

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

***Bedeutung von Mutationen im Gen des Gallensalzrezeptors TGR5
(Gpbar-1)***

bei Lebererkrankungen

-

TGR5 sequence variants and their impact on

receptor function and localization

in liver diseases

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)

der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sven Sebastian Hans Schäfer aus Aachen

Düsseldorf Mai 2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.

Dekan: Herr Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. med. V. Keitel-Anselmino

Zweitgutachterin: Frau Prof. Dr. med. M. M. Cortese-Krott

*„A knowledge of bile acid physiology and perturbations of bile acid metabolism
in liver and digestive disease should be useful for the internist.”[1]*

Hofmann A.F. 1999

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Purinbase Adenin
AC	Adenylatzyklase
AIH	Autoimmunhepatitis
AK	Antikörper
AMA	Antikörper gegen Mitochondrien
ARF	<i>ADP-ribosylation factors</i>
AS	<i>Aminosäure</i>
ASBT	<i>apical sodium dependent bile salt transporter</i>
ASH	alkoholinduzierte Steatohepatitis
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BamH I	Restriktionsenzym
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Pubmed)
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum Düsseldorf
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
Bp	Basenpaar
C	Pyrimidinbase Cytosin
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CA	Cholat/ -säure
Ca	Karzinom
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMPGEFs	<i>cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors</i>
CCC	Cholangiocelluläres Karzinom
CD95	<i>cell death receptor 95</i> , Todesrezeptor
CDCA	Chenodesoxycholats/-säure
CDS	<i>coding sequence, codierende Sequenz</i>
CF	Zystische Fibrose/ Mukoviszidose
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
DHC	Ductus hepatocholedochus
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CKK	Cholezystokinin
Cl⁻	Chlorid
CMC	<i>critical micellar concentration</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRE	<i>cAMP-responsive element</i> , cAMP responsible Elemente
CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
CU	<i>Colitis ulcerosa</i>
CYP	Cytochrom P450-Enzym
Cy3	Indocarbocyanin-3 (Cy3) gekoppelter Sekundärantikörper
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCA	Desoxycholcholats/-säure
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEN	Diethylnitrosamin
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPP4	Dipeptidylpeptidase IV
Dpn I	Restriktionsenzym
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
EC50	<i>effective concentration</i> , mittlere effektive Konzentration

Ecoli	Escherichia coli
EcoR1	Restriktionsenzym
EDG-1	<i>sphingosine-1-phosphate receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPAC	<i>exchange proteins activated by cAMP</i>
(r)ER	(raues) Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FAS-R	CD-95-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-gekoppelter Sekundärantikörper
FXR	<i>farnesoid x receptor</i>
G	Purinbase Guanin
GCDCA	<i>Glycochenodeoxycholat/-acid</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEJ	gastroösophagealer Übergang
GERD	gastroösophageale Refluxerkrankung mit Ösophagitis
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
GLP-1	<i>Glucagon-like peptid- 1</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i> / G-Protein gekoppelter Rezeptor
Gpbar-1	<i>G-protein coupled bile acid receptor-1</i>
GRHR	<i>Gonadotropin-releasing-Hormon-Rezeptor</i>
GS	Gallensalz/-säure
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCO₃	Bikarbonat
HEK293	<i>humane embryonic kidney cells</i>
HE	hepatische Enzephalopathie
IABP	<i>ileal bile acid binding protein</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INT-747	<i>Obeticholic acid, 6-ECDCA</i> , FXR-Agonist
INT-767	dualer FXR-TGR5-Agonist
INT-777	TGR5-Agonist, S-EMCA, <i>6α-ethyl-23(S)-methyl-cholic acid</i>
JAK	<i>janus activated kinase</i> , Januskinase
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
K⁺	Kalium
KHK	Koronare Herzerkrankung
KO	<i>Knock-out</i> , Kontrolle
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
LCA	Lithocholat/ -säure
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRH-1	<i>liver-receptor-homolog-1</i>
M	Mol, Molar
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEM	<i>minimal essential medium</i>
Mg²⁺	Magnesium
MgSo₄	<i>Magnesiumsulfat</i>

MRP	<i>multidrug resistance protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano
Na²⁺	Natrium
Na⁺/K⁺-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NASH	Nichtalkoholische/ -induzierte Steatohepatitis
NSAID/NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika/Antiphlogistika
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NTCP	<i>Natrium-taurocholate cotransporting polypeptide</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
OATP	<i>organic anion transporter</i>
OST	<i>organic solute transporter</i>
PAR2	Korezeptor des PAR4
PAR4	<i>Protein-activated receptor 4</i>
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBC	primäre biliäre Zirrhose/ Cholangitis
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , salzhaltiger Phosphatpuffer
pcDNA3.1+	Plasmid
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Proteindisulfid Isomerase (Marker Endoplasmatisches Retikulum)
pEYFP	Plasmid <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
PFIC	progressive familiäre intrahepatische Cholestase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PSC	primäre sklerosierende Cholangitis
PPi	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
R(N)OS	reaktive Sauerstoff-/Stickstoffspezies/-radikale
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
PXR	<i>pregnane x receptor</i>
S1P2	<i>sphingosine-1-phosphate receptor 2</i>
SEC	Sinusendothelzelle
Sek	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SHP-1	<i>small heterodimer-partner-1</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription-3</i>
STC-1	<i>secretin tumor cell-1</i>
Std	Stunde
SVR	<i>sustained virologic response</i>
SXR	<i>steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor</i>
T	Pyrimidinbase Thymin
T3	Triiodthyrosin
T4	Tetraiodthyrosin
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TGR5	<i>transmembrane G-protein coupled receptor 5</i>

TCA	Taurocholchololat/-säure
TCDCA	Taurochenodeoxychololat/-säure
TK	Tyrosinkinase
TLC	Taurolithocholchololat/-säure
TLCS	Taurolithocholylsulfat, Taurolithocholat-3-sulfat
Tm	Schmelztemperatur
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TRPA1	<i>transient receptor potential ankyrin 1</i>
UDCA	Ursodeoxychololat/-säure
UE	Untereinheit
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDR	Vitamin D Rezeptor
W	Watt
WT	Wildtyp
Xho I	Restriktionsenzym
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

* Nicht explizit aufgeführt sind der international standardisierte Ein- respektive Dreibuchstabencode der Aminosäuren

II. INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Gallensäuren/ -salze und ihre Rezeptoren	1
1.1.1 Die funktionelle Rolle	1
1.1.2 Die chemische Struktur & die physikochemischen Eigenschaften	2
1.1.3 Der Enterohepatische Kreislauf.....	3
1.1.4 Die Rezeptoren	7
1.2 Der TGR5-Rezeptor (Gpbar-1)	8
1.2.1 TGR5, ein ubiquitär exprimierter GPCR.....	8
1.2.2 TGR5 reguliert den Gallensalz-, den Energie- & den Glukosehaushalt	14
1.2.3 TGR5 moduliert die Immunfunktion in der Leber & im Gesamtorganismus	16
1.2.4 TGR5 in der Gallenblase & den Gallenwegen.....	18
1.2.5 TGR5 im Nervensystem	19
1.2.6 TGR5 reguliert die Motilität des GIT	20
1.3 TGR5 bei hepatobiliären, intestinalen und metabolischen Erkrankungen	21
1.3.1 Cholangiopathien & Mukoviszidose	23
1.3.2 Leberzirrhose	24
1.3.3 CED & Gallensalzverlustsyndrom	25
1.3.4 Gallensteine	27
1.3.5 Neoplasien	28
1.3.6 Arteriosklerose, metabolisches Syndrom, DM Typ II & TGR5-Agonisten	29
1.4 Die Fragestellung der Dissertation	32
2. MATERIALIEN & METHODEN.....	33
2.1 Materialien und Geräte	33
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Molekulargenetische Methoden	35
2.2.1.1 DNA Proben	35
2.2.1.2 Amplifizierung genomischer DNA.....	36
2.2.1.3 PCR - Polymerase Kettenreaktion.....	37
2.2.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA.....	40
2.2.1.5 DNA-Aufreinigung	41
2.2.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	42
2.2.1.7 Sequenzierung und deren Auswertung.....	42
2.2.1.8 Verwendete Plasmide	45
2.2.1.9 Design der TGR5-Mutanten und Einbringen in vorhandene Konstrukte	45
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	48

2.2.2.1 Bakterienstämme, deren Kultivierung und Transformation	48
2.2.2.2 Plasmidpräparation	49
2.2.3 Zellbiologische Methoden	52
2.2.4 Funktionsanalyse mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay	53
2.2.5 Immunfluoreszenzmessung & konfokale Laserscanning Mikroskopie	57
2.2.6 Statistische Auswertung	60
2.2.7 Patientenkollektive	61
3. ERGEBNISSE.....	63
3.1 Etablierung der Sequenzierung	63
3.2 Sequenzierungsergebnisse	63
3.3 Der single nucleotide polymorphism SNP rs11554825 im Exon 1	73
3.4 Zellbiologische Charakterisierung von Mutationen in der TGR5-CDS	76
3.4.1 TGR5-p.E8K	80
3.4.2 TGR5-p.M112V	82
3.4.3 TGR5-p.R201W	84
3.4.4 TGR5-p.Y240D.....	86
3.4.5 TGR5-p.Q296R	87
3.4.6 TGR5-p.L327P	90
4. DISKUSSION.....	92
4.1 Patientenkollektive und identifizierte Mutationen im TGR5-Gen.....	92
4.1.1 Synonyme Mutationen im Exon 2	93
4.1.2 Nicht-synonyme Mutationen im Exon 2.....	93
4.2 Speziesunterschiede bei TGR5-Defizienz	102
4.3. TGR5, GS und virale Hepatitiden.....	105
4.3.1 TGR5 als potentieller Disease-Modifizier?.....	105
4.3.2 Der SNP rs11554825 im Exon 1 bei HCV	108
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	112
6. LITERATURVERZEICHNIS	114
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	146
8. TABELLENVERZEICHNIS.....	148
9. FORMELVERZEICHNIS.....	150
10. DANKSAGUNG.....	151
Eidesstattliche Versicherung	152

1. EINLEITUNG

1.1 Gallensäuren/ -salze und ihre Rezeptoren

1.1.1 Die funktionelle Rolle

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des Teilprojekts 4 der KFO 217 „Hepatobiliärer Transport und Lebererkrankungen“ angefertigt und beschäftigt sich mit Gallensäuren (GS) und ihrem Rezeptor TGR5 (Gpbar-1). GS wurden Jahrzehnte lang lediglich als Moleküle angesehen, die der Nahrungsaufnahme, insbesondere der Resorption von Nahrungslipiden und den fettlöslichen Vitaminen A, D, E und K im Gastrointestinaltrakt (GIT) dienlich sind. Im Laufe der letzten Jahre haben das Bild und die funktionelle Wertigkeit der GS jedoch einen rasanten Wandel erfahren. Sie sind zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt, als bekannt wurde, dass sie nicht mehr nur als einfache Endprodukte des Cholesterinmetabolismus, sondern als systemische Signalmoleküle mit hormonähnlichen Funktionen angesehen werden [2–4]. Neben ihrer essentiellen Rolle in der Absorption von Nahrungslipiden sind sie an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Stoffwechselvorgängen beteiligt, insbesondere im hepatobiliären System und im GIT [5–8]. So regulieren sie nicht nur ihre eigene Biosynthese, ihre Sekretion und ihren Transport im Enterohepatischen Kreislauf, sondern stimulieren auch die biliäre Sekretion von Lipiden, erhöhen den Gallefluss und vermitteln die Elimination des Cholesterins [1, 9]. Des Weiteren dienen sie der Homöostase des Lipid-, des Glukose- und des Energiehaushaltes, haben immunmodulatorische Funktionen und beeinflussen die Zellproliferation und den Zelltod durch Modulation von Apoptosevorgängen [4, 10]. Im Darm regulieren sie die Motilität und die Epithelbarriere, wirken antimikrobiell und beeinflussen die Absorption und Sekretion von Elektrolyten und Flüssigkeiten [11–16].

Obgleich GS an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt sind, haben sie sich auch als Medikamente in der Therapie von Leber- und Darmerkrankungen nützlich erwiesen. Zugelassen ist aktuell jedoch lediglich Ursodeoxycholsäure (UDCA), eine Gallensäure mit zytoprotektiven und choleretischen Eigenschaften. UDCA stellt die Standardtherapie der primär biliären Zirrhose/ Cholangitis (PBC) dar [17–22]. Weitere Gallensäurederivate werden

1. EINLEITUNG

derzeit in klinischen Studien zur Therapie der PBC (NCT00550862), der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) (NCT01755507) sowie der nicht-alkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) erprobt [23, 24].

1.1.2 Die chemische Struktur & die physikochemischen Eigenschaften

GS sind säurehaltige Steroidderivate, die in der Leber aus Cholesterin synthetisiert werden. Sie setzen sich aus einem Steroidnukleus, bestehend aus vier Kohlenstoffringen, und einer Seitenkette zusammen. Die verschiedenen GS unterscheiden sich sowohl im Aufbau der Seitenkette als auch in den Substituenten der Ringstrukturen sowie in ihrer Potenz verschiedene GS-Rezeptoren zu aktivieren [25, 26]. Über zwei Reaktionswege, den klassischen und den alternativen Weg, können durch zahlreiche Modifikationen die beiden primären GS Cholat (CA) und Chenodesoxycholat (CDCA) gebildet werden [2, 27–32]. Der wichtigste und geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt der klassischen Biosynthese wird durch die nur in der Leber lokalisierte CYP7A1, ein Enzym der Cytochrom P450 Familie, katalysiert [33]. Die Aktivität des Enzyms ist direkt abhängig von der Größe des GS-Pools [34]. Ein weiterer wichtiger Schritt der Synthese der GS ist die Konjugation mit den Aminosäuren (AS) Glyzin oder Taurin [2, 25, 35, 36]. In selteneren Fällen können auch Glucuronidierungen oder Sulfatkonjugationen vorkommen [37]. Diese Konjugationen erhöhen die Wasserlöslichkeit und erleichtern den intestinalen Transport [38]. Unter physiologischen pH-Bedingungen liegen GS daher meist ionisiert als Anion (Salz) vor. Dies hat dazu geführt, dass Gallensäuren auch als Gallensalze bezeichnet werden [2, 27]. Aus Übersichtlichkeitsgründen wird im Folgenden nur noch von Gallensalzen die Rede sein.

Die spezielle Struktur der GS verleiht ihnen besondere physikochemische Eigenschaften, welche für die Absorption von Nahrungslipiden im Darm essentiell sind. Als so genannte amphipathische Moleküle besitzen sie einen hydrophoben und einen hydrophilen Anteil, die ihnen die Fähigkeit verleihen sich zu Makromolekülen zusammen zu lagern. Unter wässrigen Bedingungen, wie sie in der Galle oder im Lumen des GIT herrschen, können GS ab einer bestimmten Konzentration, der so genannten *critical micellar concentration*, aggregieren

1. EINLEITUNG

und mit Phospholipiden rundliche Strukturen, so genannte Micellen, bilden [39–41]. Die wasserlöslichen Hydroxylgruppen finden sich im Außenbereich der Micellen, wohingegen sich die hydrophoben Ringstrukturen im Inneren anordnen [42]. Die oben angesprochene Konjugation mit einer AS verstärkt nicht nur die Löslichkeit der GS, sondern erleichtert auch die Emulgierung der Nahrungslipide und die Diffusionsfähigkeit durch Zellmembranen durch Erhöhung dieser Amphipatizität [2, 35, 36, 42]. Eine passive Diffusion ist jedoch konjugierten GS kaum möglich, so dass für die Aufnahme ins Zellinnere spezifische Transportsysteme notwendig sind, auf welche im folgenden Abschnitt eingegangen wird [43, 44].

1.1.3 Der Enterohepatische Kreislauf

Das angesprochene Zirkulieren von GS zwischen der Leber und dem Darm wird als Enterohepatischer Kreislauf bezeichnet [32] (Siehe auch Abbildung 1 - Der Enterohepatische Kreislauf). Zahlreiche Transportproteine befördern GS zwischen diesen Kompartimenten [45, 46]. Nach der Biosynthese werden die primären GS zusammen mit Stoffwechselmetaboliten und Xenobiotika transzellulär über die apikale, kanalikuläre Membran in das intrahepatische Gallengangssystem sezerniert. Der in der Membran lokalisierte GS-spezifische BSEP-Transporter (*bile salt export pump*, ABCB11) ist ausschließlich für die kanalikuläre Sekretion von Glyzin- und Taurin-konjugierten GS verantwortlich [47–49], wohingegen Sulfat- und Glucuronat-konjugierte GS über den MRP2-Transporter (*multidrug resistance protein*, ABCC2) in die Kanalikuli freigesetzt werden [37]. Die verbleibenden Gallebestandteile, wie organische Anionen, Phospholipide, Bikarbonat und Cholesterin, werden über weitere Transporter in die Gallenkanälchen befördert [50]. Der BSEP-GS-Transport über die kanalikuläre Hepatozytenmembran ist der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Sekretion. Da er entgegen eines Konzentrationsgradienten gerichtet ist, benötigt er Energie in Form von ATP. Die Transportaktivität ist zudem direkt abhängig von der prähepatischen GS-Konzentration. Eine verstärkte Aufnahme führt zwangsläufig zu einem erhöhten intrahepatischen Gallefluss und einer erhöhten Freisetzung in das Gallengangssystem [49–51]. Zudem scheinen weitere Mechanismen eines so genannten *bile salt independent bile*

1. EINLEITUNG

flow zu existieren. So wird unter anderem der Glutathionsekretion eine Rolle zugeschrieben [52–54].

Die Galle ist für den Menschen eine wichtige Ausscheidungsmöglichkeit sowohl von Bilirubin, Cholesterin und seiner Derivate, als auch von Toxinen und einer Vielzahl von Medikamenten [55]. Nach zahlreichen Modifikationsschritten durch Ionen-, Flüssigkeits- und GS-Verschiebungen wird diese Sekundärgalle über den Ductus hepatocholedochus (DHC) und die Papilla duodeni major Vateri in das Duodenum ausgeschieden [28, 56–61].

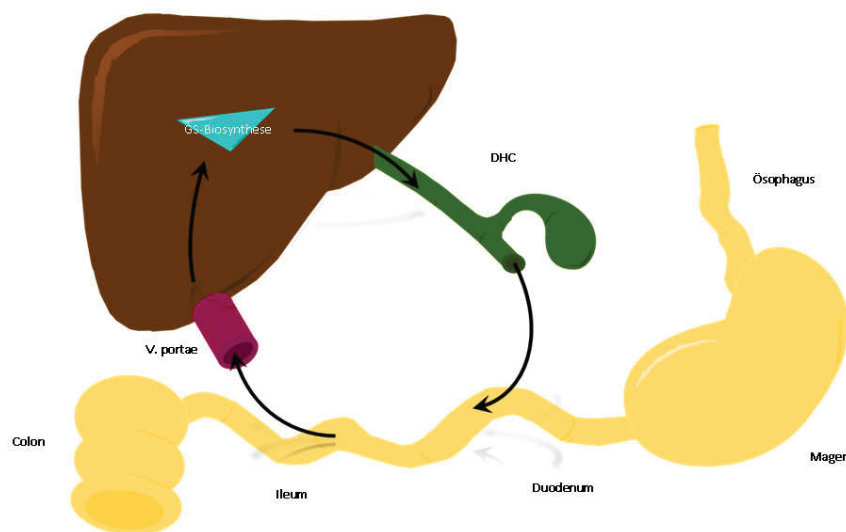


Abbildung 1 - Der Enterohepatische Kreislauf

GS werden in der Leber synthetisiert, über die Gallenwege in den Dünndarm transportiert und dort bakteriell mehrfach modifiziert. Darauf folgend werden sie im terminalen Ileum reabsorbiert und gelangen über die V. portae zurück zur Leber. Pro Tag zirkulieren sie auf diese Weise 4-12x. Vereinfachte schematische Darstellung modifiziert nach [2, 5, 27, 28, 32, 49, 50, 55, 62].

Durch Dekonjugation, Oxidation und weitere chemische Veränderungen entstehen aus den primären GS im Darmlumen letztlich die sekundären und tertiären GS Lithocholat (LCA), Desoxychololat (DCA), Taurolithocholat (TLC) und Ursodesoxychololat (UDCA) [3, 32]. Diese Modifikationen haben wichtige Konsequenzen für die Eigenschaften der GS. Auf der einen Seite fördern sie die passive Absorption der nun größtenteils unkonjugierten GS im Colon, so dass der Verlust durch Umgehung des Enterohepatischen Kreislaufs reduziert wird, auf der anderen Seite potenzieren sie die schädliche Wirkung, welche in der Karzinogenese und der Bildung von Gallensteinen beispielsweise eine Rolle spielt [63].

1. EINLEITUNG

95% der GS werden im terminalen Ileum durch den Natrium-Symporter ASBT (*active sodium bile salt transporter*, IBAT, SLC10A2) in die Enterozyten aufgenommen [51, 64, 65]. Der Rücktransport zur Leber erfolgt nach Passage durch die Enterozyten an Albumin gebunden im portalvenösen Blut [36]. In den Lebersinusoiden umspült das portalvenöse Blut den Dissé-Raum, so dass es an den Fenestrae der sinusoidalen Membran direkt mit den Hepatozyten in Kontakt kommt [66]. GS und Galle-pflichtige Substanzen werden basolateral über aktive und passive, natriumabhängige und -unabhängige Transportvorgänge, wie den natriumabhängigen GS-Transporter NTCP (*Natrium-taurocholate cotransporting polypeptide*, SLC10A1) [67] oder die Familie des natriumunabhängigen OATP (*organic anion transporter protein*) im Austausch mit intrazellulären Anionen (Glutathion, Chlorid, organische Anionen, GS und Fremdstoffe) rückresorbiert [49, 51]. Als Schutzmechanismus vor zu hohen, toxischen GS-Konzentrationen finden sich an der basolateralen Hepatozytenmembran zudem Effluxpumpen, wie die *multidrug-resistance* Transportproteine MRP3 und MRP4 (ABCC3 und ABCC4) [68], welche ATP-abhängig in entgegengesetzter Richtung GS, Bilirubin und Glutathionkonjugate aus der Zelle ins Pfortaderblut zurück transportieren können [36, 69].

GS durchlaufen diesen Enterohepatischen Kreislauf täglich etwa 4-12x [28]. Die Enterohepatische Zirkulation repräsentiert einen feinregulierten und hocheffizienten Kreislauf, welcher sowohl den Verlust von GS über den GIT, als auch die Neusynthese und somit den Energieverbrauch auf ein Minimum reduziert. Der tägliche Verlust über die Faeces von etwa 0,2-0,6 g (rund 5-10 %) wird zur Aufrechterhaltung eines konstanten GS-Pools von 3-4 g durch Neusynthese aus Cholesterin in den Hepatozyten kompensiert [2, 31, 35, 49, 70].

Hohe GS-Konzentrationen im Rahmen einer Cholestase haben einen toxischen Effekt, in dem sie unter anderem durch intrazelluläre Akkumulation zu Hepatozytenapoptose und Leberparenchymschaden sowie zur Entwicklung einer destruktiven Cholangitis führen können [71, 72]. Zur Vermeidung eines solchen Zellschadens ist es daher unabdingbar, dass das Zusammenspiel aus Synthese sowie GS-An- und -Abtransport einer präzisen Kontrolle unterliegen muss. Kleinste Veränderungen wie Transporterdefekte oder Malabsorptionssyndrome (progressive familiäre intrahepatische Cholestase (PFIC), M. Crohn oder iatrogenes Kurzdarmsyndrom bei Zn Ileumresektion) führen zu einer Unterbrechung

1. EINLEITUNG

des Kreislaufs mit gestörter Fettabsorption und gegebenenfalls GS-Verlustsyndrom [46, 73–83]. Daher existieren zahlreiche komplexe, miteinander verknüpfte und redundante Kontrollmechanismen, wobei in der folgenden Abbildung nur der wichtigste Regulationsmechanismus dargestellt wird (siehe auch Reviews von Scotti und Chiang [31, 84]).

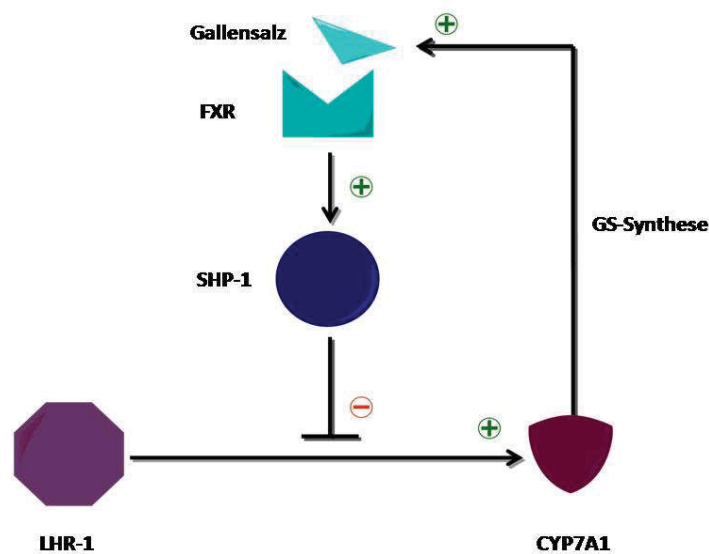


Abbildung 2 – Die FXR-vermittelte Regulation der GS-Synthese (vereinfacht)

Hohe GS-Konzentrationen führen über einen Regelkreis zur Verminderung ihrer eigenen Biosynthese. Der Großteil dieser regulatorischen Mechanismen wird durch den *farnesoid X receptor* (FXR) vermittelt [85–88]. Die Regulation der de-novo-Synthese erfolgt über das geschwindigkeitslimitierende Enzym, die CYP7A1 [28]. Über einen negativen *Feedback*-Mechanismus supprimieren GS die eigene Synthese durch direkte Aktivitätsänderungen der CYP-Enzyme, überwiegend jedoch indirekt auf Ebene der Genexpression durch eine veränderte Transkription [89, 90]. GS aktivieren via FXR den *small-heterodimer-partner-1* (SHP-1). Dieser ist ein Inhibitor des *liver-receptor homolog-1* (LRH-1), welcher die GS-Synthese stimuliert. Durch die Inhibition der LRH-1-Wirkung erfolgt eine Reduktion der Biosynthese der GS. Modifiziert nach [89–102].

Darüber hinaus existieren auch SHP-1-unabhängige Regulationskaskaden – in welchen der *fibroblast growth factor 15/19*, *c-Jun-kinase*-Signalwege [103–108], der *pregnane x receptor* (PXR) [109–112] und der *hepatocyte nuclear factor-4* (HNF-4α) [113–116] eine Rolle spielen. Die angesprochenen Signalwege reduzieren bei GS-Akkumulation auch die Zirkulation innerhalb des Enterohepatischen Kreislaufs durch eine Reduktion der Aktivität des ASBT-Transporters im Ileum [117–119] und der OATP- und NTCP-Transporter in der Leber [120, 121] sowie durch eine gesteigerte Expression der BSEP [48, 122]. Aus Übersichtgründen wurden diese zahlreichen Regulationsmöglichkeiten nicht in obiger Abbildung dargestellt.

1.1.4 Die Rezeptoren

Es lassen sich grundlegend drei verschiedene Gruppen von GS-Rezeptoren unterscheiden: a) nukleäre Rezeptoren b) Signalmoleküle wie Kinasen und c) G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Die hormonähnliche Beeinflussung diverser Signalwege wird maßgeblich durch nukleäre Rezeptoren ermöglicht. Unter ihnen konnte der *farnesoid X receptor* (FXR) als Hauptrezeptor für GS identifiziert werden [85–88]. Einen Überblick über die Signalwege und Funktionen des Hauptrezeptors bietet der Review von Lee et al. [123]. In der Folgezeit konnten weitere nukleäre Rezeptoren, deren natürliche Liganden GS sind, abgegrenzt werden: der *pregnane x receptor* (PXR) [110–112], der *steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor* (SXR) [124] und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) [125]. Im Gegensatz zum FXR ließen sich diese nukleären Rezeptoren jedoch nur durch das sekundäre GS Lithocholat (LCA) aktivieren und scheinen somit unter physiologischen Bedingungen keine oder nur eine geringe Rolle zu spielen.

Studienergebnisse belegen, dass auch FXR-unabhängige intrazelluläre kinaseabhängige Signalwege existieren, wie beispielsweise die Signalvermittlung über die Proteinkinase C (PKC) [126, 127], die *c-jun N-terminal kinase* (JNK) [108, 128] oder die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) [129–131]. Neben den erwähnten nukleären Rezeptoren und Tyrosinkinasen bestehen Interaktionen der GS mit Glucagon-, Insulin- und muskarinergen Rezeptoren durch direkte Ligandenbindung oder durch die Vermittlung der oben genannten Kinasen [132].

Ferner gibt es erste Belege, dass GS die Fähigkeit besitzen auch ohne jegliche Rezeptorbeteiligung Signale zu vermitteln. Zelluläre Informationen können durch Umbauvorgänge der PM, die zu einer veränderten Membranfluidität und -zusammensetzung führen, nach intrazellulär übermittelt werden [133, 134].

Schließlich wurde beobachtet, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch GS aktiviert werden können. Neben dem plasmamembrangebundenen G-Protein gekoppelten GS-Rezeptor TGR5 (Gpbar-1), welcher Gegenstand der vorliegenden Dissertation ist, wurde der *sphingosine-1-phosphate receptor 2* (S1P2, EDG-1) identifiziert. Taurinkonjugierte GS wie Taurochololat (TCA) führen zu einer Aktivierung des Rezeptors in Cholangiozyten und

1. EINLEITUNG

Hepatozyten. S1P2-Signale werden darauf folgend durch Interaktion mit der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2) und der Proteinkinase B (PKB) weitergeleitet [3, 135].

1.2 Der TGR5-Rezeptor (*Gpbar-1*)

1.2.1 TGR5, ein ubiquitär exprimierter GPCR

2002/ 2003 entdeckten Maruyama et al. und Kawamata et al. unabhängig voneinander einen neuen plasmamembrangebundenen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR), dessen natürliche Liganden GS sind. Sie beschrieben einen nicht-nukleären Rezeptor, der membranständig an ein stimulatorisches G_s-Protein gekoppelt ist und über die Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) zu einer intrazellulären Konzentrationserhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) führte [26, 136]. In der wissenschaftlichen Nomenklatur finden zudem die folgenden Benennungen für den TGR5-Rezeptor Verwendung: *Gpbar-1* (*G-protein coupled bile acid receptor-1*), M-BAR (*membrane-type receptor for bile acids*), BG37, GPCR19, CPR131 oder MGC40597 [137, 138].

Die Familie der GPCR repräsentiert eine der größten Proteingruppen im Genom der Säugetiere und stellt bedeutende Zielstrukturen der Medikamentenentwicklung dar [139, 140]. Zahlreiche Signalstoffe, Hormone und Neurotransmitter binden an GPCR. So entfachen Herz-Kreislauf-wirksame Medikamente wie β -Blocker oder Psychopharmaka ihre Wirkung durch Bindung an GPCR [141]. Mit mehr als 800 identifizierten Rezeptoren und einem 2 %-Anteil am gesamten humanen Genom sind sie der größte Verband von Zelloberflächenmolekülen, die Bestandteil der Signaltransmission ins Zellinnere sind [142, 143]. GPCR detektieren extrazelluläre Signale durch Bindung von spezifischen Liganden, unterziehen sich darauf folgend Konformationsänderungen und aktivieren schließlich zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden, die in einer zellulären Antwort münden [144]. Sie sind an einer Vielzahl von Stoffwechselvorgängen wie der Signalweiterleitung, der Hormon- und Enzymfreisetzung, der Drüsen- und Gehirnfunktion sowie der Immunantwort beteiligt [142]. Da die Struktur und Funktion der einzelnen Rezeptoren mitunter stark divergiert, wurde ein Klassifikationssystem eingeführt, welches fünf Hauptgruppen unterscheidet:

1. EINLEITUNG

glutamate, rhodopsin, adhesion, frizzled/ taste2 und secretin. Die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren sind mit Abstand die größte Gruppe [139, 145]. TGR5 ist ein solcher *Rhodopsin-like* Rezeptor und Bestandteil der Klasse 1/A [26, 146]. Rhodopsin-GPCR weisen eine strukturelle Verwandtheit zum TGR5-Rezeptor auf (15 % identische Sequenzen, 25 % Ähnlichkeiten) [147]. Das beim Menschen auf Chromosom 2q35 lokalisierte TGR5-Gen gliedert sich in zwei Exons und drei Introns. Es liegen drei Transkriptionsvarianten vor, welche in ihrer Länge differieren: Das Exon 1 der im Rahmen der Arbeit als Referenz verwendeten Transkriptvariante 1 (NM_001077191.1) beinhaltet die Basenpaare 1-202, das Exon 2 die Basenpaare 203-2003. Die codierende Sequenz des Rezeptors ist vollständig auf dem zweiten Exon lokalisiert und wird aus 993 Basenpaaren (Bp 869-1861) gebildet, welche für 330 AS codieren (NP_733800) [7, 26, 148].

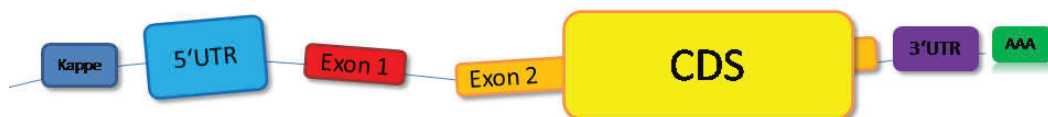


Abbildung 3 - Das TGR5-Gen

Das humane TGR5-Gen ist auf Chromosom 2q35 lokalisiert. Die Transkriptvariante 1 (NM_001077191.1) gliedert sich in die oben abgebildeten Abschnitte. Im Rahmen der Transkription werden lediglich die Abschnitte des Exon1 und Exon2 in eine mRNA umgeschrieben. Die eigentliche CDS für das translatierte Protein befindet sich innerhalb des Exon 2. Modifiziert nach [148–150].

Für das Rezeptor-Protein NP_733800 wird ein GPCR charakteristischer Aufbau, bestehend aus sieben Transmembrandomänen, welche den Rezeptor in der Zellmembran verankern, vorhergesagt (Abbildung 4 - Eine 3D-Darstellung des TGR5-Rezeptors). Der extrazelluläre Aminoterminus und die extrazellulär orientierten Anteile der Transmembrandomänen ermöglichen die Ligandenbindung, wohingegen die intrazellulären Anteile sowie der Carboxylterminus der Signaltransduktion durch Interaktion mit den heterotrimeren G-Protein-Untereinheiten dienen [151–153].

1. EINLEITUNG

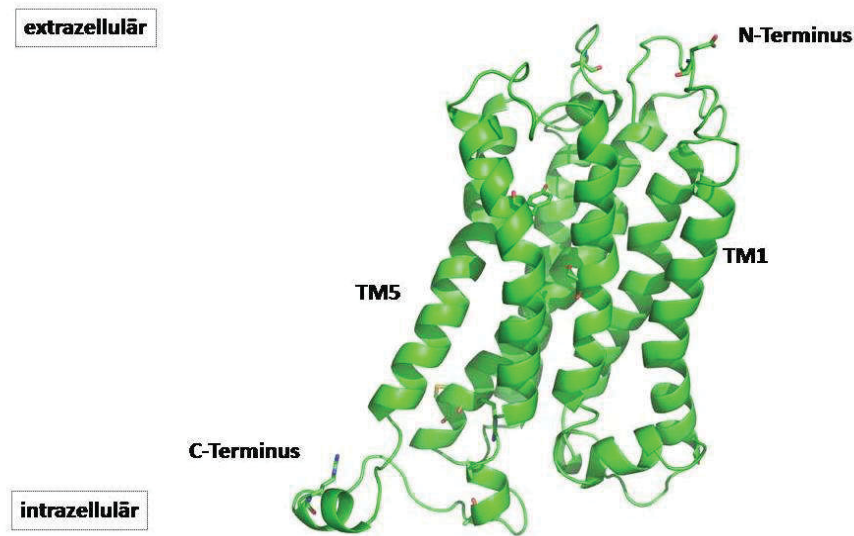


Abbildung 4 - Eine 3D-Darstellung des TGR5-Rezeptors

Die obige Darstellung wurde durch Herrn Dipl.-Pharm. Christoph G. W. Gertzen, *Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Gohlke, entworfen und zur Verfügung gestellt.

TGR5 wird durch verschiedene primäre und sekundäre GS dosisabhängig aktiviert [136]. Im Gegensatz zu nukleären Rezeptoren weist der TGR5-Rezeptor jedoch auch eine Affinität zu konjugierten GS auf [154, 155]. Taurin- und glyzingekoppelte GS können direkt ohne Vermittlung spezifischer Transporter gebunden werden. Dies ermöglicht es auch konjugierten GS, für welche die Zellmembran impermeabel ist, die Zelle zu beeinflussen ohne die Zellmembran passieren zu müssen [156]. Eine Veränderung der GS-Grundstruktur durch Methylierung an der Position C23 der Seitenkette konnte die Selektivität für den TGR5-Rezeptor erhöhen, so vergrößerte die *6- α -alkyl*-Substituierung die Potenz sowohl gegenüber TGR5 als auch FXR [157]. Sato et al. verdeutlichten ferner, dass die Konjugation der GS einen Einfluss auf ihre Wirkung am TGR5-Rezeptor nehmen könne: So verstärkt die Konjugation mit Taurin die Potenz der GS gegenüber TGR5, wohingegen die Konjugation mit Glyzin im Vergleich keinen Effekt zeigt. Unter der Vielzahl von TGR5-agonistisch wirksamen GS zeigte Lithocholat (LCA) ein besonders starkes Potential den Rezeptor zu stimulieren: Lithocholat (LCA) > Deoxycholat (DCA) > Chenodeoxycholat (CDCA) > Cholat (CA) [26, 154]. Demnach steigt die agonistische Aktivität mit der Hydrophobizität der GS an [136].

1. EINLEITUNG

Auch die Gewebeverteilung des Rezeptors weicht von der des nukleären FXR-Rezeptors ab, der besonders in der Leber, den Nieren und dem Darm lokalisiert ist [85–88]. Die TGR5-mRNA konnte in zahlreichen Studien fast ubiquitär, in einer Vielzahl von Organen, Geweben und Zellen nachgewiesen werden. Die stärkste Expression weisen Gallenblase, Plazenta, Lunge, Milz, Leber und Darm auf [26, 136, 158]. Darüber hinaus wurde der Rezeptor in den Gallenwegen, im braunen Fettgewebe, in der Skelettmuskulatur, im peripheren und zentralen Nervensystem und in verschiedenen dem Immunsystem zugehörigen Zellen beschrieben [8, 156, 159–163].

TGR5 wird nicht nur beim Menschen, sondern auch in anderen Spezies exprimiert. Die menschliche AS-Sequenz stimmt zu 86 %, 90 %, 82 % und 83 % mit der des Rindes, des Kaninchens, der Ratte und der Maus überein [136]. Jedoch variieren die Größe, die Anzahl der Exons und der Aufbau des Gens sowie die chromosomale Lokalisation [164].

Im Rahmen von TGR5-Agonisten-Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass nicht nur GS, sondern unter anderem auch einige Steroidhormone wie Progesteron und Neurosteroidoide oder Extrakte des Olivenbaums Liganden des TGR5-Rezeptors darstellen [26, 136, 154, 158, 161, 165, 166]. In den letzten Jahren wurden darüber hinaus zahlreiche, potente, selektive, sowohl natürlich vorkommende, als auch synthetische TGR5-Agonisten beschrieben [154, 157, 165, 167–184]. Der Großteil der Agonistenstudien hebt die immunmodulierenden und antidiabetischen Effekte des Rezeptors hervor [165, 171–178, 185–190]. Zuletzt wurden auch kombinierte FXR-/ TGR5-Agonisten entwickelt, welche Effekte beider Rezeptoren vereinen [191–195].

Mit Abschluss des humanen Genomprojektes war es nicht möglich einen humanen, homologen Rezeptor zum TGR5 zu ermitteln. Es besteht lediglich eine 28 %ige Ähnlichkeit mit dem Aufbau des oben erwähnten EDG-1 (*sphingosine-1-phosphate receptor*, S1P2) [26]. Auch ist der vollständige TGR5-Signalweg noch weitgehend unbekannt. Allgemein anerkannt ist die durch Aktivierung des Rezeptors hervorgerufene Erhöhung des cAMP. Die Bindung von GS aktiviert den Rezeptor und stimuliert durch Vermittlung des G_s-Proteins die AC zur Synthese von cAMP [26, 136]. Die sich anschließende größtenteils noch unbekannte intrazelluläre Signalkaskade könnte anhand eines Vergleiches mit anderen GPCR, insbesondere vom Rhodopsintyp, folgende potentielle Signalkaskade zeigen:

1. EINLEITUNG

GS aktivieren den Rezeptor, welcher daraufhin mit dem heterotrimeren stimulatorischen G_s -Protein interagiert. Dies bewirkt die Stimulation der AC, die unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) cAMP aus ATP synthetisiert [145].

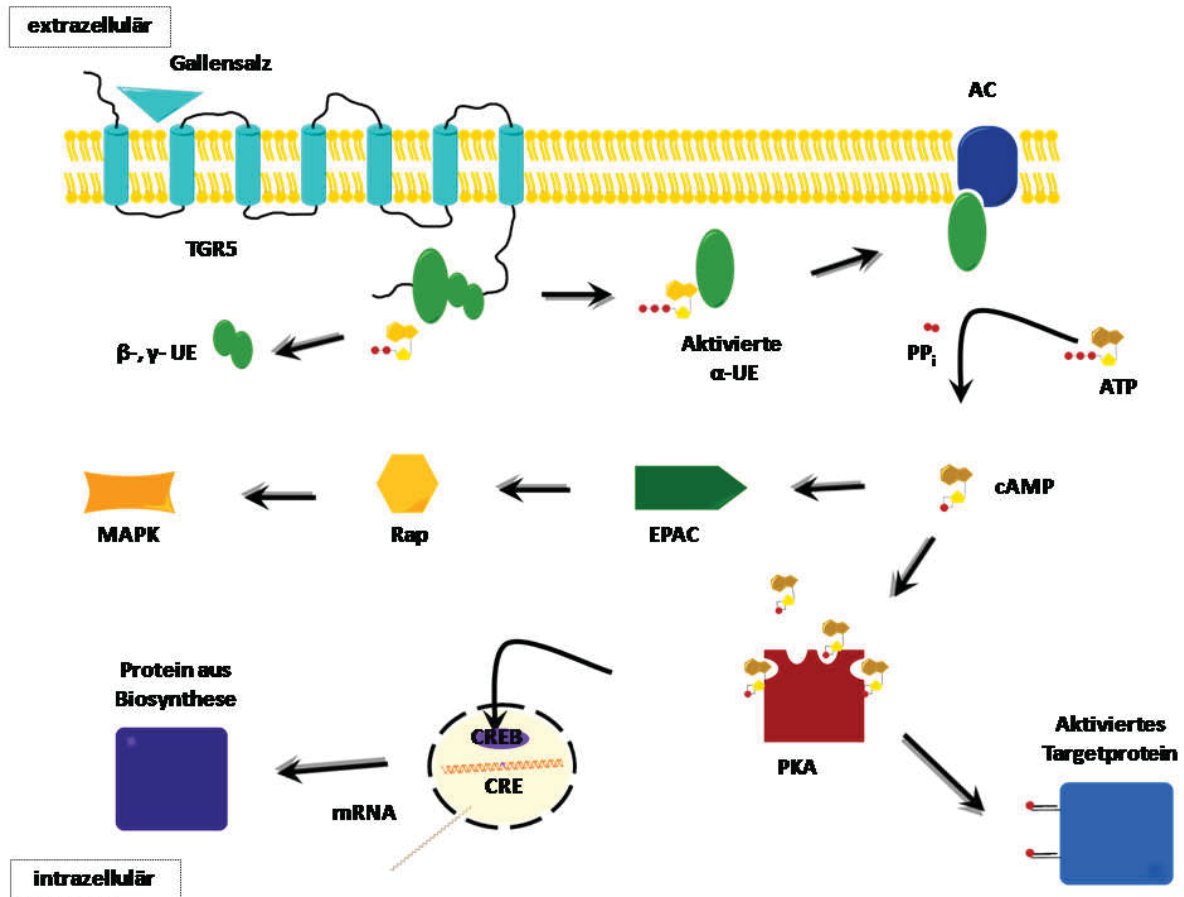


Abbildung 5 - Eine potentielle, vereinfachte Darstellung der TGR5-Signalkaskade

Die Abbildung zeigt schematisch die potentielle Signalkaskade des TGR5-Rezeptors. Die Bindung von Liganden führt zu einer Aktivierung des GS-Rezeptors. Durch eine Konformationsänderung des G-Proteins geht dieses in einen aktiven Zustand über und stimuliert die AC zur Bildung von cAMP. Dieses beeinflusst intrazellulär als *second messenger* verschiedene Signalwege. Eine cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt zur Phosphorylierung und direkten Aktivierung von Zielproteinen. Durch Beeinflussung der Transkription reguliert cAMP darüber hinaus die Expression des Targetproteins. Des Weiteren werden *exchange proteins activated by cAMP* (EPAC) reguliert, welche mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalwege modulieren. Modifiziert nach [7, 26, 136, 145, 155, 196–198].

cAMP leitet als *second messenger* darauf folgend die Signale intrazellulär auf verschiedenen Wegen weiter. Unter anderem können durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) Zielproteine durch Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten direkt aktiviert werden. Auch indirekt kann die Expression des Zielproteins durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Die PKA transloziert hierzu in den Nukleus,

1. EINLEITUNG

bindet an das *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) und phosphoryliert dieses. Der Transkriptionsfaktor interagiert daraufhin mit den *cAMP-response elements* (CRE) der DNA und steigert die Transkription des jeweiligen Zielproteins [136, 197, 199, 200]. Daneben existieren auch PKA-unabhängige Wege durch Vermittlung der *exchange proteins activated by cAMP* (EPAC) [200, 201]. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von cAMP-bindenden Molekülen, den *cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors* (cAMPGEFs), welche nach Bindung die kleine GTPase Rap aus der Ras-Familie, die wiederum zahlreiche MAP-Kinase- oder Phospholipase C-vermittelte Signalwege induziert, aktivieren [198].

Es bleibt jedoch Inhalt weiterer Forschung inwieweit der beschriebene Signalweg auch auf TGR5 zutrifft. Neuere Studien haben schließlich gezeigt, dass weitere Signalwege durch TGR5 aktiviert werden können: So interagiert der Rezeptor zwar primär mit einem stimulatorischen G_s-Protein, es konnte jedoch auch eine Inhibition der AC durch Kopplung an ein G_i-Protein und eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) durch Kopplung an ein G_q-Protein beschrieben werden [202–204]. Auch sind das *Signaling* und das *Trafficking* des Rezeptors noch weitgehend unverstanden. Beschrieben wurde bereits, dass die Internalisierung und Regulation der TGR5-Rezeptordichte in der PM nicht den für die Klasse A der GPCR üblichen Mechanismen unterliegt [143, 205]. Das *Signaling* vieler GPCR wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, welche sowohl die Interaktion mit dem G-Protein, als auch das *Trafficking* des Rezeptors aus dem Zellinneren zur PM und zurück steuern. β -Arrestine können die Endozytose von Rezeptoren und deren Interaktion mit G-Proteinen beeinflussen und auf diese Weise die Signaltransduktion regulieren [163]. Jensen et al. wiesen allerdings nach, dass der TGR5-Rezeptor nicht mit β -Arrestinen interagiert und durch Endozytose reguliert wird. Es wurde jedoch eine Umverteilung von Rezeptoren innerhalb der PM und eine Interaktion mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) beobachtet. Auch zeigte die cAMP-Synthese nach Stimulation durch GS keine Tachyphylaxie oder Desensibilisierung, wie sie bei vielen anderen GPCR nachgewiesen wurde [201].

Im hepatobiliären System und im GIT konnten bisher die meisten Erkenntnisse über die Verteilung und Funktionen des Rezeptors gewonnen werden [156]. In den nachfolgenden Abschnitten soll ein kurzer Überblick über die pleiotropen Wirkungen des GS-Rezeptors

1. EINLEITUNG

gegeben und diese Effekte anschließend vor dem Hintergrund der Pathogenese häufiger Erkrankungen erörtert werden.

1.2.2 TGR5 reguliert den Gallensalz-, den Energie- & den Glukosehaushalt

GS ist es möglich je nach aktueller Stoffwechselsituation ihre eigene Biosynthese zu stimulieren oder zu inhibieren. Diese Regulation unterliegt nicht nur wie bereits angesprochen den nukleären Rezeptoren [31], sondern über einen bis dato unbekannten negativen Feedbackmechanismus auch dem plasmamembran-gebundenen TGR5-Rezeptor [146]. TGR5-WT-Mäuse, die mit einer fettreichen Nahrung gefüttert wurden, zeigten unter experimentellen Bedingungen eine signifikant reduzierte Expression der an der GS-Homöostase beteiligten Enzyme, insbesondere des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms CYP7A1 und der zuführenden Transporter NTCP und OATP. Bei TGR5-KO-Mäusen war diese schützende Feedbackregulation nicht beobachtet worden, vielmehr fand sich entgegengesetzt sogar eine vermehrte Enzymexpression [206]. Dieser Sachverhalt wurde durch Maruyama et al. bestätigt. Es konnten jedoch geschlechtsspezifisch unterschiedliche Beobachtungen gemacht werden – lediglich männliche Tiere zeigten die erhöhten Expressionsmuster. Außerdem fand sich bei den KO-Mäusen im Vergleich mit dem WT ein signifikant kleinerer GS-Pool bei unveränderter fäkaler GS-Ausscheidung [207]. Bei weiblichen KO-Mäusen waren die Cholesterin- und Triglyzeridspiegel signifikant verringert, männliche Tiere hingegen zeigten bei hochkalorischer Fütterung eine erhöhte Rate an Lebersteatosen [206]. Geschlechtsspezifische Unterschiede sind beim Menschen noch nicht untersucht worden. Es ist jedoch bekannt, dass die kardiovaskulären Risikofaktoren, wie der *Lifestyle*, die Fettverteilung im Körper, der Energiehaushalt, das Serumlipidprofil und die periphere Insulinresistenz sowie hierausresultierende Spätkomplikationen bei Männern gehäuft zu finden sind [208, 209].

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass der Rezeptor an der Regulation der GS-Homöostase beteiligt ist. Die genauen Regulationsmechanismen eines TGR5-Feedbacks und der Syntheseinhibition sind jedoch noch nicht vollständig geklärt [207, 210–212]. Die männlichen

1. EINLEITUNG

TGR5-KO-Mäuse in der Folgearbeit Maruyamas wiesen wie beschrieben einen veränderten GS-Pool und abweichende Expressionsmustern verschiedener Gene der GS-Homöostase auf. Die weiblichen Tiere zeigten unter gleichen Bedingungen einer *high-fat-diet* eine signifikante Gewichtszunahme, welche sich auf eine Akkumulation von Lipiden zurückführen ließ. Die Arbeitsgruppe interpretierte diese Akkumulation als Folge einer Verringerung des Energieverbrauchs (*energy expenditure*) [207]. Watanabe et al. berichten später, dass GS über einen TGR5-cAMP-Signalweg dieser Gewichtszunahme entgegenwirken können [8]. Die Stimulation des TGR5-Rezeptors erhöhte den mitochondrialen Energieverbrauch in braunem Fettgewebe und in der quergestreiften Muskulatur, verbesserte die Insulinsensitivität und die Glukoseverwertung in der Peripherie und wirkte der Entwicklung einer Adipositas entgegen. Der Anstieg des Energieumsatzes konnte schließlich auf eine Interaktion der GS mit Schilddrüsenhormonen zurückgeführt werden. Diese führten in beiden oben genannten Geweben zur erhöhten Wärmeproduktion, zu einem verstärkten Stoffwechsel von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen sowie zu einem vermehrten Sauerstoffverbrauch [9]. Dieser Effekt beruhte maßgeblich auf einer verstärkten cAMP-abhängigen Expression der Schilddrüsenhormon-aktivierenden Iodthyronindeiodinase Typ 2 (D2, 5'-Deiodinase) [213]. Das Enzym dient der Konversion des aktiven Triiodthyrosin (T3) aus Tetraiodthyrosin (Thyroxin, T4). FT3, ist essentiell für die Entwicklung, das Wachstum und den Metabolismus des Menschen [214]. Synchron zu dieser sich auf der Genebene abspielenden Aktivierung erhöhten GS durch Vermittlung der PKA auch die Aktivität des Enzyms. Die TGR5-vermittelte Konversion der Schilddrüsenhormone steigerte die Thermogenese [8], den Energieverbrauch und verbesserte die Glukoseverwertung [187] und die Gewichtsreduktion (TGR5-Agonisten INT-777, *6 α -ethyl-23(S)-methyl-cholic acid*, S-EMCA) [215].

Neben den durch Schilddrüsenhormone vermittelten antihyperglykämischen Effekten fanden sich weitere antidiabetische Mechanismen, welche durch TGR5 induziert werden. Maruyama et al. beschrieben die Expression von TGR5 auch in enteroendokrinen Zellen des Darmes (*secretin tumor cell-1*, STC-1), jenen neuroendokrinen L-Zellen im Dün- und Dickdarm, welche *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) sezernieren [26, 200, 216]. Das Inkretin verringert die Glukosespiegel im Blut durch Stimulation der Insulinsekretion und Verringerung der Glucagonausschüttung, es verzögert die Magenentleerung, inhibiert die Darmmotilität und steigert das Sättigungsgefühl [217–219]. GS können durch systemische

1. EINLEITUNG

und nicht nur intestinale Aktivierung des TGR5-Rezeptors Calcium- und Phospholipase C-abhängig die Sekretion von GLP-1 ins Blut verstärken und auf diese Weise den Glukosehaushalt regulieren [9, 186, 220, 221]. Die Wirkung von GLP-1 ist im Organismus jedoch zeitlich limitiert. Eine kurze Halbwertszeit resultiert aus der Metabolisierung und Inaktivierung des Hormons durch die Dipeptidylpeptidase IV (DPP4) [222].

Darüber hinaus finden sich direkte Effekte des TGR5-Rezeptors in den Insulin produzierenden Betazellen des Pankreas. Der Rezeptor wird in den endokrinen Langerhans-Pankreasinseln exprimiert und stimuliert dort durch Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels die Insulinsekretion, sowohl bei niedrigen, als auch bei hohen Blutglukosekonzentrationen [176]. Zeitgleich findet sich eine GLP-1-vermittelte β -Zellproliferation zur Reduktion der Blutglukosespiegel [200].

Die antihyperglykämischen Wirkungen der neu entdeckten TGR5-Agonisten stützen beschriebene Beobachtungen [171–178, 181, 186, 187, 189]. So konnten Sato et al. *Oleanolic acid* aus dem Olivenbaum extrahieren/ gewinnen (*Olea europaea*), welches antidiabetische Effekte durch Erhöhung der Glukosetoleranz und Verringerung des Blutglukosespiegels zeigte. Außerdem beeinflusste es den Energiehaushalt und verlangsamte eine Gewichtszunahme von Mäusen unter hochkalorischer Fütterung [165]. Auch der TGR5-Agonist INT-777 erhöhte den Energieumsatz und -verbrauch, reduzierte eine Adipositas und eine hepatische Steatosis und verbesserte die Leberfunktion und die Glukosehomöostase [187, 188].

1.2.3 TGR5 moduliert die Immunfunktion in der Leber & im Gesamtorganismus

Seit Langem ist bekannt, dass GS in höheren Konzentrationen immunsuppressive Effekte besitzen und unter cholestatischen Bedingungen die Phagozytosefunktion von Immunzellen vermindern können [223, 224]. Bereits in der Erstbeschreibung des TGR5-Rezeptors wurde über die immunmodulierende Wirkung berichtet. Kawamata et al. zeigten, dass der Rezeptor in Alveolarmakrophagen exprimiert wurde und dass seine Aktivierung eine Suppression der Phagozytose sowie der Zytokinsynthese hervorrief [136]. Im Rahmen eines

1. EINLEITUNG

Entzündungsgeschehens erhöhen bakterielle Lipopolysaccharide die Synthese von Zytokinen (u.a. Interleukin 1 und 6 sowie TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*)) [225]. In Studien konnte gezeigt werden, dass cAMP, PKA und GS in CD14+ Monozyten des peripheren Blutes die Zytokinproduktion und die Phagozytenaktivität effektiv reduzieren konnten [226–230]. Keitel et al. bestätigten eine TGR5-Beteiligung mit dem Nachweis des Rezeptors in Kupfferzellen, den ortsständigen Makrophagen und Hauptsyntheseort inflammatorischer Zytokine in der Leber [231, 232]. Hier zeigte TGR5 eine signifikant immunsupprimierende Wirkung durch Reduktion der Zytokinproduktion [160]. Des Weiteren konnte eine Beeinflussung der Differenzierung von dendritischen Zellen, den Antigen-präsentierenden Monozyten im Blut, nachgewiesen werden [233]. Die Aktivierung des Rezeptors induzierte eine antiinflammatorische Differenzierung der naiven Immunzellen, welche eine deutlich geringere Menge Zytokine produzierten. Ausdifferenzierte Zellen hingegen blieben unbeeinflusst [233]. Auch die Migration von Makrophagen wurde durch TGR5 verringert [234]. Folgestudien haben schließlich hervorgehoben, dass ein Großteil der beobachteten antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Wirkung auf eine Interaktion mit dem Signalmolekül NF- κ B (*nuclear factor-kappaB*) zurückzuführen war. Der Transkriptionsfaktor reguliert die Immunantwort durch Beeinflussung von Immunzellproliferation und -differenzierung und ist zudem ein wesentlicher Bestandteil von Entzündungsvorgängen [235, 236]. Außerdem ist er an der Entstehung von zahlreichen inflammatorischen, immunologischen, neoplastischen und Stoffwechselerkrankungen beteiligt [237–240]. In Makrophagen wurde nachgewiesen, dass die Zytokin- und Chemokinproduktion durch NF- κ B reguliert wurde [241, 242]. Die TGR5-Aktivierung führte cAMP-vermittelt zu einer verringerten Aktivität, einer reduzierten DNA-Bindungsaktivität und zu einer reduzierten Transkriptionsaktivität des NF- κ B-Transkriptionsfaktors [215, 243]. Diese Wirkung blieb bei einer TGR5-Defizienz aus. TGR5-KO-Mäuse zeigten eine deutliche Beeinträchtigung dieser antiinflammatorischen, immunsupprimierenden und protektiven Effekte. Der Rezeptorverlust führte zu einer verminderten Leberregeneration und zu einer gesteigerten histologisch nachweisbaren LPS-induzierten Inflammation mit ausgeprägten Lebernekrosen durch Akkumulation hydrophober GS [243–246]. TGR5-Agonisten-Studien bestätigten diese immunsuppressiven Effekte auf myeloische Zellen [247].

1.2.4 TGR5 in der Gallenblase & den Gallenwegen

Auch in den Epithelien der Gallenblase sowie der intra- und extrahepatischen Gallenwege wird TGR5 exprimiert [6, 136, 159, 162, 248]. Im biliären System zeigt TGR5 sowohl eine Beeinflussung sekretorischer, als auch proliferativer Mechanismen. Bei hochkalorisch und cholesterinreich gefütterten *TGR5*-KO-Mäusen konnten Vassileva et al. keine Gallensteinbildung und Gallengangshyperplasien nachweisen [206]. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass der Rezeptor auch in der Gallenblase exprimiert und eine veränderte TGR5-Expression mit pathologisch steintragenden Gallenblasen assoziiert sein müsste. Keitel et al. beschrieben auch eine signifikant höhere TGR5-mRNA Menge in Gallenstein-Gallenblasen, konnten allerdings keinen Unterschied in der Proteinmenge des Rezeptors feststellen [159, 248]. Immunhistochemisch konnte eine Ko-Lokalisation des TGR5-Rezeptors und des CFTR-Kanals (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) in der apikalen Membran der Gallenblasenepithelien dargestellt werden [249]. TGR5 aktivierte diesen Chloridkanal [250] und führte zu einer gesteigerten Sekretion von Chloridionen in das Gallenblasenlumen [6, 159]. Außerdem bewirkte er eine Relaxation der glatten Muskulatur und begünstigte auf diese Weise neben der Gallenbildung und Chloridsekretion die Gallenblasenfüllung [251]. Über eine Interaktion der PKA mit Kaliumkanälen wurde der intrazelluläre Calciumspiegel gesenkt, die Zellmembran hyperpolarisiert und die Kontraktilität der Muskulatur verringert – ein Effekt, der bei TGR5-KO-Mäusen nicht zu beobachten war [252].

Nicht nur in den Epithelien der Gallenblase, sondern auch in den Cholangiozyten der Gallengänge, die die primäre Galle durch Absorptions- und Sekretionsprozesse modifizieren, konnte TGR5 nachgewiesen werden [57]. In der PM, in der Kernmembran als Bestandteil des ER, in subapikalen Kompartimenten und im primären Zilium war der Rezeptor lokalisiert [162, 204, 248]. Das Zilium ist ein sensorisches Zellorganell, welches in das Gallengangslumen hineinreicht und dort den Gallenfluss, die -zusammensetzung und die -osmolarität detektiert und diese Information über cAMP-abhängige Signalwege nach intrazellulär transduziert [253–257]. Die Expression des Rezeptors im Zilium war entscheidend für die Funktion der Zelle [204, 258].

1. EINLEITUNG

Neben der Stimulation der Flüssigkeitssekretion [58] führen GS auch zu einer Cholangiozytenproliferation [259]. Bei TGR5-KO-Mäusen proliferierten die Cholangiozyten signifikant geringer [6]. Masyuk et al. spezifizierten diese Beobachtung und postulierten, dass der Rezeptor sowohl proliferative als auch hemmende Einflüsse zeige. Die gegensätzlichen Effekte werden in Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation des Rezeptors im Zilium oder der Plasmamembran reguliert [204].

1.2.5 TGR5 im Nervensystem

Auch in Geweben und Zellen des Nervensystems, welche unter physiologischen Bedingungen nur sehr geringen GS-Konzentrationen ausgesetzt sind, wurde der Rezeptor gefunden. Keitel et al. konnten die von Kawamata und Maruyama beschriebene Expression des Rezeptors im Gehirn spezifizieren und TGR5 in Neuronen und Astrozyten nachweisen [26, 136, 161]. Die Arbeitsgruppe postulierte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Cholesteringrundgerüsts eine Verwandtschaft von GS und Neurosteroiden [260, 261]. Neurotransmitter werden im Gehirn synthetisiert und sind an der Gehirnentwicklung und der Vermittlung von Angst, Stress, Depression und unter anderem an den Erkrankungen Epilepsie und M. Alzheimer beteiligt [262]. Keitel et al. konnten nachweisen, dass sie zu einer Aktivierung des TGR5-Rezeptors führten. Sie erhöhten cAMP-abhängig die intrazelluläre Calciumkonzentration und die Synthese von ROS (reaktive Sauerstoffspezies/-radikale). Bei Patienten, die an einer Leberzirrhose und einer hepatischen Enzephalopathie erkrankt waren, fand sich eine verminderte mRNA- und Proteinkonzentration des Rezeptors [161]. Es wurde schließlich die These aufgestellt, dass diese *TGR5-Downregulation* als Desensibilisierungsmechanismus zum Schutz vor oxidativem Stress und zur Reduktion der Neuroinflammation verstanden werden könnte [161, 263].

Nicht nur im Gehirn, sondern auch in weiteren Anteilen des Zentralnervensystems, in Nervenfasern der Spinalganglien und des Rückenmarks konnte der Rezeptor nachgewiesen werden [264]. In sensorischen Nervenfasern führte TGR5 zu einer vermehrten Neuropeptidtransmitterausschüttung und zu einer neuronalen Hyperexzitabilität. Die TGR5-

1. EINLEITUNG

vermittelte Aktivierung von TRPA1 (*transient receptor potential ankyrin 1*), der PKC und Calcium-Ionenkanälen wurde als Hauptmechanismus des GS-induzierten Juckreizes identifiziert. Ein durch die Nervenzellen vermittelter Pruritus und eine abdominelle Analgesie konnten bei TGR5-KO-Mäusen bestätigend nicht nachgewiesen werden [264, 265].

Neben dem Nachweis im Zentralnervensystem gibt es auch erste Hinweise für eine Genexpression im peripheren Nervensystem:

1.2.6 TGR5 reguliert die Motilität des GIT

Die Identifizierung des Rezeptors im Darm wurde bereits von Kawamata et al. in der Erstbeschreibung dargelegt [136]. Neben der Expression in den neuroendokrinen L-Zellen des Darmes konnte der Rezeptor auch im enterischen Nervensystem, in den inhibitorischen Ganglien und Motoneuronen des myenterischen (Auerbach) und submucosalen Plexus (Meißner), nachgewiesen werden [266, 267]. Poole et al. beobachteten hemmende Einflüsse des Rezeptors auf die Darmmotilität [266]. In der Literatur wird die Frage nach der Auswirkung von GS auf die Motilität des Darmes allerdings kontrovers diskutiert. Es finden sich Studien, welche einen stimulatorischen [268] als auch einen inhibitorischen Effekt von GS darlegen [269, 270]. Darüber hinaus existieren auch Beobachtungen ohne Nachweis einer Motilitätsveränderung [271]. Nach der Arbeit von Poole et al. inhibierte der Rezeptor spontane Muskelkontraktionen und verlangsamte auf diese Weise den Nahrungstransit im Dünndarm [266, 272]. Die genauen Mechanismen dieser supprimierenden Effekte sind bislang noch nicht ausreichend geklärt. Es wird vermutet, dass aufgrund einer Ko-Lokalisation der NO-Synthase (NOS) neben neurogenen Einflüssen auch vasoaktives Stickstoffmonoxid (NO) für die Verlangsamung der Nahrungspassage ursächlich sein könnte [273]. Zugleich ist erwiesen, dass GS auch muskarinerge Rezeptoren zu binden vermögen [274], obschon die inhibitorische Wirkung im GIT nicht durch Atropin blockiert werden konnte [266]. Einen weiteren potentiellen Mechanismus könnte das Inkretin GLP-1 darstellen, welches seine motilitätshemmenden Effekte nach TGR5-vermittelter Sezernierung aus den L-Zellen hervorruft [275]. Es scheint, dass GS durch die Aktivierung des

1. EINLEITUNG

TGR5-Rezeptors zur so genannten *ileal brake* [270] beitragen, indem sie die Passage der Nahrung verlangsamen, um die vollständige Digestion und Absorption zu ermöglichen [276]. Auch in der glatten Muskulatur des Magens fanden sich relaxierende und die Motilität reduzierende durch cAMP-PKA- und cAMP-EPAC-Rap-Signalwege vermittelte Effekte. Beide führten zu einer Phosphorylierung des monomeren G-Proteins RhoA mit konsekutiver Inaktivierung des Rho-Kinase-Signalweges, welcher die Kontraktilität der Muskulatur regulierte [277].

Neben diesen motilitätsverlangsamenden Effekten im Dünndarm fanden sich jedoch auch stimulatorische Wirkungen des TGR5-Rezeptors, allerdings im Dickdarm. Desoxycholat, als eines der Hauptgallensalze im Colon, aktivierte den TGR5-Rezeptor und beschleunigte die Peristaltik [266, 278, 279].

1.3 TGR5 bei hepatobiliären, intestinalen und metabolischen Erkrankungen

Viele hepatobiliäre und gastrointestinale Erkrankungen gehen mit einer erhöhten GS-Konzentration einher [163]. Eine Fehlfunktion, im Sinne eines vollständigen Funktionsverlustes (*loss of function*) oder einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors (*gain of function*), könnte unter diesen Gesichtspunkten große Auswirkungen haben. Im Folgenden soll unter Berücksichtigung der dargelegten ubiquitären Expression und pleiotropen Wirkungen des TGR5-Rezeptors eine potentielle Beteiligung an der Pathogenese zahlreicher hepatobiliärer, gastrointestinaler und endokrinologischer Erkrankungen umrissen werden, welche schließlich zur Fragestellung der vorliegenden Arbeit geführt hat [280]:

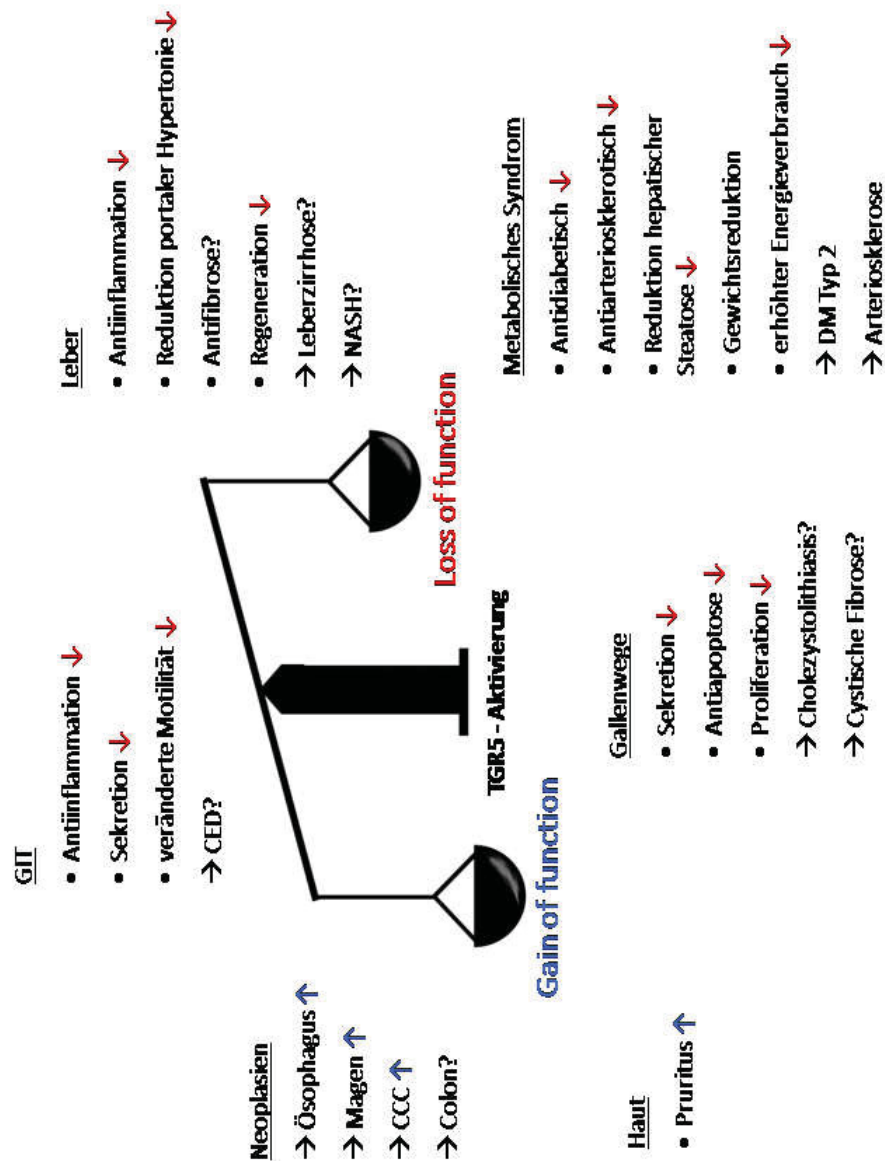


Abbildung 6 - Die Auswirkungen bei Loss/Gain of function

Die Abbildung gibt einen Überblick über die wichtigsten TGR5-Funktionen und die Auswirkungen bei *loss* oder *gain of function* hervorgerufen durch genetische Veränderungen des TGR5-Rezeptors. Potentielle Erkrankungen, an welchen der Rezeptor beteiligt sein könnte, werden im Folgenden beschrieben. Modifiziert nach [6, 7, 7–9, 26, 136, 146, 159–161, 163, 186, 187, 192, 194, 202–204, 206, 212, 215, 220, 233, 243, 251, 252, 264–267, 272, 275, 278, 280–291]

1.3.1 Cholangiopathien & Mukoviszidose

Die PSC ist eine chronisch, sklerosierende Entzündung der großen intra- und extrahepatischen Gallenwege. Die Erkrankung ist ein ernsthafter Risikofaktor für die Entstehung der CU, des CCC und HCC sowie des Gallenblasen- und colorektalen Karzinoms [292–294]. Im Vergleich zur PSC ist die PBC hingegen eine chronische, nichteitrigte Entzündung, welche mit einer Destruktion der kleinen intrahepatischen Gallenwege einhergeht. Beide Erkrankungen sind dem Formenkreis der Autoimmunerkrankungen zuzurechnen [295–298]. Der TGR5-Rezeptor wird in den Cholangiozyten der intra- und extrahepatischen Gallenwege exprimiert und reguliert dort die Gallensekretion und -modifikation durch Beeinflussung von Resorptions- und Sekretionsvorgängen [162]. Außerdem spielt er eine Rolle bei der Proliferation von Cholangiozyten [204, 248, 259, 299] und verringert die Aktivität von Immunzellen in der Leber sowie im peripheren Blut [136, 160, 235–240]. Die Aktivierung des TGR5-Rezeptors durch GS führte cAMP-abhängig zu einer verringerten NF-κB-Aktivität in Makrophagen [215, 243]. Neben dieser immunsuppressiven Wirkung besitzt der Rezeptor protektive, antiapoptotische Funktionen zum Schutz vor GS-induziertem Zellschaden [72, 300] durch Interaktion mit dem CD-95-Rezeptor [299, 301]. Die protektiven Eigenschaften könnten auch der Grund dafür sein, dass eine vermehrte Expression des Rezeptors in Ratten mit obstruktivem Ikterus nachgewiesen wurde [160, 302]. Diverse hepatobiliäre Erkrankungen führen zu erhöhten GS-Konzentrationen, welche durch die schützende Wirkung des TGR5-Rezeptors weniger toxische Wirkungen entfachen können [163]. Alpini et al. zeigten in ihrer Studie an Nagetieren, dass GS nicht nur die Apoptose, sondern auch die Proliferation von Cholangiozyten beeinflussen konnten [259]. Diese Beobachtungen wurden durch Reich et al. spezifiziert. Die Aktivierung des TGR5-Rezeptors führte zur Cholangiozytenproliferation und zu zytoprotektiven, antiapoptotischen Effekten durch Internalisierung des CD95-Rezeptors [299].

Cholangiozyten sind sehr hohen GS-Konzentrationen ausgesetzt [303]. Die Micellenbildung mit Phospholipiden und die Bikarbonatsekretion zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes schützt Cholangiozyten ebenfalls vor der Toxizität von GS [304]. An der Bikarbonatsekretion ist neben dem Chlorid-Bikarbonat-Austauschtransporter auch der *cystic fibrosis*

1. EINLEITUNG

transmembrane conductance regulator (CFTR) beteiligt. Dieser cAMP-abhängige Chloridkanal, der in der Pathogenese der Mukoviszidose/ Cystischen Fibrose (CF) eine maßgebliche Rolle spielt [249, 305–308], ist mit dem TGR5-Rezeptor in der Gallenblase kolo- lokalisiert [159]. TGR5 reguliert in der Gallenblase die Sekretion von Flüssigkeiten und Elektrolyten und wird auch in Cholangiozyten exprimiert [162, 254]. Über den Chlorid- Bikarbonat-Austauscher könnte TGR5 folglich auch auf die Bikarbonatfreisetzung Einfluss nehmen. Entsprechend führt die Stimulation von TGR5 zur Sekretion einer bikarbonatreichen Galle und fördert den Gallefluss [251]. Eine Fehlfunktion oder Defizienz des GS-Rezeptors würde zu einer beeinträchtigten Bikarbonatsekretion führen, wie sie bei der Mukoviszidose und bei Cholangiopathien zu finden ist. Im Rahmen von Cholangiopathien und cholestatischen Lebererkrankungen führen erhöhte GS-Konzentrationen zu Pruritus und einem veränderten Schmerzempfinden (abdominelle Analgesie). TGR5 konnte in den entsprechenden sensorischen Neuronen und Ganglien sowie in dermalen Makrophagen nachgewiesen werden. Bei TGR5-Defizienz blieb die vermehrte neuronale Exzitabilität und Neuropeptidausschüttung aus [264, 265]. Erstaunlich ist jedoch die Tatsache, dass bei ABCB4 (MDR2) KO-Mäusen, welche als Tiermodell für die PSC dienen, selektive TGR5-Agonisten (INT-777) nicht zu einer Verbesserung der Inflammation und Fibrosierung führen, wohingegen bei dualen FXR-TGR5-Agonisten (INT-767) antiinflammatorische Effekte zu beobachten sind [192, 281].

1.3.2 Leberzirrhose

Die beschriebenen antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Wirkungen des TGR5-Rezeptors dienen auch in der Leber der Protektion. Eine Verbesserung des histologischen Bildes einer NASH konnte nach Behandlung mit dem dualen FXR-TGR5-Agonisten INT-767 erzielt werden [193]. Eine Fehlfunktion des Rezeptors könnte diesbezüglich mit der Entstehung oder der Progression von Leberentzündungen, hervorgerufen durch multiple Trigger wie Autoimmunvorgänge, toxische Lebermetabolite oder Hepatitis-Viren, assoziiert sein. Neben dem chronischen Alkoholabusus stellen die viralen Hepatitiden, insbesondere die chronisch aktiven Hepatitiden B und C, zudem die

1. EINLEITUNG

wichtigste und häufigste Ursache für die Entstehung einer Leberzirrhose dar [309–311]. Die Zerstörung des Parenchymgerüsts, Fibrosierung und Entzündungsreaktion werden in geringer Inzidenz auch durch Autoimmunprozesse wie die AIH, die PBC und die PSC hervorgerufen [312]. Der Funktionsverlust der Leber führt zu einer verminderten Synthese- und Entgiftungsfunktion mit dem konsekutiven Anstieg von toxischen Metaboliten aus dem GIT [313]. Insbesondere das Ammoniak führt zum neuropsychiatrischen Syndrom der hepatischen Enzephalopathie mit zerebralem Ödem, Astrozytenschwellung und RNA- und Proteinmodifikationen aufgrund von oxidativem Stress [314, 315]. Eine mögliche Beteiligung von TGR5 an der Entstehung der HE wurde im Kapitel 1.2.5 bereits beschrieben [161, 263].

Des Weiteren ist der Rezeptor in Sinusendothelzellen lokalisiert, dem Hauptsyntheseort für Stickstoffmonoxid in der Leber [316]. Über einen TGR5-cAMP-PKA-Signalweg erfolgt eine Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten der endothelialen NO-Synthase (eNOS) mit darauf folgend erhöhter Stickstoffmonoxidsynthese [300, 317, 318]. Dieses reguliert die hepatische Mikrozirkulation und wirkt protektiv gegenüber Zellschäden, hervorgerufen durch oxidativen Stress und Lipidperoxidation [317–321]. Einhergehend findet sich bei Patienten mit einer Leberzirrhose eine Überexpression der NO-Synthasen als Zeichen eines Schutzes vor portaler Hypertension [163]. Eine antiapoptotische Wirkung des TGR5-Rezeptors wird durch Phosphorylierung und Inaktivierung der CD95-Rezeptors (FAS-R) und von NADPH-Oxidasen und des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), als Verstärker der einer Apoptose, ermöglicht [300, 301, 322–325].

1.3.3 CED & Gallensalzverlustsyndrom

Von der Physiologie abweichende GS-Konzentrationen im Darm, hervorgerufen durch eine Erkrankung, iatrogen durch eine Operation oder durch eine medikamentöse Therapie beispielsweise mit Anionenaustauscharzen, führen zu Motilitätsveränderungen [278]. Auch im GIT finden sich zahlreiche, konzentrationsabhängige GS-Effekte [11]. So beeinflussen GS sowohl das Zellwachstum, als auch den –untergang [326, 327] und modulieren Sekretions- und Absorptionsprozesse von Elektrolyten und Flüssigkeiten [328]. Außerdem erhöhen sie

1. EINLEITUNG

die Schleimproduktion [329], verändern die Permeabilität der Mucosabarriere [330] und wirken aktivitätsmodulierend auf mucosale Immunzellen [331]. Im Colon inhibieren sie die Absorption und verstärken die Sekretion [332, 333]. GS hemmen peristaltische Bewegungen des Dünndarmes durch Beeinflussung des *migrating motor complex* (MMC) [334] und verlangsamen den Transit (*ileal brake*) [270]. Außerdem ist bekannt, dass das Peptidhormon GLP-1 die Motilität inhibiert [218, 219, 335, 336]. Dieses Inkretin wird TGR5-vermittelt intestinal sezerniert und verlangsamt die Magenentleerung [217, 220]. Auch die Expression von TGR5 in inhibitorischen myenterischen Neuronen verdeutlicht die Beteiligung an der Darmmotilität [266]. Fast alle myenterischen Neurone (>80%) exprimieren die Stickstoffmonoxid-Synthase und den TGR5-Rezeptor [272]. Neben den inhibitorischen Effekten im Dünndarm finden sich jedoch auch Peristaltik-verstärkende GS-Wirkungen im Colon, die auf eine Aktivierung des TGR5-Rezeptors durch Desoxycholat zurückgeführt werden könnten [278]. Das sekundäre GS Desoxycholat ist ein potenter TGR5-Agonist [266] und eines der vorherrschenden GS im Dickdarm [279]. Es entsteht im Darm durch bakterielle Dekonjugation, so dass die bakterielle Flora, die selbst dynamischen Veränderungen unterworfen ist, Einfluss auf die Konzentration des GS nimmt [97, 337–341]. Ein bakterieller Überwuchs im Darmlumen erhöht die Konzentration sekundärer GS [342], so dass eine veränderte mikrobielle Flora auch an der Pathogenese von Darmerkrankungen beteiligt sein könnte [343, 344]. Eine veränderte TGR5-Funktion könnte somit Auswirkungen auf den Transit und die Defäkation haben und zu Verdauungsstörungen führen [278]. Darüber hinaus finden sich weitere Hinweise auf eine TGR5-Beteiligung bei CED [81]. TGR5 inhibierte die Zytokinproduktion der an der Schleimhautentzündung beteiligten Makrophagen. Gleichzeitig wurde eine erhöhte TGR5-Expression in diesen mononukleären Zellen selbst nachgewiesen [81]. TGR5 konnte im Mausmodell einer Colitis in 90% der Immunzellen in der entzündeten Darmwand nachgewiesen werden. Bei TGR5-KO-Mäusen wurde eine abnormale Morphologie von schleimproduzierenden Zellen und eine veränderte Struktur von *Tight-junctions* nachgewiesen, die zu einer erhöhten Permeabilität und Anfälligkeit für die Entwicklung einer Colitis beitrugen [290].

1.3.4 Gallensteine

Gallensteine gehören zu den häufigsten hepatobiliären Erkrankungen. Bei >70% aller Gallensteine handelt es sich um Ausfällungen des Cholesterins. Eine zunehmende Prävalenz ist im Rahmen des epidemiologischen Wandels und dem zunehmenden Auftreten der Adipositas und des metabolischen Syndroms zu sehen [345, 346]. Gallensteine stellen eine multifaktorielle Erkrankung dar, bei welcher hydrophobe GS und Cholesterin eine pathogenetisch wichtige Rolle spielen [347, 348]. Unter physiologischen Bedingungen wird das Cholesterol in der Gallenblase durch Micellenbildung mit GS und Phospholipiden in Lösung gehalten [345], fällt jedoch bei Übersättigung aus [346, 348]. Neben den üblichen kardiovaskulären Risiken und „Lifestyle-Faktoren“ sind auch Infektionen, Medikamente, Lebererkrankungen und in geringerem Ausmaß genetische Faktoren (*lith-genes*) als weitere Risikofaktoren von Bedeutung [349–352]. Gleichzeitig findet sich bei Gallensteinträgern eine muskuläre Dysfunktion hervorgerufen durch eine beeinträchtigte Kontraktilität der Gallenblasenmuskulatur, eine verzögerte Entleerung und eine verminderte Exkretionsfraktion mit einem erhöhten postprandialen Gallenblasenvolumen [252, 353, 354]. Cholesterineinlagerungen in die Muskulatur führen CKK-abhängig zu einer Hypomotilität mit der Folge einer beeinträchtigten Gallenblasenentleerung und der Ausbildung einer Gallenstase [60, 346, 347, 355, 356]. Auch GS führen zu einer verringerten Kontraktilität der Gallenblasenmuskulatur. Das Ausmaß dieser Inhibition steigt mit zunehmender Hydrophobizität [345, 356, 357]. Keitel et al. fanden in Gallenblasen von Patienten mit Cholezystolithiasis auch eine signifikant erhöhte TGR5-mRNA Menge, jedoch keinen Unterschied in der Proteinmenge [6, 159]. Unter physiologischen Bedingungen reguliert der TGR5-Rezeptor den biliären Fluss und die Füllung der Gallenblase durch eine Relaxation der Gallenblasenwand [251]. Bei TGR5-KO-Mäusen ist dieser Effekt nicht zu beobachten [252]. Unter achtwöchiger hochkalorischer Fütterung konnte bei KO-Mäusen keine Gallensteinbildung beobachtet werden, wohingegen bei 54% des Wildtyps Cholesterinsteine nachgewiesen werden konnten [252].

1.3.5 Neoplasien

Weiterhin besteht Evidenz bezüglich einer Assoziation von GS und der Entstehung von malignen Tumoren, insbesondere des hepatobiliären Systems und des GIT [358–364]. GS könnten als Kokarzinogene oder Promotoren die Tumorgenese erleichtern, aggravieren oder beschleunigen. Neben der Vermittlung durch den FXR-Rezeptor, erscheint auch eine Beteiligung des membranständigen TGR5 wahrscheinlich [70], da GPCR die Inflammation und Karzinogenese fördern können [365]. Es gibt Hinweise darauf, dass TGR5 ein Bindeglied in der Pathogenese von Leber-, Gallengangs-, Ösophagus-, Magen-, Darm- und Endometriumtumoren sein könnte [202, 203, 366, 367]. Hong et al. beschrieben erstmals eine potentielle Beteiligung des Rezeptors an der Entwicklung des ösophagealen Adenokarzinoms [203]. Es ist bereits bekannt, dass GS als Bestandteile des aggressiven Refluats durch Induktion von ROS zur Progression der Metaplasie beitragen können [368–373]. Im distalen Ösophagus folgt einer progressiven Entzündung der Mucosa (GERD) durch chronische Reizung und Schädigung bei etwa 5% der Betroffenen die Barrett-Metaplasie, eine Konversion des physiologischen unverhornten Plattenepithels in ein hochprismatisches muzinöses Epithel des gastralen und intestinalen Typs [374]. Diese Präkanzerose ist ein bedeutsamer Risikofaktor für die Entstehung eines Barrett-Adenokarzinoms des GEJ (Ösophagogastralen Übergangs) [375]. Die Bildung von oxidativem Stress [376], die Aktivierung von *mitogen-activated protein (MAP)*-Kinasen [377, 378], des Transkriptionsfaktors NF- κ B [379] und des Wachstumsfaktorrezeptors EGFR [380] steigern die Zellproliferation und fördern antiapoptotische Prozesse. Eine durch cAMP hervorgerufene Bildung von ROS, insbesondere die Synthese von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch eine erhöhte Expression der NOX5-S (NADPH-Oxidase), wurde in Barrett-Adenokarzinom-Zellen beschrieben [381]. In diesen konnten auch Hong et al. eine erhöhte TGR5-mRNA-Konzentration nachweisen [203].

Ferner wurde eine Beteiligung des TGR5-Rezeptors an der Entstehung von Magenkarzinomen beschrieben [202]. Der Rezeptor konnte von Yasuda et al. in humanen Adenokarzinomzellen des Magens (AGS-Zelllinie) nachgewiesen werden und zeigte eine proliferative und antiapoptotische Wirkung auf die gastrischen Tumorzellen [382].

1. EINLEITUNG

Darüber hinaus scheint TGR5 an der Entwicklung des HCC und CCC beteiligt zu sein. Das CCC geht auf Cholangiozyten zurück und tritt gehäuft bei PSC-Patienten auf [383]. Die Beteiligung von GS, ROS, Wachstumsfaktorrezeptoren (beispielsweise EGFR), MAP-Kinasen, COX-2 und Zytokinen an der Entstehung von CCCs wurde beschrieben [359, 378, 382, 384–387]. Eine chronische Cholestase und eine Entzündungsreaktion sind Wegbereiter der Karzinogenese [286]. Unter Kenntnis der dargestellten TGR5-Funktionen liegt eine Beteiligung an der Tumorentstehung auch im hepatobiliären System nahe [388]. Keitel et al. untersuchten diesbezüglich CCC-Zellen und konnten eine signifikant erhöhte Expression des TGR5-Rezeptors detektieren. An der Tumorentstehung war zudem die durch den CD95-Rezeptor-induzierte Zellapoptose beteiligt [300, 367]. TGR5 zeigte zytoprotektive Effekte in nichtmaligne transformierten Cholangiozyten und schützte die Zellen vor hohen Gallensalzkonzentrationen durch vermehrte Proliferation und Apoptoseresistenz. In Tumorzellen hingegen ermöglichte er auch die Proliferation und förderte antiapoptotische Effekte durch Internalisierung des CD95-Rezeptors [299].

1.3.6 Arteriosklerose, metabolisches Syndrom, DM Typ II & TGR5-Agonisten

Endothelschäden mit konsekutiver Dysfunktion, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und Inflammation sind essentielle Bestandteile der Arterioskleroseentstehung [171, 389]. Eine vermehrte Aufnahme von LDL-Cholesterin in die Gefäßwand (*fatty streaks*) und eine Chemotaxis von Makrophagen führen zur Inflammation mit Schaumzell- und Atherombildung [184, 390, 391]. Diese Makrophagen exprimieren diverse NF- κ B-abhängige Gene, welche in der Pathogenese der Arteriosklerose eine Rolle spielen. Ferreira et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass sich die Schaumzellbildung durch Immunsuppression reduzieren ließ [392]. Die Aktivierung von TGR5 führte durch Inhibition des NF- κ B-Signalweges gleichfalls zu einer Verringerung proinflammatorischer Zytokine, vaskulärer Läsionen und Entzündungsvorgängen innerhalb bestehender Plaques [195, 215]. Die Stimulation von TGR5 erhöhte zudem die Synthese des gefäßprotektiven NO und reduzierte die Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen sowie die LPS- und NF- κ B-vermittelte Adhäsion von Monozyten [393]. Aus klinischer Betrachtungsweise sind dies

1. EINLEITUNG

erste Hinweise für einen präventiven Effekt des Rezeptors auf die Entstehung koronarer Herzerkrankung, cerebrovaskulärer Insuffizienz oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit als wichtigste arteriosklerotische Komplikationen.

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eng mit dem Diabetes Mellitus Typ II assoziiert. Die Erkrankung ist ein weltweites in der Inzidenz und Prävalenz zunehmendes Problem des Gesundheitsfürsorge [184, 288, 394, 395]. Auch der DM Typ II ist eine chronische Erkrankung mit entzündlichem Charakter [396]. Pathophysiologisch handelt es sich um einen relativen Insulinmangel hervorgerufen durch eine multifaktoriell bedingte Insulinresistenz peripherer Organe bei gleichzeitigem progressivem Versiegen der Insulinsekretion in den Betazellen des Pankreas. Die Entstehung ist eng mit der GS-Homöostase verbunden [394]. Glukose und Insulin beeinflussen die GS-Synthese, was dazu führt, dass die Größe und Zusammensetzung des GS-Pools beim Diabetespatienten variiert [397, 398]. Ferner verdeutlicht die antihyperglykämische Wirkung von Anionenaustauschern, wie Colestyramin, die potentielle Rolle von GS bei der Entstehung der Stoffwechselerkrankung [7, 289, 399–401]. Die Wirkung der Anionenaustauscher ist direkt TGR5- und GLP-1-abhängig, in dem sie durch Aktivierung von TGR5 die Expression des GLP-1-Vorläuferproteins steigern. Ein Effekt der bei TGR5-KO-Mäusen ausbleibt [285]. Darüber hinaus führen veränderte Zytokinkonzentrationen, zellulärer Stress und eine beeinträchtigte Funktion des ER über eine gestörte Glukosetoleranz zum DM [402, 403]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist als Bestandteil der diabetischen Entzündungsreaktion persistent aktiviert [237, 404–407]. Die TGR5-Aktivierung könnte auch auf diese Weise die Entstehung und Progression des DM verhindern respektive verlangsamen [215]. Des Weiteren stimuliert die TGR5-abhängige GLP1-Sekretion in pankreatischen Betazellen durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Insulinausschüttung [176, 220]. Neben Metformin als *firstline*-Therapie hat sich die Verwendung von Inkretin/GLP-1-Analoga und DPP4-Inhibitoren als bedeutende, effektiv antihyperglykämisch wirksame Therapie herausgestellt [217, 408–412]. Der TGR5-Rezeptor ist ein weiteres vielversprechendes Target für die Entwicklung neuer Therapiestrategien des DM Typ II sowie auch vielfältiger entzündlicher Erkrankungen [7, 9, 146, 160, 166, 184, 193, 196, 243, 283, 284, 287, 288, 288, 291, 300, 413]. Die zahlreichen Wirkungen des GS-Rezeptors und seiner synthetisierten Agonisten konnten in Tiermodellen beobachtet werden und deuten auf einen Benefit für den Menschen hin [165, 171–178, 186–189, 275]. Da bei

1. EINLEITUNG

Typ II-Diabetikern häufig ein metabolisches Syndrom vorliegt, die Inkretinwirkung reduziert und die Sekretion vermindert ist, könnten TGR5-Agonisten durch Förderung der Sekretion und durch Stimulation des Energieverbrauchs gewichtsreduzierend und den Glukosehaushalt verbessernd wirken [172, 190, 287, 412].

1.4 Die Fragestellung der Dissertation

Der GS-Rezeptor TGR5 wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert und ist als Signalvermittler an zahlreichen Stoffwechsel- und Immunvorgängen beteiligt. Der beschriebene Forschungsstand legt nahe, dass eine Fehlfunktion des TGR5-Rezeptors durch den Wegfall der protektiven antiinflammatorischen und immunmodulierenden Wirkung eine Rolle in der Pathogenese zahlreicher inflammationsassoziiierter, metabolischer und hepatobiliärer Erkrankungen spielen könnte. Veränderungen seiner Expression, Lokalisation und Funktion könnten auf genetischer, epigenetischer oder auf der Proteinebene eine Lebererkrankung mitverursachen oder ihren Verlauf beeinflussen. Auch vice versa könnte eine Lebererkrankung zu diversen Veränderungen der Rezeptorexpression, -Lokalisation oder -Funktion führen. Welche Bedeutung TGR5 an der Entstehung dieser Erkrankungen zukommt, ist noch weitgehend unklar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, ob genetische Veränderungen innerhalb des TGR5-Gens bei Leber- und Gallenwegserkrankungen gehäuft auftreten. Untersucht wurden verschiedene inflammatorische Lebererkrankungen, unter anderem die PBC, die AIH, die ASH, die NASH, die Leberzirrhose und die viralen Hepatitiden. Aufgrund der immunmodulatorischen Funktion und dem beschriebenen Einfluss konjugierter und unkonjugierter GS auf die Entstehung, den Progress und das Therapieansprechen von Hepatitiden soll ein besonderes Augenmerk auf die chronische Hepatitis C gelegt werden. Als Kontrollgruppe werden die TGR5-Gensequenzen Gesunder und weiterer internistischer Patienten der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf analysiert. Identifizierte Mutationen sollen im Anschluss zellbiologisch im Hinblick auf ihre Bedeutung für Lokalisation und Funktion des Rezeptors charakterisiert und mit den klinischen Ausprägungen der Erkrankungen korreliert werden.

2. MATERIALIEN & METHODEN

2.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1 – Verwendete Materialien und Geräte

Folgende Materialien und Geräte fanden unter Berücksichtigung der Herstellerangaben Verwendung:	
DNA-Amplifizierung: <i>illustra GenomiPhi HY DNA Amplification Kit</i> (GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK) <i>PTC-200 Peltier Thermal Cycler</i> (MJ Research, Watertown, MA, USA) <i>Mastercycler</i> (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) PCR : - Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) - Phusion-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) - Nukleotidprimer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) - dNTP Nukleotide (Roche, Mannheim, Deutschland) Gelelektrophorese: 50x TAE-Puffer selbsthergestellt: 242 g/l Tris (hydroxymethyl) aminomethan, 100 ml/l 0.5 M EDTA (pH 8) und 57,1 ml/l Essigsäure 100% - Agarose (Biozym Scientific, Hess, Oldendorf, Deutschland) - Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) <i>Smartladder</i> (Eurogentec, Köln, Deutschland) - Vilber Lourmat (Peqlab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) - Gelelektrophoresekammer, Schablone und Kamm (Peqlab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) DNA-Aufreinigung: <i>QIAquick PCR Purification Kit</i> (Qiagen, Hilden, Deutschland) - Mikrozentrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) Konzentrationsbestimmung: - Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) Plasmide & Vektoren: - pcDNA3.1+ (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; Clontech Palo Alto, USA)) - pEYFP (Clontech, Heidelberg, Deutschland; Clontech Palo Alto, USA)	

2. MATERIALIEN & METHODEN

- Restriktionsendonukleasen Xho I, EcoR I, Bam H I (New England BioLabs, Beverly, MA, USA)
- *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA, USA/ Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Mutageneseprimer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland)
- **Mikrobiologie:**
 - TOP10 E.coli (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
 - XL1-blue (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
 - Mini- und Maxipräparation *QIAprep Spin Miniprep Kit und QIAprep Spin Maxiprep Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- **Zellkultur:**
 - MEM-Medium, *Minimum Essential Medium with Earle's salts with L-Glutamine* (PAA, Pasching, Österreich)
 - FCS fetales Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich)
 - Trypsin-EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
 - PBS mit & ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} (Biochrom, Berlin, Deutschland)
 - Penicillin und Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland; Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
- **Funktionsanalyse:**
 - Dual Luciferase Reporter Assay System Ansatz (Promega, Madison, WI, USA)
 - Plasmuc (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)
 - pRLTK (Promega, Madison, WI, USA)
 - SOC-Medium selbsthergestellt: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, ad 1 L aqua dest., vor Verwendung 10 ml steril-filtriertes $MgCl_2$ (1 M) oder $MgSO_4$ (1 M)
 - LB-Medium selbsthergestellt: 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, ad 1 L aqua dest. 5N NaOH bis pH 7.0
 - LB-Agar aus LB-Medium selbsthergestellt: 20 g/l Agar, 10 ml steril-filtriertes Ampicillin oder Kanamycin (10 mg/ml) (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
 - OptiMEM + Glutamax (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK; Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
 - Lipofectamin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
 - Na-ortho Vanadat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - TLC Tauroolithocholat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - Forskolin (Calbiochem, Schwalbach, Deutschland)
 - DMSO Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - Luminoskan (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

- **Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning Mikroskopie:**

- Methanol (VWR BDM Prolabo chemicals, Fontenay-sous Bois, Frankreich)
- Feuchtkammer mit Whatman-Papier und Parafilm (Bemis flexible packing, Neenah, WI, USA)
- Antikörper:
 - RVLR2 TGR5-AS 298-318[159]
 - *Monoclonal Na⁺/K⁺-ATPase mouse anti-human IgG* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - *Monoclonal PDI mouse anti-human antibody* (Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland)
 - *Polyclonal Fluorescein-(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG-Gesamtmolekül* (Dianova, Hamburg, Deutschland)
 - *Polyclonal Fluorescein-(FITC)-conjugated donkey anti-mouse IgG-Fab2-Fragment* (Dianova, Hamburg, Deutschland)
 - *Cy3 (Indocarbocyanin)-conjugated donkey anti-guinea pig IgG-Fab2-Fragment* (Dianova, Hamburg, Deutschland)
 - Hoechst (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- *Dako Fluorescent Mountig Medium* (Dako, Carpinteria, CA, USA)
- Zeiss LSM 510 META confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)

- **EDV:**

- Medico (Siemens, Deutschland)
- Pubmed BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
- Chromas (Technelysium, South Brisbane, Australien)
- LSM Image Browser (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Microsoft Office 2007 und 2010

2.2 Methoden

2.2.1 Molekulargenetische Methoden

2.2.1.1 DNA Proben

Den Patienten der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden nach Einholung des schriftlichen Einverständnisses im Rahmen der klinischen Diagnostik und Behandlung zusätzlich 4 ml EDTA-Blut zu

2. MATERIALIEN & METHODEN

Forschungszwecken entnommen. Aus diesem Blut wurde die genomische DNA durch Zentrifugation des *Buffy coats* extrahiert, isoliert und durch die Klinik bereitgestellt. Zudem wurde genomische DNA von 593 gesunden Blutspendern der universitären Blutbank durch Prof. Dr. Scharf (Institut für Hämostaseologie Hämotherapie und Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt. Die Verwendung von menschlichen DNA-Proben wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität geprüft und bewilligt (Ethikanträge 2875, 3115 und 3144). Alle Proben dieser Arbeit wurden darauf folgend anonymisiert untersucht. Erst nach Abschluss der Genanalyse und nach Fertigstellung der zellbiologischen Charakterisierung erfolgte eine Zuordnung mit den jeweiligen Patienten und ihren Erkrankungen (Phänotyp).

2.2.1.2 Amplifizierung genomischer DNA

Für die adäquate Durchführung der Gensequenzierung wiesen einige Proben eine zu geringe DNA-Konzentration auf und wurden zur Verbesserung des Ergebnisses mit Hilfe des *illustra GenomiPhi HY DNA Amplification Kits* (GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK) nach Herstellerangaben amplifiziert. Hierzu wurden 2,5 µl des Templates (10 ng) mit 22,5 µl des *Sample Buffers* versetzt, bei 95 °C denaturiert und anschließend bei 4 °C auf Eis gekühlt. Unter Zugabe von 22,5 µl *Reaction Buffer* mit 2,5 µl Phi-DNA-Polymerase-Enzym-Mix banden die *random hexamer primer* unspezifisch an die DNA. Nach 4 h Inkubation bei 30 °C wurden etwa 45 µg DNA amplifiziert. Die *Proofreading-3'-5'*-Exonukleaseaktivität der Polymerase verhinderte während der Replikation Fehlpaarungen der Basen. Schließlich folgte ein zehnminütiger Inaktivierungsschritt der Exonukleaseaktivität bei 65 °C. Zur Durchführung wurden ein *PTC-200 Peltier Thermal Cycler* der Firma MJ Research (Watertown, MA, USA) und ein *Mastercycler gradient* der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet.

2. MATERIALIEN & METHODEN

2.2.1.3 PCR - Polymerase Kettenreaktion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Polymerasekettenreaktion verwendet, um das TGR5-Gen der Patienten-DNA-Proben zur Mutationsanalyse zu vervielfältigen. Die Amplifizierung beinhaltete die zyklische Wiederholung dreier Reaktionsschritte: Die Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen, die spezifische Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an den zu amplifizierenden Genabschnitt (*Annealing*) und schließlich die Synthese (*Elongation*) der doppelsträngigen DNA durch die Taq-Polymerase ausgehend von den flankierenden Primern. Auf diese Weise wurde die DNA der Patientenprobe mit jedem Zyklus verdoppelt und exponentiell vermehrt (2^n , n =Anzahl Zyklen) [414].

Doppelstrangdenaturierung: Zunächst wurden die DNA-Doppelstränge bei 94 °C durch die Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Doppelhelixsträngen zu Einzelsträngen denaturiert. Im ersten Zyklus, der Initialisierung, wurde ein längerer Denaturierungsschritt gewählt, um eine vollständige Trennung der Ausgangs-DNA-Stränge und der Primer zu ermöglichen. Außerdem wurde auf diese Weise die aus thermophilen Bakterien gewonnene hitzeresistente Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) aktiviert [414].

Hybridisierung der Primer (*Annealing*): Der darauf folgende Schritt ermöglichte die spezifische Anlagerung der synthetischen Oligonukleotidprimer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) an die komplementären, flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genabschnitts (*Template*). Die Temperatur des *Annealings* war abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer sowie der Länge des zu amplifizierenden Genabschnitts. Sie konnte unter Zuhilfenahme der Wallace-Regel errechnet werden [414].

Formel 1 – Die Wallace-Regel

$$T \text{ in } ^\circ\text{C} = n \cdot (A + T) \cdot 2 + n \cdot (G + C) \cdot 4$$

Anm. A,C,G,T stellen die vier Basen der DNA dar, n ist die Anzahl der jeweiligen Basen

Für die Amplifizierung wurden nach erfolgreicher Testung folgende Primer in Zusammenarbeit mit Frau Spomer (AG Keitel) entworfen und durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt:

Tabelle 2 - Die Primer der Amplifizierung

	Primer	Sequenz 5'→3' (Bp)	Annealingtemperatur Tm
Exon 1	1rev	TGAGACTCAGGGTCCATTAC (20)	57,3 °C
	1.1for	CTGCAGTTTGGAATATGTCAG (21)	55,9 °C
Exon 2	2rev	TGCCTTAATCCACGCGTAT (19)	54,5 °C
	2.1for	ATGACACTGGAGGACTGAG (19)	56,7 °C

Die Testung der errechneten Temperatur lieferte für das Exon1 bei einer Annealingtemperatur von 54 °C und für das Exon2 bei einer Temperatur von 54,5 °C optimale Ergebnisse.

Elongation: Die Synthese des komplementären DNA-Stranges erfolgte in 5'-3' Richtung. Die Taq-Polymerase katalysierte bei ihrem Temperaturoptimum von 72 °C unter Verwendung der Matrize (Ursprungsstrang) die Kettenverlängerung. Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden unter Abspaltung von Pyrophosphat (PPi) an die freie Hydroxylgruppe des 3'-Endes des Primers gebunden.

2. MATERIALIEN & METHODEN

Schließlich gewährleistete am Ende des letzten Zyklus eine zehnminütige, zusätzliche Inkubation bei 72 °C die Unterbrechung des Zyklus [414].

Neben der Taq-Polymerase wurde initial auch eine Phusion-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Diese konnte mit einer geringeren Fehlerrate ein größeres DNA-Fragment, welches sowohl Exon 1 und 2, als auch das eingeschlossene Intron enthielt, amplifizieren. Die Taq-Polymerase zeigte jedoch im direkten Vergleich bessere Ergebnisse, woraufhin die Verwendung der Phusion verlassen wurde. Allerdings fehlte der Taq-Polymerase im Gegensatz zur Phusion-Polymerase eine 3'5'-Exonucleaseaktivität, welche fehlgepaarte Basen korrigieren konnte. Zur Kompensation dieser „*Proofreading*-Funktion“ und zur effektiven Minimierung dieser Fehler wurden beide Exons diesbezüglich immer in mindestens zwei separaten PCRs getrennt amplifiziert und potentielle Punktmutationen zur Qualitätssicherung mit *forward* und *revers* gerichteten Primern erneut sequenziert und bestätigt [414].

Tabelle 3 - Der PCR-Ansatz

Der Probenansatz beinhaltet:	
GC-Puffer inkl. Farbstoff	5 µl
dNTPs (10mM verdünnt zu 1mM)	1 µl
5'Oligonukleotidprimer	1 µl
3'Oligonukleotidprimer	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
DNA	2 µl (Exon 1)
	3 µl (Exon 2)
DMSO	1 µl
steriles H ₂ O	ad 50 µl
	38,5 µl (Exon 1)
	37,5 µl (Exon 2)

2. MATERIALIEN & METHODEN

Als Negativkontrolle diente ein Kontrollansatz mit 2 beziehungsweise 3 µl H₂O.

Unter den folgenden Standardbedingungen liefen 36 Zyklen der Kettenreaktion (Schritt 2-4) ab:

Tabelle 4 – Die Standardbedingungen der PCR

	Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	3 Min	94 °C
2	Denaturierung	1 Min	94 °C
3	Annealing Exon 1	1 Min	54 °C
	Annealing Exon 2	1 Min	54,5 °C
4	Elongation Exon 1	1 Min	72 °C
	Elongation Exon 2	2 Min	
5	Extension	10 Min	72 °C
6	Abkühlen	∞	4 °C

Zur Überprüfung der Reaktion wurden 5 µl jeder Probe inklusive dem Kontrollansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert.

2.2.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA

Jedes PCR-Produkt und jeder Restriktionsverdau wurden gelelektrophoretisch in 1%igem Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurden 1 g abgewogene Agarose (Biozym Scientific, Hess, Oldendorf, Deutschland) in 100 ml einfach verdünntem TAE-Puffer gelöst, in einer Mikrowelle bei 900 W für 140 Sek aufgekocht, abgekühlt und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt in die vorgesehene Gelschablone gegossen. Nach dem vollständigen Abkühlen und

2. MATERIALIEN & METHODEN

Erstarren des Gels wurde dieses in die Elektrophoresekammer gesetzt, mit zusätzlichem TAE-Puffer beschichtet und 5 µl der aufzutrennenden DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Zugabe eines Farbstoffes war nicht notwendig, da der PCR-Puffer selbst bereits einen roten Farbstoff beinhaltete. Zur Quantifizierung der Fragmentgrößen dienten 5 µl des Längenstandards *Smartladder* (Eurogentec, Köln, Deutschland), der eine Größenzuordnung im Bereich 200-10.000 Bp ermöglichte. Da die Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung trugen, wanderten sie im elektrischen Feld zur Anode. Beim Anlegen einer Spannung von 80-120 V wurden sie der Größe nach aufgetrennt, wobei große DNA-Fragmente (Exon 2) aufgrund der Siebstruktur der Agarose und des größeren Widerstandes eine geringere Laufstrecke zurücklegten als kleine Fragmente (Exon 1). Die elektrophoretische Auftrennung wurde beendet, sobald der Laufpuffer etwa 80-90% des Gels erreicht hatte. Anschließend wurden die DNA-Proben unter Verwendung des Vilber Lourmat (Peqlab Biotechnologies, Erlangen, Deutschland) unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm visualisiert und mit einer Geldokumentation aufgenommen und digital gespeichert. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkalierte mit der DNA und konnte durch die Bestrahlung mit UV-Licht als Bande sichtbar gemacht werden [414].

2.2.1.5 DNA-Aufreinigung

Zur Minimierung störender Einflüsse der PCR-Komponenten in der darauf folgenden Sequenzierung wurden die Amplikons unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kits* gemäß des Herstellerprotokolls (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 220 µl des PB- und 750 µl des ethanolhaltigen PE-Puffers in der Mikrozentrifuge *5415D* der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurde die DNA auf ein *QIAquick spin column* übertragen, um in salzreicher Umgebung und einem pH <7,5 bei 13,0000 rpm auf der Silica-Membran absorbiert zu werden. Der Puffer PB ermöglichte die effiziente Bindung der PCR-DNA bei gleichzeitiger Entfernung der Primer. Andere Kontaminierungen und Rückstände des PCR-Ansatzes wie Puffer, Salze, Farbstoffe, Proteine und Enzyme konnten ohne Bindung die Membran passieren. Daraufhin wurde das *Spin Column* in ein 1,5 ml Eppi überführt und

2. MATERIALIEN & METHODEN

die DNA nach einer einminütigen Inkubation bei RT mit 35 µl sterilem destilliertem Wasser eluiert.

2.2.1.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration und die Reinheit jeder Probe wurden mit Hilfe des *NanoDrop ND-1000 Spectrophometers* von Peqlab Biotechnologies (Erlangen, Deutschland) bestimmt. 1 µl jeder Probe wurde hierzu bei 260 und 280 nm photometrisch gemessen und mit der Referenz aus Aqua dest. verglichen. Aus der Extinktion der Probe bei 260 nm konnte die Konzentration bestimmt werden. Daneben wurde die Extinktion bei 280nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Der Quotient aus OD260/ OD280 erlaubte eine Aussage über die Reinheit der DNA. Das Optimum lag innerhalb des Bereiches von 1,8 bis 2,0. Höhere Werte legten die Vermutung einer Verunreinigung durch RNA nahe, niedrigere Werte wurden durch Proteinkontamination verursacht.

2.2.1.7 Sequenzierung und deren Auswertung

Alle amplifizierten und aufgereinigten Patientenproben wurden durch das *Genomics & Transcriptomics* Labor (GTL) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Köhrer sequenziert.

Analog zu den Primern der Amplifizierung wurden die Primer der Sequenzierung mehrfach getestet und die Ergebnisse ausgewertet. Optimale Bedingungen für die Sequenzauswertung konnte mit folgenden Primern erzielt werden:

2. MATERIALIEN & METHODEN

Tabelle 5 – Die verwendeten Primer der Sequenzierung

Exon	Primer	Sequenz 5'→3' (bp)
Exon 1	1rev	TGAGACTCAGGGTCCATTAC (20)
	1.1for	CTGCAGTTTGAATATGTCTAG (21)
Exon 2	Exon2for	AGCATCTTCCTTCCTCTCAGC (21)
	2.2.rev	TGTGCGCACGACACTTCTT (19)
	2.2for	ACTGAGACCAGGGAATGAC (19)
	3rev	CATGTTCTGCTGATACACAG (19)
	4for	CTGTGGAACCAGAGTCG (17)
	4rev	CATAGACTTCGAGGTACAG (19)
	7for	CTGTGTATCAGCGAACATG (19)
	Exon2rev1	TCCACGCGTATGTCTGTAGG (20)

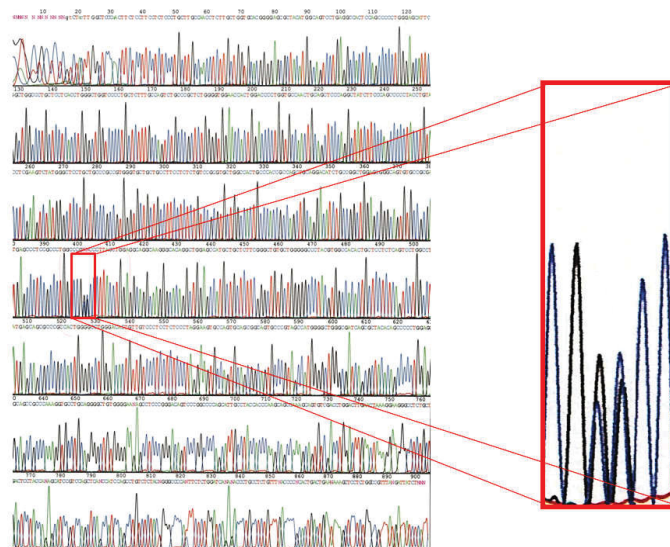


Abbildung 7 - Ein exemplarisches Sequenzierungsergebnis des BMFZ

Die Abbildung zeigt beispielhaft das Sequenzierungsergebnis einer Patientenprobe durch das BMFZ. Es handelt sich in diesem Fall um die Sequenzierung der Mutation p.A217P mit dem Primer TGR5-4for. Die beiden heterozygoten Polymorphismen an den Basen 1516 und 1517 sind in der kleineren Darstellung zu erkennen. Bild entnommen aus Chromas (Technelysium, South Brisbane, Australien).

2. MATERIALIEN & METHODEN

Nichtübereinstimmung durch eine zweite unabhängige PCR mit *revers* und *forward* gerichteten Primern wiederholt. Auf diese Weise wurde der nicht vorhandenen Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase Rechnung getragen, denn jede Punktmutation wurde durch mindestens eine zweite unabhängige PCR bestätigt und ebenfalls mit der Referenz verglichen. Im Anschluss wurde mit Hilfe einer Codesonne überprüft, ob es sich um eine synonyme oder nicht synonyme Mutation handelte. Die Anwendung BlastX wurde daraufhin zur Bestätigung herangezogen und die ermittelte AS-Sequenz der TGR5-Protein-Referenz NP_733800 gegenübergestellt [416].

2.2.1.8 Verwendete Plasmide

Ein Plasmid ist eine ringförmige, extrachromosomale, nicht an der Zellwand adhärente, in Bakterien vorkommende DNA mit der Fähigkeit sich autonom zu replizieren [414]. Für die TGR5-Funktions- und Lokalisationsanalysen wurden im Rahmen der Dissertation die beiden Plasmide pcDNA3.1+ (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und TGR5-pEYFP (Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet [161, 417, 418]. PcDNA3.1+ ist ein 5428 Bp großer Vektor, welcher verschiedene Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen beinhaltet. Xho I und EcoR I wurden für den Kontrollverdau benutzt. Für den nur 4,7 Kb großen pEYFP-Vektor wurden BamH I und ebenfalls EcoR I verwendet (New England BioLabs, Beverly, MA, USA).

Die beiden Plasmide Plasmuc und PRTLK waren Bestandteil des *Dual Luciferase Reporter Assay System* Ansatzes (PRTLK: Promega, Madison, WI, USA & Plasmuc: Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) zur Analyse der Rezeptorfunktion [300].

2.2.1.9 Design der TGR5-Mutanten und Einbringen in vorhandene Konstrukte

Zunächst wurde ein mutagener Oligonukleotidprimer mit der im Rahmen der Sequenzierung gefundenen Punktmutation generiert. Hierbei wurde berücksichtigt, dass die Punktmutation im mittleren Bereich des Mutageneseprimers lokalisiert sein sollte. Gemäß des

2. MATERIALIEN & METHODEN

Herstellerprotokolls wurden Primer der Länge 25-45 Bp mit einer Schmelztemperatur >75 °C verwendet. Zur Berechnung dieser Temperatur T_m wurde folgende Formel hinzugezogen:

Formel 2 – Die Schmelztemperatur des Mutageneseprimers

$$T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{675}{N} - \%mismatch$$

Anm. N entspricht der Primerlänge in Basen, % GC und % mismatch sind ganze Zahlen

Die folgenden sechs Mutageneseprimer sowie die beiden Zusatzprimer 1 und 2 wurden durch die Fa. Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und konnten daraufhin mit Hilfe des *QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kits* (Stratagene, La Jolla, CA, USA/ Agilent Technologies, Santa Clara, USA) in die vorhandenen Plasmide eingebracht werden:

Tabelle 6 – Die entworfenen Mutageneseprimer

Mutation	Primersequenz 5'→3' (Bp)
Glu8Lys	CAACAGCACTGGC A AGGTGCCCAGCCCC (28)
Met112Val	ACGGGGAGCGCTAC G TGGCAGTCCTGAGG (29)
Arg201Trp	GCAGGACATCTGC T GGCTGGAGCGGGCAG (29)
Tyr240Pro	GTGCTGGGGGGCCC G ACGTGGCCACAC (26)
Glu296Arg	AGGGCAGCCGCCC G AAGGTGCCTGCAG (27)
Leu327Pro	CCAAAGCAGTGTGACCC C GGACTTGAAC (28)
Zusatzprimer 1	CCTCATCATCACCGCGAACCTGCTCC (26)
Zusatzprimer 2	CAGCATTGCCTACCAACCAAGCAGCC (26)

2. MATERIALIEN & METHODEN

Zu Beginn der Mutagenese-PCR wurde die Plasmid-DNA zunächst denaturiert. Das *Annealing* der Mutagenese-Primer und die Amplifikation mit der PfuTurbo-DNA-Polymerase führten zur Synthese von mutierten Doppelsträngen. Nach Beendigung der PCR wurde 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I (10 U/µl) in jeden Ansatz pipettiert, für 1 Min zentrifugiert und sofort für 1 Std bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Restriktionsendonuklease Dpn I verdaute die Matrize, so dass nur noch die mutierte DNA vorhanden war, die schließlich in Bakterienzellen transformiert werden konnte.

Tabelle 7 – Der Mutageneseansatz

Mutageneseansatz:	
QuickChange Multi reaction buffer	2,5 µl
Vektor TGR5-pEYFP oder TGR5-pcDNA3.1+	100 ng
Quicksolution	0,5 µl
Mutageneseprimer	100 ng
Zusatzprimer 1 oder 2	100 ng
dNTPs	1 µl
QuickChange Multi enzyme	1 µl
Aqua dest.	ad 25 µl Gesamtvolumen

Unter den folgenden Standardbedingungen liefen 31 Zyklen der Kettenreaktion (nur Schritt 2-4) ab:

Tabelle 8 – Die Standardbedingungen der Mutagenese-PCR

	Arbeitsschritt	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	1 Min	95 °C
2	Denaturierung	1 Min	95 °C
3	Annealing	1 Min	55 °C
4	Elongation/ Synthese	2 Min/Kb Plasmidlänge	65 °C
5	Abkühlen	∞	4 °C

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Bakterienstämme, deren Kultivierung und Transformation

Im Rahmen der Dissertation wurden TOP 10 E.coli (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und XL1-blue Bakterien (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. 25 µl der TOP10 E.coli-Bakterienzellen bzw. 50 µl XL1-blue Bakterienzellen wurden 10 Min auf Eis aufgetaut. Letztere wurden zusätzlich mit 1,7 µl Mercaptoethanol behandelt. Darauf folgend wurden beide Bakterienstämme mit 1,5 µl der DpnI behandelten Plasmid-DNA für 20 Min auf Eis inkubiert und vorsichtig alle 2 Min gemischt. Ein 45 Sek andauernder Hitzeschock im 42 °C warmen Wasserbad ermöglichte die Aufnahme der DNA in die Bakterien. Anschließend wurden diese direkt für 2 Min auf Eis inkubiert, um im nächsten Schritt in 500 µl bei 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium für 1 h bei 37 °C geschüttelt zu werden. Je 100 µl der Bakterien wurden auf vorgewärmten, antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und für 1,5 Std bei 37 °C inkubiert. Die Selektion positiver Klone, d.h. Bakterienzellen mit aufgenommenem Plasmid, erfolgte durch den Antibiotikazusatz, welcher das Wachstum anderer nicht ampicillin- oder kanamycinresistenter Bakterien verhinderte. Da der pEYFP Vektor ein Kanamycinresistenzgen und das pcDNA3.1+ Plasmid ein Ampicillinresistenzgen aufwies, konnten auf den Agarplatten nur solche Bakterien wachsen, welche das Vektorkonstrukt aufgenommen hatten und die nötigen Antibiotika-neutralisierenden Enzyme exprimieren konnten.

2. MATERIALIEN & METHODEN

2.2.2.2 Plasmidpräparation

Zur Untersuchung der transformierten Bakterien und zur Gewinnung der Plasmide Plasmuc und PRLTK für den Luciferase-Assay erfolgte die Isolierung von zunächst geringen Plasmidmengen nach den Herstellerangaben mit dem DNA-Extraktions-Kits *QIAprep Spin Miniprep* von Qiagen (Hilden, Deutschland).

Eine Kolonie der selektionierten Bakterien, die auf dem antibiotikahaltigen Nährboden wachsen konnte, wurde mit einer Pipettenspitze gepickt und in 5 ml Luria-Bertani- (LB) Medium, versetzt mit 5 µl Ampicilin bzw. Kanamycin (Verdünnung 1/1000), über Nacht bei 37 °C und 200 U/min schüttelnd inkubiert.

Nach 12-16 Std Wachstum wurden die Bakterien durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm (~17,900 x g) in Form eines präzipitierten Pellets geerntet und der Überstand verworfen. Ein kleiner verbleibender Anteil der Bakteriensuspension wurde bei 4 °C gelagert, um später im Rahmen einer zweiten Übernachtskultur für die Maxipräparation verwendet zu werden. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das Pellet mit 250 µl des RNase A (100 µg/ml) und LyseBlue-Reagenz (1/1000) haltigen Puffers P1 resuspendiert, 250 µl des Zelllysepuffers P2 hinzugesetzt und das Eppi 4-6x invertiert bis ein Farbumschlag des Indikators *LyseBlue* nach blau sichtbar war. Das in Puffer P2 enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) löste die Zellwand auf, so dass Zellinhaltsstoffe austreten konnten, während Natriumhydroxid (NaOH) unter alkalischen Bedingungen chromosomale und Plasmid-DNA ebenso wie Proteine denaturierte. Im darauf folgenden Schritt wurden 350 µl des kaliumacetathaltigen Neutralisationspuffers N3 hinzugegeben und das Acetat durch Invertieren gefällt - erkennbar an dem Farbumschlag in farblos. Puffer N3 neutralisierte das Lysat und schaffte eine salzreiche Umgebung, die das SDS, Zellbestandteile und genomische DNA zu präzipitieren vermochte. Die Plasmid-DNA blieb in Lösung und konnte später an eine Silicamembran binden. Eine Zentrifugation für 10 Min bei RT und 13000 rpm mit einer Tischzentrifuge separierte die präzipitierten Zelltrümmer. Der plasmidhaltige Überstand wurde dann in ein *QIAprep Spin Column* überführt und die Anionen-Austauscher-Säule (Silicamembran) mit plasmidhaltigem Überstand beladen. Lediglich DNA, jedoch nicht Verunreinigungen durch Zellmetabolite, Zellbestandteile oder RNA wurden aufgrund ihrer

2. MATERIALIEN & METHODEN

Ladung auf dem Gel der Säule absorbiert und konnte nach der Zentrifugation in zwei aufeinander folgenden Waschschritten mit 500 µl des Puffers PB und 750 µl des 70% ethanolhaltigen Waschpuffers PE aufgereinigt werden. Puffer PB entfernte effizient in den Bakterienzellen enthaltene Endonukleasen, wohingegen Puffer PE die Salze der vorangegangenen Schritte beseitigte. Der Überstand wurde verworfen und die Säule durch eine letzte Zentrifugation ohne Zugabe weiteren PE-Puffers vollständig getrocknet, um die DNA anschließend in einem 1,5 ml Eppi durch Zugabe von 35 µl steril filtriertem Wasser zu eluieren.

Zum Nachweis des in das Plasmid eingeschleusten TGR5-Inserts und der beiden Plasmide Plasmuc und PRLTK wurde nach jeder Präparation ein Restriktionsverdau und darauf folgend bei TGR5-Inserts eine zusätzliche Sequenzierung durchgeführt. Endonukleasen konnten im Rahmen des Kontrollverdau an den spezifischen Schnittstellen der Plasmide das aufgenommene TGR5-Gen wieder herausschneiden, indem sie die Phosphodiesterbindungen der DNA hydrolysierten. Folgende Restriktionsansätze wurden für 1 Std bei 37 °C im Brutschrank inkubiert:

Tabelle 9 – Der Kontrollverdau transformierter Plasmide

Kontrollverdau-Ansatz:	
EcoR1	0,5 µl
BamH I (pEYFP) bzw. Xho I (pcDNA3.1+)	0,5 µl
spezifischer Restriktionspuffer EcoR I-Puffer	1 µl
Aqua dest.	6 µl
Plasmid-DNA	2 µl

2. MATERIALIEN & METHODEN

Tabelle 10 – Der Kontrollverdau des Plasmucs

Kontrollverdau Plasmuc:	
EcoR1	1 µl
EcoR1-Puffer	1 µl
destilliertes Wasser	6 µl
Plasmuc-DNA	2 µl

Um anschließend in einem 1% TAE-Agarosegel der Größe nach bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht werden zu können, wurde jeder DNA-Probe 3 µl *Orange Buffer* als Farbstoff hinzugegeben. 5 µl Etidiumbromid ermöglichten die Visualisierung der Banden unter UV-Licht, so dass ein Größenvergleich mit dem Standard möglich wurde. Ein positives Ergebnis zeigte sich in Form zweier sichtbarer Banden (TGR5-Insert & Plasmid). Eine endgültige Kontrolle der Insertaufnahme in die beiden Konstrukte pcDNA3.1+ und pEYFP wurde durch eine Sequenzierung ermöglicht. Hierfür kamen folgende Primer zum Einsatz:

Tabelle 11 – Die Sequenzierungsprimer der transformierten Plasmide

Vektor	Primer	Sequenz 5'→3' (bp)
pcDNA3.1+	Bghrev	TAGAAGGCACAGTCGAGG (18)
	T7	GTAATACGACTCACTATAGGG (21)
pEYFP	65for	CGGTAGGCGTGTACGGTGGGAG (22)
	66rev	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG (22)

Die Auswertung der übermittelten Daten erfolgte analog zur Sequenzierung der PCR-Proben unter Verwendung von Pubmed BLAST durch einen Vergleich der Basenabfolge der Plasmid-DNA mit der TGR5-Referenzsequenz NM_001077191.

2. MATERIALIEN & METHODEN

Die Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA für eine Transfektion erfolgte analog zur Minipräparation durch eine Maxipräparation mit dem *QIAprep Maxiprep Kit* von Qiagen (Hilden, Deutschland). Der aus der Miniprep verbliebene Anteil der Bakteriensuspension, der nach Restriktionsverdau und Sequenzierung als erfolgreich transformierte Bakterienkolonie identifiziert wurde, konnte in einer zweiten Übernachtskultur mit 250 ml LB-Medium und der entsprechenden Menge Ampicilin oder Kanamycin (Verdünnung 1/1000, Konzentration 50 µg/ml) bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert werden.

Nach 12-16 Std wurde die Kultur 15 Min bei 4 °C und 5000 rpm zur Pelletierung der Bakterien zentrifugiert. Das Pellet wurde resuspendiert und die Plasmid-DNA extrahiert, gereinigt und in 600-700 µl in steril filtriertem, destilliertem Wasser eluiert.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Im Rahmen der Dissertation wurden die in den Laboratorien vorhandenen *human embryonic kidney* (HEK293)-Zellen verwendet [160]. Diese wurden bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in 10ml sterilem MEM-Medium (*minimal essential medium with Earle's salts with L-Glutamine*) und dem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) (beide: PAA, Pasching, Österreich) im Brutschrank kultiviert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit vorgewärmtem Kulturmedium. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 70-80% erreichten, wurden diese gesplittet und in eine neue Passage überführt. Hierzu wurden die HEK293-Zellen mit 10 ml auf 37 °C erwärmtem, salzhaltigem Phosphatpuffer PBS ohne Calcium- und Magnesiumzusatz (Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen, mit 2 ml Trypsin-EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) von der Unterfläche gelöst und nach Zugabe von 8 ml Medium auf weitere Flaschen verteilt/ *gesplittet*. In den beschriebenen Ansätzen kamen Zellen der Passagen 14-27 zum Einsatz. Eine Langzeitkonservierung erfolgte in 10% DMSO und Kulturmedium in einer Umgebung von minus 80 °C.

2.2.4 Funktionsanalyse mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay

Zur Funktionsanalyse des Rezeptors erfolgte die Aktivitätsmessung durch ein cAMP-sensitives Luciferase-Reportergen. Diese Methode wurde bereits in der AG Keitel etabliert [149, 150, 155, 300]. Ziel des *Dual Luciferase Reporter Assay System* Ansatzes (Promega, Madison, WI, USA) war es die Auswirkung der genetischen Veränderung des TGR5-Gens auf die Funktionalität des Rezeptors zu untersuchen. Für die Analyse jeder Mutation wurden HEK239-Zellen kultiviert bis sie konfluent waren. Die Zellen wurden auf zwei 6-Well-Platten ausgesät. Pro Well wurden 1 ml Zellsuspension und 1 ml frisches Medium verwendet. Im Anschluss wurden die Platten für 3 Std in einer Atmosphäre von 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, um daraufhin mit einem cAMP-sensitiven Reporter-gen Konstrukt (Plasmuc, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), das fünf *cAMP-response elements* (CRE) vor dem Firefly-Luciferasegen enthielt, transient transfiziert zu werden. Dieses Plamid wurde mit dem TGR5pcDNA3.1+-Konstrukt bzw. mit den entsprechenden Leervektoren pcDNA3.1+ und pEYFP und dem Renilla Luciferase Reporter-gen-Konstrukt pRLTK (Promega, Madison, WI, USA) kotransfiziert (=Dual Reporter Assay). Der unter UV-Licht grün fluoreszierende Farbstoff YFP diente der Überprüfung einer adäquaten Aufnahme der Plasmide in die HEK293-Zellen. Alle Plasmide wurden unter Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), welches mit der einzuschleusenden Mutations-DNA lipophile Vesikel bildete, gleichzeitig in die Zellen eingebracht. PRLTK beinhaltete einen konstitutiv aktiven Promoter, welcher als Transfektionskontrolle diente.

Die durch TLC (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) ausgelöste Aktivierung des TGR5-Rezeptors führte G-Protein gekoppelt zu einer Aktivierung der AC, welche daraufhin die Umwandlung von ATP in cAMP katalysierte. Dieses band an die *cAMP response elements* (CRE) des Reporter-gen-Konstrukts (Plasmuc) und setzte die Expression der Firefly-Luciferase in Gang.

2. MATERIALIEN & METHODEN

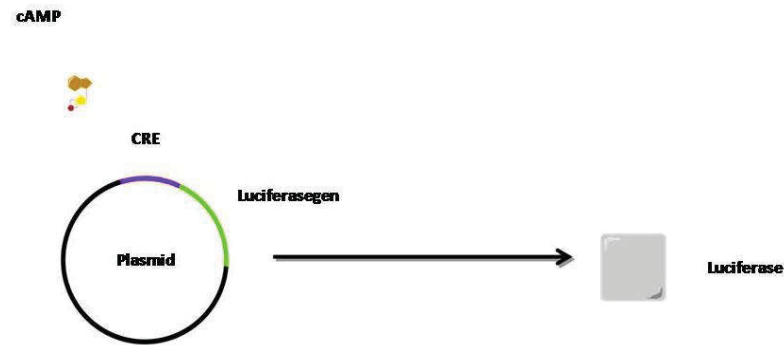


Abbildung 10 - Das Grundprinzip des Luciferase-Assays

cAMP-abhängig wird die Expression der Luciferase stimuliert und die Aktivität des TGR5-Rezeptors gemessen. cAMP bindet hierzu an die *cAMP-responsive elements* innerhalb des Plasmids und aktiviert die Transkription des Luciferasegens. Modifiziert nach Herstellerangaben (Promega, Madison, WI, USA).

Wurde nun Substrat hinzugegeben, so konnte die Firefly-Luciferase die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin in Anwesenheit von Magnesiumionen und unter Abspaltung eines Pyrophosphats katalysieren. Hierbei wurden Photonen der Wellenlänge ~ 562 nm emittiert, so dass die Luciferase-Aktivität anhand einer cAMP-vermittelten Lichtreaktion gemessen werden konnte. Analog wurde die Aktivität der Renilla-Luciferase gemessen. Diese metabolisierte unter Lichtemission Coelenerazin zu Coelenteramid.

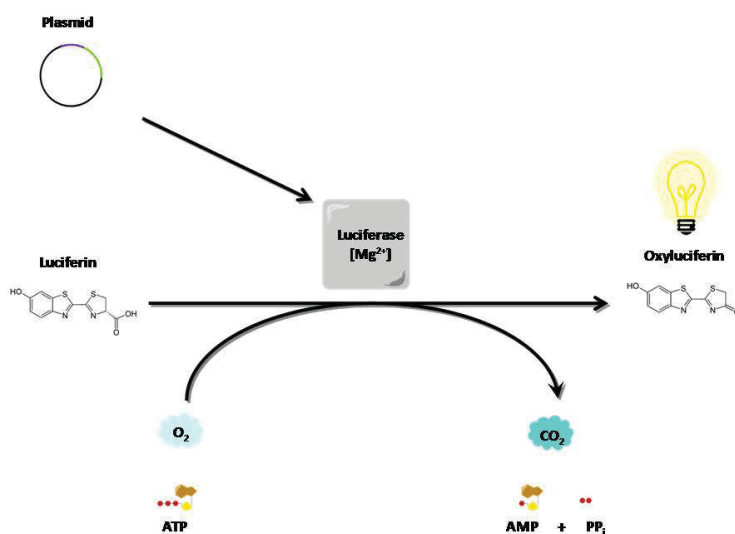


Abbildung 11 - Die Firefly-Luciferasereaktion

Die exprimierte Luciferase katalysierte nach Zugabe des Substrates die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Hierbei wurde Licht freigesetzt, welches photometrisch gemessen werden konnte. Die Intensität des gemessenen Lichts war ein Maß für die Luciferaseaktivität, die cAMP-Konzentration und folglich für die Aktivität des Rezeptors. Modifiziert nach Herstellerangaben (Promega, Madison, WI, USA).

2. MATERIALIEN & METHODEN

Die Höhe des Lichtsignals und somit die Menge der produzierten Firefly-Luciferase war ein Maß für die Aktivierung und Funktionalität des Rezeptors, da die Aktivität des Rezeptors linear mit der intrazellulären cAMP-Konzentration und der gemessenen Lichtstärke korrelierte. Die Renilla-Luciferase (pRLTK-Konstrukt) hingegen war jedoch vollkommen unabhängig von Promotoren und regulatorischen Elementen in den transfizierten Zellen konstitutiv aktiv exprimiert und gewährleistete auf diese Weise die Normierung des Lichtsignals. Durch Quotientenbildung beider Lichtsignale konnten Fehler, welche auf einer unterschiedlich starken Transfektion und divergierenden Zellkulturgrößen beruhten, minimiert werden.

Zur Transfektion wurden pro Mutation ein DNA- und ein Lipofectamin-Ansatz pipettiert:

Tabelle 12 – Der DNA-Ansatz des Luciferase-Assays

DNA-Ansatz:	
Mutation hTGR5pcDNA31+	0.5 µg/Well
Plasmuc (cAMP-Sensor)	1,6 µg/Well
PRLTK (Renilla)	0,1 µg/Well
pEYFP (Transfektionskontrolle)	1,1 µg/Well

Das Gesamtvolumen von 50 µl wurde durch Zugabe von Optimem-Medium (Optimem + Glutamax, Gibco, Life Technologies, Paisley, UK) konstant gehalten, um unterschiedliche Transfektionsansätze ausschließen zu können. Das Gemisch wurde für 5 Min bei RT inkubiert und gleichzeitig der Lipofectaminansatz begonnen:

Tabelle 13 – Der Lipofectaminsatz des Luciferase-Assays

Lipofectaminsatz	
Lipofectamin	7 µl/Well
Optimem	243 µl/Well

Die 250 µl des Lipofectaminsatzes wurden ebenfalls für 5 Min bei RT inkubiert, um daraufhin mit dem DNA-Ansatz versetzt bei RT inkubiert zu werden. Nach 20 Min wurden jeweils 2 ml frischen Mediums und 300 µl des Lipofectamin-DNA-Gemisches in jedes Well pipettiert. Die Platten wurden wiederum für 3 Std im Brutschrank inkubiert, um im Anschluss nach einem weiteren Mediumwechsel über Nacht kultiviert zu werden.

Am darauf folgenden Tag wurde die korrekte Aufnahme des Insert anhand des unter UV-Licht grünfluoreszierenden YFP-Signals kontrolliert und die Zellen mit je 2,5 ml antibiotikahaltigem „Hungermedium“ (MEM + 1% FCS + 1% Penicillin und Streptomycin), das die Zellen aufnahmefähiger gegenüber den Stimulationssubstraten machte, versetzt. Nachmittags erfolgte ein weiterer Mediumwechsel sowie die Stimulation mit 5 µl DMSO Dimethylsulfoxid als Kontrolle (Wert = 1,0), Forskolin in DMSO gelöst als Positivkontrolle und TLC in DMSO gelöst in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 2,5 und 10 µM.

Nach 16 Std wurden die Zellen zweifach mit kaltem, magnesium- und calciumhaltigem PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1/1000 Na-ortho-Vanadat (100 mM) gewaschen und je nach Konfluenz mit 120-180 µl des einfach verdünnten *Passive Lysis Buffer* versetzt, um daraufhin für 20 Min schüttelnd bei RT inkubiert zu werden. Mit Hilfe eines Spatels wurden die Zellen von der Unterfläche der Wells abgekratzt und je 120 µl des Zelllysats in ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wurde das Zellpellet verworfen und 100 µl des Überstandes in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert. Unter Verwendung des Luminoscans von Thermo Scientific wurden jeweils 10 µl der Proben zuerst mit 50 µl der nach Herstellerangaben vorbereiteten Luciferasereagenz gemischt, auf eine weiße 96-Well-Platte aufgetragen und die Lichtemission für 7 Sek gemessen (Luciferase-Aktivität). Anschließend erfolgten die

2. MATERIALIEN & METHODEN

Hinzugabe von 50 µl Stop&Glo-Reagenz und die Messung der Lichtemission für 3 Sek (Renilla-Aktivität).

Der Firefly-Luciferase-Reporter generierte durch die Hinzugabe der Luciferase-Reagenz ein stabiles lumineszierendes Signal. Nach Quantifizierung der Firefly Lumineszenz wurde durch das Hinzupipettieren der Stop&Glo-Reagenz die Renilla-Luciferase-Reaktion initiiert und das Signal der Renilla-Luciferase gemessen. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde nach Herstellerangaben zeitgleich um sieben Zehnerpotenzen reduziert, so dass die ermittelte Lichtmenge selektiv in beiden Messungen bestimmt werden konnte.

Neben den transfizierten TGR5-Mutageneseplasmiden wurden auch die Leervektoren sowie der TGR5-WT analysiert. Diese Kontrollen erlaubten schließlich die Aussage, dass die beobachteten Veränderungen der Rezeptoraktivität nur auf die Mutation zurückzuführen waren.

2.2.5 Immunfluoreszenzmessung & konfokale Laserscanning Mikroskopie

Immunfluoreszenzmessungen wurden zur Lokalisationsbestimmung des TGR5-Rezeptors verwendet [155, 160, 300]. Für die Analyse wurden HEK293-Zellen kultiviert bis sie eine Konfluenz von 60-70% aufwiesen. 400 µl Zellen wurden auf drei 12-16 mm Durchmesser große Objekträgerplättchen (*Coverslips*) in jeder Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 3 Std Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ erfolgte die Transfektion mit den sechs TGR5-Mutanten und dem TGR5-WT. Die aus den vorherigen Versuchen vorhandenen mit den TGR5-Mutationen transformierten pcDNA3.1+ Plasmide sollten mit Hilfe des Lipofectamins in die Zellen eingebracht werden. Für jede Mutation wurde analog zum Luciferase-Assay ein DNA- und ein Lipofectaminansatz hergestellt:

Tabelle 14 – Der DNA- Ansatz der Immunfluoreszenzmessung

DNA-Ansatz:	
TGR5-Plasmid-DNA pcDNA3.1+	2,5 µg/Well
Optimem	250 µl/Well

Tabelle 15 – Der Lipofectaminansatz der Immunfluoreszenzmessung

Lipofectaminansatz:	
Lipofectamin	7 µl/Well
Optimem	243 µl/Well

Beide Ansätze wurden für 5 Min bei RT inkubiert, gemischt und für weitere 20 Min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mediumwechsel mit 1,5 ml MEM + 10% FCS je Well vorgenommen. Mit 480 µl/Well des jeweiligen DNA-Lipofectamingemisches wurden die Zellen anschließend transfiziert. Zur Entfernung des Lipofectamins erfolgte nach 3 Std Inkubation im Brutschrank ein weiterer Mediumwechsel. Die Zellen wurden schließlich für weitere 48 Std im Brutschrank inkubiert, um eine ausreichende Zeit für die adäquate Proteinexpression zu gewährleisten.

Nach Inkubation und Medientfernung wurden die Zellen mit 2 ml/Well PBS ohne Magnesiumzusatz gewaschen und für 30 Sek mit 1 ml Methanol unter dem Abzug versetzt. Das Methanol machte die Zellmembran permeabel, fixierte die Zellen in ihrem aktuellen Zustand und verhinderte eine Deformierung der Zellstruktur. Anschließend wurden die Zellen wiederum zweimalig mit PBS gewaschen, in 12-Wells überführt und für 30 Min bei RT mit 2 ml 2% FCS-haltigem PBS pro Well inkubiert. Das FCS band an Oberflächenstrukturen der Zellen und verringerte spätere unspezifische Bindungen der Antikörper. Die Affinität der Antikörper war höher als die Bindungskräfte des FCS, so dass die Epitope durch die Antikörper letztlich spezifisch gebunden werden konnten. Die geblockten *Coverslips* wurden anschließend in eine Feuchtkammer auf Aqua dest. befeuchtetem Whatman-Papier und

2. MATERIALIEN & METHODEN

Parafilm ausgelegt und mit 60 µl des ersten Antikörpergemisches beschichtet und für 1 Std bei RT abgedunkelt inkubiert (Bemis flexible packing Neenah, WI, USA).

Die beiden Erstantikörper banden spezifisch an die jeweilige Zielstruktur. Zweitantikörper wurden zur Visualisierung der Erstantikörperbindung verwendet. Sie waren mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und banden spezifisch an den Erstantikörper. Hieraus resultierte unter dem Lichtmikroskop eine Fluoreszenz. Als Erstantikörper diente RVL2, ein anti-human-TGR5-IgG-Antikörper des Meerschweinchens (gegen die TGR5-AS 298-318 gerichtet [159, 162]) in einer Konzentration von 1/500. Zudem wurde ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen die Na^+/K^+ -ATPase gerichtet als Zellmembranmarker in einer Konzentration von 1/100 (in der *Blockinglösung*) verwendet. Als Marker für das humane ER wurde der murine PDI-Antikörper (Proteindisulfid Isomerase) in einer Verdünnung von 1/150 angewendet. Zwei mit Fluoreszein (FITC) gekoppelte anti-Maus (1/200) und ein anti-Meerschweinchen Indocarbocyanin-3 (Cy3) gekoppelter Antikörper (1/500) wurden als weitere Zweitantikörper eingesetzt. Schließlich fand Hoechst als separater Zellkernfarbstoff in einer Verdünnung von 1/20000 Verwendung.

Tabelle 16 – Die verwendeten Primär- & Sekundärantikörper

	Antikörper	Molekül	Wirtspezies	Reaktivität	Farbe
Erstantikörper	RVL2	polyclonal	Guinea pig	Human	
	(TGR5-AS 298-318)				
	[159, 162]				
	Na^+/K^+-ATPase	monoclonal	Mouse	Human	
	PDI	monoclonal	Mouse	Human	
Zweitantikörper	Dk anti-gpCy3	Fab2 Fragment IgG <i>polyclonal</i>	<i>Donkey</i>	<i>Guinea pig</i>	Rot
	Dk anti-ms-FITC	Fab2 Fragment IgG <i>polyclonal</i>	<i>Donkey</i>	<i>Mouse</i>	Grün
	Gt anti-ms-FITC	IgG Gesamt-molekül	<i>Goat</i>	<i>Mouse</i>	Grün
	Hoechst				Blau

2. MATERIALIEN & METHODEN

Nach 1 Std wurden die *Coverslips* wieder in 12-Wells überführt und dreimal für je 10 Min mit PBS gewaschen, um anschließend mit 80 µl des zweiten Antikörper-Gemisches beschichtet für 1 Std abgedunkelt inkubiert zu werden. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS wurden die *Coverslips* für 2 Min mit Aqua dest. gewaschen, auf einen Objektträger übertragen, mit Dako *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt, mit Nagellack fixiert und bei 4 °C gelagert.

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie war die Anregung der Proben mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, die daraufhin zu einer Abstrahlung von Licht einer weiteren Wellenlänge führte, welche mit speziellen Filtern gemessen werden konnte. Die Immunfluoreszenz der Objektträger wurde schließlich unter dem *Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope* mit einem 63x Objektiv betrachtet, Bildaufnahmen mit 1024 x 1024 Pixel und einer Kantenlänge von 48,75 x 48,75 µm digital gespeichert und anschließend mit der Software *LSM Image Browser* ausgewertet (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

2.2.6 Statistische Auswertung

Im Rahmen der Funktionsanalyse wurden zur statistischen Auswertung der Rezeptoraktivität die ermittelten Lichtintensitäten der Luciferase-Assays, angegeben in RLU (*relative light units*), in Excel-Tabellen übertragen und in Balkendiagrammen dargestellt. Jede Mutation wurde in mindestens sechs unabhängigen Untersuchungen und entsprechend unabhängigen Transfektionen an verschiedenen Tagen analysiert. Für die ermittelten Daten wurden die arithmetischen Mittelwerte, die Standardabweichungen und die statistischen Schwankungen des Mittelwertes (SEM, *standard error of the mean*) errechnet. Zudem wurden zur Bestimmung der statistischen Aussagekraft für jede Mutationsanalyse ein zweiseitiger Student-t-Test verwendet. Es konnten so direkte Vergleiche der Rezeptoraktivität bei verschiedenen TLC-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle DMSO vorgenommen werden. Eine Signifikanz wurde für $p < 0,05$ angenommen. Außerdem wurde ein statistischer Vergleich zwischen den Mutationen und dem TGR5-WT bei gleicher TLC-Konzentration durchgeführt.

2.2.7 *Patientenkollektive*

Etwa 1500 DNA-Proben wurden anonymisiert untersucht. Erst nach Abschluss der Genanalyse und nach Fertigstellung der zellbiologischen Charakterisierung erfolgte die Zuordnung mit den jeweiligen Patienten und ihren Erkrankungen. Unter Verwendung der klinikinternen Datenbank und des im klinischen Alltag verwendeten EDV-gestützten Dokumentationsprogramms MEDICO der Firma Siemens (Deutschland) konnten die Sequenzierungsergebnisse mit den zugehörigen Patientendaten schließlich korreliert werden. Die Daten wurden im Januar 2013 erhoben. Für jeden Patienten wurden zu diesem Zeitpunkt vorhandene, digitale Arztbriefe und digital dokumentierte Laborergebnisse gesichtet und folgende Parameter soweit vorhanden recherchiert und tabellarisiert: Alter, Geschlecht, Haupt- und Nebenerkrankungen. Der Fokus wurde aufgrund der in der Einleitung beschriebenen potentiellen TGR5-Beteiligungen insbesondere auf folgende Erkrankungen gelegt: Erkrankungen des GIT, der Leber und der Gallenwege sowie kardiovaskuläre, metabolische (DM Typ II) und onkologische Erkrankungen. Die Hauptdiagnose wurde als der Aufnahme- beziehungsweise als der aktuelle Behandlungsgrund festgelegt. Bei Vorliegen einer Multimorbidität war eine Mehrfachzuordnung unumgänglich. Ein Patient mit Hepatitis B konnte auch an DM Typ II und KHK erkrankt sein und wurde dementsprechend in drei Listen geführt. Aus diesem Grunde war die Anzahl der Erkrankungen größer als die Anzahl der untersuchten Patienten. Es wurden nicht nur dokumentierte Haupt-, sondern auch Nebendiagnosen berücksichtigt, um ein möglichst großes Spektrum an verschiedenen Erkrankungen abbilden und korrelieren zu können.

Als Kontrollen wurden 593 Blutspender auf TGR5-Mutationen gescreent.

Für das HCV-Kollektiv wurde zudem der aktuell dokumentierte Infektionsstatus (Stand Januar 2013) – ausgeheilte vs. chronisch replikative (= aktive) Infektion – aus den Arztbriefen und den Laborergebnissen tabellarisch festgehalten. Der Status einer ausgeheilten HCV-Infektion wurde vergeben, wenn die Virämie unter der RNA-Nachweisgrenze <12 Kopien lag.

Schließlich wurde die Anzahl der identifizierten Mutationen und des gefundenen SNP mit den Erkrankungen der Patienten korreliert. Für den SNP mit den Genotypen CC, TC und TT

2. MATERIALIEN & METHODEN

wurden die Allelfrequenzen (siehe Formel 3) in der HCV-Gruppe errechnet und mit der Kontrollkohorte verglichen.

Formel 3 – Die Berechnung der Allelfrequenz

$$\text{Allelfrequenz} = \frac{\text{Anzahl des gesuchten Allels}}{\text{Alle Allele}} = \frac{2xA + B}{2xA + 2xB + 2xC}$$

Anmerkung; Für die Errechnung des C-Allels: A = Anzahl der Genotypen CC, B = Anzahl der Genotypen CT, C = Anzahl der Genotypen TT

3. ERGEBNISSE

3.1 Etablierung der Sequenzierung

Zu Beginn der experimentellen Arbeit wurden im Rahmen der Sequenzierung durch Vergleich mit der Basenabfolge des TGR5-Gens zahlreiche Primer in Zusammenarbeit mit Frau Spomer entworfen und mehrfach getestet. Die optimalen Amplifikationszeiten, Annealingtemperaturen und Sequenzierungsergebnisse wurden durch zwei unabhängige PCRs für die Exons 1 und 2 mit den *revers* respektive *forward* gerichteten Primern 1rev, 1.1for, 2rev und 2.1for erzielt. Analog wurden die Primer für die Sequenzierung der amplifizierten Exons etabliert. Insgesamt erfolgte der Einsatz von vier Primern für die PCR und Sequenzierung von Exon 1 sowie von neun Primern für Exon 2.

Initial wurden die Sequenzierungsergebnisse der Taq-Polymerase mit denen der Phusion-Polymerase verglichen. Letztere konnte bei einer geringeren Fehlerrate ein größeres DNA-Fragment, welches sowohl Exon 1 und Exon 2, als auch das zwischenliegende Intron umfasst, amplifizieren und durch eine 3'5'-Exonucleaseaktivität fehlgepaarte Basen korrigieren (*Proofreading*). Im direkten Vergleich zeigten sich jedoch bessere Amplifikations- und Sequenzierungsergebnisse bei Verwendung der Taq-Polymerase. Um der fehlenden 3'5'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase Rechnung zu tragen und weiterhin potentielle Fehlerquellen zu minimieren wurden beide Exons des TGR5-Gens immer in zwei separaten PCRs amplifiziert und darauf folgend zur Qualitätssicherung jeder Nachweis einer Punktmutation durch eine zweite, unabhängige PCR mit *forward* und *revers* gerichteten Primern bestätigt.

3.2 Sequenzierungsergebnisse

Insgesamt wurden über 1500 Patientenproben untersucht. Eine vollständige Sequenzierung von Exon 1 und 2 bei ausreichend vorhandenem DNA-Material gelang für 735 Patienten eines allgemeinen, unselektionierten Düsseldorfer Kollektivs (allgemeines Kollektiv) und

3. ERGEBNISSE

gesondert für 472 HCV-Patienten (HCV-Kollektiv). Das allgemeine Kollektiv enthielt ebenfalls 273 Patienten mit HCV. Nach der vollständigen Analyse aller Proben wurden doppelt gelistete Patienten gesucht und die Kollektive entsprechend angepasst, so dass schließlich 472 HCV-Patienten einem etwa gleichgroßen Kollektiv von 462 Patienten mit verschiedensten Erkrankungen gegenüberstanden. Insgesamt wurden 90 Mutationen gefunden und wie oben beschrieben durch eine zweite PCR bestätigt. Das Geschlechterverhältnis war mit jeweils 45 Männern und Frauen ausgeglichen. Einen Überblick über alle identifizierten genetischen Veränderungen in codierenden und nicht-codierenden Abschnitten des TGR5-Gens liefert die folgende Tabelle 17 - Die identifizierten Mutationen des Gesamtkollektivs. Dem gefundenen *single nucleotide polymorphism SNP rs11554825* im nicht-codierenden Exon 1 wird ein gesondertes Kapitel gewidmet. Die Angabe des Nukleotidaustausches erfolgte nach den Empfehlungen der *Human Variation Nomenclature Society* [419]. Die Basenpaarnummer des Nukleotidaustausches entspricht dem jeweiligen Bp des 2023 Bp langen TGR5-Gens in der Transkriptvariante 1 (NM_001077191.1).

Tabelle 17 - Die identifizierten Mutationen des Gesamtkollektivs

Nukleotid-austausch Exon	AS-Austausch	M	W	Erkrankungen
c.[13G>A] Exon 1	Nicht codierend	2		HBV, HBs-AG-Träger
c.[111A>G] Exon 1	Nicht codierend	1		M. Crohn, Cholezystolithiasis
c.[283C>T] Exon 2	Nicht codierend		1	HBV
c.[335C>T] Exon 2	Nicht codierend		1	AIH, Zn HCV, Lebersteatose
c.[737G>A]	Nicht	1		Gewichts-

3. ERGEBNISSE

Nukleotid- austausch	AS- Austausch	M	W	Erkrankungen
Exon				
Exon 1	codierend			verlust/ Kontrolle
c.[838G>A] c.[830C>T] Exon 2	Nicht codierend	1		Rektum-Ca metastasiert, Zn CHE
c.[889C>G] Exon 2	G7G p.(=)	2	1	HCV, Zn HBV, DM II, KHK, PAVK, Zn HCV, Zn CHE
c.[890G>A] Exon 2	p.E8K	1		HBV, HBs-AG- Träger
c.[1197G>A] Exon 2	p.R110H		1	HBV
c.[1202A>G] Exon 2	p.M112V		1	HBV
c.[830C>T] c.[838G>A] c.[1326C>T] c.[1790C>T] Exon 1 & 2	2x nicht codierend p.A153V p.R308W		1	HCV
c.[1469C>T] c.[1516G>C] c.[1927C>T] c.[1936C>T] Exon 2	R216R p.(=) p.R201W		1	Leberwert- erhöhung
c.[1504C>T] Exon 2	S212S p.(=)	3	2	Colitis, HCV, HCC, NASH, HBV

3. ERGEBNISSE

Nukleotid- austausch	AS- Austausch	M	W	Erkrankungen
Exon				
c.[1504C>T]	S212S	1		HCV
c.[1516G>C]	p.(=)			
c.[1927C>T]	R216R			
c.[1936C>T]				
Exon 2	p.(=)			
c.[1516G>C]	R216R	18	20	Overlap PBC & AIH, Leberzirrhose, Reflux, AIH, NASH, HBV, HCV, Leberwert-erhöhung, Rektum-Ca
c.[1927C>T]	p.(=)			
c.[1936C>T]				
Exon 2				
c.[1516G>C]	R216R	6	6	Colitis, HBV, Leberzirrhose, DM II, HCV, NASH, PBC, Steatosis hepatis
c.[1517G>C]	p.(=)			
c.[1927C>T]	p.A217P			
c.[1936C>T]				
Exon 2				
c.[1567C>T]	F233F	1		Leberwert-erhöhung
Exon 2	p.(=)			
c.[1586T>G]	p.Y240D		1	HCV
Exon 2				
c.[1633G>A]	P255P		1	C2, Leberzirrhose, Cholezystolithiasis
Exon 2	p.(=)			
[1682A>G]	p.S272G	2		HBV, Ösophagus-Ca, exokrine Pankreasinsuffizienz
Exon 2				

3. ERGEBNISSE

Nukleotid- austausch	AS- Austausch	M	W	Erkrankungen
Exon				
c.[1756A>G]	Q296Q	1		Rektum-Ca, DM II
Exon 2	p.(=)			
c.[1755A>G]	p.Q296R		1	HCV, Mamma-Ca
Exon 2				
c.[1848T>C]	p.L327P	1		Zn HCV
Exon 2				
c.[1917C>G]	Nicht codierend	4	7	Pankreas-Ca, Reflux, HBV, Colitis ulcerosa, HCV, Overlap AIH & PBC, PAVK, DM II
Exon 2				

Tabelle 17 - Die identifizierten Mutationen des Gesamtkollektivs. Diese wurden mit dem Geschlecht und der jeweiligen Erkrankung des Patienten korreliert. Ein Fokus wurde hierbei auf Erkrankungen gelegt, welche potentiell nach dem aktuellen Forschungsstand mit TGR5 assoziiert sein könnten. Alle bekannten Nebenerkrankungen wurden ebenfalls gesichtet, jedoch aufgrund des Umfanges hier nicht vollständig gelistet. Die im Weiteren zellbiologisch untersuchten Mutationen wurden farblich gelb markiert.

Das allgemeine, unselektionierte Düsseldorfer Kollektiv umfasste 735 Patienten mit einem etwa ausgewogenen Geschlechterverhältnis. Von 237 HBV-, 273 HCV- und 2 HDV-erkrankten Patienten wiesen 78 eine ausgeheilte HBV-Infektion und 112 eine überstandene HCV-Infektion auf. Darüber hinaus fanden sich 113 Patienten mit einer diagnostizierten malignen neoplastischen Erkrankung sowohl der Leber, als auch anderer Organsysteme. 34 Patienten waren an einer PBC und 23 an einer AIH erkrankt. Bei 11 Patienten lag ein Overlap-Syndrom bestehend aus PBC und AIH vor. Eine Refluxsymptomatik respektive Refluxösophagitis oder Barrettmetaplasie zeigten 72 Patienten. Bei 69 Patienten wurde ein DM Typ II und bei 32 Patienten eine KHK nachgewiesen. In den genannten Zahlenangaben wurde die Multimorbidität zahlreicher Patienten berücksichtigt, so dass die Gesamtsumme der Erkrankungen größer als die Anzahl aller untersuchten Patienten war. Die Zuordnung diverser internistischer Erkrankungen zur Kontrollgruppe erfolgte abhängig von der

3. ERGEBNISSE

Hauptdiagnose, die anhand der entsprechenden Arztbriefe und der klinikeigenen Datenbank recherchiert wurde.

Zu den HCV-Proben aus dem allgemeinen Kollektiv wurden weitere Proben aus einem gut charakterisierten HCV-Kollektiv sequenziert, so dass schließlich ein großes HCV-Kollektiv bestehend aus insgesamt 472 Patientenproben, hierunter 234 Frauen und 238 Männer entstand. Der Großteil dieser mit Interferon behandelten HCV-Proben war im Vorfeld im Hinblick auf den HCV-Genotyp und das Therapieansprechen durch Herrn Brinkmeyer im Rahmen seiner Dissertation in der AG von Prof. Dr. Kubitz, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, charakterisiert worden. Die Auswertung der Labordaten und der entsprechenden Arztbriefe ergab 273 Patienten (57,84%) mit einer aktiven HCV-Infektion und 189 Patienten (42,16%) ohne Nachweis einer HCV-Virämie (keine Virusreplikation = ausgeheilt). 147 Frauen mit aktiver replikativer Virushepatitis standen 126 Männern gegenüber. Bei 86 Frauen und 113 Männern war eine chronisch-aktive HCV-Infektion nicht mehr nachweisbar (<12 RNA-Kopien), so dass von einer ausgeheilten Infektion ausgegangen wurde (Stand 01/2013).

Insgesamt konnte bei 90 der 735 Patienten eine oder mehrere synonyme und nicht-synonyme Mutationen nachgewiesen werden. Die mit Abstand häufigste aller identifizierten Veränderungen des TGR5-Gens war die synonyme Mutation R216R p.(=). Sie trat bei 27 Frauen und bei 25 Männern auf. Bei allen 52 Patienten war der Austausch c.[1516G>C] an das Auftreten der beiden Veränderungen c.[1927C>T] und c.[1936C>T] gekoppelt. Bis auf zwei Ausnahmen beinhaltete die R216R-Mutation jene drei beschriebenen Veränderungen der Basensequenz. In der Sequenzierung zweier HCV-Proben konnte c.[1927C>T] nicht beobachtet werden. R216R wurde bei PBC, AIH, Overlap-Syndrom PBC & AIH, NASH, HBV, Zn HCV, HCV, Basaliome, Colitis indeterminata, Laktoseintoleranz und Leberwerterhöhung nachgewiesen. 12 Patienten wiesen neben den Veränderung an der Stelle 216 auch die Mutation p.A217P auf. Diese war die häufigste nicht-synonyme Mutation im gesamten Kollektiv aller untersuchten Patienten. Der Austausch c.[1517G>C] konnte insgesamt 12x identifiziert werden. Die genetischen Veränderungen c.[1516G>C], c.[1927C>T] und c.[1936C>T] waren mit dem Auftreten der Mutation c.[1517G>C] assoziiert. Das Geschlechterverhältnis war mit sechs Frauen und sechs Männern ausgewogen. Patienten mit

3. ERGEBNISSE

nachgewiesener Mutation p.A217P litten an Colitis indeterminata und Laktoseintoleranz (Frau); HBV, Leberzirrhose, Choledocholithiasis und DM II (Mann); 5x HCV (drei Männer + zwei Frauen); 2x Zn HCV (zwei Frauen); NASH, Leberzirrhose, Parkinson und DM II (Mann); PBC, Sjögren-Syndrom, Epilepsie (Mann) und Steatosis hepatis (Frau).

Schließlich konnten zehn zum Teil in der Literatur noch nicht beschriebene, heterozygote und eine mögliche compound-heterozygote Mutation identifiziert werden. Wie oben in der Tabelle bereits ersichtlich traten homozygote Mutationen in keinem der Patientenkollektive auf. Die genetischen Veränderungen p.A217P und p.S272G fanden sich mehrfach, wohingegen alle weiteren nicht-synonymen Mutationen lediglich einmalig auftraten.

In den analysierten Proben Hepatitis B und C erkrankter Patienten fanden sich zahlreiche sowohl stumme, als auch nicht-synonyme Mutationen des TGR5-Rezeptors. Besonders letztere konnten dieser Patientengruppe zugeordnet werden. Allen voran wurde die Mutation p.A217P bei mehreren HBV- und HCV-Erkrankten beobachtet. In der Hepatitis C-Gruppe fanden sich zudem die Mutation G7G p.(=), p.Y240D, p.Q296R, das gleichzeitige Auftreten von p.A153V und p.R308W sowie die Mutation p.L327P. Ob es sich bei dem Patienten, der sowohl die Mutation p.A153V als auch p.R308W aufwies, um eine Compound-Heterozygotie handelt oder ob beide Varianten auf einem Allel liegen, blieb ungeklärt, da das Blut der Eltern beziehungsweise der Kinder nicht verfügbar war und untersucht werden konnte. Im Rahmen des Screenings von HBV-Patienten fanden sich die genetische Variationen p.E8K, G7G p.(=), p.R110H und p.M112V. Auch die Mutation p.S272G konnte bei einem Patienten mit Hepatitis B identifiziert werden. Bei Patienten mit einer AIH wurden Mutationen außerhalb des codierenden Bereichs sowie die synonyme Variation R216R p.(=) beschrieben. Bei CED zeigte die Sequenzierung lediglich nicht-codierende Mutationen. Auch im TGR5-Gen von Patienten mit malignen Neoplasien wurden Basenaustausche beobachtet. Nicht-codierende Mutationen konnten bei Patienten mit Rektum- und Pankreaskarzinom nachgewiesen werden. Die Mutation p.Q296R fand sich bei einer Patientin mit Mammakarzinom, p.S272G bei einem Patienten mit Ösophaguskarzinom und die synonymen Mutationen R216R p.(=) und Q296Q p.(=) bei einem Patienten mit Rektumkarzinom. R216R p.(=) wurde bei einem Patienten mit multiplen Basaliomen und S212S p.(=) bei einem HCV Patienten mit HCC identifiziert. Die Variation p.S272G wurde bei einem Patienten mit

3. ERGEBNISSE

Ösophaguskarzinom nachgewiesen. Bei NASH-Patienten wurden neben p.A217P auch die stummen Mutationen S212S p.(=) und R216R p.(=) diagnostiziert. Unter den PBC-Erkrankten konnten R216R p.(=) sowie Mutationen im nicht-codierenden Bereich nachgewiesen werden. Der synonyme Austausch F233F p.(=) fand sich schließlich bei einem Patienten mit unklarer Leberwerterhöhung. In Zusammenschau war auffällig, dass mehr Mutationen bei Erkrankungen als bei gesunden Kontrollen identifiziert werden konnten.

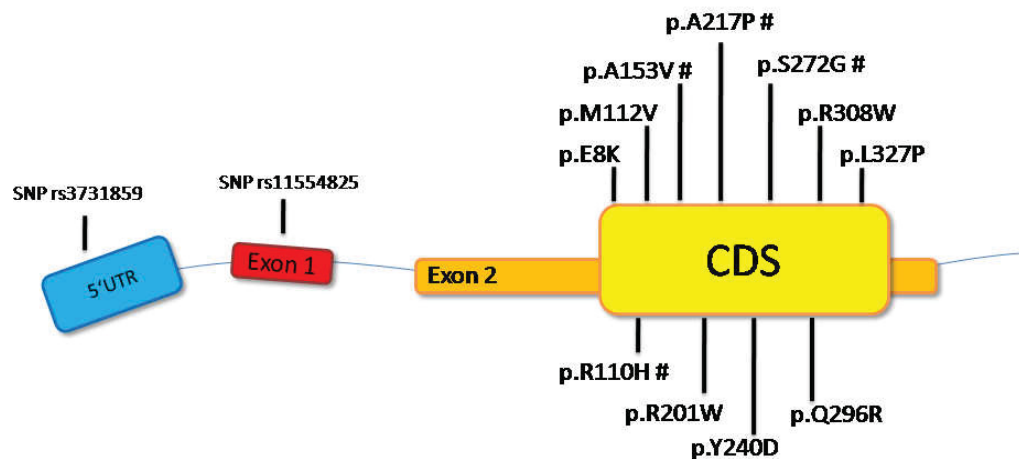


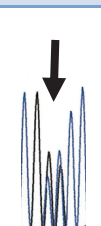
Abbildung 12 - Nicht-synonyme TGR5-Mutationen Exon 2 & SNP rs11554825 Exon 1

Die Abbildung zeigt die elf identifizierten genetischen Variation innerhalb der CDS. Die mit # gekennzeichneten Mutationen sind bereits in der Literatur durch Hov et al. oder i.R. der Dissertation von Frau Spomer beschrieben worden. Die weiteren genetischen Veränderungen wurden erstmals beschrieben. Zudem wurde der gefundene SNP rs11554825 im Exon 1, welcher mit dem SNP rs3731859 assoziiert ist, dargestellt [420]. Modifiziert nach [149, 150].

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Korrelation der identifizierten nicht synonymen Mutationen mit den jeweiligen Patienten. Mutationen, welche mit einer “#” gekennzeichnet wurden, sind bereits von Hov et al. im Rahmen einer Analyse von PSC-Patienten respektive im Rahmen der Dissertation von Frau Spomer identifiziert worden [149, 150].

3. ERGEBNISSE

Tabelle 18 – Die Korrelation der nicht-synonymen TGR5-Mutationen mit den Patienten

AS-Stelle	AS-Austausch	Codon-veränderung	Sequenzierung	Geschlecht	Diagnose	Jahrgang
8	Glu 8 Lys p.E8K	G AG → A AG		M	HBV	1985
110 #	Arg 110 His p.R110H	C GC → C AC		W	HBV, HBsAG-Trägerin	1962
112	Met 112 Val p.M112V	A TG → G TG		W	HBV, HBsAG-Trägerin	1966
153 #	Ala 153 Val p.A153V	G CC → G TC		W	HCV	1958
201	Arg 201 Trp p.R201W	C GG → T GG		W	Leberwert-erhöhung	1979
217 #	Ala 217 Pro p.A217P In Kombi-	G CC → C CC		6W 6M	Multiple Erkrankungen	Multiple Patienten

3. ERGEBNISSE

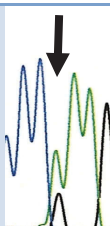
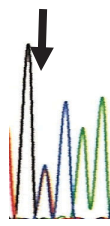
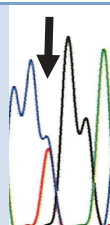
AS- Stelle	AS- Austausch	Codon- veränderung	Sequenzierung	Geschlecht	Diagnose	Jahrgang
nation mit p.R216R						
240	Tyr	TAC		W	HCV	1939
240		→				
Asp		GAC				
p.Y240D						
272	Ser272Gly	AGT		M	HCV	1948
#	p.S272G	→		W	Ösophagus- karzinom	1949
		GGT				
296	Gln296Arg	CAA		W	HCV, Mamma- karzinom	1943
	p.Q296R	→				
		CGA				
308	Arg	CGG		W	HCV	1958
308		→				
Trp		TGG				
p.R308W						
327	Leu	CTG		M	Zn HCV	1967
327		→				
Pro		CCG				
p.L327P						

Tabelle 18 stellt die Korrelation der nicht-synonymen TGR5-Mutationen mit den jeweiligen Erkrankungen dar. Diese wurden mit dem Geschlecht und der jeweiligen Erkrankung des Patienten korreliert. Ein Fokus wurde hierbei auf Erkrankungen gelegt, welche potentiell mit TGR5 assoziiert sind. Alle bekannten Nebenerkrankungen wurden ebenfalls gesichtet, jedoch aufgrund des Umfangs nicht vollständig gelistet. Die mit „#“ gekennzeichneten Mutationen wurden in der Literatur bereits beschrieben ([149, 150] sowie Dissertation Frau Spomer). Der entsprechende Nukleotidaustausch wurde farblich gelb markiert.

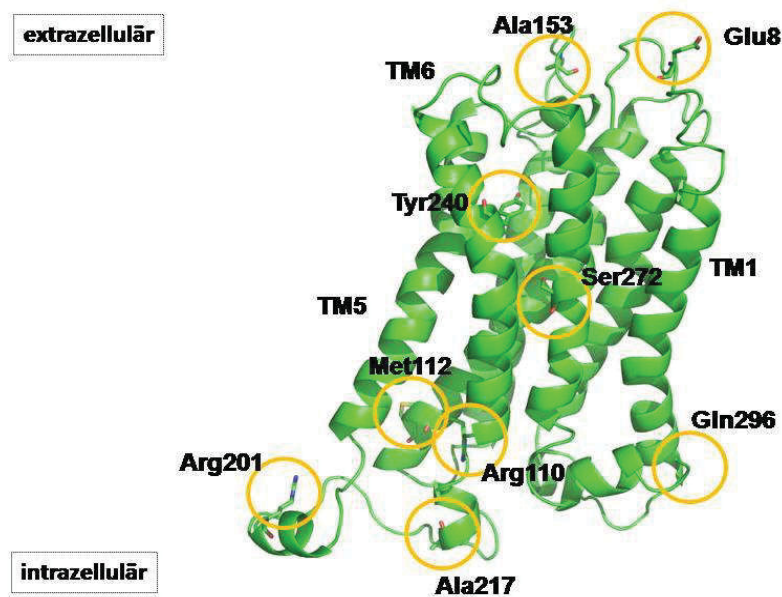


Abbildung 13: Eine 3D-Darstellung der gefundenen TGR5-Mutationen

Die obige Darstellung wurde durch Herrn Dipl.-Pharm. Christoph G. W. Gertzen, *Computational Pharmaceutical Chemistry and Molecular Bioinformatics* der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. Gohlke, entworfen. Die Abbildung zeigt die dreidimensionale Struktur des TGR5-Rezeptors und die jeweilige Lokalität der identifizierten nicht-synonymen Mutation. Die beiden genetischen Variationen Arg308Trp und Leu327Pro konnten leider in der Darstellung nicht abgebildet werden, da für jene Bereiche des C-Terminus noch keine Strukturinformation vorliegt und somit der Bereich nicht moduliert werden kann.

Sechs dieser genetischen Veränderungen wurden im Hinblick auf ihre Auswirkung auf die Lokalisation und Funktionalität des TGR5-Rezeptor analysiert (s. Kapitel 3.4).

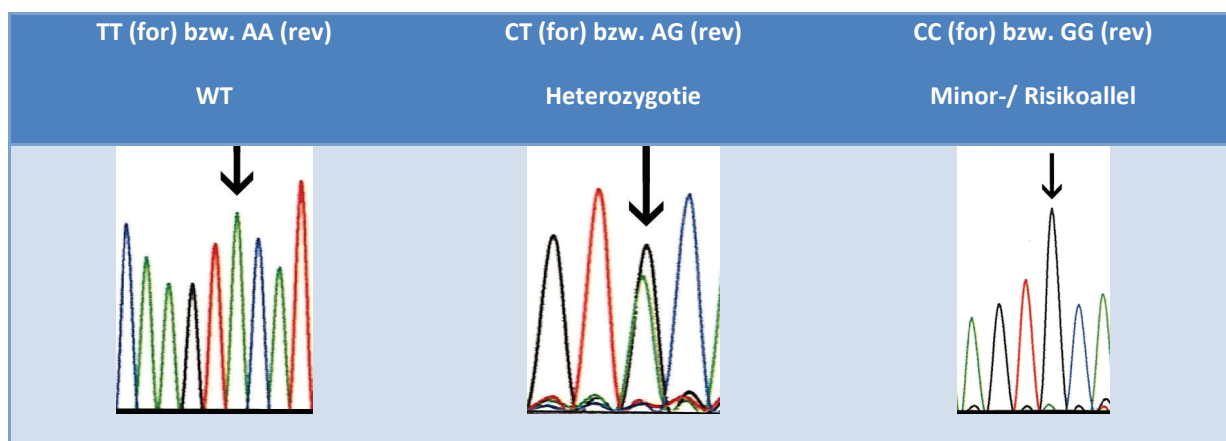
3.3 Der single nucleotide polymorphism SNP rs11554825 im Exon 1

Während der Sequenzierung konnte bei einem Großteil der Patientenproben der *single nucleotide polymorphism* (SNP) rs11554825 nachgewiesen werden [149, 150]. Dieser SNP ist innerhalb des nicht-codierenden Exon 1 lokalisiert. (s. Abbildung 12 - Nicht-synonyme TGR5-Mutationen Exon 2 & SNP rs11554825 Exon 1

3. ERGEBNISSE

Innerhalb des Exon 1 konnten für das 72. Basenpaar des TGR5-Rezeptors in beiden Kollektiven drei verschiedene Genotypen identifiziert werden – homozygot TT, heterozygot CT und homozygot CC. Das T-Allel repräsentierte das Allel, welches in der europäischen Bevölkerung am häufigsten vorkommt und im Folgenden somit als Wildtyp (WT)-Allel bezeichnet wird, wohingegen das C-Allel das seltenere Minorallel darstellt [149, 418].

Tabelle 19 – Die drei Genotypen des SNP rs11554825



Das allgemeine Kollektiv umfasste alle Personen unabhängig ihrer Diagnose. Der homozygote Genotyp CC (T72C) fand sich bei 137 der Patienten (19,03%). Bei 356 untersuchten Proben ergab die Sequenzierung eine Heterozygotie T72C/T (49,44%), wohingegen bei 227 TGR5-Sequenzen (31,53%) ausschließlich das T-Allel vorlag (T72T). Die C-Allel-Häufigkeit betrug 0,4375, die des T-Allels 0,5625.

Das HCV-Kollektiv zeigte vergleichbare Allel-Häufigkeiten. Die Heterozygotie war auch hier der vorherrschende Genotyp. Von den 472 untersuchten HCV-Patientenproben wiesen 77 den Genotypen CC auf (16,31%). 55,08% (260) der Patienten waren heterozygot (CT) und 135 HCV-Erkrankte zeigten die TT-Variante (C72T - 28,6%). Die Häufigkeit des C-Allels ergab 0,4386, wohingegen das T-Allel eine Frequenz von 0,5614 aufwies.

Eine Korrelation der drei Genotypen des Exon 1-SNP mit dem aktuellen HCV-Infektionsstatus und dem Geschlecht sowie die jeweilige C-Allelhäufigkeit zeigen die Tabellen 20-23.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 20 - Die Korrelation des SNP (T72T = TT, WT) mit dem Geschlecht und HCV-Status

HCV-Status	Männer	Frauen	Insgesamt	Anteil an Gesamtzahl
Aktive Infektion	32	36	68	50,37%
Ausgeheilte Infektion	39	28	67	49,63%
Insgesamt	71	64	135	

Tabelle 21 - Die Korrelation des SNP (T72C/T = CT) mit dem Geschlecht und HCV-Status

HCV-Status	Männer	Frauen	Insgesamt	Anteil an Gesamtzahl
Aktive Infektion	58	90	159	61,15%
Ausgeheilte Infektion	70	42	101	38,85%
Insgesamt	128	132	260	

Tabelle 22 - Die Korrelation des SNP (T72C = CC) mit dem Geschlecht und HCV-Status

HCV-Status	Männer	Frauen	Insgesamt	Anteil an Gesamtzahl
Aktive Infektion	24	22	46	59,74%
Ausgeheilte Infektion	15	16	31	40,26%
Insgesamt	39	38	77	

Tabelle 23 – Die C-Allelhäufigkeit in Abhängigkeit von Infektionsstatus und Geschlecht

HCV-Status	Männer	Frauen
Aktive Infektion	0,46	0,48
Ausgeheilte Infektion	0,40	0,43
Insgesamt	0,43	0,44

3. ERGEBNISSE

Für den SNP fanden sich keine Unterschiede in der Geschlechterverteilung. Bei allen drei Genotypen waren annähernd gleich viele Frauen und Männer sequenziert worden. Auch die entsprechenden prozentualen Anteile an der Gesamtzahl erkrankter und genesener Patienten mit dem jeweiligen Genotypen C72C oder C72C/T waren kaum unterschiedlich. Etwa 60% der Patienten zeigten eine chronisch replikative (= aktive) Infektion, wohingegen rund 40% eine ausgeheilte HCV-Infektion aufwiesen. Die C-Allelhäufigkeit zeigte keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Auffällig war, dass in der Gruppe des heterozygoten SNP trotz ausgeglichenem Geschlechterverhältnis mehr Männer eine ausgeheilte HCV-Infektion zeigten, wohingegen eine größere Anzahl an Frauen weiterhin an einer aktiven Virusinfektion erkrankt waren. Bei aktiver Infektion zeigten Männern eine C-Allelhäufigkeit von 0,46, Frauen eine von 0,48. Unter den ausgeheilten Patienten lag die C-Allelhäufigkeit bei 0,40 (Männer) respektive 0,43 (Frauen). Die Ergebnisse zeigten einen Trend dahingehend, dass die Häufigkeit des C-Allels bei Patienten mit aktiver HCV-Infektion höher, jedoch nicht signifikant höher, war als in der Gruppe der Patienten mit ausgeheilter Infektion.

3.4 Zellbiologische Charakterisierung von Mutationen in der TGR5-CDS

Im Rahmen der Dissertation wurden sechs der elf identifizierten, nicht-synonymen Mutationen durch Lokalisations- und Funktionsanalysen des Rezeptors weiterführend charakterisiert. Zum Vergleich der durch die genetischen Variationen an der Aminosäurestelle 8, 112, 201, 240, 296 und 327 verursachten Veränderungen wurde initial der TGR5-Wildtyp durch einen Luciferase-Assay analysiert. Die Methoden dieser zellbiologischen Analysen waren im Vorfeld in der AG Keitel etabliert worden [149, 150, 155].

Zur Untersuchung der Rezeptorfunktion wurde ein cAMP-responsives Luciferase Konstrukt verwendet [300]. Dementsprechend korrelierte die Luciferase-Aktivität mit dem cAMP-Anstieg in der Zelle nach TGR5-Aktivierung. TGR5-transfizierte Zellen zeigten nach

3. ERGEBNISSE

Stimulation durch DMSO eine geringe Luciferaseaktivität, welche als Kontrolle (Ko) den Wert 1,0 erhielt. Forskolin (F) als Positivkontrolle hingegen führte zu einer deutlichen Aktivitätszunahme der Luciferaseaktivität und induzierte rezeptorunabhängig die cAMP-Produktion. TLC zeigte in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1; 0,5; 2,5 und 10 μM) einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Luciferaseaktivität. Bereits ab TLC-Konzentrationen von 2,5 μM wurde eine maximale Steigerung der Luciferaseaktivität beobachtet [149, 150].

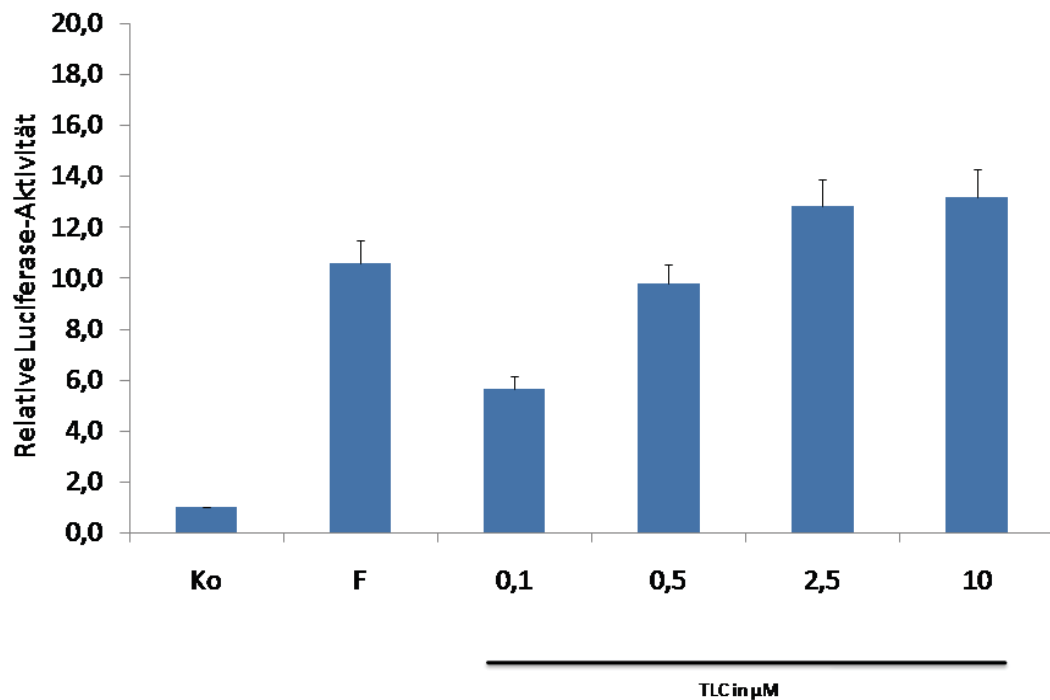


Abbildung 14 - Die Funktionsanalyse des WT

Die Abbildung stellt die Rezeptoraktivität des TGR5-WT gemessen an der Luciferaseaktivität und Lichtemission bei Stimulation durch die Kontrolle DMSO (Ko), die Positivkontrolle Forskolin (F) sowie ansteigende TLC-Konzentrationen dar. Das Enzym katalysiert die Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin. Hierbei werden Photonen freigesetzt, die ein Maß für die Aktivität des Rezeptors darstellen. Die Stimulation mit ansteigenden GS-Konzentrationen (TLC 0,1; 0,5; 2,5 und 10 μM) zeigt beim WT ein asymptotisches Verhalten der GS-Konzentration und der Luciferaseaktivität.

3. ERGEBNISSE

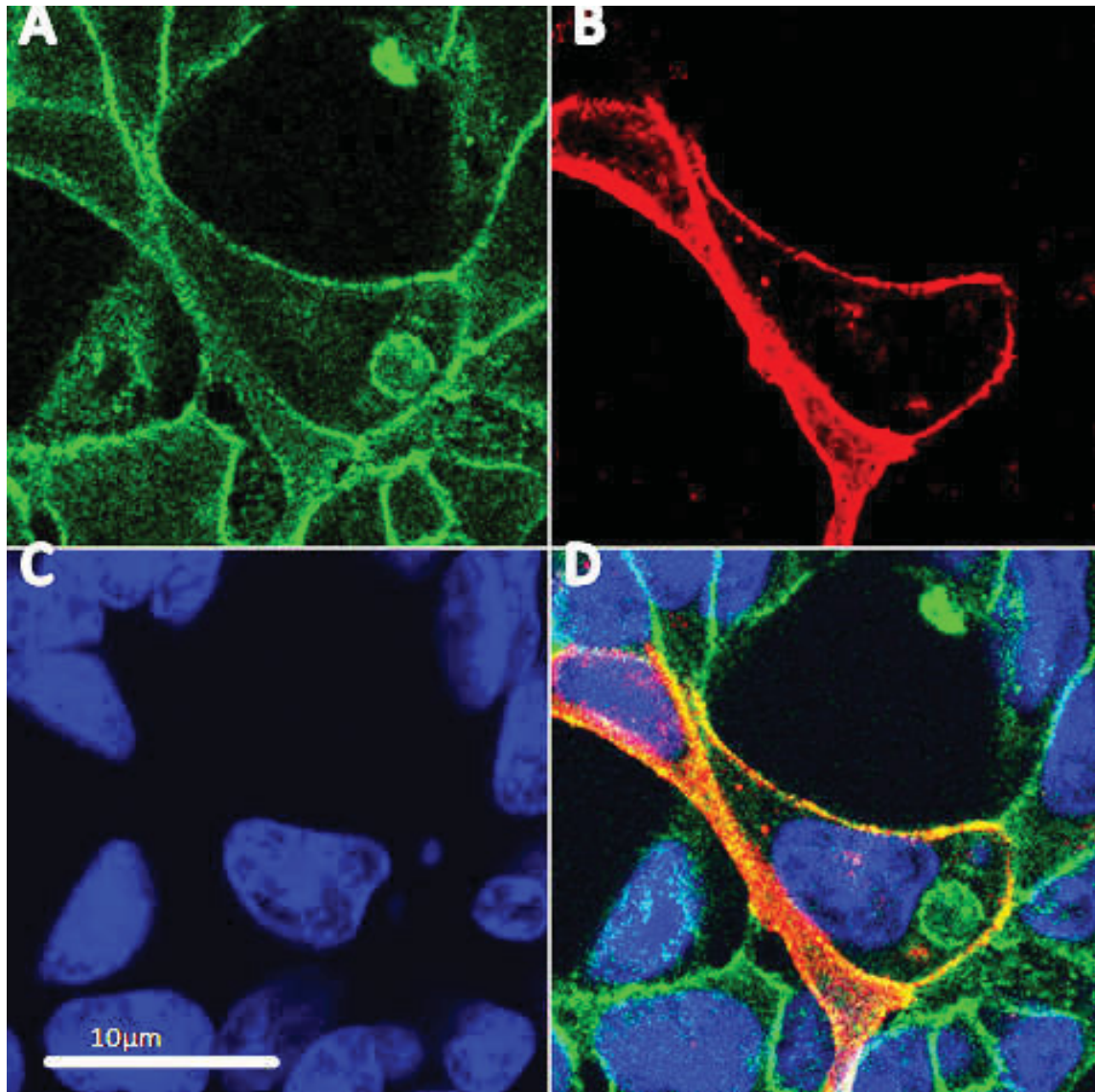


Abbildung 15 - Die Immunfluoreszenzdarstellung des TGR5-WT

Die Abbildung zeigt die physiologische Lokalisation des TGR5-Rezeptors in der PM von HEK293-Zellen. A) Na⁺/K⁺-ATPase als Zellmembranmarker grünfluoreszierend. B) TGR5-Rezeptor in der PM rotfluoreszierend. C) Zellkern blaufluoreszierend. D) merge. Die Balkengröße entspricht 10 µm.

3. ERGEBNISSE

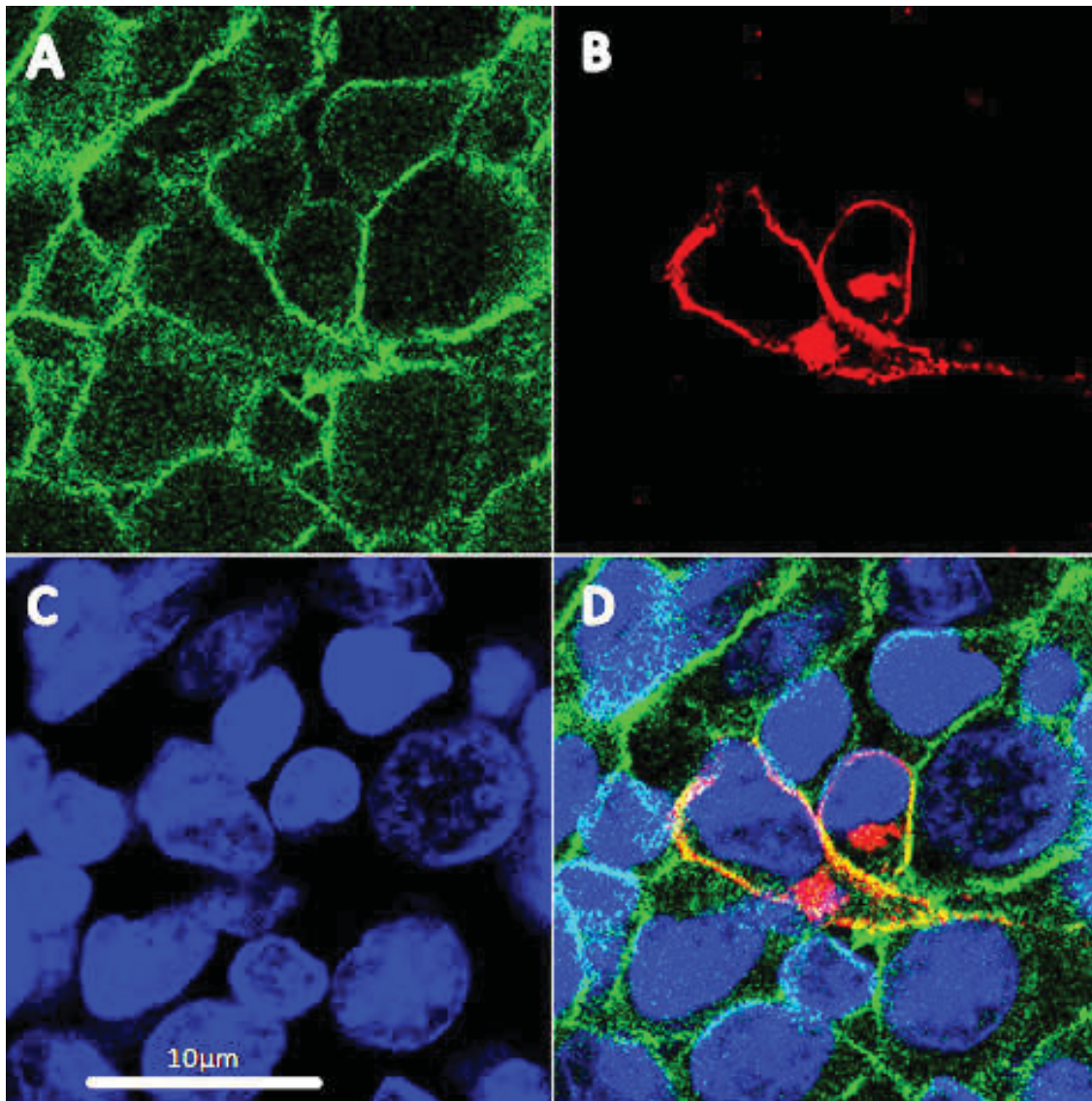


Abbildung 16 - Die Immunfluoreszenzmessung des TGR5-WT 2

Diese Abbildung insbesondere Bild B zeigt zusätzlich zur Abbildung 15, dass der Rezeptor nicht nur in der PM, sondern auch in intrazellulären vesikulären Strukturen lokalisiert ist (a.e. Golgi-Apparat).

Wie in den obigen Abbildungen zu erkennen ist, ist der TGR5-Rezeptor (rot) nicht nur in der PM von transfizierten HEK293-Zellen, sondern auch intrazellulär in vesikulären Strukturen lokalisiert, welche a.e. den Golgi-Apparat darstellen. Die Ko-Lokalisation des Rezeptors mit der Na^+/K^+ -ATPase (grün) in der PM der HEK293-Zellen wird anhand der Immunfluoreszenzdarstellung deutlich. Die Na^+/K^+ -ATPase ist ein in der Zellmembran verankertes Enzym zur Aufrechterhaltung des Ionenhaushalts und des Ruhemembranpotentials. Sie wurde als Marker für die PM verwendet.

3.4.1 TGR5-p.E8K

Die Mutation an der 8. AS-Position führte zu einem Austausch der AS Glyzin zu Lysin. Im Luciferase-Aktivitäts-Assay fand sich eine signifikant verminderte Aktivierbarkeit bei niedrigen (0,1 μ M) TLC-Konzentrationen. TLC-Konzentrationen von 0,5, 2,5 und 10 μ M hingegen führten zu einer mit dem WT vergleichbaren Aktivität des Rezeptors. Insgesamt entspricht dies einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungsbeziehung.

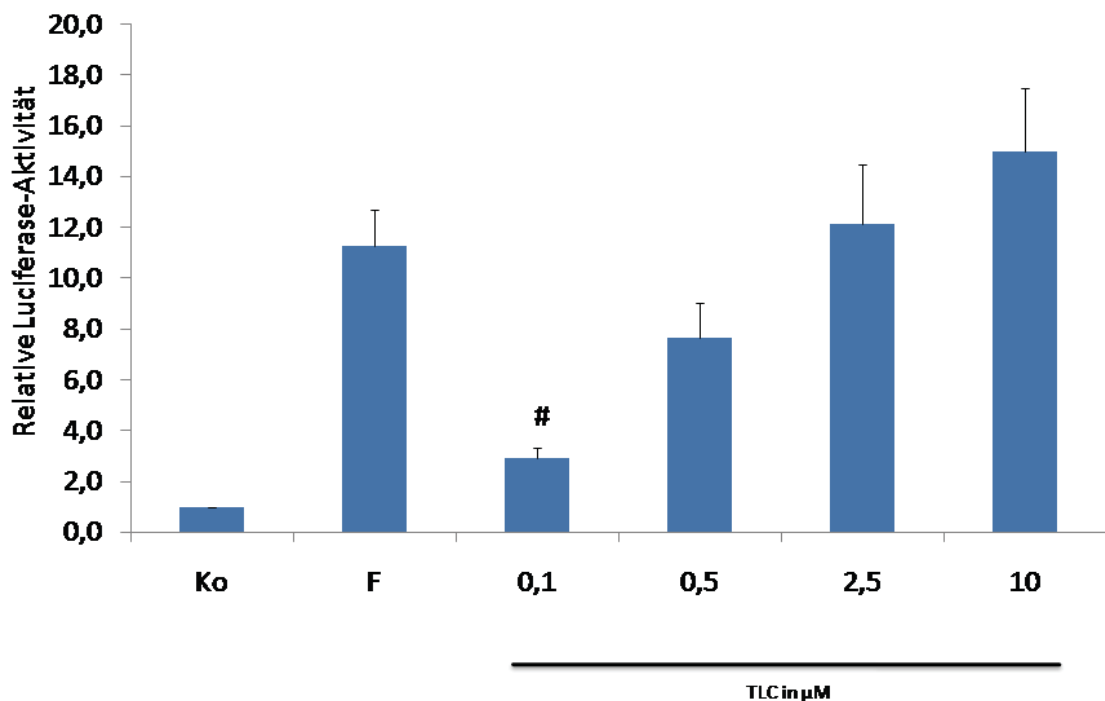


Abbildung 17 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.E8K

Die Abbildung stellt die Funktionsanalyse der Mutation p.E8K dar. Die beiden Kontrollen führen erwartungsgemäß zu vergleichbaren Luciferaseaktivitäten wie der WT. Die Mutation führt zu einer signifikant verminderten Ansprechbarkeit des Rezeptors gegenüber einer niedrigen (0,1 μ M) TLC-Konzentrationen (# $p < 0,05$). Höhere TLC-Konzentrationen von 0,5 bis 10 μ M hingegen zeigen vergleichbare Aktivitäten wie beim WT.

3. ERGEBNISSE

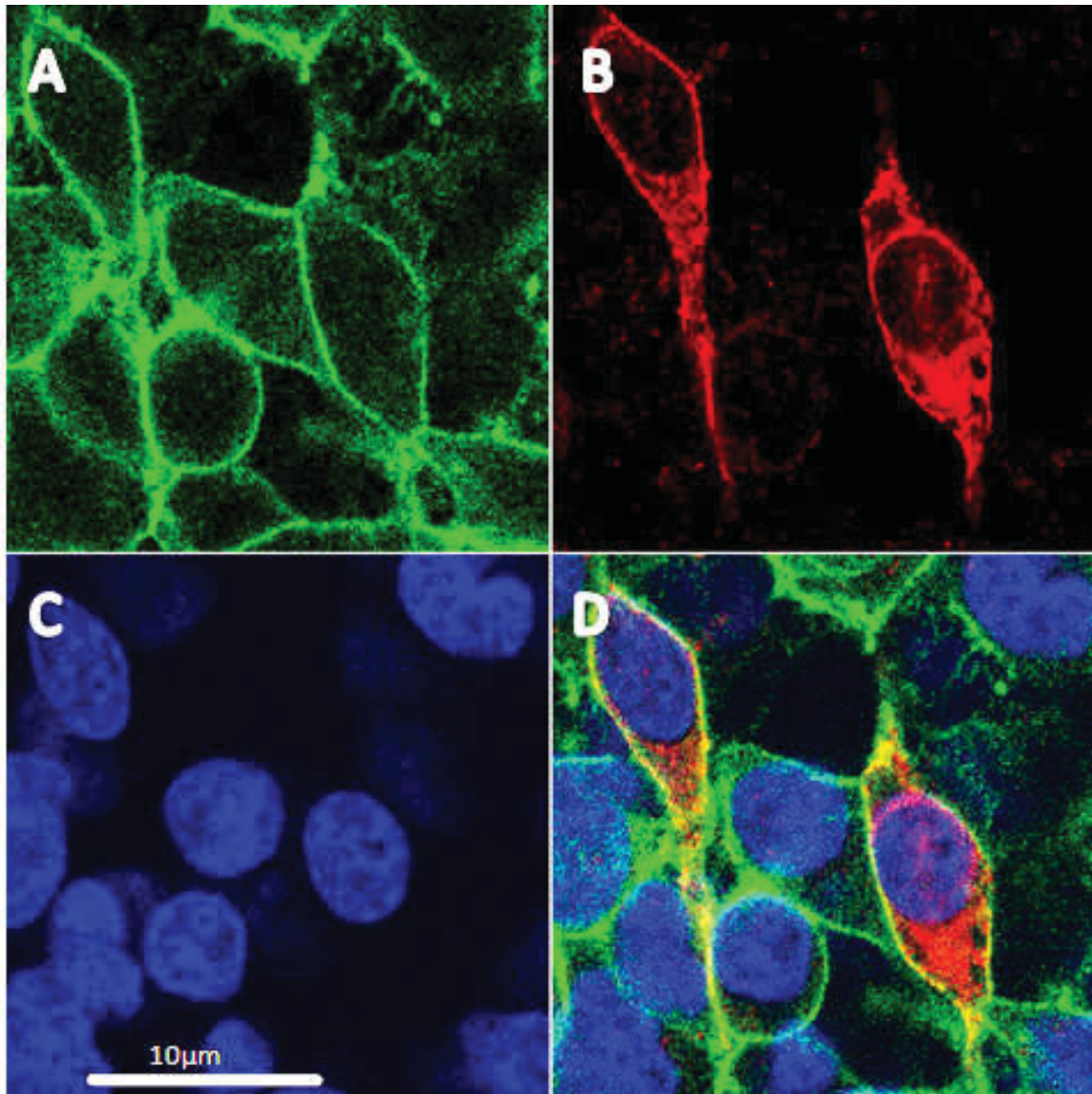


Abbildung 18 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.E8K

Die Abbildung zeigt die Lokalisation des TGR5-Rezeptors in HEK293-Zellen. A) Na^+/K^+ -ATPase als Zellmembranmarker grünfluoreszierend. B) TGR5-Rezeptor in der PM rotfluoreszierend. C) Zellkern blaufluoreszierend. D) merge. Die Balkengröße entspricht 10 μm . Die Immunfluoreszenzdarstellung verdeutlicht, dass der mutierte TGR5-Rezeptor nicht nur in der PM der HEK293-Zellen exprimiert wird, sondern sich zu einem Großteil intrazellulär befindet. Die Kernmembran als Bestandteil des rauen ER ist sichtbar. Der Einsatz des spezifisch an das ER bindenden Primärantikörpers PDI (Proteindisulfid Isomerase) ermöglicht die Demaskierung des ERs (nicht zusätzlich dargestellte Spezialfärbung).

In der Immunfluoreszenzdarstellung imponierte eine Abweichung der zellulären Verteilung. Der mutierte Rezeptor war nicht nur wie der WT in der PM und wenigen intrazellulären vesikulären Strukturen exprimiert, sondern wurde auch vermehrt in einem anderen intrazellulären Kompartiment lokalisiert. Die deutliche Erkennbarkeit der Kernmembran, als Bestandteil des rauen ERs spezifizierte den Ort der intrazellulären Expression. Diese

3. ERGEBNISSE

intrazelluläre Struktur wurde durch die Färbung mit dem Antikörper PDI (Proteindisulfid Isomerase) bestätigt und als ER identifiziert. (s. auch Immunfluoreszenz Mutation Y240D)
Der mutierte Rezeptor war somit teilweise im ER lokalisiert.

3.4.2 *TGR5-p.M112V*

Die genetische Veränderung des Triplets ATG in GTG führte bei der Mutation an der 112. AS zu einem Austausch von Methionin zu Valin. Im Luciferase-Assay wurde die Auswirkung auf die Rezeptoraktivierbarkeit der Mutation analysiert. Sie zeigte im Vergleich zum WT keine signifikanten Unterschiede gegenüber TLC. Auch in der Immunfluoreszenzdarstellung fanden sich keine Unterschiede in der Lokalisation des Rezeptors, da der mutierte Rezeptor unverändert in der PM nachgewiesen wurde.

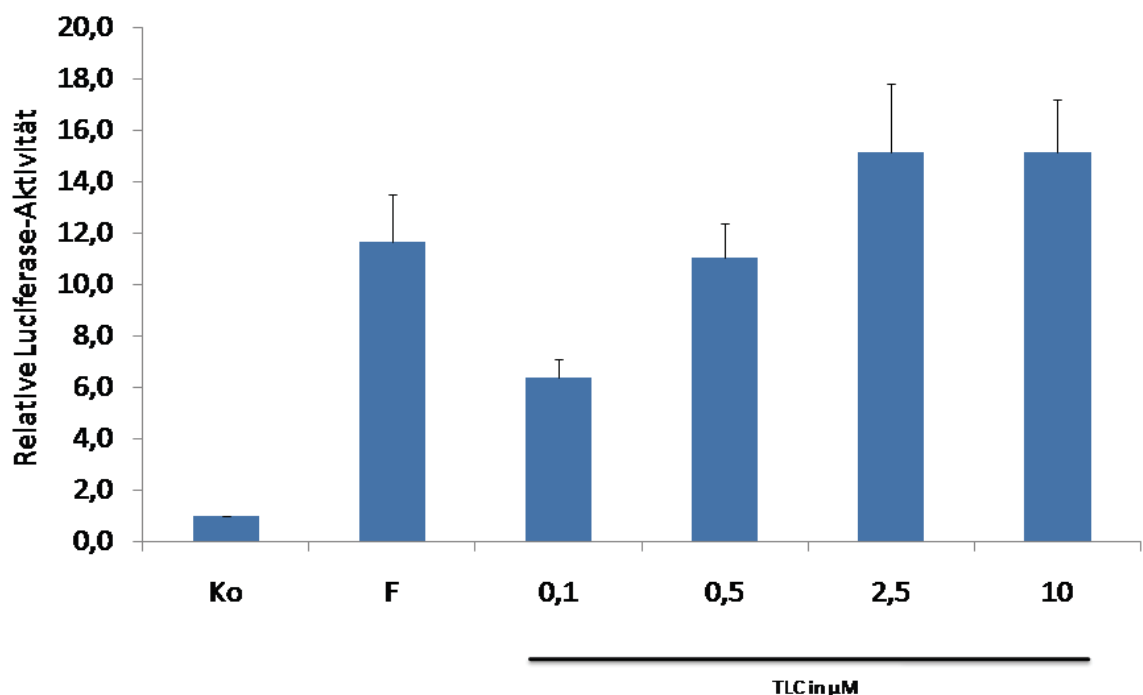


Abbildung 19 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.M112V

Die Abbildung verdeutlicht, dass die Mutation p.M112V nach TLC-Stimulation zu vergleichbaren Rezeptor-Aktivitäten wie der WT führt.

3. ERGEBNISSE

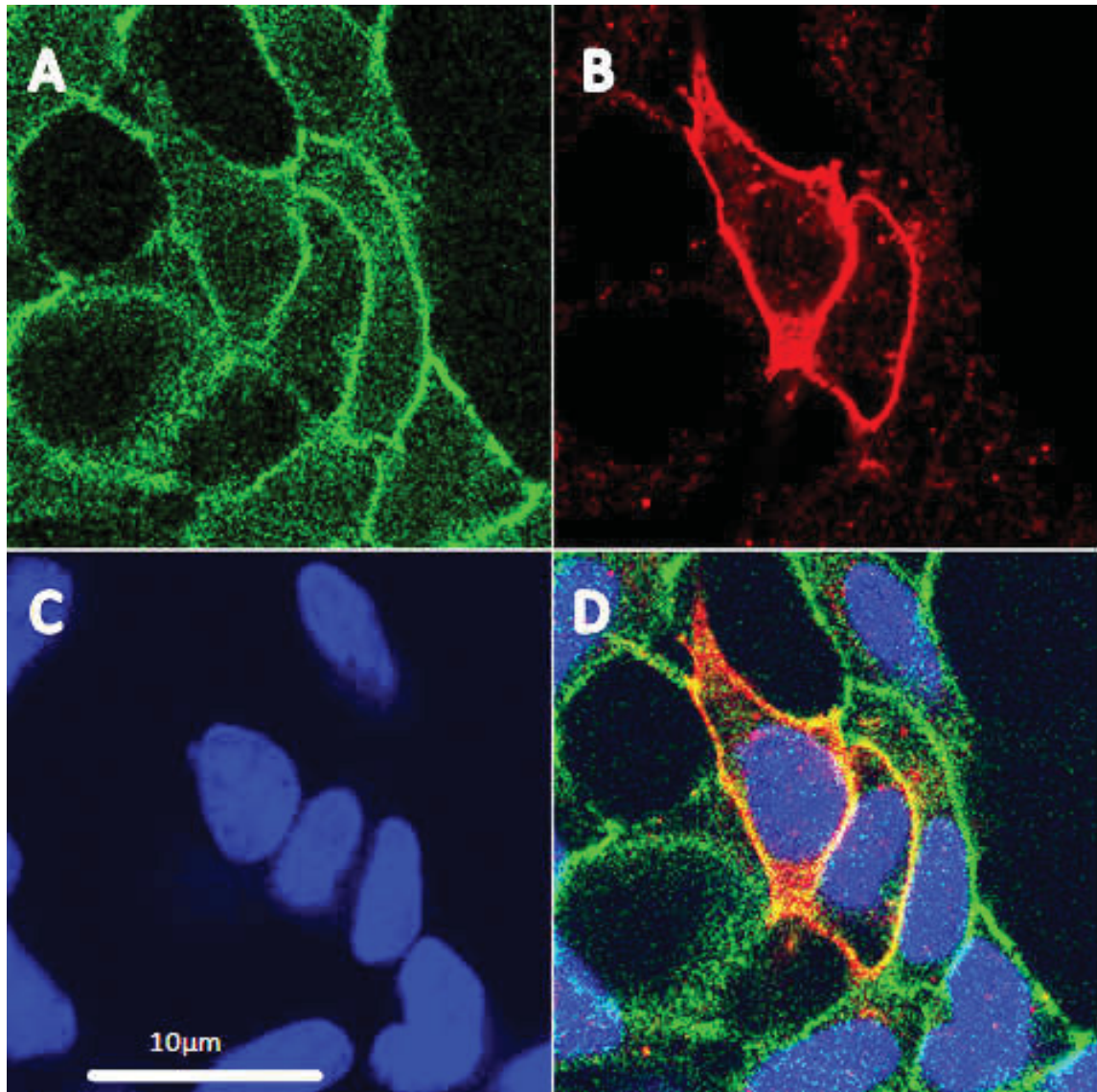


Abbildung 20 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.M112V

p.M112V führt zur physiologischen Lokalisation des TGR5-Rezeptors in der PM von HEK293-Zellen. A) Na⁺/K⁺-ATPase als Zellmembranmarker grünfluoreszierend. B) TGR5-Rezeptor in der PM rotfluoreszierend. C) Zellkern blaufluoreszierend. D) merge. Die Balkengröße entspricht 10 μm.

3.4.3 *TGR5-p.R201W*

An der 201. AS änderte sich die Basenabfolge des Triplets CGG in TGG. Es resultierte der AS-Austausch von Arginin in Tryptophan. Der Rezeptor zeigte in der Funktionsanalyse im Vergleich zum WT eine normale Aktivität und auch in der Immunfluoreszenzdarstellung imponierte eine unveränderte Lokalisation in der PM und im Golgi-Apparat.

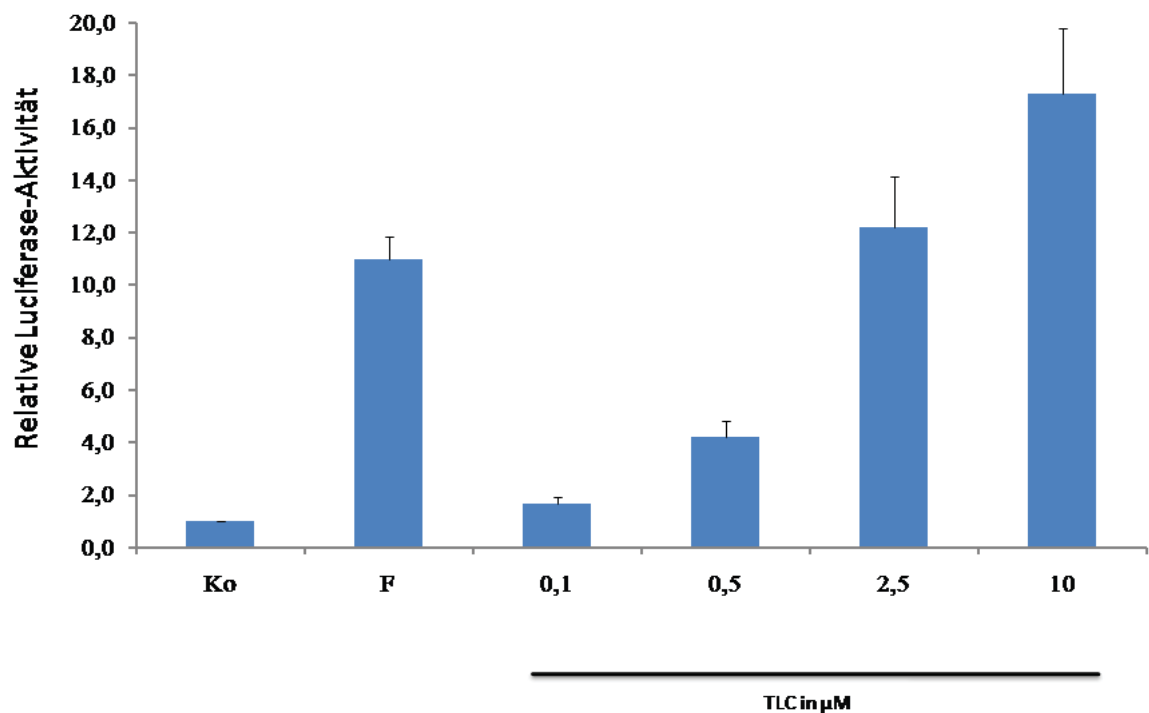


Abbildung 21 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.R201W

Die Abbildung stellt die Funktionsanalyse der Mutation p.R201W dar. Die beiden Kontrollen führen erwartungsgemäß zu vergleichbaren Luciferaseaktivitäten wie der WT. Auch die Stimulation mit verschiedenen TLC-Konzentrationen spiegelt die Aktivität des WT wider.

3. ERGEBNISSE

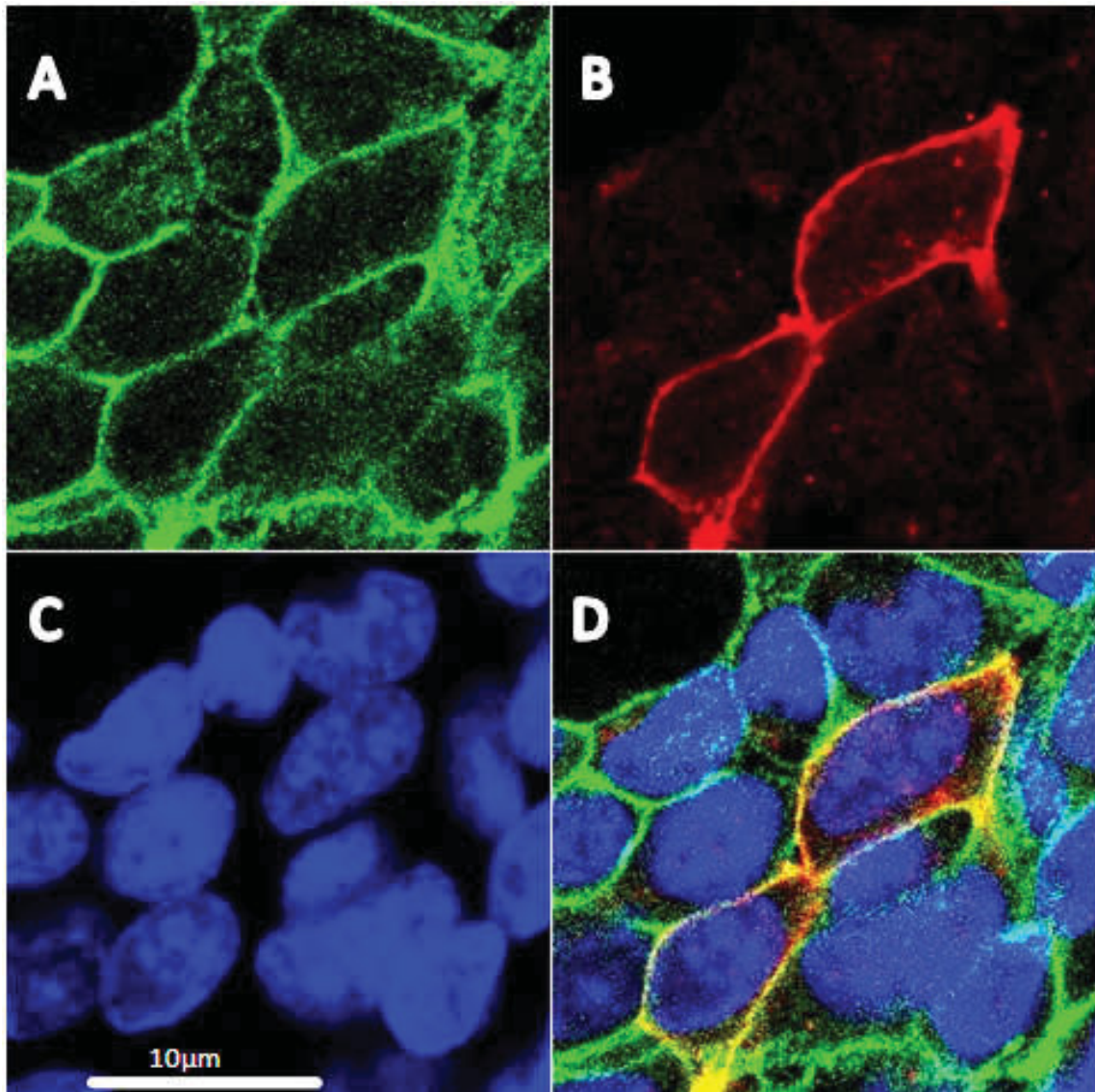


Abbildung 22 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.R201W

Auch p.R201W führt zur physiologischen Lokalisation des TGR5-Rezeptors in der PM von HEK293-Zellen. A) Na^+/K^+ -ATPase als Zellmembranmarker grünfluoreszierend. B) TGR5-Rezeptor in der PM rotfluoreszierend. C) Zellkern blaufluoreszierend. D) merge. Die Balkengröße entspricht 10 μm .

3.4.4 TGR5-p.Y240D

Der Austausch der AS Tyrosin durch Prolin an AS-Stelle 240 des TGR5-Proteins wurde durch den Nukleotidaustausch TAC in GAC verursacht. Die Funktionsanalyse des Rezeptors zeigte deutliche Funktionseinbußen. Die Mutation führte zu einer signifikanten Reduktion der Rezeptoransprechbarkeit gegenüber allen getesteten TLC-Konzentrationen. Lediglich Forskolin führte zu der erwarteten Erhöhung der cAMP-Konzentration. In der Immunfluoreszenzdarstellung wurde der Rezeptor vornehmlich in intrazellulären Strukturen detektiert, die analog zur Mutation p.E8K mit Hilfe des PDI-AK (Proteindisulfid-Isomerase) als ER identifiziert werden konnten.

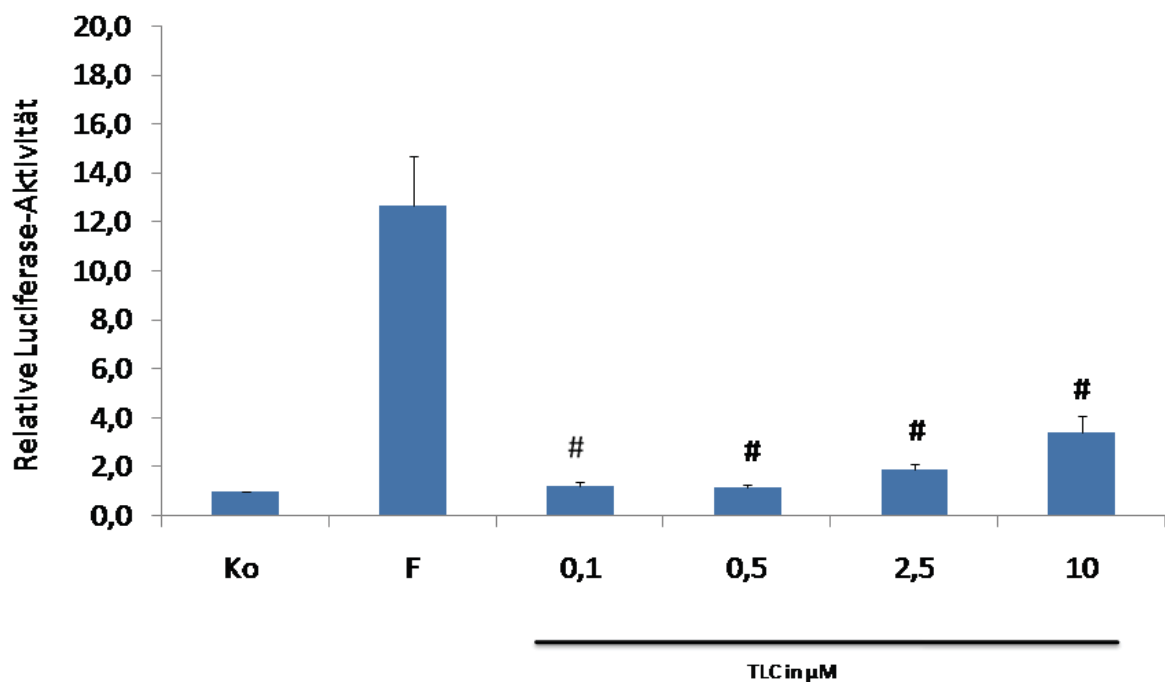


Abbildung 23 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.Y240D

Die Abbildung stellt die Funktionsanalyse der Mutation p.Y240D dar. Die beiden Kontrollen führen erwartungsgemäß zu vergleichbaren Luciferaseaktivitäten wie der WT. Abweichend ist jedoch die signifikant verringerte Ansprechbarkeit gegenüber allen getesteten TLC-Konzentrationen (# $p < 0,05$).

3. ERGEBNISSE

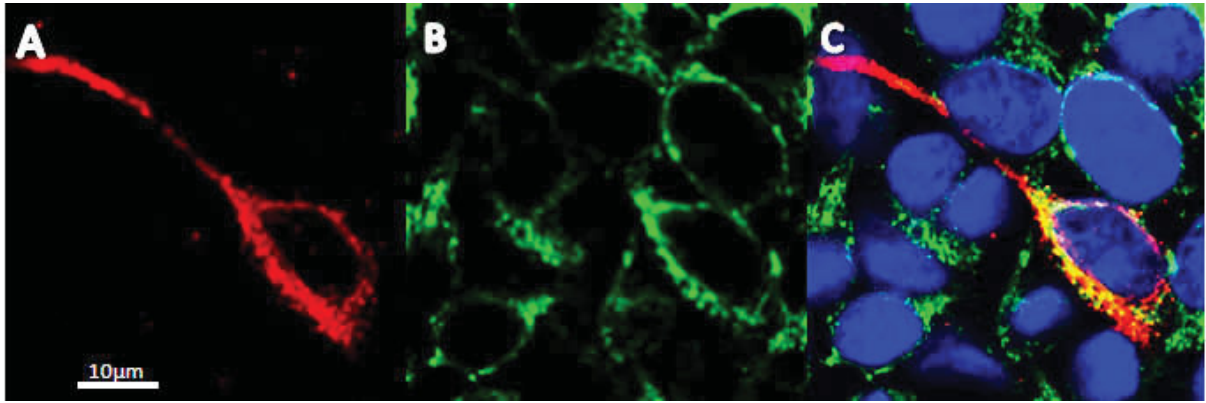


Abbildung 24 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.Y240D

Die Abbildung zeigt die Lokalisation der TGR5-Y240P-Rezeptormutante in HEK293-Zellen. Neben der physiologischen Lokalisation in der PM wird die Mutante besonders im ER angefärbt. Die separate Kernfärbung wurde aus Übersichtgründen nicht dargestellt. A) TGR5-Rezeptor in der PM rotfluoreszierend. B) PDI (Proreindisulfid-Isomerase) als ER-Marker grünfluoreszierend. C) merge. Die Balkengröße entspricht 10 µm.

3.4.5 *TGR5-p.Q296R*

Die genetische Variation an der 296. AS des TGR5-Proteins zeigte sich in einem Austausch der AS Glutamin zu Arginin. Das Triplet CAA wurde in das Codon CGA geändert. Im Luciferase-Assay fand sich eine normale Ansprechbarkeit auf verschiedene TLC-Konzentrationen. Auch die Immunfluoreszenzdarstellung verdeutlichte, dass die Mutation an der Stelle 296 zu keiner Abweichung in der Lokalisation führte. Der Rezeptor wurde wie der WT zur PM sortiert.

3. ERGEBNISSE

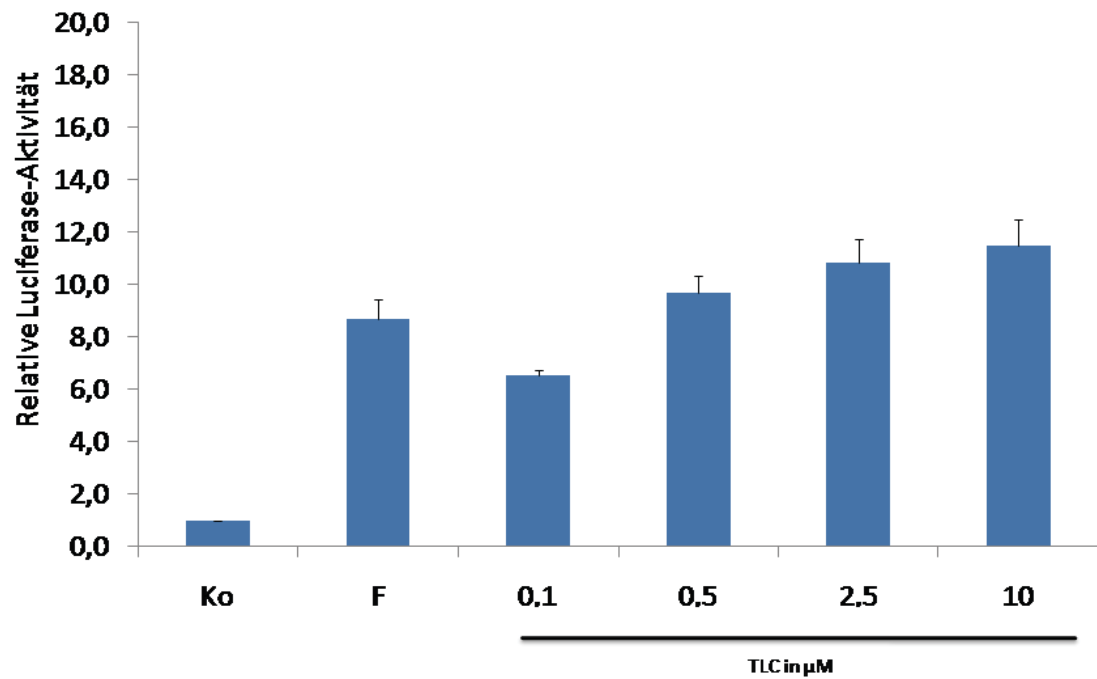


Abbildung 25 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.Q296R

Die Abbildung stellt die Funktionsanalyse der Mutation p.Q296R dar. Die beiden Kontrollen führen erwartungsgemäß zu vergleichbaren Luciferaseaktivitäten wie der WT. Auch die Stimulation mit verschiedenen TLC-Konzentrationen spiegelt die Aktivität des WT wider.

3. ERGEBNISSE

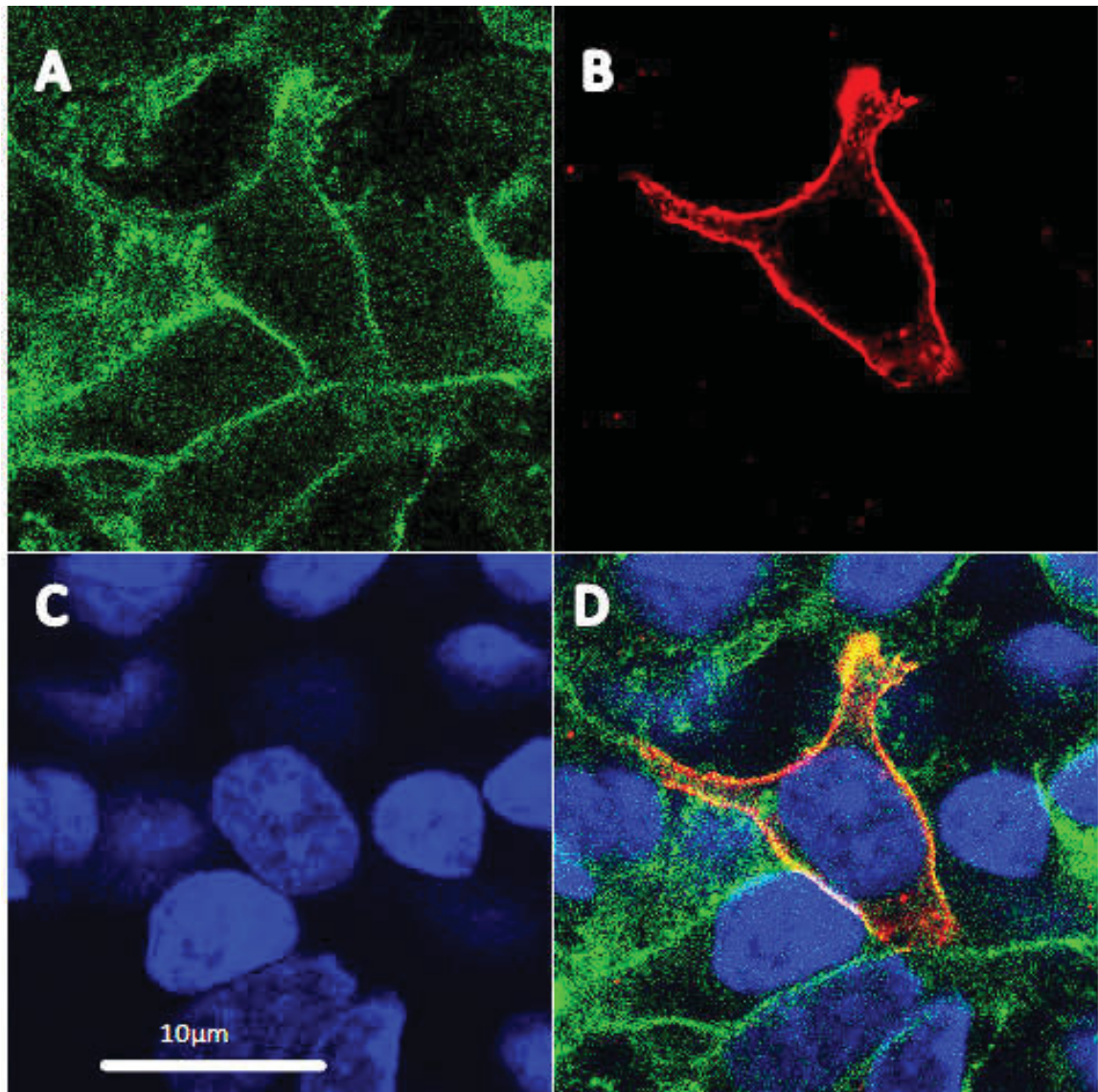


Abbildung 26 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.Q296R

p.Q296R führt zur physiologischen Lokalisation des TGR5-Rezeptors in der PM von HEK293-Zellen. Die Na^+/K^+ -ATPase ist als Zellmembranmarker grünfluoreszierend dargestellt, wohingegen der TGR5-Rezeptor in der PM rot angefärbt wird. Der Kern stellt sich durch den Farbstoff Hoechst blau dar. Das rechte untere Bild zeigt die Überlagerung der genannten Fluoreszenzen. Die Balkengröße entspricht 10 μm .

3.4.6 TGR5-p.L327P

Die genetische Veränderung des Tripletts CTG in CCG führte schließlich zu einer Mutation der 327. AS. Statt der AS Leucin codierte das Codon für Prolin. Der Austausch zeigte sowohl in der Funktions- als auch in der Lokalisationsanalyse keine signifikanten Auswirkungen. Der Rezeptor wies eine unveränderte Ansprechbarkeit sowohl gegenüber niedrigen als auch hohen TLC-Konzentrationen auf. Auch eine Antikörperfärbung konnte keine Auswirkungen der Mutation auf die Rezeptorlokalisierung verdeutlichen. Der Rezeptor war wie der WT in der PM lokalisiert.

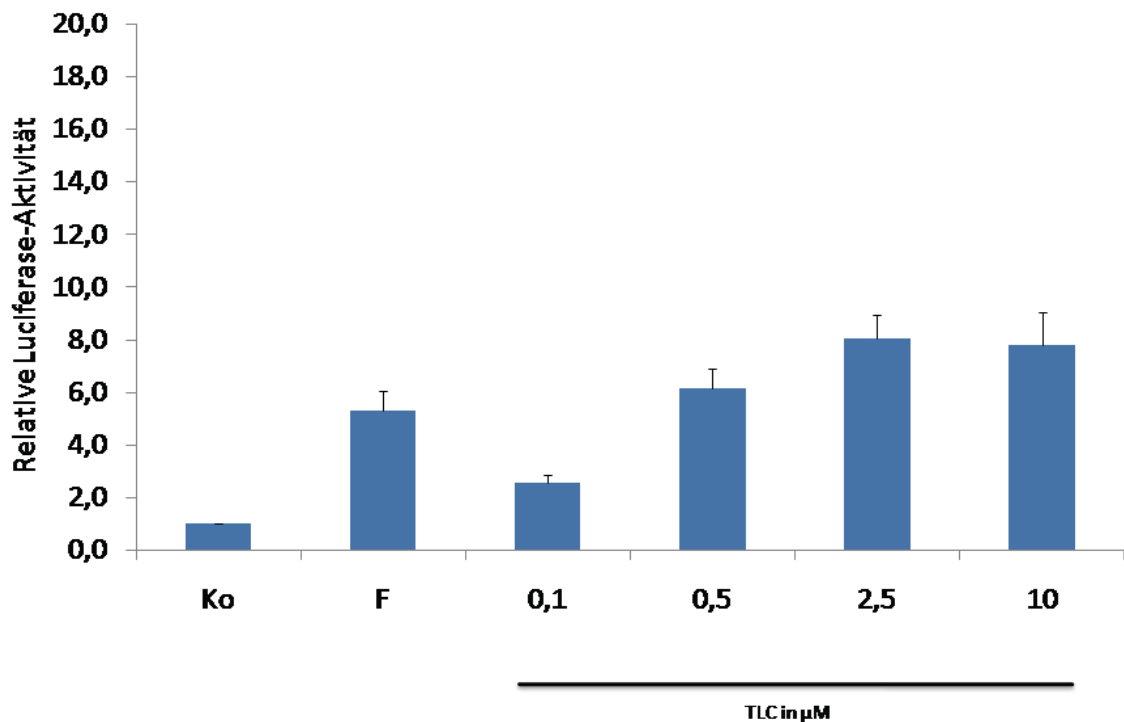


Abbildung 27 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.L327P

Die Abbildung stellt die Funktionsanalyse der Mutation p.L327P dar. Die Stimulation mit verschiedenen TLC-Konzentrationen spiegelt die Aktivität des WT wider.

3. ERGEBNISSE

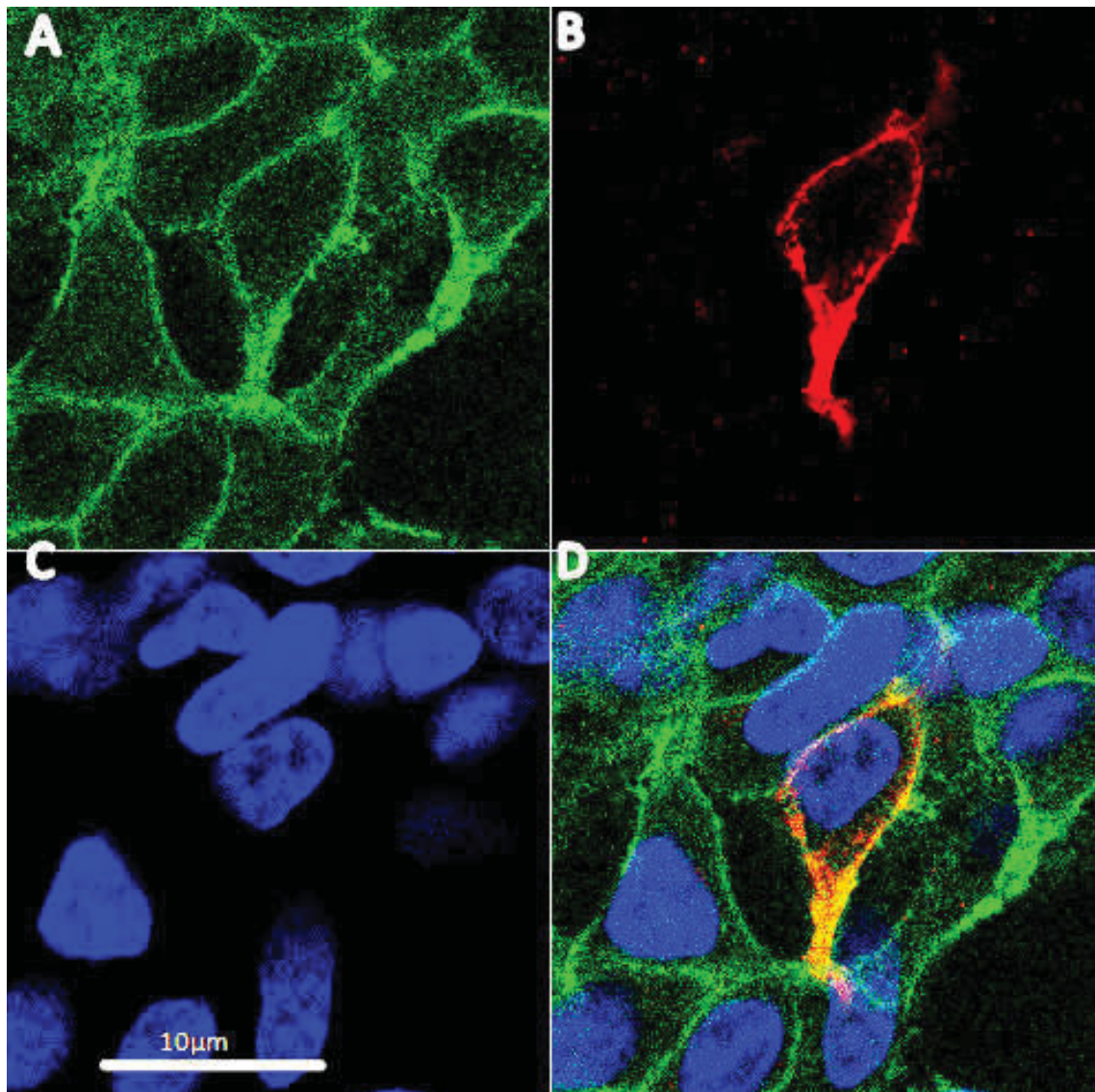


Abbildung 28 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.L327P

Die Mutation führt zur physiologischen Lokalisation des TGR5-Rezeptors in der PM von HEK293-Zellen. Die Na^+/K^+ -ATPase ist als Zellmembranmarker grünfluoreszierend dargestellt, wohingegen der TGR5-Rezeptor in der PM rot angefärbt wird. Der Kern stellt sich durch den Farbstoff Hoechst blau dar. Das rechte untere Bild zeigt die Überlagerung der genannten Fluoreszenzen. Die Balkengröße entspricht 10 μm .

4. DISKUSSION

4.1 Patientenkollektive und identifizierte Mutationen im TGR5-Gen

TGR5 ist ein membranständiger GS-Rezeptor, der in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird. In der Leber findet sich der Rezeptor in verschiedenen Nichtparenchymzellen und vermittelt antiinflammatorische, antiapoptotische, proliferative und choleretische Wirkungen. Darüber hinaus ist der Rezeptor in Makrophagen lokalisiert, in welchen er ebenfalls immunmodulatorische Funktionen hat. Dies legt nahe, dass eine Fehlfunktion von TGR5 durch Wegfall der protektiven, antiinflammatorischen und immunmodulierenden Wirkung eine Rolle in der Pathogenese zahlreicher inflammationsassoziiierter, metabolischer und hepatobiliärer Erkrankungen spielen könnte.

Genetische Untersuchungen des TGR5-Rezeptors bei PSC-Patienten hatten bereits Mutationen im TGR5-Gen identifizieren und charakterisieren können [418, 421]. Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war es bei weiteren Lebererkrankungen nach genetischen Veränderungen innerhalb des TGR5-Gens zu suchen und diese im Hinblick auf eine Veränderung der Funktionalität und der Lokalisation des Rezeptors zu charakterisieren. Schließlich wurde die Frage gestellt, ob Mutationen des Rezeptors als *Disease-Modifier* den Verlauf und das Therapieansprechen von Lebererkrankungen wie der HCV-Infektion beeinflussen könnten. Zu diesem Zweck wurde ein breites Kollektiv von Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen sowie ein zweites HCV-Kollektiv auf Mutationen innerhalb des TGR5-Gens untersucht. Einen Überblick über die zahlreichen genetischen Veränderungen und die Korrelation mit den jeweiligen Patienten bieten die Tabellen 17, 18 und 24. Bei verschiedenen Erkrankungen wurden sowohl synonyme, als auch nicht-synonyme Mutationen im TGR5-Gen nachgewiesen. Letztere zeigten nicht nur eine Veränderung der TGR5-Basensequenz, sondern auch einen Austausch in der AS-Abfolge. Die Anzahl der nicht-synonymen Austausche war jedoch deutlich geringer als die der synonymen.

Um die Auswirkungen der genetischen Veränderungen auf die Funktion und Lokalisation des Rezeptors zu analysieren wurden sechs der elf gefundenen, nicht-synonymen Mutationen in

4. DISKUSSION

TGR5-cDNA-Konstrukte eingebracht, in HEK293-Zellen transient transfiziert und die Aktivität des Rezeptors anhand der cAMP-Synthese mit Hilfe eines cAMP-sensitiven Luciferase-Assays evaluiert. Außerdem wurde die Lokalisation des mutierten Rezeptors durch Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laserscanning Mikroskopie untersucht.

Insgesamt wurden neben dem häufigen Exon 1 SNP rs11554825 90 synonyme und nicht synonyme Mutationen identifiziert.

4.1.1 Synonyme Mutationen im Exon 2

Innerhalb des Exon 2, das die codierende Sequenz enthält, zeigten sich insgesamt 19 verschiedene Mutationen (acht synonyme und elf nicht-synonyme). Die mit Abstand häufigste aller gefundenen Veränderungen des TGR5-Gens war die synonyme Mutation R216R p.(=). Sie trat bei 52 Patienten mit verschiedensten Erkrankungen wie HCV, Overlap-Syndrom aus PBC und AIH, HBV, Leberzirrhose und NASH auf. Auffallend war die Beobachtung, dass nahezu alle Patienten mit Nachweis der nicht-synonymen Mutation p.A217P auch den synonymen Austausch R216R p.(=) zeigten. Schließlich fanden sich fünf weitere synonyme Mutationen - 3x G7G p.(=) [HBV, HCV], 5x S212S p.(=) [HBV, HCV, HCC, NASH], 1x F233F p.(=) [unklare Leberwerterhöhung], 1x Q296Q p.(=) [Rektumkarzinom] und 1x P255P p.(=) [Leberzirrhose]. Die Bedeutung der beschriebenen Mutationen ist unklar. Eine adäquate Analyse gestaltet sich schwierig, da diese Mutationen nicht zu einer veränderten AS-Sequenz führen. Falls eine Krankheitsassoziation bestünde, so ließe sich dies anhand der kleinen vorliegenden Kohorte nicht darstellen. Hierfür wären deutlich größere Kollektive, wie sie von Hov et al. bei der PSC untersucht wurden, notwendig [150, 421].

4.1.2 Nicht-synonyme Mutationen im Exon 2

Insgesamt wurden elf nicht-synonyme Varianten innerhalb des TGR5-Gens identifiziert. p.R110H wurde von Frau Spomer (AG Keitel) in ihrer Dissertation bereits analysiert. Die drei

4. DISKUSSION

Mutationen p.A153V, p.A217P und p.S272G hatten Hov et al. im Rahmen der PSC-Studie bereits charakterisiert [150, 421]. Die weiteren Mutationen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden und erstmalig beschrieben (p.E8K, p.M112V, p.R201W, p.Y240D, p.Q296R, p.R308W und p.L327P). Von den nicht-synonymen Mutationen trat die p.A217P am häufigsten, d.h. bei zwölf Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen, auf.

Die einzelnen nicht-synonymen Mutationen wurden bei Patienten mit diversen Krankheitsbildern beobachtet. In der Hepatitis C-Gruppe fanden sich neben p.A217P die Mutationen p.Y240D, p.Q296R, die potentielle Compound-Heterozygotie p.A153V und p.R308W sowie die Mutation p.L327P. Im Rahmen des Screening von HBV-Patienten wurden die genetische Variationen p.E8K, p.R110H, p.M112V und p.S272G nachgewiesen.

Von den identifizierten nicht-synonymen Mutationen zeigten p.E8K, p.R110H[#], p.A217P*, p.Y240D und p.S272G* Veränderungen der Rezeptoraktivität und/oder –lokalisation, wohingegen p.M112V, p.A153V*, p.R201W, p.Q296R, p.R308W und p.L327P keine Unterschiede in der Rezeptorlokalisation und TLC-abhängigen Aktivierbarkeit aufwiesen (unveröffentlichte Daten AG Keitel, [#]Dissertation Frau Spomer, *Hov et al. [418, 421]). Für die Funktionsanalyse der Mutationen wurde lediglich die Stimulation durch den potenten TGR5-Agonisten TLC verwendet. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wirkung anderer GS durch die jeweilige Mutation beeinträchtigt ist. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Halbwertszeit des Rezeptorproteins in der PM verändert wurde.

Darüber hinaus ist auffallend, dass lediglich heterozygote Mutationen gefunden wurden. Bei einem HCV-Patienten fanden sich die beiden nicht-synonymen Mutationen p.A153V und p.R308W. Das Vorliegen einer Compound-Heterozygotie ist potentiell möglich, jedoch mit den zur Verfügung stehenden Patientenproben nicht bewertbar. Um herauszufinden, ob beide Mutationen auf einem Allel lokalisiert sind, wäre die genetische Analyse der Eltern oder der Kinder notwendig. Entsprechende Proben standen jedoch nicht zur Verfügung.

Tabelle 24 – Zusammenfassung identifizierter TGR5-Mutationen und ihren Auswirkungen

Mutation	Triplett	Funktionalität	Lokalisation	Potentielle Ursachen
p.E8K Glu8Lys	GAG → AAG	Dosis-Wirkungs-Beziehung nach rechts verschoben signifikant geringeres Ansprechen auf niedrige TLC-Konzentrationen	PM intrazellulär im ER N-Terminus	Fehlerhafter Transport? Fehlfaltung? Alternatives <i>Splicing</i> ? Posttranslationale Modifikation? Interaktion Signalpeptide & Transportfaktoren?
p.R110H Arg110His	CGC → CAC	Dosis-Wirkungs-Beziehung nach rechts verschoben signifikant geringeres Ansprechen auf niedrige TLC-Konzentrationen (Dissertation Frau Spomer)	PM Intrazellulär im ER ERY-Motiv - Übergang von der 3. TM-Domäne und der 2. intra- zellulären Schleife	Rezeptor- konformation Interaktion mit G-Protein
p.M112V Met112Val	ATG → GTG	Physiologische Rezeptorfunktion Keine funktionellen Auswirkungen	PM	
p.A153V Ala153Val	GCC → GTC	Physiologische Rezeptorfunktion Keine funktionellen Auswirkungen (Hov et al.[149, 150])	PM	
p.R201W Arg201Trp	CGG → TGG	Physiologische Rezeptorfunktion Keine funktionellen Auswirkungen	PM	
p.A217P Ala217Pro	GCC →	Signifikant verminderte Rezeptorfunktion bei allen Konzentrationen	Zu 89% in der PM 3. intrazellulärer <i>Loop</i>	Interaktion mit G- Protein

4. DISKUSSION

	CCC	(Hov et al. [149, 150])		
p.Y240D Tyr240Asp	TAC → GAC	Dosis-Wirkungs-Beziehung nach rechts verschoben signifikant geringeres Ansprechen auf niedrige TLC-Konzentrationen	PM intrazellulär im ER retiniert 5. TM-Domäne	Ligandenbindung? Fehlerhafter Transport? Fehlfaltung? Alternatives <i>Splicing</i> ? Posttranslationale Modifikation? Interaktion mit Signalpeptiden und weiteren Transportfaktoren?
p.S272G Ser272Gly	AGT → GGT	Signifikant verminderte Rezeptorfunktion bei allen TLC-Konzentrationen (Hov et al. [149, 150])	Zu 80% in der PM lokalisiert 7. TM-Domäne	Konformations- veränderung Interaktion mit G- Protein
p.Q296R Gln296Arg	CAA → CGA	Physiologische Rezeptorfunktion Keine funktionellen Auswirkungen	PM	
p.R308W Arg308Trp	CGG → TGG	Physiologische Rezeptorfunktion Keine funktionellen Auswirkungen (nicht veröffentlichte Daten AG Keitel)	PM	
p.L327P Leu327Pro	CTG → CCG	Physiologische Rezeptorfunktion Keine funktionellen Auswirkungen	PM	

Die häufigste identifizierte genetische Veränderung **p.A217P** wurde bereits von Hov et al. im Rahmen ihrer TGR5-Mutationsstudie an PSC-erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen

4. DISKUSSION

beschrieben. Obwohl der mutierte Rezeptor in der PM lokalisiert war kam es zu einem Funktionsverlust des Proteins [149, 150]. Die Mutation ist in der dritten intrazellulären Schleife lokalisiert, welche bei anderen GPCRs essentiell für die Interaktion mit G-Proteinen ist, so dass eine veränderte Interaktion mit dem G-Protein zur gestörten Funktion des Rezeptors führen könnte [422–425].

TGR5-Sequenzierungsanalysen von 543 gesunden Blutspendern der universitären Blutbank (Prof. Dr. Scharf Institut für Hämostaseologie Hämotherapie und Transfusionsmedizin) ergaben 35 Mutationen innerhalb des TGR5-Gens (unveröffentlichte Studie AG Keitel in Kooperation mit Prof. Dr. Scharf + Dissertation Frau Spomer). Auch hier wurde die Mutation p.A217P identifiziert. Die Mutationen G7G p.(=) und p.Y240D traten jeweils einmal auf. Der Austausch S212S p.(=) wurde dreifach beschrieben. Die häufigste Mutation war auch in diesem Kollektiv die stumme Mutation R216R p.(=), welche bei 25 Personen vorlag.

Bei den in der Dissertation verwendeten Patientenproben zeigte sich wie auch in der PSC-Studie von Hov et al. eine deutliche Häufung von Mutationen bei erkrankten Patienten. Etwa doppelt so viele Mutationen fanden sich bei Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [418, 421]. Es ist nicht verwunderlich, dass auch bei Gesunden Mutationen identifiziert werden können. Zahlreiche Lebererkrankungen, die Cholangiopathien oder die Colitis ulcerosa haben eine multifaktorielle Genese [149, 292, 312]. Das Alter, das Geschlecht, der Immunstatus sowie Umwelt- und genetische Faktoren beeinflussen die Entstehung von Erkrankungen. Im Rahmen eines komplexen Pathomechanismus muss die genetische Veränderung nicht zwangsläufig zum Ausbruch der Erkrankung führen, könnte jedoch den Verlauf dieser beschleunigen oder ihn im Sinne eines *second hit*, wie Knudson et al. es postulierten, bei Vorbestehen einer genetischen, prädisponierenden Veränderung erst ermöglichen [426].

Auch die genetische Variation **p.S272G** wurde bereits von Hov et al. analysiert und bewirkt einen signifikanten Funktionsverlust des Rezeptors [150]. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Mutation p.A217P, war bei dieser Mutation jedoch auffällig, dass die Luciferaseaktivität nicht nur nach Stimulation mit TLC, sondern auch nach Forskolin signifikant reduziert war [149]. Hov et al. vermuteten eine konstitutiv aktive Mutante,

4. DISKUSSION

welche die AC sättigte und die forskolinvermittelte cAMP-Synthese limitierte [427]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Mutation auch bei einem Patienten mit Ösophaguskarzinom und bei einem HBV-Infizierten mit HBsAG-Trägerschaft nachgewiesen werden.

Hov et al. konnten des Weiteren die Mutation **p.Q296X** beschreiben, bei welcher anstatt der AS Glutamin ein Stopcodon im Bereich des intrazellulären C-Terminus entstand. Der Wegfall der terminalen AS 296-330 resultierte in einer Retention des mutierten, trunktierten Rezeptors im ER [149, 150]. Die Charakterisierung der Mutation **p.Q296R** im Rahmen dieser Dissertation zeigte jedoch, dass die AS an der Stelle 296 nicht essentiell ist für die Funktion und Lokalisation des Rezeptors. Auch die Mutation **p.L327P** führte zu keiner Veränderung. Spomer et al. untersuchten darauf folgend Deletionsvarianten innerhalb des C-Terminus und bestätigten die Bedeutung und die Notwendigkeit einer α -helikalen Struktur des proximalen C-Terminus für den Transport aus dem ER, die genaue Lokalisation in der PM und die Funktionalität des Rezeptors [155, 428] (Dissertation Frau Spomer). Wie bei anderen GPCR scheint der zytoplasmatische C-Terminus essentiell für die normale TGR5-Translokation und -Expression an der PM zu sein [429, 430].

Die Mutation **p.Y240P** zeigte eine signifikante Reduktion der Rezeptoransprechbarkeit auf alle getesteten GS-Konzentrationen, ähnlich der bekannten Mutation p.S272G mit dem Unterschied, dass die Forskolin-getriggerte cAMP-Produktion unbeeinträchtigt war. Auch die Immunfluoreszenzdarstellung wich von der des WT ab und war vergleichbar mit der Mutation p.Q296X. Der Rezeptor wurde nicht nur in der PM, sondern vor allem im ER detektiert. Computergestützte Vorhersagen lokalisierten die Mutation in der fünften extrazellulär gerichteten Transmembrandomäne, so dass eine Beteiligung an der Ligandenbindung möglich erscheint, wie sie später von Gertzen et al. beschrieben wurde [431]. Aufgrund der beobachteten Effekte wird postuliert, dass es sich möglicherweise um einen inaktiven Rezeptor handeln könnte, welcher von der Zelle im ER retiniert wird. Auf mögliche Ursachen der ER-Retention wird im Folgenden anhand der Mutation p.E8K, welche ebenfalls zu einer ER-Retention führt, eingegangen werden.

p.E8K zeigte eine Veränderung der Rezeptorfunktion und Lokalisation. Im Luciferase-Ansatz konnte eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet werden: Der Rezeptor zeigte eine signifikant verminderte Ansprechbarkeit gegenüber TLC-Konzentrationen von 0,1 μM , wohingegen die Aktivität bei hohen TLC-Konzentrationen unbeeinflusst blieb. Als mögliche Ursache dieser Rechtsverschiebung fand sich eine vermehrte Lokalisation in Strukturen des ER. Rezeptoren der PM werden im rER gebildet, gefaltet und posttranslational durch Glykosylierungen modifiziert, um im sekretorischen Weg über den Golgi-Apparat in Vesikeln verpackt in andere Zellkompartimente sortiert zu werden [205]. Das erfolgreiche *Trafficking* von GPCR ist unter anderem von posttranslationalen Modifikationen, korrekter Faltung sowie Oligo-/Di-/Heteromerisierung abhängig. Darüber hinaus spielen bestimmte Endozytose-, Sortierungs- und Retentionsmotive sowie die Interaktion mit akzessorischen Helferproteinen eine entscheidende Rolle [143].

Das erfolgreiche intrazelluläre Sortieren von Proteinen in andere Kompartimente wird im ER und auch im Golgi-Apparat durch ein Kontrollsystem, welches die Qualität und richtige Konformation des synthetisierten Proteins begutachtet, reguliert [432–434]. Eine unversehrte Faltung und Konformation des Membranproteins sind essentiell für den weiteren Transport zur PM. Dieser ist auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinbiosynthese [435]. Nicht normentsprechende, in falscher Weise durch Glykosylierung modifizierte oder in der Konformation veränderte Proteine verbleiben im ER und werden nach Ubiquitinierung durch Proteasomen der *ER-associated degradation* (ERAD) abgebaut [434, 436]. Da fehlgefaltete, instabile und strukturell veränderte Proteine aggregieren, cytotoxisch wirken und zu Erkrankungen wie der Hämochromatose, des $\alpha 1$ -Antitrypsin-Mangels, der cystischen Fibrose (Mukoviszidose) oder zu Prionen- und neurodegenerativen Erkrankungen führen können, werden erstgenannte selektioniert und degradiert [205, 432]. Für GPCR, wie den *Gonadotropin-releasing-Hormon*-(GRH-)Rezeptor oder den Vasopressin Typ 2 Rezeptor, wurden zahlreiche Mutationen beschrieben, die zu fehlgefalteten Proteinen und zu einer Retention im ER führten [205, 433, 437, 438]. Außerdem ist denkbar, dass fehlgefaltete Rezeptoren im ER mit korrekt gefalteten Rezeptoren um den Transport zur Membran konkurrieren und die Expression in der Membran auf diese Weise verringern [439]. In zahlreichen Studien konnten genetische Motive identifiziert werden, welche zur

4. DISKUSSION

Retention eines GPCR im ER führten. Diese Motive fanden sich nicht nur innerhalb der Transmembrandomänen I und IV [440], sondern besonders innerhalb des C-Terminus [430]. Jene Motive waren für die richtige Faltung und den Transport der Proteine zur Zellmembran entscheidend [429, 438, 441, 442]. Auch für den C-Terminus des TGR5-Rezeptors wurden wie oben bereits angesprochen kürzlich strukturelle Veränderungen beschrieben, die zu einer verminderten Expression in der Zellmembran geführt haben [155]. Die im Rahmen der Arbeit identifizierte Mutation p.R110H ist Bestandteil des ERY-Motivs, welches sich am Übergang von der dritten TM-Domäne und der zweiten intrazellulären Schleife befindet. Dieses Motiv ist essentiell für die Rezeptorkonformation und die Interaktion mit G-Proteinen [443, 444] (Dissertation Frau Spomer).

Nicht nur die korrekte Faltung, sondern auch die physiologische posttranslationale Modifikation des Rezeptorproteins unter anderem durch eine N-Glykosylierung, ist entscheidend für den Transport und die Funktion von GPCR und könnte bei einer Mutation von Relevanz sein [445, 446].

Für verschiedene GPCR, wie den TGR5-Rezeptor, konnte demonstriert werden, dass die Anzahl der an der PM lokalisierten Rezeptoren das Signaling und die darauf folgende Liganden-abhängige intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflusst (zellulärer *Feedback*) [440, 447–449]. So führte eine Reduktion der TGR5-Membranlokalisation <70% zu einer Abnahme der Liganden-induzierten cAMP-Synthese (Dissertation Frau Spomer). Ein solcher Mechanismus könnte auch bei den Mutationen p.E8K und p.Y240D von Bedeutung sein.

Ein weiterer potentieller Grund für einen verminderten Transport aus dem ER stellt die Rezeptormultimerisierung dar. Einige GPCR besitzen die Fähigkeit sich zu Dimeren oder Oligomeren zusammenzulagern, um ihre physiologische Funktion zu gewährleisten [143, 438, 440, 446, 450]. Bestens untersucht ist die Dimerisierung von G-Protein gekoppelten GABA_B-Rezeptoren. Innerhalb des GABABR1-Proteins findet sich eine bestimmte Sequenz, das ER-Retentions-Motiv. Diese Sequenz kann erst durch die Anlagerung des koexprimierten GABABR2-Proteins maskiert werden, so dass der Rezeptor das ER verlassen und zur Membran transportiert werden kann [451]. Auch beim G-Protein gekoppelten β 2-Adrenorezeptor ist eine Homodimerisierung erwünscht und Mutationen innerhalb der für die Dimerisierung wichtigen Strukturen führen zu einem Verlust der Zusammenlagerung und

4. DISKUSSION

der Translokation an die PM [451]. Beim $\alpha 2$ -Adrenorezeptor hingegen verhindert eine Heterodimerisierung des Rezeptors die Expression in der PM [439]. Die Verbindung zweier oder mehrerer Rezeptoren könnte als Folge einer Fehlfaltung des Proteins auftreten oder aber auch verhindert werden und zu einer Retention im ER führen. Erste Hinweise für eine Homodimerisierung des TGR5-Rezeptors liegen bereits vor (Seidel, Gohlke, Keitel et al. unveröffentlichte Daten), wobei, ein Einfluss der Varianten p.E8K und p.Y240D auf diese Multimerbildung noch nicht untersucht wurde.

Ein weiterer Grund für eine Retinierung von GPCR im ER könnte auf ein fehlerhaftes *Trafficking* aus dem Zellinneren zur PM zurückgeführt werden. β -Arrestine können die Endozytose von GPCR und deren Interaktion mit G-Proteinen beeinflussen und auf diese Weise die Signaltransduktion regulieren [163]. Jensen et al. wiesen jedoch nach, dass der TGR5-Rezeptor nicht mit β -Arrestinen interagiert und durch Endozytose reguliert wurde. Der Rezeptor verblieb in der Membran. Es wurde eine Umverteilung von Rezeptoren innerhalb der PM und eine Interaktion mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) beobachtet [201]. Darüber hinaus ist eine veränderte Interaktion mit weiteren akzessorischen (Transport)-Proteinen möglich. ARF (*ADP-ribosylation factors*) gehören zur Familie der Ras-verwandten GTPasen und modulieren den Vesikeltransport vom ER/ Golgi-Apparat zur Membran. Es konnte gezeigt werden, dass genetische Veränderungen in diesen Regulatoren zu einer Reduktion der Membranexpression führen können. Die betroffenen GPCR waren intrazellulär im ER lokalisiert und konnten die PM nicht erreichen [143, 452]. Die Interaktion des TGR5-Rezeptors mit ARF könnte beeinträchtigt sein, obschon eine solche bisher noch nicht beschrieben wurde.

Schließlich ist die physiologische Funktion des extrazellulären Aminoterminus die Bindung von Liganden [447, 453]. Eine mögliche Ursache der kompromittierten Rezeptorfunktion der Mutation p.E8K könnte eine beeinträchtigte Ligandenbindung oder eine reduzierte Bindungsaffinität darstellen, die sich besonders bei geringen GS-Konzentrationen bemerkbar machen.

4.2 Speziesunterschiede bei TGR5-Defizienz

Es handelt sich bei dem Großteil der im Rahmen der Dissertation identifizierten und auch in der Literatur beschriebenen TGR5-Mutationen, insbesondere bei den nicht-synonymen genetischen Veränderungen um heterozygote Mutationen. Lediglich ein Patient wies zwei Mutationen und damit eine potentielle Compound-Heterozygotie (p.A153V + p.R308W) auf. Allerdings bewirken beide Varianten keine Beeinträchtigung der Rezeptorlokalisation oder – Funktion [150, 418], (unveröffentlichte Daten AG Keitel). Eine homozygote nicht-synonyme TGR5-Mutation konnte bisher nicht beschrieben werden. Ursache dieser Beobachtung könnte zum Einen die niedrige Allelfrequenz von TGR5-Mutationen sein, zum Anderen wäre denkbar, dass das homozygote Vorliegen einer funktionseinschränkenden Variante nicht mit dem Leben vereinbar ist. Letzteres erscheint jedoch unwahrscheinlich, da TGR5-KO-Mäuse vital, fertil und unter normalen Haltungsbedingungen keinen offensichtlichen Phänotypen entwickeln [156, 206, 207]. Die TGR5-KO-Maus weist erst nach *GS-Challenge* (hochkalorische Nahrung) einen verminderten GS-Pool, veränderte Expressionsmuster der an der GS-Homöostase beteiligten Gene und eine Gewichtszunahme durch Zugewinn von Fettmasse auf [206, 207]. Außerdem führt eine TGR5-Defizienz nach GS-Fütterung zu Hyperglykämie mit verzögerter Glukoseclearance und zu einer Kompromittierung der antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Wirkung [146]. In der Leber finden sich hervorgerufen durch Konzentrationserhöhung hydrophober GS eine Zunahme ausgeprägter Nekrosen, ein verminderter Gallefluss mit Ausbildung einer Cholestase und eine verstärkte Inflammation durch erhöhte Zytokinfreisetzung und Immunzellinfiltration [243, 244]. In den Nieren wird die Ausscheidung von GS bei TGR5-Verlust vermindert, was zu einem zusätzlichen GS-Überschuss führen kann [244]. Auch im Darm zeigen sich neben einer Obstipationsneigung [278] ausgeprägte Entzündungsreaktionen und Veränderungen der Zellarchitektur und der Permeabilität der Darmwand sowie eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Zellschäden [166, 413].

Es ist erstaunlich, dass trotz dieser weitreichenden schädlichen Auswirkungen die Tiere lebensfähig und fertil sind. Über die Ursache dieser Beobachtung lässt sich aktuell nur spekulieren. Physiologische, metabolische, genetische und anatomische Gegebenheiten unterscheiden Mensch und Maus [8, 454–458]. Dass Erkenntnisse, welche im Mausmodell

4. DISKUSSION

gewonnen wurden, nur mit größter Sorgfalt auf den Menschen extrapoliert werden können, zeigen die Beobachtungen an BSEP-*Knockout*-Mäusen [73, 459]. Die BSEP ist das wichtigste Transportprotein für GS in der Leber und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Enterohepatischen Kreislaufs [47–51]. Mutationen des Transportproteins führen zu schweren cholestatischen Erkrankungsbildern, wie der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase Typ 2 (PFIC2) und der milderen *benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2* (BRIC2) oder prädisponieren für die Entstehung einer Medikamenten- oder Schwangerschaftsassozierten Cholestase (DIC *drug-induced cholestasis*, ICP *intrahepatic cholestasis of pregnancy*) [77, 460–463]. Beim Menschen führt der vollständige Verlust des Proteins zur PFIC2, einer cholestatischen Lebererkrankung, welche bereits im Säuglingsalter zu Ikterus mit schweren Leberschäden führt und ohne Lebertransplantation frühzeitig letal endet [459, 461, 463]. Patienten mit PFIC2 sezernieren weniger als 1% der physiologischen GS-Konzentration aus der Leber [464]. Eine Akkumulation toxischer GS ist die Folge. Der Phänotyp, d.h. das Ausmaß der klinischen Ausprägung, korreliert mit dem Schweregrad der BSEP-Defizienz. Es findet sich eine direkte Assoziation mit dem Anteil von funktionstüchtigen BSEP-Transportern an der Zelloberfläche und der klinischen Ausprägung [465]. Erstaunlicherweise zeigen BSEP-KO-Mäuse jedoch nicht diesen erwarteten Phänotypen des Menschen. Sie weisen eine nichtprogressive, persistierende, intrahepatische Cholestase auf. Insgesamt findet sich jedoch ein deutlich milderer Krankheitsbild mit unverändertem Gallenfluss und ohne histologische Zeichen eines Leberschadens [459, 460, 466]. Neuere Studien zeigen einen veränderten Lipidmetabolismus und eine beeinträchtigte mitochondriale β -Oxidation [467]. Gleichzeitig finden sich Veränderungen des GS-Pools und eine gesteigerte Sekretion von Phospholipiden und Cholesterol in die Galle. Es werden vermehrt hydrophile GS, unter diesen besonders tetrahydroxylierte GS, sezerniert, welche beim WT unter physiologischen Umständen gar nicht auftreten [459]. Auf der anderen Seite werden deutlich weniger hydrophobe GS sezerniert [468]. Es erscheint zudem einen alternativen GS-Transport für hydrophile GS zu existieren [459]. Zahlreiche Transportsysteme mit geringer Affinität jedoch hoher Kapazität stehen im Verdacht GS kompensatorisch zu sezernieren, wenn das hochaffine System der BSEP ausfällt [469]. So werden die Efflux-Transporter MRP2 und MRP3 moderat und MDR1

4. DISKUSSION

und MRP4 verstärkt exprimiert, wohingegen der in die Leber aufnehmende *GS-Uptake* durch NTCP und OATP reduziert wird [73, 464, 466, 470].

Beachtlich ist zudem die Beobachtung, dass eine zusätzliche Fütterung der KO-Mäuse mit Cholat (*GS-Challenge*, cholestatischer Stress) jedoch zu einem PFIC2 vergleichbaren Phänotypen führt. Die Mäuse zeigte einen signifikanten Gewichtsverlust, laborchemisch erhöhte Leberparameter, vermehrte Zellschäden sowie Apoptosen und Nekrosen ähnlich dem histologischen Bild eines PFIC-Patienten [464]. Der beschriebene alternative Sekretionsmechanismus scheint die Mäuse nach zusätzlicher *Challenge* durch Cholatfütterung trotz effizienter Hydroxylierungs- und Detoxifizierungsmechanismen nicht vor der Entwicklung einer progressiven Cholestase schützen zu können [464]. Es lässt sich vermuten, dass die KO-Mäuse bereits ohne zusätzliche GS-Substitution ein kritisch kompensiertes Stadium erreicht haben, welches durch die zusätzliche GS-Fütterung zusammenbricht und zum Vollbild einer PFIC führt [466].

Der Vergleich der BSEP- und TGR5-KO-Maus zeigt, dass die beschriebenen Unterschiede zum Menschen unter dem Gesichtspunkt eines abweichenden GS-Pools gesehen werden müssen. Es ist lange bekannt, dass der murine Pool vermehrt hydrophile GS und deutlich weniger hydrophobe, toxische GS aufweist [459]. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung des GS-Pools scheinen die Speziesunterschiede zwischen Mensch und Maus mitzuverursachen. Der Anteil hydrophober GS, wie Glycochenodeoxycholat (GCDCA), Taurochenodeoxycholat (TCDCA) oder Tauroolithocholylsulfat (Tauroolithocholat-3-sulfat, TLCS) [471, 472] könnte beim Menschen größer sein als bei der Maus. Es wurde bereits in der Einleitung berichtet, dass GS den TGR5-Rezeptor verschieden stark aktivieren können und sekundäre GS potentere Liganden darstellen als primäre. Ebenso ist die Ansprechbarkeit des TGR5-Rezeptors gegenüber hydrophoben GS besonders hoch, wohingegen das hydrophile Ursodeoxycholat (UDCA) nur zu einer geringfügigen Aktivierung führt [26, 136]. Die Arbeiten im Rahmen der Entstehung von Gallensteinen haben schließlich gezeigt, dass besonders die hydrophoben GS eine schädigende Wirkung entfachen [347, 348, 355, 356]. Das Ausmaß der Schädigung steigt mit zunehmender Hydrophobizität [357]. GS mit geringeren wasserabweisenden Eigenschaften, wie das Ursodesoxycholat, haben hingegen protektive Eigenschaften [17, 345, 473, 474]. Auch eine hepatotoxische, proinflammatorische und die Apoptose-fördernde

4. DISKUSSION

Wirkung hydrophober GS wird durch zahlreiche Studien bestätigt [244, 324, 325, 471, 472, 475–477]. Ferner werden zelltoxische Wirkungen im GIT beschrieben [478–480]. Die Beobachtungen, dass bei TGR5-KO-Mäusen gehäuft Leberzellnekrosen durch einen Überschuss hydrophober GS auftreten, bestätigt diese Hypothese [244].

Es ist ersichtlich, dass die Hydrophobizität der GS einen entscheidenden Einfluss auf die Rezeptoraktivität und schließlich auf die zellulären Effekte besitzt. Die fehlende Aktivierung eines homozygot-mutierten TGR5-Rezeptors durch hohe Konzentrationen hydrophober GS könnte die toxischen Effekte vervielfachen. Letztlich bleibt jedoch unklar, warum bei Mäusen trotz Fehlen des Rezeptors unter normalen Haltungsbedingungen kein abnormer Phänotyp beobachtet wird.

4.3. TGR5, GS und virale Hepatitiden

4.3.1 TGR5 als potentieller Disease-Modifizier?

Die in der Einleitung beschriebenen Wirkungen des Rezeptors auf den Stoffwechsel und die Immunfunktion lassen die Vermutung aufkommen, dass eine Rolle in der Genese entzündlicher hepatischer Erkrankungen bestehen könnte. Sowohl Hepatitis B als auch Hepatitis C sind schwere Virus-induzierte Entzündungsreaktionen der Leber und bedeutende Ursachen für die Entwicklung einer Leberzirrhose und den konsekutiven Übergang in ein HCC und CCC [309–311, 383].

Das Hepatitis C Virus gehört zur der Gruppe der Flaviviren und setzt sich aus einem RNA-Einzelstrang zusammen. Man unterscheidet sechs Hauptgenotypen, welche sich grundlegend in ihrem Infektionsverlauf und in dem Therapieansprechen unterscheiden [481]. Die Standardtherapie der HCV-Infektion sah bis vor Kurzem den Einsatz von pegIFN (pegyliertes Interferon) und Ribavirin vor. Besonders der Genotyp 1, welcher den vorherrschenden Genotypen beim Menschen darstellt, zeigte jedoch eine schlechte Ansprechbarkeit von <50% gegenüber dieser Kombinationstherapie [482, 483]. Die Ansprechbarkeit gegenüber einer IFN-haltigen antiviralen Therapie hängt ferner von

4. DISKUSSION

zahlreichen Faktoren ab, neben Virus-spezifischen Faktoren wie der initialen Viruskonzentration, dem Ansprechen des Virus unter Therapie oder dem vorliegenden Genotypen, finden sich Patienten-spezifische Einflussgrößen wie das Alter, das Geschlecht, die ethnische Zugehörigkeit, der Immunstatus (Immunsuppression), das Human Leukozytenantigen-(HLA)-System, *SNPs* wie beispielsweise des IL28B- oder des BSEP-Gens und zahlreiche Komorbiditäten wie eine hepatische Fibrose und Steatose oder Adipositas äußern sich in einer Beeinträchtigung der SVR (*sustained virologic response*) [482, 484–489]. Letztere definiert sich als ein anhaltendes Ansprechen des Virus auf eine antivirale Therapie, wenn 24 Wochen nach Beendigung einer antiviralen Therapie Avirämie vorliegt, d.h. kein Nachweis von Viruskopien mehr möglich ist [483, 490].

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass GS den Verlauf viraler Hepatitiden beziehungsweise das Ansprechen auf eine antivirale Therapie beeinflussen können [491, 492]. Eine FXR-abhängige Stimulation der HCV-RNA-Replikation, besonders des Genotypen 1 wird diskutiert [481, 493]. GS liegen in der Leber unter physiologischen Bedingungen bereits in hohen Konzentrationen vor. Im Rahmen von Lebererkrankungen wie der Hepatitis steigt diese Konzentration weiter an. Zu einem Großteil findet sich Chenodeoxycholat (CDCA), welches einen sehr potenten Stimulator der viralen RNA-Replikation darstellt [481]. Es konnte verdeutlicht werden, dass erhöhte GS-Konzentrationen auch mit einem verminderten Ansprechen auf eine IFN-basierte Therapie und mit einem negativen *Outcome* einhergehen [494, 495]. GS interagieren mit dem IFN-Signalweg und führen zu einer verminderten IFN-Antwort als Bestandteil der zellulären Immunabwehr [481, 496, 497]. In Studien wurde beobachtet, dass GS das Wachstum von Caliciviren, wie der RNA-einzelsträngige Norovirus, ermöglichten. Sie führten zu einer intrazellulären Erhöhung der cAMP-Konzentration, was mit einer verminderten IFN-abhängigen STAT1-Phosphorylierung (*signal transducer and activator of transcription-1*) einherging [498]. Die genauen Mechanismen dieser Immunsuppression sind noch nicht ausreichend geklärt. Es wäre denkbar, dass auch TGR5 an der GS-cAMP-abhängigen Reduktion des IFN-Signalweges beteiligt sein könnte.

Die Infektion mit einem Hepatitisvirus entsteht nicht durch eine veränderte GS-Homöostase. Ebenso wenig ist es unwahrscheinlich, dass eine TGR5-Mutation eine Hepatitis auslöst.

4. DISKUSSION

Vielmehr könnte jedoch der TGR5-Rezeptor als *Disease-Modifier* Einfluss auf den Verlauf und Progress der Erkrankung sowie das Therapieansprechen haben, was sich anhand der Leberwerte widerspiegeln könnte. Für den IL28 SNP rs12979860 und weitere genetische Varianten konnte bereits ein Korrelat mit der HCV-Heilung und dem Ansprechen auf eine Interferon-basierte Therapie beschrieben werden [488, 489, 499–502].

Die antiinflammatorischen Effekte von TGR5, besonders in Makrophagen, wurden in der Einleitung bereits verdeutlicht. TGR5 ist in der Lage die Aktivität, Mobilität und die Funktion von Zellen des Immunsystems durch Regulation von Zytokinen und Chemokinen zu verändern [136, 160, 215, 227, 228, 234, 243]. Darüber hinaus ist die Replikation des Hepatitis C Virus eng mit dem Lipidmetabolismus des Wirtsorganismus verknüpft. Das Virus führt durch Dysregulation des Fettstoffwechsels zur Steatosis, welche wiederum durch die Akkumulation von Lipiden das Ausschleusen von weiteren Viruspartikeln, letztlich also die Virusreplikation, erleichtert [503–505]. Auch der TGR5-*Knockout* führt bei Mäusen zur Entwicklung einer Steatose mit Gewichtszunahme durch Zugewinn von Fettmasse [206, 207].

Für die Inflammation essentielle Regulationsmechanismen könnten durch TGR5 beeinflusst werden. Daher sollte untersucht werden, ob sich bei Patienten mit chronischer HCV-/ HBV-Infektion gehäuft TGR5-Varianten finden und ob diese mit einer gesteigerten oder gestörten Rezeptorfunktion einhergehen. Dies führt zu der Fragestellung, ob auch TGR5 Einfluss auf den IFN-Signalweg hat und somit das Ansprechen auf eine IFN-basierte Therapie und die Virusreplikation gezielt durch Mutationen der TGR5-CDS verändert werden können. Unter dem Gesichtspunkt einer potentiellen Beteiligung des TGR5-Rezeptors an der Pathogenese, dem weiteren Verlauf, dem Schweregrad oder der Heilung einer Hepatitis C Infektion wurde der identifizierte *small nuclear polymorphism* SNP rs11554825 des Exon 1 gezielt bei Hepatitis C Patienten analysiert.

4.3.2 Der SNP rs11554825 im Exon 1 bei HCV

Der *single nucleotide polymorphism* rs11554825 im Exon 1 wurde erstmals durch Hov et al. in ihrer Studie an PSC-Patienten beschrieben [149, 150]. TGR5 konnte auf dem Chromosomabschnitt 2q35 identifiziert werden. Es zeigte sich eine chromosomale Übereinstimmung des SNPs mit Abschnitten, welche mit der PSC und der CU assoziiert waren [149, 506, 507]. Darüber hinaus fand sich eine Assoziation von SNP rs11554825 und SNP rs3731859 innerhalb der 5'UTR (s. Abbildung 12 - Nicht-synonyme TGR5-Mutationen Exon 2 & SNP rs11554825 Exon 1). Genetische Veränderungen wie SNPs im Exon 1 und in der 5'UTR werden nicht transkribiert und verändern nicht die CDS des TGR5-Gens. Untranslatierte Bereiche eines Genes oder einer mRNA enthalten jedoch wichtige Genabschnitte, welche unter anderem für die Interaktion mit Strukturproteinen, für die Stabilität der mRNA oder für die korrekte Transkription und Translation essentiell sind [508–510]. In ihr können wichtige Signaldomänen für die physiologische Expression und Funktion liegen, welche durch einen SNP verändert werden. Eine Beeinflussung der Transkription und Translation mit konsekutiv veränderter zellulärer *Response* könnte die Expression und Funktion des Rezeptor beeinflussen.

Für den ebenfalls im Exon 1 gelegenen, assoziierten SNP rs3731859 wurden ebenfalls mögliche Korrelationen mit Erkrankungen untersucht. Der SNP war jedoch nicht signifikant mit einem erhöhten Risiko einer gestörten Glukosetoleranz assoziiert [420].

Hov et al. beobachteten eine signifikante, wenn auch schwache Korrelation des SNP rs11554825 mit der Menge an TGR5-mRNA. Die Homozygotie für den das T-Allel (TT = WT) zeigte im Vergleich mit dem Minorallel (CC) und der Heterozygotie (CT) die geringste Expression von TGR5-mRNA [150]. Bei anderen Einzelnukleotidpolymorphismen wurde die veränderte Expression des jeweiligen Rezeptors auf eine Variation der Transkription oder auf alternatives Splicing zurückgeführt [511–513]. Bei TGR5 bleibt die Ursache noch unklar.

Der SNP wurde in der vorliegenden Arbeit bei einer Vielzahl von Patienten, sowohl im allgemeinen, als auch im HCV-Kollektiv, gefunden. Zudem war er auch bei gesunden Blutspendern und bei PBC-Erkrankten nachweisbar (unveröffentlichte Studie AG Keitel in Kooperation mit Prof. Scharf Hämostaseologie + Dissertation Frau Spomer). Der Vergleich des

4. DISKUSSION

allgemeinen Kollektivs mit der HCV-Kohorte zeigte vergleichbare C/T-Allel-Häufigkeiten. Im HCV-Kollektiv war die Heterozygotie, wie auch im allgemeinen Kollektiv, der vorherrschende Genotyp. Die Häufigkeit des C-Allels bei HCV-Erkrankten ergab 0,4386, wohingegen das T-Allel eine Frequenz von 0,5614 zeigte. Dies war im Einklang mit den von Hov et al. bereits beschriebenen Allelfrequenzen - C-Allelfrequenz bei PSC-Erkrankten 0,43-0,46 und C-Allelfrequenz bei gesunden Kontrollen 0,41 [418]. In der Dissertation von Frau Spomer wurde der Polymorphismus bei PBC-Erkrankten untersucht. Hier ergab sich eine C-Allelhäufigkeit von 0,56 bei PBC-Erkrankten im Vergleich zu einer C-Allelfrequenz von 0,44 bei gesunden Kontrollen. Diese Allelfrequenzen wichen deutlich von den Frequenzen der anderen Kollektive ab. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der SNP mit dem homozygot vorliegendem C-Allel zu einer Reduktion von TGR5 führt und eine potentielle Prädisposition für die Entwicklung der Cholangiopathie darstellen könnte (unveröffentlichte Studie AG Keitel + Dissertation Frau Spomer).

Es ist bekannt, dass SNPs als genetische Prädisposition die Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung und der Progression verschiedenster Erkrankungen sowohl steigern als auch reduzieren können [511, 514–516]. Das Vorliegen des homozygoten C-Genotyps könnte durch veränderte TGR5-Expressionen Auswirkungen auf zahlreiche durch den Rezeptor beeinflusste Stoffwechselvorgänge haben. Neben der Regulation des Glukose-, des Energie- und des GS-Haushaltes könnte auch die Funktion des Rezeptors in der Leber, in den Gallenwegen und im Darm kompromittiert sein. Eine erhöhte Anfälligkeit für inflammatorische hepatische, biliäre, intestinale, neoplastische und Stoffwechselerkrankungen würde hieraus resultieren.

Im Hinblick auf die von Hov et al. gefundene Assoziation des TGR5-Rezeptors und der Pathogenese von CED studierten Camileri et al. die Auswirkungen des SNP auf die Darmtätigkeit [267]. Die Arbeitsgruppe analysierte, ob die genetische Variation mit einem veränderten Darmtransit assoziiert sei und stellte die Hypothese auf, dass eine durch den SNP verursachte abnormale Funktion des Rezeptors zu einer Verminderung des inhibitorischen Effektes auf den Dünndarmtransit und somit zu einem beschleunigten Transit des Darminhaltes führen könnte. Die These bestätigte sich zwar nicht, es konnte jedoch eine schwache, nicht signifikante Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp beobachtet

4. DISKUSSION

werden. Der T-Phänotyp des SNP (TT= WT) zeigte einen zahlenmäßig, jedoch nicht signifikant verlangsamten Transit im Vergleich mit dem TC/CC-Phänotypen. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass eine reduzierte Expression durch eine verminderte NO-Inhibition zu einer beschleunigten Peristaltik des CC/CT-Phänotypen führen könnte. Eine signifikante Korrelation des SNP mit dem klinischen Bild konnte letztendlich nicht beobachtet werden, jedoch fand sich eine signifikante Assoziation des Transits mit dem Alter und dem Geschlecht der Patienten [267].

Die Beobachtung, dass SNPs des IL28B (rs12979860) und der BSEP (V444A rs2287622) zu einer Beeinflussung des Therapieansprechens führen und die Krankheitsprogression entscheidend beeinflussen können [484, 485, 487–489], führte zu der Hypothese, dass auch der SNP rs11554825 des TGR5-Gens einen weiteren Faktor darstellen könnte, welcher auf den Therapieerfolg bei Hepatitis C-Erkrankten Einfluss nehmen könnte. Diesbezüglich wurde in dem gut charakterisierten HCV-Kollektiv der gefundene TGR5-SNP im Hinblick auf die HCV-Ausheilung untersucht. Für den SNP fanden sich keine Unterschiede in der Geschlechterverteilung. Auch die entsprechenden prozentualen Anteile an der Gesamtzahl erkrankter und genesener Patienten mit dem jeweiligen Genotypen waren vergleichbar. Etwa 60% der Patienten zeigten eine chronisch-aktive, replikative Infektion, wohingegen rund 40% eine ausgeheilte HCV-Infektion aufwiesen. Lediglich für den Genotypen T72C (homozygotes Minorallel) fand sich ein höherer Anteil an Patienten mit aktiver Infektion bei einem geringeren Anteil genesener Patienten. Die Ergebnisse der Korrelation gaben Hinweise auf einen Trend, zeigen jedoch aufgrund der geringen Kollektivgröße in der statistischen Auswertung keine signifikante Korrelation zwischen dem Polymorphismus und dem Therapieansprechen.

Viele der untersuchten HCV-Patienten wurden mit Interferon behandelt. Ob das C-Allel des Rezeptors mit einem schlechteren Ansprechen auf die IFN-Gabe assoziiert ist, bleibt unklar. Außerdem hat sich in den letzten Jahren die Therapie der Hepatitis C rasant vom Interferon wegbewegt. Zunehmend werden IFN-unabhängige Therapieformen durch direkt agierende Virustatika durchgeführt [517–520]. Eine Beeinflussung des Ansprechens auf eine IFN-freie Therapie ist bisher noch nicht erforscht.

4. DISKUSSION

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass eine Korrelation zwischen dem häufigen Exon 1 SNP rs11554825 und der klinischen Ausprägung verschiedener Lebererkrankungen sowie den Verläufen einer HCV-Infektion, insbesondere aber im Hinblick auf die PBC-Daten, denkbar wäre. Ein weiteres interessantes Kollektiv würde basierend auf den Ergebnissen der Arbeit Patienten mit einer AIH darstellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine potentielle Beteiligung des plasmamembrangebundenen, G-Protein gekoppelten durch GS aktivierbaren Rezeptors TGR5 an diversen Leber-, Gallenwegs- und Darm-assoziierten Erkrankungen wird aufgrund der vielzähligen Effekte auf die Immunfunktion, die Gallensekretion, den Stoffwechsel und die neuronale Aktivität aktuell diskutiert. Bislang ist noch weitgehend unklar, welche Rolle dem Rezeptor bei der Entstehung dieser Erkrankungen zukommt. Veränderungen der TGR5-Expression, -Lokalisierung oder -Funktion könnten auf genetischer, epigenetischer oder auf der Proteinebene eine Lebererkrankung mitverursachen. Gleichzeitig ist denkbar, dass auch vice versa eine Lebererkrankung zu Veränderungen der Rezeptorexpression, -funktion oder -lokalisation führen könnte. In wie fern der TGR5-Rezeptor eine Rolle als Verursacher oder Wegbereiter (*Disease-Modifier*) verschiedener Lebererkrankungen spielt, konnte bislang noch nicht ausreichend geklärt werden. Die vorliegende Dissertation untersucht, ob bei Patienten mit Lebererkrankungen gehäuft TGR5-Mutationen zu finden sind. Bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen wurden hierfür die Sequenzierungen des TGR5-Gens durchgeführt, Mutationen in der CDS identifiziert, zellbiologisch charakterisiert und schließlich mit dem Phänotyp der betroffenen Patienten korreliert. Struktur-Funktions-Beziehungen wurden mithilfe von Vergleichen mit anderen GPCRs der Klasse A veranschaulicht und interpretiert.

Innerhalb des TGR5-Gens konnten zahlreiche Mutationen bei diversen Erkrankungen gefunden werden, ohne dass geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet wurden. Die zellbiologische Charakterisierung der gefundenen Mutationen gaben Aufschluss über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften des Rezeptors. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass bestimmte AS-Abfolgen und Domänen des TGR5-Gens für die Rezeptorlokalisation und -funktion essentiell sind. Wird eine solche Domäne durch eine genetische Variation strukturell verändert, so hat dies mitunter schwerwiegende Auswirkungen auf die Ansprechbarkeit gegenüber den Liganden sowie auf die zelluläre Expression.

Aufgrund der Seltenheit von TGR5-Mutationen innerhalb der CDS konnte schließlich keine statistisch signifikante Assoziation zwischen TGR5-Mutationen und einer Lebererkrankung

5. ZUSAMMENFASSUNG

formuliert werden. Basierend auf der aktuellen Datenlage und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist zu folgern, dass CDS-Mutationen des TGR5-Gens die Lokalisation und die Funktion des Rezeptors beeinflussen können. Aufgrund der geringen Häufigkeit erscheint ihre Rolle in der Entstehung von Erkrankungen jedoch von untergeordneter Relevanz. Im Gegensatz dazu ist der SNP rs11554825 im Exon 1 mit einer C-Allelfrequenz von 0,4386 in der allgemeinen Bevölkerung vorzufinden. Die bisher bekannten Allelfrequenzen konnten im Düsseldorfer Kollektiv bestätigt werden. Die vorliegende Arbeit hat zudem gezeigt, dass der SNP bei Patienten mit aktiver HCV-Infektion häufiger zu finden ist als bei ausgeheilten Infektion. Eine signifikante Korrelation der Allelfrequenz mit der Ausheilungsrate der HCV-Infektion ergab sich jedoch nicht. Das seltenere C-Allel scheint zu geringeren TGR5-mRNA-Konzentrationen zu führen. Der SNP könnte daher eine Prädisposition für inflammationsassoziierte Leberschädigungen darstellen. Durch seinen Einfluss auf den GS-Pool ist TGR5 als möglicher *Disease-Modifier* anzusehen. In den Arbeiten von Hov et al. wurde diese Bedeutung für die PSC dargelegt. Ob allerdings die TGR5-Expression eine Erkrankung prädispositioniert oder ob umgekehrt die Erkrankung zu einer veränderten Rezeptorexpression führt, bleibt Gegenstand weiterer Forschung.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Hofmann A F (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 159(22): 2647–2658.
2. Russell D W (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72: 137–174, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712.
3. Hylemon P B, Zhou H, Pandak W M, et al. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res* 50(8): 1509–1520, doi: 10.1194/jlr.R900007-JLR200.
4. Keitel V, Kubitz R, Häussinger D (2008). Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol* 14(37): 5620–5629.
5. Hofmann A F (2007). Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts. *Ann Hepatol* 6(1): 15–27.
6. Keitel V, Häussinger D (2011). TGR5 in the biliary tree. *Dig Dis* 29(1): 45–47, doi: 10.1159/000324127.
7. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. (2008). Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7(8): 678–693, doi: 10.1038/nrd2619.
8. Watanabe M, Houten S M, Matakai C, et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439(7075): 484–489, doi: 10.1038/nature04330.
9. Thomas C, Auwerx J, Schoonjans K (2008). Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5--connecting nutrition and metabolism. *Thyroid* 18(2): 167–174, doi: 10.1089/thy.2007.0255.
10. Houten S M, Watanabe M, Auwerx J (2006). Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 25(7): 1419–1425, doi: 10.1038/sj.emboj.7601049.
11. Keating N, Keely S J (2009). Bile acids in regulation of intestinal physiology. *Curr Gastroenterol Rep* 11(5): 375–382.
12. Mekjian H S, Phillips S F, Hofmann A F (1971). Colonic secretion of water and electrolytes induced by bile acids: perfusion studies in man. *J Clin Invest* 50(8): 1569–1577, doi: 10.1172/JCI106644.
13. Karlström L (1986). Evidence of involvement of the enteric nervous system in the effects of sodium deoxycholate on small-intestinal transepithelial fluid transport and motility. *Scand J Gastroenterol* 21(3): 321–330.
14. Bijvelds M J C, Jorna H, Verkade H J, et al. (2005). Activation of CFTR by ASBT-mediated bile salt absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289(5): G870-9, doi: 10.1152/ajpgi.00226.2005.
15. Sanyal A J, Hirsch J I, Moore E W (1994). Premicellar taurocholate enhances calcium uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology* 106(4): 866–874.
16. Begley M, Gahan C G M, Hill C (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* 29(4): 625–651, doi: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.
17. (2009). EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 51(2): 237–267, doi: 10.1016/j.jhep.2009.04.009.
18. Corpechot C (2012). Primary biliary cirrhosis and bile acids. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36 Suppl 1: S13-20, doi: 10.1016/S2210-7401(12)70016-5.
19. Corpechot C, Carrat F, Bahr A, et al. (2005). The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 128(2): 297–303.

20. Poupon R E, Chrétien Y, Poupon R, et al. (1993). Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy. *Hepatology* 17(4): 599–604.
21. Lazaridis K N, Gores G J, Lindor K D (2001). Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 35(1): 134–146.
22. Poupon R E, Lindor K D, Parés A, et al. (2003). Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 39(1): 12–16.
23. Hirschfield G M, Mason A, Luketic V, et al. (2015). Efficacy of obeticholic acid in patients with primary biliary cirrhosis and inadequate response to ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 148(4): 751-61.e8, doi: 10.1053/j.gastro.2014.12.005.
24. Neuschwander-Tetri B A, Loomba R, Sanyal A J, et al. (2015). Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 385(9972): 956–965, doi: 10.1016/S0140-6736(14)61933-4.
25. Hofmann A F (1984). Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 4(5 Suppl): 4S–14.
26. Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, et al. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 298(5): 714–719.
27. Hofmann A F, Small D M (1967). Detergent properties of bile salts: correlation with physiological function. *Annu Rev Med* 18: 333–376, doi: 10.1146/annurev.me.18.020167.002001.
28. Russell D W (2009). Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* 50: S120-5, doi: 10.1194/jlr.R800026-JLR200.
29. Axelson M, Sjövall J (1990). Potential bile acid precursors in plasma--possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem* 36(6): 631–640.
30. Axelson M, Ellis E, Mörk B, et al. (2000). Bile acid synthesis in cultured human hepatocytes: support for an alternative biosynthetic pathway to cholic acid. *Hepatology* 31(6): 1305–1312, doi: 10.1053/jhep.2000.7877.
31. Chiang J Y L (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 50(10): 1955–1966, doi: 10.1194/jlr.R900010-JLR200.
32. Monte M J, Marin J J G, Antelo A, et al. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 15(7): 804–816.
33. Chiang J Y L (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Bile acids and nuclear receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(3): G349-56, doi: 10.1152/ajpgi.00417.2002.
34. Shefer S, Hauser S, Mosbach E H (1968). 7-alpha-hydroxylation of cholestanol by rat liver microsomes. *J Lipid Res* 9(3): 328–333.
35. Russell D W, Setchell K D (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31(20): 4737–4749.
36. Hofmann A F, Hagey L R (2008). Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 65(16): 2461–2483, doi: 10.1007/s00018-008-7568-6.
37. Akita H, Suzuki H, Ito K, et al. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta* 1511(1): 7–16.

38. Hofmann A F, Sjövall J, Kurz G, et al. (1992). A proposed nomenclature for bile acids. *J Lipid Res* 33(4): 599–604.
39. Hofmann A F (1999). Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol Sci* 14: 24–29.
40. Coello A, Meijide F, Núñez E R, et al. (1996). Aggregation behavior of bile salts in aqueous solution. *J Pharm Sci* 85(1): 9–15, doi: 10.1021/js950326j.
41. Rahman K, Coleman R (1987). Biliary lipid secretion and its control. Effect of taurodehydrocholate. *Biochem J* 245(2): 531–536.
42. Dietschy J M (1968). Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *J Lipid Res* 9(3): 297–309.
43. Love M W, Dawson P A (1998). New insights into bile acid transport. *Curr Opin Lipidol* 9(3): 225–229.
44. Borst P, Elferink R O (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71: 537–592, doi: 10.1146/annurev.biochem.71.102301.093055.
45. Alrefai W A, Gill R K (2007). Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 24(10): 1803–1823, doi: 10.1007/s11095-007-9289-1.
46. Roma M G, Crocenzi F A, Sánchez Pozzi E A (2008). Hepatocellular transport in acquired cholestasis: new insights into functional, regulatory and therapeutic aspects. *Clin Sci* 114(9): 567–588, doi: 10.1042/CS20070227.
47. Stieger B, Meier Y, Meier P J (2007). The bile salt export pump. *Pflugers Arch* 453(5): 611–620, doi: 10.1007/s00424-006-0152-8.
48. Suchy F J, Ananthanarayanan M (2006). Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1: S10-6, doi: 10.1097/01.mpg.0000226385.71859.5f.
49. Kullak-Ublick G A, Stieger B, Hagenbuch B, et al. (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 20(3): 273–292, doi: 10.1055/s-2000-9426.
50. Kullak-Ublick G A, Beuers U, Paumgartner G (2000). Hepatobiliary transport. *J Hepatol* 32(1 Suppl): 3–18.
51. Kullak-Ublick G A, Stieger B, Meier P J (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology* 126(1): 322–342.
52. Grattagliano I, Portincasa P, Palmieri V O, et al. (2005). Contribution of canalicular glutathione efflux to bile formation. From cholestasis associated alterations to pharmacological intervention to modify bile flow. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5(2): 153–161.
53. Zhang X-y, Yang J, Yin X-f, et al. (2009). [Hepatobiliary transport of glutathione and its role in cholestasis]. *Yao Xue Xue Bao* 44(4): 327–332.
54. Bouchard G, Tuchweber B, Yousef I M (2000). Bile salt independent flow during bile salt-induced choleresis and cholestasis in the rat: role of biliary thiol secretion. *Liver* 20(1): 27–37.
55. Trauner M, Boyer J L (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83(2): 633–671, doi: 10.1152/physrev.00027.2002.
56. Strazzabosco M (1997). Transport systems in cholangiocytes: their role in bile formation and cholestasis. *Yale J Biol Med* 70(4): 427–434.
57. Glaser S, Francis H, Demorrow S, et al. (2006). Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol* 12(22): 3523–3536.

58. Xia X, Francis H, Glaser S, et al. (2006). Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 12(22): 3553–3563.
59. Wheeler H O (1971). Concentrating function of the gallbladder. *Am J Med* 51(5): 588–595.
60. Choi M, Moschetta A, Bookout A L, et al. (2006). Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat Med* 12(11): 1253–1255, doi: 10.1038/nm1501.
61. Koop I, Schindler M, Bosshammer A, et al. (1996). Physiological control of cholecystikinin release and pancreatic enzyme secretion by intraduodenal bile acids. *Gut* 39(5): 661–667.
62. Meier P J, Stieger B (2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 64: 635–661, doi: 10.1146/annurev.physiol.64.082201.100300.
63. Martinez-Augustin O, Sanchez de Medina F (2008). Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World J Gastroenterol* 14(37): 5630–5640.
64. Lack L, Weiner I M (1966). Intestinal bile salt transport: structure-activity relationships and other properties. *Am J Physiol* 210(5): 1142–1152.
65. Craddock A L, Love M W, Daniel R W, et al. (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274(1 Pt 1): G157-69.
66. Reichen J (1999). The Role of the Sinusoidal Endothelium in Liver Function. *News Physiol Sci* 14: 117–121.
67. Hagenbuch B, Meier P J (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J Clin Invest* 93(3): 1326–1331, doi: 10.1172/JCI117091.
68. Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann A F, et al. (2006). Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(4): G640-9, doi: 10.1152/ajpgi.00354.2005.
69. Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, et al. (2000). ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem* 275(4): 2905–2910.
70. Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, et al. (2013). Bile acids: From digestion to cancers. *Biochimie* 95(3): 504–517, doi: 10.1016/j.biochi.2012.06.022.
71. Fickert P, Fuchsbichler A, Marschall H-U, et al. (2006). Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice. *Am J Pathol* 168(2): 410–422, doi: 10.2353/ajpath.2006.050404.
72. Faubion W A, Guicciardi M E, Miyoshi H, et al. (1999). Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* 103(1): 137–145, doi: 10.1172/JCI4765.
73. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, et al. (2005). Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 41(5): 1160–1172, doi: 10.1002/hep.20682.
74. Keitel V, Nies A T, Brom M, et al. (2003). A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(1): G165-74, doi: 10.1152/ajpgi.00362.2002.
75. Keitel V, Kartenbeck J, Nies A T, et al. (2000). Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 32(6): 1317–1328, doi: 10.1053/jhep.2000.19791.

76. Kubitz R, Dröge C, Stindt J, et al. (2012). The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36(6): 536–553, doi: 10.1016/j.clinre.2012.06.006.
77. Thompson R, Strautnieks S (2001). BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis* 21(4): 545–550, doi: 10.1055/s-2001-19038.
78. Toh S, Wada M, Uchiumi T, et al. (1999). Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet* 64(3): 739–746, doi: 10.1086/302292.
79. Tsujii H, König J, Rost D, et al. (1999). Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 117(3): 653–660.
80. Lenicek M, Duricova D, Komarek V, et al. (2011). Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease: assessment by serum markers. *Inflamm Bowel Dis* 17(6): 1322–1327, doi: 10.1002/ibd.21502.
81. Vitek L (2014). Bile Acid Malabsorption in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, doi: 10.1097/MIB.0000000000000193.
82. Meihoff W E, Kern F (1968). Bile salt malabsorption in regional ileitis, ileal resection and mannitol-induced diarrhea. *J Clin Invest* 47(2): 261–267, doi: 10.1172/JCI105722.
83. Nyhlin H, Merrick M V, Eastwood M A (1994). Bile acid malabsorption in Crohn's disease and indications for its assessment using SeHCAT. *Gut* 35(1): 90–93.
84. Scotti E, Gilardi F, Godio C, et al. (2007). Bile acids and their signaling pathways: eclectic regulators of diverse cellular functions. *Cell Mol Life Sci* 64(19-20): 2477–2491, doi: 10.1007/s00018-007-7280-y.
85. Makishima M, Okamoto A Y, Repa J J, et al. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284(5418): 1362–1365.
86. Parks D J, Blanchard S G, Bledsoe R K, et al. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284(5418): 1365–1368.
87. Wang H, Chen J, Hollister K, et al. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 3(5): 543–553.
88. Tu H, Okamoto A Y, Shan B (2000). FXR, a bile acid receptor and biological sensor. *Trends Cardiovasc Med* 10(1): 30–35.
89. Heuman D M, Hylemon P B, Vlahcevic Z R (1989). Regulation of bile acid synthesis. III. Correlation between biliary bile salt hydrophobicity index and the activities of enzymes regulating cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *J Lipid Res* 30(8): 1161–1171.
90. Pandak W M, Vlahcevic Z R, Heuman D M, et al. (1994). Effects of different bile salts on steady-state mRNA levels and transcriptional activity of cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Hepatology* 19(4): 941–947.
91. Seol W, Choi H S, Moore D D (1996). An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272(5266): 1336–1339.
92. Lu T T, Makishima M, Repa J J, et al. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6(3): 507–515.
93. Goodwin B, Jones S A, Price R R, et al. (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6(3): 517–526.

94. Lee Y-K, Schmidt D R, Cummins C L, et al. (2008). Liver receptor homolog-1 regulates bile acid homeostasis but is not essential for feedback regulation of bile acid synthesis. *Mol Endocrinol* 22(6): 1345–1356, doi: 10.1210/me.2007-0565.
95. Nitta M, Ku S, Brown C, et al. (1999). CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 96(12): 6660–6665.
96. Lee Y-K, Moore D D (2002). Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. *J Biol Chem* 277(4): 2463–2467, doi: 10.1074/jbc.M105161200.
97. Fuchs C, Claudel T, Trauner M (2013). Bile acid-mediated control of liver triglycerides. *Semin Liver Dis* 33(4): 330–342, doi: 10.1055/s-0033-1358520.
98. Lehmann J M, Kliewer S A, Moore L B, et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272(6): 3137–3140.
99. Janowski B A, Willy P J, Devi T R, et al. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 383(6602): 728–731, doi: 10.1038/383728a0.
100. Repa J J, Liang G, Ou J, et al. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXR α and LXR β . *Genes Dev* 14(22): 2819–2830.
101. Horton J D, Goldstein J L, Brown M S (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 109(9): 1125–1131, doi: 10.1172/JCI15593.
102. Edwards P A, Kast H R, Anisfeld A M (2002). BAREing it all: the adoption of LXR and FXR and their roles in lipid homeostasis. *J Lipid Res* 43(1): 2–12.
103. Holt J A, Luo G, Billin A N, et al. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev* 17(13): 1581–1591, doi: 10.1101/gad.1083503.
104. Kim I, Ahn S-H, Inagaki T, et al. (2007). Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res* 48(12): 2664–2672, doi: 10.1194/jlr.M700330-JLR200.
105. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, et al. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2(4): 217–225, doi: 10.1016/j.cmet.2005.09.001.
106. Stark K L, McMahon J A, McMahon A P (1991). FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse. *Development* 113(2): 641–651.
107. Kan M, Wu X, Wang F, et al. (1999). Specificity for fibroblast growth factors determined by heparan sulfate in a binary complex with the receptor kinase. *J Biol Chem* 274(22): 15947–15952.
108. Gupta S, Stravitz R T, Dent P, et al. (2001). Down-regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression by bile acids in primary rat hepatocytes is mediated by the c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Biol Chem* 276(19): 15816–15822, doi: 10.1074/jbc.M010878200.
109. Wang L, Lee Y-K, Bundman D, et al. (2002). Redundant pathways for negative feedback regulation of bile acid production. *Dev Cell* 2(6): 721–731.

110. Jones S A, Moore L B, Shenk J L, et al. (2000). The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* 14(1): 27–39.
111. Staudinger J L, Goodwin B, Jones S A, et al. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 98(6): 3369–3374, doi: 10.1073/pnas.051551698.
112. Kliewer S A, Moore J T, Wade L, et al. (1998). An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92(1): 73–82.
113. Bhalla S, Ozalp C, Fang S, et al. (2004). Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem* 279(43): 45139–45147, doi: 10.1074/jbc.M405423200.
114. Fabiani E de, Mitro N, Anzulovich A C, et al. (2001). The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor-alpha on the transcription of cholesterol 7alpha-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(33): 30708–30716, doi: 10.1074/jbc.M103270200.
115. Li T, Chiang J Y L (2005). Mechanism of rifampicin and pregnane X receptor inhibition of human cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(1): G74–84, doi: 10.1152/ajpgi.00258.2004.
116. Zhang M, Chiang J Y (2001). Transcriptional regulation of the human sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4alpha in mediating bile acid repression. *J Biol Chem* 276(45): 41690–41699, doi: 10.1074/jbc.M105117200.
117. Hruz P, Zimmermann C, Gutmann H, et al. (2006). Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis. *Gut* 55(3): 395–402, doi: 10.1136/gut.2005.067389.
118. Neimark E, Chen F, Li X, et al. (2004). Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 40(1): 149–156, doi: 10.1002/hep.20295.
119. Chen F, Ma L, Dawson P A, et al. (2003). Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 278(22): 19909–19916, doi: 10.1074/jbc.M207903200.
120. Denson L A, Sturm E, Echevarria W, et al. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121(1): 140–147.
121. Maeda T, Miyata M, Yotsumoto T, et al. (2004). Regulation of drug transporters by the farnesoid X receptor in mice. *Mol Pharm* 1(4): 281–289.
122. Plass J R M, Mol O, Heegsma J, et al. (2002). Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 35(3): 589–596, doi: 10.1053/jhep.2002.31724.
123. Lee F Y, Lee H, Hubbert M L, et al. (2006). FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci* 31(10): 572–580, doi: 10.1016/j.tibs.2006.08.002.
124. Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H, et al. (1998). SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 12(20): 3195–3205.
125. Makishima M, Lu T T, Xie W, et al. (2002). Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296(5571): 1313–1316, doi: 10.1126/science.1070477.

126. Stravitz R T, Rao Y P, Vlahcevic Z R, et al. (1996). Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1): G293-303.
127. Rao Y P, Stravitz R T, Vlahcevic Z R, et al. (1997). Activation of protein kinase C alpha and delta by bile acids: correlation with bile acid structure and diacylglycerol formation. *J Lipid Res* 38(12): 2446-2454.
128. Qiao L, Han S I, Fang Y, et al. (2003). Bile acid regulation of C/EBPbeta, CREB, and c-Jun function, via the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase pathways, modulates the apoptotic response of hepatocytes. *Mol Cell Biol* 23(9): 3052-3066.
129. Kurz A K, Graf D, Schmitt M, et al. (2001). Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 121(2): 407-419.
130. Schliess F, Kurz A K, Vom Dahl S, et al. (1997). Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver. *Gastroenterology* 113(4): 1306-1314.
131. Brady L M, Beno D W, Davis B H (1996). Bile acid stimulation of early growth response gene and mitogen-activated protein kinase is protein kinase C-dependent. *Biochem J* 316 (Pt 3): 765-769.
132. Nguyen A, Bouscarel B (2008). Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis. *Cell Signal* 20(12): 2180-2197, doi: 10.1016/j.cellsig.2008.06.014.
133. Jean-Louis S, Akare S, Ali M A, et al. (2006). Deoxycholic acid induces intracellular signaling through membrane perturbations. *J Biol Chem* 281(21): 14948-14960, doi: 10.1074/jbc.M506710200.
134. Akare S, Martinez J D (2005). Bile acid induces hydrophobicity-dependent membrane alterations. *Biochim Biophys Acta* 1735(1): 59-67, doi: 10.1016/j.bbalip.2005.04.006.
135. Studer E, Zhou X, Zhao R, et al. (2012). Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 55(1): 267-276, doi: 10.1002/hep.24681.
136. Kawamata Y (2003). A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *Journal of Biological Chemistry* 278(11): 9435-9440, doi: 10.1074/jbc.M209706200.
137. Pubmed NCBI TGR5 human gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=tgr5>. (Stand 01/2016)
138. HGNC HUGO Gene Nomenclature Comittee Gpbar-1. http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?q=data/hgnc_data.php&hgnc_id=19680. (Stand 01/2016)
139. Fredriksson R, Lagerström M C, Lundin L-G, et al. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63(6): 1256-1272, doi: 10.1124/mol.63.6.1256.
140. Pydi S P, Chakraborty R, Bhullar R P, et al. (2013). Role of rhodopsin N-terminus in structure and function of rhodopsin-bitter taste receptor chimeras. *Biochem Biophys Res Commun* 430(1): 179-182, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.029.
141. Bohn L M, Gainetdinov R R, Caron M G (2004). G protein-coupled receptor kinase/beta-arrestin systems and drugs of abuse: psychostimulant and opiate studies in knockout mice. *Neuromolecular medicine* 5(1): 41-50, doi: 10.1385/NMM:5:1:041.

142. Dorsam R T, Gutkind J S (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7(2): 79–94, doi: 10.1038/nrc2069.
143. Drake M T, Shenoy S K, Lefkowitz R J (2006). Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99(6): 570–582, doi: 10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce.
144. Venkatakrishnan A J, Deupi X, Lebon G, et al. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494(7436): 185–194, doi: 10.1038/nature11896.
145. Tuteja N (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal Behav* 4(10): 942–947.
146. Pols T W H, Noriega L G, Nomura M, et al. (2011). The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. *J Hepatol* 54(6): 1263–1272, doi: 10.1016/j.jhep.2010.12.004.
147. Macchiarulo A, Gioiello A, Thomas C, et al. (2013). Probing the Binding Site of Bile Acids in TGR5. *ACS Med Chem Lett* 4(12): 1158–1162, doi: 10.1021/ml400247k.
148. Pubmed NCBI TGR5 human transcript variant nucleotide. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001077191.1. (Stand 01/2016)
149. Hov J R, Keitel V, Laerdahl J K, et al. (2010). Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis. *PLoS ONE* 5(8): e12403, doi: 10.1371/journal.pone.0012403.
150. Hov J R, Keitel V, Schrumpf E, et al. (2011). TGR5 sequence variation in primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis* 29(1): 78–84, doi: 10.1159/000324138.
151. Rosenbaum D M, Rasmussen S G F, Kobilka B K (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459(7245): 356–363, doi: 10.1038/nature08144.
152. Kobilka B K (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 794–807, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.10.021.
153. Pubmed NCBI G-protein coupled bile acid receptor 1 [Homo sapiens] protein. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_733800. (Stand 01/2016)
154. Sato H, Macchiarulo A, Thomas C, et al. (2008). Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* 51(6): 1831–1841, doi: 10.1021/jm7015864.
155. Spomer L, Gertzen C G W, Schmitz B, et al. (2013). A membrane-proximal, C-terminal α -helix is required for plasma membrane localization and function of the GPCR TGR5. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.M113.502344.
156. Duboc H, Taché Y, Hofmann A F (2014). The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Dig Liver Dis*, doi: 10.1016/j.dld.2013.10.021.
157. Pellicciari R, Sato H, Gioiello A, et al. (2007). Nongenomic actions of bile acids. Synthesis and preliminary characterization of 23- and 6,23-alkyl-substituted bile acid derivatives as selective modulators for the G-protein coupled receptor TGR5. *J Med Chem* 50(18): 4265–4268, doi: 10.1021/jm070633p.
158. Keitel V, Spomer L, Marin J J G, et al. (2013). Effect of maternal cholestasis on TGR5 expression in human and rat placenta at term. *Placenta* 34(9): 810–816, doi: 10.1016/j.placenta.2013.06.302.
159. Keitel V, Cupisti K, Ullmer C, et al. (2009). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology* 50(3): 861–870, doi: 10.1002/hep.23032.

160. Keitel V, Donner M, Winandy S, et al. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 372(1): 78–84, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.171.
161. Keitel V, Görg B, Bidmon H J, et al. (2010). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia* 58(15): 1794–1805, doi: 10.1002/glia.21049.
162. Keitel V, Ullmer C, Häussinger D (2010). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biol Chem* 391(7): 785–789, doi: 10.1515/BC.2010.077.
163. Lieu T, Jayaweera G, Bunnett N W (2013). Gpba: A G Protein-Coupled Receptor for Bile Acids and an Emerging Therapeutic Target for Disorders of Digestion and Sensation. *Br J Pharmacol*, doi: 10.1111/bph.12426.
164. Pubmed NCBI TGR5 species gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=tgr5>. (Stand 01/2016)
165. Sato H, Genet C, Strehle A, et al. (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem Biophys Res Commun* 362(4): 793–798, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.130.
166. Cipriani S, Mencarelli A, Bruno A, et al. (2013). Activation of the bile acid receptor GPBAR1 protects against gastrointestinal injury caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs and aspirin in mice. *Br J Pharmacol* 168(1): 225–237, doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02128.x.
167. Macchiarulo A, Gioiello A, Thomas C, et al. (2008). Molecular field analysis and 3D-quantitative structure-activity relationship study (MFA 3D-QSAR) unveil novel features of bile acid recognition at TGR5. *J Chem Inf Model* 48(9): 1792–1801, doi: 10.1021/ci800196h.
168. Iguchi Y, Yamaguchi M, Sato H, et al. (2010). Bile alcohols function as the ligands of membrane-type bile acid-activated G protein-coupled receptor. *J Lipid Res* 51(6): 1432–1441, doi: 10.1194/jlr.M004051.
169. Iguchi Y, Nishimaki-Mogami T, Yamaguchi M, et al. (2011). Effects of chemical modification of ursodeoxycholic acid on TGR5 activation. *Biol Pharm Bull* 34(1): 1–7.
170. Londregan A T, Piotrowski D W, Futatsugi K, et al. (2013). Discovery of 5-phenoxy-1,3-dimethyl-1H-pyrazole-4-carboxamides as potent agonists of TGR5 via sequential combinatorial libraries. *Bioorg Med Chem Lett* 23(5): 1407–1411, doi: 10.1016/j.bmcl.2012.12.076.
171. Porez G, Prawitt J, Gross B, et al. (2012). Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. *J Lipid Res* 53(9): 1723–1737, doi: 10.1194/jlr.R024794.
172. Evans K A, Budzik B W, Ross S A, et al. (2009). Discovery of 3-aryl-4-isoxazolecarboxamides as TGR5 receptor agonists. *J Med Chem* 52(24): 7962–7965, doi: 10.1021/jm901434t.
173. Genet C, Strehle A, Schmidt C, et al. (2010). Structure-activity relationship study of betulonic acid, a novel and selective TGR5 agonist, and its synthetic derivatives: potential impact in diabetes. *J Med Chem* 53(1): 178–190, doi: 10.1021/jm900872z.
174. Herbert M R, Siegel D L, Staszewski L, et al. (2010). Synthesis and SAR of 2-aryl-3-aminomethylquinolines as agonists of the bile acid receptor TGR5. *Bioorg Med Chem Lett* 20(19): 5718–5721, doi: 10.1016/j.bmcl.2010.08.014.

175. Duan H, Ning M, Chen X, et al. (2012). Design, synthesis, and antidiabetic activity of 4-phenoxynicotinamide and 4-phenoxypyrimidine-5-carboxamide derivatives as potent and orally efficacious TGR5 agonists. *J Med Chem* 55(23): 10475–10489, doi: 10.1021/jm301071h.
176. Kumar D P, Rajagopal S, Mahavadi S, et al. (2012). Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun* 427(3): 600–605, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.104.
177. Raval S (2013). Compound and compositions as TGR5 agonists: WO2012082947. *Expert Opin Ther Pat* 23(4): 531–536, doi: 10.1517/13543776.2013.770841.
178. Martin R E, Bissantz C, Gavelle O, et al. (2013). 2-Phenoxy-nicotinamides are Potent Agonists at the Bile Acid Receptor GPBAR1 (TGR5). *ChemMedChem* 8(4): 569–576, doi: 10.1002/cmdc.201200474.
179. Zhu J, Ning M, Guo C, et al. (2013). Design, synthesis and biological evaluation of a novel class of potent TGR5 agonists based on a 4-phenyl pyridine scaffold. *Eur J Med Chem* 69: 55–68, doi: 10.1016/j.ejmech.2013.07.050.
180. Zhu J, Ye Y, Ning M, et al. (2013). Design, synthesis, and structure-activity relationships of 3,4,5-trisubstituted 4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoles as TGR5 agonists. *ChemMedChem* 8(7): 1210–1223, doi: 10.1002/cmdc.201300144.
181. Dehmlow H, Alvarez Sánchez R, Bachmann S, et al. (2013). Discovery and optimisation of 1-hydroxyimino-3,3-diphenylpropanes, a new class of orally active GPBAR1 (TGR5) agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 23(16): 4627–4632, doi: 10.1016/j.bmcl.2013.06.017.
182. Phillips D P, Gao W, Yang Y, et al. (2014). Discovery of trifluoromethyl(pyrimidin-2-yl)azetidine-2-carboxamides as potent, orally bioavailable TGR5 (GPBAR1) agonists: structure-activity relationships, lead optimization, and chronic in vivo efficacy. *J Med Chem* 57(8): 3263–3282, doi: 10.1021/jm401731q.
183. Park E J, Ahn Y G, Jung S H, et al. (2014). Discovery of novel pyrimidine and malonamide derivatives as TGR5 agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 24(17): 4271–4275, doi: 10.1016/j.bmcl.2014.07.026.
184. Perino A, Schoonjans K (2015). TGR5 and Immunometabolism: Insights from Physiology and Pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 36(12): 847–857, doi: 10.1016/j.tips.2015.08.002.
185. Högenauer K, Arista L, Schmiedeberg N, et al. (2014). G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 (GPBAR1, TGR5) Agonists Reduce the Production of Proinflammatory Cytokines and Stabilize the Alternative Macrophage Phenotype. *J Med Chem* 57(24): 10343–10354, doi: 10.1021/jm501052c.
186. Ullmer C, Alvarez Sanchez R, Sprecher U, et al. (2013). Systemic bile acid sensing by G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1) promotes PYY and GLP-1 release. *Br J Pharmacol*, doi: 10.1111/bph.12158.
187. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 10(3): 167–177, doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.001.
188. Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, et al. (2002). 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem* 45(17): 3569–3572.
189. Zambad S P, Tuli D, Mathur A, et al. (2013). TRC210258, a novel TGR5 agonist, reduces glycemic and dyslipidemic cardiovascular risk in animal models of diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 7: 1–14, doi: 10.2147/DMSO.S50209.

190. Zheng C, Zhou W, Wang T, et al. (2015). A Novel TGR5 Activator WB403 Promotes GLP-1 Secretion and Preserves Pancreatic β -Cells in Type 2 Diabetic Mice. *PloS one* 10(7): e0134051, doi: 10.1371/journal.pone.0134051.
191. Rizzo G, Passeri D, Franco F de, et al. (2010). Functional characterization of the semisynthetic bile acid derivative INT-767, a dual farnesoid X receptor and TGR5 agonist. *Mol Pharmacol* 78(4): 617–630, doi: 10.1124/mol.110.064501.
192. Baghdasaryan A, Claudel T, Gumhold J, et al. (2011). Dual farnesoid X receptor/TGR5 agonist INT-767 reduces liver injury in the Mdr2-/- (Abcb4-/-) mouse cholangiopathy model by promoting biliary HCO₃⁻ output. *Hepatology* 54(4): 1303–1312, doi: 10.1002/hep.24537.
193. McMahan R, Wang X X, Cheng L L, et al. (2013). Bile-acid receptor activation modulates hepatic monocyte activity and improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, doi: 10.1074/jbc.M112.446575.
194. Li Y, Jadhav K, Zhang Y (2013). Bile acid receptors in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Pharmacol*, doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.015.
195. Miyazaki-Anzai S, Masuda M, Levi M, et al. (2014). Dual Activation of the Bile Acid Nuclear Receptor FXR and G-Protein-Coupled Receptor TGR5 Protects Mice against Atherosclerosis. *PLoS ONE* 9(9): e108270, doi: 10.1371/journal.pone.0108270.
196. Keitel V, Häussinger D (2012). Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36(5): 412–419, doi: 10.1016/j.clinre.2012.03.008.
197. Montminy M (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807–822, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.807.
198. Holz G G, Kang G, Harbeck M, et al. (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol (Lond.)* 577(Pt 1): 5–15, doi: 10.1113/jphysiol.2006.119644.
199. Vallejo M (1994). Transcriptional control of gene expression by cAMP-response element binding proteins. *J Neuroendocrinol* 6(6): 587–596.
200. Kumar D P, Asgharpour A, Mirshahi F, et al. (2016). Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 modulates pancreatic islet α cells to promote glucose homeostasis. *The Journal of biological chemistry*, doi: 10.1074/jbc.M115.699504.
201. Jensen D D, Godfrey C B, Niklas C, et al. (2013). The bile acid receptor TGR5 does not interact with β -arrestins or traffic to endosomes but transmits sustained signals from plasma membrane rafts. *J Biol Chem* 288(32): 22942–22960, doi: 10.1074/jbc.M113.455774.
202. Cao W, Tian W, Hong J, et al. (2013). Expression of bile acid receptor TGR5 in gastric adenocarcinoma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(4): G322–7, doi: 10.1152/ajpgi.00263.2012.
203. Hong J, Behar J, Wands J, et al. (2010). Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 59(2): 170–180, doi: 10.1136/gut.2009.188375.
204. Masyuk A I, Huang B Q, Radtke B N, et al. (2013). Ciliary subcellular localization of TGR5 determines the cholangiocyte functional response to bile acid signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, doi: 10.1152/ajpgi.00383.2012.
205. Dong C, Filipeanu C M, Duvernay M T, et al. (2007). Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1768(4): 853–870, doi: 10.1016/j.bbamem.2006.09.008.

206. Vassileva G, Golovko A, Markowitz L, et al. (2006). Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem J* 398(3): 423–430, doi: 10.1042/BJ20060537.
207. Maruyama T, Tanaka K, Suzuki J, et al. (2006). Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J Endocrinol* 191(1): 197–205, doi: 10.1677/joe.1.06546.
208. Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Mahmoodzadeh S (2007). Gender aspects of the role of the metabolic syndrome as a risk factor for cardiovascular disease. *Gen Med* 4: S162–77.
209. Woods S C, Gotoh K, Clegg D J (2003). Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 228(10): 1175–1180.
210. Song K-H, Chiang J Y L (2006). Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43(1): 117–125, doi: 10.1002/hep.20919.
211. Viollet B, Kahn A, Raymondjean M (1997). Protein kinase A-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 17(8): 4208–4219.
212. Lou G, Ma X, Fu X, et al. (2014). GPBAR1/TGR5 mediates bile acid-induced cytokine expression in murine Kupffer cells. *PLoS ONE* 9(4): e93567, doi: 10.1371/journal.pone.0093567.
213. Bianco A C, Salvatore D, Gereben B, et al. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23(1): 38–89.
214. Arrojo E Drigo R, Fonseca T L, Werneck-de-Castro J P S, et al. (2012). Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim Biophys Acta*, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.08.019.
215. Pols T W H, Nomura M, Harach T, et al. (2011). TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab* 14(6): 747–757, doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.006.
216. Habib A M, Richards P, Rogers G J, et al. (2013). Co-localisation and secretion of glucagon-like peptide 1 and peptide YY from primary cultured human L cells. *Diabetologia*, doi: 10.1007/s00125-013-2887-z.
217. Drucker D J (2002). Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. *Gastroenterology* 122(2): 531–544.
218. Amato A, Cinci L, Rotondo A, et al. (2010). Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. *Neurogastroenterol Motil* 22(6): 664–e203, doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01476.x.
219. Hellström P M (2009). GLP-1: broadening the incretin concept to involve gut motility. *Regul Pept* 156(1-3): 9–12, doi: 10.1016/j.regpep.2009.04.004.
220. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G (2005). Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1): 386–390, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.139.
221. Bala V, Rajagopal S, Kumar D P, et al. (2014). Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ

- pathway and modulated by endogenous H₂S. *Front Physiol* 5: 420, doi: 10.3389/fphys.2014.00420.
222. Conarello S L, Li Z, Ronan J, et al. (2003). Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 100(11): 6825–6830, doi: 10.1073/pnas.0631828100.
 223. Drivas G, James O, Wardle N (1976). Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. *Br Med J* 1(6025): 1568–1569.
 224. Keane R M, Gadacz T R, Munster A M, et al. (1984). Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 95(4): 439–443.
 225. Liu C, Tao Q, Sun M, et al. (2010). Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Lab Invest* 90(12): 1805–1816, doi: 10.1038/labinvest.2010.123.
 226. Calmus Y, Guechot J, Podevin P, et al. (1992). Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α production by monocytes. *Hepatology* 16(3): 719–723.
 227. Greve J W, Gouma D J, Buurman W A (1989). Bile acids inhibit endotoxin-induced release of tumor necrosis factor by monocytes: an in vitro study. *Hepatology* 10(4): 454–458.
 228. Minter R M, Fan M-H, Sun J, et al. (2005). Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery* 138(2): 236–245, doi: 10.1016/j.surg.2005.04.001.
 229. Yoshimura T, Kurita C, Nagao T, et al. (1997). Inhibition of tumor necrosis factor- α and interleukin-1- β production by beta-adrenoceptor agonists from lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. *Pharmacology* 54(3): 144–152.
 230. Haselow K, Bode J G, Wammers M, et al. (2013). Bile acids PKA-dependently induce a switch of the IL-10/IL-12 ratio and reduce proinflammatory capability of human macrophages. *J Leukoc Biol*, doi: 10.1189/jlb.0812396.
 231. Tosello-Tramont A-C, Landes S G, Nguyen V, et al. (2012). Kupffer Cells Trigger Nonalcoholic Steatohepatitis Development in Diet-induced Mouse Model through Tumor Necrosis Factor- α Production. *J Biol Chem* 287(48): 40161–40172, doi: 10.1074/jbc.M112.417014.
 232. O'Neill P J, Ayala A, Wang P, et al. (1994). Role of Kupffer cells in interleukin-6 release following trauma-hemorrhage and resuscitation. *Shock* 1(1): 43–47.
 233. Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, et al. (2012). Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology* 136(2): 153–162, doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03554.x.
 234. Perino A, Pols T W H, Nomura M, et al. (2014). TGR5 reduces macrophage migration through mTOR-induced C/EBP β differential translation. *J Clin Invest* 124(12): 5424–5436, doi: 10.1172/JCI76289.
 235. Vallabhapurapu S, Karin M (2009). Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27: 693–733, doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
 236. Fraser C C (2008). G protein-coupled receptor connectivity to NF- κ B in inflammation and cancer. *Int Rev Immunol* 27(5): 320–350, doi: 10.1080/08830180802262765.

237. Rial N S, Choi K, Nguyen T, et al. (2012). Nuclear factor kappa B (NF- κ B): a novel cause for diabetes, coronary artery disease and cancer initiation and promotion? *Med Hypotheses* 78(1): 29–32, doi: 10.1016/j.mehy.2011.09.034.
238. Karin M, Cao Y, Greten F R, et al. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2(4): 301–310, doi: 10.1038/nrc780.
239. Aggarwal B B (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 6(3): 203–208, doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.003.
240. Bharti A C, Aggarwal B B (2002). Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 883–888.
241. Parry G C, Mackman N (1997). Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. *J Immunol* 159(11): 5450–5456.
242. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, et al. (2005). Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol* 35(1): 31–41, doi: 10.1002/eji.200425524.
243. Wang Y-D, Chen W-D, Yu D, et al. (2011). The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor κ light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. *Hepatology* 54(4): 1421–1432, doi: 10.1002/hep.24525.
244. Péan N, Doignon I, Garcin I, et al. (2013). The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice. *Hepatology* 58(4): 1451–1460, doi: 10.1002/hep.26463.
245. Michalopoulos G K (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213(2): 286–300, doi: 10.1002/jcp.21172.
246. Michalopoulos G K (2011). Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 43(2): 173–179, doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.014.
247. Lewis N D, Patnaude L A, Pelletier J, et al. (2014). A GPBAR1 (TGR5) small molecule agonist shows specific inhibitory effects on myeloid cell activation in vitro and reduces experimental autoimmune encephalitis (EAE) in vivo. *PLoS ONE* 9(6): e100883, doi: 10.1371/journal.pone.0100883.
248. Keitel V, Häussinger D (2013). TGR5 in cholangiocytes. *Curr Opin Gastroenterol*, doi: 10.1097/MOG.0b013e32835f3f14.
249. Riordan J R, Rommens J M, Kerem B, et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922): 1066–1073.
250. Anderson M P, Gregory R J, Thompson S, et al. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253(5016): 202–205.
251. Li T, Holmstrom S R, Kir S, et al. (2011). The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling. *Mol Endocrinol* 25(6): 1066–1071, doi: 10.1210/me.2010-0460.
252. Lavoie B, Balemba O B, Godfrey C, et al. (2010). Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels. *J Physiol (Lond.)* 588(Pt 17): 3295–3305, doi: 10.1113/jphysiol.2010.192146.
253. Larusso N F, Masyuk T V (2011). The role of cilia in the regulation of bile flow. *Dig Dis* 29(1): 6–12, doi: 10.1159/000324121.

254. Gradilone S A, Masyuk A I, Splinter P L, et al. (2007). Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 104(48): 19138–19143, doi: 10.1073/pnas.0705964104.
255. Masyuk A I, Gradilone S A, Banales J M, et al. (2008). Cholangiocyte primary cilia are chemosensory organelles that detect biliary nucleotides via P2Y12 purinergic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295(4): G725-34, doi: 10.1152/ajpgi.90265.2008.
256. Masyuk A I, Masyuk T V, Splinter P L, et al. (2006). Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca²⁺ and cAMP signaling. *Gastroenterology* 131(3): 911–920, doi: 10.1053/j.gastro.2006.07.003.
257. GRISHAM J W (1963). CILIATED EPITHELIAL CELLS IN NORMAL MURINE INTRAHEPATIC BILE DUCTS. *Proc Soc Exp Biol Med* 114: 318–320.
258. Masyuk T V, Masyuk A I, Larusso N F (2015). TGR5 in the Cholangiociliopathies. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 33(3): 420–425, doi: 10.1159/000371696.
259. Alpini G, Glaser S S, Ueno Y, et al. (1999). Bile acid feeding induces cholangiocyte proliferation and secretion: evidence for bile acid-regulated ductal secretion. *Gastroenterology* 116(1): 179–186.
260. Belelli D, Lambert J J (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* 6(7): 565–575, doi: 10.1038/nrn1703.
261. Lambert J J, Cooper M A, Simmons R D J, et al. (2009). Neurosteroids: endogenous allosteric modulators of GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1: S48-58, doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.08.009.
262. Reddy D S (2010). Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res* 186: 113–137, doi: 10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7.
263. McMillin M, Frampton G, Tobin R, et al. (2015). TGR5 signaling reduces neuroinflammation during hepatic encephalopathy. *Journal of neurochemistry* 135(3): 565–576, doi: 10.1111/jnc.13243.
264. Alemi F, Kwon E, Poole D P, et al. (2013). The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia. *J Clin Invest* 123(4): 1513–1530, doi: 10.1172/JCI64551.
265. Lieu T, Jayaweera G, Zhao P, et al. (2014). The Bile Acid Receptor TGR5 Activates the TRPA1 Channel to Induce Itch in Mice. *Gastroenterology*, doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.042.
266. Poole D P, Godfrey C, Cattaruzza F, et al. (2010). Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 22(7): 814-25, e227-8, doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01487.x.
267. Camilleri M, Vazquez-Roque M I, Carlson P, et al. (2011). Association of bile acid receptor TGR5 variation and transit in health and lower functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil* 23(11): 995-9, e458, doi: 10.1111/j.1365-2982.2011.01772.x.
268. Kirwan W O, Smith A N, Mitchell W D, et al. (1975). Bile acids and colonic motility in the rabbit and the human. *Gut* 16(11): 894–902.
269. Penagini R, Misiewicz J J, Frost P G (1988). Effect of jejunal infusion of bile acids on small bowel transit and fasting jejunal motility in man. *Gut* 29(6): 789–794.
270. Penagini R, Spiller R C, Misiewicz J J, et al. (1989). Effect of ileal infusion of glycochenodeoxycholic acid on segmental transit, motility, and flow in the human jejunum and ileum. *Gut* 30(5): 609–617.

271. Falconer J D, Smith A N, Eastwood M A (1980). The effects of bile acids on colonic motility in the rabbit. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 65(2): 135–144.
272. Keely S J (2010). Missing link identified: GpBAR1 is a neuronal bile acid receptor. *Neurogastroenterol Motil* 22(7): 711–717, doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01528.x.
273. Zhou H, Zhou S, Gao J, et al. (2014). Upregulation of bile acid receptor TGR5 and nNOS in gastric myenteric plexus is responsible for delayed gastric emptying after chronic high-fat feeding in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*: ajpgi.00380.2014, doi: 10.1152/ajpgi.00380.2014.
274. Raufman J-P, Cheng K, Zimniak P (2003). Activation of muscarinic receptor signaling by bile acids: physiological and medical implications. *Dig Dis Sci* 48(8): 1431–1444.
275. Pols T W H, Noriega L G, Nomura M, et al. (2011). The bile acid membrane receptor TGR5: a valuable metabolic target. *Dig Dis* 29(1): 37–44, doi: 10.1159/000324126.
276. Spiller R C, Trotman I F, Higgins B E, et al. (1984). The ileal brake--inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut* 25(4): 365–374.
277. Rajagopal S, Kumar D P, Mahavadi S, et al. (2013). Activation of G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, induces smooth muscle relaxation via both Epac- and PKA-mediated inhibition of RhoA/Rho kinase pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(5): G527–35, doi: 10.1152/ajpgi.00388.2012.
278. Alemi F, Poole D P, Chiu J, et al. (2013). The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice. *Gastroenterology* 144(1): 145–154, doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.055.
279. Hamilton J P, Xie G, Raufman J-P, et al. (2007). Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(1): G256–63, doi: 10.1152/ajpgi.00027.2007.
280. Pols T, Eggink H, Soeters M (2014). TGR5 ligands as potential therapeutics in inflammatory diseases. *IJICMR*: 27, doi: 10.2147/IJICMR.S40102.
281. Keitel V, Reich M, Häussinger D (2014). TGR5: Pathogenetic Role and/or Therapeutic Target in Fibrosing Cholangitis? *Clin Rev Allergy Immunol*, doi: 10.1007/s12016-014-8443-x.
282. Keitel V, Donner M, Winandy S, et al. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 372(1): 78–84, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.171.
283. Chen X, Lou G, Meng Z, et al. (2011). TGR5: a novel target for weight maintenance and glucose metabolism. *Exp Diabetes Res* 2011: 853501, doi: 10.1155/2011/853501.
284. Fiorucci S, Mencarelli A, Palladino G, et al. (2009). Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders. *Trends Pharmacol Sci* 30(11): 570–580, doi: 10.1016/j.tips.2009.08.001.
285. Harach T, Pols T W H, Nomura M, et al. (2012). TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Sci Rep* 2: 430, doi: 10.1038/srep00430.
286. Péan N, Doignon I, Tordjmann T (2013). Bile acids and liver carcinogenesis: TGR5 as a novel piece in the puzzle? *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, doi: 10.1016/j.clinre.2012.12.005.
287. Pols T W H, Auwerx J, Schoonjans K (2010). Targeting the TGR5-GLP-1 pathway to combat type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 34(4-5): 270–273, doi: 10.1016/j.gcb.2010.03.009.

288. Tiwari A, Maiti P (2009). TGR5: an emerging bile acid G-protein-coupled receptor target for the potential treatment of metabolic disorders. *Drug Discov Today* 14(9-10): 523–530, doi: 10.1016/j.drudis.2009.02.005.
289. Watanabe M, Morimoto K, Houten S M, et al. (2012). Bile acid binding resin improves metabolic control through the induction of energy expenditure. *PLoS ONE* 7(8): e38286, doi: 10.1371/journal.pone.0038286.
290. Yoneno K, Hisamatsu T, Shimamura K, et al. (2013). TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. *Immunology* 139(1): 19–29, doi: 10.1111/imm.12045.
291. Zhong M (2010). TGR5 as a therapeutic target for treating obesity. *Curr Top Med Chem* 10(4): 386–396.
292. Lutz H H, Trautwein C, Tischendorf J J (20131223). Primär sklerosierende Cholangitis: Diagnostik und Therapie. *Deutsches Ärzteblatt* 110(51-52): M-867.
293. Karlsen T H, Schrumpf E, Boberg K M (2010). Update on primary sclerosing cholangitis. *Dig Liver Dis* 42(6): 390–400, doi: 10.1016/j.dld.2010.01.011.
294. Boberg K M, Lind G E (2011). Primary sclerosing cholangitis and malignancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(6): 753–764, doi: 10.1016/j.bpg.2011.10.002.
295. Hohenester S, Oude-Elferink R P J, Beuers U (2009). Primary biliary cirrhosis. *Semin Immunopathol* 31(3): 283–307, doi: 10.1007/s00281-009-0164-5.
296. Invernizzi P, Selmi C, Gershwin M E (2010). Update on primary biliary cirrhosis. *Dig Liver Dis* 42(6): 401–408, doi: 10.1016/j.dld.2010.02.014.
297. Poupon R (2010). Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. *J Hepatol* 52(5): 745–758, doi: 10.1016/j.jhep.2009.11.027.
298. Talwalkar J A, Lindor K D (2003). Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 362(9377): 53–61, doi: 10.1016/S0140-6736(03)13808-1.
299. Reich M, Deutschmann K, Sommerfeld A, et al. (2015). TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro. *Gut*, doi: 10.1136/gutjnl-2015-309458.
300. Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, et al. (2007). The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 45(3): 695–704, doi: 10.1002/hep.21458.
301. Reinehr R, Häussinger D (2004). Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95. *Gastroenterology* 126(1): 249–262.
302. Wang Z-K, Xiao J-G, Huang X-F, et al. (2013). Effect of biliary drainage on inducible nitric oxide synthase, CD14 and TGR5 expression in obstructive jaundice rats. *World J Gastroenterol* 19(15): 2319–2330, doi: 10.3748/wjg.v19.i15.2319.
303. Erlinger S (2011). Chronic fibrosing cholangiopathies: a consequence of a defective HCO₃⁻ "umbrella"? *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35(2): 85–88.
304. Beuers U, Hohenester S, Buy Wenniger L J M de, et al. (2010). The biliary HCO₃(-)-umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology* 52(4): 1489–1496, doi: 10.1002/hep.23810.
305. Mogayzel P J, Flume P A (2011). Update in cystic fibrosis 2010. *Am J Respir Crit Care Med* 183(12): 1620–1624, doi: 10.1164/rccm.201102-0275UP.
306. Davies J C, Alton E W F W, Bush A (2007). Cystic fibrosis. *BMJ* 335(7632): 1255–1259, doi: 10.1136/bmj.39391.713229.AD.

307. Ratjen F A (2009). Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* 54(5): 595–605.
308. Davis P B (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173(5): 475–482, doi: 10.1164/rccm.200505-840OE.
309. Perz J F, Armstrong G L, Farrington L A, et al. (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 45(4): 529–538, doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.
310. Pungpapong S, Kim W R, Poterucha J J (2007). Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. *Mayo Clin Proc* 82(8): 967–975, doi: 10.4065/82.8.967.
311. Zein N N (2003). The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *Cleve Clin J Med* 70 Suppl 4: S2-6.
312. Wiegand J, Berg T (20130208). Ätiologie, Diagnose und Prävention einer Leberzirrhose: Teil 1 der Serie zur Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 110(6): M-85.
313. Sauerbruch T, Appenrodt B, Schmitz V, et al. (20130222). Konservative und interventionelle Therapie der Komplikationen bei Leberzirrhose: Teil 2 der Serie zur Leberzirrhose. *Deutsches Ärzteblatt* 110(8): M-126.
314. Häussinger D (2010). Hepatic encephalopathy. *Acta Gastroenterol Belg* 73(4): 457–464.
315. Häussinger D, Schliess F (2008). Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57(8): 1156–1165, doi: 10.1136/gut.2007.122176.
316. Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, et al. (2007). The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 45(3): 695–704, doi: 10.1002/hep.21458.
317. Kim M Y, Baik S K (2009). [Hyperdynamic circulation in patients with liver cirrhosis and portal hypertension]. *Korean J Gastroenterol* 54(3): 143–148.
318. Vallance P, Moncada S (1991). Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 337(8744): 776–778.
319. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 269(42): 26066–26075.
320. Keaney J F, Vita J A (1995). Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog Cardiovasc Dis* 38(2): 129–154.
321. van Ness K, Podkameni D, Schwartz M, et al. (1995). Dibutyl cAMP reduces nonparenchymal cell damage during cold preservation of rat livers. *J Surg Res* 58(6): 728–731, doi: 10.1006/jsre.1995.1115.
322. Müschen M, Warskulat U, Douillard P, et al. (1998). Regulation of CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand expression by lipopolysaccharide and dexamethasone in parenchymal and nonparenchymal rat liver cells. *Hepatology* 27(1): 200–208, doi: 10.1002/hep.510270131.
323. Graf D, Kurz A K, Fischer R, et al. (2002). Taurochenodeoxycholic acid-3 sulfate induces CD95 trafficking and apoptosis in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Gastroenterology* 122(5): 1411–1427.
324. Reinehr R, Becker S, Keitel V, et al. (2005). Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation. *Gastroenterology* 129(6): 2009–2031, doi: 10.1053/j.gastro.2005.09.023.

325. Reinehr R, Graf D, Häussinger D (2003). Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation. *Gastroenterology* 125(3): 839–853.
326. Toledo A, Yamaguchi J, Wang J-Y, et al. (2004). Taurodeoxycholate stimulates intestinal cell proliferation and protects against apoptotic cell death through activation of NF-kappaB. *Dig Dis Sci* 49(10): 1664–1671.
327. Wachs F-P, Krieg R C, Rodrigues C M P, et al. (2005). Bile salt-induced apoptosis in human colon cancer cell lines involves the mitochondrial transmembrane potential but not the CD95 (Fas/Apo-1) receptor. *Int J Colorectal Dis* 20(2): 103–113, doi: 10.1007/s00384-004-0616-2.
328. Mauricio A C, Slawik M, Heitzmann D, et al. (2000). Deoxycholic acid (DOC) affects the transport properties of distal colon. *Pflugers Arch* 439(5): 532–540.
329. Barcelo A, Claustre J, Toumi F, et al. (2001). Effect of bile salts on colonic mucus secretion in isolated vascularly perfused rat colon. *Dig Dis Sci* 46(6): 1223–1231.
330. Raimondi F, Santoro P, Barone M V, et al. (2008). Bile acids modulate tight junction structure and barrier function of Caco-2 monolayers via EGFR activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(4): G906–13, doi: 10.1152/ajpgi.00043.2007.
331. Gelbmann C M, Schteingart C D, Thompson S M, et al. (1995). Mast cells and histamine contribute to bile acid-stimulated secretion in the mouse colon. *J Clin Invest* 95(6): 2831–2839, doi: 10.1172/JCI117988.
332. Westergaard H (2007). Bile Acid malabsorption. *Curr Treat Options Gastroenterol* 10(1): 28–33.
333. Ardizzone S, Puttini P S, Cassinotti A, et al. (2008). Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 40 Suppl 2: S253–9, doi: 10.1016/S1590-8658(08)60534-4.
334. Husebye E (1999). The patterns of small bowel motility: physiology and implications in organic disease and functional disorders. *Neurogastroenterol Motil* 11(3): 141–161.
335. Giralt M, Vergara P (1999). Glucagonlike peptide-1 (GLP-1) participation in ileal brake induced by intraluminal peptones in rat. *Dig Dis Sci* 44(2): 322–329.
336. Hellström P M, Näslund E, Edholm T, et al. (2008). GLP-1 suppresses gastrointestinal motility and inhibits the migrating motor complex in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 20(6): 649–659, doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.01079.x.
337. Cani P D, Everard A, Duparc T (2013). Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 13(6): 935–940, doi: 10.1016/j.coph.2013.09.008.
338. Gareau M G, Jury J, MacQueen G, et al. (2007). Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut* 56(11): 1522–1528, doi: 10.1136/gut.2006.117176.
339. Kachrimanidou M, Malisiovas N (2011). Clostridium difficile infection: a comprehensive review. *Crit Rev Microbiol* 37(3): 178–187, doi: 10.3109/1040841X.2011.556598.
340. Cherbut C, Ferre J P, Corpet D E, et al. (1991). Alterations of intestinal microflora by antibiotics. Effects on fecal excretion, transit time, and colonic motility in rats. *Dig Dis Sci* 36(12): 1729–1734.
341. Camilleri M (2012). Peripheral mechanisms in irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 367(17): 1626–1635, doi: 10.1056/NEJMra1207068.

342. Bolt M J, Stellaard F, Sitrin M D, et al. (1989). Serum unconjugated bile acids in patients with small bowel bacterial overgrowth. *Clin Chim Acta* 181(1): 87–101.
343. Collins S M, Denou E, Verdu E F, et al. (2009). The putative role of the intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 41(12): 850–853, doi: 10.1016/j.dld.2009.07.023.
344. Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, et al. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336(6086): 1262–1267, doi: 10.1126/science.1223813.
345. Venneman N G, van Erpecum K J (2010). Pathogenesis of gallstones. *Gastroenterol Clin North Am* 39(2): 171-83, vii, doi: 10.1016/j.gtc.2010.02.010.
346. Smelt A H M (2010). Triglycerides and gallstone formation. *Clin Chim Acta* 411(21-22): 1625–1631, doi: 10.1016/j.cca.2010.08.003.
347. van Erpecum K J (2011). Pathogenesis of cholesterol and pigment gallstones: an update. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35(4): 281–287, doi: 10.1016/j.clinre.2011.01.009.
348. van Erpecum K J (2005). Biliary lipids, water and cholesterol gallstones. *Biol Cell* 97(11): 815–822, doi: 10.1042/BC20040088.
349. Stokes C S, Krawczyk M, Lammert F (2011). Gallstones: environment, lifestyle and genes. *Dig Dis* 29(2): 191–201, doi: 10.1159/000323885.
350. Hernández-Nazará A, Curiel-López F, Martínez-López E, et al. (2006). Genetic predisposition of cholesterol gallstone disease. *Ann Hepatol* 5(3): 140–149.
351. Wang D Q-H, Afdhal N H (2004). Genetic analysis of cholesterol gallstone formation: searching for Lith (gallstone) genes. *Curr Gastroenterol Rep* 6(2): 140–150.
352. Kusters A, Jirsa M, Groen A K (2003). Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim Biophys Acta* 1637(1): 1–19.
353. Jennings L J, Xu Q W, Firth T A, et al. (1999). Cholesterol inhibits spontaneous action potentials and calcium currents in guinea pig gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): G1017-26.
354. Behar J, Lee K Y, Thompson W R, et al. (1989). Gallbladder contraction in patients with pigment and cholesterol stones. *Gastroenterology* 97(6): 1479–1484.
355. Xiao Z, Schmitz F, Pricolo V E, et al. (2007). Role of caveolae in the pathogenesis of cholesterol-induced gallbladder muscle hypomotility. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(6): G1641-9, doi: 10.1152/ajpgi.00495.2006.
356. Behar J, Mawe G, Carey M (2013). Roles of cholesterol and bile salts in the pathogenesis of gallbladder hypomotility and inflammation: cholecystitis is not caused by cystic duct obstruction. *Neurogastroenterol Motil* 25(4): 283–290, doi: 10.1111/nmo.12094.
357. Xu Q W, Freedman S M, Shaffer E A (1997). Inhibitory effect of bile salts on gallbladder smooth muscle contractility in the guinea pig in vitro. *Gastroenterology* 112(5): 1699–1706.
358. Bernstein H, Bernstein C, Payne C M, et al. (2005). Bile acids as carcinogens in human gastrointestinal cancers. *Mutat Res* 589(1): 47–65, doi: 10.1016/j.mrrev.2004.08.001.
359. Blechacz B, Gores G J (2008). Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Hepatology* 48(1): 308–321, doi: 10.1002/hep.22310.
360. Nagengast F M, Grubben M J, van Munster I P (1995). Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 31(7-8): 1067–1070.
361. Degirolamo C, Modica S, Palasciano G, et al. (2011). Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors. *Trends Mol Med* 17(10): 564–572, doi: 10.1016/j.molmed.2011.05.010.

362. Debruyne P R, Bruyneel E A, Li X, et al. (2001). The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutat Res* 480-481: 359–369.
363. Qiao D, Gaitonde S V, Qi W, et al. (2001). Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 22(6): 957–964.
364. Bernstein C, Holubec H, Bhattacharyya A K, et al. (2011). Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol* 85(8): 863–871, doi: 10.1007/s00204-011-0648-7.
365. Ye R D (2001). Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *J Leukoc Biol* 70(6): 839–848.
366. Casaburi I, Avena P, Lanzino M, et al. (2012). Chenodeoxycholic acid through a TGR5-dependent CREB signaling activation enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer cell proliferation. *Cell Cycle* 11(14): 2699–2710, doi: 10.4161/cc.21029.
367. Keitel V, Reinehr R, Reich M, et al. (2012). Thieme E-Journals - Zeitschrift für Gastroenterologie / Abstract. (Keine Angabe).
368. Jankowski J A, Anderson M (2004). Review article: management of oesophageal adenocarcinoma -- control of acid, bile and inflammation in intervention strategies for Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 5: 71-80; discussion 95-6, doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.02143.x.
369. Kauer W K H, Stein H J (2005). Bile reflux in the constellation of gastroesophageal reflux disease. *Thorac Surg Clin* 15(3): 335–340, doi: 10.1016/j.thorsurg.2005.03.004.
370. Olyae M, Sontag S, Salman W, et al. (1995). Mucosal reactive oxygen species production in oesophagitis and Barrett's oesophagus. *Gut* 37(2): 168–173.
371. Farhadi A, Fields J, Banan A, et al. (2002). Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and the latter's progression toward esophageal cancer? *Am J Gastroenterol* 97(1): 22–26, doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05444.x.
372. Miwa K, Sahara H, Segawa M, et al. (1996). Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats. *Int J Cancer* 67(2): 269–274, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960717)67:2<269:AID-IJC19>3.0.CO;2-6.
373. Jenkins G J S, D'Souza F R, Suzen S H, et al. (2007). Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: The potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis* 28(1): 136–142, doi: 10.1093/carcin/bgl147.
374. Baretton G B, Aust D E (2012). Barrett-Ösophagus. Aktueller Stand. *Pathologe* 33(1): 5–16, doi: 10.1007/s00292-011-1541-0.
375. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, et al. (1999). Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* 340(11): 825–831, doi: 10.1056/NEJM199903183401101.
376. Poehlmann A, Kuester D, Malfertheiner P, et al. (2012). Inflammation and Barrett's carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 208(5): 269–280, doi: 10.1016/j.prp.2012.03.007.
377. Looby E, Abdel-Latif M M M, Athié-Morales V, et al. (2009). Deoxycholate induces COX-2 expression via Erk1/2-, p38-MAPK and AP-1-dependent mechanisms in esophageal cancer cells. *BMC Cancer* 9: 190, doi: 10.1186/1471-2407-9-190.

378. Yasuda H, Yamada M, Endo Y, et al. (2005). Elevated cyclooxygenase-2 expression in patients with early gastric cancer in the gastric pylorus. *J Gastroenterol* 40(7): 690–697, doi: 10.1007/s00535-005-1612-1.
379. Wu J, Gong J, Geng J, et al. (2008). Deoxycholic acid induces the overexpression of intestinal mucin, MUC2, via NF- κ B signaling pathway in human esophageal adenocarcinoma cells. *BMC Cancer* 8: 333, doi: 10.1186/1471-2407-8-333.
380. Qiao L, Studer E, Leach K, et al. (2001). Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell* 12(9): 2629–2645.
381. Fu X, Beer D G, Behar J, et al. (2006). cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett esophageal adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 281(29): 20368–20382, doi: 10.1074/jbc.M603353200.
382. Yasuda H, Hirata S, Inoue K, et al. (2007). Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 354(1): 154–159, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.168.
383. Gatto M, Bragazzi M C, Semeraro R, et al. (2010). Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Dig Liver Dis* 42(4): 253–260, doi: 10.1016/j.dld.2009.12.008.
384. Zhang F, Subbaramaiah K, Altorki N, et al. (1998). Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 273(4): 2424–2428.
385. Thiel A, Mrena J, Ristimäki A (2011). Cyclooxygenase-2 and gastric cancer. *Cancer Metastasis Rev* 30(3-4): 387–395, doi: 10.1007/s10555-011-9312-1.
386. Dannenberg A J, Altorki N K, Boyle J O, et al. (2001). Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* 2(9): 544–551, doi: 10.1016/S1470-2045(01)00488-0.
387. Salvado M D, Alfranca A, Haeggström J Z, et al. (2012). Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2. *Trends Mol Med* 18(4): 233–243, doi: 10.1016/j.molmed.2012.02.002.
388. Wang X, Fu X, van Ness C, et al. (2013). Bile Acid Receptors and Liver Cancer. *Curr Pathobiol Rep* 1(1): 29–35, doi: 10.1007/s40139-012-0003-6.
389. Meyers M R, Gokce N (2007). Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 14(5): 365–369, doi: 10.1097/MED.0b013e3282be90a8.
390. Rocha V Z, Libby P (2009). Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 6(6): 399–409, doi: 10.1038/nrcardio.2009.55.
391. Libby P, Geng Y J, Aikawa M, et al. (1996). Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 7(5): 330–335.
392. Ferreira V, van Dijk K W, Groen A K, et al. (2007). Macrophage-specific inhibition of NF- κ B activation reduces foam-cell formation. *Atherosclerosis* 192(2): 283–290, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.018.
393. Kida T, Tsubosaka Y, Hori M, et al. (2013). Bile acid receptor TGR5 agonism induces NO production and reduces monocyte adhesion in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(7): 1663–1669, doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301565.
394. Prawitt J, Caron S, Staels B (2011). Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 11(3): 160–166, doi: 10.1007/s11892-011-0187-x.

395. Breuer T G, Meier J J (20120629). Therapie des Typ-2-Diabetes im Krankenhaus. *Deutsches Ärzteblatt* 109(26): M-466.
396. Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, et al. (2010). SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(3): E419-28, doi: 10.1152/ajpendo.00417.2009.
397. Li T, Francl J M, Boehme S, et al. (2012). Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. *J Biol Chem* 287(3): 1861–1873, doi: 10.1074/jbc.M111.305789.
398. Staels B, Fonseca V A (2009). Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care* 32 Suppl 2: S237-45, doi: 10.2337/dc09-S355.
399. Kobayashi M, Ikegami H, Fujisawa T, et al. (2007). Prevention and treatment of obesity, insulin resistance, and diabetes by bile acid-binding resin. *Diabetes* 56(1): 239–247, doi: 10.2337/db06-0353.
400. Brufau G, Bahr M J, Staels B, et al. (2010). Plasma bile acids are not associated with energy metabolism in humans. *Nutr Metab (Lond)* 7: 73, doi: 10.1186/1743-7075-7-73.
401. Staels B, Handelsman Y, Fonseca V (2010). Bile acid sequestrants for lipid and glucose control. *Curr Diab Rep* 10(1): 70–77, doi: 10.1007/s11892-009-0087-5.
402. Wellen K E, Hotamisligil G S (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115(5): 1111–1119, doi: 10.1172/JCI25102.
403. Hotamisligil G S (2008). Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7: S52-4, doi: 10.1038/ijo.2008.238.
404. Bierhaus A, Schiekfer S, Schwaninger M, et al. (2001). Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50(12): 2792–2808.
405. Melloul D (2008). Role of NF-kappaB in beta-cell death. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 3): 334–339, doi: 10.1042/BST0360334.
406. Rink J S, Chen X, Zhang X, et al. (2012). Conditional and specific inhibition of NF-κB in mouse pancreatic β cells prevents cytokine-induced deleterious effects and improves islet survival posttransplant. *Surgery* 151(2): 330–339, doi: 10.1016/j.surg.2011.07.011.
407. Friberg J, Tonnesen M F, Heller S, et al. (2010). Inhibition of the nuclear factor-κB pathway prevents beta cell failure and diet induced diabetes in Psammomys obesus. *PLoS ONE* 5(10): e13341, doi: 10.1371/journal.pone.0013341.
408. Pfeiffer A F, Klein H H (20140131). Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Deutsches Ärzteblatt* 111(5): M-69.
409. Phillips L K, Prins J B (2011). Update on incretin hormones. *Ann N Y Acad Sci* 1243: E55-74, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06491.x.
410. Irons B K, Weis J M, Stapleton M R, et al. (2012). An update in incretin-based therapy: a focus on dipeptidyl peptidase--4 inhibitors. *Curr Diabetes Rev* 8(3): 169–182.
411. Salvatore T, Carbonara O, Cozzolino D, et al. (2009). Progress in the oral treatment of type 2 diabetes: update on DPP-IV inhibitors. *Curr Diabetes Rev* 5(2): 92–101.
412. Zarrinpar A, Loomba R (2012). Review article: the emerging interplay among the gastrointestinal tract, bile acids and incretins in the pathogenesis of diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 36(10): 909–921, doi: 10.1111/apt.12084.

413. Cipriani S, Mencarelli A, Chini M G, et al. (2011). The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PLoS ONE* 6(10): e25637, doi: 10.1371/journal.pone.0025637.
414. Mülhardt C (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics* (5th edn, Der Experimentator). München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
415. Pubmed NCBI Nucleotide BLAST.
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch. (Stand 01/2016)
416. Pubmed NCBI BLAST X.
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&BLAST_PROGRAMS=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome. (Stand 01/2016)
417. Keitel V, Cupisti K, Ullmer C, et al. (2009). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders. *Hepatology* 50(3): 861–870, doi: 10.1002/hep.23032.
418. Hov J R, Keitel V, Laerdahl J K, et al. (2010). Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis. *PLoS ONE* 5(8): e12403, doi: 10.1371/journal.pone.0012403.
419. HGVS Human genome variation society recommendations for the description of DNA sequence variants (2015). <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html#con>. (Stand 01/2014)
420. Müssig K, Staiger H, Machicao F, et al. (2009). Preliminary report: genetic variation within the GPBAR1 gene is not associated with metabolic traits in white subjects at an increased risk for type 2 diabetes mellitus. *Metab Clin Exp* 58(12): 1809–1811, doi: 10.1016/j.metabol.2009.06.012.
421. Hov J R, Keitel V, Schrumpf E, et al. (2011). TGR5 sequence variation in primary sclerosing cholangitis. *Dig Dis* 29(1): 78–84, doi: 10.1159/000324138.
422. Cotecchia S, Ostrowski J, Kjelsberg M A, et al. (1992). Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. *J Biol Chem* 267(3): 1633–1639.
423. Peeters M C, Wisse L E, Dinaj A, et al. (2012). The role of the second and third extracellular loops of the adenosine A1 receptor in activation and allosteric modulation. *Biochem Pharmacol* 84(1): 76–87, doi: 10.1016/j.bcp.2012.03.008.
424. Olah M E (1997). Identification of A2a adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors. *J Biol Chem* 272(1): 337–344.
425. Covic L, Gresser A L, Talavera J, et al. (2002). Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 99(2): 643–648, doi: 10.1073/pnas.022460899.
426. Knudson A G (2002). Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111(1): 96–102, doi: 10.1002/ajmg.10320.
427. Ligt R A F de, Rivkees S A, Lorenzen A, et al. (2005). A "locked-on," constitutively active mutant of the adenosine A1 receptor. *Eur J Pharmacol* 510(1-2): 1–8, doi: 10.1016/j.ejphar.2005.01.007.
428. Spomer L, Keitel V, Häussinger D (2012). Thieme E-Journals - Zeitschrift für Gastroenterologie / Abstract. (Keine Angabe).
429. Pankevych H, Korkhov V, Freissmuth M, et al. (2003). Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor

- folding and G protein coupling. *J Biol Chem* 278(32): 30283–30293, doi: 10.1074/jbc.M212918200.
430. Gáborik Z, Mihalik B, Jayadev S, et al. (1998). Requirement of membrane-proximal amino acids in the carboxyl-terminal tail for expression of the rat AT1a angiotensin receptor. *FEBS Lett* 428(3): 147–151.
 431. Gertzen C G W, Spomer L, Smits S H J, et al. (2015). Mutational mapping of the transmembrane binding site of the G-protein coupled receptor TGR5 and binding mode prediction of TGR5 agonists. *Eur J Med Chem* 104: 57–72, doi: 10.1016/j.ejmech.2015.09.024.
 432. Castro-Fernández C, Maya-Núñez G, Conn P M (2005). Beyond the signal sequence: protein routing in health and disease. *Endocr Rev* 26(4): 479–503, doi: 10.1210/er.2004-0010.
 433. Conn P M, Ulloa-Aguirre A, Ito J, et al. (2007). G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev* 59(3): 225–250, doi: 10.1124/pr.59.3.2.
 434. Arvan P, Zhao X, Ramos-Castaneda J, et al. (2002). Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* 3(11): 771–780.
 435. Andersson H, D'Antona A M, Kendall D A, et al. (2003). Membrane assembly of the cannabinoid receptor 1: impact of a long N-terminal tail. *Mol Pharmacol* 64(3): 570–577, doi: 10.1124/mol.64.3.570.
 436. Ahner A, Brodsky J L (2004). Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* 14(9): 474–478, doi: 10.1016/j.tcb.2004.07.013.
 437. Nanoff C, Freissmuth M (2012). ER-Bound Steps in the Biosynthesis of G Protein-Coupled Receptors. *Subcell Biochem* 63: 1–21, doi: 10.1007/978-94-007-4765-4_1.
 438. Duvernay M T, Zhou F, Wu G (2004). A conserved motif for the transport of G protein-coupled receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 279(29): 30741–30750, doi: 10.1074/jbc.M313881200.
 439. Zhou F, Filipeanu C M, Duvernay M T, et al. (2006). Cell-surface targeting of alpha2-adrenergic receptors -- inhibition by a transport deficient mutant through dimerization. *Cell Signal* 18(3): 318–327, doi: 10.1016/j.cellsig.2005.05.014.
 440. Canals M, Lopez-Gimenez J F, Milligan G (2009). Cell surface delivery and structural reorganization by pharmacological chaperones of an oligomerization-defective alpha(1b)-adrenoceptor mutant demonstrates membrane targeting of GPCR oligomers. *Biochem J* 417(1): 161–172, doi: 10.1042/BJ20081227.
 441. Oksche A, Dehe M, Schüle R, et al. (1998). Folding and cell surface expression of the vasopressin V2 receptor: requirement of the intracellular C-terminus. *FEBS Lett* 424(1-2): 57–62.
 442. Zhang X, Dong C, Wu Q J, et al. (2011). Di-acidic motifs in the membrane-distal C termini modulate the transport of angiotensin II receptors from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Biol Chem* 286(23): 20525–20535, doi: 10.1074/jbc.M111.222034.
 443. Rovati G E, Capra V, Neubig R R (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol* 71(4): 959–964, doi: 10.1124/mol.106.029470.

444. Capra V, Veltri A, Foglia C, et al. (2004). Mutational analysis of the highly conserved ERY motif of the thromboxane A2 receptor: alternative role in G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol* 66(4): 880–889, doi: 10.1124/mol.104.001487.
445. Seifert R, Wenzel-Seifert K (2003). The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors. *Life Sci* 73(18): 2263–2280.
446. Cunningham M R, McIntosh K A, Pediani J D, et al. (2012). Novel role for proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in membrane trafficking of proteinase-activated receptor 4 (PAR4). *J Biol Chem* 287(20): 16656–16669, doi: 10.1074/jbc.M111.315911.
447. Cho D I, Min C, Jung K S, et al. (2012). The N-terminal region of the dopamine D2 receptor, a rhodopsin-like GPCR, regulates correct integration into the plasma membrane and endocytic routes. *Br J Pharmacol* 166(2): 659–675, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01787.x.
448. Huang Y, Wilkinson G F, Willars G B (2010). Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Br J Pharmacol* 159(1): 237–251, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00517.x.
449. Whitaker G M, Lynn F C, McIntosh C H S, et al. (2012). Regulation of GIP and GLP1 receptor cell surface expression by N-glycosylation and receptor heteromerization. *PLoS ONE* 7(3): e32675, doi: 10.1371/journal.pone.0032675.
450. Cvejic S, Devi L A (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272(43): 26959–26964.
451. Wise H (2012). The roles played by highly truncated splice variants of G protein-coupled receptors. *J Mol Signal* 7(1): 13, doi: 10.1186/1750-2187-7-13.
452. Dong C, Zhang X, Zhou F, et al. (2010). ADP-ribosylation factors modulate the cell surface transport of G protein-coupled receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 333(1): 174–183, doi: 10.1124/jpet.109.161489.
453. Seraj Uddin M, Hauser M, Naider F, et al. (2015). The N-terminus of the yeast G protein-coupled receptor Ste2p plays critical roles in surface expression, signaling, and negative regulation. *Biochim Biophys Acta*, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.12.017.
454. Pennacchio L A (2003). Insights from human/mouse genome comparisons. *Mamm Genome* 14(7): 429–436, doi: 10.1007/s00335-002-4001-1.
455. Martignoni M, Groothuis G M M, Kanter R de (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(6): 875–894, doi: 10.1517/17425255.2.6.875.
456. Baltes S, Gastens A M, Fedrowitz M, et al. (2007). Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-glycoprotein. *Neuropharmacology* 52(2): 333–346, doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.07.038.
457. Mural R J, Adams M D, Myers E W, et al. (2002). A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* 296(5573): 1661–1671, doi: 10.1126/science.1069193.
458. Mestas J, Hughes C C W (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172(5): 2731–2738.
459. Wang R, Salem M, Yousef I M, et al. (2001). 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(4): 2011–2016, doi: 10.1073/pnas.031465498.

460. Lam P, Soroka C J, Boyer J L (2010). The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* 30(2): 125–133, doi: 10.1055/s-0030-1253222.
461. Pawlikowska L, Strautnieks S, Jankowska I, et al. (2010). Differences in presentation and progression between severe FIC1 and BSEP deficiencies. *J Hepatol* 53(1): 170–178, doi: 10.1016/j.jhep.2010.01.034.
462. Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, et al. (2005). Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 41(5): 1160–1172, doi: 10.1002/hep.20682.
463. Jansen P L, Strautnieks S S, Jacquemin E, et al. (1999). Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 117(6): 1370–1379.
464. Wang R, Lam P, Liu L, et al. (2003). Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology* 38(6): 1489–1499, doi: 10.1016/j.jhep.2003.09.037.
465. Lam P, Pearson C L, Soroka C J, et al. (2007). Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *Am J Physiol., Cell Physiol* 293(5): C1709-16, doi: 10.1152/ajpcell.00327.2007.
466. Wang R, Chen H-L, Liu L, et al. (2009). Compensatory role of P-glycoproteins in knockout mice lacking the bile salt export pump. *Hepatology* 50(3): 948–956, doi: 10.1002/hep.23089.
467. Zhang Y, Li F, Patterson A D, et al. (2012). Abcb11 deficiency induces cholestasis coupled to impaired β -fatty acid oxidation in mice. *J Biol Chem* 287(29): 24784–24794, doi: 10.1074/jbc.M111.329318.
468. Perwaiz S, Forrest D, Mignault D, et al. (2003). Appearance of atypical 3 alpha,6 beta,7 beta,12 alpha-tetrahydroxy-5 beta-cholan-24-oic acid in spgp knockout mice. *J Lipid Res* 44(3): 494–502, doi: 10.1194/jlr.M200394-JLR200.
469. Lam P, Wang R, Ling V (2005). Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry* 44(37): 12598–12605, doi: 10.1021/bi050943e.
470. Wang R, Liu L, Sheps J A, et al. (2013). Defective canalicular transport and toxicity of dietary ursodeoxycholic acid in the abcb11^{-/-} mouse: transport and gene expression studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 305(4): G286-94, doi: 10.1152/ajpgi.00082.2013.
471. Becker S, Reinehr R, Graf D, et al. (2007). Hydrophobic bile salts induce hepatocyte shrinkage via NADPH oxidase activation. *Cell Physiol Biochem* 19(1-4): 89–98, doi: 10.1159/000099197.
472. Sommerfeld A, Reinehr R, Häussinger D (2009). Bile acid-induced epidermal growth factor receptor activation in quiescent rat hepatic stellate cells can trigger both proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* 284(33): 22173–22183, doi: 10.1074/jbc.M109.005355.
473. Iwaki T, Ishizaki K, Kinoshita S, et al. (2007). Protective effects of ursodeoxycholic acid on chenodeoxycholic acid-induced liver injury in hamsters. *World J Gastroenterol* 13(37): 5003–5008.
474. Perez M-J, Briz O (2009). Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 15(14): 1677–1689.

475. Graf D, Kohlmann C, Haselow K, et al. (2006). Bile acids inhibit interleukin-6 signaling via gp130 receptor-dependent and -independent pathways in rat liver. *Hepatology* 44(5): 1206–1217, doi: 10.1002/hep.21368.
476. Kleiss C P, Wimmer R, Vennegeerts T, et al. (2012). Thieme E-Journals - Zeitschrift für Gastroenterologie / Abstract. (Keine Angabe).
477. Becker S, Reinehr R, Grether-Beck S, et al. (2007). Hydrophobic bile salts trigger ceramide formation through endosomal acidification. *Biol Chem* 388(2): 185–196, doi: 10.1515/BC.2007.021.
478. Stenman L K, Holma R, Eggert A, et al. (2013). A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(3): G227–34, doi: 10.1152/ajpgi.00267.2012.
479. Payne C M, Bernstein C, Dvorak K, et al. (2008). Hydrophobic bile acids, genomic instability, Darwinian selection, and colon carcinogenesis. *Clin Exp Gastroenterol* 1: 19–47.
480. Payne C M, Crowley-Skillicorn C, Bernstein C, et al. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 62(6): 825–840, doi: 10.1080/01635581003695756.
481. Scholtes C, Diaz O, Icard V, et al. (2008). Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replication by bile acids through FXR. *J Hepatol* 48(2): 192–199, doi: 10.1016/j.jhep.2007.09.015.
482. Zhu Y, Chen S (2013). Antiviral treatment of hepatitis C virus infection and factors affecting efficacy. *World J Gastroenterol* 19(47): 8963–8973, doi: 10.3748/wjg.v19.i47.8963.
483. Warpakowski A (20140321). Hepatitis C: Neue Wirkstoffe stoppen das Virus. *Deutsches Ärzteblatt* 111(12): A-509.
484. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, et al. (2011). Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver Int* 31(4): 443–460, doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02449.x.
485. Kubitz R, Brinkmeyer C, Sagir A, et al. (2011). Genetic variants of the bile salt export pump: inducers and modifiers of liver diseases. *Dig Dis* 29(1): 89–92, doi: 10.1159/000324140.
486. Stenkvist J, Sönnernborg A, Weiland O (2013). HCV RNA decline in chronic HCV genotype 2 and 3 during standard of care treatment according to IL28B polymorphism. *J Viral Hepat* 20(3): 193–199, doi: 10.1111/j.1365-2893.2012.01645.x.
487. Iwata R, Baur K, Stieger B, et al. (2011). A common polymorphism in the ABCB11 gene is associated with advanced fibrosis in hepatitis C but not in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 120(7): 287–296, doi: 10.1042/CS20100246.
488. Ge D, Fellay J, Thompson A J, et al. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461(7262): 399–401, doi: 10.1038/nature08309.
489. Thomas D L, Thio C L, Martin M P, et al. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461(7265): 798–801, doi: 10.1038/nature08463.

490. Pearlman B L, Traub N (2011). Sustained virologic response to antiviral therapy for chronic hepatitis C virus infection: a cure and so much more. *Clin Infect Dis* 52(7): 889–900, doi: 10.1093/cid/cir076.
491. Kim H Y, Cho H K, Choi Y H, et al. (2010). Bile acids increase hepatitis B virus gene expression and inhibit interferon- α activity. *FEBS J* 277(13): 2791–2802, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07695.x.
492. Ramière C, Scholtès C, Diaz O, et al. (2008). Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXR α . *J Virol* 82(21): 10832–10840, doi: 10.1128/JVI.00883-08.
493. Chang K-O, George D W (2007). Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells. *J Virol* 81(18): 9633–9640, doi: 10.1128/JVI.00795-07.
494. Chhatwal P, Bankwitz D, Gentzsch J, et al. (2012). Bile acids specifically increase hepatitis C virus RNA-replication. *PLoS ONE* 7(4): e36029, doi: 10.1371/journal.pone.0036029.
495. Müllenbach R, Weber S N, Krawczyk M, et al. (2012). A frequent variant in the human bile salt export pump gene ABCB11 is associated with hepatitis C virus infection, but not liver stiffness in a German population. *BMC Gastroenterol* 12: 63, doi: 10.1186/1471-230X-12-63.
496. Patton J B, George D, Chang K-O (2011). Bile acids promote HCV replication through the EGFR/ERK pathway in replicon-harboring cells. *Intervirology* 54(6): 339–348, doi: 10.1159/000321452.
497. Graf D, Haselow K, Münks I, et al. (2010). Inhibition of interferon- α -induced signaling by hyperosmolarity and hydrophobic bile acids. *Biol Chem* 391(10): 1175–1187, doi: 10.1515/BC.2010.108.
498. Chang K-O, Sosnovtsev S V, Belliot G, et al. (2004). Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 101(23): 8733–8738, doi: 10.1073/pnas.0401126101.
499. Lin C-Y, Chen J-Y, Lin T-N, et al. (2011). IL28B SNP rs12979860 is a critical predictor for on-treatment and sustained virologic response in patients with hepatitis C virus genotype-1 infection. *PLoS ONE* 6(3): e18322, doi: 10.1371/journal.pone.0018322.
500. Derbala M, Rizk N M, Al-Kaabi S, et al. (2013). The predictive value of IL28B rs12979860, rs11881222 and rs8099917 polymorphisms and IP-10 in the therapeutic response of Egyptian genotype 4 patients. *Virology* 444(1-2): 292–300, doi: 10.1016/j.virol.2013.06.025.
501. Jabłonowska E, Piekarska A, Koślińska-Berkan E, et al. (2012). Sustained virologic response and IL28B single-nucleotide polymorphisms in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon α and ribavirin. *Acta Biochim Pol* 59(3): 333–337.
502. Rojas Á, del Campo J A, Maraver M, et al. (2014). Hepatitis C virus infection alters lipid metabolism depending on IL28B polymorphism and viral genotype and modulates gene expression in vivo and in vitro. *J Viral Hepat* 21(1): 19–24, doi: 10.1111/jvh.12209.
503. Simon T G, Butt A A (2015). Lipid dysregulation in hepatitis C virus, and impact of statin therapy upon clinical outcomes. *World J Gastroenterol* 21(27): 8293–8303, doi: 10.3748/wjg.v21.i27.8293.
504. González-Reimers E, Quintero-Platt G, Rodríguez-Gaspar M, et al. (2015). Liver steatosis in hepatitis C patients. *World J Hepatol* 7(10): 1337–1346, doi: 10.4254/wjh.v7.i10.1337.

505. Modaresi Esfeh J, Ansari-Gilani K (2015). Steatosis and hepatitis C. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, doi: 10.1093/gastro/gov040.
506. Karlsen T H, Franke A, Melum E, et al. (2010). Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 138(3): 1102–1111, doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.046.
507. Franke A, Balschun T, Karlsen T H, et al. (2008). Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* 40(11): 1319–1323, doi: 10.1038/ng.221.
508. Pickering B M, Willis A E (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* 16(1): 39–47, doi: 10.1016/j.semcdb.2004.11.006.
509. Palmer E, Gray L C, Stott M, et al. (2012). Roles of promoter and 3' untranslated motifs in expression of the human C5a receptor. *Molecular immunology* 52(2): 88–95, doi: 10.1016/j.molimm.2012.04.012.
510. van der Velden A W, Thomas A A (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* 31(1): 87–106.
511. Hüffmeier U, Uebe S, Ekici A B, et al. (2010). Common variants at TRAF3IP2 are associated with susceptibility to psoriatic arthritis and psoriasis. *Nat Genet* 42(11): 996–999, doi: 10.1038/ng.688.
512. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, et al. (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466(7307): 714–719, doi: 10.1038/nature09266.
513. Burkhardt R, Kenny E E, Lowe J K, et al. (2008). Common SNPs in HMGCR in micronesians and whites associated with LDL-cholesterol levels affect alternative splicing of exon13. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(11): 2078–2084, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.172288.
514. Zhang K, Zhou B, Wang Y, et al. (2013). The TLR4 gene polymorphisms and susceptibility to cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 49(4): 946–954, doi: 10.1016/j.ejca.2012.09.022.
515. Povel C M, Boer J M A, Onland-Moret N C, et al. (2012). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved in insulin resistance, weight regulation, lipid metabolism and inflammation in relation to metabolic syndrome: an epidemiological study. *Cardiovasc Diabetol* 11: 133, doi: 10.1186/1475-2840-11-133.
516. Kristiansson K, Perola M, Tikkanen E, et al. (2012). Genome-wide screen for metabolic syndrome susceptibility Loci reveals strong lipid gene contribution but no evidence for common genetic basis for clustering of metabolic syndrome traits. *Circ Cardiovasc Genet* 5(2): 242–249, doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.961482.
517. Paterson J C M, Miller M H, Dillon J F (2014). Update on the treatment of hepatitis C genotypes 2-6. *Curr Opin Infect Dis*, doi: 10.1097/QCO.0000000000000114.
518. Ferenci P, Bernstein D, Lalezari J, et al. (2014). ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with or without ribavirin for HCV. *N Engl J Med* 370(21): 1983–1992, doi: 10.1056/NEJMoa1402338.
519. Lebovics E, Czobor K (2014). Screening, Diagnosis, Treatment, and Management of Hepatitis C: A Novel, Comprehensive, Online Resource Center for Primary Care Providers and Specialists. *Am J Med*, doi: 10.1016/j.amjmed.2014.10.004.

6. LITERATURVERZEICHNIS

520. Charlton M, Gane E, Manns M P, et al. (2014). Sofosbuvir and Ribavirin for Treatment of Compensated Recurrent Hepatitis C Virus Infection After Liver Transplantation. *Gastroenterology*, doi: 10.1053/j.gastro.2014.10.001.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 - Der Enterohepatische Kreislauf	4
Abbildung 2 – Die FXR-vermittelte Regulation der GS-Synthese (vereinfacht)	6
Abbildung 3 - Das TGR5-Gen	9
Abbildung 4 - Eine 3D-Darstellung des TGR5-Rezeptors	10
Abbildung 5 - Eine potentielle, vereinfachte Darstellung der TGR5-Signalkaskade	12
Abbildung 6 - Die Auswirkungen bei Loss/Gain of function	22
Abbildung 7 - Ein exemplarisches Sequenzierungsergebnis des BMFZ	43
Abbildung 8 - Das Basic Local Alignment Search Tool von Pubmed	44
Abbildung 9 - Ein exemplarisches BLAST-Ergebnis für die Mutation p.A217P	44
Abbildung 10 - Das Grundprinzip des Luciferase-Assays	54
Abbildung 11 - Die Firefly-Luciferasereaktion	54
Abbildung 12 - Nicht-synonyme TGR5-Mutationen Exon 2 & SNP rs11554825 Exon 1	70
Abbildung 13: Eine 3D-Darstellung der gefundenen TGR5-Mutationen	73
Abbildung 14 - Die Funktionsanalyse des WT	77
Abbildung 15 - Die Immunfluoreszenzdarstellung des TGR5-WT	78
Abbildung 16 - Die Immunfluoreszenzmessung des TGR5-WT 2	79
Abbildung 17 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.E8K	80
Abbildung 18 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.E8K	81
Abbildung 19 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.M112V	82
Abbildung 20 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.M112V	83
Abbildung 21 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.R201W	84
Abbildung 22 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.R201W	85
Abbildung 23 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.Y240D	86

8. TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 24 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.Y240D	87
Abbildung 25 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.Q296R.....	88
Abbildung 26 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.Q296R	89
Abbildung 27 - Die Funktionsanalyse der Mutation p.L327P	90
Abbildung 28 - Die Immunfluoreszenzdarstellung der Mutation p.L327P.....	91

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 – Verwendete Materialien und Geräte.....	33
Tabelle 2 - Die Primer der Amplifizierung	38
Tabelle 3 - Der PCR-Ansatz	39
Tabelle 4 – Die Standardbedingungen der PCR.....	40
Tabelle 5 – Die verwendeten Primer der Sequenzierung	43
Tabelle 6 – Die entworfenen Mutageneseprimer	46
Tabelle 7 – Der Mutageneseansatz	47
Tabelle 8 – Die Standardbedingungen der Mutagenese-PCR	48
Tabelle 9 – Der Kontrollverdau transformierter Plasmide	50
Tabelle 10 – Der Kontrollverdau des Plasmids	51
Tabelle 11 – Die Sequenzierungsprimer der transformierten Plasmide.....	51
Tabelle 12 – Der DNA-Ansatz des Luciferase-Assays.....	55
Tabelle 13 – Der Lipofectaminsansatz des Luciferase-Assays.....	56
Tabelle 14 – Der DNA- Ansatz der Immunfluoreszenzmessung.....	58
Tabelle 15 – Der Lipofectaminansatz der Immunfluoreszenzmessung	58
Tabelle 16 – Die verwendeten Primär- & Sekundärantikörper.....	59
Tabelle 17 - Die identifizierten Mutationen des Gesamtkollektivs.....	64
Tabelle 18 – Die Korrelation der nicht-synonymen TGR5-Mutationen mit den Patienten	71
Tabelle 19 – Die drei Genotypen des SNP rs11554825	74
Tabelle 20 - Die Korrelation des SNP (T72T = TT, WT) mit dem Geschlecht und HCV-Status..	75
Tabelle 21 - Die Korrelation des SNP (T72C/T = CT) mit dem Geschlecht und HCV-Status	75
Tabelle 22 - Die Korrelation des SNP (T72C = CC) mit dem Geschlecht und HCV-Status.....	75
Tabelle 23 – Die C-Allelhäufigkeit in Abhängigkeit von Infektionsstatus und Geschlecht.....	75
Tabelle 24 – Zusammenfassung identifizierter TGR5-Mutationen und ihren Auswirkungen ..	95

9. FORMELVERZEICHNIS

Formel 1 – Die Wallace-Regel.....	38
Formel 2 – Die Schmelztemperatur des Mutageneseprimers	46
Formel 3 – Die Berechnung der Allelfrequenz	62

10. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dieter Häussinger möchte ich für die Ermöglichung dieser experimentellen Dissertation und für die hervorragende Betreuung danken.

Frau Prof. Dr. Verena Keitel-Anselmino danke ich herzlich für die erstklassige Betreuung, ihr stets offenes Ohr, ihr Vertrauen, ihren unermüdlichen Einsatz und für ihre vielen Ratschläge und Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben.

Besonderen Dank gilt auch der Arbeitsgruppe, bestehend aus Frau Dr. Lina Spomer, Frau Stefanie Lindner, Frau Dr. Maria Reich und Frau Christina Wöhler, die mir stets hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite standen und mich in alle experimentellen Methoden einführten.

Danken möchte ich darüber hinaus auch den Mitarbeitern des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums Düsseldorf für die Durchführung der Sequenzierung und die hilfreichen Ratschläge zur Optimierung der Sequenzierungsergebnisse.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf für die DNA-Proben der universitären Blutbank bedanken.

Auch möchte ich mich beim gesamten Team der Experimentellen Hepatologie der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und das hilfsbereite, freundliche Miteinander bedanken.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die großartige mentale Unterstützung und ihren unermüdlichen Glauben an die Fertigstellung dieser Dissertation. Sie waren immer zur Stelle, wenn ich nach frustrierten Experimenten und nach erschöpfendem Literaturstudium neben dem Studium und dem Klinikalltag Zuspruch und Aufmunterung brauchte.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Sven Sebastian Hans Schäfer

Düsseldorf, Mai 2017