

University of Groningen

## The ABC of cholesterol transport

Plösch, Torsten

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2004

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Plösch, T. (2004). *The ABC of cholesterol transport*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## Samenvatting

Cholesterol vervult een aantal belangrijke fysiologische functies in het lichaam van zoogdieren. Het is een belangrijk bestanddeel van de celmembraan. Verder is het de precursor van steroïdhormonen, die een groot aantal fysiologische functies reguleren, en van galzouten, die noodzakelijk zijn voor de galvorming en voor de absorptie van lipiden en vetoplosbare vitaminen uit de darm. Bronnen van cholesterol zijn het dieet en de endogene synthese, waarbij de endogene synthese in de mens het meest belangrijk is.

Ondanks zijn onmisbare rol in het lichaam vormt cholesterol een potentiële bedreiging van de gezondheid. Het is gebleken dat verhoogde plasma cholesterolconcentraties, in het bijzonder in de “Low-Density-Lipoprotein” (LDL) fractie, geassocieerd zijn met een verhoogd risico op het ontstaan van atherosclerose. Dit is een gevolg van ophoping van cholesterol in macrofagen in de bloedvaatwand, hetgeen een eerste stap is in het ontstaan van de atherosclerotische plaque. Er zijn verschillende wegen om een overmaat aan cholesterol uit het lichaam te verwijderen. De weg van het perifere weefsel (inclusief macrofagen), via de lever, naar de ontlasting wordt *reverse cholesterol transport* genoemd. Volgens de klassieke definitie wordt cholesterol door de perifere cel (b.v. de macrofaag) met behulp van de “ATP-binding cassette transporter” Abca1 uitgescheiden naar “High-Density-Lipoprotein” deeltjes (HDL), ook wel “goed cholesterol” genoemd. De parenchymcel van de lever, de hepatocyt, neemt cholesterol op van het HDL en scheidt het uit naar de gal, direct als vrij cholesterol of na omzetting in een galzout. Uiteindelijk komen cholesterol (of bacteriële metaboliëten hiervan) en galzouten in de ontlasting terecht en verlaten dus het lichaam.

Er zijn verschillende mechanismen om de cholesterolhomeostase in cellen te handhaven. Enerzijds wordt de expressie van enzymen die bij de synthese van cholesterol en galzouten (alleen in levercellen) betrokken zijn op een aantal niveau's gereguleerd. Daardoor kan zowel de aanmaak als de afbraak van cholesterol worden gecontroleerd. Ten tweede wordt ook de expressie van transporteiwitten gereguleerd, die de opname, intracellulair transport en uitscheiding van cholesterol verzorgen. Op deze manier worden óók de fluxen van cholesterol in het lichaam strikt gecontroleerd. Genexpressie van de belangrijkste transporteiwitten, behandeld in dit proefschrift, wordt vooral gereguleerd door de transcriptie factor *Liver-X-Receptor (LXR)*. Deze receptor “meet” het niveau van geoxideerde cholesterolderivaten, de zogenaamde oxysterolen, en daarmee indirect de cholesterolconcentratie binnen de cel. Onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft tot doel de mechanismen te ontrafelen, die betrokken zijn bij het transport van cholesterol en de moleculaire regulatie hiervan door LXR, voornamelijk op het niveau van de darm- en levercel. **Hoofdstuk 1** geeft een samenvatting van de processen betrokken bij de cellulaire en “whole body” cholesterolhomeostase.

Algemeen wordt verondersteld dat het positieve effect van HDL, bescherming tegen het ontstaan van atherosclerose, wordt bewerkstelligd via de rol van dit deeltje als cholesterol-carrier in het *reverse cholesterol transport*. In dit model is HDL dus belangrijk als transport-

middel voor cholesterol van de periferie naar de lever, waar het vervolgens wordt geëlimineerd. Het ABC transporteiwit Abca1 is cruciaal voor de vorming van HDL. Het komt in vele weefsels tot expressie, in het bijzonder de lever, de (dunne) darm en in de macrofagen. **Hoofdstuk 2** omvat een karakterisering van het *reverse cholesterol transport* in muizen die het *Abca1* gen niet tot expressie brengen (*Abca1*<sup>-/-</sup>). Zoals verwacht ontbreekt in deze muizen het HDL. Desondanks is gevonden dat de hepatobiliaire cholesterol excretie en de uitscheiding van cholesterol via de ontlasting volledig normaal in *Abca1*<sup>-/-</sup> muizen in vergelijking met controle muizen. Sterker nog, óók na LXR activering met de synthetische LXR agonist T091317 was er geen verschil tussen *Abca1*<sup>-/-</sup> muizen en controle muizen aantoonbaar. In beide groepen werden zowel de hepatobiliaire als de fecale cholesterol excretie sterk gestimuleerd. Deze bevinding laat duidelijk zien dat Abca1 - en dus óók HDL - niet kwantitatief belangrijk is voor het *reverse cholesterol transport*, in tegenstelling tot de heersende opvatting. Op grond van deze resultaten is het zinvol de klassieke definitie van *reverse cholesterol transport* te herzien. Ook een andere uitkomst van deze studie was verrassend. Wanneer het cholesterol uit het dieet en uit de gal wordt opgeteld en daarna het cholesterol in de ontlasting wordt afgetrokken, geeft het verschil de hoeveelheid cholesterol dat door de darm wordt opgenomen. Intrigerend was het feit dat dit getal *negatief* werd als een LXR agonist werd toegediend aan de muizen, wat inhoudt dat de darm actief cholesterol uitscheidt onder deze condities. Dit “nieuwe” LXR effect wordt in hoofdstuk 5 in meer detail beschreven.

Cholesterol verschilt alleen in de structuur van de zijketen van sterolen die in hoge concentraties in planten voorkomen, zoals sitosterol en campesterol. In een representatief “Western style” dieet zitten evenveel plantsterolen als cholesterol. Echter plantsterolen worden ten opzichte van cholesterol in slechts zeer lage concentraties in het lichaam teruggevonden. Het is aangetoond dat de ABC half-transporters Abcg5 en Abcg8 de absorptie van sterolen uit de darm limiteren, doordat zij sterolen effectief uit de darmcel weer terug naar het darmlumen pompen. De zeldzame erfelijke ziekte *sitosterolemie* wordt door mutaties in de genen coderend voor *Abcg5* of *Abcg8* veroorzaakt. Het wordt verondersteld dat zij samen een functioneel dimeer vormen. **Hoofdstuk 3** beschrijft de karakterisering van een muismodel voor sitosterolemie, de *Abcg5* knockout muis. Deze muizen hebben symptomen die heel sterk lijken op die in humane patiënten, in het bijzonder verhoogde plasma plantsterol niveaus. Dat betekent dat afwezigheid van Abcg5 alleen voldoende is om het beschermende effect van het Abcg5/Abcg8 complex te verbreken.

Behandeling met een synthetisch LXR agonist, T091317, resulteerde in een verhoogde expressie van, onder anderen, *Abcg5*, *Abcg8* en *Abca1* in lever en darm van controle muizen. In *Abcg5* knockout muizen werd de *fractional cholesterol absorption* door de LXR agonist niet beïnvloed. Daarentegen verlaagde toediening van de LXR agonist wel de *fractional cholesterol absorption* in wildtype muizen. Dit houdt in dat Abcg5/Abcg8 wellicht betrokken is bij regulatie van cholesterolabsorptie. Verbazingwekkend verhoogde LXR activering de

plantsterolconcentraties in het plasma van *Abcg5* knockout muizen, mogelijk door een *Abca1*-afhankelijk mechanisme.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de functie van *Abcg5/Abcg8* in de lever. In de literatuur zijn verschillende uitkomsten beschreven over cholesterolconcentraties in de galblaas van *Abcg5*- en *Abcg8*-knockout muizen en *Abcg5/Abcg8*-dubbel-knockout muizen, waarbij de laatstgenoemden de laagste cholesterolconcentratie van allen hebben. Om echter precies de betrokkenheid van *Abcg5* bij het hepatobiliair cholesterol transport te karakteriseren hebben wij de uitscheidingsnelheid van cholesterol in *Abcg5*<sup>-/-</sup>, *Abcg5*<sup>+/-</sup> en wildtype muizen bepaald en niet alleen de galblaasconcentratie. De productie van gal en de excretie van galzouten waren niet veranderd in *Abcg5*<sup>-/-</sup> muizen, maar cholesterol- en fosfolipidenuitscheiding waren 85 % en 31% lager in vergelijking met de wildtype muizen. Om ook de maximale capaciteit van de transporters te bepalen, zijn deze muizen vervolgens met een oplopende hoeveelheid galzouten geïnfundeed om de galuitscheiding maximaal te stimuleren. Toediening van het hydrofiele galzout tauroursodeoxycholaat leidde tot vergelijkbare *relatieve* verhogingen van de cholesterol- en fosfolipidenuitscheiding in wildtype en knockout muizen. Na toediening van een LXR agonist ging de maximale uitscheidingsnelheid wel in wildtype, maar niet in *Abcg5*<sup>-/-</sup> muizen omhoog. Wij concluderen uit deze data dat *Abcg5*, en dus waarschijnlijk de *Abcg5/Abcg8* heterodimeer, sterk betrokken is bij de controle van de hepatobiliaire cholesterol uitscheidingsnelheid, maar dat er óók een *Abcg5/Abcg8*-onafhankelijke route aanwezig is, die wellicht ook onafhankelijk wordt gereguleerd. Dit wordt ondersteund door resultaten uit onderzoek bij *LXRα*<sup>-/-</sup> muizen: op een cholesterolrijk dieet neemt de uitscheidingsnelheid van cholesterol door de lever naar de gal toe, net zo als in controle of *LXRα*<sup>+/-</sup> muizen op een identiek dieet. De expressie van *Abcg5*- en *Abcg8* is echter niet verhoogd in *LXRα*<sup>-/-</sup> muizen in tegenstelling tot de expressieniveaus van deze genen in controle of heterozygote muizen. Derhalve zijn in dit specifieke model *Abcg5* and *Abcg8* niet snelheidsbepalend voor de uitscheiding van cholesterol naar de gal.

Er is altijd verondersteld dat de lever het meest belangrijke orgaan is voor de uitscheiding van cholesterol uit het lichaam. In hoofdstuk 3 is beschreven dat, met name na LXR activering, óók de darm een bron van fecaal cholesterol moet zijn in de muis. In **hoofdstuk 5** zijn *Mdr2* knockout muizen gebruikt om de betrokkenheid van de darm bij de fecale cholesterol excretie gedetailleerd te bestuderen. *Mdr2* transporteert fosfolipiden uit de hepatocyt naar de gal, hetgeen direct aan cholesteroluitscheiding is gekoppeld. Dus missen *Mdr2* knockout muizen niet alleen fosfolipiden maar óók cholesterol in de gal. Behandeling van *Mdr2* knockout muizen met de synthetische LXR agonist GW3965 stimuleerde de fecale sterol uitscheiding in even sterke mate als in wildtype muizen, dus onafhankelijk van de cholesterol excretie via de gal. Sterker nog, LXR activering stimuleerde ook in *Mdr2* knockout muizen de excretie van [<sup>3</sup>H]-cholesterol vanuit het plasma direct naar de ontlasting. Data uit hoofdstuk 5 geven dus duidelijke indicaties dat de darm een belangrijke en nieuwe rol in het *reverse cholesterol transport* speelt.

Onder pathofysiologische omstandigheden kan het hepatobiliaire cholesteroltransport verstoord zijn. Dit is bijvoorbeeld hetgeen in een diermodel voor *erythropoietische protoporfyrie*, de *fech/fech* muis (**hoofdstuk 6**). Bij *fech/fech* muizen is het gen voor het enzym ferrochelatase gemuteerd. Dit enzym katalyseert de laatste stap in de synthese van heem. In erythropoietische protoporfyrie is dan ook sprake van accumulatie van de hydrofobe heemprecursor protoporfyrin. Dit is in *fech/fech* muizen geassocieerd met galgangproliferatie en biliaire fibrose, maar met een normale galuitscheiding. Verrassenderwijs produceert de lever van *fech/fech* muizen méér gal dan die van controle muizen. *Fech/fech* muizen vertonen bovendien verhoogde cholesterolwaarden in de lever en het plasma. In het plasma bevindt het cholesterol zich tezamen met fosfolipid met name in Lipoproteïn-X (Lp-X). Lp-X is een zeldzaam partikel dat met name onder cholestatische omstandigheden wordt gevonden en in de zeldzame metabole ziekte *familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency*. Het is bekend dat bron van Lp-X cholesterol en fosfolipiden zijn die op weg naar de gal waren, maar door de cholestase er uiteindelijk niet terecht kunnen komen. *Fech/fech* muizen vormen een uniek model omdat Lp-X zonder cholestase aanwezig is. Deze muizen laten wél een ontkoppeling van biliaire galzout- en lipidsecretie zien, dat betekent dat relatief meer galzouten noodzakelijk zijn voor de excretie van cholesterol en fosfolipiden. Blijkbaar is het proces van hepatobiliaire cholesterol-excretie verstoord in *fech/fech* muizen, resulterend in accumulatie van gal lipiden in plasma. Het achterliggende mechanisme van dit verschijnsel is nog niet opgehelderd.

**Hoofdstuk 7** geeft een overzicht van het complexe netwerk van transporteiwitten en regulerende factoren betrokken bij de cholesterolhomeostase in het lichaam. In het bijzonder wordt de regulatie van de intestinale cholesterolabsorptie en de hepatobiliaire cholesterol-excretie in detail bediscussieerd. Mogelijke mechanismen verantwoordelijk voor de verschillende wijze van omgang met cholesterol en plantsterolen in de darmcel worden besproken. Verder wordt de veronderstelde werkwijze van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van hypercholesteremie beschreven.

Cholesterol homeostase in zoogdieren wordt bereikt door regulatie van endogene synthese en intestinale cholesterolabsorptie enerzijds en cholesterolkatabolisme (bijvoorbeeld omzetting naar galzouten) en excretie naar de ontlasting (via de hepatocyt of de darmcel) anderzijds. Enige van de regulerende mechanismen ervan zijn inmiddels geïdentificeerd als mogelijke targets geneesmiddelen, met als doel het plasma cholesterol te verlagen en uiteindelijk het risico op hart- en vaatziekten te verminderen. Gedetailleerde kennis van al deze processen - van het moleculaire naar het systemische niveau - is van cruciaal belang voor verdere ontwikkeling van effectieve cholesterolverlagende therapieën in de mens.

## Zusammenfassung

Cholesterol spielt eine unersetzliche Rolle in der Physiologie der Säugetiere. Es ist ein integraler Bestandteil der Zellmembran. Des Weiteren ist Cholesterol die Vorstufe der Steroidhormone, die eine Vielzahl physiologischer Parameter regulieren, und der Gallensalze, die für den Gallenfluss und die intestinale Absorption von Lipiden und lipophilen Vitaminen notwendig sind. Quellen für Cholesterol sind die Nahrung und die endogene Synthese, wobei letztere beim Menschen überwiegt.

Trotz seiner lebenswichtigen Rolle stellt Cholesterol auch eine potentielle Gefahr für die Gesundheit dar: Erhöhte Plasma-Cholesterolspiegel, insbesondere in der Low-Density-Lipoprotein-Fraktion, sind mit einem erhöhten Atherosklerose-Risiko assoziiert. Dies liegt daran, dass die Anreicherung von Cholesterol in Makrophagen ein Schlüsselschritt in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques ist. Es überrascht daher nicht, dass verschiedene Wege existieren, um Cholesterol aus dem Körper zu eliminieren. Die Route aus dem peripheren Gewebe über die Leber in den Stuhl wurde als *reverser Cholesteroltransport* definiert: Kurz gesagt wird Cholesterol mit Hilfe des ATP-binding-cassette-(ABC)-Transporters ABCA1 aus der peripheren Zelle auf einen High-Density-Lipoprotein-Partikel übertragen. Dadurch entsteht das so genannte „gute“ HDL-Cholesterol. Der Hepatocyt nimmt Cholesterol auf und scheidet es entweder als Cholesterol selbst oder als Gallensalz in die Galle aus. Im Darm werden sowohl Cholesterol als auch die Gallensalze teilweise durch die Darmflora modifiziert. Schließlich enden sowohl Cholesterol (beziehungsweise seine bakteriellen Metabolite) als auch Gallensalze im Stuhl.

Es existieren unterschiedliche Mechanismen, um die zelluläre Cholesterolhomöostase zu gewährleisten: Einerseits wird die Expression der Enzyme, die bei der Cholesterol- und Gallensalzsynthese eine Rolle spielen, auf unterschiedlichen Niveaus reguliert. Dadurch wird sowohl der Cholesterolkatabolismus als auch die Cholesterolsynthese kontrolliert. Andererseits unterliegt auch die Expression der Transportproteine einer Regulation, die sich auf die Cholesterolaufnahme, Verteilung, Transport und Exkretion auswirkt. Folglich werden auch die Cholesterolströme im Körper strikt kontrolliert. Die Genexpression der wichtigsten in dieser Arbeit behandelten Transportproteine wird durch einen Transkriptionsfaktor reguliert, der als "Liver-X-Receptor" (LXR) bezeichnet wird. Dieser Rezeptor misst das Niveau von oxidierten Cholesterolderivaten, Oxysterolen, und dadurch indirekt die Konzentration an Cholesterol in der Zelle. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen des Cholesteroltransports sowie ihre molekulare Regulation durch LXR zu beschreiben. Besondere Beachtung sollten dabei der Hepatocyt und der Enterocyt finden. **Kapitel 1** gibt einen Überblick über die Prozesse, die bei der Aufrechterhaltung der Cholesterolhomöostase eine Rolle spielen.

Bisher wurde angenommen, dass der positive Effekt von HDL seine Funktion als Cholesterol-Carrier im reversen Cholesteroltransport von der Peripherie zur Leber ist. Mit

anderen Worten: Cholesterol in der HDL-Fraktion befindet sich auf dem Weg der Eliminierung. Der ABC-Transporter *Abca1*, der auf einer Vielzahl von Zellen anwesend ist - darunter Hepatocyten, Enterocyten, und Makrophagen – ist unabdingbar für die Bildung von HDL. **Kapitel 2** charakterisiert den reversen Cholesteroltransport bei Mäusen, denen *Abca1* fehlt (*Abca1<sup>-/-</sup>*). Wie erwartet fehlt diesen Mäusen auch das HDL. Trotzdem sind sowohl die hepatobiliäre Exkretion als auch die fäkale Ausscheidung von Cholesterol in *Abca1<sup>-/-</sup>*-Mäusen vollkommen normal, wenn man sie mit Wildtyp-Mäusen vergleicht. Überdies sind die *Abca1<sup>-/-</sup>*-Mäuse auch bei Aktivierung von LXR mit dem synthetischen Liganden T0901317 nicht von Wildtyp-Mäusen zu unterscheiden: Beide zeigen einen deutlichen Anstieg sowohl der hepatobiliären als auch der fäkalen Cholesterolexkretion. Dies zeigt deutlich, dass *Abca1* – und damit also auch HDL – keine kritische Rolle im reversen Cholesteroltransport spielt. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie ist erwähnenswert: Wenn man bei Mäusen den Cholesteroleintrag aus der Nahrung und die hepatobiliäre Cholesterolexkretion addiert und die Cholesterolausscheidung im Stuhl abzieht, kann man berechnen, wie viel Cholesterol im Darm absorbiert wird. Interessanterweise wird bei LXR Aktivierung dieser Betrag *negativ*, was bedeutet, dass der Darm netto Cholesterol abgibt. Dieser Effekt wird in Kapitel 5 noch näher untersucht (siehe unten).

Cholesterol unterscheidet sich lediglich in der Seitenkette von anderen Sterolen, die häufig bei Pflanzen anzutreffen sind, zum Beispiel Sitosterol und Campesterol. Bei einer typischen „westlichen“ Ernährungsweise nehmen wir täglich ungefähr gleich viel Cholesterol wie Pflanzensterole zu uns. Trotzdem finden sich in unserem Körper nur Spuren dieser Pflanzensterole. Es wurde gezeigt, dass die Absorption dieser Pflanzensterole durch die ABC Halb-Transporter *Abcg5* und *Abcg8* limitiert wird: Sie pumpen die Pflanzensterole effektiv aus den Enterocyten zurück ins Darmlumen. Bei der seltenen Erbkrankheit *Sitosterolämie* finden sich Mutationen entweder im Gen für *Abcg5* oder *Abcg8*: Die Transporter funktionieren vermutlich als Heterodimere. In **Kapitel 3** beschreiben wir ein Tiermodell für *Sitosterolämie*, die *Abcg5* Knockout-Maus. Diese Mäuse sind durch Symptome ähnlich denen des Menschen charakterisiert, nämlich durch erhöhte Sitosterolkonzentrationen im Plasma. Abwesenheit von *Abcg5* allein ist folglich ausreichend, um die protektive Wirkung des gesamten Komplexes zu unterbinden. Die Behandlung mit dem LXR-Agonisten T0901317, die unter anderem zu einer erhöhten Expression von *Abcg5*, *Abcg8* und *Abca1* führt, hatte keinen Einfluss auf die fraktionelle Cholesterolabsorption in *Abcg5<sup>-/-</sup>*-Mäusen. In Wildtyp-Mäusen kam es hingegen zu einer Reduktion der fraktionellen Cholesterolabsorption, was bedeutet, dass *Abcg5/Abcg8* möglicherweise die Cholesterolaufnahme beeinflussen können. Überraschenderweise *erhöht* LXR-Aktivierung die Pflanzensterolkonzentrationen im Plasma bei *Abcg5<sup>-/-</sup>*-Mäusen und verschlimmert daher die *Sitosterolämie*; dies deutet auf einen LXR-abhängigen Cholesterolaufnahmemechanismus hin, an dem möglicherweise *Abca1* beteiligt ist.

**Kapitel 4** charakterisiert die Funktion von *Abcg5/Abcg8* in der Leber. Es standen bisher nur widersprüchliche Daten über die Cholesterolkonzentration in Gallenblasen-Galle von *Abcg5*- oder *Abcg8*-Knockout-Mäusen sowie von *Abcg5/Abcg8*-Doppelknockout-Mäusen zur Verfügung, wobei letztere die niedrigste Konzentration aufwiesen. Um die Rolle von *Abcg5* in der hepatobiliären Cholesterolexkretion zu studieren, haben wir anstelle der Konzentration die *Exkretionsrate* in *Abcg5<sup>-/-</sup>*-, *Abcg5<sup>+/-</sup>*- und Wildtyp-Mäusen gemessen. Der Gallenfluß und die Gallensalz exkretion sind in *Abcg5<sup>-/-</sup>*-Mäusen normal. Die Cholesterol- und Phospholipid exkretion sind verglichen mit Wildtyp-Mäusen hingegen um 85 beziehungsweise 31 % vermindert. Um ferner nicht allein die Gleichgewichtsbedingungen zu bestimmen, sondern auch die maximal mögliche Exkretionsrate bei erhöhter Gallenproduktion, wurden diese Mäuse mit einer ansteigenden Dosis Gallensalz infundiert. Die Infusion mit dem hydrophilen Gallensalz Tauroursodeoxycholat führt zu vergleichbaren *relativen* Erhöhungen der Cholesterol- und Phospholipid exkretion bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Behandlung mit einem LXR-Agonisten führt zu einer Steigerung der maximalen Exkretionsrate in Wildtyp-, aber nicht in *Abcg5<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Aus diesen Experimenten schlussfolgern wir, dass *Abcg5* bei der Kontrolle der hepatobiliären Cholesterolexkretion betroffen ist, aber dass daneben möglicherweise noch andere - LXR-unabhängige - Mechanismen bestehen. Diese Hypothese wird auch durch Versuche in *LXRα<sup>-/-</sup>*-Mäusen gestützt: Füttert man *LXRα<sup>-/-</sup>*-, *LXRα<sup>+/-</sup>*- und Wildtypmäuse mit einer cholesterolreichen Nahrung, so erhöht sich in allen drei Gruppen die hepatobiliäre Cholesterolexkretion. In *LXRα<sup>-/-</sup>*-Mäusen - in Abwesenheit von LXR - geht dies im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen nicht mit einer erhöhten Expression von *Abcg5* und *Abcg8* in der Leber einher. Daher sind in diesem besonderen Modell *Abcg5* und *Abcg8* nicht bestimmend für die Cholesterolausscheidung in die Galle.

Die Leber wurde bisher als das wichtigste Organ für die Beseitigung von Cholesterol aus dem Körper angesehen. In Kapitel 3 haben wir bereits beschrieben, dass bei LXR-Aktivierung auch der Darm eine Quelle von fäkalen Sterolen sein muss. In **Kapitel 5** werden *Mdr2*-Knockout-Mäuse benutzt, um die Rolle des Darms in der fäkalen Cholesterolausscheidung näher zu beleuchten. *Mdr2* ermöglicht den Transport von Phospholipiden aus den Hepatocyten in die Galle. Es ist lange bekannt, dass dieser Prozess auch Voraussetzung für die Cholesterolexkretion in die Galle ist. Konsequenterweise fehlen bei *Mdr2<sup>-/-</sup>*-Mäusen sowohl Phospholipide als auch Cholesterol in der Galle. Werden nun *Mdr2<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit dem synthetischen LXR-Agonisten GW3965 behandelt, so steigt die fäkale Cholesterolexkretion im gleichen Maße an wie die von Wildtyp-Mäusen, unabhängig von der Cholesterolausscheidung in die Galle. Außerdem stimuliert LXR-Aktivierung auch die Exkretion von [<sup>3</sup>H]-Cholesterol aus dem Plasma in den Stuhl von *Mdr2<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Diese Daten sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Darm eine wichtige und neuartige Rolle im reversen Cholesteroltransport spielen könnte.

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann die hepatobiliäre Cholesterolexkretion beeinträchtigt sein, ohne dass es zu einer funktionellen Cholestase kommt. Dies ist bei einem



Tiermodell für *erythropoietische Protoporphyrinurie* der Fall: Die *fech/fech* Maus wird in **Kapitel 6** näher beschrieben. *Fech/fech* Mäuse besitzen ein mutiertes Gen für das Enzym Ferrochelatase, das den abschließenden Schritt der Hämsynthese katalysiert. Das biochemische Kennzeichen dieser Erkrankung ist die Anhäufung der hydrophoben Hämvorstufe Protoporphyrin im Körper. Dies führt zur Gallengangproliferation und biliärer Fibrose, aber normalem Gallenfluß, bei *fech/fech* Mäusen. Nach unseren Ergebnissen haben *fech/fech* Mäuse außerdem erhöhte Cholesterolkonzentrationen in der Leber und im Plasma. Es handelt sich dabei hauptsächlich um freies Cholesterol, nicht um Cholesterolester. Gleichzeitig ist auch die Phospholipidkonzentration im Plasma erhöht. Diese Befunde erklären sich durch das Auftreten von Lipoprotein-X (Lp-X) im Plasma. Lp-X ist ein ungewöhnliches Partikel, das häufig unter cholestatischen Bedingungen gefunden wird. Des Weiteren ist es noch aus Patienten mit *familiärer Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) Defizienz* beschrieben. Es wird angenommen, dass es aus Cholesterol und Phospholipiden besteht, die für die Galle bestimmt waren, dort wegen der Cholestase aber nicht hingelangen konnten. *fech/fech*-Mäuse sind, neben *Lcat*<sup>-/-</sup>-Mäusen, das einzige Modell, wo Lp-X in Abwesenheit von Cholestase gefunden wird. Sie weisen jedoch eine Entkopplung von biliärer Gallensalz- von Lipidsekretion auf, das heißt, dass relativ mehr Gallensalz benötigt wird, um Cholesterol und Phospholipide auszuschleiden. Dies deutet darauf hin, dass bei diesen Mäusen die hepatobiliäre Cholesterolexkretion beeinflusst ist. Dadurch kommt es zu einer Anhäufung von Lipiden im Plasma, die eigentlich für die Galle bestimmt waren.

**Kapitel 7** gibt schließlich einen Überblick über das komplexe Netzwerk von Transportproteinen und Regulationsfaktoren, die an der Aufrechterhaltung der Cholesterolhomöostase mitwirken. Sowohl die Regulation der Cholesterolabsorption im Darm als auch die der hepatobiliären Cholesterolexkretion werden diskutiert. Mögliche Mechanismen werden vorgeschlagen, die für die separaten Stoffwechselwege von Cholesterol und Pflanzensterolen in den Enterocyten verantwortlich sein könnten. Außerdem werden auf Basis der vorgestellten Stoffwechselwege die Wirkungsmechanismen neuartiger Arzneimittel beschrieben, die für die Behandlung von Hypercholesterolämie entwickelt wurden.

Die Cholesterolhomöostase bei Säugetieren wird durch die Regulation von endogener Synthese und intestinaler Aufnahme von Cholesterol einerseits und Cholesterolkatabolismus (zum Beispiel zu Gallensalzen) und Ausscheidung im Stuhl (durch Hepatocyten und Enterocyten) andererseits erreicht. Einige der regulatorischen Mechanismen dafür sind bereits das Ziel von Wirkstoffen, um die Plasmacholesterolkonzentration und damit das Risiko für Atherosklerose zu senken. Detaillierte Kenntnis all dieser Prozesse, vom molekularen zum systemischen Niveau, ist ein bedeutender Meilenstein auf dem Weg zu einer effizienten Plasmacholesterol-vermindernden Behandlung beim Menschen.