

Der kanalikuläre Gallensäuretransporter der Leber als Kandidatengen für den Gallensteinlocus *Lith 1*

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Anne Figge

aus Marburg an der Lahn

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Siegfried Matern

Universitätsprofessor Dr. Fritz Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Entstehung von Cholesterin-Gallensteinen.....	1
1.2	Genetische Prädisposition.....	2
1.3	Genomanalysen in der Gallensteinmaus	4
1.4	Murine Gallensteinloci (<i>Lith</i> -Loci)	4
1.5	Der ABC-Transporter ABCB11 im Gallensteinlocus <i>Lith 1</i>	6
1.6	Ziel der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN.....	9
2.1	Klonierungen.....	9
2.1.1	Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung	9
2.1.2	Restriktionsverdau von DNA.....	9
2.1.3	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA.....	9
2.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	10
2.1.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	10
2.1.6	Quantifizierung des DNA-Gehaltes im ng-Bereich.....	10
2.1.7	DNA-Ligation.....	11
2.1.8	Transformation von Bakterien.....	11
2.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....	11
2.1.10	Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab.....	11
2.1.11	Quantifizierung des DNA-Gehaltes	12
2.2	Experimentelle Sequenzanalysen.....	12
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	12
2.2.2	Genome Walking.....	13
2.2.3	Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen (SSCP)-Analyse	14
2.2.4	DNA-Sequenzierung.....	14
2.3	<i>In Silico</i> Sequenzanalysen.....	15
2.3.1	Alignment von Sequenzen.....	15
2.3.2	Homologievergleich zwischen Maus und Mensch.....	15
2.3.3	Transkriptionsfaktor-Analyse.....	15

2.4	Reporterassay.....	16
2.4.1	Eukaryontische Zellen und deren Kultivierung.....	16
2.4.2	Herstellung von Reporterkonstrukten.....	16
2.4.3	Expressionsvektoren für Transkriptionsfaktoren.....	17
2.4.4	Transiente Transfektion von HepG2-Zellen.....	17
2.4.5	Reporterassay.....	18
2.4.6	Statistik.....	18
2.5	Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA).....	19
2.5.1	Herstellung von nukleären Extrakten aus Leber.....	19
2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
2.5.3	Oligonukleotide.....	19
2.5.4	Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden.....	20
2.5.5	EMSA.....	20
2.6	Bakterielle artifizielle Chromosomen (BACs).....	21
2.6.1	BAC-Bibliothek.....	21
2.6.2	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	21
2.6.3	Hybridisierung der BAC-Bibliothek.....	22
2.6.4	Isolierung von BAC-DNA im kleinen Maßstab.....	22
2.6.5	Isolierung und Aufreinigung von BAC-DNA im großen Maßstab.....	23
2.6.6	Quantifizierung des BAC-DNA Gehaltes.....	23
2.6.7	Größenbestimmung der BAC-Inserts durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE).....	23
2.6.8	BAC-DNA-Sequenzierung.....	24
2.7	<i>Abcb11</i> BAC-transgene Maus.....	24
2.7.1	Mikroinjektionen von Maus-Embryonen zur Erzeugung einer BAC-transgenen Maus.....	24
2.7.2	Versuchstiere und Haltung.....	25
2.7.3	DNA-Isolierung.....	25
2.7.4	Identifizierung transgener Mäuse.....	25
2.7.5	Southern Blot zur Untersuchung des integrierten BACs.....	26
2.7.6	RNA-Isolierung.....	27
2.7.7	Northern Blot zur Untersuchung der <i>Abcb11</i> -Expression.....	27
2.7.8	Densitometrische Quantifizierung von Northern und Southern Blots.....	28
2.8	Induktion der Gallensteinbildung.....	28
2.8.1	Lithogene Provokationsdiät.....	28
2.8.2	Phänotypisierung.....	29
2.8.3	Infrarotspektroskopie zur Analyse der Gallensteine.....	30

3	ERGEBNISSE.....	31
3.1	Molekulare Analyse des Gallensäuretransporter-Gens <i>Abcb11</i>	31
3.1.1	Ermittlung der <i>Abcb11</i> -Sequenz und Genstruktur	31
3.1.2	Identifizierung unbekannter Exons im Intron 1	34
3.1.3	Vergleichende Sequenzanalyse des <i>Abcb11</i> -Gens zwischen Gallenstein-sensitiven (C57L) und -resistenten (AKR) Mäusen.....	34
3.1.4	Haplotyp-Analyse der <i>Abcb11</i> -Polymorphismen in Gallenstein-sensitiven und -resistenten Mausinzuchtstämmen.....	37
3.1.5	Vergleichende Sequenzanalyse des <i>Abcb11</i> -Gens zwischen Maus und Mensch.....	38
3.1.6	Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen.....	41
3.2	Regulatorische Untersuchungen des <i>Abcb11</i> -Gens	44
3.2.1	Funktionelle Untersuchung des 5'-Polymorphismus im Reporteragenassay	45
3.2.2	Funktionelle Untersuchung der Intron 1-Polymorphismen im Reporteragenassay	47
3.2.3	Kotransfektions-Assays mit hepatischen Transkriptionsfaktoren.....	48
3.2.4	Untersuchung potenzieller Bindungsstellen mittels Elektrophoretischem Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	49
3.3	Herstellung einer <i>Abcb11</i> BAC-transgenen Maus	52
3.3.1	Mikroinjektionen von BAC-DNA in Gallenstein-resistente Mausinzuchtstämmen.....	52
3.3.2	Charakterisierung <i>Abcb11</i> BAC-transgener Nachkommen 129S1/SvImJ- <i>Tg(RP23-291P1)1flp</i> und 129S1/SvImJ- <i>Tg(RP23-291P1)2flp</i>	53
3.3.3	Integritätsüberprüfung und Kopienzahlbestimmung des Transgens	54
3.3.4	Expression von <i>Abcb11</i> -mRNA unter Standarddiät.....	55
3.4	Phänotypisierung <i>Abcb11</i> BAC-transgener Mäuse auf lithogener Provokationsdiät	57
3.4.1	Körpergewichtsverlauf unter lithogener Diät.....	57
3.4.2	Phänotypisierung von Leber, Galle und Darm.....	57
3.4.3	Expression von <i>Abcb11</i> -mRNA unter lithogener Diät.....	60
3.4.4	Cholesterin-Kristallisation und Gallenstein-Prävalenz.....	61
4	DISKUSSION.....	71
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
6	LITERATURVERZEICHNIS	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
abstr.	<i>abstract</i>
Amp	Ampicillin
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bakterielles Artifizielles Chromosom
BBS	<i>BES Buffered Saline</i>
BES	N,N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfo-Säure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CDCA	Chenodeoxycholsäure
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C/EBP	<i>CAAT-Element Binding Protein</i>
ChM	Cholesterin-Monohydrat
CNS	<i>Conserved Non-coding Sequence</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CSI	Cholesterin-Sättigungsindex
Da	Dalton
dCTP	deoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	deoxy-Guanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
DR	<i>Direct Repeat</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	deoxy-Thymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
FXR	<i>Farnesoid X Receptor</i>
HFH	<i>HNF Forkhead Homolog</i>
HNF	<i>Hepatocyte Nuclear Factor</i>
Hrsg.	Herausgeber

ddH₂O	bidestilliertes Wasser
IR	<i>Inverted Repeat</i>
kb	Kilobasenpaare
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
LINE	<i>Long intersperced repeats</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
MDR	Multi Drug Resistance Protein
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
Mit	Mikrosatellit
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	Nukleotid
NF-Y	<i>Nuclear Factor Y</i>
n. s.	nicht signifikant
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
r. E.	relative Einheiten
RFLP	Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus
RLUs	<i>Relative Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
s	<i>sense</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SSC	Natriumchlorid, Natriumcitrat
SSCP	Einzelstrangkonnformations-Polymorphismus
STE	Natrium-tris-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
vs.	<i>versus</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Entstehung von Cholesterin-Gallensteinen

Das Gallensteinleiden (Cholesterin-Cholelithiasis) ist eine der häufigsten gastroenterologischen Erkrankungen in Europa, Nord- und Südamerika. In Deutschland haben 10 Millionen Menschen Gallensteine. Ihre Behandlung - meist durch die Standardtherapie der Gallenblasenentfernung (130 000 Operationen pro Jahr) - verursacht in Deutschland jährlich Kosten von mehr als 500 Millionen Euro [1, 2]. Trotz dieser beträchtlichen sozioökonomischen Bedeutung ist die molekularbiologische Ursache der Gallensteinentstehung bislang wenig untersucht. Die Galleproduktion der Leber hängt von der koordinierten Interaktion verschiedener hepatozellulärer Transporter ab [3], die Gegenstand intensiver Forschung sind.

Die physikalisch-chemischen Mechanismen der Gallesekretion und -homöostase und der Cholesterinkristallisation wurden dagegen schon vor 30 Jahren intensiv erforscht [4-7]. Die Cholesterinhomöostase der Galle basiert auf dem thermodynamischen Gleichgewicht von Cholesterin und seinen beiden Lösungsvermittlern Gallensäuren und Phosphatidylcholin (Lecithin), dem vorherrschenden biliären Phospholipid. Diese halten das hydrophobe Cholesterin in der wässrigen Galleflüssigkeit in einem System von Lipidkomplexen in Lösung. Gallensäuren werden unter Verbrauch von ATP in die Galle sezerniert und lösen Cholesterin in einfachen Mizellen. Phospholipide werden gleichzeitig mit Cholesterin als Vesikel an der kanalikulären Membran des Hepatozyten abgegeben [8, 9]. Gallensäuren können aus diesen Vesikeln Segmente herauslösen und gemischte Vesikel bilden (Abb.1-1). Ist die Gallenblasengalle mit Cholesterin übersättigt, wird Cholesterin in unilamellaren Phospholipid-Cholesterin-(Gallensäure)-Vesikeln gelöst, die eine große Kapazität für Cholesterin besitzen. Diese fusionieren zu multilamellaren Vesikeln oder Flüssigkristallen und führen über die Bildung von Cholesterin-Monohydratkristallen (Nukleation) zur Entstehung von Cholesterin-Gallensteinen [10, 11]. Die Cholesterinübersättigung wird allgemein auf eine gesteigerte Cholesterinsekretion der Leber zurückgeführt, deren Ursachen unbekannt sind [12, 13].

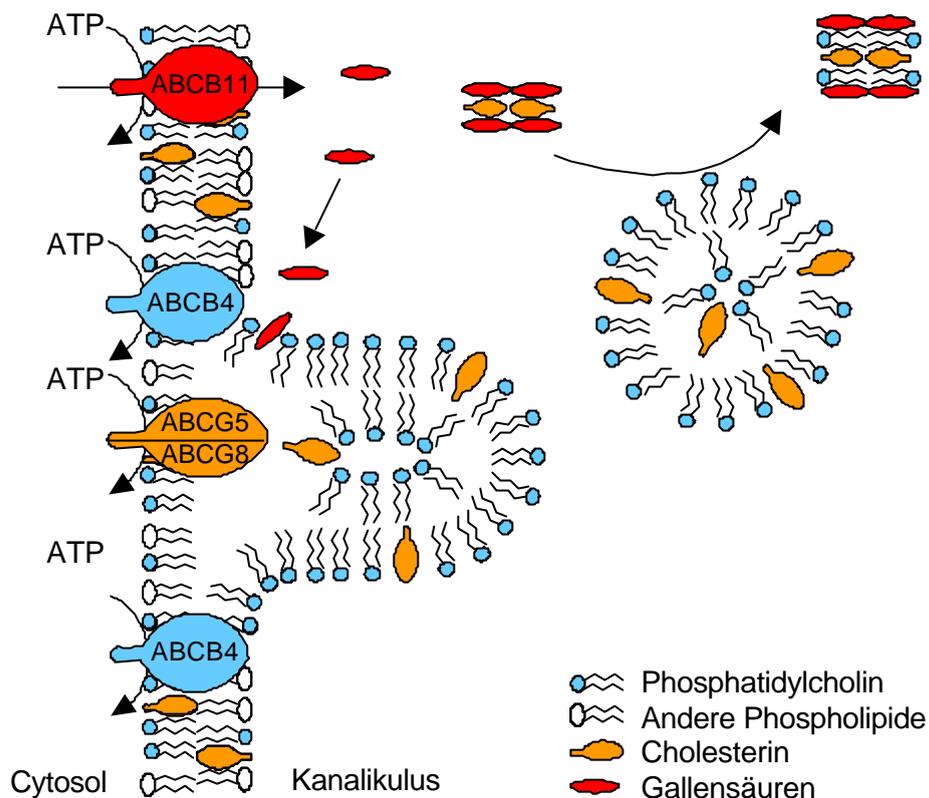


Abb. 1-1: Modell der kanalikulären Lipidsekretion (nach [9], verändert).

Das Heterodimer aus ABCG5/8 gilt als potenzieller Cholesterintransporter [14-16].

1.2 Genetische Prädisposition

Epidemiologische Studien zeigen deutliche geografische Unterschiede im Gallensteinvorkommen [17, 18]. In den meisten europäischen Ländern, Amerika und Australien wurde eine erhöhte Prävalenz dokumentiert, wohingegen in Asien und Afrika eine niedrige Prävalenz zu verzeichnen ist. Diese Unterschiede spiegeln nur teilweise den Einfluss exogener Faktoren, insbesondere der Ernährung, wider [19, 20]. Bei nordamerikanischen Pima-Indianern kommen Cholesterin-Gallensteine mit einer Gesamtprävalenz von fast 50% vor [21], obwohl die Nahrungsaufnahme der Pima nicht vom nordamerikanischen Durchschnitt abweicht [22].

Auswahlfreie Zwillings- und systematische Familienuntersuchungen weisen auf die Bedeutung genetischer Faktoren bei der Gallensteinentstehung hin [23, 24]. Gallensteine treten signifikant häufiger (3:1) in Familien erkrankter Probanden als in denen gesunder Kontrollen auf [24-26]. Die Cholesterin-Cholelithiasis ist damit - wie die Adipositas oder der Diabetes mellitus - eine "polygene Erkrankung", d. h. Gallensteine sind das Ergebnis einer komplexen Interaktion von Umwelteinflüssen mit multiplen genetischen Faktoren bzw. zwischen den Genen untereinander (Epistase), die das Krankheitsbild und die quantitative Ausprägung des Phänotyps beeinflussen [27].

Dennoch sind die zugrunde liegenden genetischen Faktoren nicht genau bekannt. Während die epidemiologischen Studien und die Familien- und Zwillingsstudien eine generelle genetische Prädisposition für einen Phänotyp beschreiben, versuchen Assoziationsstudien einen direkten Zusammenhang zwischen Gallensteinphänotypen und einzelnen Genen herzustellen. Für die Cholesterin-Gallensteinentstehung konnten bisher fünf Kandidatengene durch Untersuchungen bei Gallensteinpatienten identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Apolipoproteine *APOB* und *E* und drei weitere Gene, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind.

Es gibt drei häufige, kodominant vererbte *APOE*-Allele ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$). Bertomeu et al. [28] zeigten, dass das $\epsilon 4$ -Allel neben dem Morbus ALZHEIMER, auch mit der Cholesterin-Cholelithiasis assoziiert ist. Eine Untersuchung bei 190 chinesischen Gallensteinpatienten konnte eine Kopplung zwischen einem Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) in Exon 26 des *APOB*-Gens (*XbaI*) und Cholesterin-Gallensteinen nachweisen [29]. Bei 232 mexikanischen Patienten traten Polymorphismen im 5'-Ende des *CYP7A1*-Gens der Cholesterin 7α -Hydroxylase mit Gallenblasenerkrankungen bei Männern, nicht jedoch bei Frauen auf [30]. In einer finnischen Studie unterschied sich die Verteilung eines RFLP im Gen des Cholesterinester-Transferproteins *CETP* (*TaqIB*) signifikant zwischen Patienten mit Cholesterinsteinen und steinfreien Kontrollpersonen [31]. Darüber hinaus wurden bei Patienten mit Gallenblasensteinen und intrahepatischen Cholesterinsteinen vor kurzem *Nonsense*- und *Missense*-Mutationen im Gen des kanalikulären Phosphatidylcholin-Transporters der Leber (*ABCB4*, inoffizielles Gensymbol *MDR3*) detektiert [32].

1.3 Genomanalysen in der Gallensteinmaus

Die klassische Stammbaumanalyse nach Mendel untersucht einfache Erbgänge, die sich auf einen einzigen Genlocus begründen. Diese können rezessiver oder dominanter Art sein. Bei polygenen Phänotypen stellen experimentelle Kreuzungen von Inzuchtmäusen ein geeignetes Tiermodell zur Genomanalyse dar [33]. Ein Mausstamm gilt nach 20 Generationen der Geschwisterverpaarung als Inzuchtstamm. Da er für alle Allele homozygot ist, vermeidet man mit einem Inzuchtstamm als Modellorganismus das Problem der genetischen Heterogenität. Außerdem ermöglichen Inzuchtmäuse die Untersuchung großer Nachkommenszahlen sowie die Kontrolle der Umweltbedingungen. Sie eröffnen vielfältige Möglichkeiten, pathophysiologische Zusammenhänge durch genetische Veränderungen (Knockout- oder transgene Mäuse) zu untersuchen [34]. Die genetische Verwandtschaft der Säugetiere gestattet es zudem, von murinen Kandidatengen für einen Phänotypen auf die orthologen humanen Gene zu schließen.

Unter der Fütterung einer lithogenen Provokationsdiät, die 1% Cholesterin und 0,5% Cholsäure zur Erhöhung der intestinalen Cholesterinabsorption enthielt [35], entwickelten 80% der C57L/J-Inzuchtmäuse Cholesterin-Gallensteine, während sich andere Stämme (A/J, AKR/J, SWR/J) als resistenter erwiesen (0-44%) [36]. Phänotypisch wiesen C57L-Mäuse im Vergleich zu AKR-Mäusen auf Normaldiät eine biliäre Cholesterinhypersekretion bei gesteigerten Sekretionsraten aller biliären Lipide auf. Unter der lithogenen Diät sezernierten die C57L-Mäuse signifikant mehr Cholesterin und Phospholipide, während die Gallensäuresekretion unverändert blieb. Dies führte zu einer Erhöhung des Cholesterin-Sättigungsindex (CSI) [37]. Außerdem zeigten die Gallenstein-sensitiven Mäuse eine fehlende Suppression der Cholesterinbiosynthese und eine reduzierte Gallensäurebiosynthese [38].

1.4 Murine Gallensteinloci (*Lith-Loci*)

Die Quantitative Trait Locus Analysis (QTL-Analyse) stellt eine neue Methode dar, mit deren Hilfe pathophysiologisch relevante Genregionen für die Gallensteinentstehung in verschiedenen Mausinzuchtstämmen identifiziert und lokalisiert werden können. Sie geht

von einem Phänotypen aus und sucht die ihm zugrunde liegenden primären, strukturellen Gendefekte. Die Methode analysiert die genetische Kopplung eines quantitativen Phänotyps mit zwischen Mausinzuchtstämmen polymorphen, genetischen Markern (Mikrosatelliten), deren Lokalisationen im Genom bekannt sind [39]. Mikrosatellitenmarker (*Mit*-Marker) sind kurze repetitive DNA-Sequenzen, deren Länge sich zwischen verschiedenen Mausinzuchtstämmen unterscheidet und mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermittelt werden kann.

Das Ergebnis verschiedener QTL-Analysen für Cholesterin-Gallensteine sind fünf identifizierte, lithogene, d. h. steinbildende (*Lith*-)Loci und weitere QTLs für die Gallensteinentstehung auf den 20 Chromosomen der Maus [27]. Kollokalisierungen von QTLs und Genen, die eine Schlüsselrolle in der Cholesterinhomöostase spielen, sprechen für deren pathophysiologische Relevanz in der Gallensteinentstehung.

Eine QTL-Analyse zwischen den beiden Mausstämmen AKR und C57L zeigte, dass ihre unterschiedliche Gallensteinempfindlichkeit auf mindestens zwei ungekoppelte *Lith*-Loci zurückzuführen ist [40]. Da die F₁-Generation aus C57L und AKR mit C57L/J den gleichen Phänotyp aufweist, schlossen Wang et al., dass die Prädisposition für die Cholesterin-Cholelithiasis dominant vererbt wird [36]. Weitere Untersuchungen ergaben den stärksten Effekt für den QTL *Lith 1* [41], dessen LOD-Score - ein Maß für die Kopplungswahrscheinlichkeit - > 3,3 und damit statistisch signifikant war. Um den Einfluss von *Lith 1* auf die Gallensteinentstehung genauer zu charakterisieren, wurden durch konsekutive Rückkreuzungen kongene Mäuse mit den zu Gallensteinen prädisponierenden C57L-Allelen im *Lith 1*-Locus auf dem resistenten genetischen Hintergrund AKR hergestellt [42]. Die kongenen Mäuse entwickelten in kurzer Zeit viele Gallensteine und entsprachen damit dem C57L-Phänotyp [41]. Dies belegte einen starken, unabhängigen Effekt von *Lith 1* auf die Gallensteinentstehung.

Der kanalikuläre Gallensäuretransporter der Leber *Abcb11* (alte Gensymbole *Spgp* = Sister-of-p-glycoprotein oder *Bsep* = Bile salt export pump) stellt ein attraktives Kandidatengen für die Gallensteinprädisposition im *Lith 1*-Locus auf Chromosom 2 dar, da er mit diesem kollokalisiert [43]. In *Lith 1* wurde außerdem das Gen für das Low Density Lipoprotein Related Protein *Lrp2* (auch Megalin *Gp330* genannt) kartiert [44]. Dieses wurde

zunächst weitgehend als Kandidatengen ausgeschlossen, weil keine Expression in der Leber nachgewiesen werden konnte [45].

Der QTL *Lith 2* liegt auf Mauschromosom 19. In dieser Region befindet sich als Gallenstein-Kandidatengen der multispezifische organische Anionentransporter *Abcc2* (frühere Bezeichnung *Mrp2* = Multi-drug resistance protein oder *Cmoat* = Canalicular multispecific organic anion transporter) [27]. *Bouchard et al.* detektierten in der cDNA des *Abcc2*-Gens einen strukturellen Polymorphismus, der der unterschiedlichen Gallensteinsuszeptibilität der Mausstämme C57L und AKR zugrunde liegen könnte [46].

Eine Kreuzung der Inzuchtstämme A/J und AKR lokalisierte den Gallensteinlocus *Lith 3* auf Chromosom 17 [47]. Als Kandidatengen in *Lith 3* wird der basolaterale organische Kationentransporter *Slc22a1* (frühere Bezeichnung *Oct1*) untersucht, über den Cholin, ein essenzieller Baustein für die hepatische Phosphatidylcholin-Biosynthese, in die Hepatozyten absorbiert wird [48]. Weitere *Lith*-Loci wurden in einer Kreuzung zwischen den Mausinzuchtstämmen SWR/J und AKR auf Chromosom X (*Lith 4*) und Chromosom 9 (*Lith 5*) identifiziert [49]. *Lith 4* auf dem X-Chromosom kolokalisiert mit dem Gen für die 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase [50], einem Enzym der Cholesterinbiosynthese; der QTL überlappt zudem mit murinen QTLs für polygene Adipositas, die das Körpergewicht beeinflussen [49, 51]. Im *Lith 5*-Locus auf Chromosom 9 liegt als mögliches Kandidatengen das Gen der hepatischen Lipase (*Lipc*), einem hydrolytisches Enzym, das an der Aufnahme von Chylomikronen-Remnants und HDL-Cholesterin durch die Leber beteiligt ist [27, 52].

1.5 Der ABC-Transporter ABCB11 im Gallensteinlocus *Lith 1*

ABCB11 gehört zur Familie der membranständigen ABC-Transporter, die sich durch eine hoch konservierte ATP-Bindungscassette auszeichnen. Sie sind in der Lage durch ATP-Hydrolyse verschiedene endogene Metaboliten - wie z. B. ABCB11 Gallensäuren aus dem Hepatozyten in den Gallenkanalikulus - entgegen eines hohen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Andere ABC-Transporter, wie ABCB1 (= MDR 1, Multidrug resistance protein oder P-glycoprotein) spielen eine Rolle bei der Exkretion von Xenobiotica und deren Konjugaten [53].

Abcb11 wurde als Erstes von Childs et al. aus dem Schwein kloniert und aufgrund seiner Homologie zu *Abcb1* Sister of P-glycoprotein genannt [54]. Das murine ABCB11 transportiert Glycocholat, Taurochenodeoxycholat und Taurocholat [55-57]. Mutationen im humanen *ABCB11*-Gen, die mit der Krankheit PFIC2 (Progressive Familiäre Intrahepatische Cholestase) assoziiert sind, bestätigen seine Funktion als Gallensäuretransporter [58]. PFIC2-Patienten zeigen einen Gallerückstau (Cholestase) infolge eines defekten kanalikulären Gallensäuretransportes.

Das *Abcb11*-Gen codiert ein 160 kDa schweres Protein, welches fast ausschließlich und hoch in der Leber exprimiert wird [59]. Es konnte gezeigt werden, dass der kanalikuläre Gallensäuretransporter *Abcb11* in dem zu Gallensteinen prädisponierten Mausstamm C57L auf mRNA-Ebene 2- bis 3-fach und auf Proteinebene 3-fach stärker exprimiert wird als im resistenten Stamm AKR [60, 61].

1.6 Ziel der Arbeit

Der Gallensteinlocus *Lith 1* wurde durch die Erzeugung eines kongenen Mausstammes, der auch Gallenstein-sensitiv ist, bestätigt. Dies bietet eine solide Grundlage für die Untersuchung von Gallenstein-Kandidatengen in dieser Region auf Chromosom 2, die durch die Mikrosatellitenmarker *D2Mit182* und *D2Mit56* begrenzt wird [43].

In der vorliegenden Arbeit sollten zwei methodische Ansätze zur näheren Charakterisierung des murinen Gallensäuretransporters *Abcb11* und seiner Verifizierung als Gallenstein-Kandidatengen im Hauptlocus *Lith 1* verfolgt werden.

Es sollte die Frage untersucht werden, ob der strukturelle Unterschied von *Lith 1* zwischen den Mausstämmen im *Abcb11*-Gen liegt und dessen Transkription und Translation beeinträchtigt.

Deshalb war die cDNA von *Abcb11* zu klonieren und durch Einzelstrangkonformations-Polymorphismen (SSCP)-Analyse und Sequenzierung vergleichend zwischen dem Gallenstein-sensitiven Mausstamm C57L und dem –resistenten AKR zu analysieren.

Andernfalls sollte die Sequenzanalyse auf den Promotor ausgedehnt werden, um zu untersuchen, ob Polymorphismen in regulatorischen Bereichen eine unterschiedliche Expression des kanalikulären Gallensäuretransporters bedingen und für die erhöhte Gallensäuresekretion im Gallenstein-sensitiven Mausstamm C57L verantwortlich sind. Eine funktionelle Analyse identifizierter Polymorphismen sollte gegebenenfalls angeschlossen werden.

Parallel zum molekularen Aufklärungsansatz wurde ein physiologischer Ansatz gewählt, in dem überprüft wurde, ob eine quantitativ gesteigerte *Abcb11*-Genexpression durch das Einschleusen einer weiteren Genkopie von *Abcb11* Auswirkungen auf die hepatische Cholesterinhomöostase und die Gallensteinentstehung *in vivo* hat. Dafür sollte eine transgene Maus durch Mikroinjektion eines BACs (bakterielles artifizielles Chromosom) hergestellt und unter Fütterung einer cholesterinreichen Provokationsdiät phänotypisiert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Klonierungen

2.1.1 Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung

Um bestimmte DNA-Fragmente bzw. sie enthaltende Plasmide für die Sequenzierung oder Transformation eukaryontischer Zellen in größerem Maßstab zu gewinnen, wurden sie in *E. coli* JM83 oder One Shot Cells INV α F' (für TA-Cloning, Gibco, Eggenstein) kloniert. Die Bakterien wurden in Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium [62] unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (100 μ g/ml Ampicillin bzw. 50 μ g/ml Kanamycin) kultiviert. Stammkulturen zur längerfristigen Aufbewahrung wurden mit 15% Glycerin versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.1.2 Restriktionsverdau von DNA

DNA-Fragmente aus Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) und Plasmide wurden für Klonierungen oder analytische Zwecke nach Angaben des Enzymherstellers (New England Biolabs, Frankfurt oder Roche, Mannheim) verdaut. 0,1 bis zu 10 μ g DNA (für einen präparativen Verdau) wurden in Reaktionsvolumina von 10-50 μ l bei 37°C für 1-16 h inkubiert. Für einen doppelten Restriktionsverdau wurde das optimale Puffersystem ausgewählt und gleichzeitig für mindestens 3 h inkubiert. In problematischen Fällen wurde zunächst das eine Enzym zugegeben und nach dem Verdau bei -20°C inaktiviert, dann erfolgte der zweite Verdau.

2.1.3 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Falls das Plasmid mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, wurde die endständige 5'-Phosphatgruppe der DNA entfernt, um die Möglichkeit der Vektor-Religation zu verringern. Nach dem Restriktionsverdau und der Inaktivierung des

Restriktionsenzym durch Einfrieren des Versuchsansatzes bei -20°C wurde das linearisierte Plasmid für 1 h mit 2 U / μg DNA alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) bei 37°C dephosphoryliert. Die Reaktion wurde ebenfalls durch Einfrieren beendet.

2.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Restringierte DNA wurde zur Größenbestimmung in 1-4%-igen Agarosegelen (Roth, Karlsruhe) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Agarose wurde 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zugesetzt, um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Laufpuffer diente TBE (90 mM TRIS/Borat, 1 mM EDTA, pH 8,0), als Probenpuffer 6 % Saccharose, 0,1 mM Kresolrot. DNA-Marker (Roche, Mannheim oder Peqlab, Erlangen) wurden als Größenstandard eingesetzt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines digitalen Charged Coupled Device (CCD)-Kamera-Systems (Fluor S Multiimager, Biorad, München).

2.1.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt worden waren, wurden für die anschließende Ligation oder Sequenzierung aus dem Agarosegel isoliert. Hierzu wurde der QIA Quick Gel Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die DNA wurde am Ende von der Silikamatrix mit ddH_2O eluiert.

Für relativ schwache DNA-Banden wurde zur Erhöhung der DNA-Konzentration im Eluat der QIA Min Elute Gel Extraktions-Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

2.1.6 Quantifizierung des DNA-Gehaltes im ng-Bereich

Um geringe Mengen DNA, wie z. B. geextrahierte Fragmente, mit dem Fluorometer (Biorad, München) zu quantifizieren, wurde der Farbstoff Picogreen (Molecular Probes, Leiden, NL) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Messung wurde bei 365 nm (langes UV-Licht einer Quecksilberlampe) mit dem Probenpuffer TNE (10 mM TrisBase, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) durchgeführt. Als Standard diente λ -DNA (2 ng/ μl ; Molecular Probes, Leiden, NL).

2.1.7 DNA-Ligation

Doppelsträngige DNA-Fragmente und -Plasmide wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben ligiert. 50 ng des linearisierten Vektors und eine mindestens äquimolare Menge des geextrahierten Fragments wurden mit 1 U Ligase 4-16 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.1.8 Transformation von Bakterien

JM83 *E. coli* Bakterien wurden durch $MgCl_2$ kompetent gemacht. 50 μ l Zellen wurden mit 1-10 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch 60 sek Hitzeschock bei 42°C und anschließende Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium [62] wurden die Zellen 60 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50–200 μ l der transformierten Bakterien auf LB-Agar-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum und gegebenenfalls 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) und IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ausgestrichen und für 16-18 h bei 37°C inkubiert.

2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab dient der Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone durch anschließenden Restriktionsverdau oder Sequenzierung. Hierzu wurde eine 6 ml Bakterienflüssigkultur von einer Einzelkolonie eines Bakterienausstrichs über Nacht vermehrt und nachfolgend durch 10-minütige Zentrifugation bei 3000 U/min sedimentiert. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des QIA Prep Spin-Minipräparationskits (Qiagen, Hilden).

2.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab

Die Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab dient der Gewinnung größerer Mengen DNA zur anschließenden Transfektion eukaryontischer Zellen. Die Bakterien einer

50 ml Übernachtskultur wurden mit Hilfe des HiSpeed Plasmid Midi Prep Kits (Qiagen, Hilden) präpariert.

2.1.11 Quantifizierung des DNA-Gehaltes

Die DNA-Konzentration der Midi-Preps wurde mit Hilfe eines Photometers (Eppendorf, Hamburg) im UV-Bereich bestimmt. Eine Extinktionsmessung bei 260 nm erlaubt die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration in der Probe. Eine optische Dichte von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Mit dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} läßt sich die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren abschätzen. Eine reine DNA-Präparation hat eine Ratio von $OD_{260}/OD_{280} = 1,8 - 2,0$.

2.2 Experimentelle Sequenzanalysen

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten bis 800 bp Länge wurde eine PCR mittels *Taq* Polymerase (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. cDNA oder genomische DNA (aus Milz, Jackson Labor, Bar Harbor, USA) verschiedener Mausinzuchtstämme dienten als Matrize. cDNA wurde mittels des Superscript-Systems (Gibco, Eggenstein) aus isolierter RNA reverse transkribiert. Synthetisch hergestellte Oligonucleotide (MWG, Ebersberg) von 18 bis 24 bp Länge wurden als Primer eingesetzt.

20-100 ng DNA wurden in 20 µl Reaktionsansätzen, die neben 100-500 nM der beiden Primer, 20 mM TRIS/HCl pH 8,55, 1,5 mM $MgCl_2$, 1,6 mM $(NH_4)_2SO_4$ sowie 50-200 µM Deoxynucleosidtriphosphate und 0,4 U Polymerase enthielten, amplifiziert. Nach Denaturierung der DNA für 5 min bei 95°C schlossen sich 35 Zyklen an wie folgt: 1 min Denaturierung bei 95°C, 30 sek Annealing bei 55°C und 1 min Elongation bei 72°C; es folgte ein weiterer Elongationsschritt für 7 min bei 72°C.

Für die Amplifizierung längerer DNA-Fragmente bis 4000 bp wurde das Expand Long Template PCR System (Roche, Mannheim) genutzt. In 25 µl Reaktionsansätzen wurden

neben 20-100 ng DNA, 500 μ M Deoxynucleosidtriphosphate, 500 nM Primer, das Puffersystem 3 und 2,5 U der Expand Polymerase eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte je nach Länge des zu amplifizierenden Fragments nach Angaben des Herstellers in einer Zwei-Schritt PCR, wobei sich im zweiten Schritt die Zyklusdauer schrittweise verlängerte.

2.2.2 Genome Walking

Genome Walking ist eine Methode mit der man Fragmente von unbekanntem genomischen DNA-Sequenzen, die an bekannte Sequenzen grenzen, amplifizieren kann. Sie wurde hier benutzt, um in den 5'-Promotorbereich des *Abcb11*-Gens, ausgehend von der cDNA, weiterzuwandern. Hierzu wurde der Universal Genome Walker Kit (Clontech, Heidelberg) eingesetzt.

Zunächst wurden Genome Walker Bibliotheken, d. h. je ein Pool unklonierter genomischer DNA-Fragmente von der genomischen DNA der beiden Mausinzuchtstämme AKR/J und C57L/J mit Hilfe der Restriktionsenzyme *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* und *StuI* hergestellt. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wurden Genome Walker Adaptoren, doppelsträngige Oligonukleotide, an die Fragmente ligiert.

Nach Konstruktion der Bibliotheken konnte man durch zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen (Nested PCR) neue Fragmente amplifizieren. Es wurde das Polymerase-System Expand Long Template (s. Kap. 2.2.1) benutzt. Als Forward-Primer wurde der äußere Adapter-Primer des Kits, der an die ligierten Adaptoren bindet, als Reverse-Primer ein genspezifischer Primer (5'-ttgaagtgaccctgtgacatcctg-3'), der an die bekannte Promotor-Sequenz bindet, eingesetzt. Für das Design der genspezifischen Primer sollte eine Länge von 26-30 Nukleotiden und ein G/C-Gehalt von 40-60% gewählt werden. Die Parameter der Zwei-Schritt-PCR waren: 7 Zyklen bei 94°C, 25 sek und 70°C, 3 min; 32 Zyklen bei 94°C, 25 sek und 65°C, 3 min; ein abschließender Elongationsschritt von 7 min bei 65°C.

Die Reaktionen wurden 4-fach in H₂O verdünnt und 2 μ l davon in der zweiten Nested PCR eingesetzt. Als Forward-Primer wurde der innere Adapter-Primer, als Reverse-Primer der innere genspezifische Primer (5'-cttctgctcagaactctgtgcacac-3') eingesetzt.

Der zweite Reaktionsansatz wurde in einem 1,5%-igem Agarosegel aufgetrennt, und die Fragmente wurden anschließend geextrahiert.

2.2.3 Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen (SSCP)-Analyse

Eine kostengünstige Methode, die es erlaubt, schnell zahlreiche DNA-Proben auf Polymorphismen zu untersuchen, ist die SSCP (= Single Strand Conformation Polymorphism)-Analyse. Mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung von PCR-Fragmenten lassen sich Sequenzunterschiede zwischen Individuen oder Mausinzuchtstämmen in einem unterschiedlichen Laufverhalten der Einzelstränge in der Gelelektrophorese sichtbar machen.

Ein Aliquot der PCR-Proben (s. Kap. 2.2.1) wurde mit dem 4-fachen Volumen an Formamid und 1 Volumen Blaupuffer für 10 min bei 97°C denaturiert. Nach ihrer Abkühlung auf Eis wurden die Proben in einem 8%-igem nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (37,5% Acrylamid, 2,5% Bisacrylamid; [62]) in TBE-Puffer bei 4°C und 140-150 V für 4–5 h aufgetrennt.

Anschließend wurden die Gele folgenden Wasch- und Färbeschritten unterzogen: 2 x 5 min mit 10%-igem Ethanol waschen, 10 min mit 1%-igem HNO₃ waschen, 30 min mit Silbernitrat schütteln (Schalen dabei mit Alufolie bedecken), 4-mal mit ddH₂O waschen und anschließend mit 0,05% Formaldehyd in 0,3%-iger Na₂CO₃-Lösung färben, bis die Banden erscheinen. Die Reaktion wurde mit 10%-iger Essigsäure (10 min) gestoppt.

Die DNA-Banden wurden mit Hilfe des digitalen Fluor S Multiimager CCD-Kamera-Systems dokumentiert und die Gele über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Vakuumgeltrockner (Eppendorf, Hamburg) getrocknet.

2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger [63]. 10–100 ng geextrahierte PCR-Produkte bzw. 500 ng Plasmid-DNA wurden in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 4 µl Big Dye Terminator Reaction Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) und 0,5 µM des entsprechenden Primers in 25 Zyklen wie folgt amplifiziert: 96°C / 20 sek, 50°C / 20 sek und 60°C / 4 min.

Die Produkte wurden durch Ethanol-/Natriumacetat-Fällung gereinigt. Für die Auftrennung im automatischen Kapillar-Sequenzierer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Weiterstadt) im Polymer POP-6 wurden die Pellets in 24 µl Template Suppression Reagent gelöst und 2 min bei 95°C denaturiert.

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe der Hersteller-Software „Sequencing Analysis“ (Applied Biosystems, Weiterstadt).

2.3 *In Silico* Sequenzanalysen

2.3.1 Alignment von Sequenzen

Das Programm „Autoassembler“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) wurde genutzt, um überlappende Sequenzen im Primer Walking während der Ermittlung neuer Sequenz zu verknüpfen und um Polymorphismen zwischen Mausinzuchtstämmen zu identifizieren. Dabei wurde jede neue Sequenz mindestens zweifach in der einen Richtung und einfach in der entgegengesetzten gelesen.

2.3.2 Homologievergleich zwischen Maus und Mensch

Um Sequenzen durch einen Homologievergleich zwischen Maus und Mensch auf konservierte Bereiche zu untersuchen, wurden die On-Line Programme „Pipmaker“ (<http://bio.cse.psu.edu/pipmaker>) und „Vista“ (<http://www-gsd.lbl.gov/VISTA>) verwendet.

2.3.3 Transkriptionsfaktor-Analyse

Das On-Line Programm MatInspector 2.2, basierend auf der Transfac Database 4.0 (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html>) wurde genutzt, um potenzielle Bindungsstellen für (hepatische) Transkriptionsfaktoren in Promotor bzw. Intron 1 des *Abcb11*-Gens zu lokalisieren. Für die Identifizierung möglicher Bindungsstellen für nukleäre Rezeptoren wurde kürzlich ein neues On-Line Programm NUBIScan (<http://www.nubiscan.unibas.ch>) entwickelt [64].

2.4 Reporteragenassay

2.4.1 Eukaryontische Zellen und deren Kultivierung

HepG2-Zellen (ATCC, Wesel), eine humane, hepatische Tumorzelllinie, wurden bei 37°C in wassergesättigter Luft mit 5% CO₂ kultiviert, um sie für einen Reporteragenassay zu nutzen. DMEM/F12-Flüssigmedium (Gibco, Eggenstein) wurde 10% mykoplasmenfreies, fötales Kälberserum (Seromed, Berlin) und 1% Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml / 10 mg/ml; Cytogen, Sinn) zugegeben. Zur weiteren Kultivierung wurden konfluente Platten adhären wachsender Zellen mit PBS-Puffer (200 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und die Zellen durch Behandlung mit Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%; Cytogen, Sinn) von der Platte gelöst und durch eine 0,9 mm-Kanüle vereinzelt. Sie wurden in einer 1:2 bis 1:10-Verdünnung in frischem Medium aufgenommen.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden HepG2-Zellen in Medium mit 10% DMSO aufgenommen, in 1 ml-Aliquots für 24 h bei -70°C tiefgefroren und langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.4.2 Herstellung von Reporteragenkonstrukten

Promotor- und Intron-Fragmente unterschiedlicher Länge wurden jeweils für Sequenzen der Mausinzuchtstämme AKR/J- und C57L/J in den Luciferasevektor pGLb (Promega, Madison, USA) kloniert (s. Kap. 2.1), um die funktionelle Relevanz der identifizierten Polymorphismen im Reporteragenassay zu untersuchen. Dabei erfolgte die Klonierung der Promotorfragmente in die Multiple Cloning Site vor dem Luciferasegen, die der Intronfragmente in die zweite Cloning Site hinter dem Luciferasegen (Abb. 2-1).

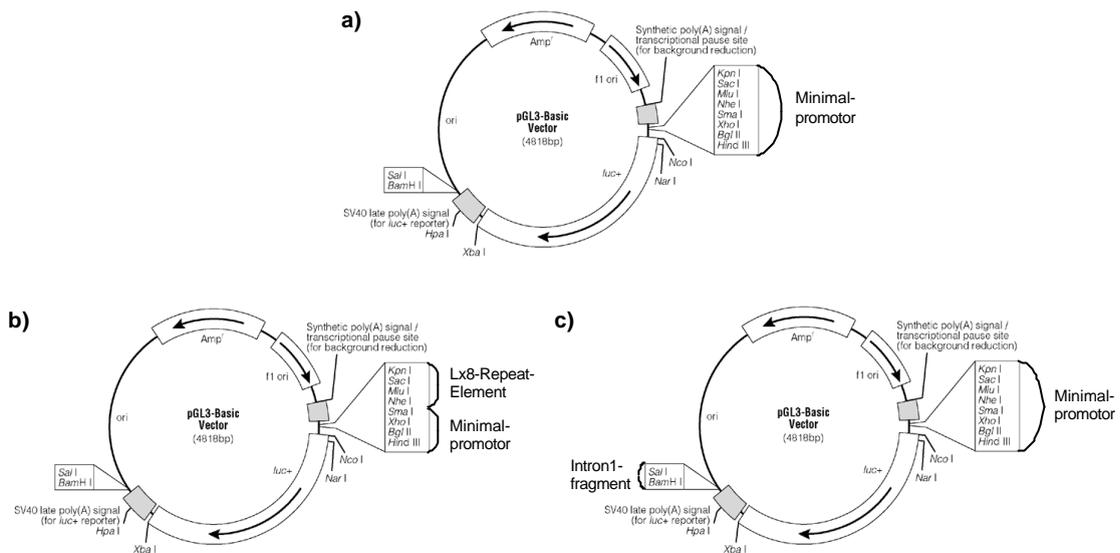


Abb. 2-1: Reportergenkonstrukte

a) Der Minimalpromotor (-376 bis +64) wurde in die Multiple Cloning Site des Luciferasevektors pGL3-Basic kloniert. b) Zur Überprüfung des Polymorphismus im Lx8-Repeat-Element (-4050 bis -3561) wurde dieses zudem vor den Promotor kloniert. c) Zur Überprüfung der Intron-Polymorphismen wurde ein Intron-Fragment (Position +2105 bis +2461 und +43 bis +3210 ab Transkriptionsstart) in die zweite Cloning Site hinter dem Luciferasegen kloniert.

2.4.3 Expressionsvektoren für Transkriptionsfaktoren

Durch Kotransfektion von HepG2-Zellen mit Expressionsvektoren, die die cDNA von Transkriptionsfaktoren enthalten, läßt sich die Luciferaseaktivität dosisabhängig stimulieren. Die Expressionsvektoren für hFXR und hRXR wurden freundlicher Weise von Dr. D. Mangelsdorf (Dallas, USA), die Vektoren für rHNF3 β und rC/EBP α von Dr. R. Costa (Chicago, USA) zur Verfügung gestellt.

2.4.4 Transiente Transfektion von HepG2-Zellen

Für eine transiente Transfektion wurden $1,4 \times 10^5$ HepG2-Zellen/well in 12-well Platten ausgesät. 16 h später wurde das DMEM/F12-Medium gegen DMEM ausgetauscht. Die Transfektion mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation erfolgte weitere 6 h später. Hierzu

wurden 1-4 μg Plasmid-DNA, 33 mM CaCl_2 und BBS (6,5 mM BES, 33 mM NaCl und 0,2 mM Na_2HPO_4) dem Medium zugegeben und vermischt. Es wurde immer eine Kotransfektion mit 37,5 pg Renillaluciferase-Plasmid pRL (Promega, Madison, USA) zur Kontrolle der Transfektionseffizienz durchgeführt. Nach 16-stündiger Inkubation wurden das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit DMEM/F12-Medium für weitere 24 h inkubiert. An dieser Stelle wurden 100 μM Gallensäuren in 0,2% Ethanol mit dem frischen Medium zugegeben, wenn eine Stimulation erfolgen sollte.

2.4.5 Reporterassay

32 h nach der transienten Transfektion von HepG2-Zellen wurde ein Dualluciferase-Assay (Promega, Madison, USA) durchgeführt, um die Transkriptionsinduktion durch die eingeschleusten Promotor- und Intron-Reportergenkonstrukte zu bestimmen. Die Zelllyse und Chemilumineszenz-Analyse erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei die Voluminaangaben auf die Hälfte reduziert werden konnten. Die Luciferaseaktivitätsmessung erfolgte am Luminometer (EG&G Berthold, Bad Wildbad).

2.4.6 Statistik

In den Abbildungen ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Dabei bezieht sich der Mittelwert in den Reporterassays auf je zwei unabhängige Versuche, die dreifach durchgeführt wurden. Es wurde ein Student's *t*-Test für zwei unabhängige Variablen durchgeführt, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen wurde.

2.5 Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

2.5.1 Herstellung von nukleären Extrakten aus Leber

Die Lebern von AKR/J und C57L/J-Inzuchtmäusen wurden unmittelbar nach deren Tötung durch Genickbruch entnommen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren bzw. bei -70°C gelagert, bis sie zur Zellkernextraktion für einen EMSA eingesetzt wurden.

Alle Extraktions- und Zentrifugationsschritte fanden auf Eis bzw. bei 4°C statt. 1/4 Mausleber wurde in Homogenisierungspuffer LHB (0,25 M Sucrose, 10 mM HEPES pH 8, 10 mM MgCl_2 , 0,1% Triton X-100, 2 mM DTT und einem Proteaseinhibitor-Gemisch aus 100 μM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin und 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin) mittels eines Teflon-Glas-Homogenisators (Heidolph, Kelheim) mit 10-15 Hüben homogenisiert. Nach Filtration des Homogenisats durch einen Mullstreifen wurde es für 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert (Beckman, München). Nachdem das Sediment in 2,5 ml LHB resuspendiert wurde, wurden 10 ml 2,1 M Saccharosekissen (in LHB) vor erneuter Zentrifugation für 80 min bei 19000 U/min in der Ultrazentrifuge (Kontron, Neufahrn) dazugegeben. Das glasige Zellkern-Sediment wurde anschließend in Kernextraktionspuffer HSB (25% Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1,5 mM MgCl_2 , 420 mM NaCl und 10 mM HEPES pH 7,6) gelöst, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und nach 30 min Inkubation 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots bei -70°C gelagert.

2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der nukleären Extrakte wurde photometrisch bei 595 nm mit Hilfe des Bradford Reagenz (Biorad, München) bestimmt [65].

2.5.3 Oligonukleotide

Einzelsträngige Oligonukleotide (siehe Tab. 2-1) wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Um doppelsträngige Oligos zu erzeugen, wurden die passenden *sense* und *antisense*- Stränge 10 min bei 95°C in Anwesenheit von 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM

NaCl und 200 μ M EDTA inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Die in Tab. 2-1 zusammengefassten Sequenzen wurden eingesetzt, um einen stammesspezifischen Unterschied hinsichtlich der identifizierten Polymorphismen zu untersuchen.

Tab. 2-1: DNA-Sequenz der Oligonukleotide für die EMSAs

Oligonukleotid	DNA-Sequenz (sense)
HNF3b-5A-AKR-s	caacaacaaaaaacttctga
HNF3b-5A-C57L-s	caacaacaaaaaaccttctca
HNF3b-TTR-costa-s	tgactaagtcaataatcagaatcagcagggttgagtcag
HNF3b-5A-nonsense-s	caggccggccgtgaagtaa

2.5.4 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA erfolgte durch Anhängen von 32 P-ATP durch die T4-Polynucleotidkinase (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers. Die radioaktiv markierten Sonden wurden über eine Sephadex-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgereinigt.

2.5.5 EMSA

Im elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assay wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren, z. B. aus nukleären Leberextrakten, an potenzielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren einer DNA-Sequenz (hier aus Intron1) überprüft.

10 μ g Kernextrakt wurden bei Raumtemperatur mit 25.000 cpm der radioaktiven Sonde in 25 mM Hepes pH 7,6, 50 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM NaEDTA, 5 mM $MgCl_2$, 10% Glycerin, 0,5 μ g/ μ l Poly(dIdC)•Poly(dIdC) und den unter Kap. 2.5.1 beschriebenen Proteinase-Inhibitoren inkubiert. Als Kontrolle für die spezifische Bindung wurde ein 200-facher Überschuss nichtmarkierter Oligonukleotide (20 pmol/Ansatz), entweder identisch mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid (spezifische Kompetition) oder einer anderen Nukleotidsequenz (unspezifische Kompetition), eingesetzt. Die Spezifität wurde außerdem durch Zugabe eines Antikörpers (Santa Cruz, Heidelberg) für den potenziell bindenden

Transkriptionsfaktor untersucht. Die Protein-DNA-Komplexe wurden in einem 6%-igen Polyacrylamid Gel [62] bei 300 V in 80 min von der ungebundenen radioaktiven Sonde getrennt. Die Banden wurden nach Trocknen des Gels durch Autoradiographie (Exposition 3-16 h) mittels des Phosphorimagers Personal FX (Biorad, München) sichtbar gemacht.

2.6 Bakterielle artifizielle Chromosomen (BACs)

2.6.1 BAC-Bibliothek

Eine BAC-Bibliothek RPCI-23 des Maus-Inzuchtstammes C57BL6/J wurde von BACPAC Resources, Roswell Park Cancer Institute, (Buffalo, USA) bezogen. Sie enthält die gesamte genomische DNA in 11,2-facher Kopienzahl im BAC-Vektor pBACe3,6 (Abb. 2-2) mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 197 kb.

Die Bibliothek wurde nach *Abcb11*-positiven BACs durchsucht, um das *Abcb11*-Gen zu sequenzieren bzw. seine Struktur aufzuklären und eine BAC-transgene Maus für *Abcb11* herstellen zu können.

2.6.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Identifizierung *Abcb11* positiver BAC-Klone wurde ein 5'- und ein 3'-Fragment des *Abcb11*-Gens mit ^{32}P -dCTP radioaktiv markiert. Hierzu wurde das Random Primer Labeling System von Gibco (Eggenstein) benutzt.

Als Ankerproben, die zur Ausrichtung des Gitters auf der Membran hilfreich sind, wurden *Overgo*-Proben nach Angaben von BACPAC Resources verwendet. Zur Markierung der Proben wurden 10 pmol zweier überlappender Oligos in Anwesenheit von 100 ng/ μl BSA, OLB-Puffer und 2 U Klenow Fragment mit ^{32}P -dCTP 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Aufreinigung wurde eine Sephadex-Säule (NucTrap Column, Stratagene, Amsterdam, NL) eingesetzt. Dabei wurde die DNA in 800 μg Lachsspermien-DNA und 400 μM NaOH aufgefangen und anschließend mit 370 μM HCl und 220 μM TrisHCl, pH 7,6 versetzt. Die Aktivität der Sonden wurde in einer Szintillationsmessung bestimmt.

2.6.3 Hybridisierung der BAC-Bibliothek

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte bei 65°C über Nacht in Church-Puffer (1% BSA, 0,5 M EDTA, 1 M NaHPO₄ pH 7,2, 20% SDS) mit einer komplexen Probe aus radioaktiv markierter Sonde und Overgo (je 1x10⁶ – 1x10⁷ cpm).

Die hybridisierten Membranen wurden nach Angaben des Herstellers gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte durch Exposition eines Phosphorscreens für 1,5 bis 3 h, wie unter Kap. 2.5.5 beschrieben.

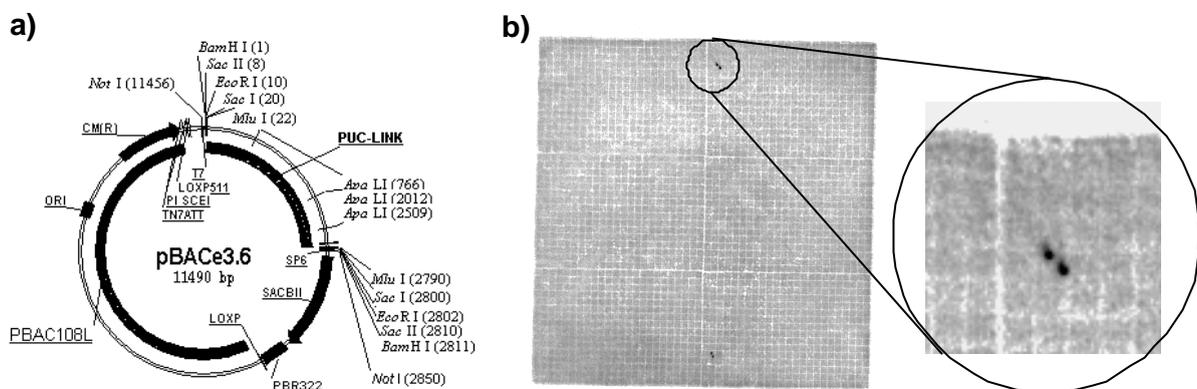


Abb. 2-1: BAC-Bibliothek RPCI-23

a) BAC-Vektor pBACe3.6, b) Positives Doppel-Signal (mit Ausschnittsvergrößerung) für einen Klon eines hybridisierten RPCI-23 Filters und seine Ausrichtung am Koordinatengitter.

2.6.4 Isolierung von BAC-DNA im kleinen Maßstab

Zur schnellen Charakterisierung der von BACPAC-Resources bezogenen Klone wurden 2 ml Übernachtskulturen von Einzelkolonien angeimpft (s. Kap. 2.1). Die BAC-DNA wurde durch alkalische Lyse isoliert [62]. Anschließend wurde eine PCR mit *Abcb11*- oder anderen genspezifischen Primern durchgeführt.

2.6.5 Isolierung und Aufreinigung von BAC-DNA im großen Maßstab

Um größere Mengen ausgewählter BAC-DNAs zur Sequenzierung oder Herstellung einer BAC-transgenen Maus zu gewinnen, wurden 500 ml Übernachtskulturen angesetzt. Diese wurden mit dem Nucleobond AX-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben präpariert und in 500 µl Injektionspuffer (10 mM TRIS/HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 30 µM Spermine, 70 µM Spermidine und 100 mM NaCl) resuspendiert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.6.6 Quantifizierung des BAC-DNA Gehaltes

Ein Aliquot der isolierten BAC-DNA wurde durch einen *NotI*-Restriktionsverdau (s. Kap. 2.1.2) linearisiert und ihre Konzentration in einem 1%-igem Agarose-Schätzgel bestimmt. Als Standard dienten verschiedene Mengen λ -DNA (10-400 ng).

2.6.7 Größenbestimmung der BAC-Inserts durch Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Charakterisierung der BACs, d. h. ihrer Größenbestimmung, sowie Überprüfung des Inserts auf interne *NotI*-Schnittstellen wurde ein *NotI*-Restriktionsverdau vorgenommen, um die Inserts vom Vektor (11.490 bp) zu trennen (s. Kap. 2.1.2). Der Verdau wurde mit 10x-Puffer versetzt (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylen Cyanol FF, Ficoll 400) und über Nacht in der PFGE (CHEF DR III, Biorad, München) aufgetrennt. Als Marker diente eine 50 kb- λ -Leiter (Promega, Madison, USA).

Das Protokoll war wie folgt: Anfangs-Switch-Zeit 10 sek, End-Switch-Zeit 50 sek bei einer Laufzeit von 15 h, 6 Volt/cm, einem Winkel von 120° und einer Temperatur von 14°C. Die Proben wurden in einem 1%-igem Agarosegel in 0,5 x TBE-Laufpuffer aufgetrennt.

Das Gel wurde nach Ablauf der 15 h in einer Ethidiumbromid-Lösung (50 µg / 100 ml H₂O) für 20 min gefärbt und dokumentiert (s. Kap. 2.1.4).

2.6.8 BAC-DNA-Sequenzierung

80-1000 ng BAC-DNA wurden für 30 min bei 60°C inkubiert. Dann wurden sie in einem 40 µl Reaktionsansatz mit 12 µl Big Dye Terminator Reaction Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt) und 0,5 µM des entsprechenden Primers bei 95°C für 5 min denaturiert und in 100 Zyklen wie folgt amplifiziert: 95°C / 30 sek, 50°C / 20 sek und 60°C / 4 min.

Die Produkte wurden über Centrisep-Säulen (Princeton Separations, emp Biotech, Berlin) gereinigt. Die Auftrennung im Kapillar-Sequenzierer ist in Kap. 2.2.4 dargestellt.

2.7 *Abcb11* BAC-transgene Maus

2.7.1 Mikroinjektionen von Maus-Embryonen zur Erzeugung einer BAC-transgenen Maus

In Zusammenarbeit mit dem Jackson Labor, Bar Harbor, USA (Dr. B. Paigen) wurde eine BAC-transgene Maus für *Abcb11* hergestellt. Nach Identifizierung und Isolierung des *Abcb11*-positiven Klons RP23-291P1 (s. Kap. 2.6), wurde die BAC-DNA im Jackson Labor nach Standardprotokollen [66] mikroinjiziert.

Um eine ausreichende Anzahl präimplantierter Embryonen (Einzell-Stadium vor der Kernverschmelzung) für die Mikroinjektion zu gewinnen, wurden je Injektionsrunde 10-20 Weibchen der Inzuchtstämme AKR/J, CBA/J und 129S1/SvImJ superovuliert. Dazu wurden die Mäuse mit PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) intraperitoneal injiziert. 24 h später erfolgte eine Injektion mit hCG (human Chorionic Gonadotropin) und die anschließende Verpaarung der Weibchen mit Männchen des entsprechenden Inzuchtstammes.

48 h später wurden die trächtigen Weibchen getötet, um die fertilisierten Eizellen zu gewinnen. Die BAC-DNA wurde nach Abtrennen der Embryonen von den Cumuluszellen in einen Pronukleus mikroinjiziert. Anschließend wurden je 15 bis 30 der injizierten Embryonen unter Narkose in die beiden Eileiter scheinträchtiger F₁-Empfängerweibchen des Hybridstammes (C57BL6/J x Balb/cByJ) F₁ transferiert. Die Empfängerweibchen wurden durch Verpaarung mit vasktomierten Männchen scheinträchtig.

Der Maus-Inzuchtstamm 129S1/SvImJ erwies sich als der für Superovulation, Lebensfähigkeit der Embryonen und Verträglichkeit mit dem Empfängerstamm als der geeignetste und lieferte zwei transgene Founder-Mäuse. Auf sie begründen sich die beiden BAC-transgenen Linien 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1flp* und 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)2flp*. Der Name eines BAC-transgenen Mausstammes setzt sich zusammen aus dem Stamm, in den injiziert wurde, dem offiziellen Namen des BAC-Klons und einer Nummer, die die Linie identifiziert sowie einem Kürzel der Experimentatoren.

2.7.2 Versuchstiere und Haltung

Die beiden BAC-transgenen Founder-Mäuse wurden mit 129S1/SvImJ-Inzuchtmäusen verpaart, um zwei hemizygote Linien zu etablieren. Die Mäuse wurden in Temperaturkontrollierten Räumen (22-23°C) bei einem 12-stündigen Licht-Dunkel-Zyklus in Gemeinschaftskäfigen mit bis maximal 5 Tieren gehalten. Futter (Zuchtdiät 1314 Ratte/Maus, Altromin, Lage) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Nach dem Abstillen erhielten alle Nachkommen Ohrmarkierungen und wurden anschließend genotypisiert. Alle Tierversuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Regierungspräsidium Köln begutachtet und genehmigt.

2.7.3 DNA-Isolierung

Für die Bestimmung transgener Mäuse mittels PCR wurde DNA aus Mausschwänzen isoliert. Hierzu wurden 3-4 mm des Schwanzes abgetrennt und die DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA wurde in 2 x 100 µl Elutionspuffer eluiert.

2.7.4 Identifizierung transgener Mäuse

In der PCR zur Identifizierung des Transgens wurden zwei Primerpaare eingesetzt, die beide Enden des BACs RP23-291P1 erkennen. Ein BAC-spezifischer Primer (T7 und SP6) wurde jeweils mit einem Insert-spezifischen Primer gepaart (Tab. 2-2).

2 µl isolierter Schwanz-DNA wurden in 25 µl Reaktionsansätzen amplifiziert. Diese enthielten neben 200 nM der beiden Primer, 20 mM Tris/HCl, pH 8,55, 1,5 mM MgCl₂, 1,6 mM (NH₄)₂SO₄ sowie 200 µM Deoxynucleosidtriphosphate und 1 U Polymerase. Nachdem die DNA 5 min bei 95°C denaturiert wurde, folgten 35 PCR-Zyklen, bestehend aus: 30 sek Denaturierung bei 95°C, 1 min Annealing bei 52°C und 30 sek Elongation bei 72°C; es schloss sich ein weiterer Elongationsschritt für 10 min bei 72°C an.

Die Analyse erfolgte durch Auftrennung der Fragmente im 1,5%-igen Agarosegel (s. Kap. 2.1.4).

Tab. 2-1: DNA-Sequenzen der Primer für die Genotypisierung BAC-transgener Mäuse

Primer	DNA-Sequenz (5'-3')	Amplikonlänge (bp)
T7	taatacgactcactataggg	367
BacEnd30rp3	ctgggtgcacgggccatcttg	
SP6	gtcgacatttagtgacactatag	290
BacEnd30rp2	cccattcagaccagctgagagc	

2.7.5 Southern Blot zur Untersuchung des integrierten BACs

Zur Integritätsbestimmung des BACs in den transgenen Linien wurde ein Southern Blot durchgeführt. Durch Hybridisierung der mit *HindIII* verdauten DNA mit 3 Sonden, die die gesamte cDNA abdecken (5': -129 bis +66, Mitte: +24 bis +3916, 3': +3788 bis 4788), konnte anhand eines identischen Bandenmusters mit dem BAC bzw. der 129S1-Wildtyp-DNA die Integrität des *Abcb11*-Gens überprüft werden.

Parallel dazu wurde die BAC-Kopienzahl in den transgenen Linien bestimmt. Dazu wurde neben den DNAs transgener Mäuse 129S1-DNA allein bzw. mit 1, 3 und 5 zusätzlichen Kopien des BACs auf das 0,7%ige Agarosegel aufgetragen.

Der Southern Blot wurde nach Sambrook et al. [62] durchgeführt. Nach 3-stündiger gelelektrophoretischer Auftrennung von 10 µg verdauter und NaAc/Ethanol-gefällter DNA/Bande bei 75 V wurde die DNA im „Upward“-Blot-Verfahren über Nacht in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M NaCitrat) auf eine Nylon-Membran (Dupont NEN, Bad Homburg) geblottet.

Die im UV-Stratalinker (Stratagene, Amsterdam, NL) fixierte Membran wurde nach 1-stündiger Prähybridisierung mit Slurp-Lösung (0,2 mM Dextransulfat, 40% Formaldehyd, 4 x SSC, 1,6% 50 x Denhardt's Lösung – 0,025 mM Ficoll, 0,25 mM Polyvinylpyrrolidone, 0,14 M BSA – 10 mg DNA, 7 mM Tris/HCl, pH 7,4) über Nacht bei 42°C mit 10^9 cpm/ μ g hybridisiert. Die Sonden wurden entsprechend Kap. 2.6.2 radioaktiv markiert.

Die Membran wurde 30 min bei 42°C mit 1 x SSC, 0,1% SDS, 15 min bei 42°C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS, 15 min bei 61,5°C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS und 15 min bei 68°C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS gewaschen, bevor sie über Nacht einem Phosphorscreen exponiert wurde.

2.7.6 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus Leber für eine Northern Hybridisierung dient der Analyse der Gen-Expression. Gesamt-RNA wurde mittels des RNA Ultraspec Reagenz (Biotecx, Texas, USA) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll isoliert und in 150 μ l DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration wurde mit einem Photometer bestimmt. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht 40 μ g/ml einzelsträngiger RNA.

2.7.7 Northern Blot zur Untersuchung der *Abcb11*-Expression

Je 20 μ g Gesamt-RNA/Bande wurden in einem denaturierendem Gel (1% Agarose, 0,67% Formaldehyd in 10 x MOPS: 0,2 M MOPS, 0,05 M NaAcetat, 0,01 M Di-Natrium EDTA) nach Sambrook et al. [62] aufgetrennt. Das Gel wurde 30 min in 50 mM NaOH denaturiert, in H₂O gewaschen und 2 mal 15 min in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5 neutralisiert. Nach 5 minütiger Inkubation des Gels in 20 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M NaCitrat) wurde die RNA im „Upward“-Blot-Verfahren über Nacht in 20 x SSC auf eine Nylon-Membran (Dupont NEN, Bad Homburg) geblottet.

Die im UV-Stratalinker (Stratagene, Amsterdam, NL) fixierte Membran wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8 mit 0,1% SDS, 1 M NaCl und 1 mM EDTA gebadet. Nachdem die Membran für 1 h bei 42°C mit Slurp-Lösung (s. o.) inkubiert wurde, wurde sie mit einem ³²P-dCTP markierten 3'-Fragment der *Abcb11*-cDNA (s. Kap. 2.6.2 und 2.7.5.) über Nacht bei 42°C hybridisiert.

Nach 30-minütigem Waschen bei 42°C mit 1x SSC, 0,1% SDS, 15-minütigem Waschen bei 42°C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS und 15-minütigem Waschen bei 61,5°C mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS wurde die Membran über Nacht einem Phosphorscreen exponiert.

2.7.8 Densitometrische Quantifizierung von Northern und Southern Blots

Die hybridisierten Sonden auf den Northern bzw. Southern Blots wurden durch 2 mal 15-minütiges Waschen mit 0,05x SSC, 0,01 M EDTA und 0,1% SDS bei 90°C entfernt. Anschließend wurden die Blots zur Ladungskontrolle mit Ubiquitin hybridisiert.

Die Banden wurden durch das digitale Fluor S Multiimager CCD-Kamera-System eingelesen und mit Hilfe des Densitometrie-Programms Quantity One (Biorad, München) analysiert. Die Ergebnisse stellen den Quotienten aus Probe und mittlerer Bande der Ubiquitin-Kontrolle dar.

2.8 Induktion der Gallensteinentstehung

2.8.1 Lithogene Provokationsdiät

Um einen Effekt des Transgens auf die Gallensteinentstehung zu untersuchen, wurden 6 bis 8 Wochen alte BAC-transgene Mäuse, sowie ihre nicht-transgenen Geschwister als Kontrolltiere, mit einer *lithogenen*, d. h. einer cholesterin- und fettreichen sowie cholsäurehaltigen Diät gefüttert. Diese enthielt 1,25% Cholesterin, 17,32% Butterfett, 0,5% Cholsäure, 0,98% Maisöl, 48,81% Saccharose, 19,33% Kasein sowie Vitamine und Mineralien. Die Fütterung erfolgte in Gruppen zu je 4 männlichen und 4 weiblichen transgenen Mäusen der Linie 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)*1flp, je 4 männlichen und 4 weiblichen transgenen Mäusen der Linie 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)*2flp und je 8 männlichen und 8 weiblichen Kontrolltieren über einen Zeitraum von 0, 2, 4 und 8 Wochen.

2.8.2 Phänotypisierung

Nach Fütterung der lithogenen Provokationsdiät wurden die Mäuse mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden) betäubt und durch Genickbruch getötet. 100-300 μl Blut wurden durch Kardiozentese gewonnen. Das Blut wurde 30 min bei 4°C und 15.000 U/min zentrifugiert und das Serum bei -70°C gelagert. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurden Leber und Milz entnommen. Die Leber wurde gewogen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bis sie zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert wurde. Nach Entnahme der Gallenblase unter Ligatur des Ductus cysticus wurde diese zur Volumenbestimmung unter der Annahme, dass die Gallenflüssigkeit eine Dichte von 1 g/ml hat, auf einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen) gewogen. Anschließend wurde die Gallenblase geöffnet und die Galle auf einem Objektträger zur mikroskopischen Untersuchung (im Polarisationslicht) ausgestrichen.

Es wurde eine semiquantitative Dokumentation des Mucins und der Cholesterin-Lipid-Komplexe nach kleinen Flüssigkristallen, aggregierten Flüssigkristallen, fusionierten Flüssigkristallen, Cholesterin-Monohydratkristallen, Cholesterin-Nadeln, aggregierten Monohydratkristallen und sandigen Steinen von 0 bis 4 vorgenommen. Außerdem wurde die Anzahl der echten Gallensteine bestimmt. Mittelwerte \pm SEM wurden berechnet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Student's-*t*-Tests überprüft, wobei ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen wurde.

Mucin ist im Durchlicht als amorphe, filamentöse Struktur zu sehen. Kleine Flüssigkristalle (unilamellare Cholesterin-Phospholipid-Vesikel) sind im Durchlicht als Tröpfchen mit etwa 5 μm Durchmesser zu erkennen. Diese können sich zu aggregierten Flüssigkristallen zusammenlagern. Bei fusionierten Flüssigkristallen handelt es sich um multilamellare Vesikel, deren Durchmesser von 2,5 bis 15 μm variieren. Im Polarisationslicht sind die fusionierten Flüssigkristalle doppelbrechend und zeigen eine Malteserkreuz-artige Struktur. Cholesterin-Monohydratkristalle sind flache Parallelogramme mit einer Kantenlänge von 10 bis 150 μm , die im Polarisationslicht doppelbrechend erscheinen. Die Winkel der Ecken, die häufig abgebrochen sind, betragen typischerweise 79° und 101° . Cholesterin-Nadeln sind im Polarisationslicht doppelbrechende nadelförmige Cholesterinkristalle, die aus wasserfreien Cholesterinkristallen bestehen [67]. Cholesterin-Monohydratkristalle können auch zu größeren Formationen aggregieren. Wenn sie mit Mucingel Agglomerate bilden,

entstehen sandige Steine mit unregelmäßiger Oberfläche, aus der Cholesterin-Monohydratkristalle herausragen. Sandige Steine erscheinen unter dem Mikroskop gelb bis braun und haben einen Durchmesser von 0,1 bis 0,4 mm. Echte Gallensteine sind harte, kugelförmige Objekte mit weiß-gelblicher Farbe und glatter Oberfläche. Im Durchlicht unter dem Mikroskop sind sie undurchsichtig und braun-schwarz. Sie haben einen Durchmesser von 0,3 bis 1,2 mm.

2.8.3 Infrarotspektroskopie zur Analyse der Gallensteinzusammensetzung

Die Gallensteine wurden im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen (Prof. Dr. Gressner) mittels Infrarotspektroskopie nach Hesse et al. [68] auf ihre Bestandteile untersucht. Hierzu wurden die Gallensteine in einem Achatmörser zerrieben und mit KBr bei 8 t/cm zu Pellets gepresst. Infrarotspektren einer Wellenlänge von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} wurden aufgenommen und rechnergestützt mit einem Standardspektrum von Cholesterin verglichen [69].

3 ERGEBNISSE

3.1 Molekulare Analyse des Gallensäuretransporter-Gens *Abcb11*

Kartierungsexperimente zeigten, dass der kanalikuläre Gallensäuretransporter der Leber (*Abcb11*) mit dem Gallensteinlocus *Lith 1* kolokalisiert [27, 43]. Darüber hinaus wird *Abcb11* in Gallenstein-sensitiven (C57L) und -resistenten (AKR) Mäusen auf mRNA- und Proteinebene differenziell exprimiert [60, 61]. Die strukturelle Ursache hierfür ist nicht bekannt und sollte durch eine molekulare Analyse des *Abcb11*-Gens untersucht werden.

3.1.1 Ermittlung der *Abcb11*-Sequenz und Genstruktur

Zu Beginn der Untersuchungen waren lediglich Fragmente der murinen cDNA-Sequenz bekannt. Kenntnis der cDNA-Sequenz und der Genstruktur von *Abcb11* sind aber für weiterführende, molekulare Vergleichsanalysen zwischen Mausinzuchtstämmen (Intraspezies-Vergleich) bzw. zwischen Maus und Mensch (Interspezies-Vergleich) unabdingbar. Deshalb wurden ein 3893 bp langes cDNA-Fragment sowie ein überlappendes 1001 bp langes Fragment am 3'-cDNA-Ende amplifiziert und nach Klonierung in den Vektor pBluescript SK⁻ sequenziert. Am 5'-Ende wurde ein überlappendes 195 bp langes Fragment von genomischer DNA kloniert, um den nicht genau definierten Transkriptionsstart einzuschließen. Mit Hilfe der Methode des Primerwalkings auf diesen Klonen wurde so die cDNA-Sequenz vervollständigt. Sie ist identisch mit der zwischenzeitlich veröffentlichten *Abcb11*-cDNA Sequenz (Genbank # NM_021022) mit Ausnahme eines Guanins an Position +1784 anstelle eines Adenins.

Ausgehend von der cDNA wurde mittels der erfolgreichen Anwendung von Genome Walking, d. h. Adapter ligierter PCR (s. Kap. 2.2.2), in zwei Schritten Sequenzinformation im unbekanntem genomischen 5'-Bereich bis -1785 bp erzeugt und in der Genbank deponiert (#AF303740).

Daneben wurde die BAC (Bakterielles Artifizielles Chromosom)-Bibliothek RPCI-23 des Mausinzuchtstammes C57BL/6J nach Klonen durchsucht, die das vollständige *Abcb11*-Gen

enthalten. Die 10 Membranen der Bibliothek wurden jeweils mit radioaktiv markierten Sonden vom 5'-Ende des ermittelten Promotors (bp -1766 bis -1431) und der 3'-UTR der cDNA (bp +4446 bis +4729) hybridisiert. Dabei wurden 14 *Abcb11*-positive Klone identifiziert. Nach Isolation der BAC-DNA aus Bakterien-Flüssigkulturen wurde die Größe der detektierten *Abcb11*-positiven Klone durch einen Restriktionsverdau und anschließende Analyse der BAC-Inserts in der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) bestimmt (Abb. 3-1). Durch Etablierung der direkten BAC-Sequenzierung wurde der genomische 5'-Bereich von *Abcb11* schrittweise bis -5485 bp sequenziert.

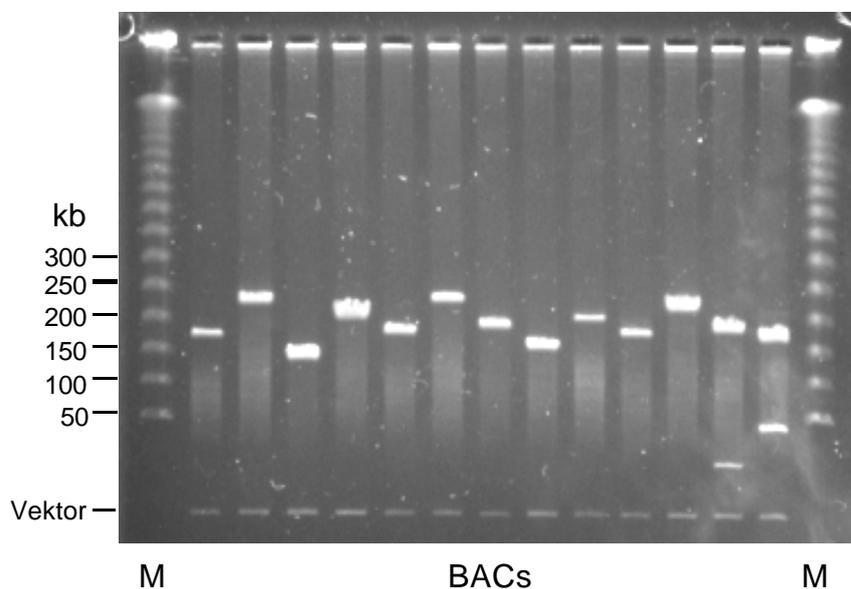


Abb. 3-1: Größenbestimmung der BAC-Klone in der PFGE

Auftrennung von 10 μ l BAC-DNA in einem 1%-igem Agarosegel. Als Größenstandard (M) diente eine 50 kb- λ -Leiter.

Während der fortschreitenden eigenen Sequenzierungen wurde ein Antrag zur Sequenzierung des kompletten *Abcb11*-positiven BACs RP23-291P1 bei der *Trans NIH Mouse Initiative* (<http://www.nih.gov/science/models/mouse>) gestellt und bewilligt. Hierbei handelt es sich um ein Programm zur Sequenzierung von DNA-Regionen mit hoher biomedizinischer Bedeutung in Modellorganismen, welches Teil des öffentlichen Maus-Genomprojektes ist.

Ein Vergleich der cDNA und der von der *Trans NIH Mouse Initiative* erzeugten genomischen Sequenz von *Abcb11* ermöglichte dann die vollständige Bestimmung der Genstruktur mit ihren Exon-Intron-Grenzen (Abb. 3-2). Das *Abcb11*-Gen der Maus ist 104.322 bp lang. Die Größen der 28 Exons betragen 22 bp bis 1.003 bp (Exon 28, inklusive 3'UTR), die der Introns von 91 bis 15.285 bp. Das Translationsstart-Codon befindet sich in Exon 2 an Position +99 vom Transkriptionsstart (nach R. Green [56]), das Translationsstop-Codon in Exon 28 an Position +4064. Daraus ergibt sich ein 3.966 bp großer offener Leserahmen in der 4.866 bp langen cDNA.

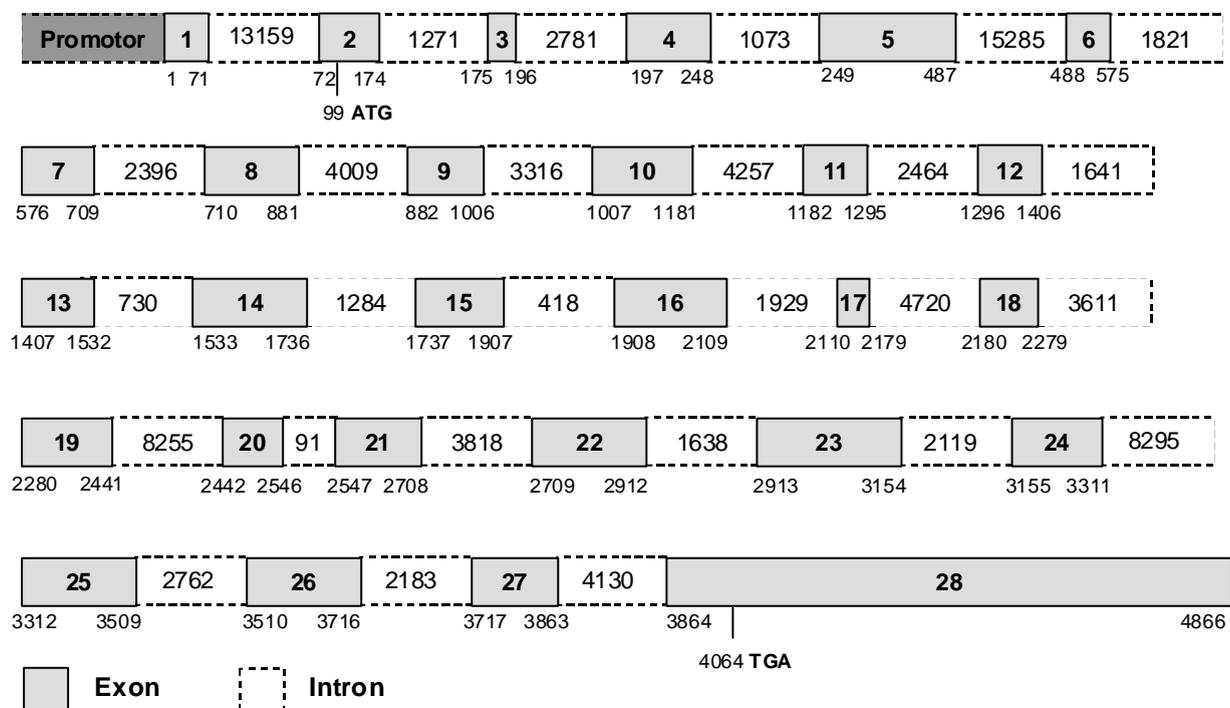


Abb. 3-2: Schematische Darstellung der Struktur des *Abcb11*-Gens

Exon-Intron-Grenzen wurden durch ein Alignment der cDNA mit der genomischen DNA (BAC Klon RP23-291P1) bestimmt. In den Exons ist deren Nummerierung von 1 bis 28 angegeben, in den Introns deren Länge in bp. Unterhalb der Exons befindet sich ihre Start- und Endposition ab Transkriptionsstart auf cDNA-Ebene.

3.1.2 Identifizierung unbekannter Exons im Intron 1

Durch den Vergleich der *Abcb11*-Genstruktur mit der anderer Abc-Transporter, insbesondere *Abca1* [70] stellte sich die Frage nach weiteren unbekanntem Exons außerhalb der veröffentlichten cDNA-Sequenz. Ein Alignment der cDNA-Sequenz von *Abcb11* der Ratte mit der Sequenz der Maus ergab eine 90%ige Übereinstimmung von bp 15 bis 87 der Ratte mit bp 2 bis 74 der Maus (entsprechend Exon 1) und bp 263 bis 5.035 der Ratte mit bp 99 bis 4.859 der Maus (entsprechend Exon 2 ab dem Translationsstart). Die Basenpaare 93 bis 151 der Ratte ergaben im Alignment mit der genomischen Maus-Sequenz des BACs RP23-291P1 eine Übereinstimmung zu Position +12.846 bis +12.941 im ersten Intron. Die Existenz dieses zusätzlichen Exons (1z) wurde mittels PCR von cDNA überprüft. Die anschließende Sequenzierung der amplifizierten Bande ergab eine tatsächliche Länge von 156 bp (Position +12.833 bis +12.988) und ein weiteres Exon (1y) von +12.065 bis +12.139. In weiteren PCRs konnten Amplifikate erzeugt werden, die eine Verbindung von Exon 1 nach 1y, nach 1z und 2, aber auch solche, die sich von Exon 1 direkt nach 1z, bzw. von 1y nach 2 erstrecken.

3.1.3 Vergleichende Sequenzanalyse des *Abcb11*-Gens zwischen Gallenstein-sensitiven (C57L) und -resistenten (AKR) Mäusen

Mehrere QTL-Analysen weisen auf einen strukturellen Unterschied im *Lith 1*-Locus, in dem sich das Kandidatengen *Abcb11* befindet, zwischen den beiden Mausinzuchtstämmen C57L und AKR hin [27], (Beverly Paigen unveröffentlichte Ergebnisse). Die *Abcb11*-Sequenz sollte daher vergleichend zwischen C57L und AKR analysiert werden, um das Gen nach möglichen Mutationen zu untersuchen, die für die Entstehung von Gallensteinen im sensitiven Stamm C57L ursächlich sein könnten. Die Sequenzierung von je drei unabhängig voneinander erzeugten cDNAs ergab, dass die cDNA der beiden Stämme identisch ist.

Deshalb wurde der Vergleich im Folgenden auf regulatorische Bereiche ausgedehnt, die die differenzielle Phospholipidsekretion bedingen könnten. Zur Regulation des *Abcb11*-Gens war inzwischen nur bekannt, dass es über den Farnesoid-X-Rezeptor FXR, der als Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor RXR an ein IR1 (*Inverted Repeat*)-Element bindet, aktiviert wird [71-73]. FXR (offizielles Gensymbol *Nr1h4*) und RXR (offizielles

Gensymbol *Nr2b1*) gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren. Vor kurzem wurde gezeigt, dass Gallensäuren ihre eigene Biosynthese und ihren Transport durch Bindung und Aktivierung an FXR regulieren [74, 75]. Das IR1-Bindungselement, bestehend aus zwei invertierten Hexamerwiederholungen, die durch ein Basenpaar separiert werden, wurde bei –92 bis –80 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart identifiziert. Es unterscheidet sich aber, wie auch der Rest des Minimalpromotors, nicht zwischen AKR und C57L.

Eine weitere Ausdehnung des Sequenzvergleichs auf nicht-codierende Regionen könnte auf zusätzliche regulatorische Bereiche hinweisen. Während die Analyse der distalen Introns 26 und 27 keinen Unterschied ergab, wurde in der 5'-flankierenden Region des Gens durch Einzelstrangkonnformations-Polymorphismen (SSCP)-Analyse ein Polymorphismus detektiert. Dieser wurde durch Sequenzierung bei –3.757 als Cytosin/Thymidin-Transition im Gallenstein-sensitiven Stamm C57L verifiziert (Abb. 3-3, Tab. 3-1). Er liegt in einem Repeat-Element (Lx8), einem LINE1-Fragment rekombinativen Ursprungs. LINEs (*Long Interspersed Repeats*) sind Pseudogene oder Pseudogenfragmente von Wiederholungssequenzen, die in großer Zahl im Genom vorkommen [76]. Für andere Gene wurde gezeigt, dass sie eine regulatorische Funktion haben können [77, 78].

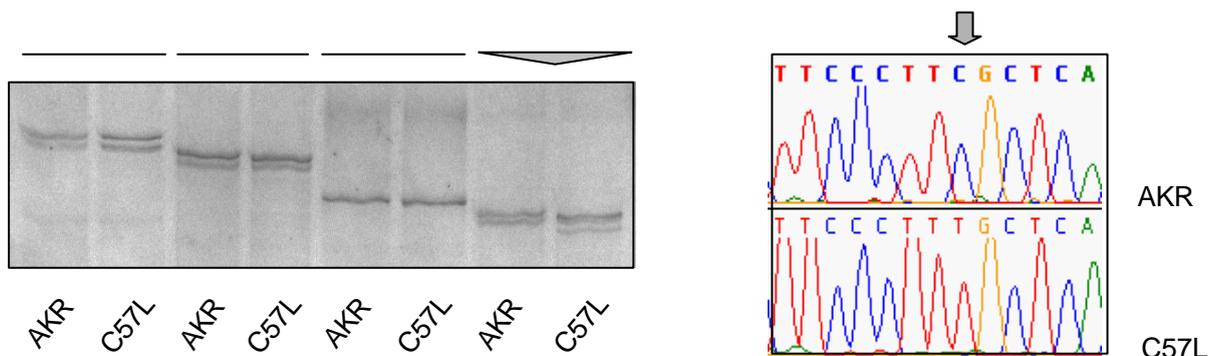


Abb. 3-1: Detektion des Polymorphismus zwischen AKR und C57L im 5'-Bereich des *Abcb11*-Gens

a) SSCP-Analyse: In einem 6%-igen Polyacrylamidgel wurden jeweils stammesspezifische, identische PCR-Fragmente von AKR und C57L nach deren Denaturierung nebeneinander aufgetragen. b) Positive Ergebnisse aus der SSCP-Analyse wurden durch vergleichende Sequenzierung zwischen AKR und C57L überprüft und die Position des Polymorphismus bestimmt.

Die vergleichende Sequenzierung zwischen AKR und C57L des ersten Introns von *Abcb11* ergab 19 Einzelnukleotid-Austausche sowie eine 5 bp-Insertion und eine 3 bp-Deletion in der Gallenstein-sensitiven Maus (Tab. 3-1). Die Insertion und Deletion sowie zwei weitere Einzelnukleotid-Austausche befinden sich in einem Mikrosatelliten der (CAAAA)_n-Familie. In anderen Genen konnte ein quantitativer Effekt solcher kurzer Wiederholungssequenzen auf den Phänotyp nachgewiesen werden [79]. Es konnten keine Polymorphismen zwischen AKR und C57L in den im Intron 1 liegenden Exons 1y und 1z (s.Kap. 3.1.2) detektiert werden.

Tab. 3-1: *Abcb11*-Polymorphismen im 5'-Bereich und Intron 1 zwischen AKR- und C57L-Mäusen

Die Nummerierung bezieht sich auf den Stamm C57L, dessen Sequenz mit der veröffentlichten genomischen Sequenz von C57BL6/J (BAC RP23-291P1) in den untersuchten Bereichen identisch ist. Die Charakterisierung der Polymorphismen nimmt den Stamm C57L (Phänotyp Gallensteine) als den gegenüber AKR veränderten an.

Position ab Transkriptionsstart	Region	Position ab Start Intron1	C57L	AKR	Polymorphismus
-3757	5'-Region	-	T	C	Transition
373	Intron1	302	A	G	Transition
1531	Intron1	1460	A	C	Transversion
1554	Intron1	1483	G	-	G-Insertion
2213-2217	Intron1	2142-2146	AAAAC	-	AAAAC-Insertion
2239	Intron1	2168	A	C	Transversion
2241/2242	Intron1	2170/2171	C	CAA	CAA-Deletion
2245	Intron1	2174	C	A	Transversion
2251	Intron1	2180	C	G	Transversion
2284	Intron1	2213	G	A	Transition
2355	Intron1	2284	G	A	Transition
2374	Intron1	2303	A	G	Transition
2405	Intron1	2334	G	T	Transversion
2804/2805	Intron1	2733/2734	-	T	T-Insertion
2858	Intron1	2787	T	C	Transition
2864	Intron1	2793	C	T	Transition
2883	Intron1	2812	C	T	Transition
2909	Intron1	2838	C	A	Transversion
3118	Intron1	3047	T	C	Transition
3305/3306	Intron1	3234/3235	-	G	G-Deletion
3313	Intron1	3242	C	-	C-Insertion
3315	Intron1	3244	A	C	Transversion

3.1.4 Haplotyp-Analyse der *Abcb11*-Polymorphismen in Gallenstein-sensitiven und -resistenten Mausinzuchtstämmen

Die identifizierten Polymorphismen wurden bei verschiedenen Mausinzuchtstämmen, deren Gallensteinprädisposition bekannt ist, hinsichtlich einer Korrelation der Polymorphismen mit der Prädisposition untersucht. Dabei wurden der 5'-Polymorphismus im Lx8-Element und ein Fragment des Introns (Mikrosatellit, s. Kap. 3.1.3) berücksichtigt.

Die Sequenzierung ergab eine gute Korrelation der Haplotypen mit der Anzahl echter Gallensteine. Der Stamm 129S1 ist Gallenstein-resistent, entspricht aber dem Haplotyp von C57L. Wird die Anzahl der sandigen Steine berücksichtigt, entfällt die Assoziation für die Stämme Cast/Ei und DBA/2J.

Tab. 3-2: Analyse der Polymorphismen im 5'-Bereich und Intron1 zwischen Mausinzuchtstämmen

Aufgelistet sind verschiedene Mausinzuchtstämmen in ihrer Rangfolge von einer hohen Anzahl echter Gallensteine zu einer niedrigen Anzahl. Der Phänotyp Gallensteine, entsprechend C57L, ist grau unterlegt. Für die Stämme 129P3 und 129X1 sind keine Prädispositionen bekannt. Die Daten sind der *Phenome Database* (<http://aretha.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rtn=docs/home>) entommen. n.b. = nicht bestimmt.

Mausstamm	Lx8 wie:	Intron1 wie:	Anzahl echter Gallensteine Männchen	Anzahl echter Gallensteine Weibchen	Anzahl echter Gallensteine gesamt
C3H/HeJ	C57L	C57L	5,20	0,00	1,90
C57BL/6J	C57L	C57L	2,50	0,00	0,94
C57L/J	C57L	C57L	0,80	0,10	0,45
DBA/2J	C57L	C57L	0,00	0,30	0,16
BALB/cJ	C57L	C57L	0,10	0,10	0,10
129P3/J	C57L	C57L	n.b.	n.b.	n.b.
129S1/SvImJ	C57L	C57L	0,00	0,20	0,10
129X1/SvJ	AKR	AKR	n.b.	n.b.	n.b.
A/J	AKR	AKR	0,00	0,60	0,30
SPRET/Ei	AKR	AKR	0,00	0,00	0,00
FVB/NJ	AKR	AKR	0,00	0,00	0,00
Cast/Ei	AKR	AKR	0,00	0,00	0,00
AKR/J	AKR	AKR	0,00	0,00	0,00

3.1.5 Vergleichende Sequenzanalyse des *Abcb11*-Gens zwischen Maus und Mensch

Die genomische *Abcb11*-Sequenz sollte vergleichend zwischen Maus und Mensch analysiert werden. Da während der Evolution konservierte nicht-codierende Bereiche (CNS = Conserved Non-coding Sequences) auf eine mögliche regulatorische Bedeutung hinweisen [80, 81], könnte ein Inter-Speziesvergleich neben dem Intra-Speziesvergleich zwischen AKR und C57L weitere wertvolle Informationen liefern.

Die Analyse wurde mittels Vista und Pipmaker Software durchgeführt (s.Kap.2.3.2). Sie ergab einen homologen Bereich in der Promotorregion. Des Weiteren wurden zwei längere Bereiche im Intron 1 sowie zusätzliche in anderen Introns und im 3'-Bereich des Gens identifiziert.

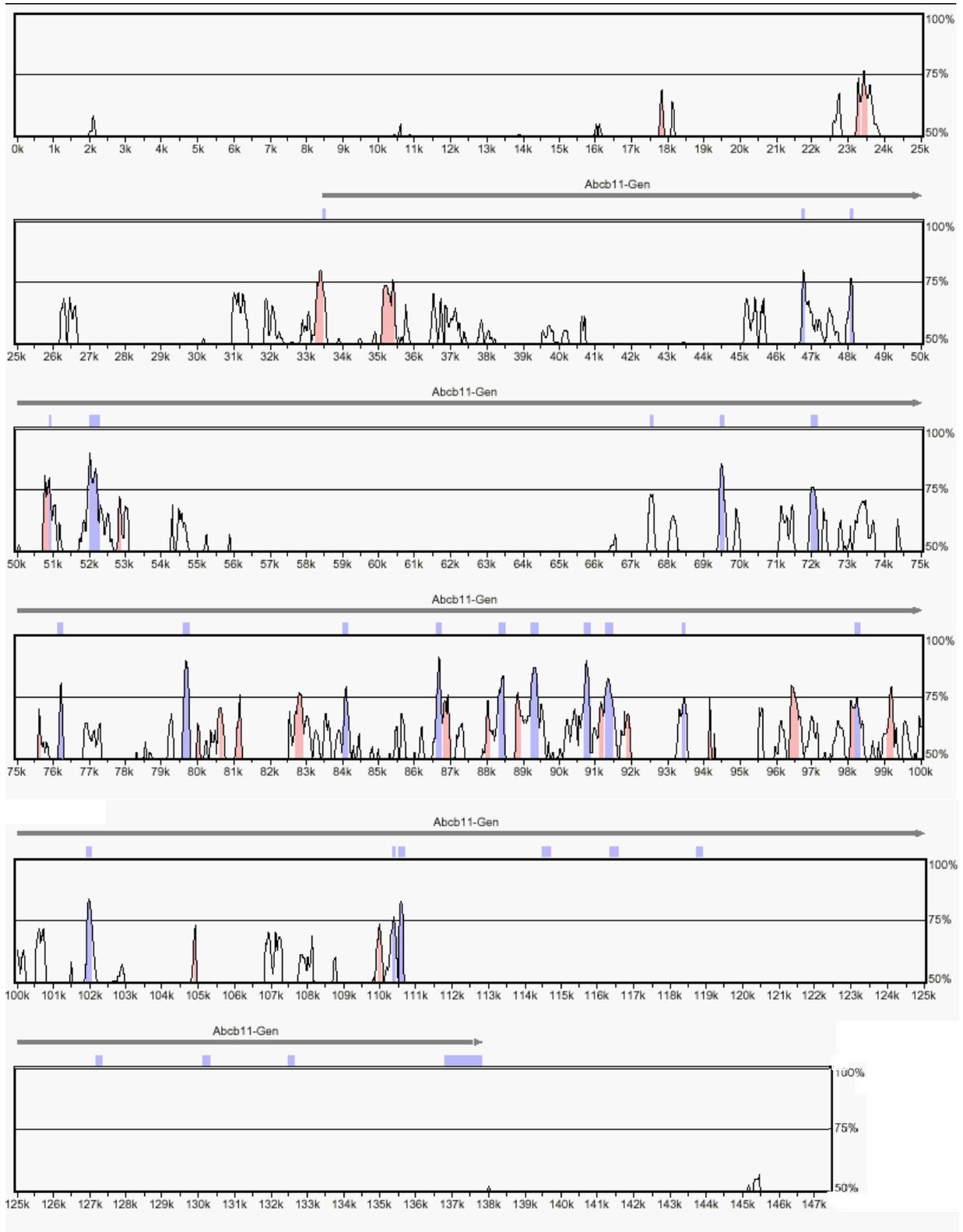


Abb. 3-4: Vista-Plot der *Abcb11*-Sequenzen von Maus und Mensch

Der Vista-Plot untersucht Sequenzen durch einen Homologievergleich zwischen Maus und Mensch auf konservierte Bereiche. Als Ausschlusskriterien für homologe Bereiche wurde eine Identität $\geq 75\%$ über eine Länge von mindestens 100 bp vorausgesetzt. Für die Vista-Analyse wurde der murine BAC-Klon RP23-291P1, der das komplette *Abcb11*-Gen enthält, benutzt. Als humane BAC-Klone wurden RP11-527A7 und RP11-750D14, die das 5'-Ende von *Abcb11* bis Exon 22 bzw. das 3'-Ende ab Exon 22 beinhalten, eingesetzt.

Abszisse: Sequenz des murinen BAC-Klons RP23-291P1 in kb, Ordinate: % Homologie der humanen Sequenz, ■ Exons entsprechend des Basis-Organismus Maus, ■ CNS = Conserved Non-Coding Sequences.

3.1.6 Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Da Polymorphismen zwischen den beiden Mausinzuchtstämmen eine differenzielle Regulation des Gallensäuretransporters bedingen könnten, wenn sie sich in regulatorischen Elementen befinden, wurden ihre Positionen nach möglichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen untersucht (s.Kap. 2.3.3).

Die Analyse des 5'-Bereiches von *Abcb11* auf potenzielle, hepatische Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zeigt keine Kolo-kalisation mit dem Polymorphismus bei -3.757 zwischen AKR und C57L (Abb. 3-5a).

Desgleichen wurden die CNS zwischen Maus und Mensch nach möglichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen untersucht. Der konservierte Bereich des Promotors enthält das regulatorisch bedeutende IR1-Element, die bekannte Bindungsstelle für den Gallensäuresensor FXR, eine Bestätigung für das wichtige Prinzip dieser Analyse (Abb. 3-5a). Er weist außerdem ein weiteres potenzielles IR1-Element auf.

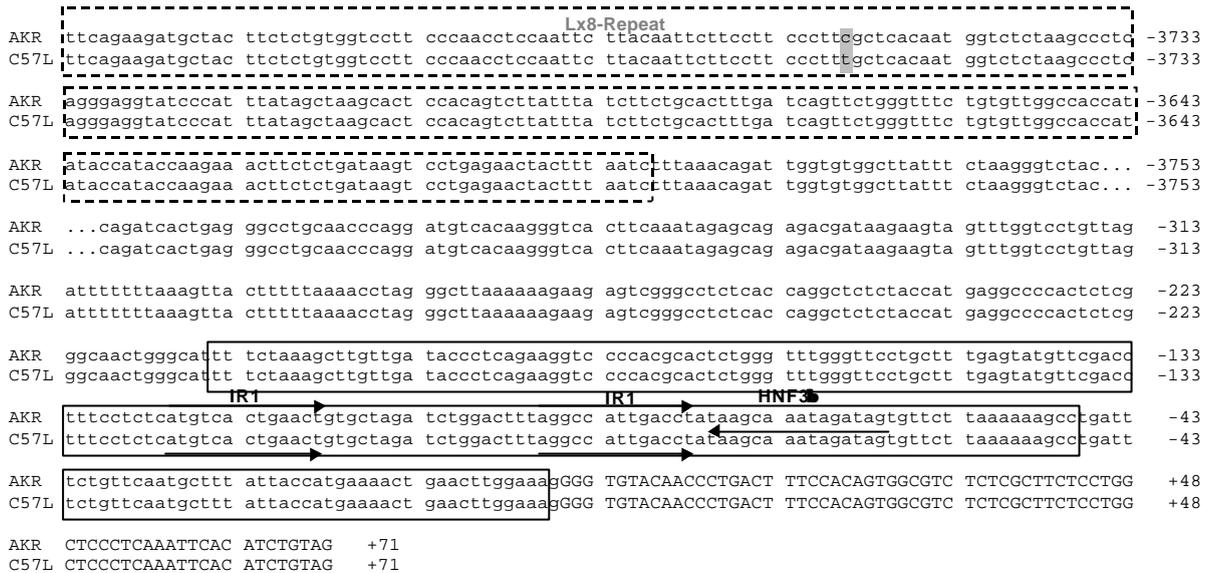


Abb. 3-5a: Alignment der 5'-Region von *Abcb11* zwischen AKR und C57L

Die Sequenz beginnt mit dem Lx8-Element bei -3822, gefolgt vom Basalpromotor (dargestellt in Kleinbuchstaben) und Exon1 (in Großbuchstaben). Sequenzunterbrechungen sind durch ... gekennzeichnet. Die Nummerierung bezieht sich auf C57L (entsprechend GenBank AC084429). Polymorphismen sind grau unterlegt. □ Konservierte nicht kodierende Sequenzen (CNS) zwischen Maus und Mensch. Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die mit den Polymorphismen oder CNS in Maus und Mensch kolokalisieren sind durch Pfeile markiert. □ Strukturelemente, die mit Polymorphismen oder homologen Regionen überlappen.

Von den Intron 1-Polymorphismen zwischen den Inzuchtmäusen kolokalisieren einige mit möglichen Bindungsstellen für die hepatischen Transkriptionsfaktoren HNF3b (*Hepatocyte Nuclear Factor 3b*), HNF2 (*HNF Forkhead Homolog*), C/EBPα (*CAAT-Element Binding Protein*) und NF-Y (*Nuclear Factor Y*) (Abb. 3-5b).

In den beiden zwischen Maus und Mensch homologen Bereichen in Intron 1 befinden sich potenzielle Bindungsstellen für C/EBPβ und LXRα (*Liver X Receptor α*). LXRα gehört wie FXR zur Familie der nukleären Rezeptoren und zeichnet sich durch ein DR (Direct Repeat) 4-Element als Bindungsstelle aus. Ein DR4-Element setzt sich aus zwei Hexamerwiederholungen zusammen, die durch 4 Nukleotide voneinander getrennt sind. LXRα wird in der Leber exprimiert und beeinflusst als Oxysterolrezeptor Gene wie die

Cholesterin-7- α -Hydroxylase *Cyp7a1*, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind [82, 83].

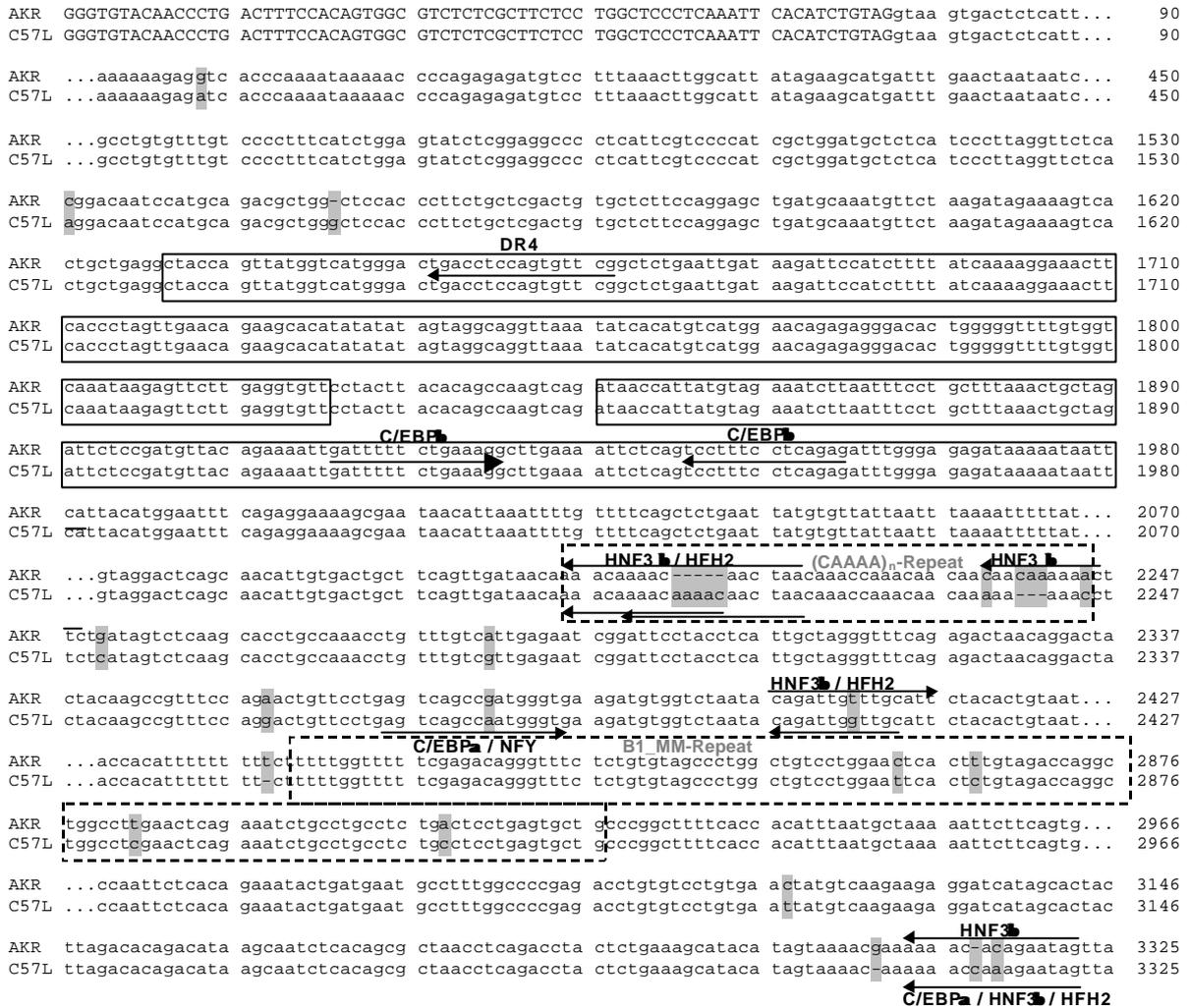


Abb. 3-5b: Alignment der Intron 1-Sequenz von *Abcb11* zwischen AKR und C57L

Die Sequenz beginnt mit Exon 1, dargestellt in Großbuchstaben, gefolgt von Intron 1 in Kleinbuchstaben bis +3325 bp. Sequenzunterbrechungen sind durch ... gekennzeichnet. Die Nummerierung bezieht sich auf C57L (entsprechend AC084429). Polymorphismen sind grau unterlegt. Konservierte nicht kodierende Sequenzen (CNS) zwischen Maus und Mensch. Mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen, die mit den Polymorphismen oder CNS von Maus und Mensch kolokalisieren sind durch Pfeile markiert. Strukturelemente, die mit Polymorphismen oder homologen Regionen überlappen.

3.2 Regulatorische Untersuchungen des *Abcb11*-Gens

Wie in Kap. 3.1.3 erwähnt, ist zur Regulation des *Abcb11*-Gens bislang nachgewiesen worden, dass es eine Bindungsstelle für den nukleären Rezeptor FXR, den Gallensäuresensor der Zelle, besitzt [71, 73]. Durch Gallensäuren, insbesondere Chenodeoxycholsäure (CDCA) kann die *Abcb11*-Aktivität gesteigert werden. Diese Ergebnisse konnten in HepG2-Zellen durch Dualluciferase-Assays unter Einsatz eines Minimalpromotor-Konstruktes von *Abcb11* reproduziert werden.

Im Gegensatz zu Ananthanarayanans Experimenten [71] zeigt der Minimalpromotor ohne Kotransfektion von FXR- und RXR-Expressionsplasmiden hier jedoch keine Luciferaseaktivität im Vergleich zur Hintergrundaktivität des Leervektors. Die Kotransfektion mit FXR und RXR führt zu einer 11,2-fachen, die zusätzliche Stimulation mit 100 μ M CDCA zu einer 237,7-fachen Aktivitätssteigerung (Abb. 3-6). Deshalb wurden alle folgenden Transfektionen in Gegenwart von FXR und RXR durchgeführt, um eine gegenüber dem Hintergrund messbare Aktivität zu erreichen.

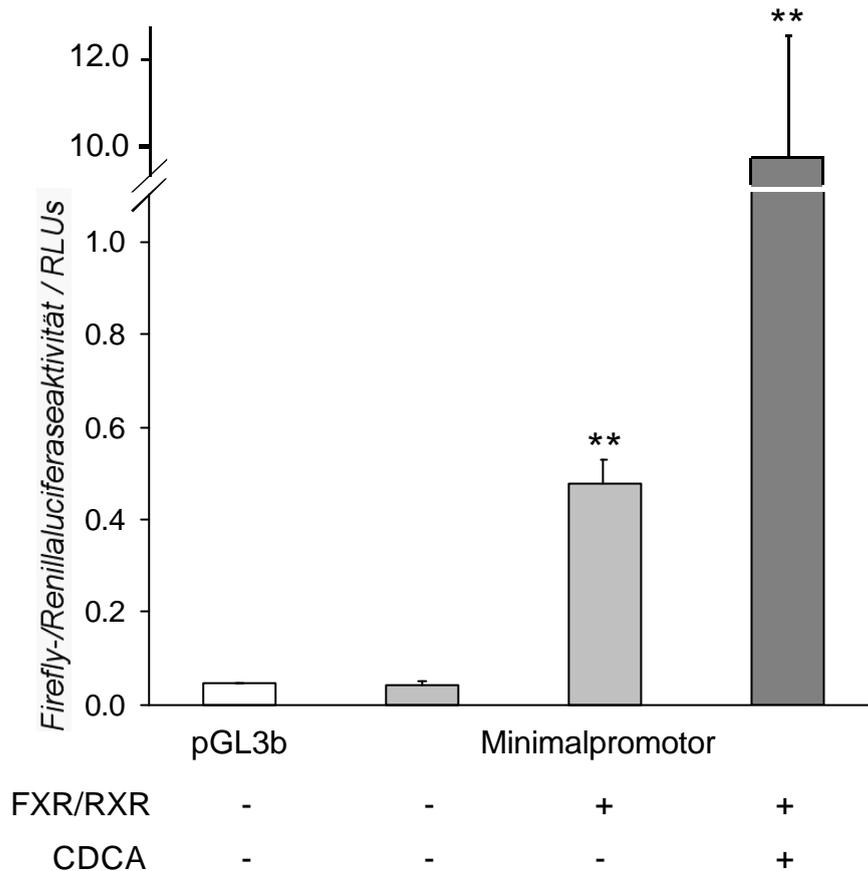


Abb. 3-6: Die Induktion des *Abcb11*-Minimalpromotors durch den Gallensäuren-Rezeptor FXR und den Retinoid-Rezeptor RXR wird durch Chenodeoxycholsäure (CDCA) stimuliert

Für den Reporterassay wurden HepG2-Zellen mit 2 µg des *Abcb11*-Minimalpromotor-Konstrukts und Expressionsvektoren für FXR und RXR (je 150 ng) bzw. dem Kontrollvektor pGL3basic (pGL3b) transient kotransfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit 0,2% Ethanol allein oder mit 100 µM CDCA in 0,2% Ethanol behandelt. Die Luciferaseaktivität der Lysate wurde gegen die Renilla-Luciferaseaktivität der Transfektionskontrolle (pRL-TK) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von in zwei unabhängigen Experimenten gemessenen Luciferaseaktivitäten, RLUs = Relative Light Units, N = 3-6, ** p < 0,01.

3.2.1 Funktionelle Untersuchung des 5'-Polymorphismus im Reporterassay

Nachdem in einem Lx8-Repeat-Element (s. Kap. 3.1.3) im 5'-Bereich des *Abcb11*-Gens ein Polymorphismus detektiert wurde, sollte im Folgenden seine mögliche funktionelle Relevanz für die Regulation des Gallensäuretransporters und damit die Cholesterin-Gallensteinentstehung untersucht werden.

Deshalb wurde das Lx8-Element von AKR und C57L vor den Minimalpromotor in den Luciferasevektor kloniert. Wenngleich sich kein Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen aufzeigen lässt, ist eine signifikante Aktivitätsminderung von $0,32 \pm 0,05$ des Minimalpromotors nach $0,17 \pm 0,01$ durch das Lx8-Element zu verzeichnen (Abb. 3-7).

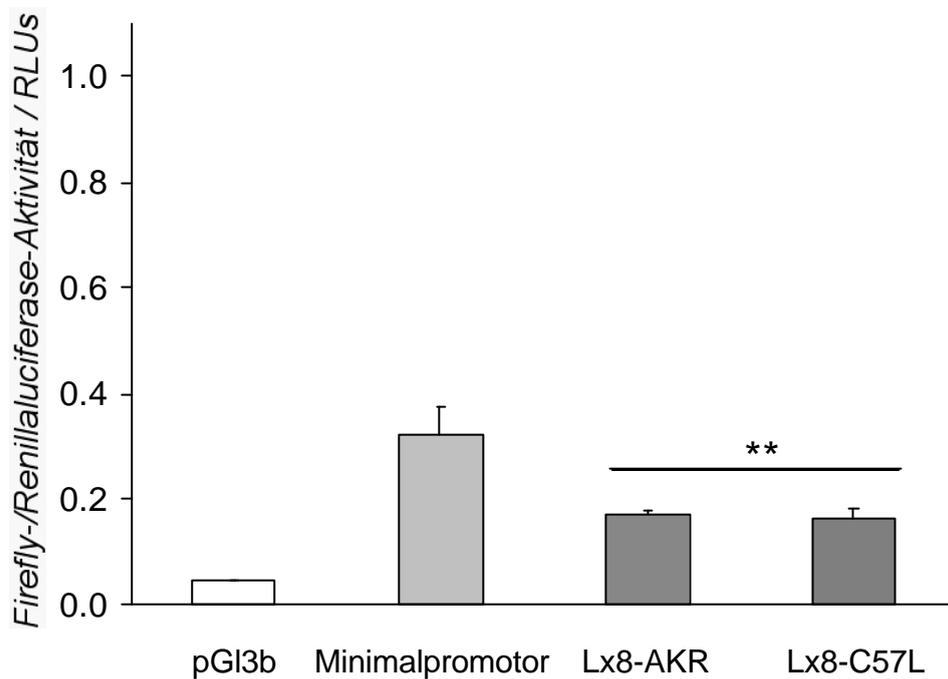


Abb. 3-7: Dualluciferase-Assay des 5'-Polymorphismus im Lx8-Repeat-Element von *Abcb11*

Für den Reporterassay wurden HepG2-Zellen mit 2 μ g des *Abcb11*-Minimalpromotor-Konstrukts bzw. eines für AKR und C57L spezifischen Lx8-Element/Minimalpromotor-Konstrukts und 150 ng der Expressionsvektoren für FXR und RXR transient kotransfiziert. pGL3b = pGL3basic, Leervektor. Die Luciferaseaktivität der Lysate wurde gegen die Renilla-Luciferaseaktivität der Transfektionskontrolle (pRL-TK) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von in zwei unabhängigen Experimenten gemessenen Luciferaseaktivitäten, RLU = Relative Light Units, N = 6, ** p < 0,01.

3.2.2 Funktionelle Untersuchung der Intron 1-Polymorphismen im Reportergenassay

Da einige der Polymorphismen im Intron 1 mit möglichen Bindungsstellen für hepatische Transkriptionsfaktoren kolokalisieren (Abb. 3-5b), sollte auch eine Bedeutung dieser Polymorphismen untersucht werden.

Im Folgenden wurden zwei Intron 1-Fragmente zusätzlich in das *Abcb11*-Minimalpromotor-Konstrukt kloniert. Ein kurzes Fragment, welches den Mikrosatelliten und einen Cluster von Polymorphismen enthält, und ein langes Fragment, welches alle bis zu dem Zeitpunkt identifizierten Nukleotidunterschiede enthält, wurden ausgewählt.

Der Reportergenassay in HepG2-Zellen zeigt durch das kurze Intron1-Fragment von *Abcb11* gegenüber dem Minimalpromotor keine signifikante Luciferase-Aktivitätsänderung. Eine Transfektion mit dem langen Intron 1-Fragment führt zu einer 3-fachen Aktivitätssteigerung gegenüber der Aktivität des Minimalpromotors ($0,77 \pm 0,30$ vs. $0,26 \pm 0,09$ RLU). Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Fragmenten von AKR bzw. C57L festzustellen (Abb.3-8).

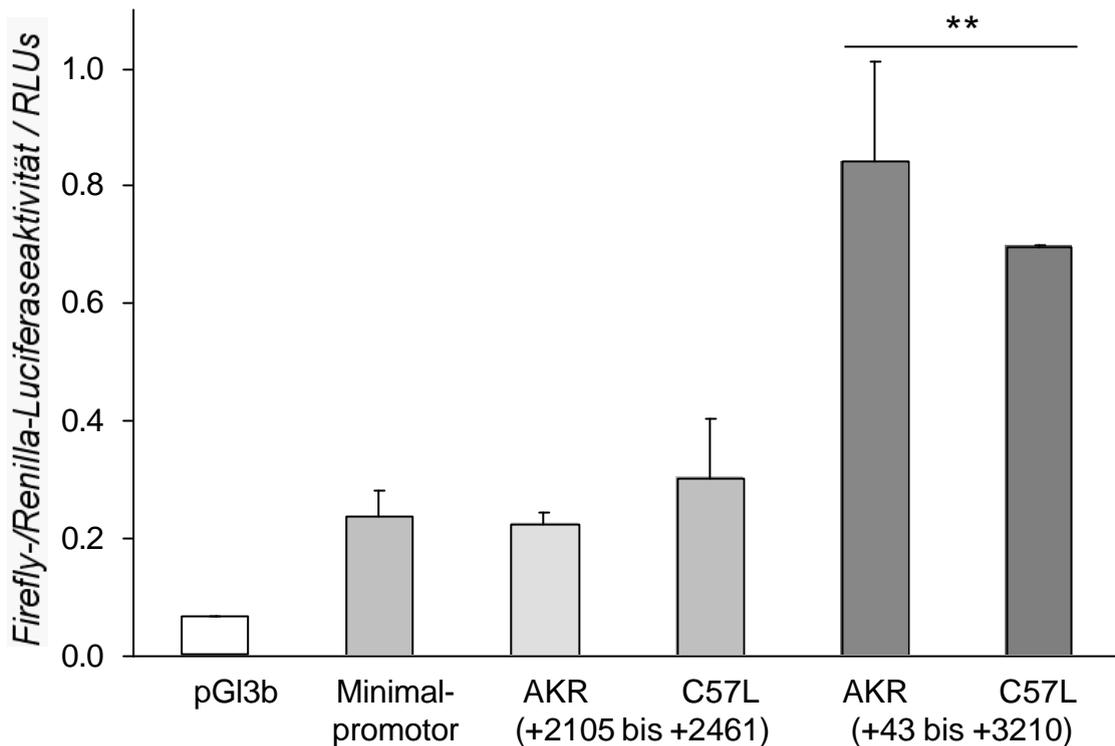


Abb. 3-8: Dualluciferase-Assay der Polymorphismen im Intron 1 von *Abcb11*

Für den Reporterassay wurden HepG2-Zellen mit 2 µg des *Abcb11*-Minimalpromotor-Konstrukts, eines für AKR und C57L spezifischen kurzen Intron1-Fragments (+2105 bis +2461), eines für AKR und C57L spezifischen langen Intron1-Fragment (+43 bis +3210) und 150 µg der Expressionsvektoren für FXR und RXR transient kotransfiziert. pGL3b = pGL3basic, Leervektor. Die Luciferaseaktivität der Lysate wurde gegen die Renilla-Luciferaseaktivität der Transfektionskontrolle (pRL-TK) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von in zwei unabhängigen Experimenten gemessenen Luciferaseaktivitäten, RLUs = Relative Light Units, N = 6, ** p < 0,01.

3.2.3 Kotransfektions-Assays mit hepatischen Transkriptionsfaktoren

Da die Reporterassays mit den Intron 1-Fragmenten keinen stammesspezifischen Unterschied aufwiesen, wurden im Folgenden Kotransfektions-Assays mit HNF3β und C/EBPα durchgeführt, da mögliche Bindungsstellen für diese mit den in Intron 1 identifizierten Polymorphismen kolokalisieren. Für diese hepatischen Transkriptionsfaktoren konnte bereits ein Einfluss auf die Expression von Genen, die in der Gallensäurehomöostase involviert sind, gezeigt werden [84]. Durch die Kotransfektion sollte einer möglicherweise zu niedrigen endogenen Konzentration der Transkriptionsfaktoren in den HepG2-Zellen entgegengewirkt werden.

Eine Kotransfektion der Intron 1-Fragmente mit HNF3 β bzw. C/EBP α in Anwesenheit von FXR/RXR führt zu einem Abfall der Luciferaseaktivität auf das Hintergrund-Aktivitätsniveau. Durch Stimulation mit CDCA kann eine deutliche Aktivitätssteigerung bewirkt werden. Kotransfektion mit HNF3 β in Anwesenheit von CDCA führt zu einem merklichen Abfall der Luciferaseaktivität. Ein Unterschied zwischen AKR und C57L ist nicht erkennbar; es bleibt aber festzustellen, dass die Standardabweichungen recht hoch sind. Die Kotransfektion von C/EBP α in Anwesenheit von CDCA führt sogar zu einer Aktivitätsminderung in den Hintergrundbereich.

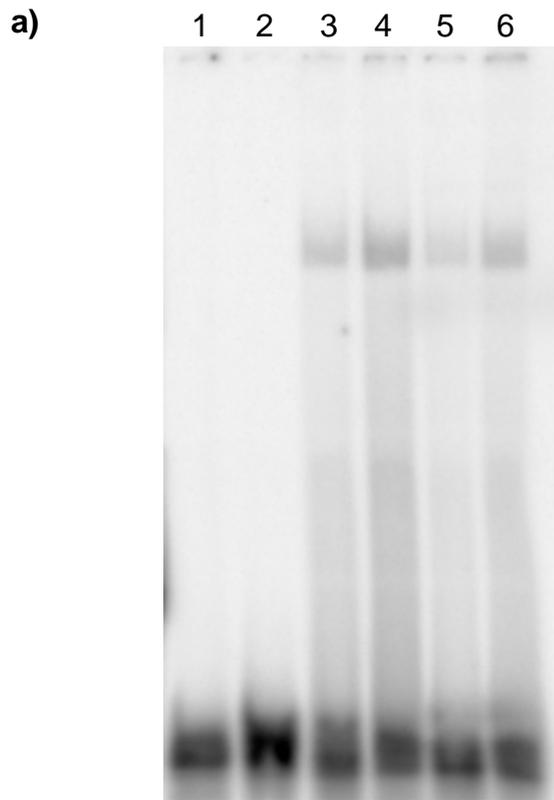
3.2.4 Untersuchung potenzieller Bindungsstellen mittels Elektrophoretischem Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

Da in den Dualluciferase-Assays keine unterschiedliche Aktivierung der Stammes-spezifischen Intron1-Fragmente nachgewiesen werden konnte, sollte mittels eines EMSAs eine potenzielle Bindung von HNF3 β an den Mikrosatelliten hinsichtlich ihrer differenziellen Stärke untersucht werden. Ausgewählt wurde ein Oligo von bp +2233 bis +2252 des Intron1 von *Abcb11*. Die Inkubation mit nukleärem Leberextrakt ergibt einen spezifischen Shift der Bande (Abb. 3.9a). Die Stärke der Banden für das C57L und AKR-Oligo ist vergleichbar. Dieses Ergebnis ist sowohl mit nukleärem Extrakt von AKR- als auch C57L-Mäusen reproduzierbar.

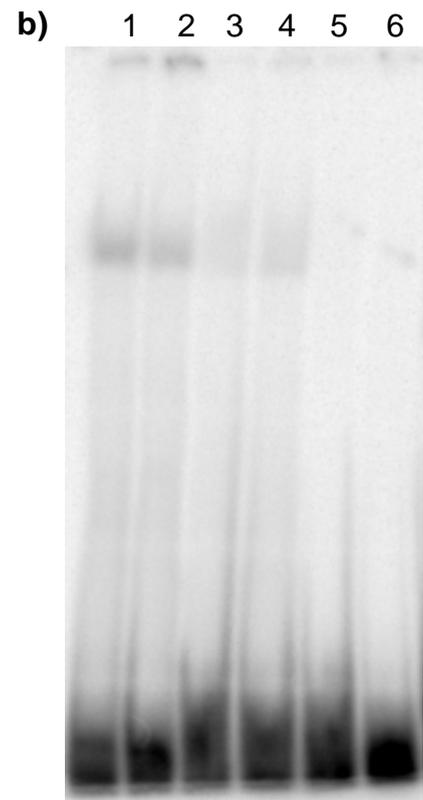
Die Bande läßt sich 100% durch nicht-markiertes Oligo kompetitieren. Durch Inkubation mit einem Oligo der HNF3 β -Bindungsstelle des Transthyretin-Promotors [85] lässt sich eine Teilkompetition erzielen (Abb. 3.9b,c).

Eine ähnliche Teilkompetition erhält man allerdings mit einem veränderten unspezifischen Nonsense-Oligo gleicher Länge, welches keine potenzielle Bindungsstelle enthält (Abb. 3.9.c) und welches allein keinen spezifischen Bandenshift erzeugt.

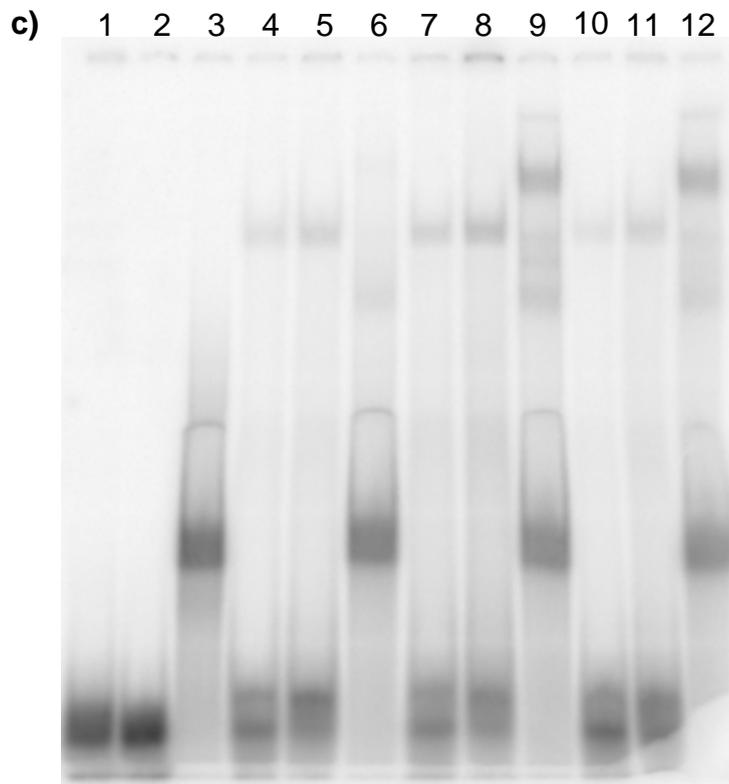
Durch Inkubation mit einem kommerziellen, polyklonalen Antikörper für HNF3 β , der in der Positivkontrolle für den Transthyretin-Promotor eine Abschwächung der Bande erzeugt, lässt sich bei den AKR und C57L-Banden weder eine Abschwächung noch ein Supershift erzielen (Abb. 3-9d).



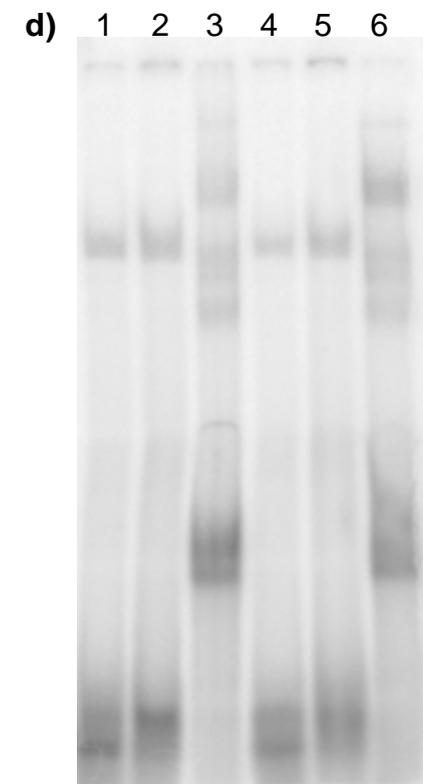
Oligo	A	C	A	C	A	C
N.Extr.	-	-	A	A	C	C
Comp.	-	-	-	-	-	-



Oligo	A	C	A	C	A	C
N.Extr.	+	+	+	+	+	+
Comp.	-	-	T	T	A	C



A	C	T	A	C	T	A	C	T	A	C	T
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	-	-	T	T	T	-	-	-	N	N	N



Oligo	A	C	T	A	C	T
N.Extr.	+	+	+	+	+	+
NE/AK	+	+	+	-	-	-

Abb. 3-9: Untersuchung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den polymorphen Mikrosatelliten in Intron 1

Die EMSAs wurden mit ^{32}P -ATP markierten Oligos a) von AKR (A) und C57L (C) (Banden 1,2) in Anwesenheit von 10 μg nukleärem Extrakt von AKR (Banden 3,4) bzw. C57L (Banden 5,6) durchgeführt. b) Dem Reaktionsansatz von Oligo und nukleärem Extrakt (Banden 1,2) wurde ein 200-facher Überschuß kaltes Transthyretin(T)-Oligo (Banden 3,4) bzw. kalte AKR und C57L-Oligos als spezifische Kompetitoren zugegeben. c) Dem Reaktionsansatz von Oligo (Banden 1-3) und nukleärem Extrakt (Banden 7-9) wurden ein 200-facher Überschuß kaltes T-Oligo (Banden 4-6) als spezifischer Kompetitor bzw. kaltes unspezifisches Nonsense-Oligo zugefügt (Banden 10-12). d) Dem Reaktionsansatz von Oligo und nukleärem Extrakt (NE; Banden 4-6) wurde ein spezifischer Antikörper (AK) für HNF3 β zugesetzt (Banden 1-3).

3.3 Herstellung einer *Abcb11* BAC-transgenen Maus

Parallel zur molekularen Aufklärung der *Abcb11*-Regulation sollte in einem physiologischen Ansatz eine BAC-transgene Maus für *Abcb11* in Zusammenarbeit mit dem Jackson Labor (Bar Harbor, USA) hergestellt werden. Durch das Einschleusen einer weiteren Genkopie von *Abcb11* in einen Gallenstein-resistenten Hintergrund sollten die protektiven oder deletären Auswirkungen einer quantitativ gesteigerten *Abcb11*-Genexpression auf die hepatische Cholesterinhomöostase und die Gallesekretion *in vivo* nachgewiesen und charakterisiert werden.

3.3.1 Mikroinjektionen von BAC-DNA in Gallenstein-resistente Mausinzuchtstämme

Zunächst wurde ein *Abcb11*-positiver BAC (RP23-291P1) des zu C57L nahe verwandten, Gallenstein-sensitiven Inzuchtstammes C57B/L6 aus der BAC-Bibliothek RPCI-23 isoliert (s. Kap. 3.1.1). Der ausgewählte BAC hat eine Insertgröße von 181 kb. 5'-wärts von dem 104 kb langen *Abcb11*-Gen enthält er 33 kb genomische DNA, 3'-wärts 44 kb. Dieser BAC sollte in den in der QTL zur Ermittlung des *Lith 1*-Locus verwendeten, Gallenstein-resistenten Stamm AKR injiziert werden. Da sich Inzuchtstämme bekanntermaßen als problematisch bei der Mikroinjektion erweisen, wurde parallel in einen zweiten resistenten Stamm CBA injiziert.

Die AKR-Weibchen hatten eine hohe Trächtigkeitsrate mit Embryonen von guter Qualität. Allerdings superovulierten sie nicht und hatten deshalb nur wenige Embryonen. Aus mehreren Injektionsrunden resultierten zwei Schwangerschaften, deren drei Nachkommen aber starben. Die CBA-Weibchen wurden schlecht trächtig und hatten wenige Embryonen. Aus drei Schwangerschaften resultierten 10 Nachkommen, die aber als nicht transgen genotypisiert wurden.

Deshalb wurden die folgenden Mikroinjektionen im Gallenstein-resistenten Maus-Inzuchtstamm 129S1/SvImJ durchgeführt, der nach den bisherigen Erfahrungen des Jackson Labors für Superovulation, Lebensfähigkeit der Embryonen und Verträglichkeit mit dem Empfängerstamm geeigneter ist. Die Mikroinjektionen lieferten ein transgenes Founder-Weibchen (#46) und ein transgenes Founder-Männchen (#60) in 72 Nachkommen. Auf sie

begründen sich die beiden BAC-transgenen Linien 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1flp* und 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)2flp*.

3.3.2 Charakterisierung *Abcb11* BAC-transgener Nachkommen 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1flp* und 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)2flp*

129S1 Mäuse haben durchschnittlich 5-6 Nachkommen. In der N1-Generation der Founder-Mäuse 46 und 60 des neuen Stammes 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1,2flp* gab es nur einen transgenen Nachkommenanteil von 20 bzw. 5%. Dieser könnte auf eine Mosaikintegration des BACs in den Keimzellen des Founders hinweisen, die allgemein bei 10 – 20% Foundern aufgrund einer späten Integration des Transgens während der Embryogenese zurückzuführen sein könnte. Eine Rückkreuzung BAC-transgener Mäuse ab N2 mit 129S1 liefert durchschnittlich ähnliche Nachkommenzahlen (4-6) wie reine 129S1-Verpaarungen.

Die heterozygoten Nachkommen beider transgener Linien 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1flp* und *-2flp* zeigen wie der Wildtypstamm 129S1 nach dem Abstillen von den Muttertieren eine gleichmäßige Gewichtszunahme. Das Gewicht transgener Mäuse (Männchen $22,26 \pm 0,73$ g, Weibchen $18,06 \pm 0,50$ g) und Wildtyp-Mäuse (Männchen $23,16 \pm 0,57$ g, Weibchen $17,71 \pm 0,68$ g) im Alter von 8 Wochen unterscheidet sich nicht.

Nach Tötung der Mäuse wurden Lebern und Gallenblasen entnommen. Die Lebern 8 Wochen alter transgener Mäuse (Männchen $0,86 \pm 0,03$ g, Weibchen $0,63 \pm 0,02$ g) sind gleich schwer wie die von Wildtyp-Mäusen (Männchen $0,87 \pm 0,03$ g, Weibchen $0,61 \pm 0,02$ g).

Eine Volumenbestimmung der Gallenblasen erfolgte durch Wiegen. Auf Normaldiät (Tag 0) unterscheiden sich die Gallenblasen-Volumina zwischen *Abcb11*-transgenen (Männchen $16,8 \pm 2,27$ μ l, Weibchen $26,4 \pm 2,21$ μ l) und Wildtyp-Mäusen (Männchen $19,6 \pm 3,61$ μ l, Weibchen $30,8 \pm 3,24$ μ l) nicht signifikant. Das Gallenblasenvolumen der Weibchen ist 1,5fach größer als das der Männchen (Tab. 3-3).

Eine mikroskopische Analyse der Galle ergab keinen Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen im Alter von 8 Wochen. In der Galle aller Mäuse kommen kleine Flüssigkristalle vor. Dies weist auf eine leichte Übersättigung der Gallenblasen-Galle unter der Normaldiät hin, da Flüssigkristalle erst bei einem CSI > 1 auftreten (Abb. 3-10).



Abb. 3-10: Kleine Flüssigkristalle

Gallenblasengalle im Durchlicht, 8 Wochen alte Mäuse auf Normaldiät.

3.3.3 Integritätsüberprüfung und Kopienzahlbestimmung des Transgens

Das identische Bandenmuster im Southern Blot von beiden transgenen Linien 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1flp* und *-2flp* sowie dem BAC RP23-291P1 und dem Wildtypstamm 129S1 zeigt, dass bei der Integration des BACs in das Genom des Mausstammes 129S1 das *Abcb11*-Gen nicht zerbrochen ist. Die DNA des BACs allein zeigt ein leicht verlangsamtes Laufverhalten gegenüber der genomischen DNA (Abb. 3-11a).

Des Weiteren kann man im Southern Blot eine Kopienzahl von jeweils ein bis zwei zusätzlichen Kopien des *Abcb11*-Gens zur endogen vorhandenen in Linie 1 bzw. 2 ablesen (Abb. 3-11b).

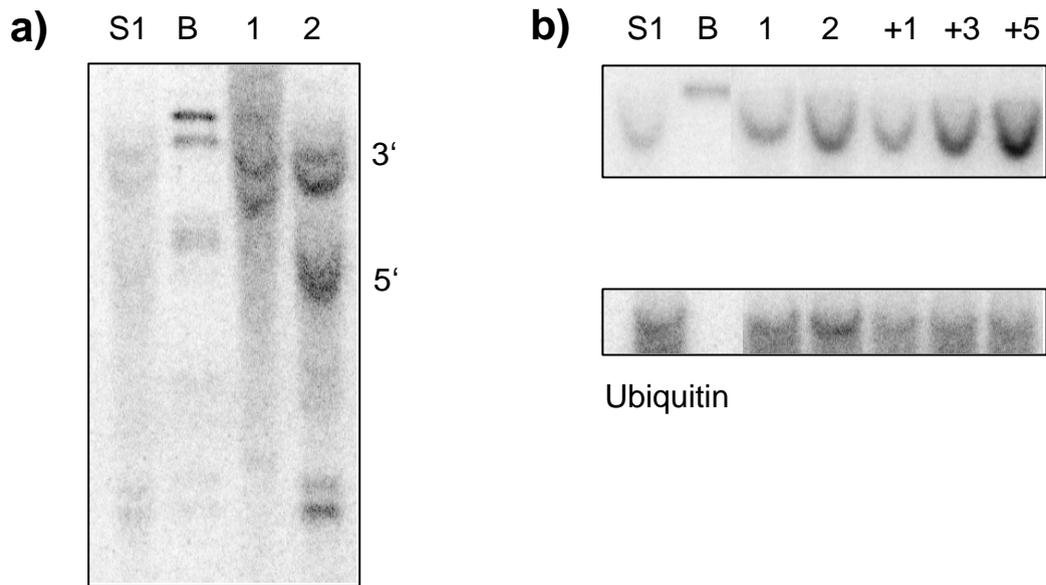


Abb. 3-11: Integritätsüberprüfung und Kopienzahlbestimmung des Transgens in 129S1/SvImJ-Tg(RP23-291P1)1,2flp

Der Southern Blot wurde aufeinanderfolgend mit überlappenden 5', 3' und Mitte-³²P-dCTP-Sonden hybridisiert, die die gesamte cDNA abdecken. Die anschließende Hybridisierung mit einer Ubiquitin-Sonde fungiert als Ladungskontrolle. A) Integritätsüberprüfung: Hybridisierung mit der 4000bp langen Mitte-Sonde erkennt auch die 5'- und 3'-Bande. B) Quantifizierung: Normalisierung der 5'-Bande gegen Ubiquitin. S1 - 129S1, B - BAC 291P1, 1 - transgene Linie 1, 2 - transgene Linie 2, +1, 3 bzw. 5 - 129S1-DNA versetzt mit 1, 3 bzw. 5 Kopien BAC RP23-291P1 als Standard.

3.3.4 Expression von *Abcb11*-mRNA unter Standarddiät

Die Expression auf RNA-Ebene der durch den BAC zusätzlich eingeschleusten Kopien des *Abcb11*-Gens wurde mittels einer Northern Hybridisierung überprüft. Sie zeigte eine 2-fach höhere Expression des Gallensäuretransporters in den transgenen Mäusen gegenüber dem Wildtyp 129S1 und bestätigt somit das quantitative Ergebnis des Southern Blots (Abb.3-12). Die Expression von *Abcb11* ist in den Männchen doppelt so hoch wie in den Weibchen.

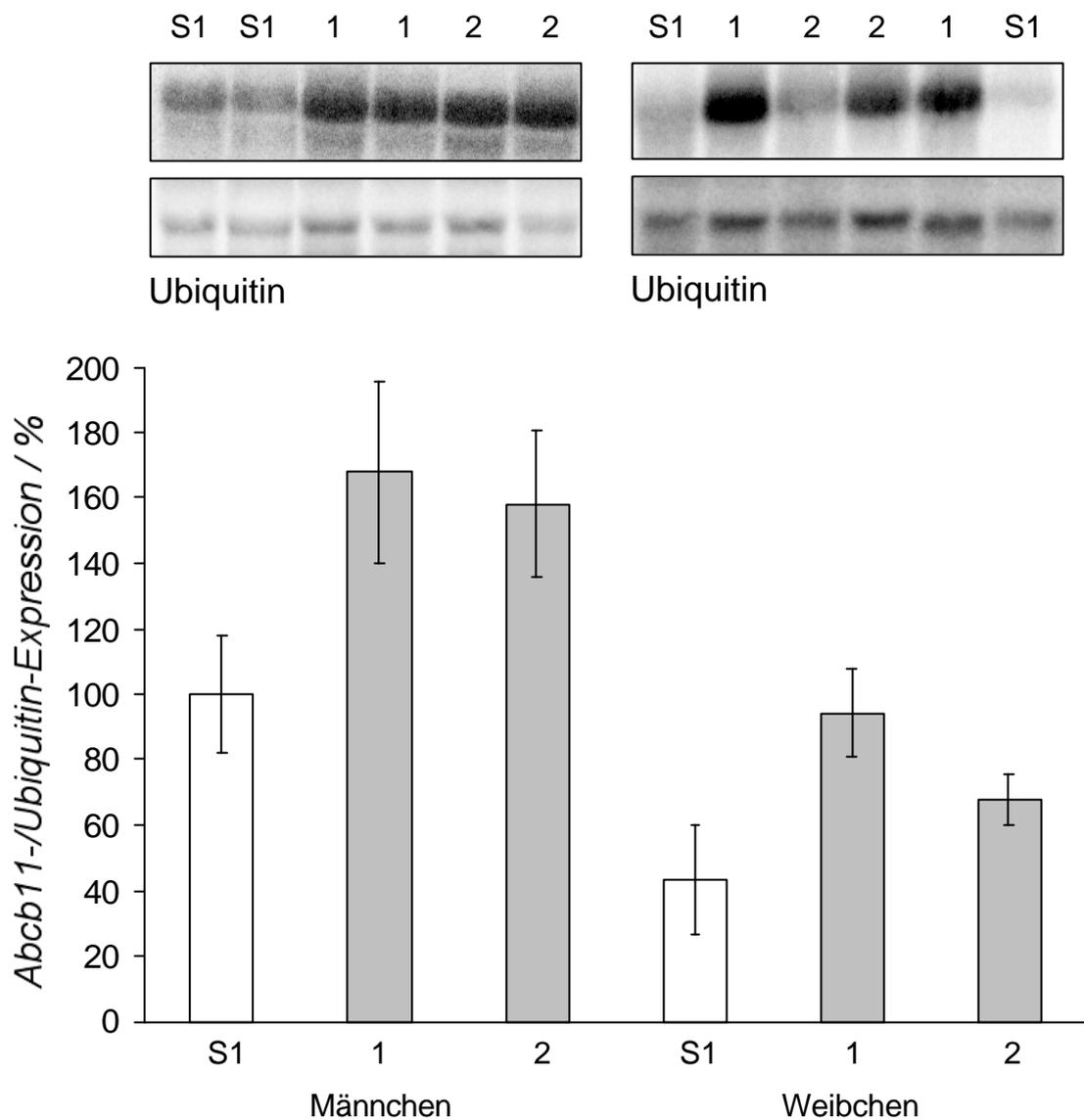


Abb. 3-12: Expression von *Abcb11*-mRNA in 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-291P1)1,2flp* unter Standarddiät

Der Northern Blot wurde mit einer $3'$ - 32 P-dCTP-Sonde von *Abcb11* hybridisiert. Die Werte wurden gegen die Ubiquitin-Kontrolle normalisiert. □ Wildtyp S1, ■ *Abcb11* BAC transgene Linien 1 und 2. N = 2.

3.4 Phänotypisierung *Abcb11* BAC-transgener Mäuse auf lithogener Provokationsdiät

Die murinen Gallenstein-Loci wurden in mehreren QTL-Analysen ermittelt. Dabei wurden in den Mäusen durch die Fütterung einer fett (17%)- und cholesterinreichen (1,25%) sowie cholsäurehaltigen (0,5%) Diät Gallensteine provoziert, weil Mäuse spontan keine Gallensteine entwickeln. Cholsäure wird dem Futter zugesetzt, um die Mausgalle hydrophober zu machen und sie der humanen Gallensäuren-Zusammensetzung anzugleichen. Außerdem steigert Cholsäure die Cholesterinabsorption [35]. Die *Abcb11* BAC-transgene Maus sollte entsprechend mit der lithogenen Diät über verschiedene Zeiträume gefüttert und phänotypisiert werden.

3.4.1 Körpergewichtsverlauf unter lithogener Diät

Das Körpergewicht der Mäuse wurde nach 2, 4 und 8-wöchiger Fütterung der lithogenen Diät gemessen. Die Gewichtszunahme der transgenen Mäuse beider Linien 1 und 2 entspricht der der Wildtyp-Mäuse (Tab. 3-3). Die transgenen Männchen wiegen nach 8-wöchiger lithogener Diät $29,17 \pm 0,48$ g, die Wildtyp-Männchen $29,27 \pm 0,55$ g, die transgenen Weibchen $22,79 \pm 0,51$ g und die Wildtyp-Weibchen $23,08 \pm 0,44$ g.

3.4.2 Phänotypisierung von Leber, Galle und Darm

Die Lebern der Mäuse unter lithogener Diät sind sehr blass und weich. Sie unterscheiden sich nicht zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Ihr Fettgehalt nimmt deutlich zu. Teilweise zeigen die Lebern eine leichte Entzündung, die sich in infiltrierten Lymphozyten äußert. Bei einigen Mausinzuchtstämmen ist bei einer Fettleber eine mehr oder weniger starke Entzündung dokumentiert [86, 87].

Über die bis zu 8 Wochen lange Fütterung nehmen die Lebern aller Mäuse gleichmäßig an Gewicht zu (Tab.3-3). Das Leber-/Körpergewichtsverhältnis der Männchen steigt während dieser Versuchsperiode von $3,89 \pm 0,03\%$ um das 1,3-fache auf $4,94 \pm 0,12\%$ an, das der Weibchen von $3,48 \pm 0,08\%$ um das 1,8-fache auf $6,11 \pm 0,21\%$.

Während der Fütterung der lithogenen Diät blieb das Gallenblasenvolumen im Durchschnitt gleich (Tab. 3-3). Die Galle der transgenen und Wildtyp-Mäuse sah meist gelb und klar aus. Bei einem sehr hohen Mucingehalt erschien sie trüb. Echte Gallensteine konnte man durch die Gallenblasenwand erkennen. Wenn viele Kristalle oder sandige Steine vorhanden waren, waren auch diese als kleine Körnchen zu sehen. Beim Auftreten von Gallensteinen war die Gallenblasenwand teilweise entzündet, und die Galle hatte eine grünliche Farbe.

Der Dünndarm transgener Mäuse sah makroskopisch unauffällig aus, und die Gewichtszunahme des Darms aller Mäuse war gleich (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Körper-, Leber-, Darmgewicht und Gallenblasenvolumen im Verlauf der lithogenen Diät

Angegeben sind die Gruppen der beiden *Abcb11* BAC-transgenen Linien individuell und zusammengefasst, sowie die Wildtyp-Kontrollgruppe, jeweils für Männchen und Weibchen. N = 4 bzw. 5-8; Mittelwerte \pm SEM. Gallenblasenvolumen: ^a p < 0,01, ^b p < 0,05 im Vergleich zum Wildtyp; ^c p < 0,01, ^d p < 0,05 im Vergleich zu Weibchen; ^e p < 0,01, ^f p < 0,05 im Vergleich zu Tg Linie 2; ^g p < 0,01 und ^h p < 0,05 im Vergleich zu 0 Wochen Diät.

Wochen lithogene Diät	Genotyp	Geschlecht	Körpergewicht (g)	Lebergewicht (g)	Darmgewicht (g)	Gallenblasenvolumen (µl)
0	Tg Linie 1	männlich	20,93 \pm 1,03	0,82 \pm 0,05	0,85 \pm 0,05	18,0 \pm 1,47
0	Tg Linie 2	männlich	23,60 \pm 0,49	0,90 \pm 0,02	0,76 \pm 0,04	15,5 \pm 4,55
0	Tg gesamt	männlich	22,26 \pm 0,73	0,86 \pm 0,03	0,81 \pm 0,03	16,8 \pm 2,27 ^c
0	Wildtyp	männlich	22,16 \pm 0,74	0,87 \pm 0,03	0,73 \pm 0,03	19,6 \pm 3,61 ^d
0	Tg Linie 1	weiblich	18,43 \pm 0,84	0,64 \pm 0,04	0,66 \pm 0,01	29,0 \pm 2,83
0	Tg Linie 2	weiblich	17,70 \pm 0,61	0,63 \pm 0,03	0,77 \pm 0,08	23,8 \pm 3,20
0	Tg gesamt	weiblich	18,06 \pm 0,50	0,63 \pm 0,02	0,71 \pm 0,04	26,4 \pm 2,21
0	Wildtyp	weiblich	17,71 \pm 0,68	0,61 \pm 0,02	0,68 \pm 0,02	30,8 \pm 3,24
2	Tg Linie 1	männlich	23,01 \pm 0,93	1,03 \pm 0,01	0,90 \pm 0,05	22,75 \pm 5,44
2	Tg Linie 2	männlich	23,32 \pm 0,77	0,97 \pm 0,09	0,85 \pm 0,02	21,25 \pm 4,44
2	Tg gesamt	männlich	23,16 \pm 0,56	1,00 \pm 0,04	0,88 \pm 0,03	22,00 \pm 3,26
2	Wildtyp	männlich	24,51 \pm 0,86	1,00 \pm 0,05	0,90 \pm 0,03	17,14 \pm 2,53
2	Tg Linie 1	weiblich	21,04 \pm 1,07	0,90 \pm 0,05	0,85 \pm 0,04	22,75 \pm 6,34
2	Tg Linie 2	weiblich	20,05 \pm 0,68	0,94 \pm 0,02	0,97 \pm 0,02	12,33 \pm 1,20
2	Tg gesamt	weiblich	20,54 \pm 0,61	0,92 \pm 0,02	0,91 \pm 0,03	18,29 \pm 4,02
2	Wildtyp	weiblich	20,34 \pm 0,58	0,86 \pm 0,03	0,84 \pm 0,03	18,00 \pm 4,45 ^h
4	Tg Linie 1	männlich	25,99 \pm 0,78	1,26 \pm 0,05	0,86 \pm 0,02	17,25 \pm 5,72 ^f
4	Tg Linie 2	männlich	22,22 \pm 0,86	1,02 \pm 0,06	0,79 \pm 0,06	62,00 \pm 15,00 ^g
4	Tg gesamt	männlich	24,10 \pm 0,89	1,14 \pm 0,06	0,83 \pm 0,03	32,17 \pm 10,82
4	Wildtyp	männlich	25,21 \pm 1,46	1,16 \pm 0,05	0,87 \pm 0,03	24,67 \pm 6,24
4	Tg Linie 1	weiblich	21,48 \pm 0,77	1,06 \pm 0,08	0,80 \pm 0,03	33,75 \pm 6,14
4	Tg Linie 2	weiblich	20,81 \pm 1,50	1,04 \pm 0,07	0,69 \pm 0,05	44,75 \pm 6,81
4	Tg gesamt	weiblich	21,14 \pm 0,79	1,05 \pm 0,05	0,75 \pm 0,03	39,25 \pm 4,73 ⁿ
4	Wildtyp	weiblich	22,34 \pm 0,60	1,02 \pm 0,01	0,83 \pm 0,04	28,00 \pm 3,65
8	Tg Linie 1	männlich	30,01 \pm 0,32	1,58 \pm 0,05	0,85 \pm 0,10	22,00 \pm 5,76
8	Tg Linie 2	männlich	28,33 \pm 0,70	1,33 \pm 0,05	0,67 \pm 0,02	19,75 \pm 5,84
8	Tg gesamt	männlich	29,17 \pm 0,48	1,46 \pm 0,06	0,76 \pm 0,06	20,88 \pm 3,82
8	Wildtyp	männlich	29,27 \pm 0,55	1,43 \pm 0,05	0,89 \pm 0,05	14,89 \pm 1,74 ^d
8	Tg Linie 1	weiblich	22,68 \pm 1,04	1,36 \pm 0,09	0,71 \pm 0,09	28,50 \pm 8,29
8	Tg Linie 2	weiblich	22,90 \pm 0,34	1,37 \pm 0,11	0,78 \pm 0,06	55,67 \pm 18,89
8	Tg gesamt	weiblich	22,79 \pm 0,51	1,36 \pm 0,06	0,74 \pm 0,05	40,14 \pm 10,03
8	Wildtyp	weiblich	23,08 \pm 0,44	1,44 \pm 0,08	0,82 \pm 0,06	24,40 \pm 4,39

3.4.3 Expression von *Abcb11*-mRNA unter lithogener Diät

Die Expression des Gallensäuretransporters ist nach 8-wöchiger Fütterung der lithogenen Diät gegenüber dem 0 Wochen Zeitpunkt nicht verändert (Abb. 3-13). Die transgenen Mäuse haben im Vergleich zum Wildtyp eine 2-fach höhere Expression.

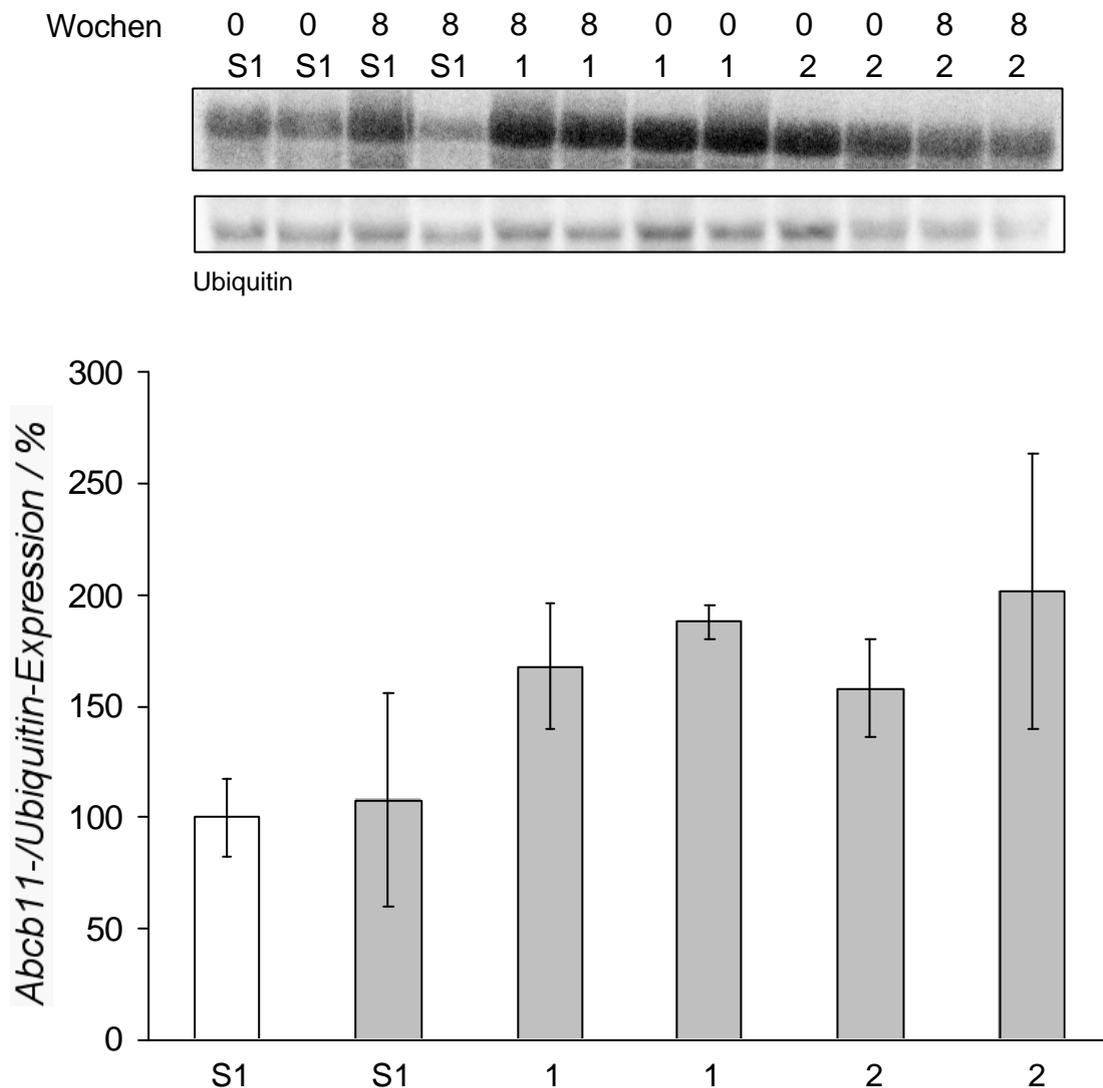


Abb. 3-13: mRNA-Expression des *Abcb11*-Gens in 129S1/SvImJ-Tg(RP23-291P1)1,2flp unter 8 Wochen lithogener Diät

Der Northern Blot zeigt die Expression der Männchen und wurde mit einer $3'$ - 32 P-dCTP-Sonde von *Abcb11* hybridisiert. Die Werte wurden gegen die Ubiquitin-Kontrolle normalisiert. □ 0 Wochen, ■ 8 Wochen lithogene Diät, S1 = Wildtyp 129S1, 1,2 = transgene Linien 1 und 2, N = 2.

3.4.4 Cholesterin-Kristallisation und Gallenstein-Prävalenz

Die Gallenblasengalle wurde nach Tötung der Mäuse mikroskopisch analysiert. Die einzelnen Stufen der Cholesterinkristallisation mit den verschiedenen Phospholipid-Cholesterin-Komplexen wurden nach Wang et al. [36, 67, 88] semiquantitativ erfasst (s. Kap. 2.8.2).

Nach 2-wöchiger Fütterung der lithogenen Diät treten in der Galle beider transgener Linien wie auch der Wildtyp-Mäuse Mucin, aggregierte und fusionierte Flüssigkristalle (Abb. 3–14a) sowie Cholesterinnadeln (Abb. 3–14b) auf. Die Zahl und die Morphologie der Flüssigkristalle und Cholesterinnadeln unterscheiden sich zu diesem und späteren Zeitpunkten nicht zwischen den transgenen Mäusen und den Wildtyp-Mäusen unter lithogener Diät (Tab. 3-4, 3-5). In den Männchen treten auch schon erste Cholesterin-Monohydrat (ChM)-Kristalle (Abb.3-14c, Tab. 3-5) auf.

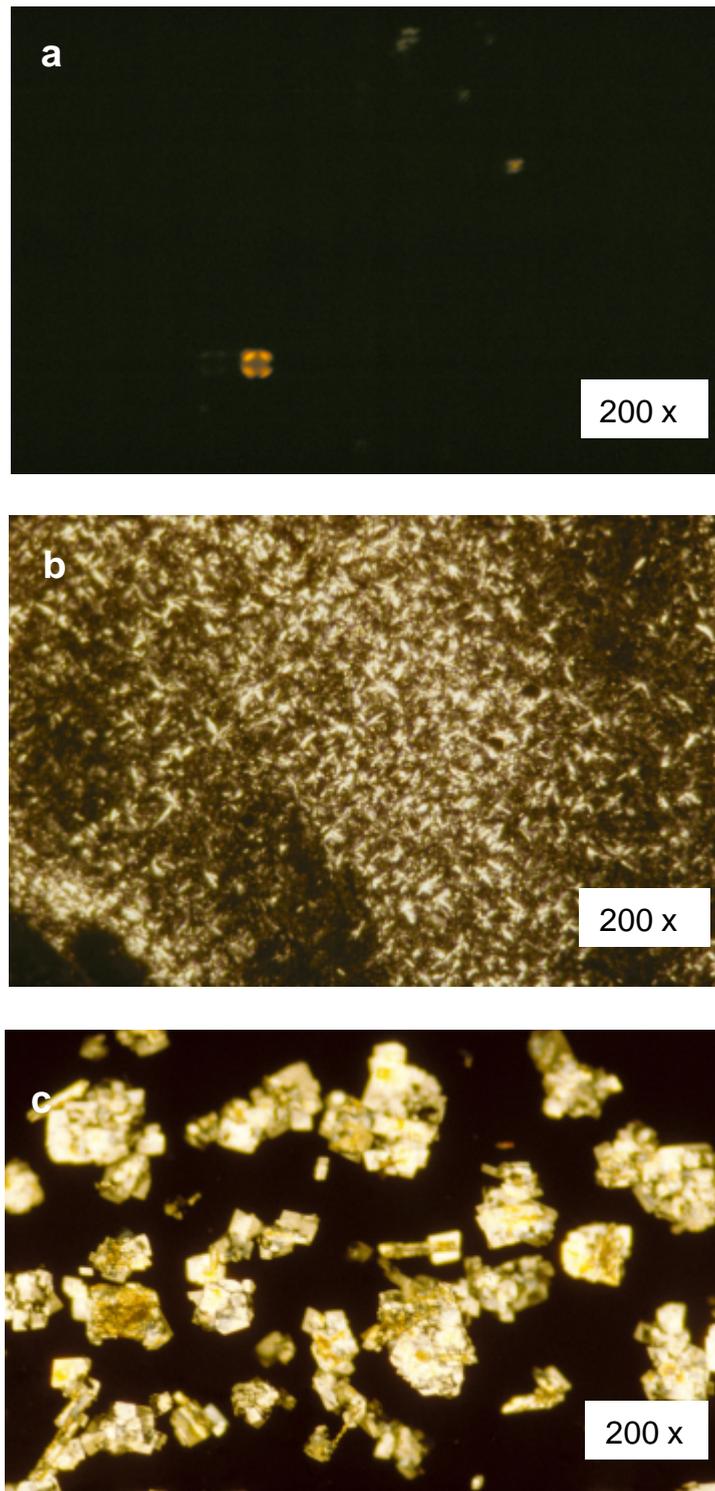


Abb. 3-14: Fusionierte Flüssigkristalle, Cholesterinnadeln und ChM-Kristalle

Gallenblasengalle im Polarisationslicht, 2 Wochen lithogene Diät. a) Fusionierte Flüssigkristalle, b) Cholesterinnadeln, c) (Aggregierte) ChM-Kristalle.

Tab. 3-4: Mucin-, und Flüssigkristallgehalt im Verlauf der lithogenen Diät

Angegeben sind die Gruppen der beiden *Abcb11* BAC-transgenen Linien individuell und zusammengefasst, sowie die Wildtyp-Kontrollgruppe, jeweils für Männchen und Weibchen. N = 4 bzw. 5-8; Mittelwerte \pm SEM in relativen Einheiten.

^a p < 0,01, ^b p < 0,05 im Vergleich zum Wildtyp; ^c p < 0,01, ^d p < 0,05 im Vergleich zu Weibchen; ^e p < 0,01, ^f p < 0,05 im Vergleich zu Tg Linie 2; ^g p < 0,01 und ^h p < 0,05 im Vergleich zu 0 Wochen Diät.

Wochen lithogene Diät	Genotyp	Geschlecht	Mucin	Kleine Flüssigkristalle	Aggregierte Flüssigkristalle	Fusionierte Flüssigkristalle
0	Tg Linie 1	männlich	-	1,67 \pm 0,29	-	-
0	Tg Linie 2	männlich	-	2,00 \pm 0,00	-	-
0	Tg gesamt	männlich	-	1,80 \pm 0,16	-	-
0	Wildtyp	männlich	-	1,83 \pm 0,15	-	-
0	Tg Linie 1	weiblich	-	2,33 \pm 0,29	-	-
0	Tg Linie 2	weiblich	-	2,00 \pm 0,00	-	-
0	Tg gesamt	weiblich	-	2,14 \pm 0,13	-	-
0	Wildtyp	weiblich	-	2,00 \pm 0,20	-	-
2	Tg Linie 1	männlich	2,00 \pm 0,41	2,00 \pm 0,46	0,50 \pm 0,29	1,00 \pm 0,41
2	Tg Linie 2	männlich	1,63 \pm 0,24	1,75 \pm 0,48	1,25 \pm 0,14	1,50 \pm 0,65
2	Tg gesamt	männlich	1,81 \pm 0,23	1,88 \pm 0,31	0,88 \pm 0,21	1,25 \pm 0,37
2	Wildtyp	männlich	1,50 \pm 0,19	2,14 \pm 0,18	0,57 \pm 0,28	1,57 \pm 0,41
2	Tg Linie 1	weiblich	1,25 \pm 0,25	2,13 \pm 0,31	1,50 \pm 0,50	2,00 \pm 0,00
2	Tg Linie 2	weiblich	1,88 \pm 0,31	1,75 \pm 0,25	0,50 \pm 0,50	1,38 \pm 0,38
2	Tg gesamt	weiblich	1,56 \pm 0,22	1,94 \pm 0,20	1,00 \pm 0,38	1,69 \pm 0,21
2	Wildtyp	weiblich	1,40 \pm 0,24	2,30 \pm 0,37	0,80 \pm 0,34	1,30 \pm 0,30
4	Tg Linie 1	männlich	1,50 \pm 0,29	2,00 \pm 0,41	0,50 \pm 0,28 ^d	1,50 \pm 0,29
4	Tg Linie 2	männlich	1,25 \pm 0,25	2,25 \pm 0,75	1,00 \pm 0,71	0,50 \pm 0,29
4	Tg gesamt	männlich	1,38 \pm 0,18	2,13 \pm 0,40	0,75 \pm 0,37 ^c	1,00 \pm 0,27
4	Wildtyp	männlich	1,14 \pm 0,14	2,57 \pm 0,37	1,00 \pm 0,22	0,86 \pm 0,26 ^d
4	Tg Linie 1	weiblich	1,00 \pm 0,00	2,88 \pm 0,43	2,00 \pm 0,00	2,38 \pm 0,24
4	Tg Linie 2	weiblich	1,25 \pm 0,48	2,50 \pm 0,29	2,00 \pm 0,41	1,13 \pm 0,31
4	Tg gesamt	weiblich	1,13 \pm 0,22	2,69 \pm 0,25	2,00 \pm 0,19	1,75 \pm 0,30
4	Wildtyp	weiblich	1,33 \pm 0,42	2,67 \pm 0,42	1,50 \pm 0,34	1,92 \pm 0,20
8	Tg Linie 1	männlich	3,00 \pm 0,50	1,00 \pm 0,00	0,33 \pm 0,29	1,33 \pm 0,63
8	Tg Linie 2	männlich	2,00 \pm 0,71	1,25 \pm 0,48	1,25 \pm 0,63	1,75 \pm 0,63
8	Tg gesamt	männlich	2,43 \pm 0,45	1,14 \pm 0,24	0,86 \pm 0,38	1,57 \pm 0,41
8	Wildtyp	männlich	1,67 \pm 0,43	1,58 \pm 0,32	1,00 \pm 0,29	0,93 \pm 0,21
8	Tg Linie 1	weiblich	1,75 \pm 0,25	1,75 \pm 0,25	1,63 \pm 0,38	2,00 \pm 0,41
8	Tg Linie 2	weiblich	1,00 \pm 0,00	1,50 \pm 0,35	1,00 \pm 0,71	1,00 \pm 0,71
8	Tg gesamt	weiblich	1,50 \pm 0,19	1,67 \pm 0,18	1,42 \pm 0,32	1,67 \pm 0,37
8	Wildtyp	weiblich	2,38 \pm 0,20	1,00 \pm 0,00	0,75 \pm 0,39	2,00 \pm 0,33

Tab. 3-5: Cholesterin-Nadeln, ChM-Kristalle-, Sandsteingehalt und Anzahl echter Gallensteine im Verlauf der lithogenen Diät

Angegeben sind die Gruppen der beiden *Abcb11* BAC-transgenen Linien individuell und zusammengefasst, sowie die Wildtyp-Kontrollgruppe, jeweils für Männchen und Weibchen. N = 4 bzw. 5-8; Mittelwerte \pm SEM in relativen Einheiten.

^a p < 0,01, ^b p < 0,05 im Vergleich zum Wildtyp; ^c p < 0,01, ^d p < 0,05 im Vergleich zu Weibchen; ^e p < 0,01, ^f p < 0,05 im Vergleich zu Tg Linie 2; ^g p < 0,01 und ^h p < 0,05 im Vergleich zu 0 Wochen Diät.

Wochen lithogene Diät	Genotyp	Geschlecht	Cholesterin-Nadeln	Cholesterin-Monohydrat-kristalle	Sandige Steine	Echte Gallensteine
0	Tg Linie 1	männlich	-	-	-	-
0	Tg Linie 2	männlich	-	-	-	-
0	Tg gesamt	männlich	-	-	-	-
0	Wildtyp	männlich	-	-	-	-
0	Tg Linie 1	weiblich	-	-	-	-
0	Tg Linie 2	weiblich	-	-	-	-
0	Tg gesamt	weiblich	-	-	-	-
0	Wildtyp	weiblich	-	-	-	-
2	Tg Linie 1	männlich	1,00 \pm 0,40	0,75 \pm 0,75	-	-
2	Tg Linie 2	männlich	1,25 \pm 0,14 ^a	-	-	-
2	Tg gesamt	männlich	1,13 \pm 0,21 ^b	0,38 \pm 0,38	-	-
2	Wildtyp	männlich	0,43 \pm 0,13	0,14 \pm 0,14	-	0,14 \pm 0,14
2	Tg Linie 1	weiblich	1,38 \pm 0,63	-	-	-
2	Tg Linie 2	weiblich	0,63 \pm 0,13	-	-	-
2	Tg gesamt	weiblich	1,00 \pm 0,33	-	-	-
2	Wildtyp	weiblich	0,30 \pm 0,12	-	-	-
4	Tg Linie 1	männlich	0,63 \pm 0,38	0,25 \pm 0,25	-	-
4	Tg Linie 2	männlich	1,50 \pm 0,65	2,50 \pm 0,87	1,00 \pm 0,58	0,75 \pm 0,48
4	Tg gesamt	männlich	1,06 \pm 0,38	1,38 \pm 0,60	0,50 \pm 0,33	0,38 \pm 0,26
4	Wildtyp	männlich	0,57 \pm 0,20	1,14 \pm 0,59	0,43 \pm 0,30	0,29 \pm 0,29
4	Tg Linie 1	weiblich	0,75 \pm 0,48	-	-	-
4	Tg Linie 2	weiblich	0,13 \pm 0,13	-	-	-
4	Tg gesamt	weiblich	0,44 \pm 0,26	-	-	-
4	Wildtyp	weiblich	0,33 \pm 0,25	-	-	-
8	Tg Linie 1	männlich	1,50 \pm 0,43	0,75 \pm 0,75	0,50 \pm 0,50	0,75 \pm 0,75
8	Tg Linie 2	männlich	1,63 \pm 0,47	0,13 \pm 0,13	-	-
8	Tg gesamt	männlich	1,57 \pm 0,30	0,44 \pm 0,37	0,25 \pm 0,25	0,38 \pm 0,38
8	Wildtyp	männlich	0,92 \pm 0,13	0,38 \pm 0,00	-	-
8	Tg Linie 1	weiblich	0,75 \pm 0,14 ^e	-	-	-
8	Tg Linie 2	weiblich	2,25 \pm 0,25	1,50 \pm 0,35	1,00 \pm 0,71	-
8	Tg gesamt	weiblich	1,50 \pm 0,31	0,50 \pm 0,30	0,33 \pm 0,29	-
8	Wildtyp	weiblich	1,20 \pm 0,37	-	-	-

Nach 4-wöchiger Fütterung zeigt die Galle der Männchen neben Mucin und Flüssigkristallen ChM-Kristalle, sandige Cholesterinsteine sowie echte Gallensteine (Abb. 3-15). Die echten Gallensteine der Männchen wurden durch Infrarotspektroskopie analysiert. Sie bestehen hauptsächlich aus Cholesterin mit kleinen Verunreinigungen (Abb. 3-16). Steine mit einem Cholesteringehalt $> 80\%$ gelten als Cholesterinsteine [88]. In den Weibchen werden zu diesem Zeitpunkt weder ChM-Kristalle, sandige Steine noch echte Gallensteine detektiert. Die transgenen Männchen zeigen tendenziell höhere Kristallisationsraten als die Wildtyp-Männchen: ChM-Kristalle $1,38 \pm 0,60$ r.E. vs. $1,14 \pm 0,59$ r.E., sandige Steine $0,50 \pm 0,33$ r.E. vs. $0,43 \pm 0,30$ r.E. und $0,38 \pm 0,26$ vs. $0,29 \pm 0,29$ echte Gallensteine (Abb. 3-17, Tab. 3-5).

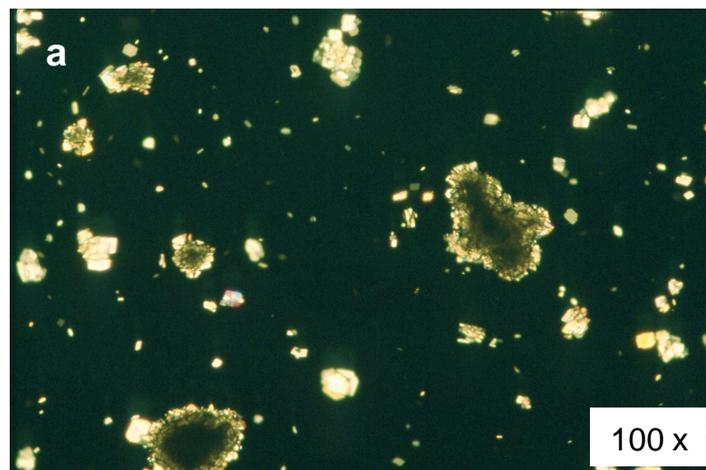


Abb. 3-15a: Sandige Steine

Mikroskopische Aufnahme der Gallenblasengalle. a) Sandiger Stein, Polarisationslicht.



Abb. 3-15b: Echter Gallenstein

Mikroskopische Aufnahme der Gallenblasengalle. Echter Gallenstein; Durchlicht.

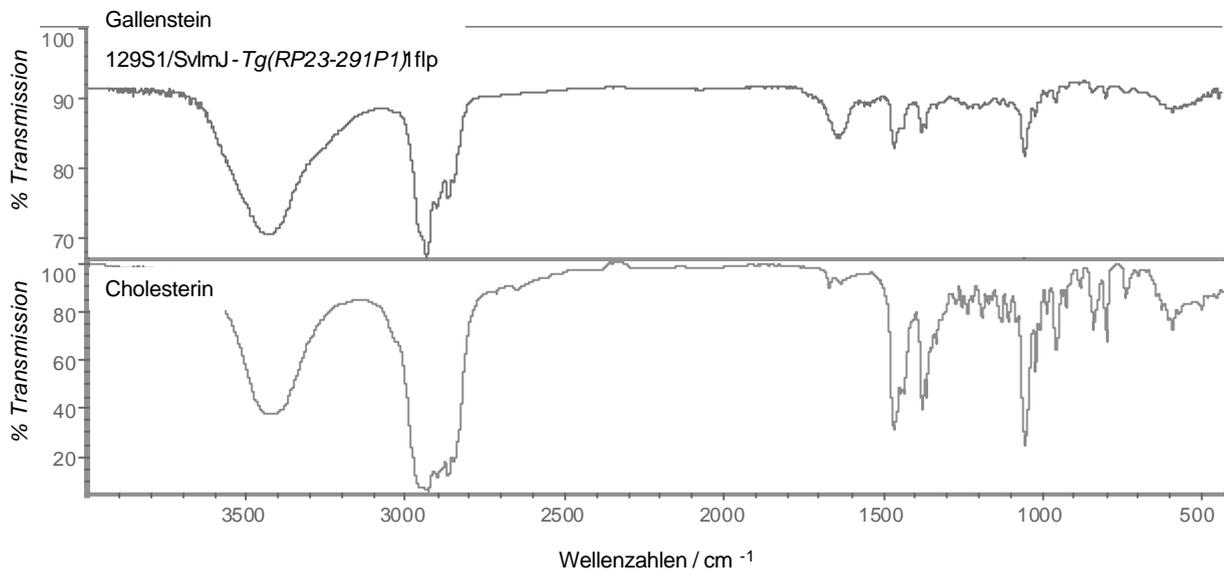
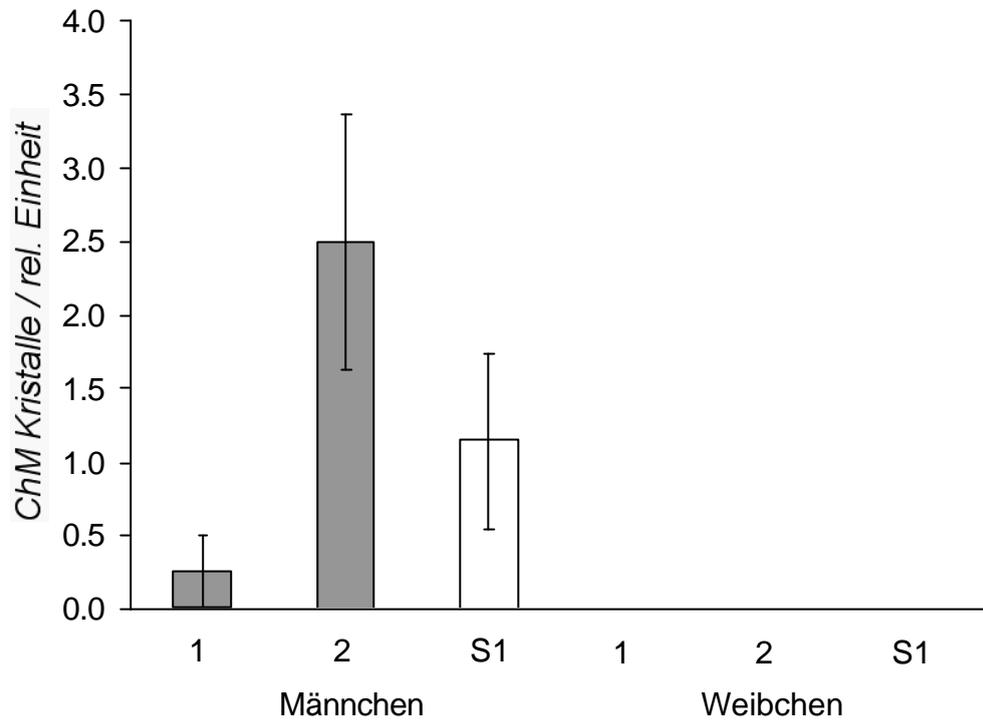


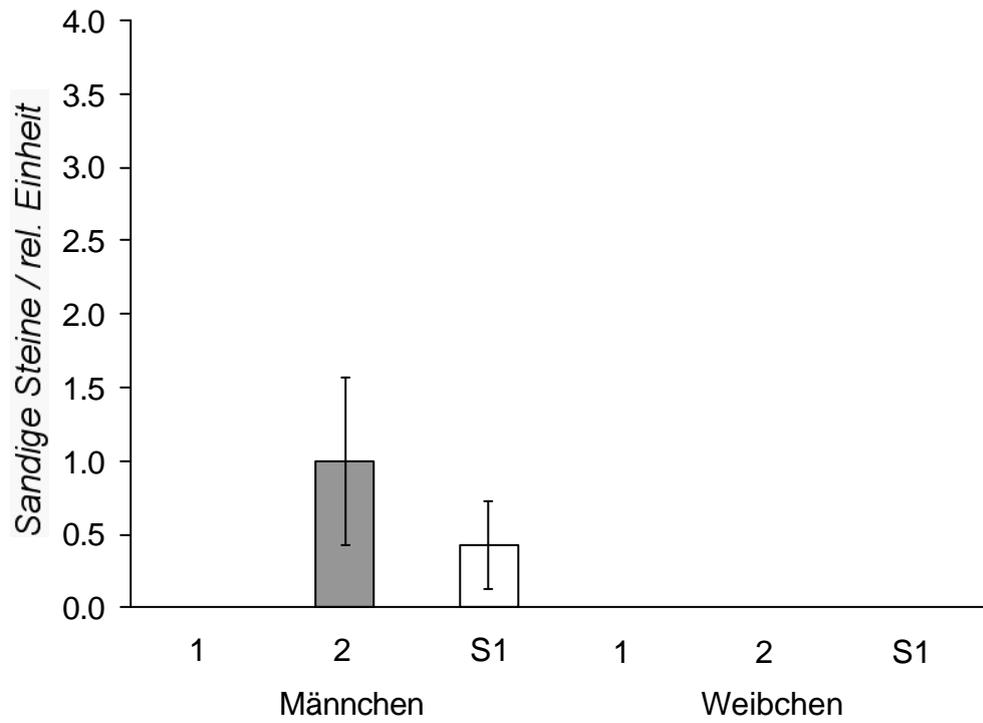
Abb. 3-16: Infrarotspektrum eines Gallensteins

Der Stein eines transgenen Männchens unter lithogener Diät wurde analysiert (oberer Graph). Der untere Graph zeigt die Standardkurve von Cholesterin.

a)



b)



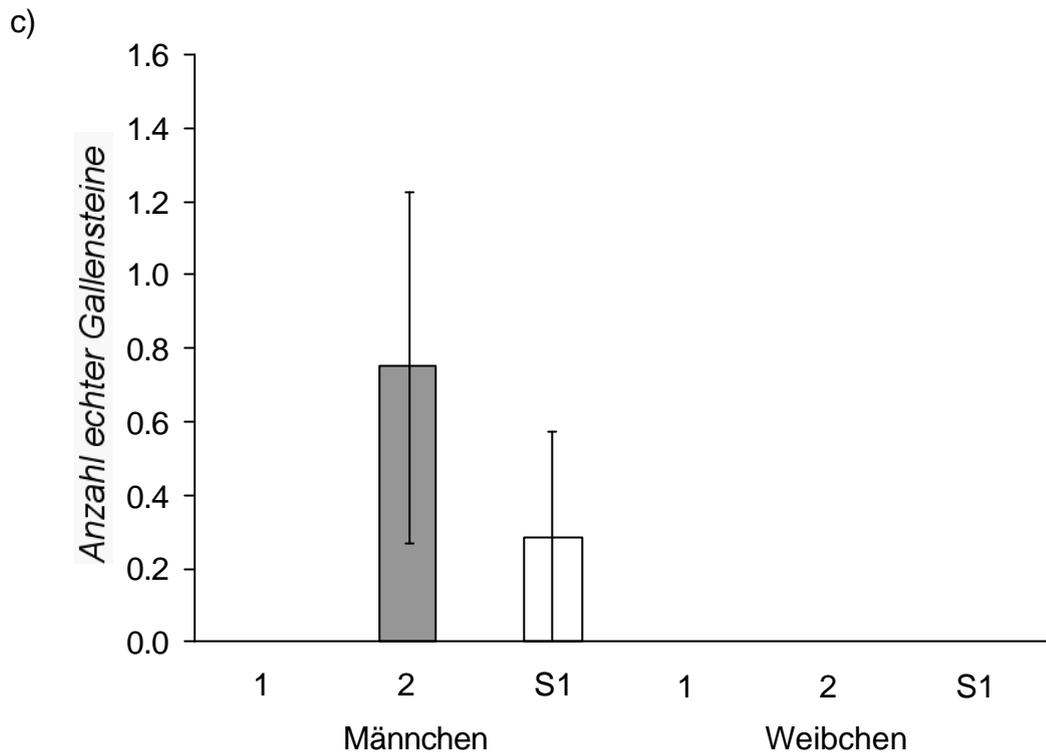
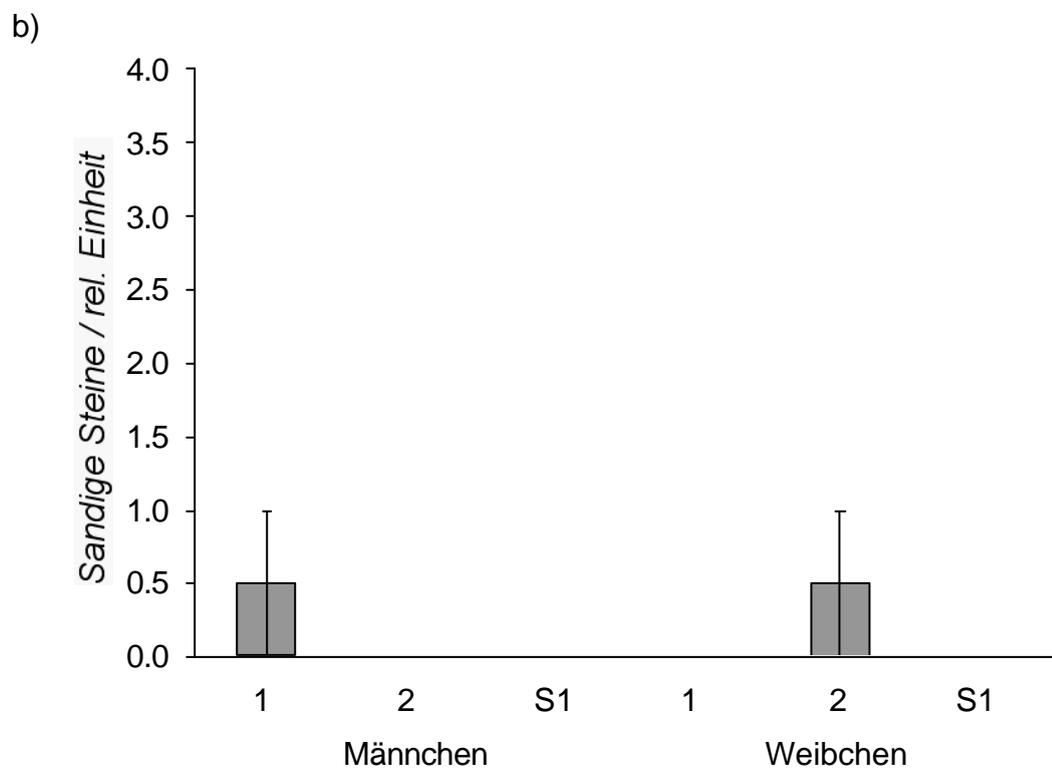
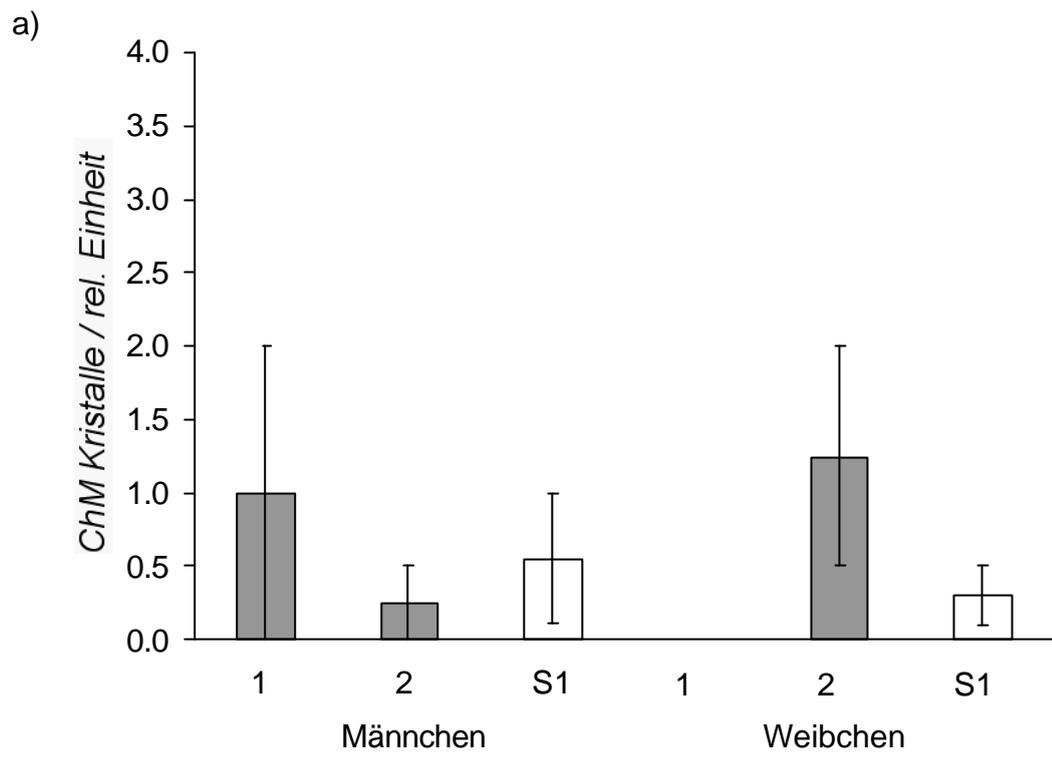


Abb. 3-17: Cholesterinkristallisation und Gallensteinvorkommen nach 4-wöchiger lithogener Diät

Transgene Mäuse (Linien 1 und 2) und Wildtyp-Mäuse (S1) wurden über 4 Wochen mit lithogener Diät gefüttert. Die Galle wurde unter dem Mikroskop analysiert und relativ quantifiziert. a) Relativer ChM-Kristallgehalt, b) Relativer Sandsteingehalt und c) Anzahl echter Gallensteine. □ Wildtyp S129S1, ■ *Abcb11* BAC-transgene Linien 1 und 2. N = 4-7, Mittelwert ± SEM.

Die transgenen Männchen zeigen auch nach 8-wöchiger lithogener Diät tendenziell höhere Kristallisationsraten als die Wildtyp-Männchen: ChM-Kristalle $0,44 \pm 0,37$ r.E. vs. $0,38 \pm 0,00$ r.E., sandige Steine $0,25 \pm 0,25$ r.E. vs. 0 r.E. und $0,38 \pm 0,38$ vs. 0 echte Gallensteine (Abb. 3-18a-c, Tab. 3-5). Die Anzahl echter Gallensteine in den transgenen Männchen ist nach 4- und 8-wöchiger Fütterung gleich hoch. Der relative ChM-Kristall- und der Sandsteingehalt liegen nach 8 Wochen unter dem 4-Wochengehalt. In den Weibchen treten nach 8-wöchiger lithogener Diät tendenziell mehr ChM-Kristalle und sandige Steine auf als in den Wildtyp-Weibchen: ChM-Kristalle: $0,50 \pm 0,30$ r.E. vs. 0 r.E. und sandige Steine $0,33 \pm 0,29$ r.E. vs. 0 r.E.. Auch nach 8 Wochen werden in den Weibchen keine echten Gallensteine beobachtet (Abb. 3-18, Tab. 3-5).



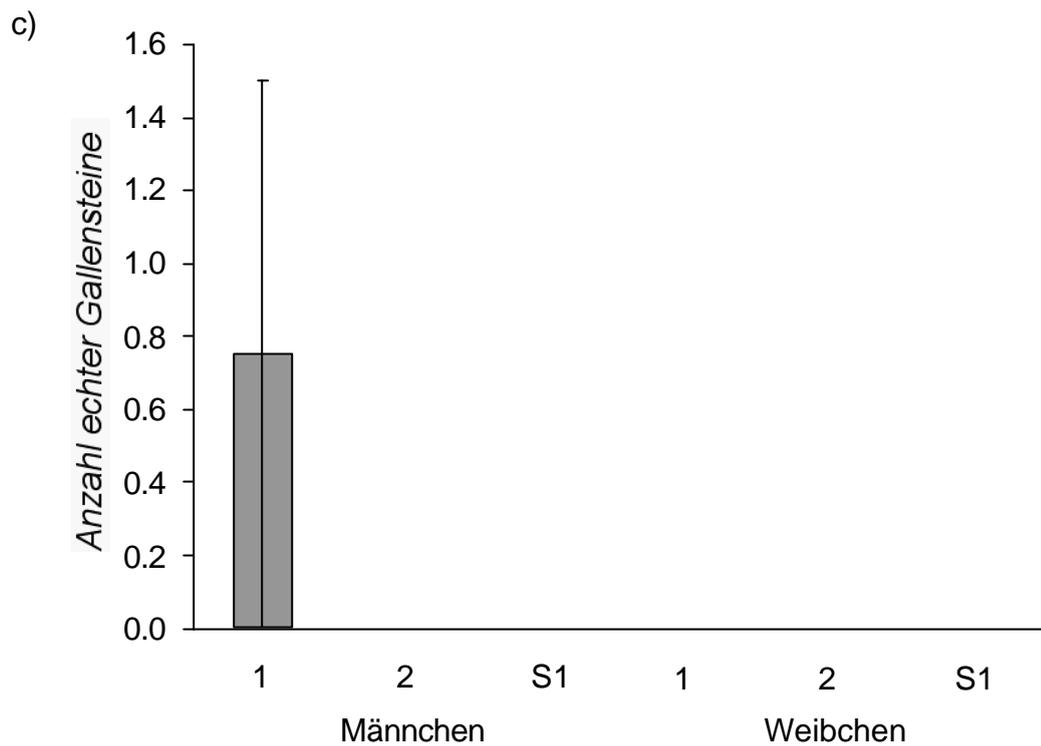


Abb. 3-18: Cholesterinkristallisation und Gallensteinvorkommen nach 8-wöchiger lithogener Diät

Transgene Mäuse (Linien 1 und 2) und Wildtyp-Mäuse (S1) wurden über 4 Wochen mit lithogener Diät gefüttert. Die Galle wurde unter dem Mikroskop analysiert und relativ quantifiziert. a) Relativer ChM-Kristallgehalt, b) Relativer Sandsteingehalt und c) Anzahl echter Gallensteine. □ Wildtyp 129S1, ■ *Abcb11* BAC-transgene Linien 1 und 2. N = 3-9, Mittelwert ± SEM.

4 DISKUSSION

Epidemiologische Studien, Familien- und Zwillingsstudien sowie Assoziationsstudien belegen eine genetische Prädisposition für die Cholesterin-Cholelithiasis. Kreuzungen von Mausinzuchtstämmen unterstützen diese Ergebnisse nicht nur, sondern zeigen in Quantitative Trait Locus Analysen, dass es sich um eine polygene, dominante Erkrankung handelt (s. Kap. 1.3). Durch diese leistungsfähige Methode konnten chromosomale Regionen eingegrenzt werden, die mit dem quantitativen Phänotyp der Gallensteinentstehung unter lithogener Provokationsdiät gekoppelt sind. Erst kürzlich wurde in einer neuen Kreuzung zwischen den Mausstämmen CAST/Ei und DBA/2J der Hauptlocus *Lith 1* auf Chromosom 2 bestätigt und ein neuer Gallenstein-Locus *Lith 6* auf Chromosom 6 identifiziert [89]. Dieser Locus enthält das Gen für den Peroxisomen Proliferator Aktivierten Rezeptor γ *Pparg*. Die kartierten Regionen erlauben eine gezielte Untersuchung von Kandidatengenen für einen komplexen Phänotyp. Denn trotz ihrer großen sozioökonomischen Bedeutung und Aufklärung ihrer physikalisch-chemischen Parameter ist über die molekulargenetische Grundlage der Gallensteinentstehung wenig bekannt.

Die Ermittlung der *Abcb11*-Genstruktur ist die Basis für vergleichende und funktionelle Untersuchungen des Kandidatengens

Das Gen des kanalikulären Gallensäuretransporters *Abcb11* stellt aufgrund seiner Kolokalisation mit dem Hauptlocus *Lith 1* und seiner differentiellen Expression in Hepatozyten von AKR und C57L ein attraktives Kandidatengen für die Cholesterin-Gallensteinentstehung dar [60, 61]. In der vorliegenden Arbeit sollte in der molekularen Analyse das *Abcb11*-Gen näher charakterisiert werden. Zunächst wurden durch Primer Walking und Genome Walking die teilweise bekannte cDNA-Sequenz vervollständigt bzw. neue Sequenzinformation im unbekanntem Promotorbereich erzeugt. Daneben wurde eine BAC-Bibliothek nach *Abcb11*-positiven Klonen durchsucht und der ausgewählte Klon RP23-291P1 durch die *Trans NIH Mouse Initiative* als bevorzugter Klon des öffentlichen Maus-Genomprojektes vollständig sequenziert. Dies war die Grundlage, um die Genstruktur von *Abcb11* durch ein Alignment von cDNA und genomischer Sequenz zu ermitteln

(Abb. 3–2). Die Maus-Genstruktur von *Abcb11* mit 28 Exons, Translationsstartcodon in Exon 2 und einer langen 3'-UTR entspricht der des humanen Transporters.

Interessant ist auch die Identifizierung weiterer unbekannter Exons in Intron 1 durch PCR von cDNA wie in *ABCA1*, einem anderen zur Familie der ABC-Proteine gehörigen Transporter. Die genaue Funktion von *ABCA1* ist unbekannt, das Protein ist aber im reversen Cholesterintransport involviert. In *ABCA1* hat die Identifizierung eines funktionellen LXR-Elementes und zweiten Promotors in Intron1 *in vitro* zur Entdeckung dreier alternativer Transkripte durch drei neue Exons im Intron 1 *in vivo* geführt [70]. Die Lage der unbekannt Exons vor dem Translationsstartcodon in Exon 2 bedingt in *ABCB11* keine unterschiedlichen Proteine, könnte aber eventuell eine regulatorische Bedeutung haben.

Nachdem die cDNA-Sequenz von *Abcb11* der Maus vervollständigt war, konnte ein Sequenzvergleich zwischen dem Gallenstein-sensitiven Inzuchtstamm C57L und dem resistenten AKR vorgenommen werden. Die cDNA-Sequenz der beiden Stämme ist identisch. Folglich muss auch die Aminosäuresequenz des Proteins identisch sein. Dabei kann auch ein Spleißdefekt ausgeschlossen werden, da die beiden Stämme in der Northern Hybridisierung ein Transkript gleicher Größe aufweisen (Lammert, unveröffentlichte Ergebnisse). Da sich auch die Sequenzen der Exons 1y und 1z in Intron1 nicht zwischen AKR und C57L unterscheiden, wurde ihre Rolle hier nicht weiter untersucht.

Die identifizierten Polymorphismen im 5'-Silencer-Element und im 3'-Enhancer-Element zeigen keine stammesspezifische Luciferaseaktivität

Nachfolgend wurde der Promotor des Gallensäuretransporters *ABCB11* nach einem strukturellen Unterschied zwischen C57L und AKR untersucht. Die Promotorsequenz der Stämme einschließlich ihrer bekannten Bindungsstelle IR1 für den nukleären Transkriptionsfaktor FXR, der als Gallensäuresensor des Hepatozyten fungiert, unterscheidet sich nicht.

Eine Ausdehnung des Sequenzvergleichs auf nicht-codierende Regionen, sollte auf weitere regulatorische Bereiche hinweisen. In der 5'-flankierenden Region des Gens wurde eine Cytosin/Thymidin-Transition im Gallenstein-sensitiven Stamm C57L detektiert, die in einem Lx8-Repeat-Element liegt (Abb. 3-3). Das Lx8-Repeat-Element gehört zur LINE 1-Familie von Retrotransposons. Für das Agouti-Gen wurde gezeigt, dass Elemente der Repeat-Familie

einen regulatorischen, epigenetischen Einfluss auf die Genexpression haben können [90]. Eine funktionelle Relevanz des detektierten Polymorphismus für die höhere *Abcb11*-Expression in C57L konnte durch einen Reporter-genassay nicht belegt werden. Das den Polymorphismus beinhaltende Lx8-Element beider Stämme zeigt jedoch eine Silencerfunktion und vermindert die Luciferaseaktivität gleichermaßen (von $0,32 \pm 0,05$ RLU des Minimalpromotors nach $0,17 \pm 0,01$ RLU; Abb. 3–7).

Für andere Gene konnte bereits ein regulatorischer Einfluss intronischer Bereiche auf die Transkription nachgewiesen werden. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in Intron 3 des humanen Calpain (*CAPN*) 10-Gens, der mit Diabetes Typ 2 assoziiert ist, zeigt eine differenzielle Aktivität im Luciferaseassay [91]. Außerdem wird eine mögliche regulatorische Bedeutung von Intron 1 des *Abcb11*-Gens dadurch unterstützt, dass im Inter-Speziesvergleich zwischen Maus und Mensch zwei konservierte Bereiche in Intron 1 detektiert wurden (Abb. 3-4). Die vergleichende Sequenzierung zwischen AKR und C57L von *Abcb11* ergab 19 Einzelnukleotid-Austausche sowie eine 5 bp-Insertion und eine 3 bp-Deletion in der Gallenstein-sensitiven Maus (Tab. 3-1) in den ersten 3300 bp des 13 kb langen Intron 1. Die intronischen Polymorphismen erscheinen umso interessanter, als dass sie mit putativen Bindungsstellen für Leber-spezifische Transkriptionsfaktoren kolokalisieren (Abb. 3-5b). Im Reporter-genassay erzeugt das Intron 1-Fragment eine Erhöhung der Luciferaseaktivität, was wiederum auf ein regulatorisches (Enhancer-)Potential hinweist. Jedoch unterscheidet sich die Aktivität zwischen AKR und C57L, auch bei zusätzlicher Kotransfektion mit den hepatischen Transkriptionsfaktoren HNF3 β und C/EBP α nicht (Abb. 3-8). Dadurch konnte keine funktionelle Bedeutung der Polymorphismen für die unterschiedliche Gallensteinsuszeptibilität der Mauseinzuchtstämme nachgewiesen werden.

Die potenzielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle des ersten Introns bildet einen spezifischen DNA-Protein-Komplex

In EMSAs konnte gezeigt werden, dass eine mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle in Intron 1, die die 5bp-Insertion und 3bp-Deletion umfasst, einen DNA-Protein-Komplex mit nukleärem Extrakt aus AKR und C57L-Lebern bildet (Abb. 3-9). Da durch Inkubation mit einem HNF3 β -Antikörper und nicht-markierten Oligos bekannter HNF3 β -

Bindungsstellen kein Supershift bzw. nur eine Teilkompetition des DNA-Protein-Komplexes erreicht werden konnte, die der Kompetition durch ein nicht-markiertes Nonsense-Oligo entspricht, handelt es sich bei HNF3 β vermutlich nicht um das bindende Protein in diesem Komplex. Es wurde hier nicht weiter untersucht, welcher Transkriptionsfaktor an dem spezifischen Komplex beteiligt ist, weil keine differenzielle Bindungsstärke zwischen den Mausstämmen detektiert wurde.

Gallenstein-sensitive Mausinzuchtstämme zeigen einen spezifischen Haplotypen im *Lith 1*-Locus

Auch wenn mit den vorhandenen funktionellen *in vitro*-Methoden kein Nachweis über die Relevanz der identifizierten Polymorphismen in der Gallensteinentstehung erbracht werden konnte, unterstreicht die *Abcb11*-Haplotypverteilung in verschiedenen Inzuchtstämmen die Bedeutung dieser strukturellen Region bei der Entstehung echter Gallensteine. So entspricht der Haplotyp aller getesteten sensitiven Inzuchtstämme dem von C57L, der der resistenten Stämme -mit Ausnahme von 129S1- dem von AKR (Tab. 3-2). Die Haplotypverteilung unterstützt das Vorgehen, den in der QTL-Analyse ermittelten strukturellen Unterschied in der Nukleotidsequenz zu suchen. Denkbar wäre daneben auch eine strukturelle Differenz auf höherer, epigenetischer Ebene, wie im Methylierungsmuster von Cytosin-/Guanosin-Inseln der DNA oder auch im Modifikationsmuster (Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung) am Amino-terminalen Ende der Histone [92, 93].

Die Herstellung der BAC-transgenen Maus erzeugt eine physiologische *Abcb11*-Expressionssteigerung *in vivo*

Parallel zum molekularen Ansatz sollte in einem physiologischen Ansatz durch eine *Abcb11* BAC-transgene Maus, die Rolle des Gens in der Gallensteinentstehung untersucht werden. Im Rahmen dieses Projektes wurde in Kooperation mit dem Jackson Labor, Bar Harbor, USA eine BAC-transgene Maus angestrebt, da der Transfer dieser langen DNA-Fragmente die Expression komplexer Transkriptionseinheiten und die Integration kritischer regulatorischer und isolatorischer Regionen ermöglicht [94]. Normalerweise werden nur 1 bis 5 Kopien eines BACs in das Empfängergenom integriert, so dass eine physiologische

Expressionssteigerung zu erwarten ist. Diese Steigerung entspricht der Größenordnung der höheren Expression von *Abcb11* im Gallenstein-suszeptiblen Stamm C57L im Vergleich zum resistenten AKR. Die Expressionssteigerung von *Abcb11* und damit die Erhöhung der Sekretion des Cholesterinlösungsvermittlers Gallensäuren bei einer höheren Gallensteinprävalenz im natürlichen Modell könnte paradox erscheinen. Dabei sollte erwähnt werden, dass es in der Literatur mittlerweile gegensätzliche Ergebnisse zur *Abcb11*-Expression gibt. Müller et al. konnten keine differenzielle *Abcb11*-Expression auf RNA- und Proteinebene zeigen [95]. Messungen zur Gallensäuresekretion in dieser Studie existieren aber nicht. Die Diskrepanz in der Expressionsrate könnte teilweise auf unterschiedliche Methoden zurückzuführen sein. Es ist nicht auszuschließen, dass die Fastenzeit der Mäuse vor ihrer Tötung einen Einfluss auf die Expression von hepatischen Genen, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind, hat. In einer Microarray-Analyse der Ratte wurden Schlüsselenzyme des Stoffwechsels, wie z. B. die HMGCoA-Synthase identifiziert, die nach 24-stündigem Fasten unterschiedlich exprimiert werden [96].

Die Inzuchtmäuse sind selbst der beste Beleg dafür, dass mit einer erhöhten Gallensäuresekretion eine größere Gallensteinprävalenz einhergeht: 85% Prävalenz im sensitiven Stamm C57L im Vergleich zu 15% Prävalenz im resistenten Stamm AKR. Außerdem tritt neben einer erhöhten Gallensäuresekretion eine verstärkte Cholesterinsekretion auf, so dass in C57L-Mäusen die Cholesterin-/Phosphatidylcholinratio von 0,41 auf 0,54 nach 8-wöchiger lithogener Diät ansteigt, während sie in AKR-Mäusen von 0,31 auf 0,27 leicht abfällt [37]. Bemerkenswert ist auch, dass der Phänotyp humaner, adipöser Gallensteinträger der Situation in der Maus entspricht. Adipöse Patienten mit Gallensteinen zeigen eine erhöhte Gallensäuresekretion, die auf eine gesteigerte *Abcb11*-Expression zurückzuführen sein könnten [97]. Daten zur Expression, die anhand von Leberbiopsien ermittelt werden könnten, existieren allerdings nicht. Da die Adipositas einen Risikofaktor für Gallensteine darstellt [98], erstaunt es nicht, dass *Lith 4* auf dem X-Chromosom mit QTLs für Adipositas überlappt [49, 51].

Durch die Sequenzierung des gesamten BACs RP23-291P1 durch die *Trans NIH Mouse Initiative* wurde nachgewiesen, dass dieser für die Mikroinjektionen ausgewählte BAC neben *Abcb11* kein weiteres Kandidatengen für *Lith 1* enthält. 5'-wärts des *Abcb11*-Gens befindet sich nur das *Glucose-6-Phosphatase Catalytic Related Protein (G6pc-rs)*, welches vornehmlich im Pankreas exprimiert wird und dessen Funktion noch unbekannt ist [99]. Des

Weiteren liegt am 5'-Ende des BAC-Inserts ein unvollständiger EST (Expressed Sequence Tag) unbekannter Funktion. 3'-wärts liegt das Mitglied der Komplementfaktorfamilie Integrin Alpha X (*Cd11c*), welches ebenfalls unvollständig ist.

Mittels einer Southern Hybridisierung der erhaltenen *Abcb11* transgenen Mäuse konnte gezeigt werden, dass in beiden Linien 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-29IP1)*1 und -2flp neben dem endogenen Gen ein bis zwei zusätzliche Kopien von *Abcb11* vorliegen (Abb. 3-11). In einer Northern Hybridisierung konnte bestätigt werden, dass der Gallensäuretransporter *Abcb11* entsprechend der Ergebnisse in der Southern Analyse 1,5 bis 2-fach stärker in den transgenen Mäusen exprimiert wird; die beiden transgenen Linien unterscheiden sich nicht in der Expression. Die *Abcb11*-Expression in Männchen ist etwa doppelt so hoch wie in Weibchen (Abb. 3-12). Männliche und weibliche Mäuse differieren in vielen Aspekten des Cholesterin- und Gallensäurenmetabolismus [100]. Die niedrigere *Abcb11*-Expression in den BAC-transgenen Weibchen könnte auf einen inhibitorischen Effekt von Östrogen zurückzuführen sein. Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl mRNA-Expression als auch Promotoraktivität von *Abcb11* der Ratte durch β -Estradiol gehemmt werden [72, 101].

Diese Rekapitulation der natürlichen Expressionsunterschiede im Wildtyp belegen, dass die zusätzlichen Kopien des *Abcb11*-Gens mit ihrer biologischen Transkriptionseinheit in das Genom integriert wurden. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Elemente für den geschlechtsspezifischen Einfluss in *cis* liegen.

Die gleiche Kopienzahl und Expression des Transgens in den beiden Linien 129S1/SvImJ-*Tg(RP23-29IP1)*1flp und -2flp weist darauf hin, dass vermutlich kein phänotypischer Unterschied zwischen diesen zu erwarten ist. Es ist aber anzunehmen, dass sich die beiden Linien im Integrationsort des BACs im Genom unterscheiden. Ein Unterschied im Gallenstein-Phänotyp bzw. der Subphänotypen würde sich also auf verschiedene Integrationsorte begründen, die die Regulation in *trans* beeinflussen. Die Insertion in ein anderes vom Gallenstein-Phänotyp zusammenhangloses Gen könnte eventuell zu einem unerwarteten *knockout* führen.

Die physiologische Steigerung der *Abcb11*-Expression führt zu einer tendenziell höheren Gallensteinsuszeptibilität

Da vor allem die Frage geklärt werden sollte, ob eine erhöhte *Abcb11*-Expression, die Gallensteinentstehung beeinflusst, ob also die *Abcb11* BAC-transgenen Mäuse Gallensteinanfälliger sind, als der Wildtyp 129S1, wurden die Mäuse mit einer lithogenen Provokationsdiät gefüttert. Inzuchtmäuse entwickeln aufgrund ihres hydrophilen Gallensäuren-pools (ca. 50 % Tauro-Cholsäure, 40 % Tauro- β -Muricholsäure) spontan keine Gallensteine. Nur in der Wildmaus *Peromyscus maniculatus* konnte eine spontane Gallensteinbildung nachgewiesen werden, deren Ausprägung aber auch vom Ernährungsstatus der Maus abhängt [102].

Ein weiteres Beispiel für spontane Gallensteinentwicklung ist die *Abcb4*-Knockout-Maus. Sie sezerniert kein Phosphatidylcholin in die Galle [103] und zeichnet sich durch eine hohe Gallensäuren-/Phosphatidylcholinratio sowie eine hohe Cholesterin-/Phosphatidylcholinratio aus. Mikroskopische Untersuchungen 12 bis 15 Wochen alter Mäuse zeigten Gallensteine aus wasserfreien Cholesterinnadeln in der Gallenblase und bei älteren Mäusen auch in den Gallengängen und intrahepatisch [104]. Somit etabliert das Knockout-Modell *Abcb4* als genetischen Risikofaktor für Gallensteine. Eine Übertragung der im Tiermodell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist inzwischen auch gelungen. Rosmorduc et al. identifizierten Patienten mit intrahepatischen Steinen, die Mutationen im *Abcb4*-Gen zeigen [32].

Die Cholesterin-Gallensteinbildung erfolgt über verschiedene Stufen von Cholesterin-Phospholipid-Vesikeln. Bezüglich des Gehaltes an Mucin, aggregierten und fusionierten Flüssigkristallen sowie Cholesterinnadeln, die zuerst nach 2-wöchiger Fütterung der lithogenen Diät auftreten, ist in der Galle beider transgener Linien und der der Wildtyp-Mäuse kein Unterschied zu verzeichnen (Tab. 3-4). Dies zeigt, dass auch der Wildtypstamm 129S1 eine deutlich übersättigte Galle entwickelt und sich unter den lokalen Bedingungen als weniger resistent erweist, als nach der *Phenome Database* des Jackson Labors zu erwarten. Ein möglicher Grund könnte der etwas höhere Cholesteringehalt in der hier verwendeten Diät von 1,25 % gegenüber 1 % im Jackson Labor sein.

Die *Abcb11* BAC-transgenen Weibchen und die 129S1 Wildtyp-Weibchen zeigen unter den Aachener Bedingungen eine niedrigere Gallensteinsuszeptibilität als die Männchen. Dies

deckt sich nicht mit den Angaben der *Phenome Database*, nach der die 129S1-Weibchen eine Gallensteinprävalenz von 20% haben, die Männchen von 0%. Das Ergebnis stimmt aber überein mit der Suszeptibilität verschiedener anfälliger Stämme wie C57L/J oder C57BL6/J oder intermediärer Stämme wie BALB/cJ, in denen die Männchen mehr Steine und Kristalle aufweisen (Tab. 3-2).

In den *Abcb11*-transgenen Mäusen zeigt sich nach 4- und 8-wöchiger Fütterung eine tendenziell höhere ChM-Kristallbildung, Sandsteinbildung und Anzahl echter Gallensteine (Abb. 3-17 u. 3-18). Diese Tendenz unterstreicht die Hypothese, dass eine veränderte Gallensäuresekretion einen Einfluss auf die Cholesterinhomöostase hat und somit einen genetischen Risikofaktor für pathophysiologische Veränderungen der Galle darstellt.

Weitere Untersuchungen sind hier jedoch notwendig, um den genauen Einfluss der erhöhten Gallensäuresekretion auf die Gallenhomöostase zu bestimmen. Eine Analyse der Lipidzusammensetzung, also der prozentualen Anteile der Galle an Gallensäuren, Cholesterin und Phosphatidylcholin und die damit verbundene Ermittlung des Cholesterinsättigungsindex sollte eine bessere Einordnung des Gallensteinphänotyps ermöglichen.

In diesem Zusammenhang sollte selbstverständlich auch die Expression des Phosphatidylcholin-Transporters *Abcb4* und des putativen Cholesterintransporters *Abcg5/8* untersucht werden. So kann eine Interaktion der Gene untereinander und Primär- von Sekundäreffekten unterschieden werden. Entsprechend kann auch die Analyse des Einflusses einer gesteigerten *Abcb11*-Expression auf weitere Gene, die an der Cholesterinhomöostase beteiligt sind, wie z. B. die Cholesterin-7 α -Hydroxylase *Cyp7a1* oder auch basolaterale Transporter wie z. B. den Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter *Slc22a1*, Aufschluss über die Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts in der Galle geben.

Modifikationen des *Abcb11*-transgenen Mausmodells könnten die Frage zur Identität von *Abcb11* und *Lith 1* eindeutig klären

Die erhaltenen Ergebnisse des Gallensteinphänotyps zeigen eine Tendenz der transgenen Mäuse zur Suszeptibilität an. Als mögliche Erklärung für die verminderte Resistenz des Wildtyp-Stammes wurde bereits der leicht erhöhte Cholesteringehalt der lithogenen Provokationsdiät angeführt. Es bieten sich noch weitere Ansatzpunkte, um das Mausmodell

so zu verändern, dass sich ausgeprägtere Steinphänotypen entwickeln. Zunächst kann durch die Erzeugung homozygoter transgener Mäuse untersucht werden, ob durch eine weitere Steigerung der *Abcb11*-Expression, die Gallesekretion so beeinflusst werden kann, dass sie die Lipidzusammensetzung der Galle dahingehend verändert, dass diese sich eindeutig aus der mizellären Phase entfernt. Dadurch könnte eine Dosis-Phänotyp-Abhängigkeit aufgezeigt werden, wie sie für Angiotensinogen in transgenen Mäusen mit 1 bis 4 Genkopien dokumentiert wurde [105].

Ein anderer wichtiger Ansatzpunkt ist der Stammeshintergrund des transgenen Mausmodells. Wie in Kap. 3.3.1 dargestellt war die Herstellung der BAC-transgenen Maus nur auf dem 129S1-Hintergrund möglich. Durch die vergleichende Sequenzierung konnte inzwischen gezeigt werden, dass der Haplotyp von 129S1 dem des Gallenstein-sensitiven Stammes C57L entspricht, obwohl 129S1 einen nach der *Phenome Database* resistenten bzw. nach der vorgenommenen Fütterung zumindest intermediären Gallensteinphänotyp aufweist. Da es sich bei der Gallensteinentstehung um einen komplexen Phänotyp handelt, der auf der Interaktion mehrerer Gene beruht, muss der Haplotyp für ein Kandidatengen im *Lith 1*-Locus selbstverständlich nicht für alle resistenten Stämme identisch sein. Bei den Stämmen der 129-er Mauslinie muss darüber hinaus berücksichtigt werden, dass es sich um eine heterogene Linie handelt, die Einflüssen verschiedener anderer Inzuchtstämme unterlag [106, 107]. Es kann also bei der Ermittlung des Kandidatengens, in dem ein struktureller, auf einem QTL basierender Unterschied liegt, wichtig sein, dass der Stammeshintergrund dem der ursprünglichen QTL-Analyse entspricht. Für das *Abcb11* BAC-transgene Mausmodell ist hier also eine Rückkreuzung auf den AKR-Hintergrund zu empfehlen, der sich als eindeutig Gallenstein-resistent erwiesen hat. Nach 10 Generationen der Rückkreuzung gilt ein Stamm als kongen [42] und enthält in diesem Fall in einem 99,9%-igen AKR-Hintergrund das Transgen des suszeptiblen C57BL/6J-Stammes (mit C57L-Haplotyp). Erst wenn das *Abcb11*-transgene Modell so modifiziert wird, ist eine eindeutige Aussage über eine Identität des Gallensäuretransporters *Abcb11* mit *Lith 1* möglich.

Der *Lith 1*-Locus könnte eine Gruppe funktionell verwandter Gene darstellen, die gemeinsam die Gallensteinsensitivität beeinflussen

Im *Lith 1*-Locus gibt es mittlerweile neue Erkenntnisse zum zweiten Kandidatengen, dem Gen für das Low Density Lipoprotein Related Protein *Lrp2*. Der Multiligandenrezeptor LRP2 wird in der Niere exprimiert und ist unter anderem an der Vitamin D-Reabsorption beteiligt [108, 109]. Da durch Immunhistochemie inzwischen eine differenzielle *LRP2*-Expression in der Gallenblase und ein Polymorphismus im Promotor detektiert werden konnten (Davids und Lammert, unveröffentlichte Ergebnisse), könnte *LRP2* doch ein interessantes Kandidatengen darstellen. Falls LRP2 in der Gallenblase als Vitamin A-Rezeptor fungiert und in einem Feedback-Mechanismus die Retinolsekretion beeinflusst, könnte es so über den nukleären Rezeptor FXR, der als Heterodimer mit dem Retinoid Rezeptor RXR agiert, an der Regulation des Gallensäuretransporters ABCB11 beteiligt sein. Ausserdem wurde kürzlich die Megalin Knockout-Maus mit der lithogenen Diät gefüttert und phänotypisiert. Die Mäuse zeigen bereits ohne Fütterung stark vergrößerte Gallenblasen und entwickeln tendenziell mehr ChM-Kristalle und Gallensteine (Bock und Lammert, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Identifizierung mehrerer Kandidatengene innerhalb eines QTLs bedeutet nicht, dass diese Gene einander als Kandidaten ausschließen. Es ist durchaus möglich, dass *Lith 1* eine Gruppe von funktionell verwandten Genen darstellt und den additiven Effekt von Polymorphismen in diesen wiedergibt, wie schon für andere QTLs gezeigt wurde [110, 111]. Dadurch kommt ein entsprechend hoher LOD-Score ($> 3,3$ für *Lith 1*) bei der QTL-Analyse zustande.

Ausblick

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit konnten einen wesentlichen Beitrag zur Charakterisierung des *Abcb11*-Gens leisten. Die Genstruktur konnte aufgeklärt und zwischen Gallenstein-sensitiven und resistenten Mausinzuchtstämmen verglichen werden. Mit den erhaltenen Einblicken in die Regulation des Gallensäuretransporters konnte noch nicht bewiesen werden, dass der strukturelle Unterschied von *Lith 1* tatsächlich im *Abcb11*-Gen bzw. seinen regulatorischen Einheiten zu finden ist. Die *Abcb11* BAC-transgene Maus könnte möglicherweise mit den vorgeschlagenen Modifikationen des Modells die Frage zur

Identität des Gallensäuretransporters *Abcb11* und des Gallensteinlocus *Lith 1* eindeutig klären.

Wie in Kap. 1 erläutert handelt es sich bei der Cholesterin-Cholelithiasis um einen multifaktoriellen Phänotyp. Nachdem kürzlich durch die Herstellung einer transgenen Maus das Heterodimer aus ABCG5 und ABCG8 als der kanalikuläre Cholesterintransporter bestätigt wurde, sind die drei Transporter bekannt, die im Wesentlichen die Lipidzusammensetzung der Galle bestimmen [16]. Darüber hinaus wurde vor kurzem eine Kolo-kalisation von *Abcg5/8* mit einem Gallensteinlocus auf Chromosom 17 gezeigt [112].

Das *Abcb4* Knockout-Modell, aber auch erste Erkenntnisse aus den *Abcb11* und *Abcg5/8* transgenen Mäusen zeigen, dass eine veränderte hepatobiliäre Lipidsekretion durch ABC-Transporter der primäre pathophysiologische Defekt bei der Gallensteinbildung ist. Es gilt nun, die komplexen Interaktionen der kanalikulären Transporter untereinander, mit basolateralen sowie intrazellulären Transportern und Genen, die an Cholesterinsynthese und -abbau beteiligt sind, zu analysieren. Eine besondere Rolle wird hier der Kombination von Mausmodellen wie z. B. der *Abcb11* transgenen Maus mit der *Lrp2* Knockout-Maus zukommen. Die Kombination könnte klären, ob es sich bei *Lith 1* wirklich um einen additiven QTL aus funktionell verwandten genetischen Risikofaktoren handelt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung von Cholesterin-Gallensteinen zählt zu den polygenen Erkrankungen. Dies bedeutet, dass die Interaktion von multiplen genetischen Faktoren mit Umwelteinflüssen, die quantitative Ausprägung des Phänotyps beeinflusst. Die Gallensteingene liegen in Quantitative Trait Loci (QTLs), d. h. chromosomalen Regionen, die mit der Cholesterin-Cholelithiasis assoziiert sind. In dieser Arbeit wurde ein Kandidatengen für den Cholesterin-Gallensteinlocus *Lith 1*, das Gen für den kanalikulären Gallensäuretransporter der Leber *Abcb11*, genauer charakterisiert und durch die Herstellung einer BAC (Bakterielles Artifizielles Chromosom)-transgenen Maus *in vivo* überexprimiert.

In der molekularbiologischen Analyse wurden mittels Plasmid- und BAC-klonierter DNA-Fragmente sowie verankerter PCR (Genome Walking) auf genomischer DNA Sequenzinformationen in unbekanntem Bereichen des *Abcb11*-Gens erzeugt und die genomische Struktur des Gens aufgeklärt.

Die Sequenzen des Gallenstein-sensitiven Mausstammes C57L/J und des resistenten Stammes AKR/J wurden durch Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse und Direktsequenzierung von PCR-Fragmenten verglichen. Die cDNA beider Stämme ist identisch. In der 5'-flankierenden Region des Gens konnte bei -3.757 ein C/T-Polymorphismus und im ersten Intron konnten 19 Einzelnukleotidaustausche sowie eine 5 bp-Insertion und eine 3 bp-Deletion lokalisiert werden.

Die funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen wurde in Dualluciferase-Assays durch Kotransfektion mit nukleären Rezeptoren und im Elektrophoretischen Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA) überprüft. Die experimentellen Untersuchungen wurden durch *in silico* Sequenzanalysen ergänzt. Wenngleich die untersuchten Bereiche regulatorisches Potenzial aufweisen, konnte ihre Bedeutung für eine differenzielle Transkriptionsregulation zwischen den Inzuchtmausstämmen nicht nachgewiesen werden.

Für die physiologische Analyse des Effekts einer gesteigerten *Abcb11*-Expression auf die Cholesterinhomöostase wurde mit Hilfe einer radioaktiv markierten Sonde eine genomische BAC-Bibliothek nach *Abcb11*-positiven Klonen durchsucht, die DNA isoliert und aufgereinigt.

Nach Mikroinjektion in die Pronuclei Gallenstein-resistenter Mausstämme, wurden zwei *Abcb11* BAC-transgene Founder-Linien auf dem 129S1/SvImJ-Stammeshintergrund erzeugt. Anhand von Southern und Northern Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass beide Linien 1 – 2 Genkopien zusätzlich zu ihren endogenen *Abcb11*-Kopien in ihr Genom integriert haben und diese exprimieren. Die transgenen Mäuse zeigen eine normale Entwicklung und keinen offensichtlichen Phänotyp. Durch Fütterung einer cholesterinreichen Provokationsdiät wurden Cholesterin-Kristallbildung und Gallensteinentstehung induziert. In den transgenen Mäusen zeichnet sich im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen eine tendenziell höhere Gallensteinsuszeptibilität ab.

Die Herstellung der *Abcb11* BAC-transgenen Maus wird mit ihren Variationsmöglichkeiten einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Identität des Cholesterin-Gallensteinlocus *Lith 1* und des kanalikulären Gallensäuretransporters *Abcb11* sowie zur Erforschung der komplexen Interaktionen der an der biliären Cholesterinhomöostase beteiligten Proteine leisten.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Gerste B. Operationshäufigkeit in Krankenhäusern 1996 bis 1999. In Krankenhaus-Report 2000. M. Arnold, M. Litsch, and H. Schellschmidt, (Hrsg.). Schattauer, Stuttgart 2001. 415-424.
2. Matern S. Cholelithiasis. In Hepatologie. W. Gerok, and H.E. Blum, (Hrsg.). Urban & Schwarzenberg, München 1995. 565-596.
3. Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 2000; 32: 3-18.
4. Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J. Clin. Invest.* 1968; 47: 1045-1052.
5. Small DM. Physico-chemical studies of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* 1967; 52: 607-610.
6. Lichtenberg D, Ragimova S, Bor A, Almog S, Vinkler C, Kalina M, Peled Y, Halpern Z. Stability of mixed micellar bile models supersaturated with cholesterol. *Biophys. J.* 1988; 54: 1013-1025.
7. Carey MC, Small DM. Solution properties of taurine and glycine conjugates of fusidic acid and its derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* 1973; 306: 51-57.
8. Carey MC, Lamont JT. Cholesterol gallstone formation. 1. Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. *Prog Liver Dis* 1992; 10: 139-163.
9. Oude Elferink RP, Groen AK. Mechanisms of biliary lipid secretion and their role in lipid homeostasis. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 293-305.
10. Paumgartner G, Sauerbruch T. Gallstones: pathogenesis. *Lancet* 1991; 338: 1117-1121.
11. LaMont JT, Carey MC. Cholesterol gallstone formation. 2. Pathobiology and pathomechanics. *Prog Liver Dis* 1992; 10: 165-191.
12. Busch N, Matern S. Current concepts in cholesterol gallstone pathogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991; 21: 453-460.
13. Apstein MD, Carey MC. Pathogenesis of cholesterol gallstones: a parsimonious hypothesis. *Eur J Clin Invest* 1996; 26: 343-352.

14. Lee MH, Lu K, Patel SB. Genetic basis of sitosterolemia. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 141-149.
15. Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H, Ose L, Stalenhoef AF, Mietinnen T, Bjorkhem I, Bruckert E, Pandya A, Brewer HB, Jr., Salen G, Dean M, Srivastava A, Patel SB. Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin- 2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 278-290.
16. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002; 110: 671-680.
17. Burkitt DP, Tunstall M. Gall-stones: geographical and chronological features. *J Trop Med Hyg* 1975; 78: 140-144.
18. Brett M, Barker DJ. The world distribution of gallstones. *Int J Epidemiol* 1976; 5: 335-341.
19. Maclure KM, Hayes KC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC. Weight, diet, and the risk of symptomatic gallstones in middle-aged women. *N Engl J Med* 1989; 321: 563-569.
20. Attili AF, Scafato E, Marchioli R, Marfisi RM, Festi D. Diet and gallstones in Italy: the cross-sectional MICOL results. *Hepatology* 1998; 27: 1492-1498.
21. Sampliner RE, Bennett PH, Comess LJ, Rose FA, Burch TA. Gallbladder disease in pima indians. Demonstration of high prevalence and early onset by cholecystography. *N Engl J Med* 1970; 283: 1358-1364.
22. Reid JM, Fullmer SD, Pettigrew KD, Burch TA, Bennett PH, Miller M, Whedon GD. Nutrient intake of Pima Indian women: relationships to diabetes mellitus and gallbladder disease. *Am J Clin Nutr* 1971; 24: 1281-1289.
23. Kesaniemi YA, Koskenvuo M, Vuoristo M, Miettinen TA. Biliary lipid composition in monozygotic and dizygotic pairs of twins. *Gut* 1989; 30: 1750-1756.
24. Van der Linden W. Genetic factors in gallstone disease. *Clin Gastroenterol* 1973; 2: 603-614.
25. Attili AF, Capocaccia R, Carulli N, Festi D, Roda E, Barbara L, Capocaccia L, Menotti A, Okolicsanyi L, Ricci G, Lalloni L, Mariotti S, Sama C, Scafato E. Factors

- associated with gallstone disease in the MICOL experience. Multicenter Italian Study on Epidemiology of Cholelithiasis. *Hepatology* 1997; 26: 809-818.
26. Kratzer W, Kron M, Hay B, Pfeiffer MM, Kachele V. Prävalenz der Cholezystolithiasis in Süddeutschland - eine sonographische Untersuchung an 2.498 Personen einer ländlichen Bevölkerung. *Z Gastroenterol* 1999; 37: 1157-1162.
 27. Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map. *Gastroenterology* 2001; 120: 221-238.
 28. Bertomeu A, Ros E, Zambon D, Vela M, Perez-Ayuso RM, Targarona E, Trias M, Sanllehy C, Casals E, Ribo JM. Apolipoprotein E polymorphism and gallstones. *Gastroenterology* 1996; 111: 1603-1610.
 29. Han T, Jiang Z, Suo G, Zhang S. Apolipoprotein B-100 gene *XbaI* polymorphism and cholesterol gallstone disease. *Clin Genet* 2000; 57: 304-308.
 30. Lin JP, Hanis CL, Boerwinkle E. Genetic epidemiology of gallbladder disease in Mexican-Americans and cholesterol 7 α -hydroxylase gene variation. *Am J Hum Genet* 1994; 55: A48 (abstr.).
 31. Juvonen T, Savolainen MJ, Kairaluoma MI, Lajunen LH, Humphries SE, Kesaniemi YA. Polymorphisms at the *apoB*, *apoA-I*, and cholesteryl ester transfer protein gene loci in patients with gallbladder disease. *J Lipid Res* 1995; 36: 804-812.
 32. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2001; 120: 1459-1467.
 33. Paigen K. A miracle enough: the power of mice. *Nature Med* 1995; 1: 215-220.
 34. Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genet* 1995; 11: 241-247.
 35. Wang DQ, Lammert F, Cohen DE, Paigen B, Carey MC. Cholic acid aids absorption, biliary secretion, and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G751-760.
 36. Wang DQ, Paigen B, Carey MC. Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: physical-chemistry of gallbladder bile. *J Lipid Res* 1997; 38: 1395-1411.

37. Wang DQ, Lammert F, Paigen B, Carey MC. Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: pathophysiology of biliary lipid secretion. *J Lipid Res* 1999; 40: 2066-2079.
38. Lammert F, Wang DQ, Paigen B, Carey MC. Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes. *J Lipid Res* 1999; 40: 2080-2090.
39. Copeland NG, Jenkins NA, Gilbert DJ, Eppig JT, Maltais LJ, Miller JC, Dietrich WF, Weaver A, Lincoln SE, Steen RG, et al. A genetic linkage map of the mouse: current applications and future prospects. *Science* 1993; 262: 57-66.
40. Khanuja B, Cheah YC, Hunt M, Nishina PM, Wang DQ, Chen HW, Billheimer JT, Carey MC, Paigen B. *Lith 1*, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7729-7733.
41. Paigen B, Schork NJ, Svenson KL, Cheah YC, Mu JL, Lammert F, Wang DQ, Bouchard G, Carey MC. Quantitative trait loci mapping for cholesterol gallstones in AKR/J and C57L/J strains of mice. *Physiol Genomics* 2000; 4: 59-65.
42. Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ. Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genet* 1997; 17: 280-284.
43. Lammert F, Beier DR, Wang DQ, Carey MC, Paigen B, Cohen DE. Genetic mapping of hepatocanicular transporters establishes Sister-P-glycoprotein (*Spgp*) as a candidate for the major gallstone gene (*Lith 1*). *Hepatology* 1997; 26: 358A (abstr.).
44. Bouchard G, Nelson HM, Lammert F, Rowe LB, Carey MC, Paigen B. High-resolution maps of the murine Chromosome 2 region containing the cholesterol gallstone locus, *Lith 1*. *Mamm Genome* 1999; 10: 1070-1074.
45. Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; 1: E157-162.
46. Bouchard G, Paigen B, Carey MC. Functional and genetic studies of *Abcc2* in inbred mice: evidence for a primary role of the canalicular conjugate organic anion transporter in *Lith2*-transmitted cholesterol gallstone susceptibility. In *Hepatology* 2000. Symposium in honour of Gustav Paumgartner. A.L. Gerbes, U. Beuers, D. Jüngst, G.R. Pape, M. Sackmann, and T. Sauerbruch, (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2001. 97-101.

47. Lammert F, Wang DQ, Wittenburg H, Bouchard G, Taenzler B, Hillebrandt S, Carey MC, Paigen B. Lith genes with independent loci for gallstone formation and mucin accumulation in A/J and AKR/J inbred mouse strains. *Hepatology* 2002; 36 (im Druck).
48. Zeisel SH, da Costa KA, Franklin PD, Alexander EA, Lamont JT, Sheard NF, Beiser A. Choline, an essential nutrient for humans. *FASEB J* 1991; 5: 2093-2098.
49. Wittenburg H, Lammert F, Wang DQ, Churchill GA, Li R, Bouchard G, Carey MC, Paigen B. Interacting susceptibility loci for cholesterol gallstones and gallbladder mucin in AKR and SWR strains of mice. *Physiol Genomics* 2001; 8: 67-77.
50. Angel TA, Faust CJ, Gonzales JC, Kenwrick S, Lewis RA, Herman GE. Genetic mapping of the X-linked dominant mutations striated (Str) and bare patches (Bpa) to a 600-kb region of the mouse X chromosome: implications for mapping human disorders in Xq28. *Mamm Genome* 1993; 4: 171-176.
51. York B, Lei K, West DB. Inherited non-autosomal effects on body fat in F2 mice derived from an AKR/J x SWR/J cross. *Mamm Genome* 1997; 8: 726-730.
52. Donner C, Choi S, Komaromy M, Cooper AD. Accelerated lipoprotein uptake by transplantable hepatomas that express hepatic lipase. *J Lipid Res* 1998; 39: 1805-1815.
53. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 537-592.
54. Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V. Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res* 1995; 55: 2029-2034.
55. Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 2001; 33: 1223-1231.
56. Green RM, Hoda F, Ward KL. Molecular cloning and characterization of the murine bile salt export pump. *Gene* 2000; 241: 117-123.
57. Lecureur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB, Schuetz JD. Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2000; 57: 24-35.
58. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. A gene

- encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998; 20: 233-238.
59. Torok M, Gutmann H, Fricker G, Drewe J. Sister of P-glycoprotein expression in different tissues. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 833-835.
60. Lammert F, Matern S. Genetic analysis of biliary lipid secretion in mouse models. In *Hepatobiliary Transport: From Bench to Bedside*. S. Matern, J.L. Boyer, D. Keppler, and P.J. Meier-Abt, (Hrsg.). Kluwer Academic Publishers, BV, Dordrecht 2001. 78-90.
61. Green RM, Ward K, Hoda F. Phenotypic characterization of ATP-dependent canalicular bile salt transport in C57L/J and AKR/J mice. *Hepatology* 2000; 32: 390A (abstr.).
62. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989.
63. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
64. Podvinec M, Kaufmann MR, Handschin C, Meyer UA. NUBIScan, an in Silico Approach for Prediction of Nuclear Receptor Response Elements. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1269-1279.
65. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
66. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York 1994. .
67. Wang DQ, Carey MC. 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. *J Lipid Res* 1996; 37: 606-630.
68. Hesse A, Molt K. Technik der infrarotspektroskopischen Harnsteinanalyse. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982; 20: 861-873.
69. Hesse A, Sanders A. Infrarotspektren-Atlas zur Harnsteinanalyse. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1988.

70. Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR, Tan B, Brooks-Wilson A, Kwok A, Bissada N, Yang YZ, Liu G, Tafuri SR, Fievet C, Wellington CL, Staels B, Hayden MR. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. *J Biol Chem* 2001; 276: 33969-33979.
71. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 2001; 276: 28857-28865.
72. Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ, Gartung C. Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 2002; 269: 3495-3503.
73. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, Muller M. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 2002; 35: 589-596.
74. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 1999; 3: 543-553.
75. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999; 284: 1362-1365.
76. Soares MB, Schon E, Efstratiadis A. Rat LINE1: the origin and evolution of a family of long interspersed middle repetitive DNA elements. *J Mol Evol* 1985; 22: 117-133.
77. Rothbarth K, Hunziker A, Stammer H, Werner D. Promoter of the gene encoding the 16 kDa DNA-binding and apoptosis-inducing C1D protein. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518: 271-275.
78. Cohen D, Higman SM, Hsu SI, Horwitz SB. The involvement of a LINE-1 element in a DNA rearrangement upstream of the *mdr1a* gene in a taxol multidrug-resistant murine cell line. *J Biol Chem* 1992; 267: 20248-20254.
79. Kashi Y, King D, Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 1997; 13: 74-78.
80. Qiu Y, Cavalier L, Chiu S, Yang X, Rubin E, Cheng JF. Human and mouse ABCA1 comparative sequencing and transgenesis studies revealing novel regulatory sequences. *Genomics* 2001; 73: 66-76.

81. Dubchak I, Brudno M, Loots GG, Pachter L, Mayor C, Rubin EM, Frazer KA. Active conservation of noncoding sequences revealed by three-way species comparisons. *Genome Res* 2000; 10: 1304-1306.
82. Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene* 2001; 262: 257-265.
83. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 1997; 272: 3137-3140.
84. Rausa FM, Tan Y, Zhou H, Yoo KW, Stolz DB, Watkins SC, Franks RR, Unterman TG, Costa RH. Elevated levels of hepatocyte nuclear factor 3 β in mouse hepatocytes influence expression of genes involved in bile acid and glucose homeostasis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8264-8282.
85. Costa RH, Grayson DR, Darnell JE, Jr. Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1415-1425.
86. Yellin TO, Klaiber MS, Webb E. Lithogenic effects of cholic acid and chenodeoxycholic acid in the cholesterol fed mouse. *Biochim Biophys Acta* 1973; 320: 478-485.
87. Bergman F, van der Linden W. Liver morphology and gallstone formation in hamsters and mice treated with chenodeoxycholic acid. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 1973; 81: 213-221.
88. Wang DQ, Carey MC. Characterization of crystallization pathways during cholesterol precipitation from human gallbladder biles: identical pathways to corresponding model biles with three predominating sequences. *J Lipid Res* 1996; 37: 2539-2549.
89. Lyons MA, Wittenburg H, Korstanje R, Walsh K, Carey M, Paigen B. Co-localization of quantitative trait loci for cholesterol gallstone susceptibility and plasma HDL cholesterol levels in an intercross of DBA/2J and CAST/Ei strains of mice. *Gastroenterology* 2002; 122: A626 (abstr.).
90. Whitelaw E, Martin DI. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 2001; 27: 361-365.

91. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 2000; 26: 163-175.
92. Urnov FD. Methylation and the genome: the power of a small amendment. *J Nutr* 2002; 132: 2450S-2456S.
93. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-1080.
94. Hammes A, Schedl A. Generation of transgenic mice from plasmids, BACs and YACs. In *Mouse genetics and transgenics. A practical approach*. I.J. Jackson, and C.M. Abbott, (Hrsg.). Oxford University Press, Oxford 2000. 217-245.
95. Muller O, Schalla C, Scheibner J, Stange EF, Fuchs M. Expression of liver plasma membrane transporters in gallstone-susceptible and gallstone-resistant mice. *Biochem J* 2002; 361: 673-679.
96. Kita Y, Shiozawa M, Jin W, Majewski RR, Besharse JC, Greene AS, Jacob HJ. Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 55-65.
97. Shaffer EA, Small DM. Biliary lipid secretion in cholesterol gallstone disease. The effect of cholecystectomy and obesity. *J Clin Invest* 1977; 59: 828-840.
98. Diehl AK. Epidemiology and natural history of gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20: 1-19.
99. Arden SD, Zahn T, Steegers S, Webb S, Bergman B, O'Brien RM, Hutton JC. Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes* 1999; 48: 531-542.
100. Turley SD, Schwarz M, Spady DK, Dietschy JM. Gender-related differences in bile acid and sterol metabolism in outbred CD-1 mice fed low- and high-cholesterol diets. *Hepatology* 1998; 28: 1088-1094.
101. Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ, Boyer JL. Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 2000; 118: 163-172.
102. Schwab RG, Theis JH. Annual cyclicality of gall stone prevalence in deer mice (*Peromyscus maniculatus gambelii*). *J Wildl Dis* 1989; 25: 462-468.

103. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75: 451-462.
104. Lammert F, Wang DQ, Paigen B, Carey MC. Spontaneous cholesterol gallstone formation on normal diet characterizes mice with disrupted *Mdr2* P-glycoprotein gene and provides new insights into cholesterol crystallization and bile formation. *Gastroenterology* 1998; 114: A527 (abstr.).
105. Kim HS, Lee G, John SW, Maeda N, Smithies O. Molecular phenotyping for analyzing subtle genetic effects in mice: application to an angiotensinogen gene titration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 4602-4607.
106. Threadgill DW, Yee D, Matin A, Nadeau JH, Magnuson T. Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm Genome* 1997; 8: 390-393.
107. Simpson EM, Linder CC, Sargent EE, Davisson MT, Mobraaten LE, Sharp JJ. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat Genet* 1997; 16: 19-27.
108. Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 1999; 96: 507-515.
109. Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F562-573.
110. Morel L, Blenman KR, Croker BP, Wakeland EK. The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, *Sle1*, is a cluster of functionally related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1787-1792.
111. Legare ME, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN. A major effect QTL determined by multiple genes in epileptic EL mice. *Genome Res* 2000; 10: 42-48.
112. Wittenburg H, Lyons MA, Renhua L, Carey MC, Paigen B. New cholesterol gallstone susceptibility (Lith) loci with attractive positional candidate genes in an intercross of PERA/Ei and I/Ln strains of mice. *Gastroenterology* 2002; 122: A-543 (abstr.).

DANKE...

Herrn Prof. Dr. Matern danke ich sehr für die Möglichkeit, dieses Projekt in seiner Abteilung durchführen zu können und für die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. Kreuzaler möchte ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Frank Lammert für die sehr gute Zusammenarbeit am Projekt und eine ausgezeichnete Betreuung: für immer gewährte Diskussionsbereitschaft über Methoden und Ergebnisse, für die unterstützende Vorbereitung auf Vorträge („give them hell“) und natürlich last but not least die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Der gesamten Forschungsabteilung sage ich danke für kleinere und größere Ratschläge, insbesondere Michaela Styrnik für die anfängliche methodische Einarbeitung sowie Daniela Falk (u.a. für die Hilfe an den Maustagen) und Sonja Hillebrandt als diejenigen des Lab Lammert, die mich die ganze Zeit begleitet haben. Nina Davids für Intronsequenzierungen, Bettina Jansen und Sonja Strauch für Zellen und Fragen zu diesen sowie Petra Schmitz für die EMSA-Einweisung. Hilde Keppeler vielen Dank fürs Korrekturlesen und den Medizinstudenten für die nette Atmosphäre.

Dr. Beverly Paigen, Karen Svenson und Ron Korstanje am Jackson Lab danke ich sehr für die produktive Kooperation sowie natürlich der Abteilung Microinjection, ohne die es unsere transgene Maus-flp nicht gäbe.

Herzlichen Dank auch an die Tierex für die Unterstützung bei Tierversuchsanträgen und Tierzuchtfragen, vor allem an Frau Dr. Scherer und Herrn Dr. Kluge, aber natürlich an alle Tierpfleger, die eine tolle Versorgung geleistet haben.

Ein großes Dankeschön an die Biomat für die selbstverständlich gewährte Hilfe bei methodischen Fragen zu Promotoranalysen, insbesondere an Michael und Beate.

Vielen lieben Dank an Henrike und Bärbel für fachliche und besonders moralische Unterstützung.

Cornel sei neben dem Korrekturlesen vor allem ganz herzlich dafür gedankt, dass er sich alle meine Sorgen geduldig anghört hat.

Lebenslauf

Name: Anne Figge
Geburtsdatum: 22.02.1973
Geburtsort: Marburg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1979 – 1983 Mittelpunktschule, Grundschule, Vöhl
1983 – 1992 Alte Landesschule, Gymnasium, Korbach
Juni 1992 Abitur

Auslandsaufenthalt

09/1992-05/1993 Au-pair in Shenfield, England

Studium

1993– 1999 Studium der Biologie an der Philipps-Universität, Marburg
09/1996 – 04/1997 Auslandsstudium an der Wilfrid Laurier University, Waterloo, Kanada
06/1998 - 05/1999 Diplomarbeit in der Abteilung Tierphysiologie (Prof. Dr. G. Heldmaier)
Thema: Detektion von Leptinrezeptor- und Agouti Related Peptide Expression im ZNS des Dsungarischen Zwerghamsters
Juni 1999 Diplom

Berufstätigkeit

08 - 09/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Prof. Dr. G. Heldmaier)
seit 10/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Medizinischen Klinik III am Universitätsklinikum der RWTH Aachen (Prof. Dr. S. Matern)

