäuse angegeben. Die Ausgleichsgerade für die AlbCre-Mäuse ist signifikant ( $p = 0,0179$ ) steiler verglichen mit der Ausgleichsgeraden der Kontrollgruppe. Vor allem fallen beim AlbCre-Mausmodell hohe Cholesterinsekretionswerte bei geringen Gallensäuresekretionwerten auf. Nachfolgend finden sich die Gleichungen der Ausgleichsgeraden:



► WT - Diät:  $Ch_{\text{secWT-Diät}} = 0,03 (\pm 0,01) \cdot GF_{\text{sec}} + 0,15 (\pm 0,07)$   
 $(R^2 = 0,2687; p < 0,0001)$ ,

► AlbCre - Diät:  $Ch_{\text{secAlbCre-Diät}} = 0,07 (\pm 0,02) \cdot GF_{\text{sec}} + 0,55 (\pm 0,08)$   
 $(R^2 = 0,1514; p < 0,0001)$ .

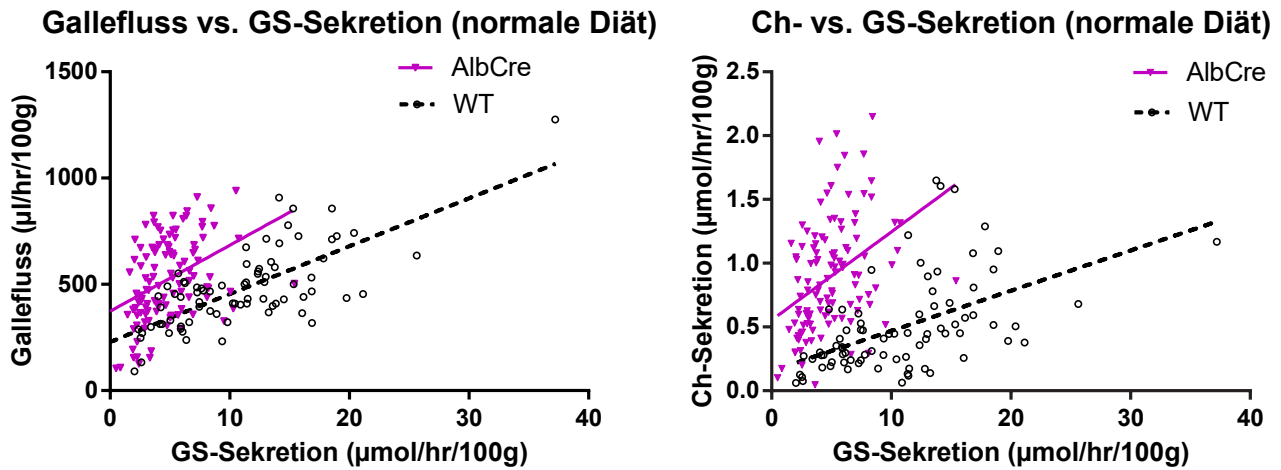


Abbildung 6.4: Darstellung des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei normaler Diät. Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) zeigt einen linearen Fit.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Phospholipid- und Gallensäuresekretion bedient man sich wieder einer rechteckigen Hyperbel (s. Abb. 6.5). Die hyperbolische Fitfunktion zeigt für die AlbCre-Mäuse und den WT einen signifikanten ( $p < 0,0001$ ) Unterschied in der Abhängigkeit der Phospholipid- von der Gallensäuresekretion.

Die Fitfunktion ergibt eine maximale Phospholipidsekretion von  $Lec_{\text{max}} = 8,87 (\pm 3,11) \mu\text{mol/hr/100g}$  für die AlbCre-Mäuse, welche geringer ist als die der Kontrollgruppe ( $Lec_{\text{max}} = 11,19 (\pm 3,55) \mu\text{mol/hr/100g}$ ). Jedoch ist im Diagramm erkennbar, dass die einzelnen Phospholipidsekretionsmesswerte der AlbCre-Mäuse höher liegen als die der WT-Mäuse (s. Abb. 6.5).

► WT - Diät:  $Lec_{\text{secWT-Diät}} = \frac{11,19 (\pm 3,55) \cdot GS_{\text{sec}}}{31,58 (\pm 14,46) + GS_{\text{sec}}}$ ,

► AlbCre - Diät:  $Lec_{\text{secAlbCre-Diät}} = \frac{8,87 (\pm 3,11) \cdot GS_{\text{sec}}}{11,17 (\pm 5,98) + GS_{\text{sec}}}$ .

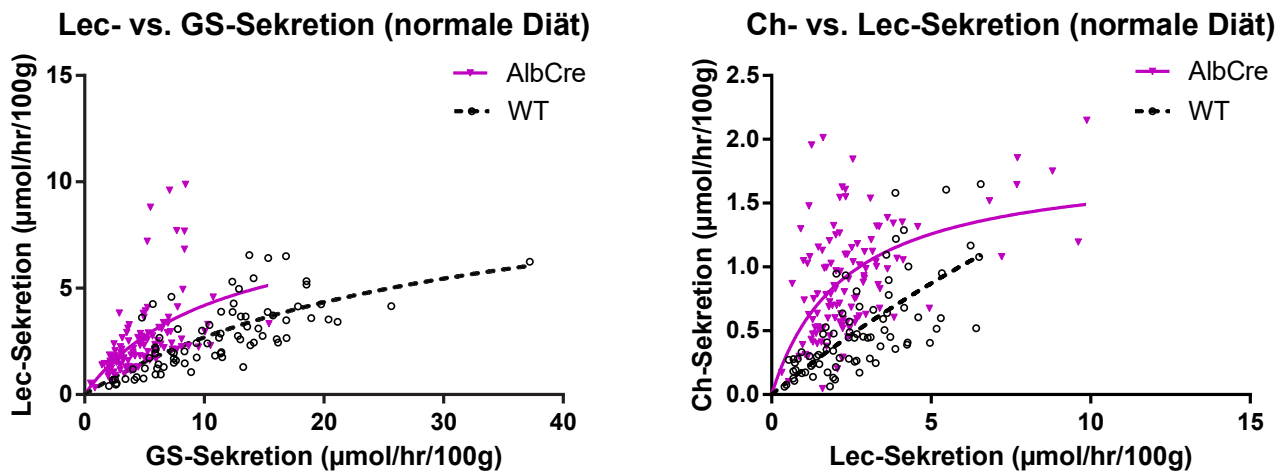


Abbildung 6.5: Darstellung der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen bei normaler Diät. Die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie die Beziehung zwischen Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) und Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) zeigen einen hyperbolischen Fit.

#### 6.1.4 Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration

Betrachtet man die Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren- ( $p = 0,0024$ ) und die Cholesterinkonzentration ( $p = 0,0015$ ) der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse, ergibt sich jeweils ein signifikanter Unterschied mit den höheren Werten für die AlbCre-Mäuse (s. Abb. 6.6). Die Output-Werte der Phospholipidkonzentration hingegen zeigen keinen Unterschied (s. Abb. 6.6).

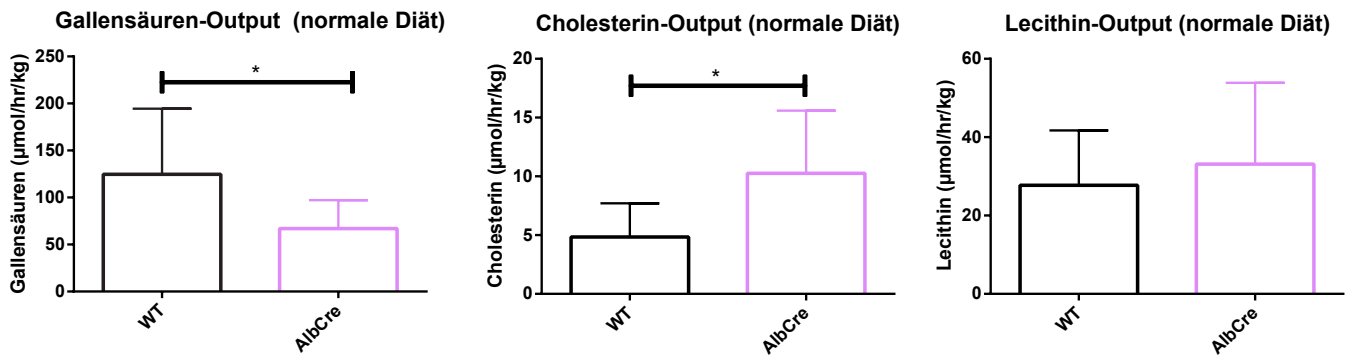


Abbildung 6.6: Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei normaler Diät.

## 6.2 Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei lithogener Diät

### 6.2.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht

Unter lithogener Diät ergibt sich, wie schon unter normaler Diät festgestellt wurde, kein Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen bezüglich des Körpergewichts. Die Parameter Lebergewicht und Quotient aus Leber- und Körpergewicht der beiden Mausmodelle unterscheiden sich jedoch unter lithogener Diät signifikant (jeweils  $p < 0,0001$ ) (s. Abb. 6.7).

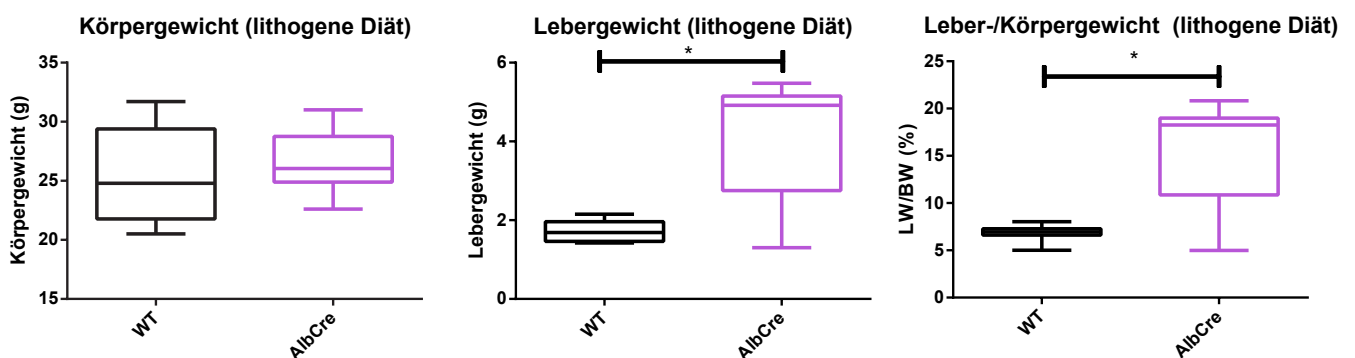


Abbildung 6.7: Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei lithogener Diät.

## 6.2.2 Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex

Vergleicht man die mit lithogener Diät gefütterten AlbCre-Mäuse mit der ebenfalls mit lithogener Diät gefütterten WT-Gruppe, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied der Gesamtlipidkonzentration ( $p < 0,0001$ ) (s. Abb. 6.9) sowie der Gallensäuren- ( $p = 0,0172$ ) und der Phospholipidkonzentrationen ( $p = 0,0160$ ), welche bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration angegeben werden (s. Abb. 6.8). In der Cholesterinkonzentration, bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration, ergibt sich kein Unterschied. Die Tendenz, die bereits beim Vergleich dieser Werte zwischen den beiden Mausmodellen bei normaler Diät festgestellt wurde, bestätigt sich auch unter lithogener Diät. Die Gesamtlipidkonzentration ist, wie auch die Gallensäuresekretion, bei den AlbCre-Mäusen geringer verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Phospholipidkonzentration ist hingegen, wie bereits bei normaler Diät zu beobachten, in der AlbCre-Gruppe höher als bei dem WT. Auch die Cholesterinkonzentration ist bei der AlbCre-Mausgruppe höher, der Unterschied ist jedoch unter lithogener Diät nicht signifikant. Der CSI-Wert unterscheidet sich, anders als unter normaler Diät, nicht (s. Abb. 6.9). Die Änderungen weiterer Werte können der Tabelle 6.1 entnommen werden.

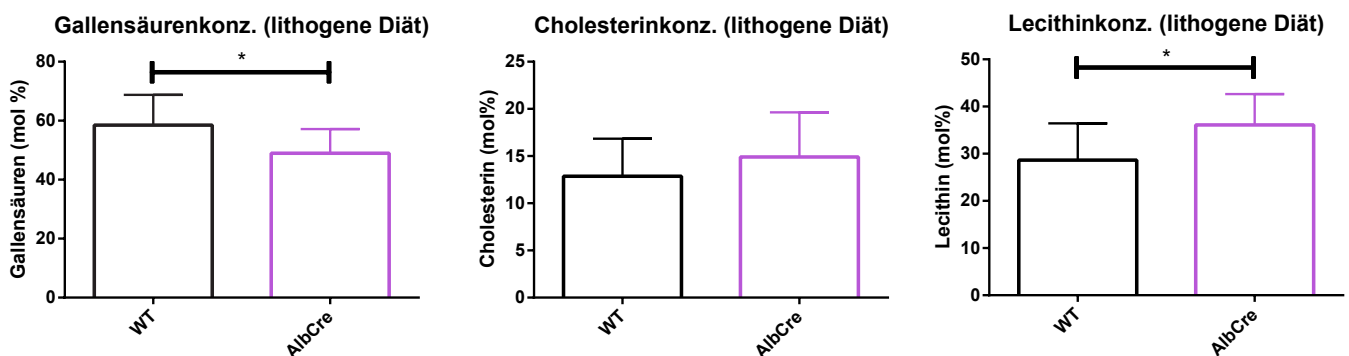


Abbildung 6.8: Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der 1. Stunde in mol % bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät.

## 6.2.3 Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäuresekretion

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion wurde jeweils mithilfe einer linearen Regressionsanalyse untersucht (s. Abb. 6.10). Bei jedem Mausmodell zeigt sich

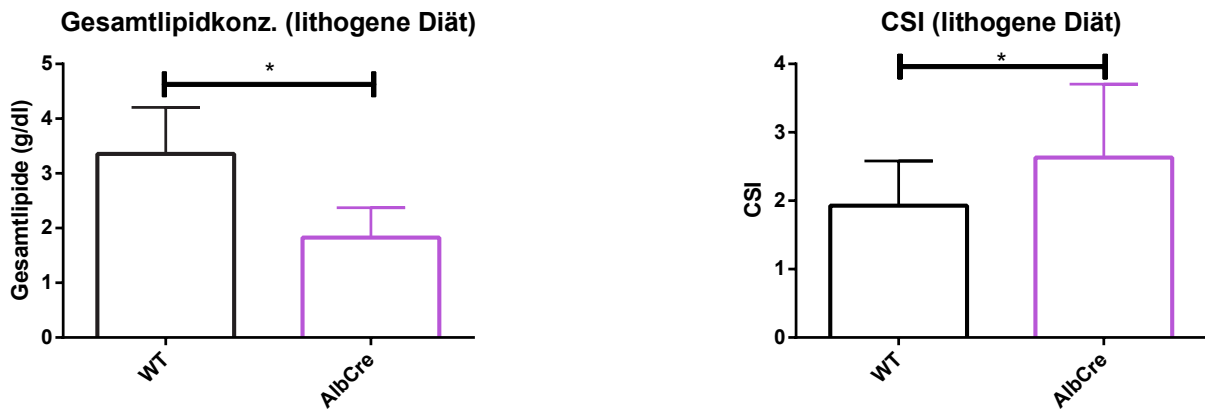


Abbildung 6.9: Gesamtlipidkonzentration in g/dl und CSI der 1. Stunde für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät.

eine lineare Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion ( $p = 0,0050$  bzw.  $p = 0,0145$ ). Die Steigungen der Regressionsgeraden unterscheiden sich nicht.

Die gallensäurenunabhängige Gallensekretion zeigt jedoch einen signifikanten ( $p = 0,0051$ ) Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen. Diese Beobachtungen konnten auch schon unter normaler Diät gemacht werden. Weiterhin ist zu beobachten, dass die Gallensäuresekretion der AlbCre-Mäuse, abgesehen von einzelnen Ausreißern, im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich geringer ist und einen maximalen Wert von etwa  $GS = 20 \text{ mol/hr/100g}$  besitzt. Der Verdacht einer maximalen Gallensäuresekretionsrate der AlbCre-Mäuse wurde bereits unter normaler Diät geäußert.

► WT + Diät:  $GF_{WT + Diät} = 6,06 (\pm 2,09) \cdot GS_{sec} + 460,50 (\pm 42,12)$   
 $(R^2 = 0,1134; p = 0,0050),$

► AlbCre + Diät:  $GF_{AlbCre + Diät} = 6,59 (\pm 2,63) \cdot GS_{sec} + 537,00 (\pm 30,75)$   
 $(R^2 = 0,0761; p = 0,0145).$

Die Cholesterinsekretion zeigt bei den AlbCre-Mäusen eine lineare Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion ( $p = 0,0005$ ). Dies trifft jedoch nicht für die Kontrollgruppe zu ( $p = 0,2164$ ), wodurch ein weiterer Vergleich sehr schwierig ist. Betrachtet man die Punktwolken der Messwerte, so ist die der AlbCre-Mäuse auf niedrige Cholesterinsekretionsraten bei geringen Gallensäuresekretionsraten konzentriert, wohingegen beim WT eine große Spannweite der Messwerte zu beobachten ist.

► WT + Diät:  $Ch_{\text{secWT} + \text{Diät}} = 0,03 (\pm 0,03) \cdot GS_{\text{sec}} + 3,88 (\pm 0,55)$   
 $(R^2 = 0,0231; p = 0,2164),$

► AlbCre + Diät:  $Ch_{\text{secAlbCre} + \text{Diät}} = 0,07 (\pm 0,02) \cdot GS_{\text{sec}} + 2,26 (\pm 0,24)$   
 $(R^2 = 0,1468; p = 0,0005).$

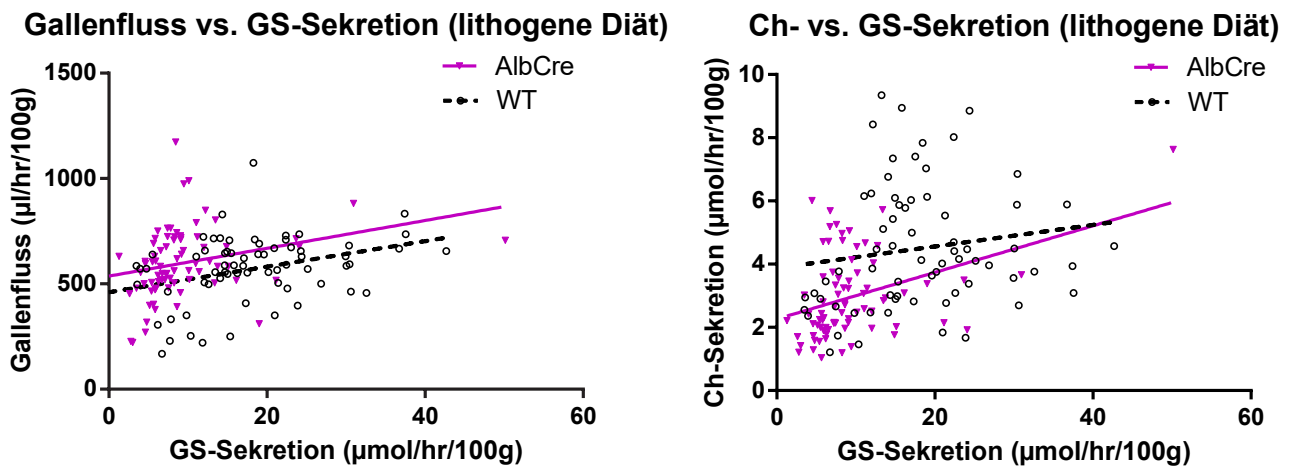


Abbildung 6.10: Darstellung des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) zeigt einen linearen Fit.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Phospholipidsekretion und Gallensäuresekretion be-  
 dient man sich wieder der in Gleichung (5.1) beschriebenen hyperbolischen Fitfunktion (s. Abb. 6.11). Die  
 hyperbolische Regressionsanalyse ergibt folgende Gleichungen

► WT + Diät:  $Lec_{\text{secWT} + \text{Diät}} = \frac{12,24 (\pm 1,30) \cdot GS_{\text{sec}}}{4,41 (\pm 2,11) + GS_{\text{sec}}},$

► AlbCre + Diät:  $Lec_{\text{secAlbCre} + \text{Diät}} = \frac{10,12 (\pm 1,15) \cdot GS_{\text{sec}}}{4,35 (\pm 1,46) + GS_{\text{sec}}}.$

Diese zeigen einen signifikanten ( $p = 0,0217$ ) Unterschied für die Abhängigkeit der Phospholipidsekre-  
 tion von der Gallensäuresekretion zwischen dem AlbCre-Mausmodell und dem WT ( $p = 0,0217$ ). Ins-  
 gesamt fallen auch hier bei den AlbCre-Mäusen geringe Phospholipidsekretionsraten bei geringen Gallen-  
 säuresekretionsraten auf. Unter lithogener Diät besitzt die Fitfunktion der AlbCre-Messwerte eine maxi-  
 male Phospholipidsekretion von  $Lec_{\text{max}} = 10,12 \mu\text{mol/hr/100g}$ . Diese ist, wie schon unter normaler Diät

zu beobachten war, geringer als die maximale Phospholipidsekretion der WT-Mäuse. Jedoch liegen jetzt die einzelnen Messwerte der AlbCre-Mäuse häufig auch unterhalb der der WT-Mäuse, was sich von den Beobachtungen bei normaler Diät unterscheidet.

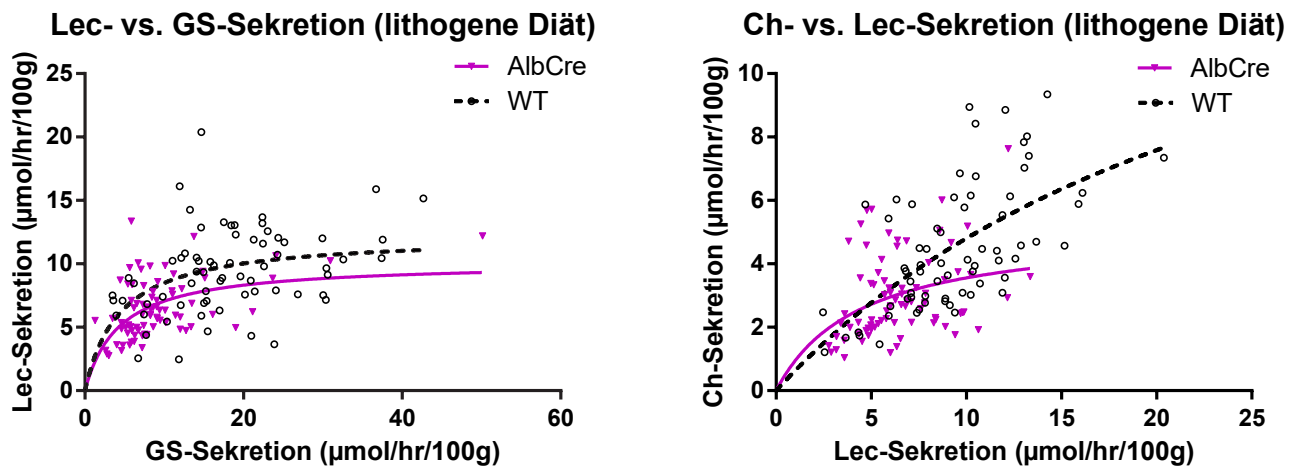


Abbildung 6.11: Darstellung der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie die Beziehung zwischen Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) und Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) zeigen einen hyperbolischen Fit.

### 6.2.4 Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration

Vergleicht man die Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren- ( $p < 0,0001$ ), die Cholesterin- ( $p = 0,0082$ ) und die Phospholipidkonzentration ( $p = 0,0014$ ) der AlbCre-Mäuse und der Kontrollgruppe unter lithogener Diät, zeigt sich für jeden dieser Parameter ein signifikanter Unterschied (s. Abb. 6.12). Unter lithogener Diät sind alle drei Parameter der AlbCre-Mäuse geringer als die der WT-Mäuse.

## 6.3 Zusammenfassung

In der nachfolgenden Tabelle 6.1 sind die einzelnen untersuchten Parameter und deren Abweichungen aus Sicht der AlbCre-Mäuse verglichen mit den WT-Mäusen zusammengefasst.

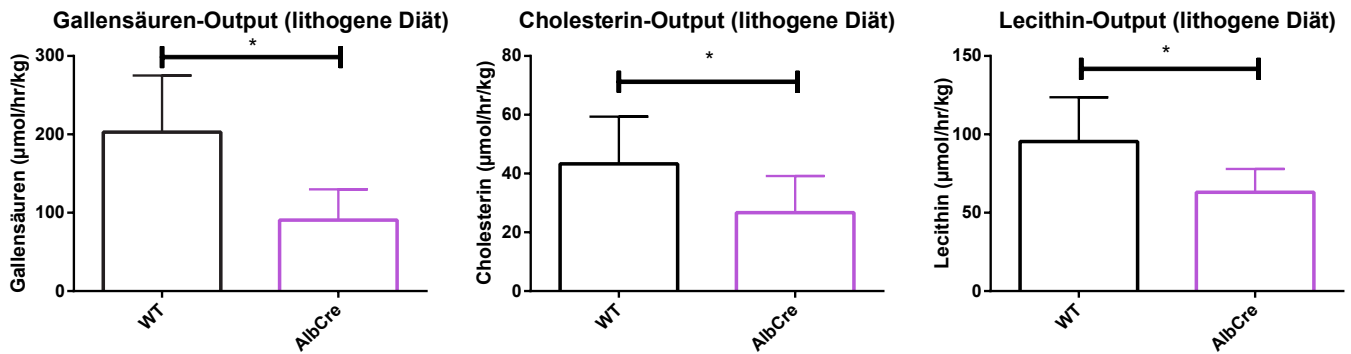


Abbildung 6.12: Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für der AlbCre-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen bei lithogener Diät.

Tabelle 6.1: Zusammenfassung WT versus AlbCre bei normaler und bei lithogener Diät. Die Pfeile stellen jeweils die Abweichung des Parameters der AlbCre-Mäuse unter der entsprechenden Diät von den WT-Mäusen dar. Fettgedruckte Pfeile deuten auf gleiche Abweichungsrichtung unter der entsprechenden Diät hin.

Variable	normale Diät	lithogene Diät
Lebergewicht	↔	↑
LW/BW	↔	↑
Gallensäurenkonzentration	↓	↓
Cholesterinkonzentration	↑	↔
Lecithinkonzentration	↑	↑
Gesamtlipidkonzentration	↓	↓
CSI	↑	↔
Gallefluss	Steigung: ↔ gallensäurenunabh. Gallefluss: ↑	Steigung: ↔ gallensäurenunabh. Gallefluss: ↑
Cholesterin- vs. Gallensäurensekretion	Steigung: ↑	WT: nicht linear
Lecithin- vs. Gallensäurensekretion	<i>Lec</i> <sub>max</sub> : ↓	<i>Lec</i> <sub>max</sub> : ↓
Gallensäurenoutput	↓	↓
Cholesterinoutput	↑	↓
Lecithinoutput	↔	↓



## 7. Ergebnisse: Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

Nachfolgend wird der gewebsspezifische *Abcg5/g8* Knock-out in der Leber (AlbCre) mit dem gewebsspezifischen *Abcg5/g8* Knock-out im Darm (VilCre) verglichen. Der Vergleich wird jeweils für die Mäuse mit normaler Diät und mit lithogener Diät durchgeführt.

### 7.1 Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler Diät

#### 7.1.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht

Vergleicht man die AlbCre-Mäuse mit den VilCre-Mäusen unter normaler Fütterung, zeigt sich bezüglich Körpergewicht und Lebergewicht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 7.1). Der Quotient aus Leber- und Körpergewicht unterscheidet sich signifikant ( $p = 0,0077$ ) mit einem kleineren Quotienten für die AlbCre-Mäuse (s. Abb. 7.1).

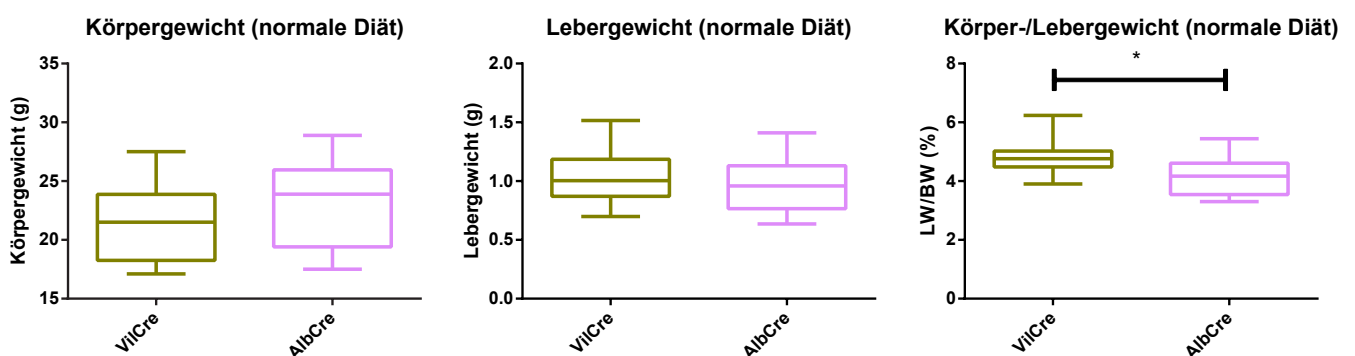


Abbildung 7.1: Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei normaler Diät.

### 7.1.2 Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex

In der relativen Cholesterinkonzentration unterscheiden sich die beiden Mausmodelle unter lithogener Diät nicht (s. Abb. 7.2). Außerdem unterscheiden sich die Gesamtlipidkonzentration und der CSI-Wert der AlbCre-Mäuse nicht von den entsprechenden Werten der VilCre-Mäuse (s. Abb. 7.3). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen zeigt sich nur für die Gallensäuren- ( $p = 0,0164$ ) und die Phospholipidkonzentration ( $p = 0,0220$ ), jeweils bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration (s. Abb. 7.2).

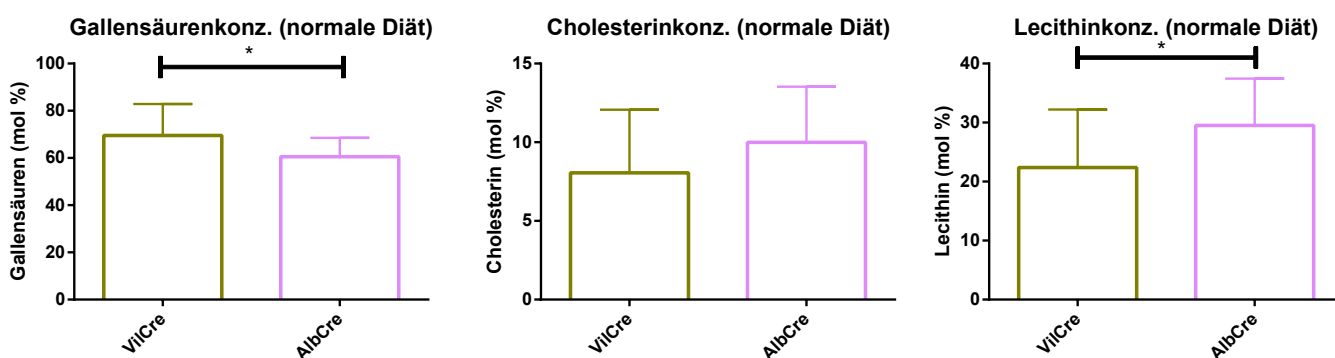


Abbildung 7.2: Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der 1. Stunde in mol % bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei normaler Diät.

### 7.1.3 Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäuresekretion

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion wurde jeweils mithilfe einer linearen Regressionsanalyse untersucht (s. Abb. 7.5). Für die VilCre-Mäuse ergibt sich, genau wie beim AlbCre-Mausmodell in Abschnitt 5.2.3, eine lineare Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion ( $p = 0,0179$ ). Anzumerken ist jedoch, dass die Fits mit einem  $R^2 = 0,0607$  für die VilCre-Gruppe und mit einem  $R^2 = 0,1574$  für die AlbCre-Mäuse angegeben werden. Die linearen Fits zeigen keinen Unterschied, weder in der Steigung noch im y-Achsenabschnitt der Geraden. Die Ausgleichsgeraden besitzen folgende Gleichungen:

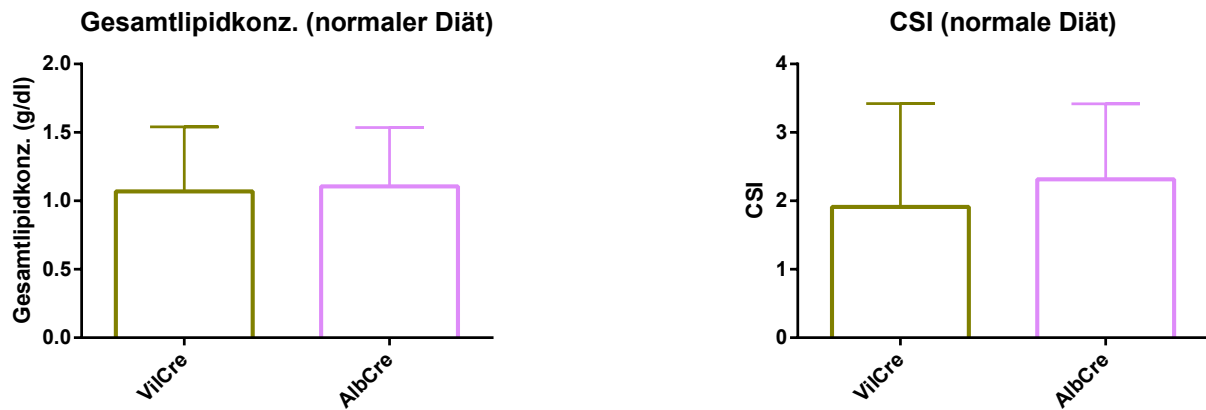


Abbildung 7.3: Gesamtlipidkonzentration in g/dl und CSI der 1. Stunde der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei normaler Diät.

► VilCre - Diät:  $GF_{\text{VilCre - Diät}} = 20,52 (\pm 8,51) \cdot GS_{\text{sec}} + 429,00 (\pm 70,86)$   
 $(R^2 = 0,0607; p < 0,0179),$

► AlbCre - Diät:  $GF_{\text{AlbCre - Diät}} = 31,05 (\pm 6,76) \cdot GS_{\text{sec}} + 373,30 (\pm 36,69)$   
 $(R^2 = 0,1574; p < 0,0001).$

Betrachtet man die Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion, besteht auch hier für die VilCre-Mäuse eine lineare Beziehung ( $p < 0,0001$ ), wie sie bereits für die AlbCre-Mäuse beobachtet wurde ( $p < 0,0001$ ). Die Güte der Fits werden mit  $R^2 = 0,1514$  für die AlbCre-Mäuse und mit  $R^2 = 0,1995$  für die VilCre-Mäuse angegeben. Die Ausgleichsgeraden zeigen keinen Unterschied in der Steigung. Der y-Achsenabschnitt unterscheidet sich hingegen signifikant ( $p = 0,0002$ ) mit einer höheren basalen Cholesterinsekretion für die AlbCre-Mäuse.

► VilCre - Diät:  $Ch_{\text{secVilCre - Diät}} = 0,07 (\pm 0,01) \cdot GS_{\text{sec}} + 0,30 (\pm 0,11)$   
 $(R^2 = 0,1995); p < 0,0001),$

► AlbCre - Diät:  $Ch_{\text{secAlbCre - Diät}} = 0,07 (\pm 0,02) \cdot GS_{\text{sec}} + 0,55 (\pm 0,09)$   
 $(R^2 = 0,1514; p < 0,0001).$

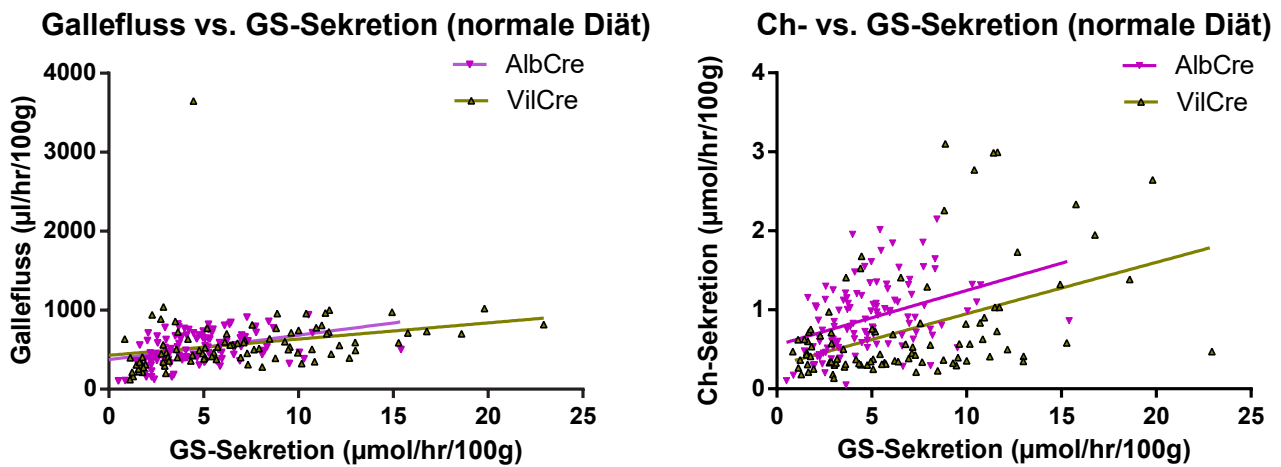


Abbildung 7.4: Darstellung des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei normaler Diät. Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) zeigt einen linearen Fit.

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Phospholipidsekretion und der Gallensäuresekretion bedient man sich wieder der hyperbolischen Fitfunktion aus Gleichung (5.1) (s. Abb. 7.5). Die hyperbolischen Fitfunktionen für die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion von der Gallensäuresekretion der AlbCre- und der VilCre-Mäuse unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,0001$ ).

$$\triangleright \text{VilCre - Diät: } Lec_{\text{secVilCre - Diät}} = \frac{6,48 (\pm 1,89) \cdot GS_{\text{sec}}}{12,60 (\pm 6,36) + GS_{\text{sec}}},$$

$$\triangleright \text{AlbCre - Diät: } Lec_{\text{secAlbCre - Diät}} = \frac{8,87 (\pm 3,11) \cdot GS_{\text{sec}}}{11,17 (\pm 5,98) + GS_{\text{sec}}}.$$

Die Abhängigkeit der Cholesterinsekretion von der Phospholipidsekretion ist nicht signifikant, sodass eine gemeinsame hyperbolische Fitfunktion ermittelt wird (s. Abb. 7.5).

#### 7.1.4 Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration

Betrachtet man die Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, die Cholesterin- und die Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse, zeigt sich für keinen dieser Parameter ein Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen (s. Abb. 7.6).

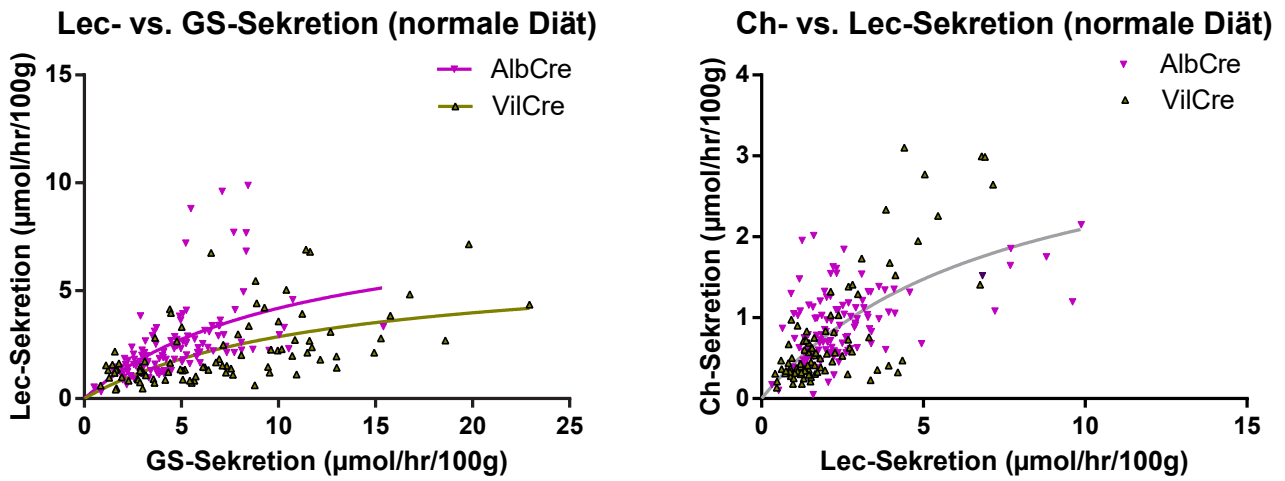


Abbildung 7.5: Darstellung der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei normaler Diät. Die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie die Beziehung zwischen Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) und Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) zeigen einen hyperbolischen Fit.

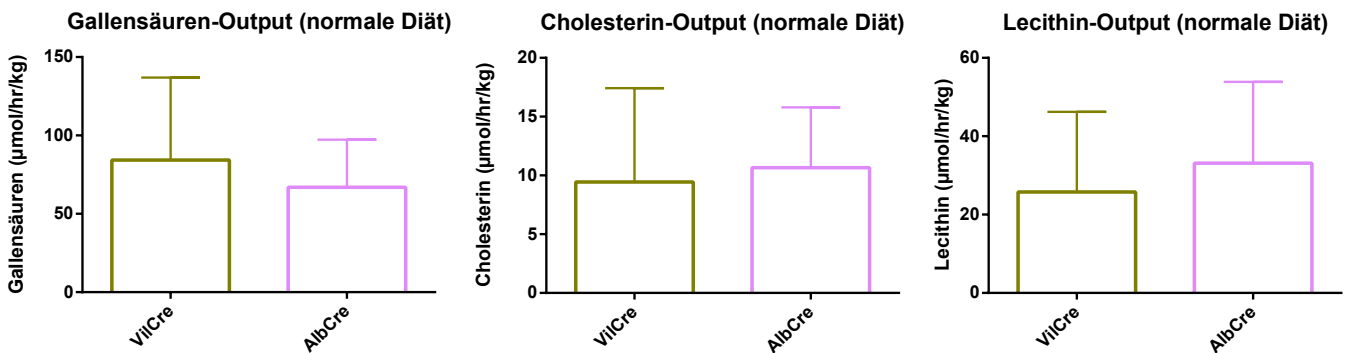


Abbildung 7.6: Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei normaler Diät.

## 7.2 Vergleich zwischen VilCre-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei lithogener Diät

### 7.2.1 Körpergewicht, Lebergewicht, Verhältnis Leber- zu Körpergewicht

Unter lithogener Diät ergibt sich wie unter normaler Diät kein Unterschied im Körpergewicht und im Lebergewicht ( $p = 0,6549$ ) zwischen den AlbCre-Mäusen und den VilCre-Mäusen (s. Abb. 7.7). Zudem zeigt sich kein Unterschied im Quotienten aus Leber- und Körpergewicht, der unter normaler Diät noch beobachtet werden konnte (s. Abb. 7.7).

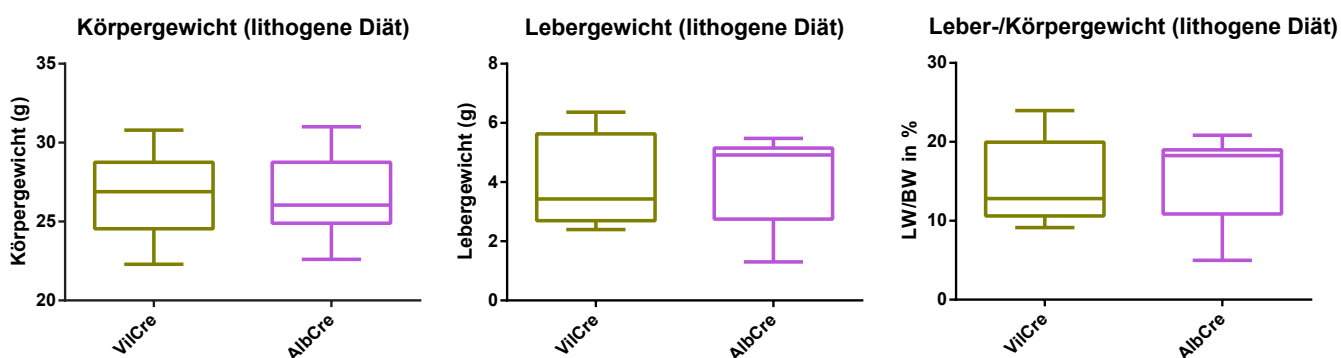


Abbildung 7.7: Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (BW/LW) der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei lithogener Diät.

### 7.2.2 Gesamtlipidkonzentration, Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration, Cholesterinsättigungsindex

Unter lithogener Diät unterscheidet sich weder die relative Cholesterinkonzentration der AlbCre- und VilCre-Mäuse, was bereits unter normaler Diät beobachtet werden konnte, noch zeigt sich ein Unterschied in der relativen Gallensäuren- und Phospholipidkonzentration (s. Abb. 7.8). Außerdem ist der CSI-Wert identisch (s. Abb. 7.9).

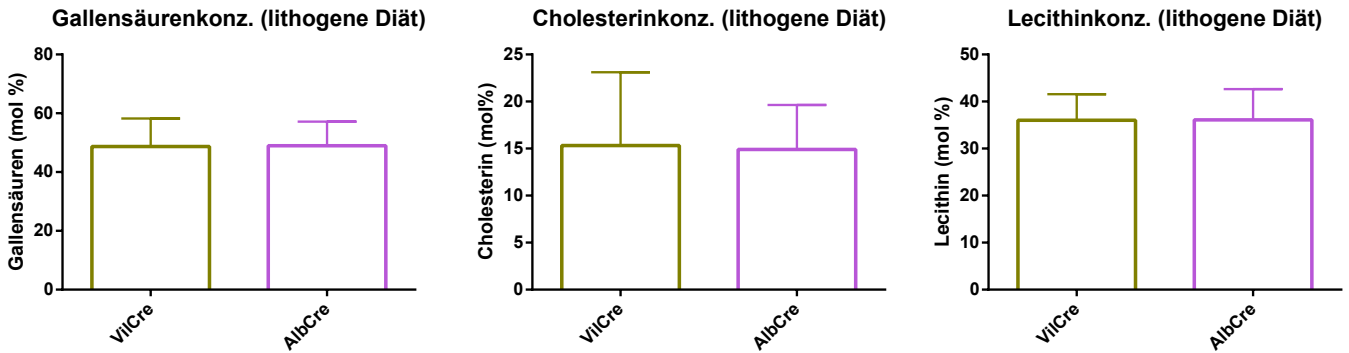


Abbildung 7.8: Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der 1. Stunde in mol % bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei lithogener Diät.

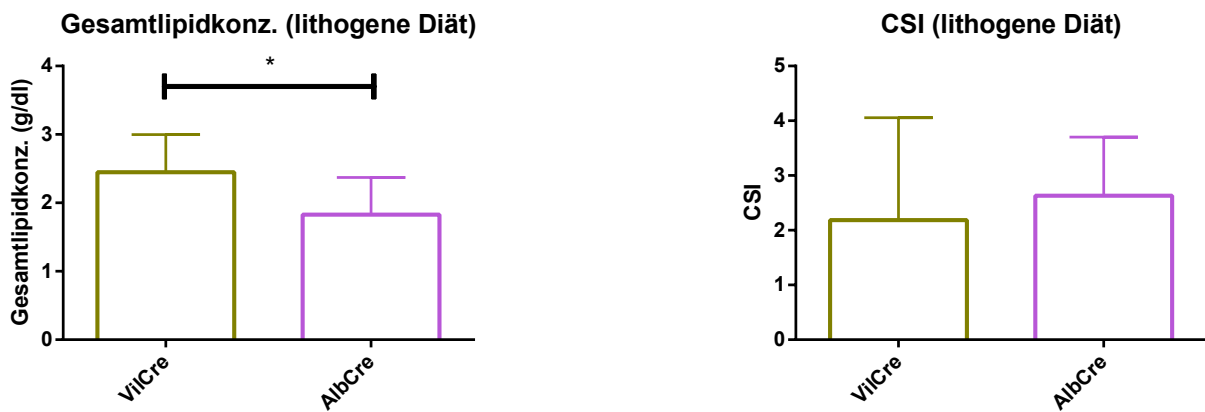


Abbildung 7.9: Gesamtlipidkonzentration in g/dl und CSI der 1. Stunde der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei lithogener Diät.

### 7.2.3 Gallefluss, Cholesterinsekretion und Phospholipidsekretion versus Gallensäuresekretion

Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion wurde jeweils mithilfe einer linearen Regressionsanalyse untersucht (s. Abb. 7.11). Wie schon bei den AlbCre-Mäusen unter lithogener Diät gesehen (s. Abschnitt 5.2.3), zeigt sich auch bei den VilCre-Mäusen unter lithogener Diät eine lineare Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäuresekretion ( $p = 0,0032$ ). Die

Steigungen der Regressionsgeraden unterscheiden sich auch unter lithogener Diät nicht. Der gallensäurenunabhängige Gallefluss zeigt jedoch einen signifikanten ( $p = 0,0002$ ) Unterschied zwischen den beiden Mausmodellen. Dies konnte unter normaler Diät nicht beobachtet werden. Der gallensäurenunabhängige Gallefluss ist mit  $GF_{\text{AlbCre} + \text{Diät}} = 537,00 (\pm 30,75) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$  für die AlbCre-Mäuse signifikant höher als der der VilCre-Mäuse ( $GF_{\text{VilCre} + \text{Diät}} = 345,40 (\pm 52,16) \mu\text{l/hr}/100\text{g}$ ).

► VilCre + Diät:  $GF_{\text{VilCre} + \text{Diät}} = 14,79 (\pm 4,89) \cdot GS_{\text{sec}} + 345,40 (\pm 52,16)$

$$(R^2 = 0,0871; p = 0,0032),$$

► AlbCre + Diät:  $GF_{\text{AlbCre} + \text{Diät}} = 6,59 (\pm 2,63) \cdot GS_{\text{sec}} + 537,00 (\pm 30,75)$

$$(R^2 = 0,0761; p = 0,0145).$$

Eine lineare Abhängigkeit der Cholesterinsekretion von der Gallensäuresekretion, wie sie bei den AlbCre-Mäusen unter lithogener Diät beobachtet werden konnte (s. Abschnitt 5.2.3), zeigt sich bei den lithogen gefütterten VilCre-Mäuse nicht. Dadurch wird ein weiterer Vergleich der Gruppen erschwert. Die dennoch ermittelten Ausgleichsgeraden zeigen weder einen signifikanten Unterschied in der Steigung noch im y-Achsenabschnitt.

► VilCre + Diät:  $Ch_{\text{secVilCre} + \text{Diät}} = 0,12 (\pm 0,06) \cdot Ch_{\text{sec}} + 2,20 (\pm 0,66)$

$$(R^2 = 0,0379; p = 0,0547),$$

► AlbCre + Diät:  $Ch_{\text{secAlbCre} + \text{Diät}} = 0,0737 (\pm 0,0204) \cdot Ch_{\text{sec}} + 2,26 (\pm 0,23)$

$$(R^2 = 0,1468; p = 0,0005).$$

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Phospholipidsekretion und der Gallensäuresekretion bedient man sich der hyperbolischen Fitfunktion aus Gleichung (5.1). Die Regressionsanalyse ergibt keinen Unterschied für die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion von der Gallensäuresekretion zwischen dem AlbCre-Mausmodell und dem VilCre-Mausmodell. Es wird eine gemeinsame Fitfunktion ermittelt (s. Abb. 7.11)

► VilCre + Diät bzw. AlbCre + Diät:  $Lec_{\text{secVilCre/AlbCre} + \text{Diät}} = \frac{9,51 (\pm 0,83) \cdot GS_{\text{sec}}}{3,36 (\pm 1,04) + GS_{\text{sec}}}$

Zwischen der Cholesterinsekretion und der Phospholipidsekretion besteht bei den VilCre-Mäusen mit lithogener Diät, im Gegensatz zu den AlbCre-Mäusen, kein hyperbolischer Zusammenhang, sodass ein weiterer Vergleich hier schwierig ist (s. Abb. 7.11).



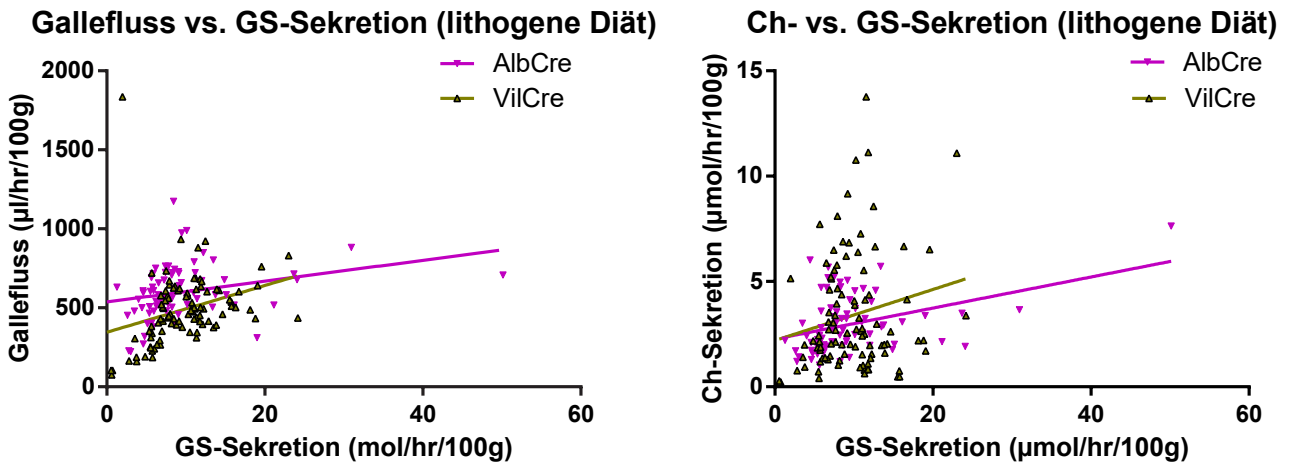


Abbildung 7.10: Darstellung des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) für die *AlbCre*-Mäuse und die *VilCre*-Mäuse bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit des Galleflusses und der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) zeigt einen linearen Fit.

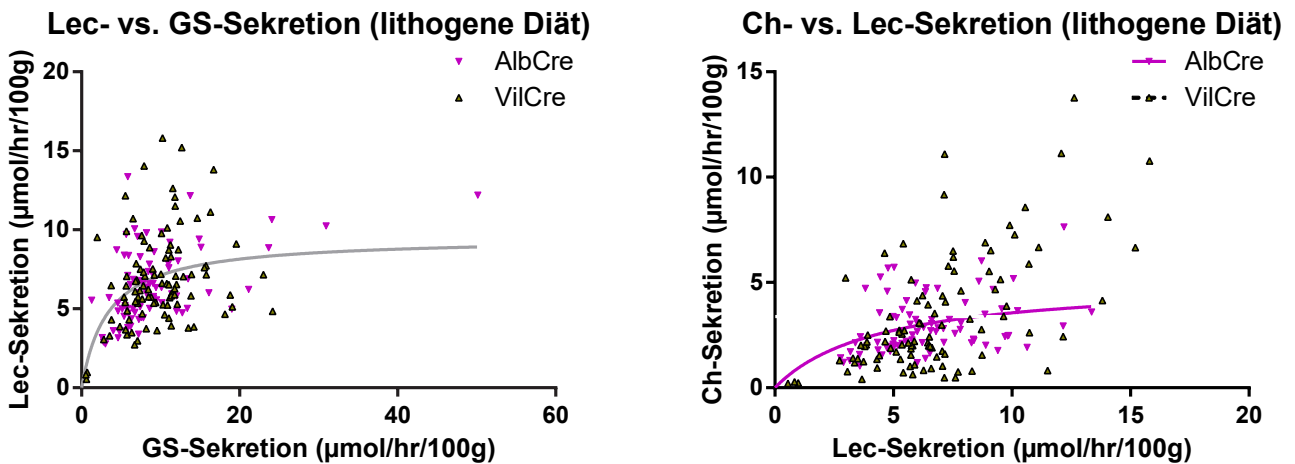


Abbildung 7.11: Darstellung der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie der Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) für die *AlbCre*-Mäuse und die *VilCre*-Mäuse bei lithogener Diät. Die Abhängigkeit der Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) von der Gallensäuresekretion (GS-Sekretion) sowie die Beziehung zwischen Cholesterinsekretion (Ch-Sekretion) und Phospholipidsekretion (Lec-Sekretion) zeigt einen hyperbolischen Fit.

### 7.2.4 Output-Werte für Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration

Vergleicht man die Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und die Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse unter lithogener Diät, zeigt sich für jeden dieser Parameter kein Unterschied (s. Abb. 7.12), was auch unter normaler Diät beobachtet werden konnte.

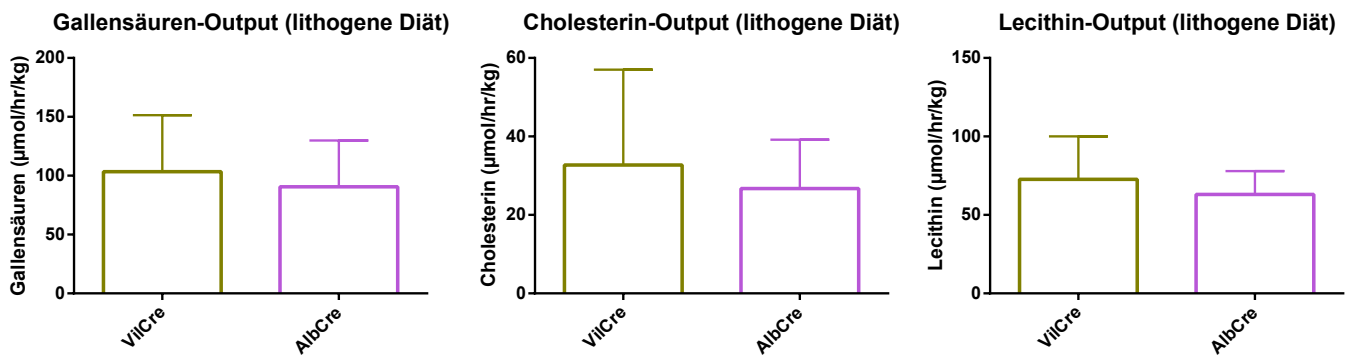


Abbildung 7.12: Output-Werte der 1. Stunde für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei lithogener Diät.

### 7.3 Cholesterin/Phospholipid-Verhältnis der *VilCre*- und *AlbCre*-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät

Vergleicht man das Verhältnis aus der biliären Cholesterin- zu Phospholipidkonzentration der *AlbCre*- und *VilCre*-Mäuse jeweils bei normaler und lithogener Diät untereinander und mit dem entsprechenden Quotienten der Kontrollgruppe, ergibt sich unter normaler Diät jeweils ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied. Dabei besitzt die Kontrollgruppe den geringsten und die *AlbCre*-Mäuse den größten Cholesterin- zu Phospholipidquotienten. Unter lithogener Diät nimmt der Cholesterin- zu Phospholipidquotient der *AlbCre*-Mäuse nur gering zu. Der Quotient der *VilCre*- und WT-Mäuse steigt hingegen an, sodass sich unter lithogener Diät das Cholesterin- zu Phospholipidverhältnis der verschiedenen Mausgruppen sich nicht unterscheidet.

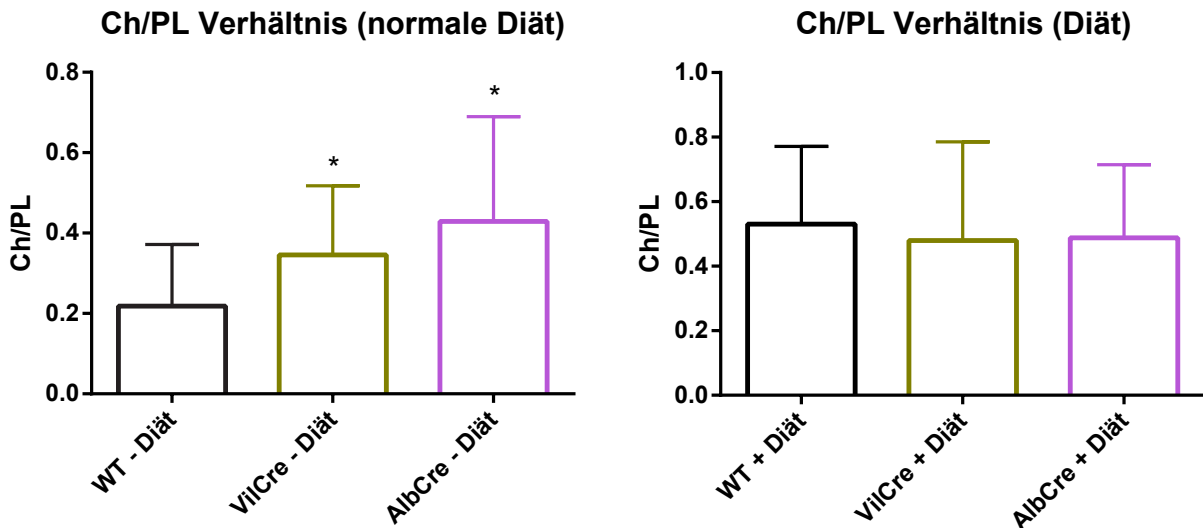


Abbildung 7.13: Der Quotient aus biliärer Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der *VilCre*- und der *AlbCre*-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT-Mäuse) jeweils bei normaler und bei lithogener Diät.

## 7.4 Zusammenfassung

In der nachfolgenden Tabelle 7.1 sind alle Abweichungen aller untersuchten Parameter aus Sicht der AlbCre-Mäuse verglichen mit den VilCre-Mäusen zusammengefasst.

Tabelle 7.1: Zusammenfassung VilCre-Mäuse versus AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. Die Pfeile stellen jeweils die Abweichung der Parameter der AlbCre-Mäuse unter der entsprechenden Diät von den VilCre-Mäusen dar. Fettgedruckte Pfeile stehen für keine Abweichungen zwischen den Mausmodellen unter der entsprechenden Diät.

Variable	normale Diät	lithogene Diät
Lebergewicht	↔	↔
LW/BW	↓	↔
Gallensäurenkonzentration	↓	↔
Cholesterinkonzentration	↔	↔
Lecithinkonzentration	↑	↔
Gesamtlipidkonzentration	↔	↓
CSI	↔	↔
Gallefluss	Steigung: ↔ gallensäurenunabh. Gallefluss: ↔	Steigung: ↔ gallensäurenunabh. Gallefluss: ↑
Cholesterin- vs. Gallensäuresekretion	Steigung: ↔ gallensäurenunabh. Gallefluss: ↑	WT: nicht linear
Lecithin- vs. Gallensäuresekretion	<i>Lec<sub>max</sub></i> : ↑	<i>Lec<sub>max</sub></i> : ↔
Output: Gallensäure	↔	↔
Output: Cholesterin	↔	↔
Output: Lecithin	↔	↔

## 8. Diskussion

### 8.1 Auswirkungen der lithogenen Diät auf die Wildtyp-Mäuse und die AlbCre-Mäuse

#### 8.1.1 Vergleich zwischen Wildtyp Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

Die Ergebnisse des Vergleichs der WT-Mäuse mit normaler und mit lithogener Diät entsprechen den Erwartungen und zeigen, dass die Zusammensetzung der lithogenen Diät die gewünschte Wirkung erzeugt. Die lithogene Diät führt zu einer Zunahme des Lebergewichts bei unverändertem Körpergewicht. Aufgrund der lithogenen Diät kommt es zu einem Überangebot an Lipiden, welche in der Leber akkumulieren und zu einer Leberzellverfettung entsprechend einer „nichtalkoholischen Fettlebererkrankung“ (NAFLD = „Non-alcoholic fatty liver disease“) führen [108]. Unter einer NAFLD versteht man eine Steatose der Leber mit einem Fettanteil von mehr als 5 % des Lebergewichts oder eine Makrosteatose der Hepatozyten gleichen Ausmaßes, die nicht maßgeblich durch erhöhten Alkoholkonsum verursacht ist [108]. Der Fettanteil der Lebern der WT-Mäuse wurde zwar nicht bestimmt, aber die makroskopische Betrachtung der Lebern bei der Operation bestätigte die deutliche Leberverfettung. NAFLD stellt einen Oberbegriff für eine einfache Fettleber (NAFL = „Non-alcoholic fatty liver“) und einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH = „Non-alcoholic steatohepatitis“), die durch eine entzündliche Reaktion mit Hepatozytenschäden mit Fibrosierung gekennzeichnet ist [108]. Um welchen Typ der Leberzellverfettung es sich genau bei den untersuchten WT-Mäusen handelt, kann nicht beschrieben werden.

An der Gesamtlipidkonzentration wie auch an den Outputwerten der einzelnen Lipidkonzentrationen der Galle zeigt sich, dass der Organismus der WT-Mäuse bei lithogener Diät mit dem Lipidangebot übersättigt ist. Dies wird mit einem CSI-Wert deutlich größer 1, der signifikant höher liegt als der CSI-Wert bei normaler Diät, bestätigt. Anzumerken ist, dass bei den lithogen gefütterten Mäusen die Cholesterin- und Lipidkonzentration, jeweils bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration, erhöht sind, dies jedoch nicht für die Gallensäurenkonzentration bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration zutrifft. Die gleiche Beobachtung wurde auch von Wang et al. [16] gemacht. Trotz einer erhöhten absoluten Gallensäurenkonzentration in der

Galle der WT-Mäuse mit lithogener Diät verschiebt sich das Verhältnis der Lipide zugunsten des Lecithin- und Cholesteringehalts.

In Berge et al. [83] wird eine Steigerung des ABCG5/G8 Transporters um das Zweifache im Darm und um das Dreifache in der Leber durch eine einwöchige, cholesterinreiche Diät postuliert. Dieses stellt einen protektiven Mechanismus des Körpers gegen Arteriosklerose dar. Andererseits wird dadurch das Risiko zur Entstehung von Gallensteinen erhöht. Unter lithogener Diät scheint dieser Mechanismus jedoch an seine Grenzen zu gelangen, sodass es zu einer Leberzellverfettung kommt.

Die Reaktion des Organismus auf das erhöhte Lipidangebot wird bei der Betrachtung des Galleflusses und der Cholesterin- und Lecithinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion deutlich. Der gallensäurenunabhängige Gallefluss ist für die lithogen gefütterten Mäuse höher. Zudem liegen die Cholesterinsekretionswerte genauso wie die Lecithinsekretionswerte für alle Gallensäuresekretionswerte deutlich über den entsprechenden Werten der WT-Mäuse mit normaler Diät. Die Lebern der lithogen gefütterten Mäuse versuchen, durch vermehrte Sekretion der entsprechenden Lipide, dem Überangebot entgegenzusteuern. So wird relativ gesehen auf weniger Gallensäuren mehr Cholesterin und Lecithin sezerniert. Dass dieser Kompensationsversuch jedoch nur eingeschränkt erfolgreich ist, zeigt die Verfettung bzw. signifikante Gewichtszunahme der Lebern dieser Tiere.

### 8.1.2 Vergleich zwischen AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

Die Ergebnisse des Vergleichs der AlbCre-Mäuse mit normaler und lithogener Diät zeigen die gleiche Tendenz wie der Vergleich der WT-Mäuse untereinander. Jedoch sollen im Folgenden einige Merkmale hervorgehoben werden: Das Lebergewicht, aber bereits auch das Körpergewicht der lithogen gefütterten AlbCre-Mäuse, ist gegenüber den entsprechenden Werten der normal gefütterten AlbCre-Mäusen erhöht. Diese Unterschiede zwischen den Diätformen sind bei den AlbCre-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den WT-Mäusen, dieses wird im Abschnitt 8.2 genauer analysiert. Ebenso zeigen sich bei den lithogen gefütterten AlbCre-Mäusen im Vergleich zu den normal gefütterten eine Erhöhung der Gesamtlipidkonzentration sowie eine Erhöhung der absoluten und relativen Cholesterin- und Lecithinkonzentrationen. Diese Beobachtung konnte auch im Vergleich der beiden Diätgruppen der WT-Mäuse gemacht werden, wobei jedoch der Unterschied, obgleich er signifikant ist, geringer ausfällt. Die relative Gallensäurenkonzentration ist unter lithogener Diät signifikant geringer; dieser Unterschied ist noch signifikant, wohingegen sich der absolute Gallensäurenoutput nicht mehr signifikant unterscheidet, auch wenn die höheren absoluten Werte der Tendenz der WT-Mäuse entsprechen. Die Beobachtung dieser gleichen Tendenzen zeigt uns, dass die AlbCre-

Mäuse mit Hilfe des gleichen Mechanismus wie die Kontrollgruppe versuchen, mit dem Überangebot an Lipiden zurecht zu kommen. Aufgrund der Mutation des *Abcg5/g8* Transporters haben diese Mäuse jedoch eine geringere Kompensationsfähigkeit. Den lithogen gefütterten Mäusen gelingt es zwar, mehr Cholesterin zu sezernieren, jedoch nicht in dem Ausmaß wie den WT-Mäusen. Dieser Weg der Cholesterinexkretion, welcher in Abschnitt 8.2 näher diskutiert wird, scheint schneller an seine Grenzen zu kommen. Auch kommt es bei den AlbCre-Mäusen zu einer relativen Reduktion der Gallensäurenkonzentration. Der bereits schon bei normaler Diät hohe CSI-Wert erhöht sich durch die lithogene Diät nicht weiter. Dies ist ein Indiz dafür, dass trotz des Kompensationsversuchs es den Mäusen nicht gelingt die übersättigte Galle, welche bereits bei normaler Diät vorliegt, zu äquilibrieren. Das Resultat ist die wesentlich größere Zunahme im Lebergewicht und die Zunahme extrahepatischer Fetteinlagerungen. Bei den AlbCre-Mäusen scheint bereits unter normaler Diät ein spontanes NAFLD-Modell vorzuliegen [108].

Der gallensäurenunabhängige Gallefluss ist auch bei den lithogen gefütterten AlbCre-Mäusen, wie schon bei den WT-Mäusen beobachtet, höher als der Gallefluss der normal gefütterten AlbCre-Mäuse. Diese Steigerung fällt jedoch im Vergleich mit den WT-Mäusen geringer aus. Unabhängig von der Diätform zeigen die AlbCre-Mäuse geringere absolute Gallensäuresekretionsraten. Die Mutation im *Abcg5/g8* Transporter scheint auf noch unbekannte Weise die Gallensäuresekretion zu beeinflussen. Die Abhängigkeit der Cholesterin- und der Lecithinsekretion von der Gallensäuresekretion zeigt die bereits oben gemachte Beobachtung höherer Lipidsekretionsraten unter lithogener Diät, wie auch in der WT-Gruppe zu beobachten. Diese Steigerung fällt jedoch geringer aus als beim WT und zeigt nochmal die eingeschränkte Kapazität der AlbCre-Mäuse, die Anflutung der Lipide zu kompensieren.

## 8.2 Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen und AlbCre-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

Vergleicht man den WT mit dem AlbCre-Mausmodell bei normaler Diät, fällt auf, dass der Knock-out keinen Einfluss auf Körper- und Lebergewicht der Mäuse hat. Überraschend ist der Unterschied in der Cholesterinkonzentration in der Galle zwischen den beiden Mausmodellen. Hierbei handelt es sich nicht nur um eine signifikante Erhöhung der relativen, sondern auch der absoluten Cholesterinkonzentration. Dies wird deutlich bei der Betrachtung der Output-Werte der 1. Stunde für Cholesterin.

Die Existenz einer biliären Cholesterinsekretion trotz *Abcg5/g8* Knock-out in den AlbCre-Mäusen wurde bereits in Abschnitt 8.1.2 beobachtet. Aktuelle Erkenntnisse [12] gehen davon aus, dass der ABCG5/G8 Trans-

porter der Haupttransporter für die biliäre Cholesterinsekretion ist. Demnach hätte man für die AlbCre-Mäuse, bei denen dieser Transporter in der Leber ausgeschaltet ist, genau das Gegenteil erwartet, d.h. eine im Vergleich zu den WT-Mäusen verminderte Cholesterinsekretion in die Galle. Die komplette Überprüfung der Expressionsdaten dieses Transporters in den Lebern der AlbCre-Mäusen steht noch aus. Jedoch lassen erste Ergebnisse darauf schließen, dass bei diesen Mäusen der ABCG5/G8 Transporter nicht exprimiert wird und es sich um einen vollständigen Knock-out in der Leber handelt [109].

Demnach zeigt der Vergleich der beiden Mausmodelle, dass die AlbCre-Mäuse fähig sind, auf einem ABCG5/G8 unabhängigen Weg Cholesterin aus der Leber in die Galle zu sezernieren. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in Wang et al. [16] gemachte Beobachtung eines ABCG5/G8 unabhängigen Sekretionsweges für Cholesterin. In [16] wird postuliert, dass dieser ABCG5/G8 unabhängige biliäre Sekretionsweg für 30 % - 40 % der hepatischen Cholesterinsekretion verantwortlich ist. Jedoch wurde in ihrer Arbeit [16] nicht der *Abcg5/g8* Knock-out in der Leber untersucht. Demnach wird in Wang et al. [16] keine Aussage über die Leistungsfähigkeit dieses Transportwegs bei einem leberspezifischen *Abcg5/g8* Knock-out gemacht. Es wird jedoch dem ABCG5/G8 unabhängigen Sekretionsweg bei einem *Abcg5/g8* Knock-out eine zentrale Rolle in der biliären Cholesterinsekretion zugeschrieben. Weiterhin ist dieser ABCG5/G8 unabhängige Sekretionsweg nicht fähig, Pflanzensterole zu sezernieren und lässt sich nicht durch einen LXR-Agonisten regulieren [16]. Die Funktionsweise der Transporter und eventuelle Kopplungsmechanismen der Transporter untereinander, die es den AlbCre-Mäusen unter normaler Diät ermöglichen, signifikante Mengen an Cholesterin in die Galle zu sezernieren, sind im Moment noch unverstanden.

Auffällig ist zudem der Unterschied in der biliären Gallensäurenkonzentration mit niedrigeren Werten für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät, der sich sowohl relativ als auch absolut signifikant darstellt. Entweder wird die Gallensäurensynthese oder die -sekretion durch den Knock-out beeinflusst. Diese geringen Gallensäurenssekretionsraten werden auch in den Abbildungen 6.4 und 6.10 deutlich, die die Abhängigkeiten des Galleflusses und der Cholesterinsekretion von der Gallensäurenssekretion darstellen. Für die AlbCre-Mäuse scheint es eine maximale Gallensäurenssekretionsrate zu geben, die bei normaler Diät bei 10  $\mu\text{mol/hr}/100\text{g}$  und bei lithogener Diät bei 20  $\mu\text{mol/hr}/100\text{g}$ , abgesehen von einzelnen Ausreißern, zu liegen scheint.

Betrachtet man die Abhängigkeit des Galleflusses von der Gallensäurenssekretion deuten die gleichen Steigungen der Ausgleichsgeraden sowohl bei normaler als auch bei lithogener Diät für die WT- und für die AlbCre-Mäuse auf einen identischen Mechanismus der Gallensäurenssekretion (über die Gallensäurensexportpumpe ABCB11) hin. Die hohen Galleflussraten der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener



Diät mit einem hohen und im Vergleich zum WT signifikant gesteigerten gallensäurenunabhängigen Gallenfluss können den Versuch der AlbCre-Mäuse widerspiegeln, durch eine hohe Flussrate vermehrt Cholesterin zu sezernieren. Als Auswirkung der reduzierten Gallensäuresekretion ist auch die reduzierte Gesamtlipidkonzentration zu werten, da die Gallensäurenreduktion nicht durch die Zunahme ( bei normaler Diät) oder Konstanz (unter lithogener Diät) der Cholesterinkonzentration kompensiert wird. Der CSI-Wert ist aufgrund der höheren Cholesterinkonzentration bei den AlbCre-Mäusen signifikant höher als der der WT-Mäuse. Bei normaler Diät können die AlbCre-Mäuse über den bis jetzt noch nicht identifizierten ABCG5/G8 unabhängigen Weg den Knock-out kompensieren, sodass es zu keinen Abweichungen im Körper- und Lebergewicht im Vergleich zum WT kommt. Jedoch hat dieser Genotyp bereits bei normaler Diät aufgrund eines CSI-Wertes  $> 2$ , welcher signifikant größer ist als der CSI-Wert der WT-Mäuse, ein hohes Cholelithiasis-Risiko.

Dieser Kompensationsmechanismus scheint unter lithogener Diät überfordert zu sein, da es beim Vergleich der Mausmodelle dann zu einem signifikanten Unterschied im Lebergewicht und im Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht kommt. Durch das Fehlen des ABCG5/G8 Transporters gelingt es der Leber der AlbCre-Mäuse nicht mehr, das überschüssige Cholesterin über den ABCG5/G8 unabhängigen Weg, der unter normaler Diät beobachtet werden konnte, zu eliminieren. Dies könnte eine Akkumulation des Cholesterins in der Leber zur Folge haben, die zum Anstieg des Lebergewichts der AlbCre-Mäuse im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe führt und zur Bildung einer Fettleber beiträgt. Unter normaler Diät sind die AlbCre-Mäuse noch fähig, das überschüssige Cholesterin in die Galle zu sezernieren. Unter lithogener Diät scheint der ABCG5/G8 unabhängige biliäre Sekretionsweg jedoch mit dem anflutenden Cholesterin überfordert zu sein.

Diese These wird durch den unter lithogener Diät nicht mehr zu beobachtenden Unterschied in der relativen Cholesterinkonzentration bestätigt. Die absoluten Cholesterin Output-Werte sind bei den AlbCre-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen unter lithogener Diät sogar geringer. Durch den Knock-out und durch die insbesondere unter lithogener Diät angestiegenen Cholesterinkonzentration scheint die Gallensäuresekretion, wie schon unter normaler Diät beobachtet werden konnte, inhibiert zu werden. Trotz der erniedrigten Gesamtlipidkonzentration steigt der CSI an. Dies lässt sich anhand des Kurvenverlaufes des maximal löslichen Cholesterins in Prozent in Abhängigkeit vom  $N$ -Wert, welcher dem Quotienten aus Phospholipidkonzentration und Summe aus Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration entspricht, erklären. Die erhöhte Phospholipidkonzentration bei unveränderter Summe aus Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration ergibt einen erhöhten  $N$ -Wert, wodurch man auf der  $x$ -Achse weiter nach rechts wandert (s. Abb.

9.1 im Anhang). Hierdurch gelangt man in das Maximum des Kurvenverlaufes, was gleichbedeutend mit der maximal möglichen maximalen Cholesterinkonzentration bei einer bestimmten Gesamtlipidkonzentration ist. Somit erhält man trotz erniedrigter Gesamtlipidkonzentration höhere maximal lösliche Cholesterinwerte. Da die Cholesterinkonzentration bezogen auf die Gesamtlipidkonzentration stärker steigt als die maximal lösliche Cholesterinkonzentration, ergibt sich im Ergebnis ein Anstieg des CSI.

### 8.3 Vergleich zwischen *VilCre*-Mäusen und *AlbCre*-Mäusen bei normaler und bei lithogener Diät

Die Ergebnisse des Vergleichs der *VilCre*- und *AlbCre*-Mäuse zeigen, trotz des unterschiedlichen gewebsspezifischen *Abcg5/g8* Knock-outs, überraschenderweise einen ähnlichen Phänotyp. Nicht erst unter lithogener Diät, sondern bereits unter normaler Diät verhalten sich die beiden Mausmodelle hinsichtlich der betrachteten Parameter sehr ähnlich. Der ABCG5/G8 Transporter spielt sowohl eine Hauptrolle in der biliären Cholesterinsekretion als auch in der intestinalen Absorption von Sterolen [110]. Patienten, die eine Mutation im ABCG5/G8 Transporter haben, zeigen eine gesteigerte intestinale Absorptionsraten von Pflanzen- und Nicht-Cholesterinsterolen und eine geringere biläre Sekretion dieser Sterole. Dies resultiert in hohen Sterolwerten im Blut und einer Akkumulation der Sterole im Gewebe der Patienten [110]. Inwiefern sich ein gewebsspezifische Knock-out auf die Absorption und Sekretion von Cholesterin auswirkt, ist noch nicht hinreichend bekannt. Daher liegt die Vermutung nahe, dass durch Fehlen des ABCG5/G8 Transporters im Darm der *VilCre*-Mäuse und damit Wegfall des exkretorischen ABCG5/G8 Transporters über den *Npc1l1* Transporter auch absolut mehr Cholesterin im Darm resorbiert wird. Aufgrund des in der Leber funktionierenden ABCG5/G8 Transporters der *VilCre*-Mäuse erwartete man bei diesen Mäusen eine erhöhte biliäre Cholesterinsekretion und damit eine erhöhte Cholesterinkonzentration in der Galle verglichen mit dem *AlbCre*-Mausmodell. Jedoch wurde von Jakulj et al. [13] durch Experimente an Mäusen bestätigt, dass diese vereinfachte Darstellung der Funktionsweise der Transporter nicht der Realität entspricht. In diesen Experimenten wurden zwar keine leberspezifischen Knock-out Mäuse untersucht, es konnte jedoch bei *Abcg8* Knock-out Mäusen die Cholesterinabsorption im Darm bestimmt werden, sodass die Ergebnisse der Arbeit [13] auch für das Verständnis unserer gewebsspezifischen Knock-out Mäuse relevant sind.

Jakulj et al. [13] zeigen, dass die Cholesterinabsorption in *Abcg8* Knock-out Mäusen geringer ist im Vergleich zu der Cholesterinabsorption der WT-Mäuse. Dies entspricht nicht der oben gemachten vereinfachten Darstellung der Funktionsweise des ABCG5/G8 Transporters im Darm. Wie unklar die Erkenntnisse über

die genaue Funktionsweise des ABCG5/G8 Transporters und eventuelle Wechselwirkungen dieses Transporters mit anderen Transportern noch sind, zeigen die widersprüchlichen Beobachtungen in der Literatur. Von H. Wang et al. [16] wurden *Abcg8* und *Abcg5/g8* nicht gewebsspezifische Knock-out Mäuse untersucht. Bei diesen Mäusen wurde im Gegensatz zu den Untersuchungen an *Abcg8* Knock-out Mäusen in [13] eine gesteigerte intestinale Absorption von Cholesterin festgestellt. In der Arbeit von J. Wang et al. [14] wird der gewebsspezifische *Abcg5/g8* Knock-out, in der Leber und im Darm, mit dem kompletten Knock-out und mit dem WT verglichen. Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Untersuchung der Auswirkungen der unterschiedlichen Knock-outs auf die intestinale Absorption von Cholesterin und Pflanzensterole sowie deren biläre Sekretion. In [14] wird postuliert, dass die intestinale Cholesterinabsorption für alle Mausreihen unabhängig von Anwesenheit und Ort des Knock-outs ist. Kein Unterschied in der intestinalen Cholesterinabsorption wurde auch in [12] für *Abcg5/g8* Knock-out Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen beobachtet. Aufgrund des nicht vorhandenen Unterschiedes in der Cholesterinabsorption zwischen den *Abcg5/g8* Knock-out Mäusen und dem WT postulieren Yu et al. [12], dass der ABCG5/G8 Transporter keine limitierende Funktion in der intestinalen Cholesterinabsorption besitzt. Inwieweit diese unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der intestinalen Cholesterinabsorption auf Unterschiede in der experimentellen Durchführung oder aber mit dem Knock-out der verschiedenen Transporter bzw. Transporterkombinationen (ABCG5/G8, ABCG5, ABCG8) zusammenhängen, bleibt damit offen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass der ABCG5/G8 Transporter in komplexe Transportvorgänge an den apikalen Zellmembranen involviert ist. In [13] wird bestätigt, dass eine Kopplung zwischen den gegensätzlich arbeitenden Transportern *Npc1l1* und ABCG5/G8 existiert. Wie genau diese Kopplung funktioniert, ist noch nicht bekannt, sie stellt jedoch einen sensiblen Mechanismus zur Kontrolle der Cholesterinkonzentration in den Enterozyten dar. Außerdem beschreiben Jakuli et al. [13], dass ABCG8 nicht als einziger Transporter für die Cholesterinsekretion der Enterozyten verantwortlich ist, evtl. könnten auch ABCB1A und ABCB1B die Funktion kompensieren.

Von Yu et al. [12] wurde bei *Abcg5/g8* Knock-out Mäusen eine reduzierte biliäre Cholesterinkonzentration gefunden bei gleichzeitig sogar geringerem hepatischen Cholesteringehalt. Es wird vermutet, dass durch eine Akkumulation von Pflanzensterolen in der Leber die Cholesterin-denovo-Synthese unterdrückt wird, wodurch die geringen Cholesterinwerte in der Leber erklärt werden. In dem schon zitierten Paper von Wang et al. [14] wird wie in dieser Arbeit der gewebsspezifische *Abcg5/g8* Knock-out untersucht, jedoch mit einem anderen Fokus. Es wird eine geringere biliäre Cholesterinsekretion bei den leberspezifischen *Abcg5/g8* Knock-out Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen beschrieben. Jedoch muss angemerkt werden,

dass keine Cholesterinsekretionsraten bestimmt wurden. Die erhöhte biliäre Cholesterinkonzentration beim leberspezifischen Knock-out wurde durch eine erhöhte Neusynthese von Sterolen aufgrund einer geringeren Sterolkonzentration in der Leber, verglichen mit den totalen Knock-out Mäusen, erklärt [14].

Der Vergleich der VilCre- und AlbCre-Mäuse in dieser Arbeit zeigt, dass die Transporter miteinander zu kommunizieren scheinen und gemeinsam die Cholesterinhomöostase beeinflussen. Trotz des Verlusts des intestinalen ABCG5/G8 Transporters kommt es somit nicht zu einer gesteigerten Cholesterinabsorption. Durch einen noch nicht bekannten Rückkopplungsmechanismus bzw. durch Wechselwirkung mit anderen Mechanismen, wie z.B. die Transintestinale Cholesterin Exkretion (TICE), scheint absolut nicht mehr Cholesterin absorbiert zu werden. Die TICE beschreibt einen zusätzlichen, reversen Cholesterintransport [111, 112]. Hierbei wird Cholesterin vom Blut direkt über die Enterozyten, welche sich vor allem im proximalen Teil des Dünndarms befinden, in das Darmlumen transportiert [111–113]. Die Existenz dieses Transportwegs wurde in mehreren Studien bei Mäusen bewiesen [111, 112, 114] und bereits schon durch frühere Arbeiten von Simmonds et al. [115] beim Menschen postuliert [111, 113]. Von Temel et al. [113] wurde die Aktivität dieses Transports bestätigt [111]. Die genaue Funktionsweise der TICE ist jedoch noch nicht verstanden [111]. Es konnte aber gezeigt werden, dass HDL, für den hepatobiliären Cholesterintransport, aber nicht für TICE essenziell ist [111]. In vergleichbarer Weise kann durch den Verlust des ABCG5/G8 Transporters in der Leber nicht eine Akkumulation des Cholesterins in der Leber postuliert werden, sondern es wird möglicherweise über einen ABCG5/G8 unabhängigen Weg die biliäre Cholesterinsekretion ebenfalls aufrecht gehalten.

## 9. Anhang

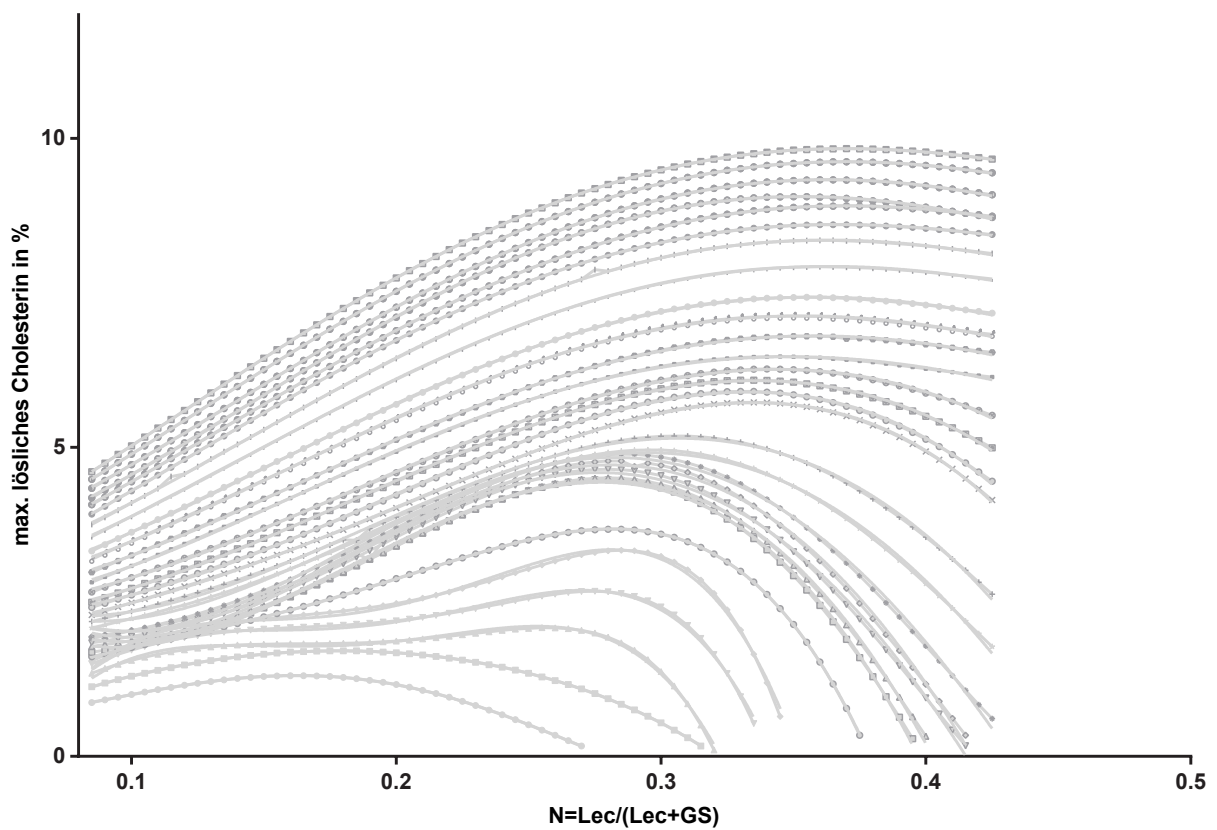


Abbildung 9.1: Maximal lösliches Cholesterin in Abhängigkeit vom  $N$ -Wert, dem Quotienten aus der Phospholipidkonzentration und der Summe aus Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration.

## 10. Literaturverzeichnis

- [1] G. Körner. Über die familiäre Häufung der Gallenblasenkrankheiten. *Zeitschrift für Menschliche Vererbungs- und Konstitutionslehre*, 20:528-582, 1937.
- [2] S. Buch, C. Schafmayer, H. Völzke, C. Becker, A. Franke, H. von Eller-Eberstein, C. Kluck, I. Bässmann, M. Brosch, F. Lammert, J. F. Miquel, F. Nervi, M. Wittig, D. Rosskopf, B. Timm, C. Höll, M. Seeger, A. ElSharawy, T. Lu, J. Egberts, F. Fändrich, U. R. Fölsch, M. Krawczak, S. Schreiber, P. Nürnberg, J. Tepel, und J. Hampe. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nature Genetics*, 39(8):995-999, 2007. <https://doi.org/10.1038/ng2101>.
- [3] F. Grünhage, M. Acalovschi, S. Tirziu, M. Walier, T. F. Wienker, A. Ciocan, O. Mosteanu, T. Sauerbruch, und F. Lammert. Increased gallstone risk in humans conferred by common variant of hepatic ATP-binding cassette transporter for cholesterol. *Hepatology*, 46(3):793-801, 2007. <https://doi.org/10.1002/hep.21847>.
- [4] K.-K. Kuo, S.-J. Shin, Z.-C. Chen, Y.-H. C. Yang, J.-F. Yang, und P.-J. Hsiao. Significant association of ABCG5 604Q and ABCG8 D19H polymorphisms with gallstone disease. *British Journal of Surgery*, 95(8):1005-1111, 2008. <https://doi.org/10.1002/bjs.6178>.
- [5] I. Rudkowska und P. J.H. Jones. Polymorphisms in ABCG5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. *Nutrition Review*, 66(6):343-348, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00042.x>.
- [6] D. Katsika, P. Magnusson, M. Krawczyk, F. Grünhage, P. Lichtenstein, C. Einarsson, F. Lammert, und H.-U. Marschall. Gallstone disease in swedish twins: risk is associated with ABCG8 D19H genotype. *Journal of Internal Medicine*, 268(3):279-285, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2010.02249.x>.

- [7] J. H. Yoon, R. Kuver, und H. S. Choi. ABCG8 D19H polymorphism: A basis for the genetic prediction of cholesterol gallstone disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25(11):1713-1717, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06484.x>.
- [8] Ans. Srivastava, Anv. Srivastava, K. Srivastava, G. Choudhuri, und B. Mittal. Role of ABCG8 D19H (rs11887534) variant in gallstone susceptibility in northern India. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25(11):1758-1762, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06349.x>.
- [9] O. von Kampen, S. Buch, M. Nothnagel, L. Azocar, H. Molina, M. Brosch, W. Erhart, W. von Schönfels, J. Egberts, M. Seeger, A. Arlt, T. Balschun, A. Franke, M. M. Lerch, J. Mayerle, W. Kratzer, B. O. Boehm, K. Huse, B. Schniewind, K. Tiemann, Z.-Y. Jiang, T.-Q. Han, B. Mittal, Ans. Srivastava, M. Fenger, T. Jørgensen, R. Schirin-Sokhan, A. Tönjes, H. Wittenburg, M. Stumvoll, H. Kalthoff, F. Lammert, J. Tepel, K. Puschel, T. Becker, S. Schreiber, M. Platzer, H. Völzke, M. Krawczak, J. F. Miquel, C. Schafmayer, und J. Hampe. Genetic and functional identification of the likely causative variant for cholesterol gallstone disease at the *ABCG5/8* lithogenic locus. *Hepatology*, 57(6):2407-2417, 2013. <https://doi.org/10.1002/hep.26009>.
- [10] H. H. Wang, T. Li, P. Portincasa, D. A. Ford, B. A. Neuschwander-Tetri, P. Tso, und D. Q.-H. Wang. New insights into the role of *lith* genes in the formation of cholesterol-supersaturated bile. *Liver Research*, 1(1):42-53, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2017.05.005>.
- [11] M. Acalovschi, A. Ciocan, O. Mostean, S. Tirziu, E. Chiorean, H. Keppeler, R. Schirin-Sokhan, und F. Lammert. Are plasma lipid levels related to *ABCG5/ABCG8* polymorphisms? A preliminary study in siblings with gallstones. *European Journal of Internal Medicine*, 17(7):490-494, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2006.04.012>.
- [12] L. Yu, R. E. Hammer, J. Li-Hawkins, K. von Bergmann, D. Lutjohann, J. C. Cohen, und H. H. Hobbs. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25):16237-16242, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.252582399>.
- [13] L. Jakulj, T. H. van Dijk, J. F. de Boer, R. S. Kootte, M. Schonewille, Y. Paalvast, T. Boer, V. W. Bloks, R. Boverhof, M. Nieuwdorp, U. H.W. Beuers, E. S.G. Stroes, und A. K. Groen. Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell Metabolism*, 24(6):783-794, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.10.001>.

- [14] J. Wang, M. A. Mitsche, D. Lütjohann, J. C. Cohen, X.-S. Xie, und H. H. Hobbs. Relative roles of *ABCG5/ABCG8* in liver and intestine. *Journal of Lipid Research*, 56(2):319-330, 2015. <https://doi.org/10.1194/jlr.M054544>.
- [15] C. Rebholz. Biliäre Lipidsekretion bei *Abcg8 p.D19H*-transgenen und intestinalen *Abcg5/g8*-Knockout-Mäusen. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, in Druck.
- [16] H. H. Wang, X. Li, S. B. Patel, und D. Q.-H. Wang. Evidence that the adenosine triphosphate-binding cassette G5/G8-independent pathway plays a determinant role in cholesterol gallstone formation in mice. *Hepatology*, 64(3):853-864, 2016. <https://doi.org/10.1002/hep.28570>.
- [17] F. Lammert, K. Gurusamy, C. W. Ko, J.-F. Miquel, N. Méndez-Sánchez, P. Portincasa, K. J. van Erpecum, C. J. van Laarhoven, und D. Q.-H. Wang. Gallstones. *Nature Reviews Disease Primers*, 2:16024, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.24>.
- [18] M. Gekle. Physiologie der Leber. In: P. Pape, A. Kurtz, und S. Silbernagl (Hrsg.), *Physiologie*. 8., unveränderte Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2018, S. 534-544. <https://doi.org/10.1055/b-002-46974>.
- [19] U. Welsch. Leber und Gallenwege. In: G. Wennemuth (Hrsg.), *Taschenbuch Histologie*. 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München 2017, S. 262-266. ISBN-13 : 9783437419782.
- [20] C. Jüngst und F. Lammert. Physiologie und Pathophysiologie des Gallensäurenstoffwechsels und der Gallesekretion. In: J. F. Riemann, W. Fischbach, P. R. Galle, und J. Mössner (Hrsg.). *Gastroenterologie in Klinik und Praxis. Das Referenzwerk für Klinik und Praxis. Band 2: Leber, Galle, Pankreas*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008, S. 1671-1677. <https://doi.org/10.1055/b-0034-79981>.
- [21] P. C. Heinrich, M. Müller, und L. Graeve. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>
- [22] E. Breitmaier und G. Jung. Gallensäuren. *Organische Chemie: Grundlagen, Verbindungsklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur, Naturstoffe, Synthesepaltung, Nachhaltigkeit*. 7. vollst. erarb. u. erw. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2012, S. 961-962. <https://doi.org/10.1055/b-002-44908>.
- [23] H. Dancygier, U. Leuschner, und D. Häussinger. Physiologie. In: H. Dancygier (Hrsg.), *Klinische Hepatologie. Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg 2003, S. 40-110. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-55902-0>.



- [24] U. Tennert, A. Tönjes, N. Favreau, C. Ruffert, J. Mössner, F. Lammert, M. Stumvoll, P. Kovacs, und H. Wittenburg. Assoziationsstudie der Gene für Cholezystokinin und Fibroblast Growth Factor 19 sowie deren jeweiligen Rezeptoren mit der Cholithiasis in zwei Populationen. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 48(8):307, 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1263747>.
- [25] S. A. Baeurle und J. Kroener. Modeling effective interactions of micellar aggregates of ionic surfactants with the Gauss-core potential. *Journal of Mathematical Chemistry*, 36(4):409-421, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:JOMC.0000044526.22457.bb>.
- [26] D. Q.-H. Wang und M. C. Carey. Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems. *Journal of lipid research*, 37(3):606-630, 1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728323>.
- [27] R. Aerts und F. Penninckx. The burden of gallstone disease in Europe. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 18(s3):49-53, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.0953-0673.2003.01721.x>.
- [28] H. Völzke, S. E. Baumeister, D. Alte, W. Hoffmann, C. Schwahn, P. Simon, U. John, und M. M. Lerch. Independent risk factors for gallstone formation in a region with high cholelithiasis prevalence. *Digestion*, 71(2):97-105, 2005. <https://doi.org/10.1159/000084525>.
- [29] M. C. Carey und B. Paigen. Epidemiology of the American Indians' burden and its likely genetic origins. *Hepatology*, 36(4I):781-791, 2002. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.36545>.
- [30] F. Lammert und T. Sauerbruch. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*, 2(9):423-433, 2005. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0257>.
- [31] F. Kern jr.. Effects of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid homeostasis in patients with cholesterol gallstones. *Journal of Clinical Investigation*, 93(3):1186-1194, 1994. <https://doi.org/10.1172/JCI117072>.
- [32] F. Lammert, M. C. Carey, und B. Paigen. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology*, 120(1):221-238, 2001. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.20878>.

- [33] J. F. Miquel, C. Covarrubias, L. Villaroel, G. Mingrone, A. V. Greco, L. Puglielli, P. Carvallo, G. Marshall, G. Del Pino, und F. Nervi. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. *Gastroenterology*, 115(4):937-946, 1998. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(98\)70266-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(98)70266-5).
- [34] J. E. Everhart, F. Yeh, E. T. Lee, M. C. Hill, R. Fabsitz, B. V. Howard, und T. K. Welty. Prevalence of gallbladder disease in American Indian populations: findings from the Strong Heart Study. *Hepatology*, 35(6):1507-1512, 2002. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33336>.
- [35] A. Nakeeb, A. G. Comuzzie, L. Martin, G. E. Sonnenberg, D. Swartz-Basile, A. H. Kissebah, und H. A. Pitt. Gallstones: genetics versus environment. *Annals of Surgery*, 235(6):842-849, 2002. <https://doi.org/10.1097/0000658-200206000-00012>.
- [36] H. Wittenburg, M. A. Lyons, R. Li, G. A. Churchill, M. C. Carey, und B. Paigen. FXR and ABCG5/ABCG8 as determinants of cholesterol gallstone formation from quantitative trait locus mapping in mice. *Gastroenterology*, 125(3):868-881, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)01053-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(03)01053-9).
- [37] M. Krawczyk, O. Niewiadomska, I. Jankowska, K. Jankowski, J. Gozdowska, D. Lebensztejn, S. Wiecek, F. Lammert, und P. Socha. Frequent polymorphism p.D19 H of the biliary cholesterol transporter ABCG5/8 increases the risk of gallstone disease in children. *Zeitung für Gastroenterologie*, 54(8):KV331, 2016. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1587107>.
- [38] S. Puppala, G. D. Dodd, S. Fowler, R. Arya, J. Schneider, V. S. Farook, R. Granato, T. D. Dyer, L. Almas, C. P. Jenkinson, A. K. Diehl, M. P. Stern, J. Blangero, und R. Duggirala. A genomewide search finds major susceptibility loci for gallbladder disease on chromosome 1 in Mexican Americans. *American Journal of Human Genetics*, 78(3):377-392, 2006. <https://doi.org/10.1086/500274>.
- [39] C. S. Stokes, M. Krawczyk, und F. Lammert. Gallstones: environment, lifestyle and genes. *Digestive Diseases (Basel, Schweiz)*, 29(2):191-201, 2011. <https://doi.org/10.1159/000323885>.
- [40] V. Valdivieso, C. Covarrubias, F. Siegel, und F. Cruz. Pregnancy and cholelithiasis: pathogenesis and natural course of gallstones diagnosed in early puerperium. *Hepatology*, 17(1):1-4, 1993. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423030>.
- [41] P. J.R. Banim, R. N. Luben, N. J. Wareham, S. J. Sharp, K.-T. Khaw, und A. R. Hart. Physical activity reduces the risk of symptomatic gallstones: a prospective cohort study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 22(8):983-988, 2010. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32833732c3>.

- [42] R. L. Weinsier, L. J. Wilson, und J. Lee. Medically safe rate of weight loss for the treatment of obesity: a guideline based on risk of gallstone formation. *The American Journal of Medicine*, 98(2):115-117, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)80394-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)80394-5).
- [43] V. B. Tsirlina, Z. M. Keilani, S. El Djouzi, R. C. Phillips, T. S. Kuwada, K. Gersin, C. Simms, und D. Stefanidis. How frequently and when do patients undergo cholecystectomy after bariatric surgery? *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 10(2):313-321, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soard.2013.10.011>.
- [44] M. F. Leitzmann, E. L. Giovannucci, M. J. Stampfer, D. Spiegelman, G. A. Colditz, W. C. Willett, und E. B. Rimm. Prospective study of alcohol consumption patterns in relation to symptomatic gallstone disease in men. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 23(5):835-841, 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371403>.
- [45] M. A. Lyons und H. Wittenburg. Cholesterol gallstone susceptibility loci: a mouse map, candidate gene evaluation, and guide to human *LITH* genes. *Gastroenterology*, 131(6):1943-1970, 2006. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.024>.
- [46] H. H. Wang, P. Portincasa, N. H. Afdhal, und D. Q.-H. Wang. Lith genes and genetic analysis of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology Clinics of North America*, 39(2):185-207, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2010.02.007>.
- [47] D. Q.-H. Wang, D. E. Cohen, und M. C. Carey. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl:406-411, 2009. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800075-JLR200>.
- [48] S. B. Biddinger, J. T. Haas, B. B. Yu, O. Bezy, E. Jing, W. Zhang, T. G. Unterman, M. C. Carey, und C. R. Kahn. Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nature Medicine*, 14(7):778-782, 2009. <https://doi.org/10.1038/nm1785>.
- [49] O. de Bari, T. Y. Wang, M. Liu, P. Portincasa, und D. Q.-H. Wang. Estrogen induces two distinct cholesterol crystallization pathways by activating ER $\alpha$  and GPR30 in female mice. *Journal of Lipid Research*, 56(9):1691-1700, 2015. <https://doi.org/10.1194/jlr.M059121>.
- [50] A. Moschetta, A. L. Bookout, und D. J. Mangelsdorf. Prevention of cholesterol gallstone disease by FXR agonists in a mouse model. *Nature Medicine*, 10(12):1352-1358, 2004. <https://doi.org/10.1038/nm1138>.

- [51] H. Uppal, Y. Zhai, A. Gangopadhyay, S. Khadem, S. Ren, J. A. Moser, und W. Xie. Activation of liver X receptor sensitizes mice to gallbladder cholesterol crystallization. *Hepatology*, 47(4):1331-1342, 2008. <https://doi.org/10.1002/hep.22175>.
- [52] T. Inagaki, M. Choi, A. Moschetta, L. Peng, C. L. Cummins, J. G. McDonald, G. Luo, S. A. Jones, B. Goodwin, J. A. Richardson, R. D. Gerard, J. J. Repa, D. J. Mangelsdorf, und S. A. Kliewer. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism*, 2(4):217-225, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.09.001>.
- [53] M. Krawczyk, M. Acalovschi, und F. Lammert. Genetic study of FGF19 receptor variants in gallstone disease. *Hepatology*, 56(6):2424, 2012. <https://doi.org/10.1002/hep.25863>.
- [54] M. C. Carey und D. M. Small. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *Journal of Clinical Investigation*, 61(4):998-1026, 1978. <https://doi.org/10.1172/JCI109025>.
- [55] J. M. Crawford, G.-M. Möckel, A. R. Crawford, S. J. Hagen, V. C. Hatch, S. Barnes, J. J. Godleski, und M. C. Carey. Imaging biliary lipid secretion in the rat: ultrastructural evidence for vesiculation of the hepatocyte canalicular membrane. *Journal of Lipid Research*, 36(10):2147-2163, 1995. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576641>.
- [56] P. Portincasa, K. J. van Erpecum, und G. P. Vanberge-Henegouwen. Cholesterol crystallisation in bile. *Gut*, 41(2):138-141, 1997. <http://dx.doi.org/10.1136/gut.41.2.138>.
- [57] D. Q.-H. Wang und M. C. Carey. Complete mapping of crystallization pathways during cholesterol precipitation from model bile: influence of physical-chemical variables of pathophysiologic relevance and identification of a stable liquid crystalline state in cold, dilute and hydrophilic bile salt-containing systems. *Journal of Lipid Research*, 37(3):606-630, 1996. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728323>.
- [58] M. J. Burnstein, R. G. Ilson, C. N. Petrunka, R. D. Taylor, und S. M. Strasberg. Evidence for a potent nucleating factor in the gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gastroenterology*, 85(4):801-807, 1983. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6884705>.
- [59] P. F. Levy, B. F. Smith, und J. T. LaMont. Human gallbladder mucin accelerates nucleation of cholesterol in artificial bile. *Gastroenterology*, 87(2):270-275, 1984. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6428962>.

- [60] S. Sahlin, J. Ahlberg, B. Angelin, E. Reihner, und K. Einarsson. Nucleation time of gall bladder bile in gall stone patients: influence of bile acid treatment. *Gut*, 32(12):1554-1557, 1991. <https://doi.org/10.1136/gut.32.12.1554>
- [61] W. H. Admirand und D. M. Small. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *Journal of Clinical Investigation*, 47(5):1043-1052, 1968. <https://doi.org/10.1172/JCI105794>.
- [62] M. C. Carey und D. M. Small. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *Journal of Clinical Investigation*, 61(4):998-1026, 1978. <https://doi.org/10.1172/JCI109025>.
- [63] F. Bolck und G. Machnik. Leber und Gallenwege. Gallenblase und extrahepatische Gallengänge. In: W. Doerr, G. Seifert, und E. Uehlinger (Hrsg.) *Spezielle pathologische Anatomie*, Band 10. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg 1978, S.721-971. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-96410-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-96410-7_2).
- [64] M. J. Armstrong und M. C. Carey. The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities. *Journal of Lipid Research*, 23(1):70-80, 1982. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7057113>.
- [65] A. L. Metzger, S. Heymsfield, und S. M. Grundy. The lithogenic index - a numerical expression for the relative lithogenicity of bile. *Gastroenterology*, 62(3):499-501, 1972. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5011538>.
- [66] F. M. Konikoff, D. S. Chung, J. M. Donovan, D. M. Small, und M. C. Carey. Filamentous, helical, and tubular microstructures during cholesterol crystallization from bile. Evidence that cholesterol does not nucleate classic monohydrate plates. *Journal of Clinical Investigation*, 90(3):1155-1160, 1992. <https://doi.org/10.1172/JCI115935>.
- [67] Z.-L. Xiao, Q. Chen, J. Amaral, P. Biancani, R. T. Jensen, und J. Behar. CCK receptor dysfunction in muscle membranes from human gallbladders with cholesterol stones. *American Journal of Physiology*, 276(6):G1401-G1407, 1999. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.6.G1401>.
- [68] H. H. Wang, P. Portincasa, N. Mendez-Sanchez, M. Uribe, und D. Q.-H. Wang. Effect of ezetimibe on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones. *Gastroenterology*, 134(7):2101-2110, 2008. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.011>.

- [69] D. Q.-H. Wang, F. Schmitz, A. S. Kopin, und M. C. Carey. Targeted disruption of the murine cholecystokinin-1 receptor promotes intestinal cholesterol absorption and susceptibility to cholesterol cholelithiasis. *Journal of Clinical Investigation*, 114(4):521-528, 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI16801>.
- [70] T. Wu, Z. Zhang, B. Liu, D. Hou, Y. Liang, J. Zhang, und P. Shi. Gut microbiota dysbiosis and bacterial community assembly associated with cholesterol gallstones in large-scale study. *BMC Genomics*, 14:669, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-669>.
- [71] L. Vitek und M. C. Carey. New pathophysiological concepts underlying pathogenesis of pigment gallstones. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 36(2):122-129, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2011.08.010>.
- [72] P. N. Meier, E. Rambusch, und M. P. Manns. Gallensteine. In: G. Adler, C. Beglinger, M. P. Manns, S. Müller-Lissner, und W. Schmiegel (Hrsg.), *Klinische Gastroenterologie und Stoffwechsel*. Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg 2000, S.911-924. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-57194-7>.
- [73] H. E. Wasmuth, H. Keppeler, U. Herrmann, R. Schirin-Sokhan, M. Barker, und F. Lammert. Coinheritance of Gilbert syndrome-associated *UGT1A1* mutation increases gallstone risk in cystic fibrosis. *Hepatology*, 43(4):738-741, 2006. <https://doi.org/10.1002/hep.21105>.
- [74] M. Dean, A. Rzhetsky, und R. Allikmets. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 11(7):1156-1166, 2001. <https://doi.org/10.1101/gr.184901>.
- [75] I. D. Kerr, A. J. Haider, und I. C. Gelissen. The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *British Journal of Pharmacology*, 164(7):1767-1779, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01177.x>.
- [76] C. F. Higgins. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 8(1):67-113, 1992. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>.
- [77] S. Wilkens. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7:14, 2015. <https://doi.org/10.12703/P7-14>.
- [78] A. J. Smith, J. M. L. de Vree, R. Ottenhoff, R. P. J. Oude Elferink, A. H. Schinkel, und P. Borst. Hepatocyte-specific expression of the human *MDR3* P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology*, 28(2):530-536, 1998. <https://doi.org/10.1002/hep.510280234>.

- [79] S. S. Sundaram und R. J. Sokol. The multiple facets of ABCB4 (MDR3) deficiency. *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 10(6):495-503, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11938-007-0049-4>.
- [80] A. van Helvoort, A. J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A. H. Schinkel, P. Borst, und G. van Meer. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell*, 87(3):507-517, 1996. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81370-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81370-7).
- [81] D. Gotthard, R. Kubitz, C. Flechtenmacher, K. H. Weiss, P. Schirmacher, und W. Stremmel. Eine Mutation im *ABCB11* Gen (c.1943G>T) ist mit einer rekurrenten intrahepatischen Cholestase und progredienten Leberfibrose im Erwachsenenalter assoziiert. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 49 - P443, 2011. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1285714>.
- [82] G. A. Graf, L. Yu, W.-P. Li, R. Gerard, P. L. Tuma, J. C. Cohen, und H. H. Hobbs. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48):48275-48282, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310223200>.
- [83] K. E. Berge, H. Tian, G. A. Graf, L. Yu, N. V. Grishin, J. Schultz, P. Kwiterovich, B. Shan, R. Barnes, und H. H. Hobbs. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497):1771-1775, 2000. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1771>.
- [84] Z. Chen und N. O. Davidson. Genetic regulation of intestinal lipid transport and metabolism. In: H. M. Said, J. D. Kaunitz, F. K. Ghishan, J. L. Merchant, und J. D. Wood (Hrsg.), *Physiology of the gastrointestinal tract*, Volume 2, 6. Auflage, Academic Press Elsevier, Großbritannien, Vereinigte Staaten 2018, S. 1109-1131. <https://doi.org/10.1016/C2015-1-04889-X>.
- [85] G. Salen, S. Shefer, L. Nguyen, G. C. Ness, G. S. Tint, und V. Shore. Sitosterolemia. *Journal of Lipid Research*, 33(7):945-955, 1992.
- [86] J.-Y. Lee, L. N. Kinch, D. M. Borek, Ji. Wang, Ju. Wang, I. L. Urbatsch, X.-S. Xie, N. V. Grishin, J. C. Cohen, Z. Otwinowski, H. H. Hobbs, und D. M. Rosenbaum. Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8. *Nature*, 533(7604):561-564, 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17666>.
- [87] B. Sauer. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods (San Diego, Calif.)*, 14(4):381-392, 1998. <https://doi.org/10.1006/meth.1998.0593>.

- [88] N. Sternberg und D. Hamilton. Bacteriophage P1 site-specific recombination. *Journal of Molecular Biology*, 150(4):467-486, 1981. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90375-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90375-2).
- [89] J. Graw. Veränderungen im Genom: Mutationen. Ortsspezifische Mutationen. In: *Genetik*. 6. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg 2015, S.446-455. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44817-5>.
- [90] H. Gu, J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, und K. Rajewsky. Deletion of a DNA polymerase  $\beta$  gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5168):103-106, 1994. <https://doi.org/10.1126/science.8016642>.
- [91] The Jackson Laboratory. Mouse strain datasheet - 000664. Vereinigte Staaten 2019. <https://www.jax.org/Strain/UrlAsPDF/000664> [abgerufen 17.07.2019].
- [92] ssniff Spezialdiäten GmbH, <http://www.ssniff.de>. Soest 2016. [abgerufen am 11.12.2018].
- [93] §§ 7 ff. TierSchG. Ausfertigungsdatum: 24.07.1972. Neugefasst durch Bek. v. 18.5.2006 | 1206, 1313; Zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 17.12.2018 | 2586.
- [94] A. Tannapfel. Leberembryologie, Lebermakroskopie und -mikroskopie. In: J. F. Riemann, W. Fischbach, P. R. Galle, und J. Mössner (Hrsg.). *Gastroenterologie in Klinik und Praxis. Das Referenzwerk für Klinik und Praxis. Band 2: Leber, Galle, Pankreas*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008, S. 1167-1176. <https://doi.org/10.1055/b-0034-79978>.
- [95] Tecan Trading AG. Sunrise™ Absorbance Microplate Reader. Schweiz 2018. [https://lifesciences.tecan.com/products/microplate\\_readers/sunrise](https://lifesciences.tecan.com/products/microplate_readers/sunrise). [abgerufen am 11.12.2018].
- [96] SARSTEDT AG & Co. KG. Microtestplatte 96 Well, F. Nümbrecht 2018. <https://www.sarstedt.com/produkte/labor/allgemeine-laborartikel/mikrotestplatten/produkt/82.1581.001/>. [abgerufen am 11.12.2018].
- [97] Randox Laboratories Ltd.. Randox Reagents: Total Cholesterol (Cat No.: CH200), Bile Acids Reagent (Cat No.: BI3863). Großbritannien 2018. <https://www.randox.com/total-cholesterol/>, <https://www.randox.com/bile-acids/>. [abgerufen am 15.12.2018].
- [98] C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, und P. C. Fu. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical Chemistry*, 20(4):470-475, 1974. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4818200>.



- [99] P. Roeschlau, E. Bernt, und W. Gruber. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie*, 12(5):226, 1974. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4440114>.
- [100] mti-diagnostics GmbH. Gesellschaft für medizinische und technische Investitionsprojekte mbH. Multipurpose Kits. Phospholipid Lyo-Buffer und Phospholipid Standard. Idstein 2018. <http://www.mti-diagnostics.de/produkte-1/multipurpose-kits/index.html>. [abgerufen am 15.12.2018].
- [101] M. Takayama, S. Itoh, T. Nagasaki, und I. Tanimizu. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 79(1):93-98, 1977. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(77\)90465-x](https://doi.org/10.1016/0009-8981(77)90465-x).
- [102] Y. Komiyama, T. Adachi, Y. Ito, K. Hirano, M. Sugiura, und S. Sawaki. Microassay of serum bile acids by an enzymatic cycling method. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokio)*, 30(10):3796-3799, 1982. <https://doi.org/10.1248/cpb.30.3796>.
- [103] V. Agape, P. Russo, L. Xaiz, S. Calmi, und R. Grisler. [Evaluation of a colorimetric enzymatic procedure for determining the total bile acids in the blood]. *Minerva Dietologica e Gastroenterologica*, 35(3):159-164, 1989. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2601866>.
- [104] M. C. Carey. Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *Journal of Lipid Research*, 19(8):945-955, 1978. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/731129>.
- [105] GraphPad Software. GraphPad Prism 6 (Version 6.01, Windows). Vereinigte Staaten 2018. <https://www.graphpad.com/>. [abgerufen am 18.12.2018].
- [106] N. A. Mazer und M. C. Carey. Mathematical model of biliary lipid secretion: a quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species. *Journal of Lipid Research*, 25(9):932-953, 1984. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6491540>.
- [107] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr., und L. Stryer. Enzyme: Grundlegende Konzepte und Kinetik. In: *Stryer Biochemie*. 8. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg 2018, S.255-297. [https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2989-6_8).
- [108] J. Weiß, M. Rau, und A. Geier. Nichtalkoholische Fettlebererkrankung. Epidemiologie, Verlauf, Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt International*, 111(26):447-452, 2014. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0447>.

- [109] S. Weber, F. Lammert, und F. Poppenborg. unveröffentliche Daten.
- [110] A. Kusters, C. Kunne, N. Looije, S. B. Patel, R. P. J. Oude Elferink, und A. K. Groen. The mechanism of ABCG5/ABCG8 in biliary cholesterol secretion in mice. *Journal of Lipid Research*, 47(9):1959-1966, 2006. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500511-JLR200>.
- [111] C. L. Vrins, R. Ottenhoff, K. van den Oever, D. R. de Waart, J. K. Kruyt, Y. Zhao, T. J. C. van Berkel, L. M. Havekes, J. M. Aerts, M. van Eck, P. C. Rensen, und A. K. Groen. Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 53(10):2017-2023, 2012. <https://doi.org/10.1194/jlr.M022194>.
- [112] A. E. van der Velde, C. L. Vrins, K. van den Oever, C. Kunne, R. P. Oude Elferink, F. Kuipers, und A. K. Groen. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*, 133(3):967-975, 2007. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.019>.
- [113] R. E. Temel, J. K. Sawyer, L. Yu, C. Lord, C. Degirolamo, A. McDaniel, S. Marshall, N. Wang, R. Shah, L. L. Rudel, und J. M. Brown. Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metabolism*, 12(1):96-102, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.011>.
- [114] J. M. Brown, T.A. Bell 3rd, H. M. Alger, J. K. Sawyer, T. L. Smith, K. Kelley, R. Shah, M. D. Wilson, M. A. Davis, R. G. Lee, M. J. Graham, R. M. Croke, L. L. Rudel. Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *Journal of Biological Chemistry*, 283(16):10522-10534, 2008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707659200>.
- [115] J. W. Simmonds, A. F. Hofmann, und E. Theodor. Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *Journal of Clinical Investigation*, 46(5):874-890, 1967. <https://doi.org/10.1172/JCI105587>.

## 11. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-bindung cassette
ABCB4	ATP-bindung cassette transporter B4
ABCB11	ATP-bindung cassette transporter B11
ABCB1A	ATP-bindung cassette transporter B1A
ABCB1B	ATP-bindung cassette transporter B1B
ABCG1	ATP-bindung cassette transporter G1
ABCG2	ATP-bindung cassette transporter G2
ABCG4	ATP-bindung cassette transporter G4
ABCG5	ATP-bindung cassette transporter G5
ABCG8	ATP-bindung cassette transporter G8
<i>ABCB11</i>	humanes Gen codierend für den ATP-bindung cassette transporter B11
<i>ABCG5</i>	humanes Gen codierend für den ATP-bindung cassette transporter G5
<i>ABCG8</i>	humanes Gen codierend für den ATP-bindung cassette transporter G8
<i>Abcg5</i>	mucines Gen codierend für den ATP-bindung cassette transporter G5
<i>Abcg8</i>	mucines Gen codierend für den ATP-bindung cassette transporter G8
AlbCre	Mäuse mit Mutation im hepatischen ABCG5/G8 Transporter
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoB-48	Apolipoprotein B-48

---

<b>ApoC</b>	Apolipoprotein C
<b>ApoC-II</b>	Apolipoprotein C-II
<b>ApoE</b>	Apolipoprotein E
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BRIC2</b>	Benigne rekurrende intrahepatische Cholestase Typ 2
<b>BW</b>	Körpergewicht
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CCK</b>	Cholecystokinin
<b>CFTR</b>	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
<b>Ch</b>	Cholesterin
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chlorid-Ion
<b>CMR</b>	Remnant
<b>Cre</b>	cyclische Rekombinase
<b>CSI</b>	cholesterol-saturated fat index
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CYP7A1</b>	Cytochrom P450 7A1 (Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase)
<b>CYP27A1</b>	Cytochrom P450 27A1 (Sterol 27-Hydroxylase)
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>+ Diät</b>	lithogene Diät
<b>- Diät</b>	normale Diät
<b>FGF15</b>	Fibroblast growth factor 15
<b>FGF19</b>	Fibroblast growth factor 19
<b>FGFR3</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor 3
<b>FOXO1</b>	Forkhead box protein O1
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptor
<b>g</b>	Gramm
<b>GF</b>	Gallefluss
<b>GS</b>	Gallensäure

---

<b>hr</b>	Stunde
<b>H<sup>+</sup></b>	Wasserstoff-Ion
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Hydrogencarbonat-Ion
<b>HDL</b>	High density lipoprotein
<b>HMDH</b>	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzym A reductase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>3-<math>\alpha</math>-HSD</b>	3- $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IgA</b>	Immunglobulin A
<b>kb</b>	Kilo-Basenpaare
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>LDLR</b>	LDL-Rezeptor
<b>Lec</b>	Lecithin
<b>lox-P</b>	locus of X-over of P1
<b>LRP1</b>	LDL receptor-related protein 1
<b>LW</b>	Lebergewicht
<b>LXR</b>	Liver X receptor
<b>max</b>	maximal
<b>MDR-3</b>	Multi-Drug Resistance 3
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium-Ion
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NAD</b>	Thio-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
<b>NADH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
<b>NAFL</b>	Non-alcoholic fatty liver
<b>NAFLD</b>	Non-alcoholic fatty liver disease
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NASH</b>	Non-alcoholic steatohepatitis
<b>NBD</b>	Nukleotid-Bindungsdomäne

---

<b>Npc1l1</b>	Niemann-Pick C1-like 1
<b>NTCP</b>	Natrium-Taurocholate Cotransporting Ploypeptide
<b>OH<sup>-</sup></b>	Hydroxid-Ion
<b>ORCC</b>	Outwardly Rectifying Chloride Channel
<b>PAP</b>	4-Aminoantipyrine
<b>PFIC3</b>	Progressive familiäre intrahepatische Cholestase Typ 3
<b>PFIC2</b>	Progressive intrahepatische Cholestase Typ 2
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>sec</b>	Sekretion
<b>SEM</b>	standard error of the mean
<b>SNP</b>	Einzelnukeotid-Polymorphismus
<b>SRB1</b>	Savenger receptor class B type 1
<b>TAG</b>	Triacylglycerin
<b>TBA</b>	Total Bile Acids
<b>Thio-NAD</b>	Thio-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
<b>Thio-NADH</b>	Thio-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
<b>TICE</b>	Transintestinal Cholesterin Exkretion
<b>TM</b>	Transmembrandomäne
<b>USP</b>	United States Pharmakopeia
<b>VilCre</b>	Mäuse mit Mutation im enteropatischen ABCG5/G8 Transporter
<b>VIP</b>	Vasoaktives intestinales Peptid
<b>VLDL</b>	Very low density lipoprotein
<b>WT</b>	Kontrollmäuse

## 12. Abbildungsverzeichnis

3.1	Metabolisierung von Cholesterol im Hepatozyten . . . . .	13
3.2	Gleichgewichtsphasendiagramm eines Gallensäure-Phospholipid-Cholesterin-Systems. . . . .	21
3.3	Struktur des ABCG5/G8 Heterodimers . . . . .	25
3.4	Schematische Darstellung der Herstellung der gewebsspezifischen Abcg5/g8 Knock-out Mäuse mithilfe des Cre/lox Systems . . . . .	27
5.1	Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	37
5.2	Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für die WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	38
5.3	Gesamtlipidkonzentration und CSI-Wert der WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . .	39
5.4	Gallefluss und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion für die WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	40
5.5	Phospholipidsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion für die WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	42
5.6	Output-Werte für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentrationen der WT-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	42
5.7	Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	43
5.8	Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	44

5.9 Gesamtlipidkonzentration und CSI-Wert der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	44
5.10 Gallefluss und Choesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	46
5.11 Phospholipidsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	47
5.12 Output-Werte für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	47
6.1 Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	49
6.2 Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	50
6.3 Gesamtlipidkonzentration und CSI-Wert der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	51
6.4 Gallefluss und Choesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	52
6.5 Phospholipidsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion für die AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	53
6.6 Output-Werte für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	54
6.7 Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse und der WT-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	54
6.8 Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät. . . . .	55



6.9	Gesamtlipidkonzentration in g/dl und CSI für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	56
6.10	Gallefluss und Choesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	57
6.11	Phospholipidsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät. . . . .	58
6.12	Output-Werte für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen bei lithogener Diät . . . . .	59
7.1	Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und Quotient aus Leber- und Körpergewicht (LW/BW) der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	60
7.2	Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	61
7.3	Gesamtlipidkonzentration in g/dl und CSI der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei normaler Diät . . . . .	62
7.4	Gallefluss und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion für die AlbCre-Mäuse und die WT-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	63
7.5	Darstellung der Phospholipidsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion sowie der Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei normaler Diät. . . . .	64
7.6	Output-Werte für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse im Vergleich zu den VilCre-Mäusen bei normaler Diät. . . . .	64
7.7	Körpergewicht (BW), Lebergewicht (LW) und der Quotient aus Leber- und Körpergewicht (BW/LW) der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	65
7.8	Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei lithogener Diät. . . . .	66

7.9 Gesamtlipidkonzentration in g/dl und CSI der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	66
7.10 Gallefluss und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	68
7.11 Phospholipidsekretion in Abhängigkeit von der Gallensäuresekretion und Cholesterinsekretion in Abhängigkeit von der Phospholipidsekretion für die AlbCre-Mäuse und die VilCre-Mäuse bei lithogener Diät . . . . .	68
7.12 Output-Werte für die Gallensäuren-, Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der AlbCre-Mäuse und der VilCre-Mäuse bei lithogener Diät. . . . .	69
7.13 Der Quotient aus biliärer Cholesterin- und Phospholipidkonzentration der VilCre- und der AlbCre-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT-Mäuse) jeweils bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	70
9.1 Maximal lösliches Cholesterin in Abhängigkeit von $N$ , dem Quotienten aus Phospholipidsekretion und Summe aus Phospholipidsekretion und Gallensäuresekretion. . . . .	80

## 13. Tabellenverzeichnis

4.1 Materialien . . . . .	28
4.2 Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Cholesterinkonzentration . . . . .	31
4.3 Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Phospholipidkonzentration. . . . .	32
4.4 Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Gallensäurenkonzentration. . . . .	33
5.1 Zusammenfassung der WT-Mäuse und AlbCre-Mäuse jeweils bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	48
6.1 Zusammenfassung WT-Mäuse versus AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät . . . . .	59
7.1 Zusammenfassung VilCre-Mäuse versus AlbCre-Mäuse bei normaler und bei lithogener Diät. . . . .	71

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg erstellt.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Frank Lammert für die Überlassung des Themas, für seine ausgezeichnete Betreuung sowie für die stetige Bereitschaft zur konstruktiven Kritik. Zudem danke ich ihm für seine zahlreichen Anregungen und Ideen, die für die Entstehung der Arbeit in dieser Form unabdingbar waren.

Bei Dr. rer. nat. Susanne Weber möchte ich mich für die nette und konstruktive Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit recht herzlich bedanken. Der gesamten Laborgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft sowie die Unterstützung bei der praktischen Einarbeitung im Labor. Besonderen Dank gilt hier Frau Annika Bohnert, die mir mit ihrer Erfahrung in der Laborarbeit sehr geholfen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Charlotte Rebholz für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Thema meiner Arbeit sowie die wertvolle gegenseitige Unterstützung.

# **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.