

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. L. Fehm

---

**Einfluss des Sterol-Carrier-Proteins 2 (SCP2)  
auf die Gallensäurensynthese und deren  
Regulation**

Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Universität zu Lübeck

Vorgelegt von  
**Christian Münch**  
aus Kassel

Lübeck 2004

Betreuer in Lübeck: PD Dr. med. Michael Fuchs

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Michael Fuchs

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rainer Broll

Tag der mündlichen Prüfung: 15.4.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.4.2005

Gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Abkürzungsverzeichnis	II
Einleitung	1
Gallebildung und enterohepatische Zirkulation	1
Gallensäurensynthese	3
Sterol Carrier Protein 2 (SCP2)	13
Fragestellung	16
Geräte und Material	17
Geräte	17
Material	18
Methoden	21
Tiere	21
Operationen	21
Analyse der hepatischen Galle	22
Analyse des Gallensäurepools	23
Westernblot	24
Multiplex RT-PCR	27
Ergebnisse	32
Körper- und Lebergewicht	32
Analyse der hepatischen Galle	32
Größe und Zusammensetzung des Gallensäurepools	34
Enzyme des klassischen Wegs der Gallensäuresynthese	37
Enzyme des alternativen Wegs der Gallensäuresynthese	40
Expression der Transkriptionsfaktoren	44
Diskussion	47
Zusammenfassung	57
Danksagung	58
Lebenslauf	59
Literaturverzeichnis	60

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
BSEP	Bile salt export pump
CDCS	Chenodeoxycholsäure
CS	Cholsäure
CYP27A1	Cholesterin 27-Hydroxylase
CYP39A1	Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase
CYP7A1	Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase
CYP7B1	Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase
CYP8B1	Sterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymintriphosphat
FXR	Farnesoid-Rezeptor X
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
IBAT	Ileal bile acid transport protein
LRH-1	Leber-Rezeptor-Homolog 1
LXR $\alpha$	Leber-Rezeptor X $\alpha$
MCS	Muricholsäure
NCS	Norcholsäure
RNS	Ribonukleinsäure
SCP2	Sterol-Carrier-Protein 2
SCPX	Sterol-Carrier-Protein X
SD	Standartabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHP	Small heterodimer partner
TBS	Tris bufferd saline

## Einleitung

### ***Gallebildung und enterohepatische Zirkulation***

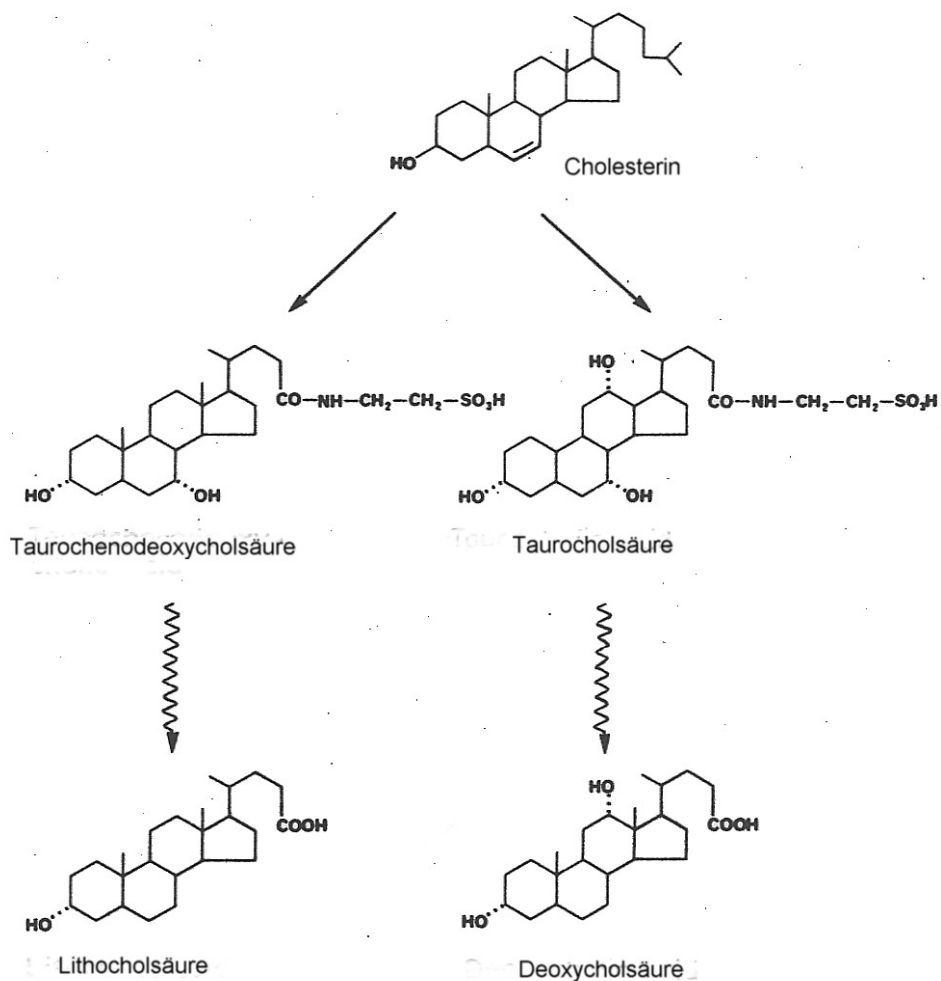
Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert und in die Galle sezerniert. Sie stellen den quantitativ wichtigsten Abbauweg des Cholesterins im Organismus der Säugetiere dar. Ihre physiologische Bedeutung besteht außerdem in der Aufrechterhaltung des Galleflusses zur Exkretion zahlreicher gallegängiger Substanzen und der Bildung gemischter Mizellen. Diese erleichtern im Dünndarm die Aufnahme von Fetten und anderen lipophilen Substanzen wie fettlösliche Vitamine (35).

Die primären Gallensäuren Cholsäure (CS;  $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Trihydroxy- $5\beta$ -Cholansäure) und Chenodeoxycholsäure (CDCS;  $3\alpha,7\alpha$ -Dihydroxy- $5\alpha$ -Cholansäure) werden in der Leber aus Cholesterin synthetisiert. CS und CDCS werden vor der biliären Sekretion an  $C_{24}$  mittels einer Aminosäuren-N-Acyltransferase über eine Amid-Bindung mit den Aminosäuren Glycin bzw. Taurin konjugiert. Die lipophilen Gallensäuren können sich dadurch im wässrigen Milieu des Dünndarms in Lösung halten und sind besser zur Bildung von Micellen geeignet (35).

Ein kleiner Teil der primären Gallensäuren wird im Kolon durch bakterielle Hydrolasen der Darmflora dekonjugiert. Diese unkonjugierten primären Gallensäuren mit einer freien Carboxylgruppe stellen dann im Kolon Substrate für die weitere mikrobielle Umwandlung zu sekundären Gallensäuren dar. Durch  $7\alpha$ -Dehydroxylierung der CS entsteht Deoxycholsäure (DCS;  $3\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy- $5\beta$ -Cholansäure) und aus CDCS Lithocholsäure (LCS;  $3\alpha$ -Hydroxy- $5\alpha$ -Cholansäure) (56) (Abb.1).

Die Galle des Menschen enthält neben Gallensäuren Bilirubin, Cholesterin, Lezithin, Elektrolyte und Wasser. Der Gesamtgallensäurepool des Menschen beträgt ungefähr 2-4g, die tägliche Syntheserate der Gallensäuren in der Leber 200-600mg und entspricht damit dem Verlust von Gallensäuren über den Stuhl. Etwa 95% der in den Darm sezernierten Gallensäuren werden entweder durch aktiven Transport im terminalen Ileum oder durch passiven Transport im Kolon wiederaufgenommen. Der aktive Transport erfolgt hauptsächlich über ein in den Enterozyten des Ileums

lokalisiertes, Natrium abhängiges Transportprotein namens IBAT. Nach der Aufnahme gelangen die Gallensäuren über die Pfortader zur Leber, wo sie erneut konjugiert und in die Galle ausgeschieden werden. Die Gallensäuren zirkulieren so etwa 3-10 mal täglich im enterohepatischen Kreislauf (16).



**Abbildung 1:** In der Leber werden aus Cholesterin die primären Gallensäuren Chenodeoxycholsäure und Cholsäure synthetisiert. Um eine bessere Sekretion der Gallensäuren zu gewährleisten sowie eine bessere Löslichkeit im Darmsaft zu erreichen, werden die Gallensäuren vor der Ausscheidung in die Galle mit einer Aminosäure, z.B. Taurin, konjugiert. Nach der Umwandlung durch Darmbakterien entstehen die sekundären Gallensäuren Lithocholsäure und Deoxycholsäure.

### **Gallensäurensynthese**

Die Umwandlung von Cholesterin zu Gallensäuren stellt einen komplexen Vorgang dar, an dem 17 verschiedene Enzyme beteiligt sind. Die einzelnen Schritte lassen sich dabei gliedern in: (a) Beginn des Synthesewegs durch  $7\alpha$ -Hydroxylierung des Cholesterins, wobei sich dieser noch in einen klassischen und einen alternativen Weg unterteilt, (b) weitere Veränderungen an der Struktur des Sterolrings, (c) Oxidation und Kürzung der Seitenkette sowie (d) Konjugation mit einer Aminosäure.

#### *Klassischer Weg der Gallensäurensynthese*

Der so genannte klassische Weg der Gallensäurensynthese beginnt mit der Umwandlung von Cholesterin zu  $7\alpha$ -Hydroxycholesterin durch die Cholesterin  $7\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) (92). Dieses im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Enzym ist geschwindigkeitsbestimmend für den klassischen Weg der Gallensäurensynthese und wird ausschließlich in der Leber synthetisiert (41). Das aus etwa 500 Aminosäuren bestehende Enzym CYP7A1 gehört als mischfunktionelle Oxidase zur Gruppe der Cytochrom P450 Enzyme (41,64). Die Isolierung des Cholesterin  $7\alpha$ -Hydroxylase Gens ermöglichte die Generierung von Mäusen mit deletiertem *Cyp7a1*-Gen und folglich auch ohne CYP7A1-Enzymaktivität, so genannten *Cyp7a1* Knockout-Mäusen. 90% dieser *Cyp7a1*<sup>-/-</sup> Mäuse starben während der ersten drei Lebenswochen an Leberversagen sowie an einem Mangel an fettlöslichen Vitaminen (37). Bei den überlebenden Tieren betrug die Größe des Gallensäurepools lediglich 25% der Norm. Diese Menge scheint jedoch ausreichend, um den *Cyp7a1*<sup>-/-</sup> Mäusen eine normale Entwicklung zu gewährleisten (84). Die *Cyp7a1*<sup>-/-</sup> Mäuse synthetisieren die Gallensäuren dabei über den so genannten alternativen Weg der Gallensäurensynthese.

### *Alternativer Weg der Gallensäurensynthese*

Im Gegensatz zum klassischen Weg der Gallensäurensynthese beginnt der alternative Weg nicht mit der  $7\alpha$ -Hydroxylierung von Cholesterin, sondern von Oxysterolen. Oxysterole sind Cholesterinderivate mit zusätzlichen Hydroxylgruppen an der Seitenkette und entstehen beispielsweise durch Hydroxylierung des Cholesterins an der 24-, 25- oder 27-Position des Kohlenstoffgerüsts. Das vorwiegend im Gehirn gebildete 24-Hydroxycholesterin spielt eine wichtige Rolle im Cholesterinstoffwechsel des Gehirns, trägt jedoch wenig zur Gesamtgallensäurensynthese bei (80). Auch 25-Hydroxycholesterin spielt in der Gallensäurensynthese eine eher untergeordnete Rolle, erkennbar an einem unveränderten Gallensäurestoffwechsel in Cholesterin 25-Hydroxylase Knockout-Mäusen (80). Den größten Anteil der Oxysterole stellt das 27-Hydroxycholesterin dar (24,52), gebildet von der Cholesterin 27-Hydroxylase (CYP27A1). Im Gegensatz zu CYP7A1 ist dieses Enzym an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (14) und ist weniger spezifisch in Bezug auf die verwendeten Substrate (107). Des Weiteren ist die Expression von CYP27A1 nicht auf die Leber beschränkt, sondern lässt sich in vielen Geweben nachweisen und spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase des Cholesteringehalts von peripheren Geweben (5). Die entstandenen Oxysterole werden nachfolgend durch eine von zwei Oxysterol  $7\alpha$ -Hydroxylasen (CYP7B1 bzw. CYP39A1)  $7\alpha$ -hydroxyliert. Dieses stellt einen essentiellen Schritt zur Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren dar. Während CYP39A1 fast selektiv 24-Hydroxycholesterin metabolisiert (51), katalysiert CYP7B1 die  $7\alpha$ -Hydroxylierung von 25- und 27-Hydroxycholesterin (83,93). Untersuchungen anhand von *Cyp7b1* Knockout-Mäusen zeigten, dass CYP7B1 für 25-30% der synthetisierten Gallensäuren bei Mäusen verantwortlich ist (80).

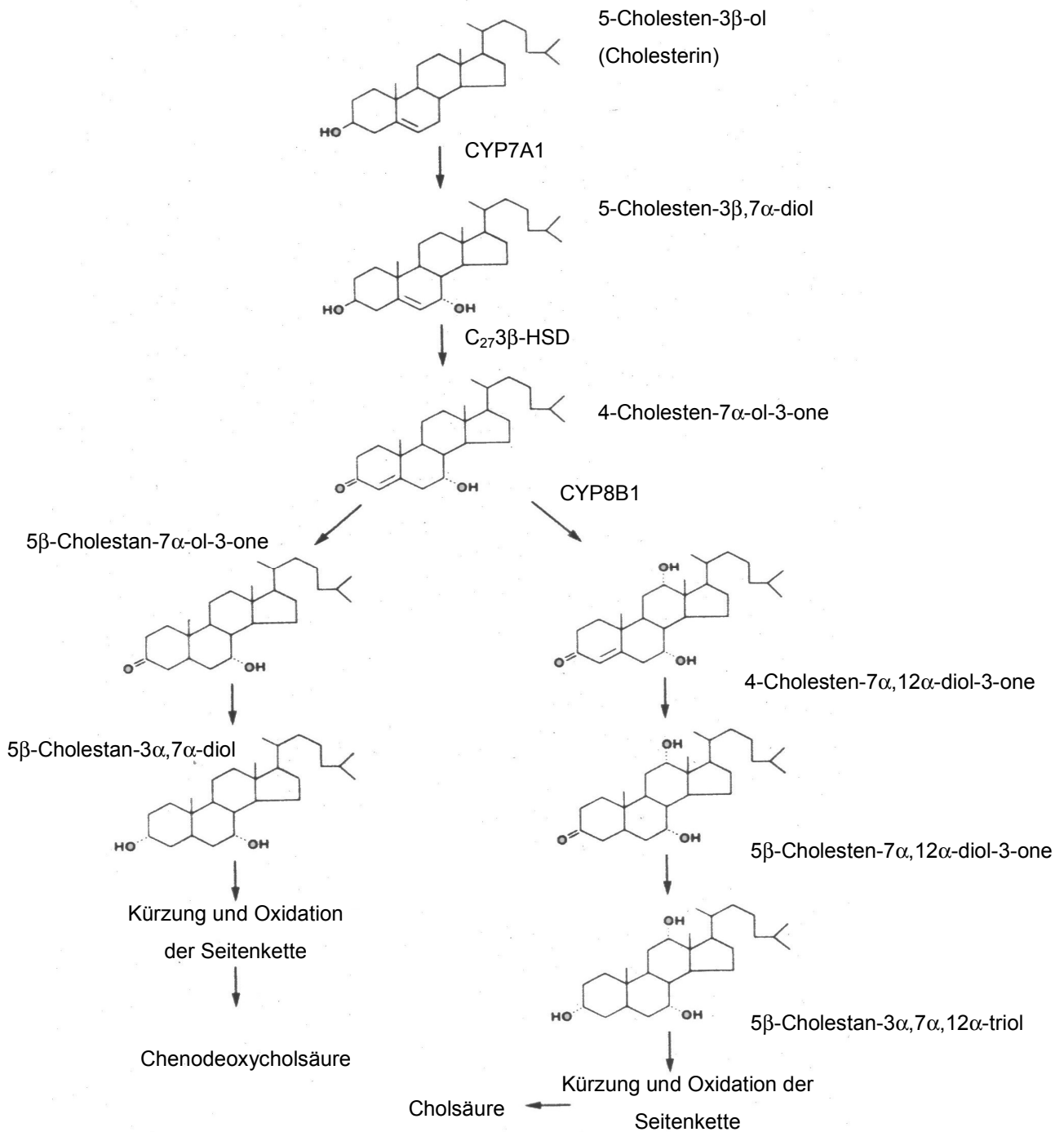
### *Veränderungen der Ringstruktur*

Die aus Cholesterin oder Oxysterolen entstandenen  $7\alpha$ -hydroxylierten Metaboliten bilden die Substrate für die  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -sterol Oxidoreduktase (C<sub>27</sub>3 $\beta$ -HSD). Zu den komplexen Wirkungen des Enzyms gehört die Isomerisation der Doppelbindung

von Position C<sub>5</sub> zu C<sub>4</sub> sowie die Oxidation der 3 $\beta$ -hydroxyl- zu einer 3-Oxogruppe (31,106). Die Produkte der C<sub>27</sub>3 $\beta$ -HSD können die folgenden Schritte zur Umwandlung in Gallensäuren auf zwei verschiedenen Wegen durchlaufen. Wird das Zwischenprodukt durch die Sterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP8B1) metabolisiert, entsteht letztendlich Cholsäure. Wird das Zwischenprodukt allerdings nicht durch CYP8B1 metabolisiert, entsteht Chenodeoxycholsäure. Nahezu alle Wirbeltiere produzieren zwei primäre Gallensäuren, von denen eine grundsätzlich Cholsäure ist. Die zweite, hydrophobere Gallensäure variiert je nach Spezies, beispielsweise Chenodeoxycholsäure (Mensch, Ratte) oder  $\beta$ -Muricholsäure (Maus). Die Aktivität von CYP8B1 entscheidet dabei über das Verhältnis der beiden primären Gallensäuren. Mäuse mit zerstörtem *Cyp8b1*-Gen produzieren keine Cholsäure, weisen aber dennoch einen deutlich vergrößerten Gallensäurepool auf, wahrscheinlich als Folge einer fehlenden Hemmung der Expression von *Cyp7a1* durch Cholsäure (50). Im weiteren Verlauf der Gallensäurensynthese folgen die Reduktion der Doppelbindung im A-Ring des Sterolrings, sowie die Reduktion der 3-Oxogruppe zu einem Alkohol (Abb.2).

#### *Kürzung der Seitenkette und Konjugation*

Den Modifikationen des Sterolrings folgen die Oxidation und die Kürzung der Seitenkette. Die ersten Reaktionen werden dabei von der mitochondrialen Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1) katalysiert. CYP27A1 steht also nicht nur am Anfang des alternativen Wegs der Gallensäurensynthese, sondern hat auch eine wichtige Funktion bei der Kürzung der Seitenkette. CYP27A1 fügt eine Hydroxylgruppe an C<sub>27</sub> ein, oxidiert diese erst zu einer Aldehyd- und dann zu einer Carboxylgruppe (5). Die anschließende Kürzung der Seitenkette um 3 Kohlenstoffatome findet in den Peroxisomen statt. Die dazu notwendigen Reaktionen verlaufen analog zur  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren (75). Als letzter Schritt vor der biliären Exkretion findet die Konjugation der synthetisierten Gallensäuren mit Glycin oder Taurin durch eine A:Aminosäure N-Acyltransferase statt (Abb.2).



**Abbildung 2:** Das Schema zeigt die notwendigen Veränderungen des Sterolrings bei der Synthese primärer Gallensäuren. Der klassische Weg der Gallensäurensynthese beginnt mit der 7 $\alpha$ -Hydroxylierung des Cholesterins durch die Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase. Wird das Zwischenprodukt nicht durch CYP8B1 12 $\alpha$ -hydroxyliert entsteht Chenodeoxycholsäure (linker Arm des Schemas), andernfalls Cholsäure (rechter Arm des Schemas)

### *Regulation der Gallensäurensynthese*

Die Regulation der Gallensäurensynthese wird hauptsächlich über die Expression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms des klassischen Weges der Gallensäurensynthese CYP7A1 vermittelt (81).

Ein erhöhter Verlust von Gallensäuren, z.B. durch eine Gallenfistel oder Fütterung von Cholestyramin, führt zu einer verstärkten Expression von CYP7A1 (20). Im Gegensatz zum Menschen führt bei Ratten und Mäusen auch eine erhöhte Zufuhr von diätetischem Cholesterin zu einer vermehrten Expression des *Cyp7a1*-Gens (23,41). Die verstärkte Expression des Enzyms aufgrund einer erhöhten Substratkonzentration bzw. einer verminderten Konzentration der Endprodukte wird auch als Feedforward-Regulation bezeichnet.

Erreicht der Gallensäurepool dagegen eine unphysiologische Größe, wird die Expression von CYP7A1 reduziert (91). Dieser Mechanismus, eine durch erhöhte Konzentrationen der Endprodukte vermittelte reduzierte Expression des verantwortlichen Enzyms, ist kennzeichnend für die Feedback-Regulation.

Die molekulare Grundlage für die Regulation der Gallensäurensynthese wurde durch die Entdeckung von Transkriptionsfaktoren entschlüsselt. Diese aktivierbaren Transkriptionsfaktoren sind Mitglieder einer neuen Familie von Kernrezeptoren. Definitionsgemäß bestehen sie aus einer zentralen DNS-bindenden Domäne und einem hydrophoben C-Terminus, an dem die Bindungspartner erkannt werden. An dieser Stelle erfolgt ebenfalls die Dimerisation und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren (77). Im Folgenden werden die molekularen Mechanismen der Regulation der Gallensäurensynthese ausführlicher dargestellt.

### *Feedforward-Regulation*

Die vermehrte Expression von Cholesterin  $7\alpha$ -Hydroxylase aufgrund eines erhöhten Cholesterinangebots wird durch den Transkriptionsfaktor Leber-Rezeptor-X alpha ( $LXR\alpha$ ) vermittelt.  $LXR\alpha$  heterodimerisiert obligat mit einem weiteren Transkriptionsfaktor, dem Retinoid-Rezeptor-X (RXR) (108). Erst dieses  $LXR\alpha$ -RXR-Heterodimer besitzt eine geringe transkriptionssteigernde Aktivität. Durch die Bindung verschiedener Liganden kann diese um ein Vielfaches gesteigert werden. Die größte

Aktivitätssteigerung erfolgt durch Oxysterole, insbesondere 22-Hydroxycholesterin (39). Das Heterodimer bindet an eine bestimmte Nukleotidsequenz (LXR-response-element: LXRE) im Promotor des *Cyp7a1*-Gens und steigert so dessen Expression (49). Neben *Cyp7a1* werden auch zahlreiche andere Gene des Cholesterinstoffwechsels beeinflusst (27), so dass die Aktivierung von LXR $\alpha$  nicht nur zu einer vermehrten Bildung von Gallensäuren, sondern auch zu einer gesteigerten intestinalen Cholesterinexkretion (78) und zu einem vermehrtem reversen Cholesterintransport führt (15).

LXR vermag die *Cyp7a1* Expression nur in Gegenwart eines weiteren Transkriptionsfaktors zu steigern, dem Leber-Rezeptor-Homolog-1 (LRH-1). LRH-1 bindet als Monomer an ein auf LRH-1 antwortendes Motiv der DNS, das so genannte LRH-response-element (LRHRE). LRH ist für die leberspezifische Expression von CYP7A1 und CYP8B1 ebenso erforderlich wie für die Wirkung von LXR $\alpha$  (55,62).

### *Feedback-Regulation*

Wenn die Konzentration der Gallensäuren in den Hepatozyten steigt, wird die Expression von *Cyp7a1* und *Cyp8b1* durch den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) inhibiert und dadurch die Synthese der Gallensäuren vermindert (57,69). FXR gehört wie LXR $\alpha$  zur Gruppe der aktivierbaren Transkriptionsfaktoren und bildet ebenfalls ein Heterodimer mit RXR. Die Aktivierung erfolgt durch verschiedene Gallensäuren in unterschiedlichem Maß. CDCS, sowohl konjugiert als auch unkonjugiert, ist der potenteste Ligand. Dagegen bewirken CS und MCS keine Aktivierung, wohl aber die sekundäre Gallensäure Deoxycholsäure (69,104).

Das aktivierte FXR-RXR Heterodimer inhibiert die Expression von *Cyp7a1* und *Cyp8b1* nicht direkt, sondern durch die vermehrte Bildung des so genannten kurzen heterodimeren Partners (SHP) (18). Dazu bindet das aktivierte FXR-RXR Heterodimer an eine Nukleotidsequenz (FXR-response-element, FXRE) im Promotor des *Shp*-Gens und steigert so dessen Expression. Im Gegensatz zu den meisten Transkriptionsfaktoren führt SHP zu einer verminderten Expression des betreffenden Gens. Dazu bindet SHP an LRH-1, inaktiviert dessen Wirkung und verringert auf

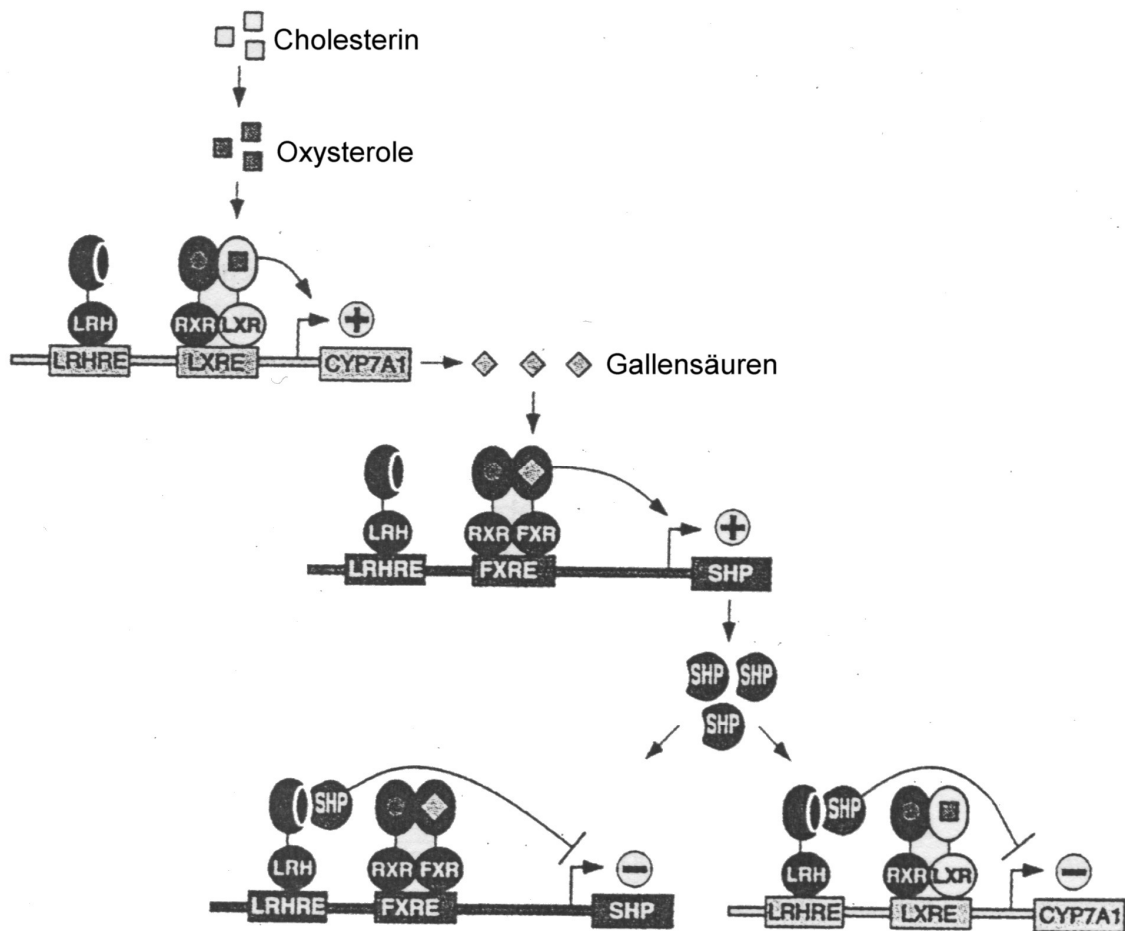
diese Weise sowohl die Expression von *Cyp7a1*, *Cyp8b1* als auch die eigene Expression (33,55).

#### *Regulation durch Signaltransduktion*

Anhand von Untersuchungen mit *Shp* Knock-out Mäusen (*Shp*<sup>-/-</sup>-Mäuse) konnte gezeigt werden, dass die Rückkopplung über FXR und SHP nicht die einzige Möglichkeit der *Cyp7a1*- und *Cyp8b1*- Repression ist. Unter Normalbedingungen zeigten die *Shp*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich mit Kontrolltieren eine etwa zweifach erhöhte Expression von *Cyp7a1* und *Cyp8b1*. Diese wurde jedoch durch exogene Zufuhr von Gallensäuren und einer dadurch hervorgerufenen Cholestase wieder reduziert und lässt somit auf zusätzliche, SHP-unabhängige Regelkreise schließen (45). Ein möglicher Mechanismus besteht in der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch Gallensäuren (94). Die Aktivierung der PKC führt mittels einer intrazellulären Signalkette zu einer verminderten Expression des *Cyp7a1*-Gens. Gallensäuren induzieren außerdem die Bildung der inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) in den Kupffer-Zellen der Leber (60). Die Zytokine führen zu einer Aktivierung von MAP-K (mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase) und mittels der folgenden Signaltransduktion zu einer Inhibition der *Cyp7a1*-Expression (22).

#### *Regulation des alternativen Weges der Gallensäurensynthese*

Im Gegensatz zu der Regulation von CYP7A1 bleibt die Regulation von CYP27A1 und des alternativen Weges der Gallensäurensynthese weiterhin unklar, die Angaben in der Literatur sind teilweise widersprüchlich. Einige Autoren beschreiben eine Änderung der CYP27A1 Expression bei Ratten analog zu der von CYP7A1 (98,102). Andere Ergebnisse, sowohl von Untersuchungen an Ratten und Kaninchen (9), als auch von Menschen (8) deuten auf wenig bis gar keine Regulation der CYP27A1 Expression hin.



**Abbildung 3: Feedback- und Feedforward-Regulation der Gallensäurensynthese durch aktivierbare Transkriptionsfaktoren. Oxysterole binden an LXR $\alpha$  und aktivieren die *Cyp7a1*-Transkription. *Cyp7a1* fördert die Gallensäurenbildung und somit die Aktivierung von FXR. FXR induziert die Transkription von *Shp*, welches einen inhibitorisch wirkenden Komplex mit LRH-1 bildet und so die *Cyp7a1*- und *Shp*-Expression hemmt (aus (56)).**

### *Lithogene Diät*

Um die Regulation der Gallensäuren in einem *in vivo*-Modell besser untersuchen zu können, eignet sich die Anreicherung der Nahrung mit Cholesterin, Triglyceriden und Gallensäuren im Sinne einer lithogenen Diät. Die gleichzeitige Belastung der Tiere mit oral zugeführtem Cholesterin und Gallensäuren ermöglicht eine Aktivierung sowohl der Feedforward- als auch der Feedbackregulation. Werden gallensteinempfindliche Mausstämme mit einer lithogenen Diät gefüttert, entwickeln diese Gallensteine (28,30).

### *Klinische Bedeutung der Gallensäurensynthese*

Krankheiten bedingt durch Störungen in der Gallensäurensynthese sind trotz der Vielzahl beteiligter Enzyme selten. Da die Gallensäuren prinzipiell über mindestens zwei unterschiedliche Wege synthetisiert werden können, kann ein Ausfall des einen Weges durch Steigerung des anderen Weges kompensiert werden. Eine frühzeitige Erkennung von Störungen der Gallensäurensynthese ist dennoch wichtig, da einige dieser Krankheiten durch eine Substitutionstherapie mit exogen zugeführten Gallensäuren behandelt werden können (36).

Noch nicht getestet wurde der Effekt einer Substitutionstherapie mit Gallensäuren im Fall einer Mutation des *CYP7A1*-Gens. Dieser Defekt, beschrieben bei einer amerikanischen Familie, geht mit erhöhten Cholesterinwerten im Plasma, erniedrigter Gallensäurenproduktion und Cholezystolithiasis einher. Die erhöhten Cholesterinwerte sprechen nicht auf eine Behandlung mit HMG-CoA-Reduktasehemmern an (73). Verursacht wird die Mutation durch die Deletion eines Basenpaares des *CYP7A1*-Gens, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription des *CYP7A1*-Gens führt.

Ein weiterer Defekt betrifft die Sterol 27-Hydroxylase. Eine Mutation des *Cyp27*-Gens wurde als Ursache der cerebrotendinösen Xanthomatose (Van-Bogaert-Krankheit) identifiziert (13). Diese autosomal-rezessiv vererbte Krankheit ist durch Xanthome, frühzeitige Arteriosklerose und eine progrediente neurologische Symptomatik gekennzeichnet (34). Eine Behandlung mit CDCS kann eine Progression der Krankheit verhindern (29,82).

Eine Mutation des *CYP7B1*-Gens wurde als Ursache einer Cholestase und einer Leberzirrhose bei einem zehn Wochen alten Jungen identifiziert. Das entsprechende Enzym, eine Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase, war aufgrund der Mutation funktionslos. Daraus resultierten massiv erhöhte Werte für Oxysterole im Serum sowie der Nachweis atypischer Gallensäuren im Urin des Patienten (90).

## **Sterol Carrier Protein 2 (SCP2)**

### *Grundlagen*

SCP2 wurde als 13,2 kDa großes Protein isoliert, welches ein notwendiger Faktor zur *in vitro* Umwandlung von 7-Dehydrocholesterin zu Cholesterin durch die Sterol- $\Delta^7$ -reduktase darstellt (63). Es konnte gezeigt werden, dass SCP2 identisch mit dem so genannten nichtspezifischem Lipid Transport Protein ist, welches den Transport von Phospholipiden zwischen Zellmembranen *in vitro* katalysiert (11). SCP2 wird als ein aus 142 Aminosäuren bestehendes Vorläuferprotein synthetisiert und in den Peroxisomen zu der aus 123 Aminosäuren bestehenden endgültigen Form umgebaut (88). Die Aminosäuresequenz des Vorläuferproteins von SCP2 besitzt am C-Terminus eine Zielsequenz für den post-translationalen Transport zu Peroxisomen. Am N-Terminus befindet sich dagegen eine Zielsequenz für den Transport zu Mitochondrien (7), passend zu der intrazellulären Verteilung von SCP2. SCP2 kommt in hohen Konzentrationen in Peroxisomen (44) und Mitochondrien vor (1). Die Konzentration von SCP2 im Zytosol beträgt etwa ein Fünftel der Konzentration in den Peroxisomen. Bezogen auf die Gesamtmenge an zellulärem SCP2 entspricht die Menge an SCP2 im Zytosol allerdings der Menge in den Peroxisomen (97).

Untersuchungen mit gegen SCP2 gerichteten Antikörpern reagierten nicht nur mit dem bekannten 13,2 kDa großen Protein, sondern auch mit einem 60 kDa großen Protein (96). Dieses aus 547 Aminosäuren bestehende Protein wurde SCPX genannt und besteht aus einer Thiolase am N- und SCP2 am C-Terminus (66,74). SCPX entsteht durch alternative Transkription des *Scp2*-Gens, welches zwei unterschiedliche Promotoren besitzt (65).

### *SCP2 und zytoplasmatischer Cholesterintransport*

In den meisten eukaryotischen Zellen wird der Großteil des Cholesterins im endoplasmatischen Retikulum gebildet, wohingegen bis zu 90% des freien, nicht veresterten Cholesterins in der Plasmamembran gebunden sind (10). Es befindet sich dort vorwiegend in der inneren Schicht der doppelschichtigen Lipidmembran, reduziert die Fluidität der Membran und trägt so zur Membranstabilität bei. Das

Cholesterin ist jedoch nicht gleichmäßig über die innere Schicht der Zellmembran verteilt, sondern befindet sich vielmehr in cholesterinreichen Mikrodomänen, so genannten Caveolen oder „Lipid-rafts“ (47,61). Diese höchst unsymmetrische Verteilung des Cholesterins in der Zelle lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass ein zielgerichteter Transport des Cholesterins vom endoplasmatischen Retikulum zu den cholesterinreichen Mikrodomänen besteht. Ein weiterer wichtiger intrazellulärer Transportweg besteht vom endoplasmatischen Retikulum zu den Mitochondrien, dem Ausgangspunkt der Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren. Frühere Studien wiesen auf einen schnellen, energieverbrauchenden Transport mittels Vesikeln hin (100), alternativ käme jedoch auch ein Protein-vermittelter Transport in Frage.

SCP2 wurde früh als möglicher intrazellulärer Cholesterintransporter gehandelt (70). Es konnte gezeigt werden, dass SCP2 den schnellen Transport neu synthetisierten Cholesterins vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran fördert (72). SCP2 stimuliert ebenfalls den Transport des Cholesterins von den Lysosomen zu den Mitochondrien (32) und es konnte auch gezeigt werden, dass in SCP2 überexprimierenden Zellen die Synthese von Cholesterinestern, die intrazelluläre Speicherform des Cholesterins, vermindert ist (114). Erklärt wird dies durch eine vermehrte Bindung des Cholesterins an SCP2. Der dadurch erhöhte Transport des Cholesterins zur Plasmamembran senkt den Anteil freien Cholesterins, welcher dem veresternden Enzym Acyl-CoA-Cholesterinacyl-Transferase (ACAT) zur Verfügung steht (6,29). Eine SCP2-Überfunktion stellt außerdem eine mögliche Ursache erhöhter Cholesterinsekretion in die Galle dar und vermag so zur Gallensteinbildung beizutragen. Hinweise darauf liefern erhöhte Mengen von SCP2, sowohl im Zytosol von gallensteinempfindlichen Mausstämmen als auch von Patienten mit Gallensteinen (30,38).

#### *SCP2 und Gallensäurensynthese*

Als zytosolisches Transportprotein scheint SCP2 für die Metabolisierung von Cholesterin von Bedeutung zu sein. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass mehrere an der Gallensäurensynthese beteiligte Enzyme durch Zugabe von SCP2 stimuliert

werden (54). Da diese Stimulation jedoch nicht spezifisch für ein bestimmtes Enzym ist, lässt sich dieser Effekt am ehesten auf einen gesteigerten Substrattransport zurückführen. Tatsächlich ließ sich auch in verschiedenen Untersuchungen nachweisen, dass SCP2 am Cholesterintransport zum Mitochondrium (32) bzw. zur inneren Mitochondrienmembran beteiligt ist (101). Dies ist von besonderer Bedeutung, da gerade dort wichtige Enzyme des Cholesterinmetabolismus und der Gallensäurensynthese lokalisiert sind. Beispielsweise bewirkt eine Überexpression von SCP2 und Cytochrom P-450 Enzymen in Zellen von Hamsterovarien eine deutliche Steigerung der Cholesterinoxidation (111).

Besondere Bedeutung für die Untersuchungen des Einflusses von SCP2 auf die Gallensäurensynthese hatte die Züchtung von *Scp2* Knockout (*Scp2*<sup>-/-</sup>) Mäusen mit dessen Hilfe erstmals *in vivo* Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchgeführt werden konnten (42). Im Serum dieser Mäuse lassen sich atypische Gallensäuren mit lediglich 23 C-Atomen nachweisen. Diese verkürzten Gallensäuren, insbesondere 23-Norcholsäure (23-NCS) und 23-Norchenodeoxycholsäure (23-NCDCS), entstehen wahrscheinlich aufgrund einer gestörten  $\beta$ -Oxidation. Weiterhin finden sich im Serum von *Scp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen atypische Gallenalkohole, ebenfalls Ausdruck einer gestörten  $\beta$ -Oxidation. Untersuchungen zur Regulation der Gallensäurensynthese wurden jedoch bisher an *Scp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht durchgeführt.

***Fragestellung***

Die bisher durchgeführten Untersuchungen sprechen deutlich für eine Beteiligung von SCP2 an der Gallensäurensynthese. Beobachtungen anhand von *Scp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen erlaubten erstmals Aussagen bezüglich des Einflusses von SCP2 auf die Gallensäurensynthese in einem *in vivo* – Modell zu treffen (42). Völlig ungeklärt bleibt allerdings die Wirkung von SCP2 auf die Zusammensetzung des Gallensäurenpools und die hepatische Galle sowie auf die Regulation der verschiedenen Wege der Gallensäurensynthese.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen beantworten:

Beeinflusst SCP2 die Menge und Zusammensetzung des Gallensäurenpools und die hepatische Gallensäurenssekretion?

Welchen Einfluss hat SCP2 auf die Expression sowie die Regulation der an der Gallensäurensynthese beteiligten Enzyme?

Werden die verschiedenen Wege der Gallensäurensynthese durch SCP2 unterschiedlich beeinflusst?

## Geräte und Material

### Geräte

Biofuge pico	Heraeus Instrument GmbH, Hamburg
Blot Transfer-System 20-25	GibcoBRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Finnigan GCQ HPLC-System	Thermoquest, Egelsbach
Gelkammern: P8DS, B1, B1A	OWL, Peqlab, Heidelberg,
GS-700 Imaging Densitometer	BioRad, München
Homogenisator	Janke Kunkel GmbH,
HT-5 Kapillarsäule	SGE, Weiterstadt
NuPage Blotting System	Invitrogen, Karlsruhe
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc., Massachusetts, USA
Power pac 3000	BioRad, München
SmartSpec 3000 Photometer	BioRad, München
Sorvall OTD-Combi Ultracentrifuge	Du Pont Nemours GmbH, Bad Nauheim
Sorvall SM-24 und GS-3 Rotoren	Du Pont Nemours GmbH, Bad Nauheim

**Material**

24- <sup>14</sup> C Taurocholsäure	PerkinElmer, Frankfurt
Agarose, electrophoresis grade	GibcoBRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
CYP7A1 und CYP27A1 Antikörper	Calbiochem, San Diego, USA
CYP7B1, CYP39A1 und	Freundliches Geschenk von
CYP8B1 Antikörper	Prof. D. W. Russel, Dallas, USA
BioRad Protein Assay	BioRad, München
Bio-Safe™ Coomassie	BioRad , München
Blottingpapier	Whatman Int., Kent, Großbritannien
BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Chloroform (HPLC grade)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Cholesterol 20 Kit	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Cocoa butter diet 751	Harlan Teklad, Madison, WI ,USA
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Development Folders	Tropix, Bredford, MA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Ethanol 75%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Gallensäuren Kit	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Gel Ladepuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim ,
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim

Kodak X-OMAT-LS Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Molecular Analyst Software	BioRad, München
Molecular Weight Marker	Boehringer Mannheim
Nitrozellulosemembran	BioRad, München
NuPage-System	Invitrogen, Karlsruhe
PE-10 Polyethylenkatheter	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Pentobarbital	Apotheke MUL
Phospholipide Kit	Wako Chemicals GmbH, Neuss,
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinsheim
Protein Assay Kit	BioRad, München, Deutschland
Quantum RNA 18S internal standards	AmBion Inc., Wiesbaden
Rainbow-Marker	Amersham, Freiburg
Random Primer Labeling Kit	GibcoBRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Sekundäre Antikörper, HRP markiert	DAKO Chemicals, Hamburg
SigmaStat 2.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Skim Milk	Difco, Augsburg
Spezifische Primer	MWG Biotech, Ebersberg
Standardfutter Altromin 1314	Altromin GmbH, Lage, Deutschland
SuperScript II Preamplification System	GibcoBRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizol Reagenz	GibcoBRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe

TRIS-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ultrapure dNTP Set	Amersham, Freiburg
Vektor NT 4.0 Deluxe	InforMax Inc., N. Bethesda, USA
Western Blot Chemiluminescence Reagent	Du Pont NEN <sup>TM</sup> Life Science Products, Boston, MA, USA

## **Methoden**

### ***Tiere***

Die Mäuse mit der Deletion des *Scp2*-Gens (C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup>) wurden von Dr. Udo Seedorf (Institut für Arterioskleroseforschung, Universität Münster) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (89). Alle Knockout-Mäuse wurden durch Isolierung von Mäuseschwanz-DNS genotypisiert (93).

Um eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, dienten C57BL/6 Mäuse als Kontrolltiere. Dieser Mausstamm weist eine hohe Empfänglichkeit für Gallensteine auf (46) und wurde vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

Alle Tiere wurden in einem Raum mit konstanter Temperatur (22±1°C) und einem 12stündigen Hell-Dunkel-Zyklus (Licht: 6-18Uhr) gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Altromin 1314 Futter, welches weniger als 0.02% Cholesterin enthält. Im Alter von 10-12 Wochen wurde den Tieren eine aus 15% (w/w) Fett, 1,25% (w/w) Cholesterin und 0,5% (w/w) Cholsäure bestehende lithogene Diät verabreicht (Cocoa butter diet 751). Die Kontrollgruppen erhielten weiterhin das Altromin 1314 Futter. Die Haltung, Pflege und Tötung der Tiere entsprach den geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen.

### ***Operationen***

Da die Gallensäuresynthese einem zirkadianem Rhythmus unterliegt, wurden die Operationen grundsätzlich in der Zeit zwischen 8 und 10 Uhr morgens vorgenommen. Die nüchternen Tiere wurden präoperativ mit 35mg/kg KG Pentobarbital intraperitoneal narkotisiert. Der Laparatomie folgte die Ligation des Ductus cysticus und die Aspiration der Blasengalle, welche bei -20°C gelagert wurde. Anschließend wurde der Ductus choledochus distal ligiert und proximal der Ligatur inzidiert. Ein PE-10 Polyethylenkatheter (innerer Durchmesser: 0,28mm, äußerer Durchmesser: 0,61mm) wurde durch die Inzision nach proximal in den Ductus hepaticus

vorgeschoben und mit einer Umschlingung des Ductus fixiert. Die Tiere wurden per Wärmelampe vor Unterkühlung, der Situs durch eine 0,9%ige Kochsalzlösung vor Austrocknung geschützt. Die hepatische Galle wurde für eine Stunde abgeleitet, gesammelt und das Volumen bestimmt. Während der Ableitung wurde die Narkose nach Bedarf mit Isoflurane per inhalationem aufrechterhalten. Anschließend wurden die Leber und Gallenblase entnommen, mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### ***Analyse der hepatischen Galle***

#### *Gallensäuren*

Die Menge und Zusammensetzung der hepatisch sezernierten Gallensäuren wurde mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt (42). Die Messungen wurden auf einem Finnigan GCQ-Gerät durchgeführt, ausgestattet mit einer HT-5 Kapillarsäule (25m Länge, 0,22mm Innendurchmesser, 0,1 $\mu\text{m}$  Filmschichtdicke des vernetzten Silikons).

#### *Phospholipide*

Der Phospholipidgehalt der hepatischen Galle wurde mittels einer enzymatisch-colorimetrischen Methode bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der enzymatischen Abspaltung von Cholin, welches durch eine Cholinoxidase oxidiert wird. Dabei entstehendes Wasserstoffperoxyd wird in einen Farbstoff umgesetzt, welcher bei einem Extinktionsmaximum von 505nm spektralphotometrisch nachgewiesen werden kann. Verwendet wurde ein kommerziell erhältliches Test-Kit, die Anwendung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden 10 $\mu\text{l}$  hepatische Galle, die Berechnung erfolgte anhand einer mit verschiedenen Phospholipidverdünnungen erstellten Standardkurve.

### *Cholesterin*

Die Bestimmung des Cholesteringehalts der hepatischen Galle erfolgte ebenfalls mittels einer enzymatisch-colorimetrischen Methode. Cholesterin wird dabei durch eine Cholesterinoxidase oxidiert, das entstandene Wasserstoffperoxid lässt sich mittels eines Farbstoffes spektralphotometrisch nachweisen. Die Durchführung des Tests erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Für die Messung wurden 10µl hepatische Galle eingesetzt, die Berechnung der Werte erfolgte anhand einer mit verschiedenen Cholesterinverdünnungen erstellten Standardkurve.

### *Gallefluß und Sekretionsraten*

Zur Berechnung des Galleflusses wurde die hepatische Galle für eine Stunde abgeleitet, gesammelt und ausgewogen. Unter Annahme der Dichte von 1g/ml wurde der Gallefluß berechnet, auf 100g Körpergewicht (KG) bezogen und als µl/(min\*100g KG) angegeben. Anhand des Galleflusses wurden die zugehörigen Sekretionsraten (nmol/(min\*100g KG)) unter Berücksichtigung von Cholesterin-, Phospholipid- und Gallensäurenkonzentration sowie des Körpergewichts berechnet.

### **Analyse des Gallensäurepools**

Leber, Gallenblase und Darm von jeweils vier Mäusen C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> und C57BL/6 – Wildtypen wurden samt Inhalt entnommen und zusammen in einem Becherglas mit 100ml 75%igem Ethanol homogenisiert (29,112). Um den Verlust an Gallensäuren während der Extraktion quantifizieren zu können, wurde dem Homogenat 10µl [24-<sup>14</sup>C]-Taurocholsäure zugegeben. Zur Extraktion der Gallensäuren kochte das abgedeckte Gemisch vier Stunden auf einem Magnetrührer. 20ml des filtrierten Gemisches wurden in einem Rotationsverdampfer mit Stickstoff eingedampft. Die getrockneten Proben wurden resuspendiert und die Menge und Zusammensetzung der Gallensäuren mittels GC-MS gemessen (42). Unter Einbeziehung der Verluste des radioaktiv markierten internen Standards konnte die Größe und Zusammensetzung des Gallensäurepools errechnet werden.

## **Westernblot**

### *Prinzip*

Den ersten Schritt bildet die Auftrennung des Proteingemisches in einer Gelmatrix über einer elektrischen Spannung. Durch Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) liegen alle Proteine als negativ geladene Teilchen vor und können so ausschließlich anhand ihrer Größe in einem Polyacrylamidgel getrennt werden. Daran anschließend erfolgt der Transfer der Proteine auf eine immobilisierende Nitrozellulosemembran. Die fest auf dieser Membran haftenden Proteine können so weder diffundieren noch eluiert werden. Anders als im Gel sind die Proteine auf der Membran frei zugänglich für Ligandenbindungen mit Makromolekülen wie Antikörpern und können somit spezifisch detektiert werden.

### *Präparation des Leberhomogenats*

250mg des bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Lebergewebes wurden unter ständiger Kühlung und nach Zugabe von 2ml Pufferlösung (0,01M Tris, 0,25M Sucrose; pH 7,0) mit einem elektrischen Homogenisator zerkleinert. Die Proteinkonzentration der Proben wurde nach der Methode von Bradford (12) bestimmt. Dazu wurden 20 $\mu\text{l}$  Homogenat mit 80 $\mu\text{l}$  Aqua dest. und 5ml BioRad Protein Assay gemischt und nach 5min die optische Dichte bei 595nm mittels eines SmartSpec 3000 Photometers bestimmt. Die Berechnung erfolgte anhand einer mittels verschiedener Verdünnungen von Rinderserumalbumin erstellten Standardkurve.

### *SDS-PAGE Gelelektrophorese*

Für die Gelelektrophorese wurde das kommerziell erhältliche NuPage-System benutzt. Für jede Probe wurden 100 $\mu\text{g}$  Protein aus Leberhomogenat verwendet und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 65 $\mu\text{l}$  verdünnt. Dieses wurde mit 25 $\mu\text{l}$  4x NuPage Probenpuffer und 10 $\mu\text{l}$  NuPage 10x Reduzierlösung vermischt. Die Proben wurden dann 10min bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt und auf ein 3-12%iges NuPage Gradientengel aufgetragen. Als Größenmarker wurden 3 $\mu\text{l}$  Rainbow-Marker verwendet. Das Gel

war in einem mit Laufpuffer (50ml 20x MES NuPage Laufpuffer, 950ml Aqua dest.) befüllten Zwei-Kammer-System befestigt. Zum Schutz der Proteine vor Oxidation wurde den 200ml Laufpuffer der inneren Kammer 500µl NuPage Laufpuffer Antioxidans zugemischt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 200V für 35min.

### *Immunoblot*

An die Gelelektrophorese schloss sich der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45µm an. In einer Sandwichtechnik wurden Blottingpapiere, das Gel und eine Nitrozellulosemembran in einer Kassette zwischen zwei als Anode und Kathode fungierende Metallplatten geklemmt. Dieses System wurde mit Transferpuffer (4,08g Bicine, 5,23g Bis-Tris, 0,29g EDTA, 1ml NuPage Proben Antioxidans, 100ml Methanol ad 1000ml Aqua dest.) befüllt. Der Transfer erfolgte bei 25V für eine Stunde. Überschüssige freie Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran wurden durch zweistündige Inkubation in Milchlösung (5g Magermilchpulver, 1g Rinderalbumin, 0,5ml Tween 20 ad 100ml TBS; 10x TBS: 36,33g Tris, 87,66g NaCl ad 1000ml Aqua dest. bei pH 7,5) geblockt. Anschließend wurde die Membran 25min in TBS gewaschen und über Nacht mit dem ersten Antikörper (Antikörperverdünnung laut Tab. 1 in 80µl  $\text{NaN}_3$ -Lsg ad 20ml TBS;  $\text{NaN}_3$ -Lsg: 0,25g  $\text{NaN}_3$  ad 5ml Aqua dest.) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran mit TBS gespült, drei mal eine Stunde in 1%ger Milchlösung (1g Magermilchpulver ad 100ml TBS) geblockt und wieder mit TBS gespült. Die Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion. Die an den zweiten Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation von Luminol und führt so zu einer Lichtemission, welche auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte (Antikörperverdünnung laut Tab. 1 in 20ml TBS) für eine Stunde. Anschließend wurde die Membran 15min in TBS, danach 30min in TBS-Tween-Lösung (100µl Tween ad 100ml TBS) und wieder 5min in TBS gewaschen.

Protein	1. Antikörper	2. Antikörper
CYP7A1	1:2000	1:100000 Anti-Rabbit
CYP7B1	1:1000	1:100000 Anti-Rabbit
CYP39A1	1:1000	1:100000 Anti-Rabbit
CYP27A1	1:1000	1:100000 Anti-Rabbit

**Tabelle 1 : Verdünnungen der verwendeten Antikörperkonzentrationen für die Westernblots.**

### *Belichtung und Entwicklung*

Zur Detektion der gebundenen Antikörper-Komplexe wurde die Membran eine Minute mit einer Chemilumineszenz-Lösung bedeckt. Die Belichtung der Kodak X-OMAT-LS Filme durch die in Folie gepackten Membranen erfolgte in einer Kodak BioMax-Kassette, je nach Signalstärke für 30 Sekunden bis zu 5 Minuten. Die densitometrische Auswertung der Filme erfolgte mittels der Molecular Analyst Software und einem GS-700 Densitometer.

### *Interne Kontrolle*

Als Ladungskontrolle diente die erneute Verwendung der Membran zur Bindung eines Antikörpers gegen ein in konstanter Menge vorkommendes Protein. Aufgrund der gleichmäßigen Expression sind dazu Antikörper gegen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase besonders geeignet. Nach der Belichtung wurden die bereits verwendeten Antikörper von der Membran abgewaschen, dazu wurde diese für 30min bei 50°C in Stripping Lösung (62,5mM TRIS-Puffer pH 6,7, 2% SDS, 100mM Mecaptoethanol) gewaschen. Anschließend wurde die Membran wie oben beschrieben geblockt, gewaschen, mit dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Antikörper und dem entsprechenden zweiten Antikörper inkubiert. Durch die Bildung eines Quotienten aus der Expression des gesuchten Proteins und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase lassen sich Ungenauigkeiten durch unterschiedlich aufgetragene Proteinmengen korrigieren.

## **Multiplex RT-PCR**

### *Prinzip*

Reverse Transkription (RT), verbunden mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), erlaubt eine Quantifizierung der Genexpression. Man geht dabei davon aus, dass die mRNA-Menge einer Zelle die Aktivität des zugehörigen Gens widerspiegelt. Das Prinzip beruht auf der Transkription der empfindlichen mRNA in eine stabilere cDNA vor der eigentlichen PCR-Reaktion. Zu diesem Zweck wird eine bekannte Menge mRNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgewandelt.

Die PCR dient der Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen. Die Reaktion beginnt mit der Denaturierung der cDNA zu Einzelsträngen durch Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 90°C. Nach Abkühlung des Gemischs auf etwa 50-60°C binden die zugesetzten Primer, aus 15 – 20 Basen bestehende Oligonukleotide, die der Sequenz an den 5'-Enden der gesuchten DNA komplementär sind, an die Einzelstränge. Durch eine hitzestabile DNA-Polymerase werden die als Matrize dienenden Einzelstränge bei 72°C zu Doppelsträngen komplementiert. Durch mehrfache Wiederholung des Reaktionszyklus ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA.

Um Fehler durch unterschiedliche Qualitäten der mRNA, ungenaue Quantifizierung der Ausgangsmenge oder Pipettierungenauigkeiten zu vermeiden, hat sich die Methode der Multiplex-Reaktion bewährt. Dabei werden zwei Primersets in einer PCR-Reaktion verwendet, ein Set um die gesuchte cDNA, das andere Set, um ein konstant exprimiertes Gen (Housekeeping-Gene) bzw. ribosomale RNA als interne Kontrolle zu amplifizieren. Die gemessene Expression des gesuchten Gens wird dann gegen die Kontrolle normalisiert.

### *RNA-Isolation aus Mäuseleber*

Gesamt-RNA aus Mäuseleber wurde nach der von Chomczynski und Sacchi (19) beschriebenen Methode isoliert. Auf flüssigem Stickstoff schockgefrorene Leber wurde bei 4°C in 2ml Trizolreagenz homogenisiert. Nach Zugabe von 0,4ml Chloroform und anschließender Zentrifugation (1300g) bei 4°C wurde die in der

oberen, wässrigen Schicht befindliche RNS in ein neues Gefäß transferiert. Nach der Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol folgte die Pelletierung der RNS durch Zentrifugation (12000g) für 10min bei 4°C. Die Pellets wurden zweimal mit 75%igem RNase-freiem Ethanol gewaschen und in 150µl DEPC Aqua dest. (2ml DEPC auf 2l Aqua dest. wurden unter Lichtschutz bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert) gelöst. Die Konzentration der Gesamt-RNS wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei 260nm gemessen. Die Reinheit der RNS, bestimmt anhand des Quotienten aus RNS (OD 260) und Protein (OD 280), war bei einem durchschnittlichen Quotienten von 1,8 gut bis sehr gut. Nicht sofort verwendete RNS wurde bei -80°C gelagert.

#### *Erststrang cDNS Synthese*

Die Synthese der Erststrang cDNS wurde mittels des Superscript Preamplification Systems durchgeführt. Da die in diesem Kit verwendete reverse Transkriptase keine RNase H Aktivität besitzt, ist die Verwendung von Gesamt-RNS möglich. Das Procedere der Erststrang cDNS Synthese erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers: 7,5µg Gesamt-RNS aus Mäuseleber, random hexameres (2µl; 50mg/µl) und 20ml DEPC Aqua dest wurden in einem 0,5ml fassendem PCR Gefäß für 10min bei 70°C inkubiert. Nach einminütiger Kühlung auf Eis wurde dem RNS und Hexamere enthaltendem PCR-Gefäß der Reaktionsmix, bestehend aus PCR-Puffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTP mix und 0,1M DTT zugegeben. Anschließend wurde dieser für 10min bei 25°C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2µl (400Units) SuperScript II reverse Transcriptase in das Gefäß und eine Inkubation für 10min bei 25°C, eine weitere für 50min bei 42°C. Die Reaktion wurde durch das Erhitzen des Gefäßes auf 70°C beendet. Um die Sensitivität der PCR zu erhöhen, wurde die als Vorlage dienende RNS durch Verdau des cDNS:RNS Molekül mit 1µ RNase H für 20min bei 37°C entfernt. Die entstandene cDNS wurden entweder sofort verwendet oder bei -20°C nicht länger als 7 Tage aufbewahrt.

### *Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Um sicher zu stellen, dass das PCR-Produkt innerhalb der linearen Phase der exponentiellen Vermehrung analysiert wird, wurde zuvor eine Zyklusreihe ausgewertet. Dazu wurden zwischen dem 20. und 40. Zyklus alle 2 Zyklen ein Aliquot von der PCR Reaktion entfernt. Die Produkte wurden dann in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch quantifiziert. Für die folgenden Reaktionen wurde eine im linearen Bereich liegende Zyklenzahl verwendet.

Als interne Kontrolle fand entweder ribosomale RNS oder die mRNA des "Housekeeping-Gens" GAPDH Verwendung. Die interne Kontrolle muss dabei ebenfalls im linearen Bereich der Amplifizierung liegen. Da die ribosomale RNS in großer Menge vorhanden ist, wurden zusätzlich zu den 18S Primern sogenannte 18S Competimer verwendet. Competimer weisen ein verändertes 3'-Ende auf, welches die DNS-Polymerase blockiert. So konnte die Amplifizierungsrate der 18S cDNS reduziert werden, ohne dabei die relative Quantifizierung zu beeinflussen. Nach der Bestimmung des optimalen Verhältnisses zwischen 18S Primern und 18S Competimern, so dass sowohl das gesuchte Gen als auch die interne Kontrolle gleich stark amplifiziert werden, wurde die PCR in einem 50µl Reaktionsmix angesetzt. Dieser setzte sich zusammen aus: 5µl 10x PCR-Puffer, 3µl 25mM MgCl<sub>2</sub>, 2µl 10mM dNTP-Mix, 4µl 18S Competimer/Primer-Mix bzw. GAPDH-Primer, 4 µl genspezifischer Primer, 0,5µl (2,5 Units) Taq-Polymerase, 27,5µl Aqua dest. und 4µl cDNS. Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte aus den in der Genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html)) enthaltenen Nukleotidsequenzen der gesuchten Gene mit Hilfe des Programms Vector NT 4.0 Deluxe. Die Sequenzen der einzelnen Primerpaare und die Länge des amplifizierten Produktes sind in Tabelle 2 aufgelistet, die verwendeten Programme in Tabelle 3.

Gen	Primersequenzen	Interner Standard
<i>Cyp7a1</i>	5'GTC ACG GAA GGG ATG TAT GC 3' 5'AAG TCA AAG GGT CTG GGT AG 3'	GAPDH
<i>Cyp7b1</i>	5'GAG GTT CTG AGG CTG TGC TC 3' 5'GCA CAT GCA GCC TTA CTC TG 3'	18s "Alternate", Verdünnung 3:10
<i>Cyp39a1</i>	5'AGT GGT GGA GAC GGA AAC AC 3' 5'AAC CAC CTT CCA GGA CAC TG 3'	GAPDH
<i>Fxr</i>	5'CAG ACA CTG GAC CAC GAA GA 3' 5'GTG TCC ATC ACT GCA CAT CC 3'	18s "Alternate", Verdünnung 2:10
<i>Lxra</i>	5' GGA GTG TGG ACT TCG CAA AT 3' 5' CCT TGA GGA AGG TGA TGC TC 3'	18s "Classic", Verdünnung 2:10
<i>Lrh-1</i>	5'ACC CTT ACT CCA GCT CAC CT 3' 5'ACG CGA CTT CTG TGT GTG AG3'	18s "Alternate", Verdünnung 1:10

**Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer sowie die benutzten internen Kontrollen**

Gen	PCR-Programm	Produktgröße
<i>Cyp7A1</i>	5min 95°C; 1min 95°C, 1min 55°C, 1min 72°C 35 Zyklen; 10min 72°C	701bp
<i>Cyp7B1</i>	5min 95°C; 30sec 95°C, 30sec 64°C, 1min 72°C 27 Zyklen; 2min 72°C	500bp
<i>Cyp39A1</i>	5min 95°C; 30sec 95°C, 30sec 64°C, 1min 72°C 29 Zyklen; 2min 72°C	498bp
<i>FXR</i>	5min 95°C; 30sec 95°C, 30sec 64°C, 1min 72°C 29 Zyklen; 2min 72°C	502bp
<i>LXR</i>	3min 96°C; 45sec 96°C, 45sec 62°C, 45sec 72°C 33 Zyklen; 2min 72°C	1665bp
<i>LRH</i>	5min 95°C; 30sec 95°C, 30sec 64°C, 1min 72°C 25 Zyklen; 2min 72°C	447bp

**Tabelle 3: Verwendete PCR-Programme und entstandene Produktgröße**

Als Negativkontrolle diente eine Probe, welcher während der Erststrang cDNS Synthese keine Superscript II Reverse Transkriptase zugegeben wurde. Es konnte so sichergestellt werden, dass keine genomische DNS amplifiziert wurde. Die Effizienz der Erststrang cDNS Synthese wurde durch die Verwendung mitgelieferter Kontroll-RNS in einer Positivkontrolle unter sonst gleichen Bedingungen sichergestellt.

Der PCR folgte die elektrophoretische Auftrennung von jeweils 16µl Probe in einem Ethidiumbromid enthaltendem Agarosegel und die photographische Dokumentation. Die densitometrische Auswertung der PCR-Produkte erfolgte wie oben beschrieben. Der Quotient aus der Signalstärke des gesuchten Genes und der internen Kontrolle ergab den korrigierten Wert.

### *Statistik*

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaStat 2.0. Angewendet wurde der Student's t-test, die Ergebnisse wurden in Form des arithmetischen Mittels  $\pm 1$  Standardabweichung angegeben. Von statistischer Signifikanz wurde bei einem p-Wert  $<0,05$  ausgegangen.

## Ergebnisse

### ***Körper- und Lebergewicht***

Sowohl die C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse als auch die Kontrolltiere entwickelten sich unter den Laborbedingungen normal, waren fertil und zeigten keine körperlichen Auffälligkeiten.

Vor Gabe der lithogenen Diät war das mittlere Körpergewicht der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse ( $36 \pm 3$ g) signifikant ( $p < 0,05$ ) größer als das der C57BL/6 Wildtypen ( $26 \pm 1$ g). Nach Gabe der lithogenen Diät blieb das Gewicht der Knockout Tiere konstant, während das mittlere Gewicht der Wildtypen auf  $30 \pm 2$ g stieg.

Das Lebergewicht (g/100g KG) betrug bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Tieren  $4,2 \pm 0,4$  und bei den Wildtypen  $4,2 \pm 0,3$ . Nach Erhalt der lithogenen Diät stieg bei beiden Gruppen das Lebergewicht signifikant ( $p < 0,001$ ) an, das der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse erreichte  $7,0 \pm 1,1$ , das der Wildtypen  $8,3 \pm 2,0$ .

### ***Gallensteine***

Alle Tiere entwickelten nach Erhalt der lithogenen Diät Cholesteringallensteine. Eine Wildtyp-Maus entwickelte einen Stein im Ductus choledochus mit Aufweitung der extrahepatischen Gallenwege. Diese Maus wurde nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

Tiere die lediglich die Standarddiät erhalten hatten, entwickelten in keinem Fall Gallensteine.

### ***Analyse der hepatischen Galle***

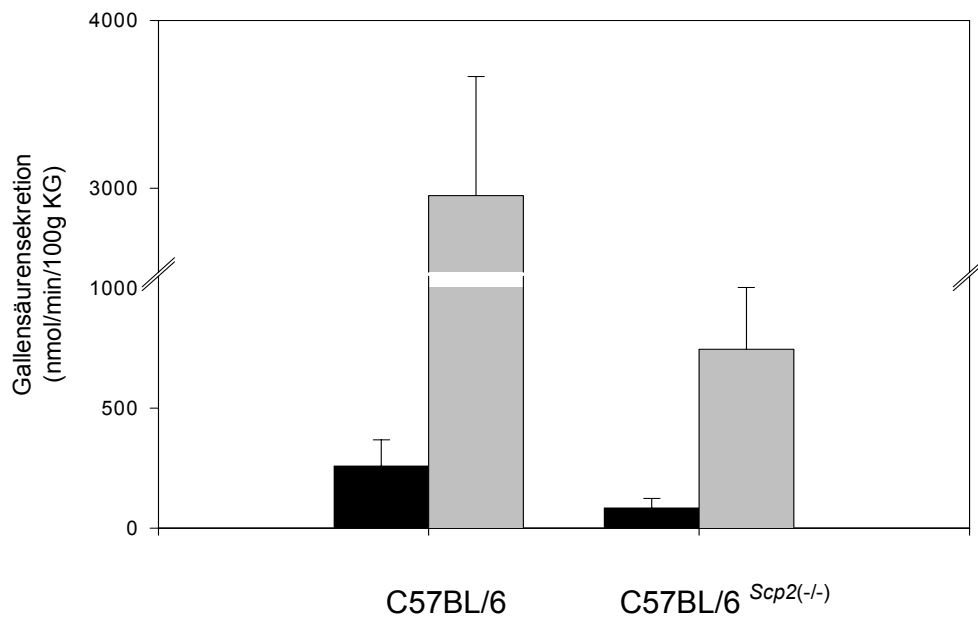
#### ***Lipid- und Gallensäuresekretion***

Zur Bestimmung der Menge und Zusammensetzung der hepatischen Galle wurde diese für 1h mittels einer akuten Gallenfistel abgeleitet. Nach Erhalt der Standarddiät ergaben sich für die Cholesterin- und Phospholipidsekretion bei beiden Mausgruppen

ähnliche Werte. Die mit Standarddiät gefütterten C57BL/6 – Wildtypen wiesen eine Cholesterinsekretion von  $2,6 \pm 0,6$  nmol/min/100g KG und eine Phospholipidsekretion von  $42 \pm 17$  nmol/min/100g KG auf. Die C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse zeigten unter Kontrollbedingungen eine Cholesterinsekretion von  $5,3 \pm 2,3$  nmol/min/100g KG und eine Phospholipidsekretion von  $30 \pm 8$  nmol/min/100g KG.

Nach Erhalt der lithogenen Diät erhöhte sich bei beiden Gruppen sowohl die Sekretion von Cholesterin (jeweils  $p < 0,001$ ) als auch die Sekretion von Phospholipide (WT  $p < 0,01$ , C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup>  $p < 0,001$ ) deutlich. Die Cholesterinsekretion erhöhte sich bei den Knockout - Mäusen dreifach auf  $16,3 \pm 2,3$  nmol/min/100g KG, bei den Wildtypen 21fach auf  $56 \pm 11$  nmol/min/100g KG. Die Phospholipidsekretion stieg bei den Wildtypen auf  $238 \pm 62$  nmol/min/100g KG und bei den Knockout - Mäusen auf  $152 \pm 45$  nmol/min/100g KG.

Die Gallensäuresekretion (Abb.4) war bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen unter der Standarddiät signifikant ( $p < 0,01$ ) kleiner als bei den Wildtypen ( $83 \pm 40$  vs.  $258 \pm 110$  nmol/min/100g KG). Dagegen war der Gallefluss bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen mit  $8,5 \pm 1,6$   $\mu$ l/min/100g KG signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als bei den Wildtypen ( $5,8 \pm 0,8$   $\mu$ l/min/100g KG). Nach Erhalt der lithogenen Diät stieg die Gallensäuresekretion bei den Knockout - Mäusen auf  $745 \pm 298$  nmol/min/100g KG und bei den C57BL/6 Wildtypen auf  $2957 \pm 708$  nmol/min/100g KG. Bei den Kontrolltieren führte die Gabe der lithogenen Diät zu einer deutlichen ( $p < 0,01$ ) Zunahme des Galleflusses ( $15,0 \pm 2,7$   $\mu$ l/min/100g KG), im Gegensatz dazu blieb der Gallefluss bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen annähernd unverändert ( $9,9 \pm 2,4$   $\mu$ l/min/100g KG).



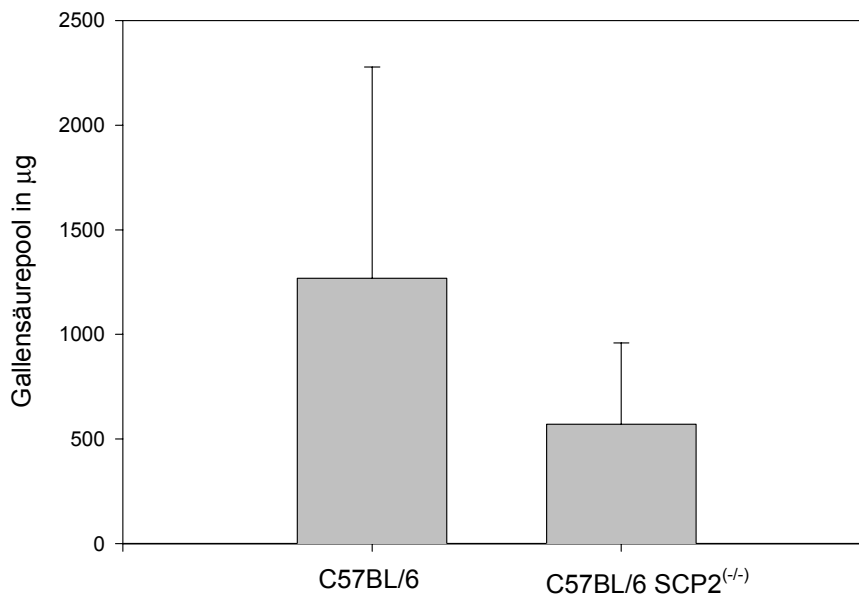
**Abbildung 4:** Dargestellt ist die Gallensäuresekretion für C57BL/6 Wildtypen und C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse, jeweils nach dreimonatiger Kontrolldiät (schwarze Balken) bzw. lithogener Diät (graue Balken). Jede Säule gibt den Mittelwert ± 1 Standardabweichung (SD) für jeweils vier Tiere wieder.

### **Größe und Zusammensetzung des Gallensäurepools**

#### **Größe**

Um der Frage nachzugehen, inwieweit die Expression des *Scp2*-Gens die Größe und die Zusammensetzung des Gallensäurepools beeinflusst, wurden die Gallensäuren aus Lebern, Gallenblasen und Dünndärmen von jeweils vier Wildtyp- bzw. C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen extrahiert und untersucht. Da die lithogene Diät mit 0,5% Cholsäure angereichert war, wurden ausschließlich mit Standarddiät gefütterte Tiere untersucht.

Der Gallensäurepool der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse war im Vergleich zu den Wildtypmäusen kleiner ( $1267\mu\text{g} \pm 1009$  vs.  $571\mu\text{g} \pm 388$ ), allerdings statistisch nicht signifikant (Abb.5).

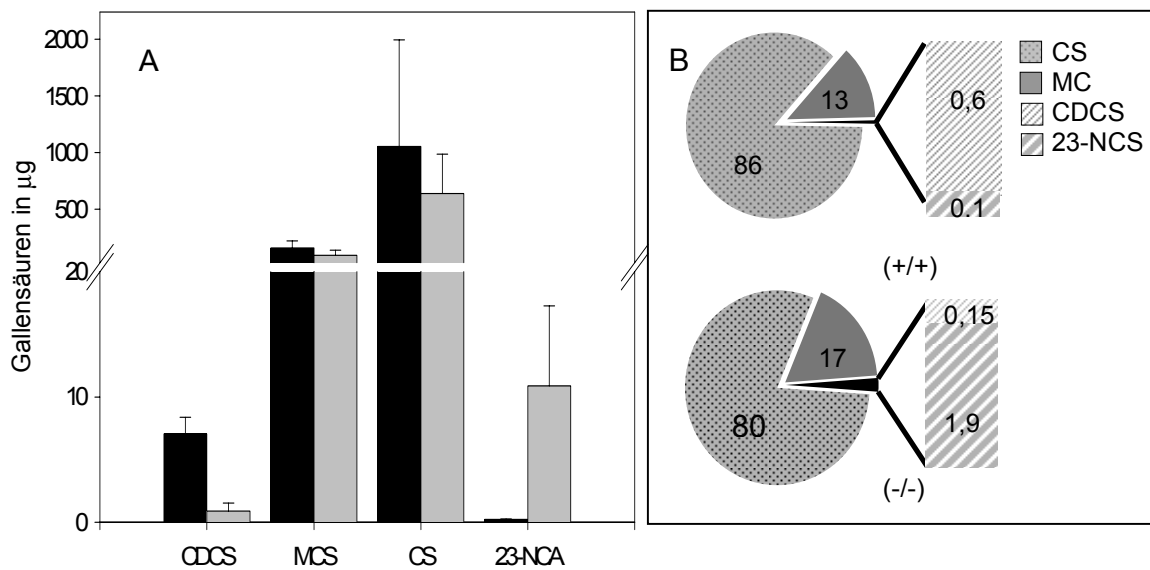


**Abbildung 5:** Zur Bestimmung der Größe des Gallensäurepools von C57BL/6 Wildtypmäusen im Vergleich zu C57BL/6 Scp2<sup>(-/-)</sup> wurden die Gallensäuren aus Leber, Gallenblase und Darm von 4-6 Tieren pro Gruppe extrahiert und deren Menge per Gas-Chromatographie Massenspektrometrie bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte  $\pm$  1 SD dar.

#### *Zusammensetzung des Gallensäurepools*

Die Zusammensetzung des Gallensäurepools wurde mittels Gas-Chromatographie – Massenspektrometrie bestimmt. Der Gehalt an CDCS im Gallensäurepool der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse betrug lediglich 13% dessen der Wildtypmäuse ( $0,89\mu\text{g} \pm 0,65$  vs.  $7,07\mu\text{g} \pm 1,31$ ;  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz dazu ließ sich im Gallensäurepool der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse deutlich mehr 23-Norcholsäure (23-NCS) als in dem Gallensäurepool der Wildtypen nachweisen ( $10,89\mu\text{g} \pm 6,39$  vs.  $0,25\mu\text{g} \pm 0,005$ ;  $p < 0,05$ )(Abb.6). 23-NCS unterscheidet sich von CS durch das Fehlen einer Methylgruppe an der Seitenkette des Sterolrings. Sowohl für Muricholsäure als auch

für CS ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Diese Daten belegen einen Einfluss der *Scp2*-Genexpression auf die Größe und Zusammensetzung des Gallensäurepools.



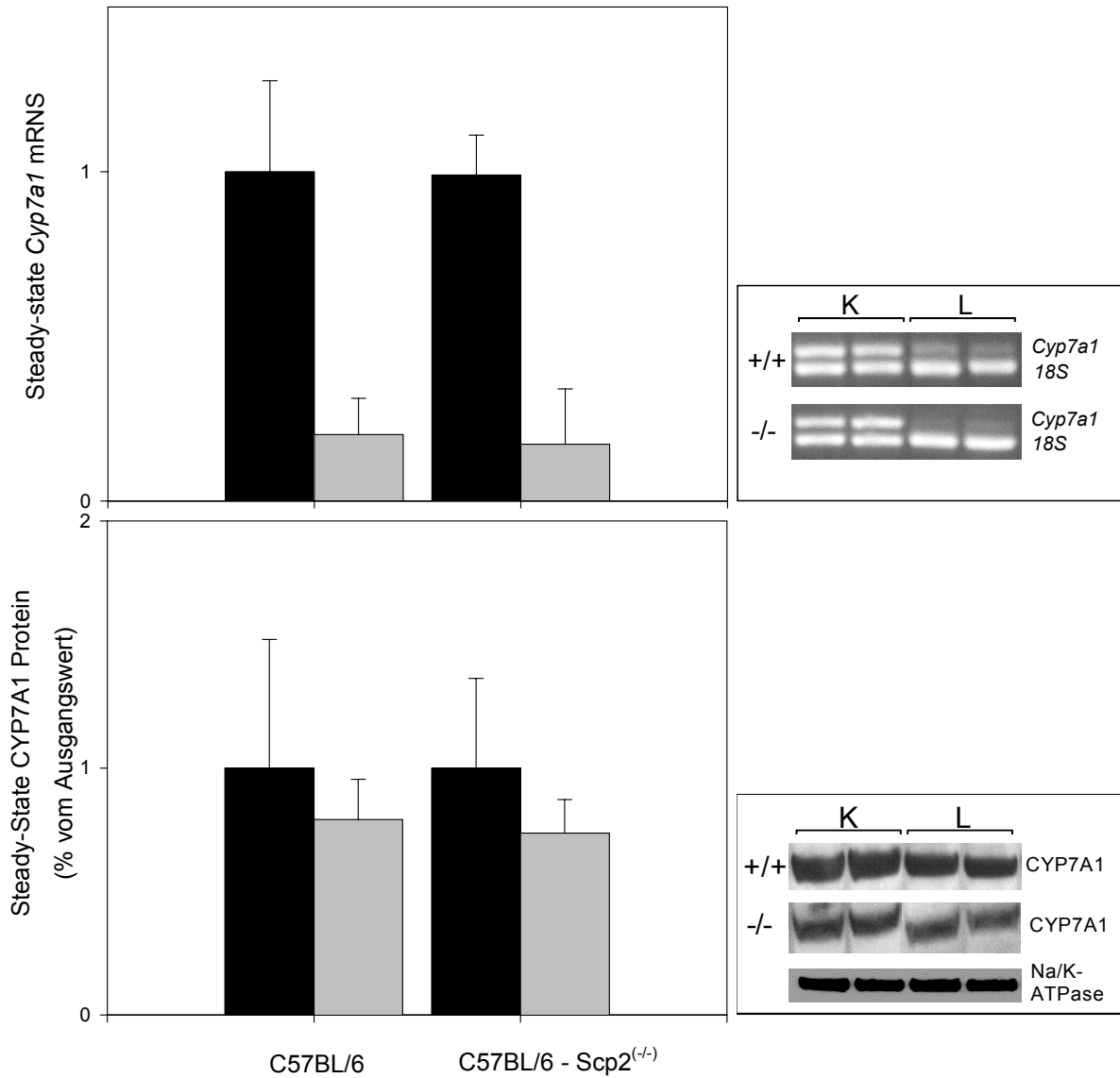
**Abbildung 6: Zusammensetzung des Gallensäurepools:** Mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie wurde die Zusammensetzung des Gallensäurepools von C57/BL6 Wildtypen (schwarze Balken) und C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäusen (graue Balken) bestimmt. Während in Abbildung A die Mittelwerte  $\pm$  1 SD der einzelnen Gallensäuren dargestellt sind, zeigt Abbildung B auf der rechten Seite die prozentuale Verteilung der Gallensäuren bei C57/BL6 Wildtypen (+/+) und C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäuse (-/-). Im Gegensatz zu den Wildtypen zeigen die Knockout – Mäuse einen deutlich erhöhten Gehalt von 23-NCS bei geringeren Werten für CDCS.

### **Enzyme des klassischen Wegs der Gallensäuresynthese**

#### *Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1)*

Die Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Wegs der Gallensäuresynthese. CYP7A1 wird ausschließlich in der Leber exprimiert und unterliegt einer genauen Regulation durch Feedback- und Feedforward-Mechanismen. Die in Abb. 7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Verlust des *Scp2*-Gens weder eine Veränderung der *Cyp7a1* mRNA-Expression noch eine Veränderung der CYP7A1 Protein - Expression bewirkt.

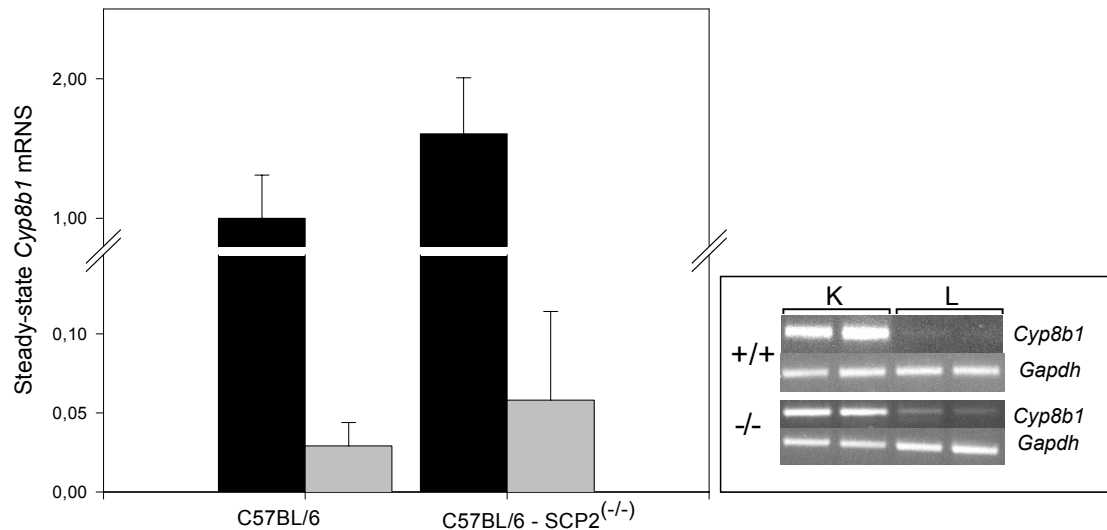
Auch nach Fütterung der Tiere mit lithogener Diät für 12 Wochen ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen nachweisen. Beide Gruppen reagierten mit einer deutlichen Reduktion der Enzymexpression. Während sich die mRNA-Expression um 80% (C57/BL6,  $p < 0,002$ ) bzw. 82,5% (C57BL/6<sup>*Scp2*(-/-)</sup>  $p = 0,01$ ) reduzierte, fiel die Verringerung auf der Proteinebene geringer und nicht signifikant aus. Diese Ergebnisse lassen auf eine intakte Feedback-Hemmung des klassischen Weges der Gallensäuresynthese in beiden Tiergruppen schließen.



**Abbildung 7: Einfluss der lithogenen Diät auf die *Cyp7a1* mRNA und CYP7A1-Proteinexpression bei C57BL/6-Wildtypen und Knockout-Mäuse (C57BL/6 - *Scp2*<sup>(-/-)</sup>), jeweils nach 12 Wochen Kontrolldiät (schwarze Balken) bzw. lithogener Diät (graue Balken). Steady-state *Cyp7a1* mRNA wurde aus Leber-Gesamt-RNS mittels Multiplex RT-PCR, CYP7A1 Protein aus Leberhomogenat mittels Western Blot bestimmt. Die Säulen stellen den Mittelwert  $\pm$  1 SD für 4-6 Mäuse dar. Repräsentative Blots sind auf der rechten Seite abgebildet, wobei K Kontrolldiät und L lithogene Diät bedeutet.**

### *Sterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP8B1)*

Während CYP7A1 das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des klassischen Weges der Gallensäuresynthese ist, entscheidet die Aktivität der Sterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase über das Verhältnis der Endprodukte Cholsäure zu Chenodeoxycholsäure. Dabei unterliegt *Cyp8b1* wie auch *Cyp7a1* einer Feedback-Regulation durch FXR. Die mit Hilfe der Multiplex RT-PCR gemessenen *Cyp8b1* mRNA-Mengen zeigten unter Kontrollbedingungen eine nicht signifikante Erhöhung bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen (Abb. 8). Auf die lithogene Diät reagierten die C57/BL6 Wildtypen mit einer Verminderung der *Cyp8b1*-mRNA um 96,7% ( $P < 0,001$ ), die C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse mit einer Verminderung um 95,9% ( $P = 0,02$ ). Die Ergebnisse zeigen eine intakte Feedback-Hemmung der *Cyp8b1*-Expression nach Erhalt der cholsäurehaltigen Diät in beiden Tiergruppen. *Scp2* hat demzufolge keinen Einfluss auf die Regulation der *Cyp8b1*-Expression



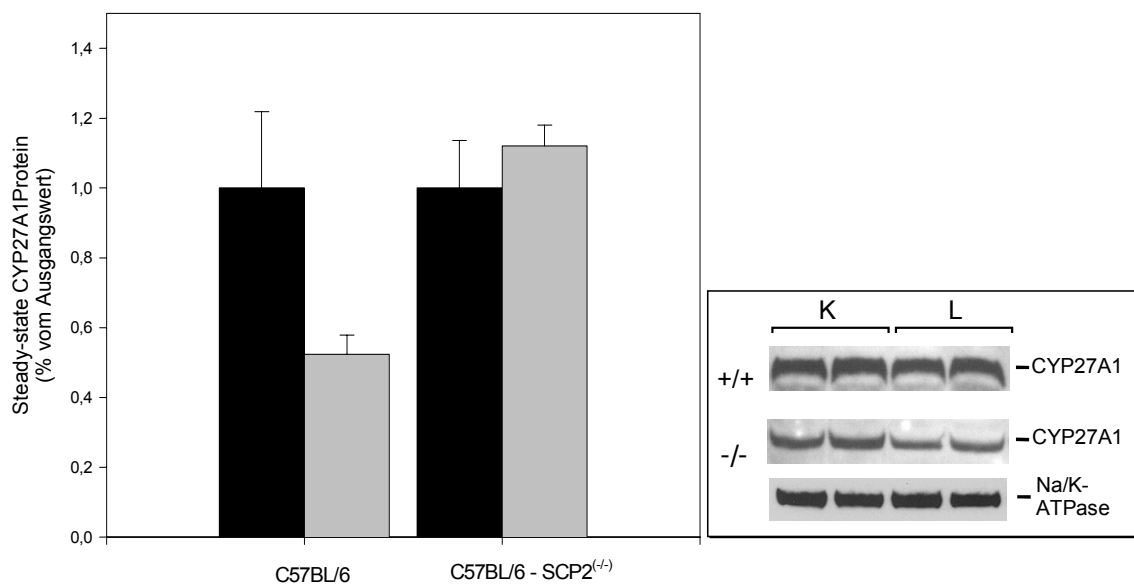
**Abbildung 8:** Die mittels RT-PCR bestimmte *Cyp8b1*-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen. Nach Erhalt der lithogenen Diät (graue Balken) reagieren beide mit einer deutlichen Reduktion der *Cyp8b1* mRNA-Expression im Vergleich zu den Tieren mit Kontrolldiät (schwarze Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  1 Standardabweichung für jeweils 4-6 Mäuse. Repräsentative Blots sind auf der rechten Seite abgebildet, wobei K Kontrolldiät und L lithogene Diät bedeutet.

### ***Enzyme des alternativen Wegs der Gallensäuresynthese***

#### ***Cholesterin 27-Hydroxylase (CYP27A1)***

Die Cholesterin 27-Hydroxylase ist das erste Enzym des alternativen Weges der Gallensäuresynthese. Durch die Bildung von 27-Hydroxycholesterin, dem quantitativ wichtigsten Oxysterol, kommt CYP27A1 eine bedeutende Funktion in der Elimination überschüssigen Cholesterins zahlreicher Gewebe zu.

Im Sinne einer Feedback-Hemmung zeigten die C57BL/6 Wildtypen eine Reduktion der Cyp27A1-Proteinmenge um 47,8% ( $p < 0,01$ ) nach Fütterung der lithogenen Diät. Bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen konnte hingegen keine signifikante Reduktion der Cyp27A1-Proteinmenge festgestellt werden (Abb. 9). Die *Scp2*-Genexpression scheint demnach die Regulation von CYP27A1 zu beeinflussen.

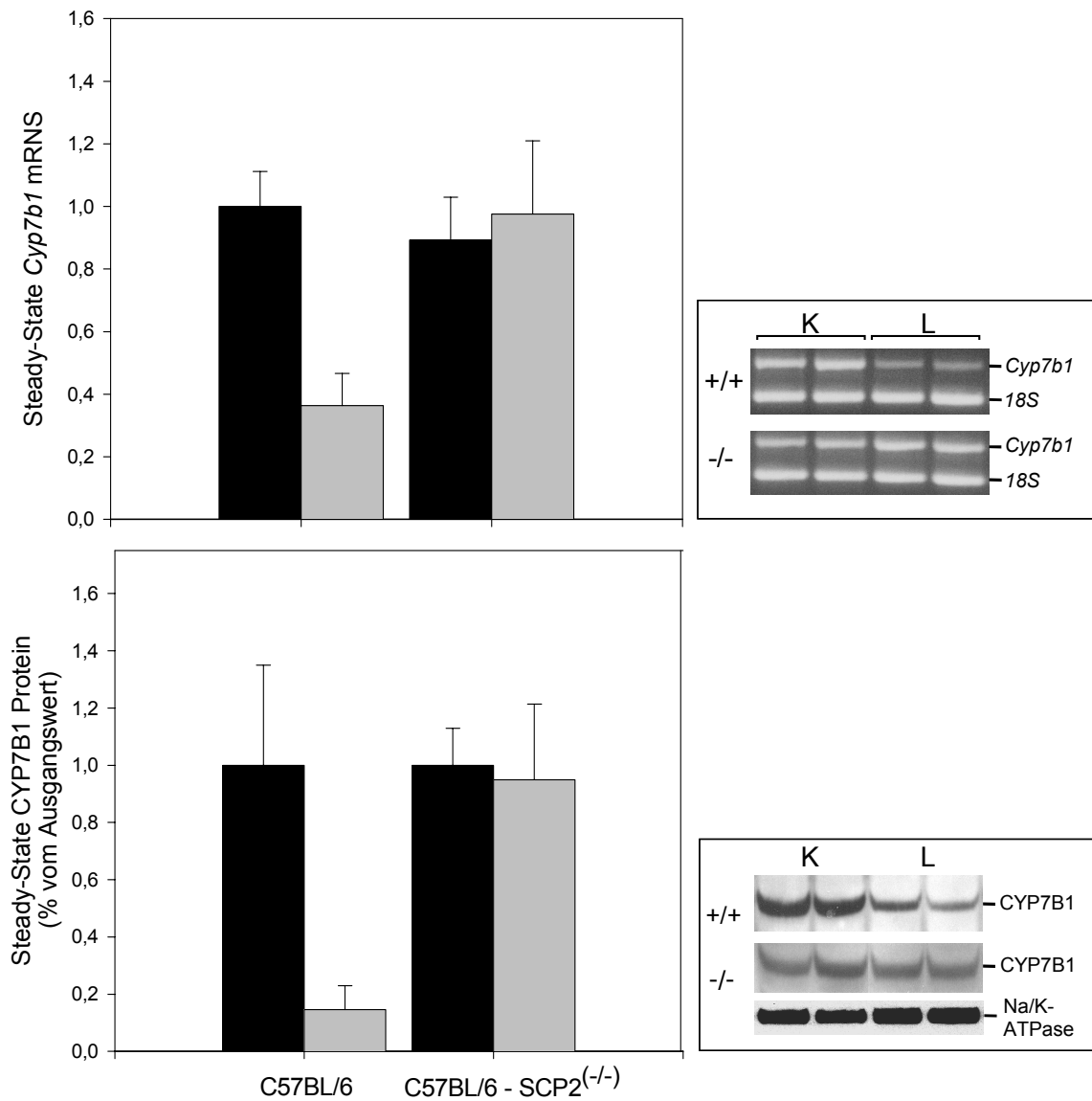


**Abbildung 9:** Dargestellt sind die CYP27A1-Proteinmengen von C57/BL6 Wildtyp- und Knockout-Mäusen, nach Erhalt einer Kontrolldiät (schwarze Balken) bzw. einer lithogenen Diät (graue Balken) für 12 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  1 SD für 4-6 Tiere. Repräsentative Blots sind auf der rechten Seite abgebildet, wobei K Kontrolldiät und L lithogene Diät bedeutet.

### *Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7B1)*

Das *Cyp7b1*-Gen kodiert für eine Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase. Diese ist verantwortlich für die 7 $\alpha$ -Hydroxylierung von Oxysterolen, hauptsächlich 25- und 27-Hydroxycholesterin.

Unter Kontrollbedingungen, d.h. nach Fütterung einer Standarddiät unterschied sich die Expression des *Cyp7b1*-Gens zwischen den beiden Mäusegruppen nur marginal. Nach Erhalt der lithogenen Diät ließ sich bei den C57/BL6 Wildtypen sowohl eine signifikante Reduktion der *Cyp7b1* - mRNA (-63,6%,  $p < 0,001$ ), als auch der CYP7B1 Proteinmenge (-85,5%,  $p = 0,005$ ) feststellen. Im Gegensatz dazu, veränderten sich bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen weder die *Cyp7b1*-mRNA, noch die CYP7B1 Proteinmengen nach Gabe der lithogenen Diät (Abb.10). Eine intakte *Scp2*-Expression scheint demnach die Voraussetzung für eine funktionierende Regulation von *Cyp7b1* zu sein.



**Abbildung 10:** Dargestellt ist die *Cyp7b1* mRNA – Expression im oberen und die CYP7B1 Protein–Expression im unteren Diagramm, jeweils für Kontrolltiere (C57BL/6) und C57BL/6<sup>Scp2<sup>(-/-)</sup></sup> Mäusen (C57BL/6 – SCP2<sup>(-/-)</sup>) vor und nach Erhalt einer lithogenen Diät. Dargestellt sind die Mittelwerte ± 1 SD für 4-6 Tiere. Repräsentative Blots sind auf der rechten Seite abgebildet, wobei K Kontrolldiät und L lithogene Diät bedeutet.

### *Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP39A1)*

Durch Transkription und Translation des *Cyp39a1* - Gens entsteht eine weitere Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase. Diese wird im Gegensatz zu CYP7B1 ausschließlich in der Leber synthetisiert und hydroxyliert vornehmlich das im Gehirn gebildete 24-Hydroxycholesterin.

Die Expression von *Cyp39a1* zeigte keine Unterschiede zwischen den C57BL/6 Wildtypen und C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen. Auch nach Erhalt der cholesterin- und cholsäurehaltigen Diät zeigten sich bei beiden Mausstämmen keine Veränderungen, weder in der mRNA- noch in der Proteinexpression. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression von *Cyp39a1* keiner Regulation durch *Scp2* unterliegt.

### ***Expression der Transkriptionsfaktoren***

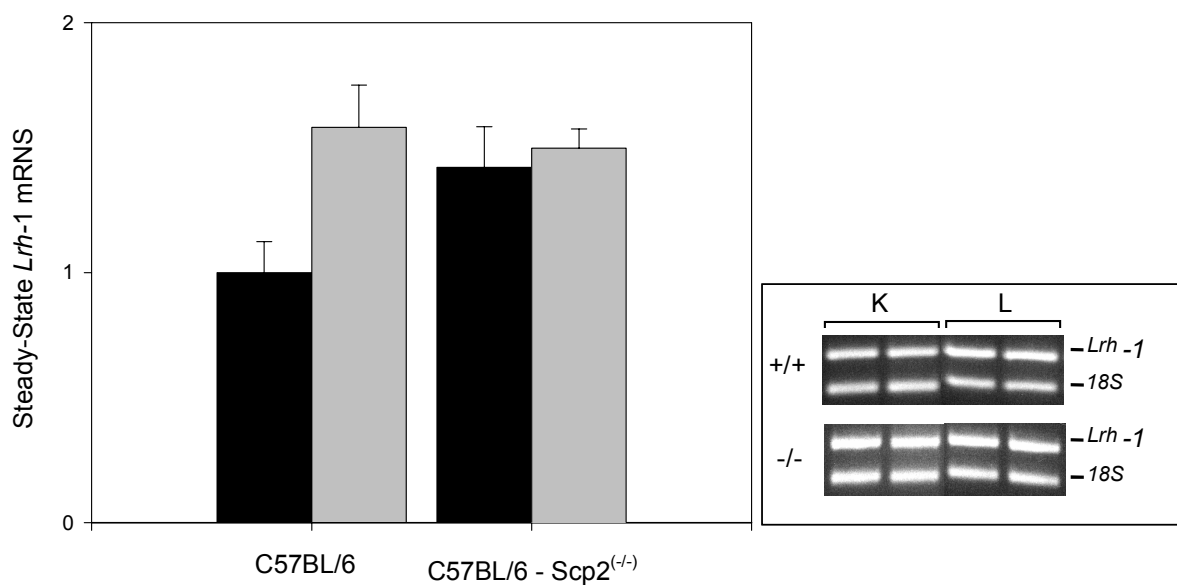
#### *Leber Rezeptor-X $\alpha$ (LXR $\alpha$ ) und Leber Rezeptor Homolog-1 (LRH-1)*

Die Cholesterin- und Gallensäurehomöostase in der Leber wird durch einen aktivierenden und einen hemmenden Regelkreis der Gallensäuresynthese gewährleistet. LXR $\alpha$  und LRH-1 stellen die wesentlichen Komponenten des aktivierenden Regelkreises dar. LXR $\alpha$  bindet als Heterodimer mit RXR Oxysterole, steigert die Expression von CYP7A1 und CYP8B1 und somit auch die Bildung von Gallensäuren. Für diese Aktivierung ist LRH-1 ein notwendiger Kofaktor.

Die Untersuchung der mRNA-Expression von *Lxr $\alpha$*  ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, weder zwischen Wildtypen und C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen, noch zwischen Standarddiät und lithogener Diät. Während die *Lxr $\alpha$* -Expression anscheinend weder durch die Zusammensetzung der Diät noch durch die *Scp2* - Expression beeinflusst wird, ließen sich für die *Lrh-1* mRNA - Expression die in Abb. 11 gezeigten Unterschiede nachweisen. Unter

Kontrollbedingungen zeigte sich eine 1,4-fach höhere Expression von *Lrh-1* bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen ( $p = 0,02$ ).

Nach Fütterung der cholesterin- und cholsäurehaltigen Diät stieg die *Lrh-1* mRNA - Expression bei den C57BL/6–Wildtypmäusen 1,6-fach ( $p = 0,06$ ) und bei den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen 1,4–fach ( $p < 0,01$ ) an.



**Abbildung 11:** Die *Lrh1* mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNS der Leber bestimmt, pro Gruppe wurden 4-6 Mäuse untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm 1$  SD. Repräsentative Blots sind auf der rechten Seite abgebildet, wobei K Kontrolldiät und L lithogene Diät bedeutet.

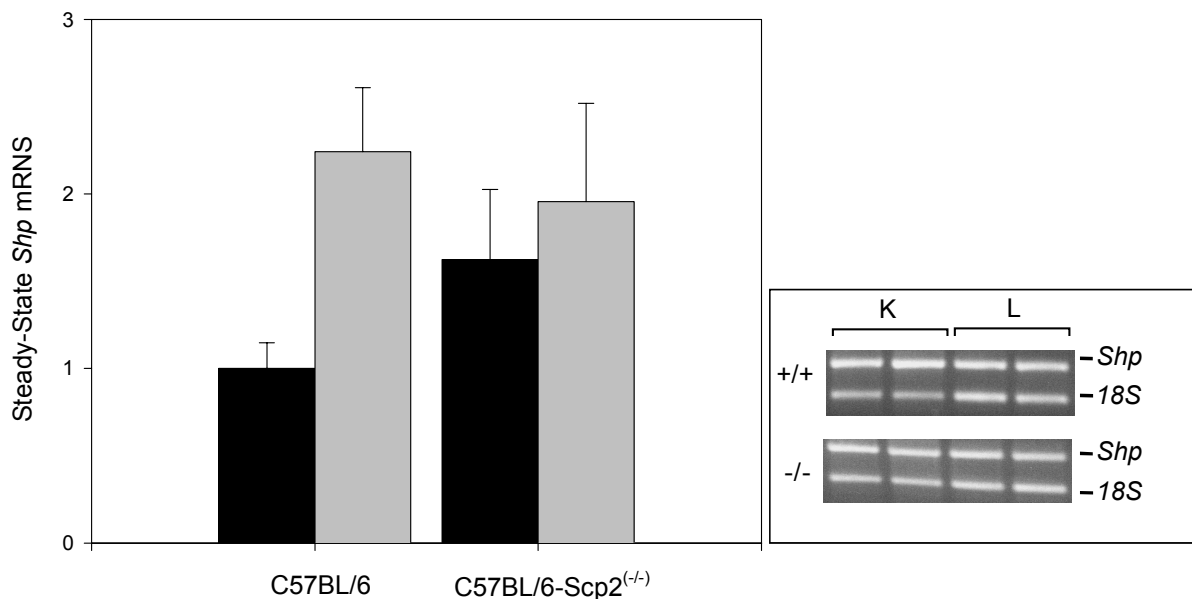
#### *Farnesoid Rezeptor-X (FXR) und kurzer heterodimerer Partner (SHP)*

Während LXR $\alpha$  und LRH-1 vorwiegend die Aktivierung der Gallensäuresynthese vermitteln, sind FXR und SHP entscheidende Faktoren für die Inhibition der

Gallensäurensynthese. Aktiviert durch Gallensäuren verringern diese beiden Faktoren im Sinne einer Feedback-Inhibition die Expression von *Cyp7a1* und *Cyp8b1*.

Die Analyse der *Fxr* mRNS-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Mäusen, weder vor noch nach Erhalt einer lithogenen Diät.

In Abb. 12 ist der 2,2-fache Anstieg der *Shp* mRNS-Expression nach Erhalt der lithogenen Diät bei den Wildtypmäusen dargestellt ( $p < 0,001$ ), passend zu einer intakten Feedback-Hemmung durch die zugeführte Cholsäure. Die C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäuse zeigten unter Kontrollbedingungen eine 1,6-fach höhere Expression als die Mäuse mit intaktem *Scp2* - Gen ( $p = 0,02$ ). Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied liefert die veränderte Zusammensetzung des Gallensäurepools der Knockout-Mäuse.



**Abbildung 12:** Die *Shp* mRNS-Expression wurde mittels RT-PCR aus Gesamt-RNS von 4-6 Mäuselebern bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  1 SD. Repräsentative Blots sind auf der rechten Seite abgebildet, wobei K Kontrolldiät und L lithogene Diät bedeutet.

## Diskussion

### ***Einfluss von SCP2 auf die Größe des Gallensäurenpools***

Verschiedene Untersuchungen versuchten einen Einfluss von SCP2 auf die Gallensäurensynthese zu belegen. Lidström-Olsson et. al. konnten *in vitro* eine dreifache Steigerung der Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1), sowie eine zweifache Steigerung der 12 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP8B1) durch Zugabe von SCP2 zu einem aus Zellextrakten bestehendem System erreichen (54). Diese unspezifische Stimulation der Enzyme wurde von den Autoren am ehesten durch einen gesteigerten Substrattransport zu den membrangebundenen Enzymen erklärt. Erst die Züchtung einer *Scp2* Knockout-Maus (C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>(-/-)</sup></sup>) eröffnete jedoch die Möglichkeit, Klarheit zu schaffen, inwieweit sich die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse auf die Gallensäurensynthese *in vivo* übertragen lassen (89). Die Analyse der hepatischen Galle nach Ableitung aus dem Ductus hepaticus erlaubt zudem genauere Aussagen über die Menge und Zusammensetzung der sezernierten Galle, da diese in der Gallenblase in ihrer Zusammensetzung verändert wird (16).

Die C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>(-/-)</sup></sup> Mäuse zeigten einen, wenn auch nicht signifikant, verkleinerten Gallensäurepool. Dazu passend ließ sich im Vergleich mit den Wildtypen bei den Knockout-Mäusen eine deutlich verringerte biliäre Gallensäuresekretion nachweisen. Die Werte der Cholesterin- und Phospholipidsekretion ergab dagegen ähnliche Werte für beide Mausstämme. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen an Mäusen, die aufgrund einer Infektion mit einem rekombinanten *Scp2*-Adenovirus vermehrt SCP2 bilden. Diese weisen einen vergrößerten Gallensäurenpool und eine vermehrte biliäre Gallensäuresekretion auf (113). Eine mögliche Ursache des verkleinerten Gallensäurenpools und der geringeren biliären Gallensäuresekretion ist dabei die gestörte  $\beta$ -Oxidation der Cholesterinseitenkette im Rahmen der Gallensäurensynthese in den C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>(-/-)</sup></sup> Mäusen. Die gestörte  $\beta$ -Oxidation ist allerdings nicht auf das Fehlen von SCP2, sondern wahrscheinlich auf die Abwesenheit von SCPX zurückzuführen. SCPX entsteht durch alternative Transkription ebenfalls aus dem *Scp2*-Gen und ist als Thiolase an der  $\beta$ -Oxidation

der Gallensäuren beteiligt (42). Neben der mangels SCPX gestörten Gallensäurensynthese scheint allerdings auch eine fehlerhafte Regulation insbesondere des alternativen Wegs der Gallensäure in den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen zu einem verkleinerten Gallensäurenpool beizutragen. Mäuse mit deletiertem *Cyp27a1*-Gen weisen ebenfalls einen verkleinerten und in seiner Zusammensetzung veränderten Gallensäurenpool auf (76,79).

### ***Einfluss von SCP2 auf die Zusammensetzung des Gallensäurenpools***

Durch den Nachweis einer großen Fraktion von 23-Nor-Gallensäuren im Serum der *Scp2* Knockout-Mäuse konnten Kannenberg et. al. erstmals einen Effekt von SCP2/SCPX auf die Gallensäurensynthese *in vivo* nachweisen (42). In Übereinstimmung damit, konnten durch die vorliegende Untersuchung erstmals erhöhte Werte für 23-Norgallensäuren im gesamten Gallensäurenpool der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse im Vergleich mit den Wildtypen nachgewiesen werden. Während normalerweise die Gallensäuren nahezu aller Säugetiere aus 24 Kohlenstoffatomen bestehen, setzen sich die Nor-Gallensäuren aufgrund einer fehlenden Methylgruppe aus lediglich 23 Kohlenstoffatomen zusammen. 23-Nor-Gallensäuren werden durch eine gesteigerte  $\alpha$ -Oxidation der Zwischenprodukte der Gallensäurensynthese gebildet. In den *Scp2* Knockout-Mäusen ist die  $\alpha$ -Oxidation vermutlich als Kompensationsmechanismus für die gestörte  $\beta$ -Oxidation der Gallensäurensynthese gesteigert (89).

Die veränderte Zusammensetzung des Gallensäurenpools in den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen stellt einen möglichen Grund für die verringerte biliäre Gallensäuresekretion dar. Während die atypischen 23-Nor-Gallensäuren im Pool der C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse deutlich erhöht waren, war der Anteil an Chenodeoxycholsäure vermindert. Chenodeoxycholsäure besitzt im Gegensatz zu Cholsäure eine Hydroxylgruppe weniger und gehört in das hydrophobere Spektrum der Gallensäuren. *Scp2* Knockout-Mäuse besitzen demnach einen hydrophileren Gallensäurenpool als die Kontrolltiere mit intaktem *Scp2*-Gen. Die Sekretion der Gallensäuren des hydrophileren Spektrums aus den Hepatozyten in die Galle erfolgt vornehmlich durch

ein in der kanalikulären Membran vorhandenes Transportprotein mit der Bezeichnung BSEP (105). Untersuchungen haben eine Reduktion der *Bsep*-Expression in *Scp2* Knockout-Mäusen ergeben (unveröffentlichte Daten, M. Fuchs). Es ergibt sich bei den C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäusen also ein Zustand erhöhter Hydrophilie des Gallensäurepools, dem eine erniedrigte Expression des für die Sekretion dieser Gallensäuren wichtigen Transportproteins gegenübersteht und stellt damit, neben dem verkleinerten Gallensäurenpool, einen weiteren Grund für die verminderte biliäre Gallensäuresekretion dar.

Erhöhte Werte von 23-Nor-Gallensäuren lassen sich ebenfalls bei Patienten nachweisen, die an zerebrotendinöser Xanthomatose leiden. Diese Krankheit wird durch den Ausfall der Sterol 27-Hydroxylase (CYP27A1) ausgelöst und führt aufgrund eines gestörten Cholesterin- und Gallensäurenstoffwechsels zu einer Zerstörung der Myelinscheiden der Nerven und damit zu einer progressiven neurologischen Dysfunktion (13,109). Interessanterweise zeigen Mäuse mit künstlich zerstörtem *Cyp27a1*-Gen keine erhöhten Werte für 23-Nor-Gallensäuren (79). Ein im murinen, nicht aber im menschlichen Organismus enthaltenes Enzym kann diese unterschiedlichen Phänotypen bei der Zerstörung des *Cyp27a1*-Gens erklären. Mäuse besitzen eine zusätzliche microsomale Steroid 27-Hydroxylase, welche die normale Gallensäurenbildung aufrecht erhalten kann (99).

Die Störung der  $\beta$ -Oxidation mangels ScpX ist jedoch nicht die einzige pathogenetische Erklärung für die gestörte Gallensäurensynthese in den C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäusen. Die Oxidation des Cholesterins im Rahmen der Gallensäurensynthese findet sowohl im endoplasmatischen Retikulum (6 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ -, 12 $\alpha$ - und 6 $\beta$ -Hydroxylase) als auch im Mitochondrium (27-Hydroxylase) statt (25). Der Transfer des Cholesterins innerhalb der Zelle spielt somit für die Gallensäurensynthese eine wichtige Rolle (32). Im Mitochondrium ist zusätzlich der Transfer des Cholesterins von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran von besonderer Bedeutung, da die innere Membran zwar wenig Cholesterin enthält, gerade dort aber die Oxidationsvorgänge, wie z.B. die 27-Hydroxylierung des Cholesterins, stattfinden (21). Für die Bildung der Steroidhormone, deren erster Schritt ebenfalls mit einer Oxidation im Mitochondrium beginnt, stellt der Transport des Cholesterins von der äußeren zur inneren Membran sogar den

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (59). Eine direkte Verbindung zwischen der Gallensäurensynthese und dem Cholesterintransport im Mitochondrium konnte allerdings erst durch die Untersuchungen von Pandak und Mitarbeitern bewiesen werden. Sie konnten zeigen, dass der Cholesterintransport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den alternativen Weg der Gallensäurensynthese ist (68). SCP2 transportiert Cholesterin zum Mitochondrium und sorgt dadurch für einen Ersatz des durch Oxidation umgebauten Cholesterins (1). Dadurch ergibt sich eine Verbindung von der Gallensäurensynthese und SCP2 durch den Transport von Cholesterin zum Mitochondrium. Weitere Untersuchungen untermauern diese Vermutung durch folgende Ergebnisse: (a) hohe Werte von SCP2 lassen sich besonders in Zellen mit hohem Cholesteringehalt nachweisen, so z.B. in der Leber und den Nebennieren (71); (b) werden SCP2-Antikörper in Nebennierenrindenzellen injiziert, verringern sie die Produktion von Steroidhormonen (17); und (c) in den Mitochondrien von LH-stimulierten Ratten-Lutealzellen lassen sich erhöhte Mengen SCP2 nachweisen (58). Einen weiteren Hinweis liefert der erniedrigte Gehalt an Chenodeoxycholsäure in den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen. Chenodeoxycholsäure entsteht hauptsächlich als Produkt des alternativen Wegs der Gallensäurensynthese (103). Durch den gestörten Cholesterintransport zum Mitochondrium in den *Scp2* Knockout-Mäusen kann die Sterol 27-Hydroxylase CYP27A1 nicht ausreichend mit Substrat versorgt werden. Dies führt zu einem kleineren Gallensäurenpool mit einem verminderten Anteil von Chenodeoxycholsäure in den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen.

### ***Einfluss von SCP2 auf den klassischen Weg der Gallensäurensynthese***

Schon seit den späten 60er Jahren ist bekannt, dass die Gallensäurensynthese in der Leber genau reguliert ist (20). Steigt der Gehalt an Gallensäuren an, wird die Expression der Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) und der 12 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP8B1) durch einen negativen Feedback-Mechanismus reduziert. Steigt dagegen der Gehalt von Cholesterin bzw. Oxysterolen in der Zelle, wird die Gallensäurensynthese durch eine vermehrte Expression von *Cyp7a1* aktiviert. Die Reduzierung der Gallensäurensynthese wird durch den Kernrezeptor FXR vermittelt.

Durch die Bindung von Gallensäuren aktiviert dieser eine Reihe von Genen, deren Produkte im Gallensäuren- und Lipidmetabolismus wichtige Funktionen übernehmen. Dazu gehören u.a. der ileale Gallensäuretransporter IBAT (57) sowie einige ABC-Transportproteine, welche eine wichtige Rolle im transmembranären Transport von Gallensäuren übernehmen (3,43). Besondere Bedeutung hat zudem die Aktivierung von SHP durch FXR (55). SHP seinerseits sorgt für eine Blockierung der durch LRH-1 vermittelten Expression des *Cyp7a1*- und *Cyp8b1*-Gens (55). Die verminderte Expression von *Cyp7a1*- und *Cyp8b1* nach Erhalt der gallensäurenreichen Diät in der vorliegenden Untersuchung deutet auf eine intakte Feedback-Hemmung sowohl in den Wildtypen als auch in den *Scp2*-Knockouts hin.

Die geringere Reduktion des CYP7A1-Proteins im Gegensatz zu der ausgeprägteren Reduktion der *Cyp7a1*-mRNS lässt sich durch die verschiedenen Regulationsmechanismen der Proteinbiosynthese erklären. Prinzipiell kann die Proteinbiosynthese auf der Ebene der Transkription sowie der Regulation der mRNS-Stabilität oder der Ebene der mRNS-Translation reguliert werden. Für die Regulation der mRNS-Translation scheinen dabei sowohl G-Proteine als auch verschiedene Zytokine eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Mechanismen erlauben eine Aktivitätssteigerung der mRNS-Translation, so dass trotz verminderter mRNS-Mengen annähernd gleiche Proteinmengen synthetisiert werden.

Trotz einer scheinbar intakten Regulation von *Cyp7a1* und *Cyp8b1* zeigen die *Scp2* Knockout-Mäuse eine veränderte Expression der Kernrezeptoren. Während *Fxr* in der Expression keine Unterschiede zwischen C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäusen und Wildtypen zeigt, fällt die *Shp*-Expression in den C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäusen signifikant höher aus. Eine umfassende Erklärung für die erhöhte Expression lässt sich derzeit nicht geben, wohl aber können Vermutungen angestellt werden. Für die gesteigerte Aktivierung des *Shp*-Gens ist eine vermehrte Bindung von Gallensäuren an FXR notwendig. Allerdings besitzen nicht alle Gallensäuren die gleiche Potenz zur Bindung an FXR. Es bestehen vielmehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Gallensäuren in ihrer Möglichkeit, den Feedbackmechanismus zu regulieren (57,69). Auch wenn Chenodeoxycholsäure einen der potentesten Bindungspartner für FXR darstellt und dessen Konzentration im Gallensäurenpool der C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>-/-</sup></sup> Mäuse vermindert ist, lässt sich eine verstärkte Expression des *Shp*-Gens durch eine veränderte

Zusammensetzung des Gallensäurepools in den Knockout-Mäusen nicht ausschließen. Eine Erklärung für die fehlende Auswirkung der veränderten Expression von *Shp* auf *Cyp7a1* und *Cyp8b1* liefern die alternativen Regulationsmechanismen dieser Gene. Kerr und Mitarbeiter konnten anhand von Untersuchungen an einer *Shp* Knockout-Maus nachweisen, dass neben SHP mindestens vier weitere Mechanismen zur Verminderung der Expression von *Cyp7a1* bestehen (45). Dazu gehört auch eine über Signaltransduktion regulierende Wirkung der Gallensäuren auf die synthetisierenden Enzyme. Inwieweit die cholesterin- und cholsäurehaltige lithogene Diät diese Regulation beeinflusst bleibt unklar.

Während FXR und SHP die Bildung der potenziell zytotoxischen Gallensäuren verringern, sorgen LXR $\alpha$  und LRH-1 für einen vermehrten Umbau von Cholesterin in Gallensäuren. LXR $\alpha$  steigert durch die Bindung von Cholesterin bzw. Oxysterolen die Expression von *Cyp7a1*, LRH-1 fungiert dabei als notwendiger Co-Faktor. Auch die exklusive Synthese der Cholesterin 7 $\alpha$ -Hydroxylase in der Leber lässt sich auf die Wirkung von LRH-1 auf eine regulatorische Sequenz im *Cyp7a1*-Gen zurückführen (2,62). Die Expression von *Lxr $\alpha$*  wurde durch SCP2 nicht beeinflusst, weder unter den Bedingungen der Kontrolldiät, noch unter der Fütterung der cholesterinreichen lithogenen Diät. Die Expression von *Lrh-1* zeigte demgegenüber Unterschiede zwischen den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen und den Wildtypmäusen, wobei die Knockout-Mäuse unter Kontrollbedingungen signifikant höhere Mengen von *Lrh-1* mRNS aufwiesen. LRH-1 wird in der Leber, den Ovarien, dem Dünndarm, dem Pankreas sowie im Kolon synthetisiert (77). Bindet SHP LRH-1 an dessen Carboxyende verliert LRH-1 die Möglichkeit, andere Co-Faktoren zu binden und *Cyp7a1* zu aktivieren (48). Auf welche Weise SCP2 mit LRH-1 interagiert und warum die Ausschaltung des *Scp2* - Gens zu einer vermehrten Expression von *Lrh-1* führt, lässt sich nur vermuten. Eine mögliche Ursache liegt in einem durch SCP2 veränderten intrazellulären Cholesteringehalt. Im Gegensatz zu Wildtypmäusen weisen C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse einen geringeren Gehalt an Cholesterin und Cholesterinestern in der Leberzelle auf (27). Dazu passend zeigte sich in SCP2 überexprimierenden Zellen ein erhöhter Cholesteringehalt (114). Eine Störung der Feedforward-Regulation der

Gallensäurensynthese durch einen veränderten intrazellulären Cholesteringehalt in C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen scheint daher möglich.

### ***Einfluss von SCP2 auf den alternativen Weg der Gallensäurensynthese***

Während die Regulation des klassischen Wegs der Gallensäurensynthese durch die Entdeckung der Kernrezeptoren und ihren Regelkreisen weitgehend entschlüsselt wurde, wirft die Regulation des alternativen Wegs der Gallensäurensynthese weiterhin zahlreiche Rätsel auf. Die Cholesterin 27-Hydroxylase (CYP27A1) bildet das wichtigste Enzym am Beginn dieses Synthesewegs (4,80). Die Regulation dieses Enzyms durch Gallensäuren bildet den Gegenstand zahlreicher Diskussionen. Während einige Autoren bei Ratten eine Regulation von *Cyp27a1* analog zu der von *Cyp7a1* beschreiben (98,102), stellen andere in Ratten (9), Menschen (8) und Mäusen (86) keine koordinierte Regulierung der beiden Enzyme fest. Die Sterol 27-Hydroxylase steht allerdings nicht nur am Beginn des alternativen Wegs der Gallensäurensynthese, sondern spielt auch im Rahmen der Kürzung und Oxidation der Seitenkette beim klassischen Weg der Gallensäurensynthese eine entscheidende Rolle. Eine vollkommen unkoordinierte Regulation würde demnach in einer Anhäufung von Zwischenprodukten resultieren und scheint vor diesem Hintergrund eher unwahrscheinlich (40). Viel wahrscheinlicher ist dagegen, dass nicht die Expression der Sterol 27-Hydroxylase den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor darstellt, sondern der Substrattransport zu diesem Enzym (95). Auch die Menge der mittels des alternativen Weges synthetisierten Gallensäuren wird durch diesen Substrattransport geregelt (68). Die beobachteten Unterschiede bei der Expression von CYP27A1 zwischen C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen und Wildtypmäusen lassen sich somit durch eine potentielle Rolle von SCP2 als Substrattransporter zum Mitochondrium erklären. Während die Mäuse mit intaktem *Scp2* - Gen eine Reduktion der Sterol 27-Hydroxylase nach Erhalt einer cholesterin- und cholsäurehaltigen Diät zeigen, ändert sich die Enzymmenge in den C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen nicht. Der alternative Weg der Gallensäurensynthese ist in den Knockout-Mäusen durch einen verminderten Substrattransport nicht nur in seiner Funktion, erkennbar an dem

verminderten Chenodeoxycholsäuregehalt, sondern auch in seiner Regulation gestört.

Dies wird auch durch die Untersuchungen eines weiteren Enzyms des alternativen Wegs der Gallensäuresynthese, der Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7B1) deutlich. Eine unabdingbare Voraussetzung für den Umbau von Cholesterin zu Gallensäuren besteht in der 7 $\alpha$ -Hydroxylierung der potentiellen Substrate. Unabdingbar deshalb, weil die C<sub>27</sub>-3 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Oxidoreduktase ausschließlich 7 $\alpha$ -hydroxylierte Substrate verstoffwechselt (87,106). Beim klassischen Weg der Gallensäuresynthese stellt die 7 $\alpha$ -Hydroxylierung sowohl den ersten als auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Der alternative Weg der Gallensäuresynthese beginnt dagegen mit der 27-, 25- oder 24-Hydroxylierung des Cholesterins. Erst nach der Bildung eines dieser Oxysterole erfolgt die 7 $\alpha$ -Hydroxylierung durch eine der beiden Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylasen CYP7B1 und CYP39A1 (51,83). CYP39A1 besitzt eine hohe Substratspezifität für das vor allem im Gehirn gebildete 24-Hydroxycholesterin, der quantitative Beitrag dieses Enzyms zur Synthese der Gallensäuren wurde noch nicht bestimmt. Aufgrund der hohen Substratspezifität für 24-Hydroxycholesterin und des ungestörten Gallensäurestoffwechsels in Mäusen, die aufgrund einer Deletion des Cholesterin 24-Hydroxylase-Gens dieses Oxysterol nicht bilden können, scheint CYP39A1 eine spezielle Rolle im Cholesterinmetabolismus des Gehirns zu spielen (80). Es verwundert daher nicht, dass in der vorliegenden Untersuchung die Expression von CYP39A1 keine Unterschiede erkennen ließ, weder zwischen den Gruppen mit und ohne lithogene Diät, noch zwischen C57BL/6 Wildtypen und C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäusen. Diesem Ergebnis nach scheint eine Regulation des *Cyp39a1*-Gens höchst unwahrscheinlich, sowohl in unveränderten C57BL/6 Mäusen als auch in denen mit zerstörtem *Scp2*-Gen.

Ein anderes Bild liefert die Untersuchung der Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase CYP7B1. Die Mäuse mit intaktem *Scp2*-Gen reagierten mit einer deutlichen Reduzierung sowohl der CYP7B1 Protein- als auch der *Cyp7b1* mRNA-Mengen auf die Gabe der cholsäure- und cholesterinhaltigen Diät. Die C57BL/6<sup>Scp2(-/-)</sup> Mäuse zeigten dagegen keine Unterschiede in der Expression, weder bei der mRNA- noch bei der

Proteinmenge. CYP7B1 katalysiert die 7 $\alpha$ -Hydroxylierung vor allem von 25- und 27-Hydroxycholesterol (83) und lässt sich in großen Mengen in der Leber und in geringeren Mengen in Nieren, Gehirn und Prostata nachweisen. Die Expression in der Leber wird bei Mäusen ab der dritten Lebenswoche induziert und zeigt eine geschlechtsabhängige Ausprägung, wobei männliche Mäuse höhere Mengen von CYP7B1 aufweisen (52,53,84). Die Untersuchungen von Mäusen mit zerstörtem *Cyp7b1*-Gen ergaben erhöhte Werte für 25- und 27-Hydroxycholesterol im Serum, nicht aber für 24-Hydroxycholesterol, was durch die funktionierende Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase CYP39A1 mit einer Substratspezifität für 24-Hydroxycholesterol zu erklären ist. Außerdem fand sich in den *Cyp7b1* Knockout-Mäusen eine um etwa 30% gesteigerte Menge von CYP7A1, vermutlich ein Kompensationsmechanismus um eine gewisse Größe des Gallensäurepools aufrechtzuerhalten (52). Dieser Anstieg entspricht in etwa der Größe des verbleibenden Gallensäurepools in *Cyp7a1* Knockout-Mäuse (30% des Normalwertes) (85). Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase CYP7B1 für etwa 25-30% der gebildeten Gallensäuren in Mäusen verantwortlich ist.

Untersuchungen an isolierten Leberzellen von Ratten zeigten, dass die Expression von *Cyp7b1* durch Gallensäuren reduziert werden kann und sich somit gleichartig wie die Expression von *Cyp7a1*, wenn auch in schwächerer Ausprägung, verhält (67). Die fehlende Reduzierung der *Cyp7b1* Expression in C57BL/6<sup>*Scp2*<sup>(-/-)</sup></sup> Mäusen nach Erhalt der cholsäurehaltigen Diät stellt somit eine eindeutige Störung in der Regulation der Genexpression dar. Betrachtet man dieses Ergebnis im Zusammenhang mit der gestörten Regulation von CYP27A1 und dem verkleinerten Gallensäurepool mit vermindertem Gehalt an Chenodeoxycholsäure bei den *Scp2* Knockout-Mäusen, so betreffen die durch Ausschaltung des *Scp2*-Gens hervorgerufenen Störungen besonders den alternativen Weg der Gallensäurensynthese.

Der Einfluss von *Scp2/ScpX* auf die Gallensäurensynthese und deren Regulation lässt sich wie folgt zusammenfassen: (a) *ScpX* ist an der  $\beta$ -Oxidation der Gallensäurensynthese beteiligt, deren Ausfall zu einem Auftreten von atypischen Nor-Gallensäuren im Gallensäurepool führt; (b) *Scp2* ist, vermutlich aufgrund einer Funktion als intrazelluläres Transportprotein vor allem an dem alternativen Weg der Gallensäurensynthese und dessen Regulation beteiligt. Die Ausschaltung des *Scp2*

Gens führt sowohl zu einem verminderten Anteil von Chenodeoxycholsäure im Gallensäurenpool der Knockout-Mäuse als auch zu einer gestörten Regulation von *Cyp27a1* und einer gestörten Regulation der Expression von *Cyp7b1*; (c) *Scp2* ist ebenfalls an dem Feedback- und Feedforwardmechanismus der Regulation des klassischen Wegs der Gallensäurensynthese beteiligt, erkennbar an einer veränderten Expression von *Lrh-1* und *Shp* in Mäusen mit zerstörtem *Scp2*-Gen.

## Zusammenfassung

Gallensäuren stellen den wichtigsten Abbauweg von Cholesterin im Organismus der Säugetiere dar. Die Synthese der Gallensäuren erfolgt über zwei unterschiedlich Wege, den klassischen und den alternativen Weg. C57BL/6<sup>(Scp2<sup>-/-</sup>)</sup> Mäuse weisen eine gestörte  $\beta$ -Oxidation mit Auftreten atypischer Gallensäuren sowie einen gestörten hepatischen Cholesterinmetabolismus auf.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit die *Scp2*-Expression die Gallensäurensynthese und deren Regulation beeinflusst, wurden C57BL/6 und C57BL/6<sup>(Scp2<sup>-/-</sup>)</sup> Mäuse mit Standarddiät bzw. cholesterin- und cholsäurereicher lithogener Diät gefüttert. Es wurde die Größe und Zusammensetzung des Gallensäurenpools sowie die hepatische Gallensäurenssekretion bestimmt. Die Expression von für die Gallensäurensynthese relevanten Enzymen und Transkriptionsfaktoren wurde mittels RT-PCR, Northern und Western Blots untersucht.

Unter der Standarddiät wiesen die C57BL/6<sup>(Scp2<sup>-/-</sup>)</sup> Mäuse im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen einen kleineren Gallensäurepool auf, welches sich auch in einer geringeren hepatischen Gallensäurenssekretion widerspiegelte. Während 23-Norcholsäure im Gallensäurenpool der C57BL/6<sup>(Scp2<sup>-/-</sup>)</sup> Mäuse deutlich erhöht war, zeigte sich der Chenodeoxycholsäuregehalt erniedrigt. Die Expression der Enzyme des klassischen Wegs der Gallensäurensynthese, CYP7A1 und CYP8B1, zeigte keine Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen. Beide Stämme wiesen eine regelrechte Hemmung der Enzymexpression nach Gabe der lithogenen Diät auf. Dagegen zeigten C57BL/6<sup>(Scp2<sup>-/-</sup>)</sup> Mäuse im Unterschied zu den Wildtypen eine fehlende Hemmung der CYP7B1- und CYP27A1-Expression, beides Enzyme des alternativen Wegs der Gallensäurensynthese. Die Wildtypen zeigten nach Erhalt der lithogenen Diät eine gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren *Lrh-1* und *Shp*, welche bei den C57BL/6<sup>(Scp2<sup>-/-</sup>)</sup> Mäusen unverändert blieb. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Scp2* für eine ungestörte Gallensäurensynthese und deren Regulation erforderlich ist. *Scp2* scheint dabei, vermutlich aufgrund seiner Funktion als intrazelluläres Transportprotein, besonders in den alternativen Weg der Gallensäurensynthese und dessen Regulation eingebunden zu sein.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. H.-L. Fehm für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Michael Fuchs für die Überlassung des Themas sowie die exzellente Betreuung. Dr. Fuchs war mir als ständiger Ansprechpartner eine große Hilfe bei allen Fragen und Problemen. Dank seiner Hilfe konnte ich Erfahrungen im Ausland sowie auf mehreren Kongressen sammeln.

Prof. D.W. Russell und seinem Team möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung während meines Forschungsaufenthaltes an der University of Texas danken.

Mein Dank gilt dem gesamten Laborteam, insbesondere Oliver Müller sowie Carmen Schalla die eine große Hilfe bei der Einarbeitung in das Themengebiet sowie in die verschiedenen Untersuchungsmethoden waren. Nadine Katzberg und Janine Pertack standen mir bei allen labortechnischen Dingen mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Frau Martina, meinen Eltern und meinem Bruder, die mir während der gesamten Ausbildungszeit zur Seite standen.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Christian Münch  
 Geboren am 22.11.1976 in Kassel  
 Verheiratet mit Martina Münch, geb. Reilmann

### Schulbildung

1983 – 1987                      Grundschule Immenhausen  
 1987 – 1996                      Privates Gymnasium der Heiligenstätter Schulschwester „Engelsburg“ in Kassel, 1996 Abitur

### Medizinstudium

10/1996 – 10/1998              Universität Greifswald  
 09/1998                              Physikum  
 10/1998 – 04/2003              Medizinische Universität zu Lübeck  
 03/2000                              1. Staatsexamen  
 03/2000 – 10/2000              Forschungsaufenthalt am Southwestern Medical Center der University of Texas, Dallas, Department of Molecular Genetics (Prof. D.W. Russell)  
 03/2002                              2. Staatsexamen  
 04/2002 – 03/2003              Praktisches Jahr  
 04/2003                              3. Staatsexamen

### Klinische Ausbildung

Seit 08/2003                      Arzt im Praktikum an der Klinik für Hand- Unfall- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 01.8.2004

## Literaturverzeichnis

1. Adalberto M, Gallegos AM, Schoer JK, Starodub O, Kier AB, Billheimer JT und Schroeder F: **A potential role for sterol carrier protein-2 in cholesterol transfer to mitochondria.** *Chemistry and Physics of Lipids* 105, 9-29 (2000)
2. Agellon LB, Toth MJ und Thomson AB: **Intracellular lipid binding proteins of the small intestine.** *Mol Cell Biochem* 239, 79-82 (2002)
3. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ und Suchy FJ: **Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor / bile acid receptor.** *J Biol Chem* 276, 28857-28865 (2001)
4. Anderson KE, Kok E und Javitt NB: **Bile acid synthesis in man: metabolism of 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol-[14C] and 26-hydroxycholesterol-[3H].** *J Clin Invest* 51, 112-117 (1972)
5. Andersson S, Davis DL, Dahlbäck H, Jörnvall H und Russell DW: **Cloning, structure and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme.** *J Biol Chem* 264, 8222-8229 (1989)
6. Baum CL, Reschly EJ, Gayen AK, Groh ME und Schadick K: **Sterol carrier protein-2 overexpression enhances sterol cycling and inhibits cholesterol ester synthesis and high density lipoprotein cholesterol secretion.** *J Biol Chem* 272, 6490-6498 (1997)
7. Billheimer JT, Strehl LL, Davis GL, Strauss III JF und Davis LG: **Characterization of a cDNA encoding rat sterol carrier protein2.** *DNA Cell Biol* 9, 159-165 (1990)

8. Björkhem I, Araya Z, Rudling M, Angelin B, Einarsson C und Wikvall K: **Differences in the regulation of the classical and the alternative pathway for bile acid synthesis in human liver. No coordinate regulation of CYP7A1 and CYP27A1.** *J Biol Chem* 277, 26804-26807 (2002)
9. Björkhem I und Gustafsson J: **w-Hydroxylation of steroid side-chain in biosynthesis of bile acids.** *Eur J Biochem* 36, 201-212 (1973)
10. Bloj B und Zilversmit DB: **Asymmetry and transposition rates of phosphatidylcholine in rat erythrocyte ghosts.** *Biochemistry* 15, 1277-1283 (1976)
11. Bloj B und Zilversmit DB: **Rat liver proteins capable of transferring phosphatidylethanolamine. Purification and transfer activity for other phospholipids and cholesterol.** *J Biol Chem* 252, 1613-1619 (1977)
12. Bradford, M. M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)
13. Cali JJ, Hsieh CL, Francke U und Russell DW: **Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis.** *J Biol Chem* 266, 7779-7783 (1991)
14. Cali JJ und Russell DW: **Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reactions in bile acid biosynthesis.** *J Biol Chem* 266, 7774-7778 (1991)

15. Cao G, Beyer TP, Yang XP, Schmidt RJ, Zhang Y, Bensch WR, Kauffman RF, Gao H, Ryan TP, Liang Y, Eacho PI und Jiang XC: **Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo.** *J Biol Chem* 277, 39561-39565 (2002)
16. Carey MC und Calahane MJ: **The enterohepatic circulation.** In: Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D und Shafritz DA: *The Liver: Biology and Pathobiology.* 573-616, Raven Press, New York, 1988
17. Chanderbhan R, Kharoubi A, Pastuszyn A, Gallo LL und Scallen TJ: **Sterol carrier protein 2: further evidence for its role in adrenol steroidogenesis.** *Endocrinol Res* 12, 351-370 (1986)
18. Chiang JL, Kimmel R, Weinberger C und Stroup D: **Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (Cyp7a1) transcription.** *J Biol Chem* 275, 10918-10924 (2000)
19. Chomczynski P und Sacchi N: **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987)
20. Danielsson H, Einarsson K und Johansson G: **Effect of biliary drainage on individual reactions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid.** *Eur J Biochem* 2, 44-49 (1967)
21. Daum G und Vance JE: **Import of lipids into mitochondria.** *Prog Lipid Res* 36, 103-130 (1997)
22. De Fabiani E, Mitro N, Anzulovich AC, Pinelli A, Galli G und Crestani M: **The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor  $\alpha$  on the transcription of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (Cyp7a1) converge to hepatic nuclear factor-4. A novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors.** *J Biol Chem* 276, 30708-30716 (2001)

23. Dueland S, Drisko J, Graf L, Machleder D, Lusis AJ und Davis RA: **Effect of dietary cholesterol and taurocholate on cholesterol 7 alpha-hydroxylase and hepatic LDL receptors in inbred mice.** *J Lipid Res* 34, 923-931 (1993)
24. Dzeletovic S, Breuer O, Lund E und Diczfalusy U: **Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry.** *Anal Biochem* 225, 73-80 (1995)
25. Edwards PA und Davis R: **Isoprenoids, sterols and bile acids.**In: Vance, D. E. and Vance, J. E.: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.*341-362, Elsevier Science, Amsterdam, 1996
26. Edwards PA, Kast HR und Anisfeld AM: **BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis.** *J Lipid Res* 43, 2-12 (2002)
27. Fuchs M, Hafer A, Münch C, Kannenberg F, Teichmann S, Scheibner J, Stange EF und Seedorf U: **Disruption of the sterol carrier protein 2 gene in mice impairs biliary lipid and hepatic cholesterol metabolism.** *J Biol Chem* 276, 48058-48065 (2001)
28. Fuchs M, Ivandic B, Müller O, Schalla C, Scheibner J, Bartsch P and Stange EF: **Biliary cholesterol hypersecretion in gallstone-susceptible mice is associated with hepatic up-regulation of the high-density lipoprotein receptor SRB1.** *Hepatology* 33, 1451-1459 (2001)
29. Fuchs M: **Bile acid regulation of hepatic physiology III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: 551-557 (2003)
30. Fuchs M, Lammert F, Wang DQH, Paigen B, Carey MC und Cohen DE: **Sterol carrier protein 2 participates in hypersecretion of biliary cholesterol in genetically gallstone-susceptible mice.** *Biochem J* 336, 33-37 (1998)

31. Furster C, Zhang J und Toll A: **Purification of a 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase from pig liver microsomes active in major and alternative pathways of bile acid biosynthesis.** *J Biol Chem* 271, 20903-20907 (1996)
32. Gallegos AM, Schoer JK, Starodub O, Kier AB, Billheimer JT und Schroeder F: **A potential role for sterol carrier protein-2 in cholesterol transfer to mitochondria.** *Chem Phys Lipids* 105, 9-29 (2000)
33. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM und Kliewer SA: **A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis.** *Mol Cell* 6, 517-526 (2000)
34. Harris W.R. Jr.: **Cerebrotendinous xanthomatosis.** *N Engl J Med* 278, 857 (1968)
35. Hofmann AF: **Bile Acids.** In: Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D und Shafritz D: *The Liver: Biology and Pathobiology.* 553-572, Raven Press, New York, 1988
36. Hofmann AF: **The Continuing Importance of Bile Acids in Liver and Intestinal Disease.** *Arch Intern Med* 159, 2647-2658 (2000)
37. Ishibashi S, Schwarz M, Frykman PK, Herz J und Russell DW: **Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation.** *J Biol Chem* 271, 18017-18023 (1996)

38. Ito T, Kawata S, Imai Y, Kakimoto H, Trzaskos JM und Matsuzawa Y: **Hepatic cholesterol metabolism in patients with cholesterol gallstones: enhanced intracellular transport of cholesterol.** *Gastroenterology* 110, 1619-1627 (1996)
39. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR und Mangelsdorf DJ: **An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha.** *Nature* 383, 728-731 (1996)
40. Javitt NB: **Biologic role(s) of the 25(R), 26-hydroxycholesterol metabolic pathway.** *Biochem Biophys Acta* 1529, 136-141 (2000)
41. Jelinek DF, Andersson S, Slaughter CA und Russell DW: **Cloning and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis.** *J Biol Chem* 265, 8190-8197 (1990)
42. Kannenberg F, Ellinghaus P, Assmann G und Seedorf U: **Aberrant oxidation of the cholesterol side-chain in bile acid synthesis of sterol carrier protein-2 / sterol carrier protein-X-knockout mice.** *J Biol Chem* 274, 35455-35460 (1999)
43. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM und Edwards PA: **Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor and constitutive androstane receptor.** *J Biol Chem* 277, 2908-2915 (2002)
44. Keller GA, Scallen TJ, Clarke D, Maher PA, Krisans SK und Singer SJ: **Subcellular localization of sterol carrier protein-2 in rat hepatocytes: its primary localization to peroxisomes.** *J Cell Biol* 108, 1353-1361 (1989)

45. Kerr TA, Saeki S, Schneider M, Schaefer K, Berdy S, Redder T, Shan B, Russell DW und Schwarz M: **Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis.** *Dev Cell* 2, 713-720 (2002)
46. Khanuja B, Cheah YC, Hunt M, Nishina PM, Wang DQH, Chen HW, Billheimer JT, Carey MC und Paigen B.: **Lith1, a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice.** *Proc Natl Acad Sci* 92, 7729-7733 (1995)
47. Kurzchalia TV und Parton RG: **Membrane microdomains and caveolae.** *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-431 (1999)
48. Lee YK und Moore DD: **Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner.** *J Biol Chem* 277, 2463-2467 (2002)
49. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA und Willson TM: **Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway.** *J Biol Chem* 272, 3137-3140 (1997)
50. Li-Hawkins J, Gafvels M, Olin M, Lund EG, Andersson U, Schuster G, Bjorkhem I, Russell DW und Eggertsen G: **Cholic acid mediates negative feedback regulation of bile acid synthesis in mice.** *J Clin Invest* 110, 1191-1200 (2002)
51. Li-Hawkins J, Lund EG, Bronson AD und Russell DW: **Expression cloning of an oxysterol 7 $\alpha$  -hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol.** *J Biol Chem* 275, 16543-16549 (2000)
52. Li-Hawkins J, Lund EG, Turley SD und Russell DW: **Disruption of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice.** *J Biol Chem* 275, 16536-16542 (2000)

53. Li-Hawkins J, Münch C und Russell DW: **Pathways of bile acid synthesis**. In: van Berge O, Hengouwen GP, Keppler D, Leuschner U, Paumgartner G und Stiehl A: *XVI Int. Bile Acid Meet.* Kluwer Acad, Dordrecht, 2000
54. Lidström-Olsson, B. and Wikvall, K.: **The role of sterol carrier protein 2 and other hepatic lipid-binding proteins in bile-acid biosynthesis**. *Biochem J* 238, 879-884 (1986)
55. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J und Mangelsdorf DJ: **Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors**. *Mol Cell* 6, 507-515 (2000)
56. MacDonald IA, Bokkenheuser V, Winter J, McLermon AM und Mosbach EH: **Degradation of steroids in the human gut**. *J Lipid Res* 24, 675-700 (1983)
57. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ und Shan B: **Identification of a nuclear receptor for bile acids**. *Science* 284, 1362-1365 (1999)
58. Mendis-Handagama SM, Aten RF, Watkins PA, Scallen TJ und Berhman HR: **Peroxisomes and Sterol carrier protein-2 in luteal cell steroidogenesis: a possible role in cholesterol transport from lipid droplets to mitochondria**. *Tissue Cell* 27, 483-490 (1995)
59. Miller WL: **Molecular biology of steroid hormone synthesis**. *Endocrinol Rev* 9, 295-318 (1988)
60. Miyake JH, Wang SL und Davis RA: **Bile acid induction of cytokine expression by macrophages correlates with repression of hepatic cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase**. *J Biol Chem* 275, 21805-21808 (2000)
61. Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia T und Simons K: **VIP21 / caveolin is a cholesterol-binding protein**. *Proc Natl Acad Sci* 92, 10339-10343 (1995)

62. Nitta M, Ku S, Brown C, Okamoto AY und Shan B: **CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 96, 6660-6665 (1999)
63. Noland BJ, Arebalo RE, Hansbury E und Scallen TJ: **Purification and properties of sterol carrier protein-2.** *J Biol Chem* 255, 4282-4289 (1980)
64. Noshiro M, Nishimoto M, Morohashi K und Okuda K: **Molecular cloning of cDNA for cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase from rat liver microsomes. Nucleotide sequence and expression.** *FEBS Lett* 257, 97-100 (1989)
65. Ohba T, Holt JA, Billheimer JT und Strauss JF: **Human sterol carrier protein X / sterol carrier protein 2 gene has two promoters.** *Biochemistry* 34, 10660-10668 (1995)
66. Ohba T, Rennert H, Pfeifer SM, He Z, Yamamoto R, Holt J, Billheimer JT und Strauss JF: **The structure of the human sterol carrier protein X / sterol carrier protein 2 gene (SCP2).** *Genomics* 24, 370-374 (1994)
67. Pandak WM, Hylemon PB, Ren S, Marques D, Gil G, Redford K, Mallonee D, und Vlahcevic ZR: **Regulation of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1) in primary cultures of rat hepatocytes.** *Hepatology* 35, 1400-1408 (2002)
68. Pandak WM, Ren S, Marques D, Hall E, Redford K, Mallonee D, Bohdan P, Heuman D, Gil G und Hylemon P: **Transport of cholesterol into mitochondria is rate limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes.** *J Biol Chem* 277, 48158-48164 (2002)

69. Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD und Lehmann JM: **Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor.** *Science* 284, 1365-1368 (1999)
70. Pastuszyn A, Noland BJ, Bazan JF, Fletterick RJ und Scallen TJ: **Primary sequence and structural analysis of sterol carrier protein 2 from rat liver: homology with immunoglobulins.** *J Biol Chem* 262, 13219-13227 (1987)
71. Pfeifer SM, Furth EE, Ohba T, Chang YJ, Rennert H, Sakuragi N, Billheimer JT und Strauss III JF: **Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis?** *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 167-172 (1993)
72. Puglielli L, Rigotti A, Greco AV, Santos MJ und Nervi F: **Sterol carrier protein-2 is involved in cholesterol transfer from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane in human fibroblasts.** *J Biol Chem* 270, 18723-18726 (1995)
73. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson KE, Verhagen A, Rivera CR, Mulvihill SJ, Malloy MJ und Kane JP: **Human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype.** *J Clin Invest* 110, 109-117 (2002)
74. Raabe M., Seedorf U, Hameister H, Ellinghaus P und Assmann G: **Structure and chromosomal assignment of the murine sterol carrier protein 2 gene (SCP2) and two related pseudogenes by in situ hybridization.** *Cytogenet Cell Genet* 73, 279-281 (1996)
75. Reddy JK und Hashimoto T: **Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system.** *Annu Rev Nutr.* 21, 193-230 (2001)

76. Repa JJ, Lund E, Horton JD, Leitersdorf E, Russell DW, Dietschy JM und Turley SD: **Disruption of the Sterol 27-Hydroxylase Gene in Mice Results in Hepatomegaly and Hypertriglyceridemia.** *J Biol Chem* 275, 39685-39692 (2000)
77. Repa JJ und Mangelsdorf DJ: **Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism.** *Curr Opin Biotechnol* 10, 557-563 (1999)
78. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JMA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM und Mangelsdorf DJ: **Regulation of absorption and Abc1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers.** *Science* 289, 1524-1529 (2000)
79. Rosen H, Reshef A, Maeda N, Lippoldt A, Shpizen S, Triger L, Eggertsen G, Björkhem I und Leitersdorf E: **Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene.** *J Biol Chem* 273, 14805-14812 (1998)
80. Russell DW: **The Enzymes, Regulation and Genetics of Bile Acid Synthesis.** *Annu Rev Biochem* 72, 137-174 (2003)
81. Russell DW und Setchell KD: **Bile acid biosynthesis.** *Biochemistry* 31, 4737-4749 (1992)
82. Salen G, Batta AK, Tint GS und Shefer S: **Comparative effects of lovastatin and chenodeoxycholic acid on plasma cholesterol and abnormal bile acid metabolism in cerebrotendinous xanthomatosis.** *Metabolism* 43, 1018-1022 (1994)
83. Schwarz M, Lund EG, Lathe R, Björkhem I und Russell DW: **Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase cDNA.** *J Biol Chem* 272, 23995-24001 (1997)

84. Schwarz M, Lund EG, Setchell KD, Kayden HJ, Zerwekh JE, Bjorkhem I, Herz J und Russell DW: **Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase.** *J Biol Chem* 271, 18024-18031 (1996)
85. Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM und Turley SD: **Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia.** *J Lipid Res* 39, 1833-1843 (1998)
86. Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM und Turley SD: **Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding.** *J Lipid Res* 42, 1594-1603 (2001)
87. Schwarz M, Wright AC, Davis DL, Nazer H, Bjorkhem I und Russell DW: **The bile acid synthetic gene 3 $\beta$ -hydroxy-Delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis.** *J Clin Invest* 106, 1175-1184 (2000)
88. Seedorf U, Ellinghaus P und Roch-Nofer J: **Sterol carrier protein-2.** *Biochim Biophys Acta* 1486, 45-54 (2000)
89. Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters F, Wirtz KWA, Wanders RJA, Maeda N und Assmann G: **Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl Coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function.** *Genes Dev* 12, 1189-1201 (1998)
90. Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, Thompson HR, Weslie H, Tyson R, Sokol RJ und Russell DW: **Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease.** *J Clin Invest.* 102, 1690-1703 (1998)

91. Shefer S, Hauser S, Bekersky I und Mosbach EH: **Feedback regulation of bile acid biosynthesis in the rat.** *J Lipid Res* 10, 646-655 (1969)
92. Shefer S, Hauser S und Mosbach EH: **7 $\alpha$ -hydroxylation of cholestanol by rat liver microsomes.** *J Lipid Res* 9, 328-333 (1968)
93. Stapleton G, Steel M, Richardson M, Mason JO, Rose KA, Morris RG und Lathe R: **A novel cytochrome P450 expressed primarily in brain.** *J Biol Chem* 270, 29739-29745 (1995)
94. Stravitz RT, Rao YP, Vlahcevic ZR, Gurley EC, Jarvis WD und Hylemon PB: **Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 $\alpha$  -hydroxylase.** *Am J Physiol* 271, G293-G303 (1996)
95. Sugawara T, Lin D, Holt JA, Martin KO, Javitt NB, Miller WL und Strauss JF: **Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity.** *Biochemistry* 34, 12506-12512 (1995)
96. Suzuki Y, Yamaguchi S, Orii T, Tsuneoka M und Tashiro Y: **Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) defective in patients with deficient peroxisomes.** *Cell Struct Funct* 15, 301-308 (1990)
97. Tsuneoka M, Yamamoto A, Fujiki V und Tashiro Y: **Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) is located in rat liver peroxisomes.** *J Biochem* 104, 560-564 (1988)
98. Twisk J, de Wit CM und Princen HMG: **Suppression of sterol 27-hydroxylase mRNA and transcriptional activity by bile acids in cultured rat hepatocytes.** *Biochem J* 305, 505-511 (1995)

99. Une M, Kim HG, Kuramoto T und Hoshita T: **Comparative studies on omega-hydroxylation of 5 $\beta$ /cholestane-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol in the mitochondrial and microsomal fraction of the liver from several vertebrates.** *Steroids* 62, 458-461 (2003)
100. Urbani L und Simoni RD: **Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane.** *J Biol Chem* 265, 1919-1923 (1990)
101. Vahouny GV, Dennis P, Chanderbhan R, Fiskum G, Noland BJ und Scallen TJ: **Sterol Carrier Protein 2 (SCP2)-mediated transfer of cholesterol to mitochondrial inner membranes.** *Biochem Biophys Res Comm* 122, 509-515 (1984)
102. Vlahcevic ZR, Sanjeev KJ, Heuman DM, Stravitz RT, Hylemon PB, Narayan GA und Pandak WM: **Transkriptional regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase by bile acids.** *Am J Physiol* 270, G646-G652 (1996)
103. Vlahcevic ZR, Pandak WM und Stravitz RT: **Regulation of bile acid biosynthesis.** *Gastroenterol Clin North Am* 28, 1-25, v (1999)
104. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC und Forman BM: **Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR.** *Mol Cell* 3, 543-553 (1999)
105. Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Philips MJ und Ling V: **Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (*spgp*) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98, 2011-2016 (2001)
106. Wikvall K: **Purification and properties of a 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid oxidoreductase from rabbit liver microsomes.** *J Biol Chem* 256, 3376-3380 (1981)

107. Wikvall K: **Hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria catalyzing 26-hydroxylation of C27-steroids.** *J Biol Chem* 259, 3800-3804 (1984)
108. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA und Mangelsdorf DJ: **LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway.** *Genes Dev* 9, 1033-1045 (1995)
109. Wolthers BG, Volmer M, van der Molen J, Koopman BJ, de Jager AE und Waterreus RJ: **Diagnosis of cerebrotendinous xanthomatosis (CTX) and effect of chenodeoxycholic acid therapy by analysis of urine using capillary gas chromatography.** *Clin Chim Acta* 131, 53-65 (1983)
110. Xu G, Müller O, Stange EF und Fuchs M: **Impaired regulation of sterol regulatory element binding protein 2 in cholesterol gallstone-susceptible mice.** *Biochem Biophys Acta* 1688, 274-9 (2004)
111. Yamamoto R, Kallen CB, Babalola GO, Rennert H, Billheimer JT und Strauss III JF: **Cloning and expression of a cDNA encoding human sterol carrier protein 2.** *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 88, 463-467 (1991)
112. Yu C, Wang F, Kan M, Jin C, Jones RB, Weinstein M, Deng CX und McKeehan WL: **Elevated cholesterol metabolism and bile acid synthesis in mice lacking membrane tyrosine kinase receptor FGFR4.** *J Biol Chem* 275, 15482-15489 (2000)
113. Zanlungo S, Amigo L, Mendoza H, Miquel JF, Vio C, Glick JM, Rodriguez A, Kozarsky K, Quinones V, Rigotti A, and Nervi F: **Sterol Carrier Protein 2 Gene Transfer Changes Lipid Metabolism and Enterohepatic Sterol Circulation in Mice.** *Gastroenterology* 119, 1708-1719 (2000)

114. Zanlungo S, Amigo L, Mendoza H, Glick JM, Rodriguez A, Kozarsky K, Miquel JF, Rigotti A und Nervi F: **Overexpression of sterol carrier protein-2 in mice leads to increased hepatic cholesterol content and enterohepatic circulation of bile acids.** *Gastroenterology* 108, A1165 (2000)