

Aus der
Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie
und Infektiologie
der Heinrich-Heine Universität
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tom Lüdde

**Einfluss von Gallenwegserkrankungen auf die Expression und
Lokalisation des Gallensäurenrezeptors TGR5**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Johanna Mathilde Höhne
2022

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

Dekan:	Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachterin:	Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino
Zweitgutachter:	Prof. Dr. med. Nadja Lehwald-Tywuschik

Für meine Eltern.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**Posterbeiträge:**

Spomer, L., Höhne, J., Hov, J., Karlsen, T., Nierhoff, D., Häussinger, D., Keitel, V., (2015), TGR5 protein amount is reduced in patients with primary sclerosing cholangitis (PSC), *Zeitschrift für Gastroenterologie*, (53) A1_39

Reich, M., Spomer, L., Höhne, J., Hov, J., Karlsen, T., Nierhoff, D., Häussinger, D., Keitel, V., (2017), Expression of the bile acid receptor TGR5 in livers of PSC patients and MDR2 $-/-$ (Abcb4 $-/-$) mice. *Journal of Hepatology*, (66) S555-556

Spomer, L., Reich, M., Höhne, J., Hov, J., Karlsen, T., Nierhoff, D., Häussinger, D., Keitel, V., (2018), Biliary TGR5 expression is reduced in the course of sclerosing cholangitis in humans and mice. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, (56) A1.5

Publikation:

Reich, M., Spomer, L., Klindt, C., Fuchs, K., Stindt, J., Deutschmann, K., Höhne, J., Liaskou, E., Hov, J., Karlsen, T., Beuers, U., Verheij, J., Ferreira-Gonzalez, S., Hirschfield, G., Forbes, S., Schramm, C., Esposito, I., Nierhoff, D., Fickert, P., Fuchs, Trauner, M., García-Beccaria, M., Gabernet, G., Nahnsen, S., Mallm, J-M., Vogel, M., Schoonjans, K., Lautwein, T., Koehrer, K., Häussinger, D., Luedde, T., Heikenwalder, T., Keitel, V., (2021) Downregulation of TGR5 (GPBAR1) in biliary epithelial cells contributes to the pathogenesis of sclerosing cholangitis. *Journal of Hepatology*, (75) S634-646

1 Zusammenfassung

Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der intra- und extrahepatischen Gallengänge, welche über eine fortschreitende Cholestase mit Fibrose in einer Leberzirrhose mündet. Die genaue Ätiopathogenese ist unklar. Aktuell stellt die Lebertransplantation die einzige lebensverlängernde Therapieoption der PSC dar. Ein genaueres Verständnis der Krankheit ist daher von großem klinischen Interesse. TGR5 ist ein G-Protein-gekoppelter Gallensäurenrezeptor, welcher in der Leber unter anderem in Cholangiozyten und den ortsständigen Makrophagen exprimiert wird. Dort fördert TGR5 die Proliferation, den Gallefluss sowie die Mikrozirkulation und hemmt die Apoptose sowie Entzündungsreaktionen. In dieser Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen TGR5 und der PSC näher untersucht. Um die Expression und Lokalisation von TGR5 in den Gallenwegen darzustellen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von PSC-Lebern sowie gesunden Kontrollgruppen mit Antikörpern gegen TGR5 angefertigt. Anschließend erfolgte eine relative Quantifizierung der TGR5-Fluoreszenzintensität in den einzelnen Gallengängen. Hier zeigte sich die TGR5-Immunfluoreszenzintensität in den PSC-Biopsien im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen vermindert. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden mögliche Mechanismen, die zu der Herabregulation von TGR5 in PSC-Lebern führen, untersucht. Dafür wurden humane Makrophagen sowie Cholangiozyten für vorbestimmte Zeiträume mit PSC-assoziierten Substanzen stimuliert und anschließend die TGR5-mRNA-Expression mittels semi-quantitativer *Realtime*-PCR ermittelt. Hier fand sich in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Gallensäuren (mit Ausnahme von TDC/GCDC), Il-8, den Vitamin-D-Vorstufen sowie Dexamethason keine Änderung der TGR5-mRNA-Expression. Hingegen konnte eine signifikante Verminderung der TGR5-mRNA-Expression nach der Stimulation mit den Zytokinen TNF- α und Il-1 β , dem aktiven Vitamin D sowie den PXR-Agonisten Mifepriston und Rifampicin beobachtet werden. In humanen Cholangiozytenzelllinie H69 fand sich nach der Stimulation mit Gallensäuren, Zytokinen (Il-8, TNF- α und Il-1 β) sowie Vitamin D kein signifikanter Effekt auf die TGR5-mRNA-Expression. Ergänzend zu dieser Arbeit wurden durch Kathleen Deutschmann und Katharina Ebener humane biliäre Organoide erzeugt und mit Il-8 stimuliert, wo sich eine Herabregulation der TGR5-mRNA-Menge zeigte. Die Herabregulation der TGR5-Expression in den Gallengängen von PSC-Erkrankten könnte durch verminderte protektive und proliferative TGR5-Wirkungen die Entwicklung einer PSC begünstigen sowie den Krankheitsverlauf aggravieren. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus eine Zelltyp-spezifische Regulation der TGR5-Expression gezeigt werden. Weiterführende Arbeiten könnten sich mit der therapeutischen Nutzbarkeit dieser Regulation befassen.

2 Summary

Primary sclerosing cholangitis (PSC) is a chronic inflammatory disease of the intra- and extrahepatic bile ducts, which leads to liver cirrhosis via progressive cholestasis with fibrosis. The exact etiopathogenesis is unclear. Currently, liver transplantation is the only life-prolonging therapeutic option for PSC. A more detailed understanding of the disease is, therefore, of great clinical interest. TGR5 is a G-protein-coupled bile acid receptor which is expressed, amongst others, in cholangiocytes and macrophages of the liver. There, TGR5 promotes proliferation, bile flow and inhibits apoptosis and inflammatory responses. This work investigated a possible link between TGR5 and PSC.

To visualize the expression and localization of TGR5 in the bile ducts, immunofluorescence staining was performed on PSC livers as well as healthy controls using antibodies against TGR5. This was followed by relative quantification of TGR5 fluorescence intensity in individual bile ducts. Here, TGR5 immunofluorescence intensity was shown to be decreased in the PSC biopsies compared with the healthy control groups. In the second part of this work, possible mechanisms leading to the downregulation of TGR5 in PSC livers were investigated. For this purpose, human macrophages as well as cholangiocytes were stimulated with PSC-associated substances for predetermined periods of time. Subsequently, TGR5 mRNA expression was determined by semi-quantitative real-time PCR. Here, no change in TGR5 mRNA expression was found in human macrophages after stimulation with bile acids (with the exception of TDC/GCDC), Il-8, the vitamin D precursors, and dexamethasone. In contrast, a significant decrease in TGR5 mRNA expression was observed in macrophages after stimulation with the cytokines TNF- α and Il-1 β , active vitamin D, and the PXR agonists mifepristone and rifampicin. Conversely, in the human cholangiocyte cell line H69, no significant effect on TGR5 mRNA expression was seen after stimulation with bile acids, cytokines (Il-8, TNF- α , and Il-1 β) and vitamin D.

Complementary to this work, human bile-derived organoids were generated by Kathleen Deutschmann and Katharina Ebner and stimulated with Il-8, where a significant downregulation of TGR5 mRNA levels was seen. Downregulation of TGR5 expression in the bile ducts of PSC patients could promote the development of PSC as well as aggravate disease progression through decreased protective and proliferative TGR5 effects. In this work it was demonstrated that TGR5 mRNA is regulated in a cell-type specific manner. A better understanding of this regulation may allow for therapeutic interventions in the future.

3 Abkürzungsverzeichnis

AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
ADAM 17	<i>A disintegrin and metalloprotease 17</i>
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
CA	Cholsäure
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	<i>Constitutive Androstane-Rezeptor</i>
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
CDCA	Chenodesoxycholsäure
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonukleinsäure</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CK7	Zytokeratin 7
CREB	<i>cAMP Responsive Element-Binding-Protein</i>
C_t	<i>Cycle of Threshold</i>
CYP3A4	Cytochrom P ₄₅₀ 3A4
CYP7A1	Cholesterol-7 α -Hydroxylase
DCA	Desoxycholsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASL	<i>European Association for the Study of the Liver</i>
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor</i> Rezeptor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FI	Immunfluoreszenzintensität
FXR	<i>Farnesoid-X-Rezeptor</i>
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glycocholsäure
GCDC	Glycochenodesoxycholsäure
GDC	Glycodesoxycholsäure
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GGT	γ -Glutamyltranspeptidase
GLP-1	<i>Glucagon-like-Peptide-1</i>
GLC	Glycolithocholsäure
GP-BAR1	<i>G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1</i>
GUDCA	Glycoursodesoxycholsäure
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HPRT-1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1
IL	Interleukin
IPAN	Intrinsische primär afferente Neuronen
JAM-A	<i>Junctional Adhesion Molecule-A</i>
LCA	Lithocholsäure
MAdCAM-1	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1</i>

M-BAR	<i>Membrane-Type Receptor for Bile Acids</i>
MCS-F	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MRCP	Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOX5-S	NADPH-Oxidase 5-S
OCA	Obeticholsäure
PKA	Proteinkinase A
p-ANCA	Perinukleäre Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PM	Progesteronmetabolite
RCF	<i>Relativ Centrifugal Force</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
RTq-PCR	Quantitative <i>Realtime</i> -PCR
S1PR2	Sphingosin-1-Phosphat-2-Rezeptor
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SEM	Standardfehler
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	Sekundär sklerosierende Cholangitis
SV40	<i>Simian-Virus 40</i>
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodesoxycholsäure
TLC	Taurolithocholsäure
TDC	Taurodesoxycholsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
UDCA	Ursodesoxycholsäure
TUDCA	Tauroursodesoxycholsäure
VAP-1	<i>Vascular Adhesion Protein-1</i>
VDR	Vitamin-D-Rezeptor

1	ZUSAMMENFASSUNG	III
2	SUMMARY	IV
3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
4	TABELLENVERZEICHNIS	IX
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
1	EINLEITUNG	1
1.1	GALLENSÄUREN.....	1
1.1.1	<i>Gallensäuresynthese und enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren</i>	1
1.1.2	<i>Physiologische Gallensäurefunktionen</i>	3
1.1.3	<i>Signalwege der Gallensäuren</i>	4
1.2	DER GALLENSÄUREREZEPTOR TGR5.....	7
1.2.1	<i>Bedeutung des TGR5-Rezeptors in der Leber, in den Zellen des Immunsystems und im Darm</i>	7
1.2.2	<i>Die TGR5-Signalkaskade in der Leber und im Magendarm-Trakt</i>	11
1.3	PRIMÄR SKLEROSIERENDE CHOLANGITIS (PSC)	14
1.3.1	<i>Epidemiologie</i>	14
1.3.2	<i>Theorien zur Ätiopathogenese</i>	14
1.3.3	<i>Klinik und Verlauf der Erkrankung</i>	17
1.3.4	<i>Diagnostik</i>	18
1.3.5	<i>Therapie</i>	18
2	ZIELE DER ARBEIT	20
3	MATERIAL UND METHODEN	21
3.1	MATERIAL, SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	21
3.1.1	<i>Biologisches Material</i>	21
3.1.2	<i>Zellkulturmedien und -materialien</i>	22
3.1.3	<i>Reagenzien</i>	23
3.1.4	<i>Kits</i>	23
3.1.5	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	23
3.1.6	<i>Antikörper</i>	23
3.1.7	<i>Geräte und Computerprogramme</i>	23
3.2	METHODEN.....	24
3.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	24
3.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	26
3.2.3	<i>Immunhistochemische Methoden</i>	28
4	ERGEBNISSE	32
4.1	RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER TGR5-PROTEINMENGE IN GALLENGÄNGEN VON PSC-LEBERN MITTELS IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG UND KONFOKALER LASERSCANNING MIKROSKOPIE	32
4.1.1	<i>Relative Quantifizierung der TGR5-Proteinmenge mittels Auswertung einzelner Gallengangszellen</i>	33
4.1.2	<i>Relative Quantifizierung der TGR5-Proteinmenge mittels Auswertung ganzer Gallengänge</i>	35
4.2	REGULATION DER TGR5-MRNA-EXPRESSION IN HUMANEN MAKROPHAGEN	37
4.2.1	<i>TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Gallensäuren</i>	38
4.2.2	<i>TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Zytokinen</i>	40
4.2.3	<i>TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Aktivatoren von nukleären Gallensäurenrezeptoren</i>	41
4.3	REGULATION DER TGR5-MRNA-EXPRESSION IN DER CHOLANGIOZYTEN-ZELLINIE H69 UND IN HUMANEN BILIÄREN ORGANOIDEN	44
4.3.1	<i>TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten der Zelllinie H69 nach Stimulation mit Gallensäuren</i>	44
4.3.2	<i>TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten der Zelllinie H69 nach Stimulation mit Zytokinen und Vitamin D</i>	45
4.3.3	<i>TGR5-mRNA-Expression in humanen biliären Organoiden nach der Stimulation mit Il-8</i>	46
5	DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	48
5.1	VERMINDERTE TGR5-PROTEINMENGE IN DEN GALLENGÄNGEN VON PSC-PATIENTEN	48

5.2	REGULATION DES TGR5-REZEPTORS	52
5.2.1	<i>Regulation des TGR5-Rezeptors in humanen differenzierten Makrophagen</i>	52
5.2.2	<i>Regulation des TGR5-Rezeptors in Cholangiozyten</i>	59
6	LITERATURVERZEICHNIS	62
7	DANKSAGUNG	68
8	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	69

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Stadieneinteilung der PSC nach Ludwig	18
Tabelle 2 Übersicht der verwendeten primären Antikörper für die kryofixierten Schnitte	28

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 01 Biosynthese und enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren beim Menschen.....	3
Abb. 02 Die TGR5-abhängigen Signalkaskaden.....	13
Abb. 03 Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung.....	30
Abb. 04 Immunfluoreszenzfärbung von humanen Lebern mit Darstellung von TGR5 in Cholangiozyten	33
Abb. 05 Exemplarische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mittels Betrachtung einzelner	34
Abb.06 Exemplarische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mittels Einschluss des gesamten Gallenganges nach Subtraktion des Lumens	35
Abb. 07 Die TGR5-Immunfluoreszenz (IF) ist in biliären Epithelzellen reduziert	37
Abb. 08 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Gallensäuren	38
Abb. 09 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Zytokinen	40
Abb. 10 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Calcitriol und seinen Vorstufen Vitamin-D ₃ sowie 25-OH-Vitamin-D ₃	42
Abb. 11 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Aktivatoren des nukleären Gallensäurenrezeptors PXR.....	43
Abb. 12 TGR5-mRNA-Expression in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 nach Stimulation mit Gallensäuren .	44
Abb. 13 TGR5-mRNA-Expression in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 nach Stimulation mit Zytokinen und Vitamin D.....	45
Abb. 14 TGR5-mRNA-Expression in biliären Organoiden nach Stimulation mit Il-8	47

1 Einleitung

Diese Arbeit untersucht, ob es im Rahmen der chronisch entzündlichen Gallenwegserkrankung primär sklerosierende Cholangitis (PSC) zu Veränderungen der Expression des in den Gallenwegen exprimierten Gallensäure-Rezeptors TGR5 kommt. Zunächst wird daher näher auf die Gallensäuren selbst eingegangen, bevor die Gallensäurenrezeptoren und schließlich die PSC einführend erläutert werden.

1.1 Gallensäuren

1.1.1 Gallensäuresynthese und enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren

Gallensäuren sind ein wichtiger Bestandteil der Galle [3]. Sie sind essentiell für die Fettverdauung sowie die Elimination von Cholesterin aus dem Körper [4]. Gebildet werden sie in der Leber und werden von dort über die Gallenwege in das Duodenum transportiert. Im terminalen Ileum werden sie dann zum größten Teil aus dem Darmlumen durch die Enterozyten in das Blutsystem rückresorbiert und gelangen über die Pfortader zurück in die Leber, wo sie erneut durch den Hepatozyten in die Galle sezerniert werden. Sie unterliegen somit dem sogenannten enterohepatischen Kreislauf [5].

In der Leber werden Gallensäuren ausgehend von Cholesterin in den Hepatozyten gebildet. Sie gehören somit chemisch zu der Gruppe der Steroide. Cholesterin ist ein weitestgehend hydrophobes Molekül. Aufgrund ihrer Funktion in der Fettverdauung und -resorption aus der Nahrung benötigen Gallensäuren amphiphile Eigenschaften [6]. Diese Eigenschaft wird unter anderem durch eine Hydroxylierung des Cholesterins erreicht, welche durch das Enzym Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) katalysiert wird. Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Gallensäuresynthese und wird durch einen negativen Feedbackmechanismus durch die Gallensäuren selbst reguliert. In weiteren Zwischenschritten entstehen die unkonjugierten Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodesoxycholsäure (CDCA) im Verhältnis von 2:1. Sie werden auch als primäre Gallensäuren bezeichnet [7]. Neben dem oben beschriebenen klassischen Weg zur Synthese der primären Gallensäuren gibt es auch den alternativen Weg. Dort entstehen die primären Gallensäuren nicht direkt aus Cholesterin, sondern aus oxygenierten Cholesterolderivaten [8].

Anschließend werden durch Konjugation von CA und CDCA mit den Aminosäuren Taurin und Glycin die vier konjugierten, primären Gallensäuren Glyco- und Taurocholsäure (GC, TC) sowie Glyco- und Taurochenodesoxycholsäure (GCDC, TCDC) synthetisiert. Durch die Konjugation wird der amphiphile Charakter der primären Gallensäuren weiter verstärkt. Unter

physiologischen Bedingungen liegen die konjugierten, primären Gallensäuren als negativ geladene Ionen vor. In diesem Zustand werden sie als Gallensalze bezeichnet. Vereinfachend wird in der Literatur auch für die anionische Form der Begriff „Gallensäure“ verwendet, so dass auch in dieser Arbeit verallgemeinernd über „Gallensäuren“ gesprochen wird.

Durch aktiven Transport gelangen die primären Gallensäuren aus den Hepatozyten in die Gallengänge und von dort weiter ins Duodenum. Ein großer Teil der Galle wird allerdings in der Gallenblase zwischengespeichert, konzentriert und erst bei Bedarf an den Dünndarm abgegeben [6].

Im Darm entstehen durch Abspaltung von Glycin bzw. Taurin sowie Entfernung einer Hydroxylgruppe die sekundären Gallensäuren, welche vermehrt hydrophobe Eigenschaften aufweisen. Katalysiert werden diese Reaktionen von Enzymen aus anaeroben Bakterien. In diesem Prozess wird Desoxycholsäure (DCA) aus CA sowie Lithocholsäure (LCA) aus CDCA gebildet [7].

Die tertiäre Gallensäure Ursodesoxycholsäure (UDCA) kann entweder durch bakterielle Umwandlung von LCA im Darm entstehen oder über einen Zwischenschritt aus CDCA, welcher sowohl in der Leber als auch im Darm stattfinden kann [9].

95 % der im Darm befindlichen Gallensäuren werden im terminalen Ileum rückresorbiert. Die übrigen 5%, die den Körper über den Stuhl verlassen, werden in der Leber durch Neusynthese aus Cholesterin ersetzt [8]. Die resorbierten Gallensäuren gelangen über das Pfortadersystem zurück in die Leber. Dort werden sie modifiziert, erneut mit Glycin/Taurin konjugiert und in den Gallekanalikus ausgeschieden, was den enterohepatischen Kreislauf komplettiert [5].

In Abbildung 1 findet sich eine schematische Übersicht über die Gallensäuresynthese in der Leber.

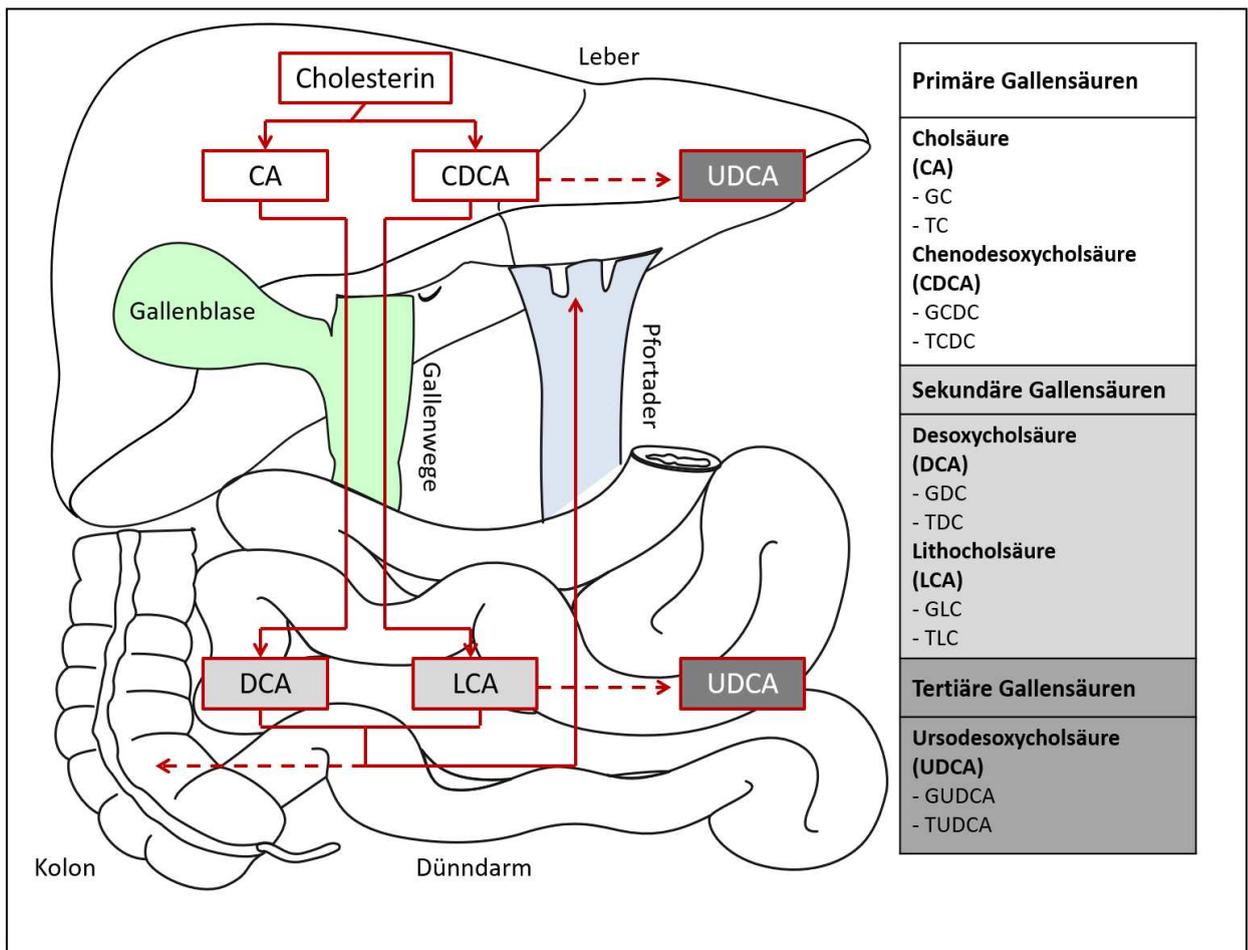


Abb. 01 Biosynthese und enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren beim Menschen

Die primären Gallensäuren CA und CDCA werden in der Leber aus Cholesterin gebildet. Über die Gallenwege gelangen sie in das Duodenum. Durch anaerobe Bakterien entstehen im Darm aus den primären Gallensäuren die sekundären Gallensäuren DCA und LCA. Der Großteil der Gallensäuren werden aus dem Darm, insbesondere im terminalem Ileum rückresorbiert und gelangen über das Pfortadersystem zurück in die Leber, so dass ein enterohepatischer Kreislauf entsteht. Die tertiäre Gallensäure UDCA kann durch bakterielle Prozesse im Darm, aber auch durch Umwandlung von CDCA in der Leber entstehen. Zur besseren Übersicht sind in der Abbildung nur die unkonjugierten Gallensäuren aufgeführt. Die Tabelle zeigt die einzelnen Gallensäuren sowie ihre konjugierten Formen mit Taurin und Glycin (Glycodesoxycholsäure (GDC), Taurodesoxycholsäure (TDC), Glycolithocholsäure (GLC), Tauroolithocholsäure (TLC), Glycoursodesoxycholsäure (GUDCA), Tauroursodesoxycholsäure (TUDCA)).

1.1.2 Physiologische Gallensäurefunktionen

Gallensäuren spielen eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel. Durch ihren amphiphilen Charakter bilden sie im wässrigen Milieu zusammen mit Cholesterin und Phospholipiden gemischte Mizellen. Diese Struktur ermöglicht im Darm die Emulsion von Lipiden und somit auch die Aufnahme der fettlöslichen Vitamine A, D, E und K. Außerdem bilden sie einen wichtigen Bestandteil in der Cholesterin-Homöostase, da die endgültige Cholesterin-Elimination über die Ausscheidung der Gallensäuren mit dem Stuhl erfolgt [4].

Gallensäuren sind allerdings nicht nur auf ihre Aufgaben im Lipidstoffwechsel zu beschränken. Als hormonähnliche Signalmoleküle regulieren sie die eigene Synthese in den Hepatozyten, die Sekretion in die Gallengänge sowie die Wiederaufnahme in Darm und Leber [10]. Darüber hinaus haben Gallensäuren einen modulierenden Effekt im Glucose- und Energiehaushalt. Über verschiedene Wege haben sie unter anderem Einfluss auf die Glykolyse, Insulinsensibilität sowie die Glukoneogenese [11].

Als Signalmoleküle nehmen sie zudem über ihre Rezeptoren positiven Einfluss auf die Leberregeneration. Die Regeneration wird unter anderem durch die Entgiftung von toxischen Gallensäuren, durch die Unterdrückung proinflammatorischer Prozesse und durch die Stimulation der Hepatozytenproliferationen gefördert [12].

Gallensäuren modulieren sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. So exprimieren verschiedene Immunzellen, u.a. Leber-residente Makrophagen (sog. Kupffer-Zellen) Gallensäuren-Rezeptoren und können so von diesen beeinflusst werden [13, 14].

Durch ihre regulatorischen Wirkungen in verschiedensten Bereichen des Körpers sind Gallensäuren bereits Teil der Therapie unterschiedlicher Erkrankungen. Die Gallensäure UDCA dient als Erstlinientherapie bei der Gallenwegserkrankung primär biliäre Cholangitis (PBC), wird breit zur Therapie von cholestatischen Lebererkrankungen eingesetzt und wurde in der Vergangenheit auch zur Behandlung von Cholesterin-Gallensteinen verwendet [13, 15].

In hohen Konzentrationen können Gallensäuren allerdings zu intra- und extrazellulären Zellschäden führen. Dabei ist die Hydrophobizität der Gallensäuren maßgeblich entscheidend für deren Zytotoxizität [5]. So sind die hydrophoben Gallensäuren DCA und LCA besonders schädlich [4]. Eine intrazelluläre Akkumulation, wie sie zum Beispiel bei angeborenen Defekten der hepatobiliären Transportmoleküle oder bei anderen Formen der Cholestase vorkommen, kann durch die Schädigung von Mitochondrien Apoptose und Nekrose auslösen. Hohe intraluminale Konzentrationen im Darm können durch Sekretion von Elektrolyten und Wasser zu einer Gallensäure-induzierter Diarrhoe führen [5]. Besonders zytotoxisch ist zudem die sekundäre Gallensäure LCA. Da sie nur im geringen Maße im terminalen Ileum rückresorbiert wird, gelangt sie in hohen Konzentrationen ins Kolon. Dort scheint sie durch die Einleitung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Strangbrüchen und die Hemmung von DNA-Reparatur-Enzymen bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen eine Rolle zu spielen [16].

1.1.3 Signalwege der Gallensäuren

Gallensäuren können ihre Effekte hauptsächlich über drei unterschiedliche Wege vermitteln. Zum einen ermöglicht die Bindung an nukleäre Rezeptoren, bei denen es sich um Transkripti-

onsfaktoren handelt, die Beeinflussung der Genexpression, zum anderen können Gallensäuren über plasmamembranständige Rezeptoren sowie über intrazelluläre Kinase-abhängige Wege schnellere Wirkungen erzielen [17].

Nukleäre Gallensäurerezeptoren

Nukleäre Rezeptoren sind Ligand-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die von verschiedenen lipophilen Molekülen wie Steroiden, die leicht die Plasmamembranen durchdringen können, aktiviert werden können [18]. Gallensäuren können so an den *Farnesoid-X*-Rezeptor (FXR), den Vitamin-D-Rezeptor (VDR, NR1I1), den Pregnan-X-Rezeptor (PXR, NR1I2) sowie den *Constitutive Androstane* Rezeptor (CAR, NR1I3) binden [11].

FXR ist ein wichtiger Regulator der Gallensäuren-, Lipid- und Glukose-Homöostase [10]. CDCA ist der beste endogene Ligand von FXR (mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) 10-50 μ M), gefolgt von LCA und DCA [19]. Durch die Beeinflussung der Genregulation kontrolliert FXR die Synthese, Sekretion sowie Entgiftung der Gallensäuren und verhindert somit eine Akkumulation von zytotoxischen Gallensäuren in der Leber [10]. Über das Schlüsselenzym CYP7A1 nimmt FXR Einfluss auf die Umwandlung von Cholesterin zu den primären Gallensäuren. Nach Bindung von Gallensäuren an den nukleären Rezeptor kommt es zu einer verminderten CYP7A1-Expression und somit zu einem negativen Feedback-Mechanismus [20]. Darüber hinaus kontrolliert FXR die Zusammensetzung des Gallensäuren-Pools. So werden diejenigen Enzyme vermindert exprimiert, welche für die Umwandlung von CDCA zu Cholsäure und für den ersten Schritt im alternativen Syntheseweg verantwortlich sind [21]. Des Weiteren fördert FXR auf molekularer Ebene über die vermehrte Expression von kanalikulären Gallensäuretransportern die Sekretion von Gallensäuren aus den Hepatozyten in den Gallenkanalikus [22, 23]. Entgegengesetzt limitiert FXR durch eine Herunterregulation von basolateral lokalisierten Transportern die Aufnahme von Gallensäuren aus dem portalvenösen Blut in die Hepatozyten. Damit wirkt FXR zu hohen Konzentrationen von toxischen Gallensäuren in den Leberzellen entgegen [22]. FXR nimmt zudem auch direkt Einfluss auf Enzyme, die an der Detoxifikation von Gallensäuren beteiligt sind. Potentiell schädliche hydrophobe Gallensäuren werden durch Hydroxylierung, Sulfatierung und Glucuronidierung in wasserlösliche und somit weniger zytotoxische Metabolite umgewandelt [24-26].

Der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) ist über die Aktivierung seines Hauptliganden, der aktiven Form von Vitamin D (1α -25(OH) $_2$ -Cholecalciferol), vor allem für die Regulation des Calcium-Stoffwechsels verantwortlich. Zusätzlich kann der Vitamin-D-Rezeptor in mittleren Konzentrationen von der sekundären Gallensäure LCA aktiviert werden. Dadurch wird die Expression von CYP3A induziert, wodurch VDR maßgeblich an der Entgiftung von LCA

in Leber und Darm beteiligt ist [16]. In der Leber wird VDR hauptsächlich in den Cholangiozyten, Sinusendothel-, Stern- und Kupffer-Zellen exprimiert, während in Hepatozyten nur eine geringe Menge zu finden ist [27].

Ein weiterer nukleärer Gallensäure-Rezeptor ist der Pregnan-X-Rezeptor, der vor allem in höheren Konzentrationen von LCA ($\geq 100 \mu\text{M}$) aktiviert wird [16]. Darüber hinaus gibt es zahlreiche endogene sowie exogene Agonisten. Unter anderem zählen Steroide wie Mifepriston sowie das Antibiotikum Rifampicin zu potenten PXR-Aktivatoren [28]. Als Hauptaufgabe hat PXR das Erkennen von körperfremden Stoffen sowie die Regulation für deren Detoxifikation [29]. Weiterführend moduliert PXR über die Induktion metabolischer Enzyme wie CYP3A4 den Abbau von toxischen Gallensäuren und kann eine Hemmung der Gallensäuresynthese bewirken. Der Rezeptor kann somit bei Cholestase leberprotektive Effekte vermitteln [29-31]. CAR vermittelt über ein ähnliches Spektrum von Zielgenen wie PXR ebenfalls die Detoxifikation von endogenen sowie exogenen Substraten. Dabei spielt CAR vor allem im Metabolismus von Bilirubin eine wichtige Rolle [29].

Effektausübung über Signalmoleküle

Die kurzfristige Regulation der Gallensäurewirkungen kann über verschiedenste Wege vermittelt werden. Dazu gehören die Aktivierung von Integrinen und Proteinkinase-abhängigen Signalwegen. Integrine sind Transmembranproteine, die an ihrer extrazellulären Seite Proteine erkennen und dann intrazellulär Signalkaskaden über Proteinkinasen aktivieren können. Die wichtigsten Integrine in der Leber sind $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 9\beta 1$ [18]. Über diese kann die therapeutisch genutzte Taurin-konjugierte Gallensäure TUDC den Gallenfluss und die Proliferation von Hepatozyten fördern sowie die von hydrophoben Gallensäuren induzierte Apoptose verhindern [32]. Proteinkinasen können auch über andere Rezeptoren und Moleküle aktiviert werden und können so verschiedenste Gallensäureeffekte in den Zellen vermitteln.

Zudem können Gallensäuren ihre Wirkung über Veränderung von Ionen-Strömen wie Ca^{2+} und Cl^- , Zu- und Abnahme des Zellvolumens sowie durch Modulation der cAMP-Konzentration entfalten [18, 33].

Plasmamembranständige Rezeptoren

Zu den plasmamembranständigen Gallensäurerezeptoren gehören TGR5, der Sphingosin-1-Phosphat-2-Rezeptor (S1PR2) sowie muskarinische Rezeptoren [11]. Während muskarinische Rezeptoren nur eine untergeordnete Rolle bei Gallensäuren-induzierten Effekten zu spielen scheinen, stellt TGR5 den Prototypen der membranständigen Gallensäurerezeptoren dar. Nä-

her wird auf die Wirkungen und Bedeutung von TGR5 in der Leber und im Immunsystem im Kapitel 2 eingegangen.

S1PR2 ist wie TGR5 ein G-protein-gekoppelter Rezeptor, der von TC aktiviert wird. Er kann an verschiedene G-Proteine gebunden sein, wobei jedes G-Protein einen anderen Signalweg aktivieren kann [34]. So scheint S1PR2 durch die Koordination von der *Extracellular Signal-regulated Kinase* (ERK1/2), Proteinkinasen und FXR eine Rolle bei der Regulation des hepatischen Glucose-, Gallensäuren- und Lipidstoffwechsels zu spielen [35].

1.2 Der Gallensäurerezeptor TGR5

TGR5 wird nach seiner Lokalisation in der Zellmembran entweder als *Membrane-Type Receptor for Bile Acids* (M-BAR) oder nach seiner Art der Signalübermittlung über G-Proteine auch als *G Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1* (GP-BAR1) bezeichnet [36-38].

Dosisabhängig wird TGR5 hauptsächlich von Gallensäuren aktiviert [38]. Dabei sind vor allem hydrophobe Gallensäuren besonders starke Aktivatoren. Unkonjugierte Gallensäuren zeigen somit in folgender Reihenfolge eine absteigende Potenz: LCA > DCA > CDCA > CA > UDCA. Durch die Konjugation der Gallensäuren mit Taurin kann die Potenz nochmals gesteigert werden. Damit stellt die Taurin-konjugierte Variante von LCA den stärksten, endogenen Agonisten für TGR5 dar ($EC_{50} = 0,285 \mu\text{M}$) [39]. Darüber hinaus konnten auch verschiedene Steroide, wie zum Beispiel Neurosteroiden als TGR5-Liganden charakterisiert werden [39, 40]. Diese zeigen im Vergleich zu Gallensäuren allerdings eine geringere Wirksamkeit („*efficacy*“) [39].

TGR5 kommt in unterschiedlicher Ausprägung ubiquitär im Körper vor. Die höchste *Messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression konnte in Makrophagen, Milz, Gallenblase, Leber und Darm festgestellt werden [38, 40-42].

1.2.1 Bedeutung des TGR5-Rezeptors in der Leber, in den Zellen des Immunsystems und im Darm

Während die nukleären Rezeptoren wie FXR eine hohe Expression in Hepatozyten zeigen, ist die TGR5-Expression in Hepatozyten unter physiologischen Bedingungen unterhalb der Detektionsgrenze [43]. In der Leber ist TGR5 allerdings in Cholangiozyten, Sinusendothelzellen, Gallenblasenepithelzellen und in Kupffer-Zellen zu finden [44]. In diesen Zelltypen wirkt TGR5 fördernd auf die Proliferation, den Gallefluss sowie die Mikrozirkulation und hemmend auf die Apoptose und auf Entzündungsreaktionen.

Cholangiozyten:

Cholangiozyten bilden als Epithelzellen sowohl intra- als auch extrahepatische Gallengänge. Je nach Größe und Lokalisation des Gallenganges können sie sich in ihrer Morphologie stark unterscheiden [45]. TGR5 fördert in Cholangiozyten vor allem die Proliferation sowie die Chloridsekretion und vermittelt protektive Effekte.

TGR5 ist in Cholangiozyten vorwiegend an der apikalen Membran, am primären Zilium sowie an den nukleären Membranen exprimiert [46, 47]. Die unterschiedliche Lokalisation ermöglicht TGR5 eine Detektion von Gallensäuren im Lumen des Gallengangs, an der Zelloberfläche sowie intrazellulär [47]. Als Mechano-, Chemo- und Osmosensor kann das primäre Zilium Veränderungen in dem Fluss, der Zusammensetzung und der Osmolalität der Galle erkennen und im Zellinneren Signalkaskaden anstoßen [48]. Während TGR5 im primären Zilium hauptsächlich an $G_{\alpha i}$ -Proteine gekoppelt ist, findet man an der Zelloberfläche eine Kopplung an $G_{\alpha s}$ -Proteine. Dadurch kommt es zu entgegengesetzten cAMP-Konzentrationen nach Aktivierung und somit zu gegensätzlichen Effekten. So veranlasst TGR5 in Cholangiozyten ohne primäres Zilium zum Beispiel eine Proliferation dieser Zelle, während sie in zili-entragenden Zellen inhibiert wird [46]. Neben diesem Signalweg kann TGR5 die Cholangiozytenproliferation in Mäusen auch über eine Aktivierung des *Epidermal Growth Factor* Rezeptor (EGFR) induzieren. Dieser Signalweg wird in Abschnitt 1.2.2. näher erläutert [49].

Zu den Hauptaufgaben der Cholangiozyten zählt die Modifikation der Galle. Durch chlorid- und bikarbonatreiche Sekretion mit folgendem Wassernachstrom über Aquaporin-Kanäle können sie die Zusammensetzung der Galle beeinflussen [50]. Der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) ist dabei ein wichtiger Chlorid-Kanal. TGR5 kann die Chlorid-Sekretion sowohl durch die direkte Aktivierung von CFTR als auch durch die Translokation von CFTR in die apikale Membran von Gallenblasenepithelzellen induzieren [42]. Die Cl^- - Freisetzung ermöglicht über einen Chlorid/Bikarbonat-Austauschtransporter die Alkalisierung der Galle oberhalb der apikalen Cholangiozytenmembran. Dieser Schutzfilm („*The biliary HCO₃⁻ Umbrella*“) verhindert eine Protonierung Glycin-konjugierter hydrophober Gallensäuren und unterbindet somit eine unkontrollierte Penetration von toxischen Gallensäuren in die Cholangiozyten [51]. TGR5 kann zudem über die Regulation der Permeabilität des Gallengangepithels vor dem Übertritt toxischer Substanzen ins Interstitium schützen. Diesen Effekt vermittelt TGR5 über die Expression und Phosphorylierung von *Junctional Adhesion Molecule-A* (JAM-A). JAM-A ist ein Teil der *Tight Junctions*, welche eine Barriere zwischen einzelnen Zellen ausbilden und somit die freie Diffusion von Stoffen aus der Galle verhindern [52]. TGR5 vermittelt in Cholangiozyten über die Ausbildung des Bikarbonat-

Schutzfilms sowie über die Stärkung der Zell-Zell-Verbindungen eine protektive Wirkung vor toxischen Gallensäuren.

Neben der Regulation von CFTR ist TGR5 auch an der Aktivierung und Translokation des Gallensäureaufnahme-transporters ASBT beteiligt. Darüber kann TGR5 Einfluss auf die Gallensäurezusammensetzung in der Galle nehmen [42]. Durch die Aufnahme von konjugierten Gallensäuren über ASBT in Cholangiozyten wird die Gallensäurekonzentration im Gallengang verringert [42, 53]. Darüber hinaus hat TGR5 positive Einwirkungen auf den Gallenfluss. So zeigten TGR5-Knockout-Mäuse einen reduzierten Gallenfluss gegenüber den Wildtyp-Mäusen [54].

Sinusendothelzellen:

Sinusoide sind weitlumige Kapillaren, die sowohl arterielles/sauerstoffreiches als auch portalvenöses/nährstoffreiches Blut aus der Peripherie ins Zentrum des Leberläppchen transportieren. Dabei liegen die Sinusendothelzellen zwischen dem Blutfluss und den Hepatozyten. Eine fehlende Basalmembran, unterschiedlich große Poren sowie Transporter in den Sinusendothelzellen ermöglichen einen ständigen Stoffaustausch zwischen dem Blutstrom und den Hepatozyten [55]. Sowohl durch die Kontraktion der Poren als auch durch Veränderung ihrer Anzahl kann je nach Bedingung der Stoffaustausch mit den Hepatozyten reguliert werden [56]. Dabei könnte TGR5 über einen cAMP-abhängigen Weg Einfluss auf die Größenveränderung der Poren nehmen [41]. Des Weiteren spielen Sinusendothelzellen eine wichtige Rolle in der Steuerung der Leberdurchblutung und somit auch in der Entstehung von portaler Hypertension im Rahmen der Leberzirrhose. Durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) kommt es zur Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und folglich zu einer Dilatation der Blutwege [57]. Nach Stimulation mit Gallensäuren kann TGR5 die Expression der eNOS-mRNA steigern [41]. Weiterführend entwickeln TGR5-defiziente Mäuse bereits bei einer akuten Leberschädigung eine portale Hypertension, während dies bei Wildtyp-Kontrolltieren nicht zu beobachten ist [58]. NO wird zusätzlich ein schützender Effekt vor oxidativem Stress und Lipidperoxidation zugeschrieben, wie er durch Gallensäuren induziert werden kann [59, 60]. Durch die unmittelbare Nähe zu portalvenösem Blut sind Sinusendothelzellen kontinuierlich wechselnden Gallensäurekonzentrationen ausgesetzt. Hierbei kommt TGR5 eine entscheidende Rolle zum Schutz der Sinusendothelzellen vor toxischen Gallensäuren zu. Die Initiation zur Serin-Phosphorylierung des CD95-Todesrezeptor durch TGR5 verhindert die CD95-induzierte Apoptose der Sinusendothelzellen [41, 60].

Kupffer-Zellen und das Immunsystem:

Kupffer-Zellen sind leberspezifische Makrophagen. Sie liegen in den Sinusoiden den Sinusendothelzellen auf und haben somit direkten Kontakt zum Blut. TGR5 wird sowohl in der Plasmamembran als auch in den intrazellulären Kompartimenten von Kupffer-Zellen exprimiert [61]. Neben der Phagozytose von Partikeln und Mikroorganismen, die über das Blut in die Leber gelangen, sind Kupffer-Zellen die Hauptproduzenten von Zytokinen in der Leber [55, 61]. Dabei hat TGR5 Einfluss auf beide Bereiche.

Die Stimulation von TGR5 mit hydrophoben Gallensäuren bewirkt in Kupffer-Zellen eine verminderte Expression der Zytokine Interleukin-1 α (Il-1 α), Il-1 β , Il-6 und des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [61]. Il-1 β , Il-6 und TNF- α sind wichtige Entzündungsmediatoren. So aktivieren sie unter anderem Monozyten und neutrophile Granulozyten und locken diese zum Infektionsherd [62]. Die Abnahme der Zytokin-Produktion wird über die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells*) vermittelt. NF- κ B übernimmt eine Schlüsselfunktion in der Entstehung und Unterhaltung von Autoimmunerkrankungen sowie von Krebs in der Leber. So kann TGR5 in der Leber über diesen Weg protektiv wirken [63].

In Alveolarmakrophagen konnte gezeigt werden, dass LCA und seine konjugierten Varianten die Phagozytoseleistung über TGR5 herabsetzen können. Da die Phagozytosekapazität in Kupffer-Zellen bei obstruktiven Gallenwegserkrankungen ebenfalls reduziert ist, wird vermutet, dass TGR5 auch dort regulatorische Einflüsse hat [38].

Eine TGR5-Expression zeigte sich auch in anderen Makrophagen, wie den CD14-positiven Blutmonozyten sowie den ortsständigen Makrophagen in Lunge und Gehirn [38, 40]. Ähnlich wie in Kupffer-Zellen hat TGR5 auch hier einen inhibierenden Effekt auf die Zytokinbildung [38].

Die TGR5-Aktivierung in Blutmakrophagen schützt vor der Entstehung von arteriosklerotischen Plaques in Blutgefäßen. Pathophysiologisch kommt es bei der Arteriosklerose zunächst zu einer Schädigung der Intima mit folgender Entzündungsreaktion und Ansiedlung von Makrophagen. Durch die Aufnahme von oxidierten Lipoproteinen in die Makrophagen entstehen Schaumzellen, die einen wichtigen Bestandteil arteriosklerotischer Plaques bilden. TGR5 reduziert nicht nur die Aufnahme von oxidierten Lipoproteinen in die Makrophagen, sondern hat auch durch die verminderte Zytokinproduktion eine antiinflammatorische Wirkung in der initialen Entzündungsreaktion [64].

Zwar wird TGR5 selbst nicht in Dendritischen Zellen exprimiert, kann aber die Differenzierung aus Monozyten beeinflussen. So entsteht nach Stimulation mit Gallensäuren ein antiinflammatorischer Phänotyp, der eine verringerte Il-12-Produktion aufweist [65]. Il-12 stimu-

liert die Differenzierung von T-Helferzellen zu Typ1-T-Helferzellen und fördert somit die zellvermittelte Immunantwort [66].

Zusammenfassend zeigt TGR5 in Immunzellen eine antiinflammatorische Wirkung und kann so vor der Entstehung und Unterhaltung von Entzündungsreaktionen schützen.

Darm

TGR5 wird auch in verschiedenen Zellen des Dün- und Dickdarms exprimiert. So findet sich TGR5 in Teilen des enterischen Nervensystems, worüber es Einfluss auf die Motilität des Darms nehmen kann. Neben inhibitorischen Neuronen des Plexus myentericus exprimieren auch cholinerge Neuronen des Plexus submucosus sowie intrinsische primär afferente Neuronen (IPAN) TGR5 im Dün- und Dickdarm. Zusammenfassend wirkt TGR5 im Dünndarm hemmend auf die Motilität, während der Rezeptor im Dickdarm diese fördert [67, 68]. TGR5 kann im Kolon auch in enterochromaffinen Zellen fördernd auf die Motilität wirken. Dieser Effekt wird über die Freisetzung von Serotonin vermittelt, welches die Darmperistaltik steigert [68, 69]. Des Weiteren wird TGR5 in den Epithelzellen des Kolons exprimiert. Hier hat der Rezeptor hemmende Wirkungen auf die Chlorid-Sekretion, wodurch entgegengesetzt zu anderen TGR5-medierten Effekten im Darm eine Obstipation gefördert wird [70]. Da bei TGR5-*Knockout*-Mäusen eine verminderte Defäkationsfrequenz sowie ein reduzierter Wassergehalt des Stuhlgangs zu beobachten ist, erscheint TGR5 im Gesamten eher einer Obstipation entgegenzuwirken [68]. Neben der Regulation der Darmmotilität kann TGR5 im Darm zusätzlich Einfluss auf den Glukosehaushalt nehmen. TGR5 wird in den neuroendokrinen L-Zellen in Dün- und Dickdarm exprimiert [71]. Neuroendokrine L-Zellen produzieren das *Glucagon-like-Peptide-1* (GLP-1), welches die Insulinfreisetzung fördert, darüber den Glukose-Spiegel im Blut senkt, die Magenentleerung verzögert und die Darmmotilität inhibiert [72].

1.2.2 Die TGR5-Signalkaskade in der Leber und im Magendarm-Trakt

TGR5 ist ein plasmamembranständiger Rezeptor und zählt zu der Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren [37, 38]. In der Leber ist TGR5 am häufigsten an stimulierende, heterotrimere G-Proteine ($G_{\alpha s}$, G_{β} , G_{γ}) gekoppelt, die nach Bindung von Gallensäuren an TGR5 die membranständige Adenylatzyklase aktivieren. Diese katalysiert die Bildung des *Second Messengers* cAMP (Cyclisches Adenosinmonophosphat), welches zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Als Serin-/Threoninkinase vermittelt die PKA ihre Effekte über die Phosphorylierung von Proteinen. So wird die antiapoptotische Wirkung von TGR5 über die Phosphorylierung des CD95-Rezeptors in Sinusendothelzellen erzielt. Ebenso phosphoryliert sie im Zellkern den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP Responsive Element-Binding* Pro-

tein) und steigert darüber die Expression der Zielgene [73]. Über diesen Weg kann TGR5 unter anderem die Expression der endothelialen NO-Synthase steigern. Durch PKA-abhängige Phosphorylierung eben dieses Enzyms kommt es zu einem Anstieg von NO [41]. Weiterführend kann TGR5 über die Aktivierung der PKA in der glatten Muskulatur der Gallenblasenwand den ATP-sensitiven Kaliumkanal K_{ATP} öffnen. Durch die dadurch induzierte Hyperpolarisation des Muskels entsteht eine Relaxation der Gallenblasenwand [74]. Zusätzlich kann PKA-abhängig über den EGFR eine Proliferation in gastralen Adenokarzinom-Zellen vermittelt werden. Dabei wird durch die PKA die Metalloprotease ADAM-17 (*a disintegrin and metalloprotease-17*) aktiviert, welche von proHB-EGF einen aktiven EGFR-Liganden abspaltet. Durch die EGFR-Aktivierung wird nun die MAP-Kinasen-Signalkaskade ausgelöst an deren Ende Erk 1 und 2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 und 2*) durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen induzieren [75]. Neben der beschriebenen PKA-abhängigen Stimulation des EGF-Rezeptors gibt es einen Mechanismus der unabhängig von der Adenylatzyklase eine Aktivierung hervorrufen kann. TGR5 fördert dabei in Cholangiozyten über die Aktivierung der NADPH-Oxidase die Entstehung von reaktiven Stickstoffspezies, welche wiederum die cSrc-Kinase stimulieren. Dadurch kann es zu einer direkten Aktivierung des EGFR durch die cSrc-Kinase kommen sowie zu einer indirekten Aktivierung über ADAM-17 [49].

In einigen Fällen kann TGR5 über cAMP selbst Effekte vermitteln. So steigert TGR5 über cAMP die Interaktion von β -Arrestin-2 mit dem NF- κ B-Inhibitor $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und verhindert somit auf mRNA-Ebene die Expression von NF- κ B [63]. Darüber kann TGR5 auf Genomebene die Zytokinproduktion in Kupffer-Zellen mindern [61]. Weiterführend kann eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels die Translokation von CFTR und ASBT in die Zellmembran von Cholangiozyten induzieren, wodurch eine Förderung des Gallenflusses entsteht [47].

Neben der häufigeren Bindung von TGR5 an die stimulierende $G_{\alpha s}$ -Untereinheit, kann TGR5 auch an die inhibierende $G_{\alpha i}$ -Untereinheit gebunden sein. Eine Aktivierung führt hier zu einer Hemmung der Adenylatzyklase [46].

Ferner ist TGR5 in Ösophaguskarzinom-Zellen an die G_{α} -Untereinheit G_q gekoppelt. Über diesen Signalweg wird eine gesteigerte Expression der NADPH-Oxidase 5-S (NOX5-S) vermittelt, wodurch eine Prostaglandin E2-induzierte Zellproliferation entsteht [76, 77].

Für eine bessere Übersicht sind die unterschiedlichen TGR5-abhängigen Signalkaskaden in Abbildung 2 zusammengefasst.

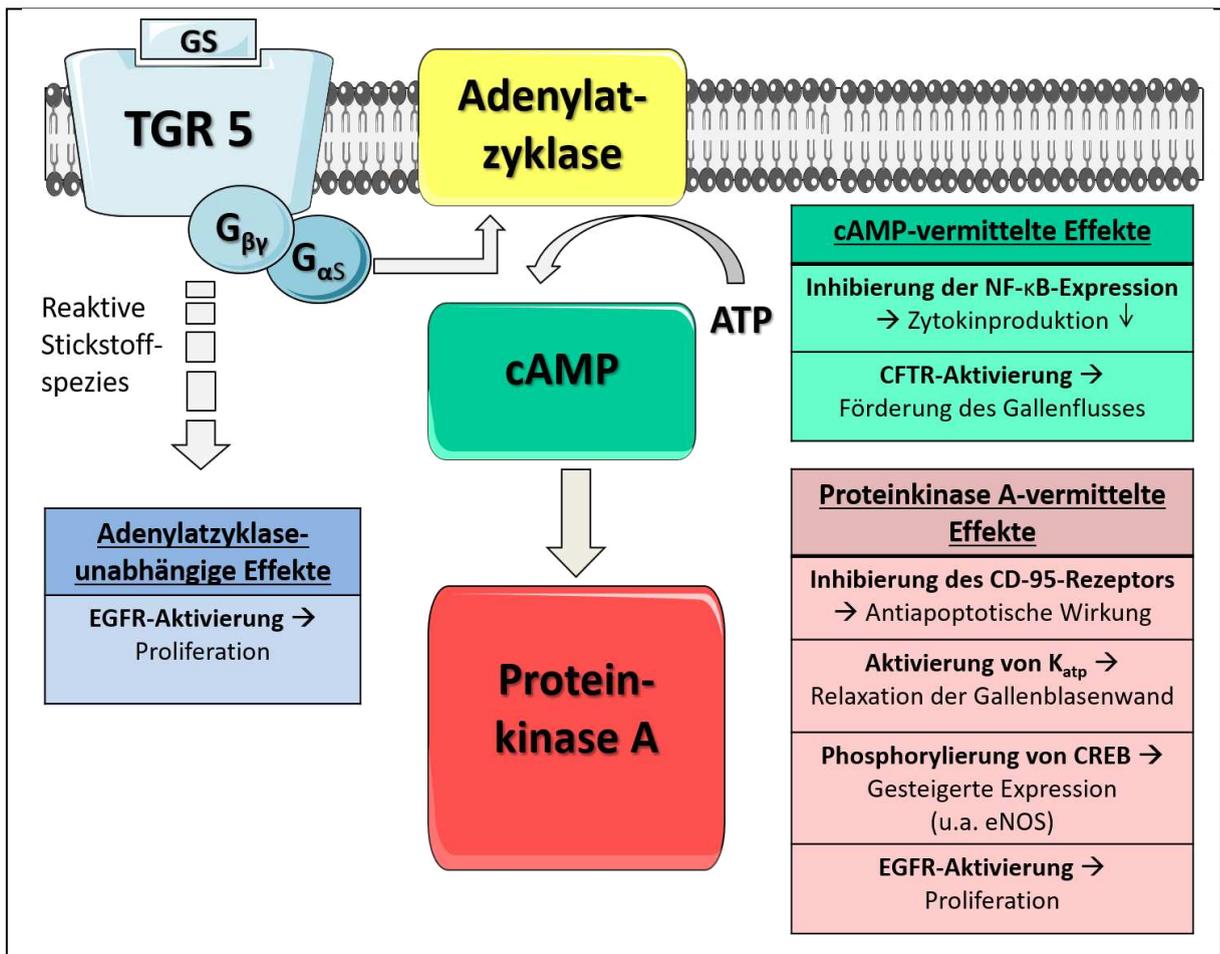


Abb. 02 Die TGR5-abhängigen Signalkaskaden

Die Abbildung stellt eine Zusammenfassung der TGR5-Signalwege nach Kopplung an stimulierende, heterotri-mere G-Proteine (G α_s), welche in der Leber die häufigste Bindung ist. Die Signalwege nach Kopplung mit den G α -Untereinheit G α_q und G α_i sind für eine bessere Übersicht nicht abgebildet.

1.3 Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)

Die PSC ist eine chronisch entzündliche, fibrosierende Erkrankung der intra- und extrahepatischen Gallengänge [78].

1.3.1 Epidemiologie

Mit 0,77 (0,45-1,09) Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr ist die PSC eine relativ seltene Erkrankung. Die Epidemiologie-Studien stammen hauptsächlich aus Amerika sowie Nordeuropa und zeigen ein Nord-Süd-Gefälle [78, 79]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 41 Jahren (35-47 Jahre). Männer haben dabei gegenüber Frauen ein 1,7-fach höheres Risiko innerhalb eines Jahres an einer PSC zu erkranken [79]. Es sind vor allem junge, männliche Erwachsene von der PSC betroffen.

1.3.2 Theorien zur Ätiopathogenese

Die genaue Ätiologie und Pathogenese der PSC ist zurzeit unklar, wobei verschiedene Theorien ihrer Entstehung diskutiert werden [80].

Genetische Prädisposition

In einer schwedischen Studie konnte gezeigt werden, dass Verwandte ersten Grades eines PSC-Erkrankten ein 100-fach erhöhtes Risiko aufweisen ebenfalls an einer PSC zu erkranken. Geschwister eines PSC-Erkrankten haben mit einer Prävalenz von 1,5% sogar ein 200-fach erhöhtes Risiko [81]. Zusätzlich verdeutlicht das Nord-Süd-Gefälle in der Inzidenz der PSC, dass genetische Faktoren eine Rolle in der Ätiologie spielt [79].

Dabei steht die Prädisposition eine PSC zu entwickeln im Zusammenhang mit der Ausbildung verschiedener HLA-Haplotypen und mit der Expression anderer HLA-unabhängiger Gene [82].

Humane Leukozyten Antigene (HLA) sind wichtige Bestandteile des adaptiven Immunsystems. HLA-1-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert und können über die Präsentation endogener Antigene die Aktivierung CD8⁺-positiver Leukozyten zu zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren. HLA-2-Moleküle hingegen werden nur auf bestimmten Zellen wie dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert und präsentieren exogene Antigene. Darüber erreichen sie über die Aktivierung CD4⁺-positiver Leukozyten eine Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten und eine Aktivierung von Makrophagen bzw. natürlicher Killerzellen [82]. Die Auswirkungen dieser mit PSC-assoziierten HLA-Varianten sind komplex. So wird unter anderem eine verminderte Inhibierung von natürlichen Killerzellen diskutiert [80].

Neben HLA-Varianten scheinen auch HLA-unabhängige Gene eine Rolle bei der Entwicklung der PSC zu spielen. Neben Genen wie CCR5 Δ 32 und ICAM-1, die Veränderungen im Immunsystem hervorrufen, wurden auch Mutationen des CFTR und TGR5-Gens bei PSC-Erkrankten gefunden [82, 83]. Ähnlich der PSC kann auch die cystische Fibrose, der eine Mutation des CFTR-Gens zu Grunde liegt, in der Ausbildung einer progressiven Cholestase mit biliärer Zirrhose resultieren. Obwohl die typischen Mutationen der cystischen Fibrose nicht in PSC-Erkrankten nachgewiesen werden konnten, konnten verschiedene CFTR-Varianten identifiziert werden, die möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung einer PSC spielen könnten [84-86]. Die Mutationsanalyse in der TGR5-Sequenz von PSC-Patienten ergab eine Assoziation eines *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) im TGR5-Exon-1. Dieser SNP scheint mit einer geringeren TGR5-mRNA-Expression assoziiert zu sein [83].

Letztlich kann die Entstehung der PSC nicht allein durch genetische Faktoren erklärt werden. Äußere Einflüsse sind zusätzlich an der Entwicklung und am Progress der PSC beteiligt. In diesem Rahmen werden autoimmune sowie infektiöse Ursachen diskutiert. Außerdem spielt die Änderung des Milieus, zum Beispiel durch die Entstehung einer „toxischen Galle“, eine Rolle.

Autoimmunhypothese:

Die Hypothese einer autoimmunen Genese der PSC wird durch das Vorkommen der Autoantikörper p-ANCA (perinukleäre Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper) und ANA (antinukleäre Antikörper) unterstützt, die allerdings für diese Erkrankung nicht spezifisch sind [87]. Ein spezifischer PSC-Autoantikörper konnte noch nicht identifiziert werden. Dabei erscheint die PSC durch die männliche Prädominanz und die Unwirksamkeit einer immunsuppressiven Therapie eine atypische Autoimmunerkrankung zu sein [82].

Zur Genese der Autoimmunerkrankung wird die *Aberrant-Homing*-Hypothese diskutiert [88]. Diese besagt, dass langlebige T-Gedächtniszellen im entzündeten Darm geprägt und dann in die Gallengänge fehlgeleitet werden. Dort könnten sie anschließend die Entzündung der Gallengänge in der PSC triggern. Fehlgeleitet werden sie durch eine ektope Expression des *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1* (MAdCAM-1) sowie des *Vascular Adhesion Protein-1* (VAP-1) in portalen Endothelzellen. Diese werden normalerweise im Darm exprimiert und verhelfen zu einer erleichterten Migration von T-Zellen. Das Vorhandensein von Gedächtniszellen könnte eine Erklärung für das zeitlich unabhängige Auftreten von PSC und der Colitis Ulcerosa darstellen [88]. Allerdings kann diese Hypothese die Entstehung von PSC in Patienten ohne Colitis Ulcerosa nicht erklären [89].

Hypothese einer infektiösen Genese

Des Weiteren gibt es Theorien zur Entstehung der PSC, die eine infektiöse Teilursache postulieren. Untermauert werden diese Theorien durch die Ähnlichkeiten zwischen der HIV-assoziierten sekundär sklerosierenden Cholangitis (SSC), welche durch die Infektion mit *Cryptosporidium parvum* hervorgerufen wird und der PSC. Bei dieser SSC kommt es über den Dünndarm zu einer retrograden Besiedlung des Gallengang-Systems mit *Cryptosporidium parvum*. Ähnlich zur PSC entwickelt sich anschließend eine Fibrose der Gallengänge [90]. Dabei zeigen die Cholangiozyten einen proinflammatorischen Phänotyp mit einer geänderten Expression von Zytokinen. O'Hara sieht in diesem Cholangiozyten-Phänotyp Charakteristika wie sie auch bei Cholangiozyten in PSC-Lebern zu beobachten sind [90, 91].

Weiterführend wird eine infektiöse Genese der PSC auch durch das gehäufte, zusätzliche Auftreten der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis Ulcerosa diskutiert. Durch den enterohepatischen Kreislauf entsteht eine wechselseitige Beziehung zwischen dem Darm und den Gallenwegen. Über das portalvenöse Blut bzw. der Galle erfolgt unter anderem ein Austausch von bakteriellen Produkten, Immunzellen und Immunglobulinen [92]. Weiterführend kann bei PSC-Erkrankten im Darm im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen ein geändertes Keimspektrum nachgewiesen werden, was eine weitere Verbindung zwischen dem Darm und den Gallenwegen herstellt. Dabei zeigen Betroffene mit einer Colitis Ulcerosa, die gleichzeitig auch eine PSC entwickeln dasselbe Mikrobiom wie solche Erkrankte die alleinig an einer PSC leiden. Das Mikrobiom ist gekennzeichnet durch ein vermindertes Keimspektrum [93].

Das Konzept der toxischen Galle:

Das Konzept der toxischen Galle stellt die Vermutung auf, dass eine Änderungen der Gallenzusammensetzung zu einer Zerstörung der Gallengänge führen kann [94]. Diese Schädigung durch eine „toxische Galle“ könnte am Anfang der PSC-Erkrankung stehen [18]. Die Folgen einer Änderung der Gallenzusammensetzung kann in *MDR2^{-/-}*-Mäusen gesehen werden. *MDR2^{-/-}*-Mäuse weisen eine gestörte Phospholipid-Sekretion in die Galle auf, so dass keine Mizellenbildung mit Gallensäuren entsteht und die Cholangiozyten den freien toxischen Gallensäuren ausgesetzt sind. Diese Mäuse entwickeln sowohl makroskopische als auch mikroskopische Zeichen einer sklerosierenden Cholangitits [95]. In einem anderen Beispiel wird eine „toxische Galle“ künstlich durch die Fütterung von Mäusen mit der hydrophoben und toxischen Gallensäure LCA herbeigeführt. In diesen Mäusen fanden sich segmentale Gallengangobstruktionen, eine destruktive Cholangitis sowie eine periduktale Fibrose [96]. Schädigungen des Gallengangepithels können auch durch einen fehlenden Bikarbonat-Schutzfilm entstehen, an dessen Aufrechterhaltung der Chlorid-Kanal CFTR maßgeblich beteiligt ist [51].

CFTR^{-/-}-Mäuse zeigten mit einer fokalen entzündlichen Veränderung der Gallengänge mit folgender Fibrose, Gallengangsproliferationen und abschließender biliärer Zirrhose einen ähnlichen Krankheitsverlauf wie bei der PSC [97].

Abschließend sind die auslösenden Faktoren der Erkrankung, Ursachen für den Progress und die Verbindung zwischen der PSC mit Colitis Ulcerosa noch unklar und werden Teil weiterer Forschungen sein [90].

1.3.3 Klinik und Verlauf der Erkrankung

Ein Großteil der Erkrankten wird mit einer asymptomatischen cholestatischen Leberwerterhöhung auffällig. Typische Symptome wie Juckreiz, Ikterus, abdominelle Schmerzen und Abgeschlagenheit deuten bereits auf ein fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung hin [78, 98]. Mit einer Cholangitis der kleinen Gallengänge zu Beginn, einer fortschreitenden Cholestase, einer Zirrhose und einer finalen Dekompensation der Leber verläuft die PSC oft langsam progredient in vier Phasen [78]. Das mittlere Überleben von Diagnosestellung bis zum Tode bzw. bis zur Lebertransplantation beträgt 12-18 Jahre [99].

Zwischen 60 und 100% aller PSC-Erkrankten entwickeln je nach Studie und geographischer Lage gleichzeitig auch eine chronisch entzündliche Darmerkrankung [98-100]. Hauptsächlich handelt es sich dabei um die Colitis Ulcerosa, wobei auch eine Assoziation mit Morbus Crohn besteht [101]. Dabei wird in 75% der Fälle die chronisch entzündliche Darmerkrankung bereits vor der PSC diagnostiziert [78]. Seltener besteht auch eine Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Morbus Bechterew, Zöliakie oder Thyreoditiden [78].

Darüber hinaus steht die PSC auch in Verbindung mit dem Cholangiozellulärem Karzinom (CCC). Während in einer deutschen Studie 13% der PSC-Erkrankten ein CCC entwickelten, traten CCCs in einer amerikanischen Studie nur bei 6% der Betroffenen auf [99]. Dabei kann das CCC in jeder Krankheitsphase, unabhängig vom Fortschritt der Erkrankung entstehen [78]. Zudem treten bei PSC-Erkrankten häufiger andere gastrointestinale Tumore wie Pankreas- oder Kolorektale-Karzinome auf [80].

Eine Unterform der PSC stellt die *Small-Duct-PSC* dar, die nur die mikroskopisch-erkennbaren Gallengänge befällt und somit im Cholangiogramm unauffällig bleibt. Diese Patientinnen und Patienten weisen sowohl eine deutlich bessere Prognose als auch kein erhöhtes Malignomrisiko auf. Der Übergang in eine PSC ist allerdings möglich [102].

1.3.4 Diagnostik

In der Diagnostik kann der Laborbefund erste Hinweise auf eine mögliche PSC-Erkrankung geben. So findet sich häufig eine Erhöhungen der Leberwerte, wie der alkalischen Phosphatase (AP) und der γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) [78]. In 50 bzw. 80% der Fälle sind pANCA und ANA nachweisbar, die auch bei anderen Autoimmunkrankheiten erhöht sein können. Ein erhöhter Bilirubin-Wert bei Diagnosestellung stellt einen prognostisch ungünstigen Faktor dar und korreliert positiv mit der Entwicklung eines CCC [103]. Als Goldstandard in der PSC-Diagnostik zählt die MRCP (Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie), die durch geringerer Risiken und ähnlicher Sensitivität/Spezifität die ERCP (endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie) abgelöst hat. Dort sind die Strikturen und Stenosen der PSC-Leber als perlschnurartige Veränderungen erkennbar [78]. Leberbiopsien spielen nur noch eine untergeordnete Rolle. Sie werden allerdings noch für die Diagnose einer *Small-Duct-PSC* und eines CCC benötigt [78]. Histologisch präsentiert sich die PSC in Anfangsstadien zunächst als herdförmige periduktale Entzündung mit diffuser Infiltration von Lymphozyten, Monozyten sowie von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten. Es kommt zu einer zwiebelschalenartigen, periduktalen Fibrose, die mit Lumeneinengungen und Atrophien der Gallengänge einhergeht. Neben einer Reduktion oder einem totalen Verlust der Gallengänge, findet sich in PSC-Lebern gleichzeitig häufig auch eine reaktive Proliferation der Gallengänge. Im Endstadium zeigt sich das Bild einer biliären Zirrhose mit nur noch fibrösen Strängen als ehemalige Gallengänge [104].

Histologische Einteilung der PSC:

Die Stadien können histologisch nach Ludwig wie in Tabelle 1 eingeteilt werden [105]:

Stadium 1	Cholangitis mit intakten Membranen
Stadium 2	Periportale Fibrose
Stadium 3	Septale Fibrose und brückenbildende Nekrosen
Stadium 4	Billiäre Zirrhose

Tabelle 1 Stadieneinteilung der PSC nach Ludwig

1.3.5 Therapie

Aktuell stellt die Lebertransplantation die einzige lebensverlängernde Therapieoption im Endstadium der PSC dar [99]. Zur symptomatischen Behandlung können dominante Gallengangstenosen endoskopisch dilatiert werden [15]. Eine medikamentöse Therapie der PSC, welche die Progression der Erkrankung verlangsamen kann, steht aktuell nicht zur Verfügung.

Als medikamentöse Therapie der PSC wird im Klinikalltag oftmals die hydrophile Gallensäure UDCA verabreicht, die bereits ein fester Bestandteil in der Therapie der PBC ist [15]. Dort fördert UDCA unter anderem den Gallenfluss, schützt vor toxischen Effekten hydrophober Gallensäuren und inhibiert Gallensäuren-induzierte Apoptose in Hepatozyten bzw. Cholangiozyten [106]. Deswegen erscheint UDCA als potentieller Kandidat in der Therapie der PSC. Während die aktuellen *European Association for the Study of the Liver* (EASL)-Leitlinien aufgrund fehlender Beweislage keine generelle Empfehlung zur UDCA-Therapie aussprechen, raten die *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD)-Leitlinien sogar von der UDCA-Gabe ab [15, 107]. Es konnte zwar eine Verbesserung der Leberparameter im Blut erzielt werden, allerdings zeigte sich keine Verbesserung im Hinblick auf das Überleben, die Zeit bis zur Transplantation oder auf die Symptome der PSC-Erkrankten [15, 108]. Eine UDCA-Therapie in höheren Dosen (28-30 mg/kg/Tag) verkürzte sogar die Zeit bis zur Lebertransplantation bzw. bis zum Tod und führte zu einem Anstieg kolorektaler Dysplasien [107, 109]. Die Hypothese, dass UDCA bei Patientinnen und Patienten mit PSC und gleichzeitiger CED vor der Entwicklung eines Kolonkarzinoms schützen kann, konnte ebenfalls nicht eindeutig bewiesen werden [15]. Als weitere medikamentöse Therapieoption der PSC hat *NorUDCA* erfolgreich eine Phase-II-Studie durchlaufen [110]. *NorUDCA* ist eine Modifikation von UDCA und zeichnet sich durch anticholestatische, antifibrotische und antiinflammatorische Effekte aus. Als unkonjugierte Gallensäure tritt sie in den cholehepatischen Kreislauf ein und wird dadurch zum einen in der Leber gehalten und fördert zum anderen die bikarbonatreiche Sekretion der Cholangiozyten [111].

Die Behandlung von PSC-Patientinnen und Patienten mit Kortikosteroiden oder Immunsuppressiva zeigte ebenfalls keine Besserung, so dass diese nicht indiziert ist [15].

2 Ziele der Arbeit

Die PSC ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der intra- und extrahepatischen Gallengänge und zeigt eine starke Assoziation mit der Darmerkrankung Colitis Ulcerosa. Die genaue Ätiopathogenese dieser Erkrankung ist weiterhin ungeklärt. Der Gallensäurerezeptor TGR5 wird in verschiedenen Nichtparenchymzellen der Leber exprimiert. So findet sich TGR5 in der Leber in Sinusendothelzellen, Cholangiozyten sowie Kupffer-Zellen. Dort vermittelt TGR5 unter anderem protektive, choleretische und antiinflammatorische Effekte. Im Darm wird TGR5 in Epithelzellen sowie Zellen des Immun- und Nervensystems exprimiert. Änderungen der TGR5-Expression, Lokalisation und Funktion könnten folglich eine Rolle in der PSC-Pathogenese spielen oder Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung nehmen.

In dieser Arbeit sollte durch die Immunfluoreszenzfärbung die Expressionsstärke und subzelluläre Lokalisation von TGR5 in PSC-Lebern bestimmt werden. Zusätzlich sollte eine relative Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung in den Gallengängen erfolgen, um eine mögliche Änderung der TGR5-Expression auf Proteinebene in PSC-Lebern im Vergleich zu gesundem Lebergewebe aufzudecken.

Sofern bei den Immunfluoreszenzfärbungen eine Änderung der TGR5-Expression in PSC-Lebern zu beobachten ist, sollte der Einfluss verschiedener Substanzen auf die TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten und Makrophagen untersucht werden. Gewählt wurden dabei solche Substanzen, welche potentiell einen Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung haben bzw. in der PSC-Therapie eingesetzt werden. So erfolgte eine Stimulation der humanen Makrophagen und Cholangiozyten mit Gallensäuren (u.a. der therapeutischen Gallensäure UDCA), Zytokinen (TNF- α , Il-1 β und Il-8) sowie Aktivatoren von nukleären Gallensäurenrezeptoren (u.a. Vitamin D). Dadurch sollte die mögliche Veränderung der TGR5-Expression in PSC-Lebern näher charakterisiert werden und mögliche therapeutische Ansatzpunkte identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material, Substanzen und Lösungen

3.1.1 Biologisches Material

Buffy Coats

Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Düsseldorf; Deutschland, Prof. Dr. R. Scharf

Kontrollleber (Randgewebe bei Metastasenresektionen)

Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland, Prof. Dr. med. W. T. Knoefel/
Biobank des Universitätsklinikums Düsseldorf

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland, Prof. Dr. med. C. Schramm

PSC-Leberbiopsien

International PSC Study Group (IPSCSG)

PSC Research Center, Clinic for Specialized Medicine and Surgery, University Hospital Rikshospitalet, Oslo, Norwegen, Prof. T.Karlsen

Medizinische Klinik u. Poliklinik II, Klinikum der Universität München, Deutschland, Prof. Dr. med. J. Mayerle

I. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland, Prof. Dr. med. C. Schramm

Cholangiozyten-Zelllinie H69

*Department of Gastroenterology and Hepatology, Academic Medical Center, Amsterdam, Niederlande, Prof. U.H.W. Beuers
Departments of Pediatrics and Medicine, New England Medical Center, and Departments of Physiology and Pathology, Tufts University School of Medicine, Boston, USA, S. A. Grubman [112]*

Ethikantrag

Nr. 3144, Nr. 5350

3.1.2 Zellkulturmedien und -materialien

Adenin (100x)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
<i>Antibiotic-Antimycotic</i> (100x)	<i>Gibco Life Technologies</i> ; Karlsruhe, D
Choleratoxin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
DMEM (4,5g/l Glucose)	<i>Gibco Life Technologies</i> ; Karlsruhe, D
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	<i>Thermo Scientific</i> ; Rockford, USA
Ficoll-Paque PLUS	<i>GE Healthcare Bio-Sciences AB</i> ; Uppsala, S
Hams F12	<i>Gibco Life Technologies</i> ; Karlsruhe, D
Hanks Salzlösung (HBSS)	Biochrom; Berlin, D
Hydrocortison	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
Insulin (1000x)	<i>Gibco Life Technologies</i> ; Karlsruhe, D
M-CSF	PAN; Aidenbach, D
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Biochrom; Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	<i>Gibco Life Technologies</i> ; Karlsruhe, D
RPMI 1640 mit GlutaMax -I	<i>Gibco Life Technologies</i> ; Karlsruhe, D
Transferrin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
Trijodthyronin	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
Gewebekulturflaschen (75cm ² , 250ml)	<i>Greiner Bio-One</i> ; Frickenhausen, D
6cm Gewebekulturschalen (Oberflächenmodifiziertes Polystyrol)	<i>Becton Dickinson</i> ; Heidelberg, D
6cm Gewebekulturschalen	<i>Corning Incorporated</i> ; Corning USA
Thincert-Zellkultur-Einsatz (Porengröße 0,4 µm, transparent)	<i>Greiner Bio-One</i> ; Frickenhausen, D
Sterile Einweg-Filtrationsflaschen	<i>Thermo Scientific</i> , Rockford, USA

3.1.3 Reagenzien

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
GCDC	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
PBS Trockensubstanz ohne Ca/Mg	Biochrom; Berlin, D
TCDC	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
TDC	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D
TUDCA	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, D

3.1.4 Kits

<i>Maxwell 16 LEV simplyRNA Cell and Tissue Kit</i>	Promega; Madison, USA
<i>QuantiTect Reverse Transcriptions Kit</i>	Qiagen; Hilden, D

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<i>TaqMan Gene Ex Master Mix</i>	<i>Applied Biosystems; Foster City, USA</i>
TGR5 (GPBAR1, Hs01937849_s1)	<i>Applied Biosystems; Foster City, USA</i>
HPRT-1 (Hs99999909_m1)	<i>Applied Biosystems; Foster City, USA</i>

3.1.6 Antikörper

CK7	Roth; Karlsruhe, D
RVLR2	(Keitel et al., 2007) [41]
Hoechst	Invitrogen; Karlsruhe, D
Zweitantikörper	Dianova; Hamburg, D

3.1.7 Geräte und Computerprogramme

<i>Maxwell 16 IVD</i>	<i>Promega; Madison, USA</i>
<i>NanoDrop ND-1000</i>	<i>Peqlab; Erlangen, D</i>
Kryotom	Leica, Wetzlar, D
<i>LSM 510, LSM 810</i>	Zeiss; Oberkochen, D
<i>7500 Real-Time PCR System</i>	<i>ABI Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>LSM Image Browser</i>	Zeiss; Oberkochen, D
<i>AxioVision Rel. 4.8</i>	Zeiss; Oberkochen, D

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation und Kultivierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus tagesfrischen *Buffy Coats* von männlichen Blutspendern gewonnen. Es wurden alleinig männliche Spender ausgewählt, um den Einfluss der weiblichen Geschlechtshormone auf die TGR5-Expression auszuschließen. Die TGR5 mRNA-Expression in PBMCs wird durch die Stimulation mit Progesteronderivaten verringert, ebenso wirken diese Derivate als TGR5-Liganden und in Anwesenheit von TLC als kompetitive Agonisten [113].

Der *Buffy Coat* ist ein Konzentrat aus Leukozyten und Thrombozyten, das bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten entsteht. Dabei bilden sich durch Zentrifugation von antikoaguliertem Vollblut drei Schichten aus Plasma, *Buffy Coat* und Erythrozyten. Die weitere Verarbeitung der *Buffy Coats* wurde nach dem Protokoll von Christian Ehling durchgeführt [114]. Hiernach erfolgte zunächst die gleichmäßige Aufteilung des *Buffy Coats* auf drei 50ml-Falcons, die mit warmer *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) auf 40ml aufgefüllt wurden. Anschließend wurde die *Buffy-Coat*/HBSS-Suspension auf das Lymphozytentrenn-Medium Ficoll in 50ml-Falcons gegeben. Hierbei ist eine Phasenvermischung der beiden Medien zu vermeiden. Nach einer 35-minütigen Zentrifugation ohne Bremse mit 600 *Relative Centrifugal Force* (RCF) zeigte sich eine Aufteilung der Suspension in vier Phasen. Die oberste Phase bildet das Blutplasma, darunter findet sich eine weißliche Bande aus PBMCs und schließlich abgetrennt durch das Lymphozytentrenn-Medium die Erythrozyten als *Pellet* in der unteren Schicht. Die Interphase mit den PBMCs wurde abpipettiert und anschließend zur Entfernung verbleibender Zell- und Ficollreste dreimal mit HBSS (4°C) durch Zentrifugation gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellett in 5 ml HBSS resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension lichtmikroskopisch mittels einer Neubauer-Kammer in einer Verdünnung von 1:10 ausgezählt. Schließlich wurden pro 6cm-Schale vier Millionen Zellen im Kulturmedium (RPMI 1640 Medium mit GlutaMAX, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Verwendet wurden hierfür Gewebeschalen mit oberflächenmodifiziertem Polysterol, die durch eine hydrophile, negative Oberflächenladung eine bessere Zelladhäsion ermöglichen. Die Zellen wurden insgesamt für drei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit einer 37 °C-warmen phosphatgepufferten Salzlösung (PBS -/-) gewaschen. Durch Zugabe des körpereigenen Zytokins M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*(10 ng/ml)) erfolgte die Ausreifung der mononukleären Zellen zu Makrophagen. Ein Wechsel des mit MCS-F versetzten Mediums wurde jeweils am dritten und

sechsten Tag nach der Aussaat vorgenommen. Die Ernte der Zellen erfolgte am neunten Tag nach Aussaat.

Stimulation der Makrophagen

Die Stimulation der Makrophagen erfolgte jeweils 72, 24 und 12 Stunden vor der Ernte. Zuvor wurden die Zellen mit PBS (-/-) gewaschen und anschließend mit frischem Medium, das mit M-CSF und der Stimulationsbedingung versehen war, versorgt.

3.2.1.2 Kultivierung der Cholangiozyten-Zelllinie H69 und der humanen biliären Organoiden

Als Cholangiozyten-Zelllinie diente die durch das *Simian-Virus 40* (SV40) transformierte und somit immortalisierte Zelllinie H69, die über Prof. U.H.W. Beuers bezogen wurde [112]. Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit Zellen aus den Passagen 15 bis 31 durchgeführt.

Die Zelllinie wurde in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zum Erreichen einer Zelldichte von ca. 90 % inkubiert. Ein Medienwechsel erfolgte je nach Bedarf alle zwei bis drei Tage. Nach Erreichen der angestrebten Konfluenz wurden die Zellen zur Subkultivierung zunächst mit PBS (-/-) gewaschen und durch Trypsinierung bei 37°C vom Kulturflaschenboden abgetrennt. Die gelösten Zellen wurden nach Resuspension im Nährmedium auf die Zellkulturschalen mit frischem Medium aufgetragen. Hierfür wurden *ThinCert*TM-Zellkultur-Einsätze mit Böden aus transparentem, mit 0,4 µm-großen Poren versehenem Polyethylenterephthalat verwendet. Für die 6, 12, 24 und 72 Stunden-Stimulation wurden die Zellen jeweils mindestens für ein bzw. zwei Stunden in nährstoffarmen Medium aus DMEM (4,5g/l Glucose), HAMS F12 und *Antibiotic-Antimycotic* inkubiert. In der 72 Stunden-Stimulation erfolgte ein mit Stimulanzien-versetzter Medienwechsel alle 24 Stunden.

Zusammensetzung des Nährmediums:

	DMEM (4,5g/l Glucose)
	HAMS F12
10 %	FCS
1 %	<i>Antibiotic-Antimycotic</i>
0,18 mM	Adenin
4 µg/ml	Insulin
5 µg/ml	Transferrin
2 nM	Triiodothyronin
1,1 µM	Hydrocortison
10 ng/ml	Choleratoxin

Ergänzend erfolgte im Anschluss an diese Arbeit eine Kultivierung humaner biliären Organoiden. Dies wurde auf Grundlage der Methode von Carol J. Soroka et al., wie in [115] beschrieben, von Kathleen Deutschmann und Katharina Ebener etabliert und durchgeführt. Die humanen biliären Organoiden wurden aus Zellen der Gallenflüssigkeit generiert, welche während einer ERCP gewonnen werden konnten.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA) aus den kultivierten Zellen bzw. Organoiden wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des geschlossenen Vollautomats *Maxwell 16 LEV* bzw. nach dem *Maxwell 16 LEV SimplyRNA Cell and Tissue Kits* durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen vor der Ernte zunächst mit einer 37°C-warmen PBS(-/-) auf Eis gewaschen. Im Anschluss wurden die kultivierten Zellen mittels 1-Thioglycerol/Homogenisierungspuffer abgekratzt und lysiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte dann in dem Vollautomaten *Maxwell 16 LEV* durch Anlagerung an magnetische Partikel. Abschließend wurde die RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei einer optischen Dichte von $\lambda=260$ nm als Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bzw. von $\lambda=280$ nm als Proteinabsorptionsmaximum als Kontrolle für die Reinheit der RNA gemessen.

3.2.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

In der reversen Transkription wird die aus der RNA-Isolierung gewonnene Gesamt-RNA in *Complementary* Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben, die als Ausgangsmaterial für die PCR dient. Hierzu wurde das Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit verwendet und die RNA in einer Konzentration von 1000 nM eingesetzt.

Zunächst wird durch Zugabe des *gDNA Wipeout Buffer* störende genomische Desoxyribonukleinsäure (gDNA) aus dem Gemisch entfernt. Anschließend wird der Mastermix bestehend aus einem *Primer-Mix*, einer Reversen Transkriptase und eines Reverse Transkriptase-Puffers hinzugefügt. Zur Kontrolle für die Reinheit der späteren cDNA wird eine Probe ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

Der *Primer-Mix* besteht nicht nur aus Oligo-dT-*Primern*, die am Poly-A⁺-Strang am 3'-Ende der mRNA hybridisieren, sondern auch aus zufälligen Hexamer-*Primern*. Dadurch wird gewährleistet, dass nicht nur Basenpaare in der Nähe des 3'-Endes umgeschrieben werden, sondern auch das 5'-Ende der mRNA erfasst wird.

Die *Quantitect Reverse* Transkriptase verfügt über drei verschiedene Funktionen. Nach Anlagerung des *Primers* wird der mRNA-Strang durch die RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität zu einem RNA/DNA-Doppelstrang ergänzt. Im nächsten Schritt entfernt die RNase H-Funktion die RNA-Anteile in dem Hybridstrang und somit kann im dritten Schritt durch die DNA-abhängige-DNA-Polymerase-Aktivität eine doppelsträngige DNA entstehen.

Die cDNA-Synthese erfolgt in 30min bei 42°C. Bei 95°C wird die Reverse Transkriptase im letzten Schritt für 3min inaktiviert. Durch Zugabe von 100 µl RNase-freiem Wasser wird eine angemessene Konzentration für die *Realtime*-PCR erreicht. Die cDNA wird bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.2.3 Semi-quantitative Realtime PCR

Die quantitative *Realtime*-PCR (RTq-PCR) ermöglicht neben der Amplifizierung von spezifischen Gensequenzen nach dem Prinzip der PCR auch die Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Fluoreszenz-Signalen. In der PCR entsteht die Vervielfältigung der DNA durch die Wiederholung von drei Vorgängen. Im ersten Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNA bei 95°C in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Anschließend lagern sich bei 55°C die im Überschuss vorhandenen *Primer* an die nun einzelsträngige DNA an (*Annealing*-Schritt). Im letzten Elongationsschritt synthetisiert die Taq-Polymerase bei 72°C wieder eine doppelsträngige DNA, die dem ursprünglichen *Template* gleicht.

Zur Quantifizierung der entstehenden DNA in Echtzeit wurde in dieser Arbeit das *TaqMan*-Prinzip verwendet. Hierbei hybridisiert ein Oligonucleotid, das einen Reporter und einen *Quencher* besitzt, mit dem DNA-Einzelstrang zwischen den *Primern*. Der Reporter sendet nach Anregung ein Fluoreszenzsignal (hier 6-Carboxyfluorescein=6-FAM) aus, das vom *Quencher* gelöscht wird. In der Elongationsphase werden die beiden Moleküle durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase voneinander räumlich getrennt und der *Reporter* kann nun ungehindert sein Fluoreszenzsignal aussenden. Die Lichtemission ist somit proportional zu der entstehenden Menge des Amplifikationsproduktes.

Um die amplifizierte Menge des Untersuchungstranskripts in Relationen setzen zu können wurde ein *Housekeeping Gene* als externer Standard verwendet. Hier wurde das Gen der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT-1) als *Housekeeping Gene* für die Cholangiozyten-Zelllinie H69 sowie die humanen Makrophagen benutzt, das nahezu konstitutiv exprimiert wird [116]. Für die humanen biliären Organoide wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GADPH) als *Housekeeping Gene* benutzt. Zur Verifizierung der Reinheit und Spezifität der RTq-PCR wurden eine Negativ-Kontrolle mit Wasser statt cDNA sowie

eine RT-negative-Kontrolle mitgeführt. Zudem wurde die PCR in Doppelbestimmung durchgeführt. Für diese Arbeit wurde das *7500 Realtime PCR System* verwendet.

Die Auswertung erfolgte nach der ΔC_T -Methode und mit dem Programm *ABI Software SDS Version 1.4 Patch 2* [117]. Der C_T -Wert (*Cycle Of Threshold*) beschreibt die Zykluszahl, bei der der exponentielle Anstieg des Fluoreszenzsignals beginnt. Je niedriger also dieser Wert ist, desto eher trat das erste Fluoreszenzsignal auf, desto höher war somit die Menge des Zielgens im Ansatz. Es wurde die Differenz der C_T -Mittelwerte des Referenz- und Zielgens gebildet. Als Zielgen wurde hier TGR5 untersucht und als Referenzgen diente das *Housekeeping Gene* HPRT-1 bzw. GADPH. Anschließend wurden die Ergebnisse zur unstimulierten Kontrolle normiert.

3.2.3 Immunhistochemische Methoden

Zielantigen/Zelle	Antikörper	Herkunft	Verdünnung
TGR5	RVLR2	Meerschweinchen	1:500
Cholangiozyten	CK7	Maus	1:25
RVLR2	Anti- Meerschweinchen IgG Fluorescein (Cy3),	Esel	1:500
CK7	Anti-Maus-IgG Fluorescein (FITC),	Ziege	1:100
dsDNA	Hoechst		1:20.000

Tabelle 2 Übersicht der verwendeten primären Antikörper für die kryofixierten Schnitte

Immunfluoreszenz-Färbungen:

Die Immunfluoreszenz-Färbung ermöglicht die Darstellung von Proteinen im histologischen Schnittpräparat mittels selektiver Antigen-Antikörper-Bindung. Hierbei bindet zunächst der Primärantikörper an das gewünschte nachzuweisende Protein. Zur Visualisierung dieses Antigen-Antikörper-Komplexes dient ein zweiter Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist und zusätzlich an den Sekundärantikörper bindet. Die Fluoreszenzmarkierung kann dann mittels Licht einer bestimmten Wellenlänge, die für diesen Farbstoff typisch ist angeregt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Da sich die einzelnen Bildpunkte sowohl in ihrer Anzahl als auch in ihrer Intensität unterscheiden, ist nicht nur eine reine Detektion des Proteins, sondern auch eine Quantifizierung möglich. Um unspezifische Strahlung des Gewebes selbst und eine Kopplung des Sekundärantikörpers an andere Epitope auszuschließen, wurde eine Kontrolle ohne jegliche Antikörper und eine ohne Primärantikörper im Färbeprozess mitgeführt. In dieser Arbeit wurde für die Gefrierschnitte der Anti-TGR5-Antikörper RVLR2 [41], ein Zytokeratin 7 (CK7)-Antikörper zur Darstellung der Gallenwege sowie Hoechst zur Anfärbung der DNA und damit der Zellkerne genutzt. Eine

Übersicht bietet Tabelle 2. Für die Paraffinschnitte wurden für TGR5 (Thermo Fisher Scientific, 1:100) und CK7 (OV-TL 12/30; Zytomed Systems, 1:100) andere Primärantikörper verwendet.

Anfertigung von Gewebeschnitten:

Die Färbungen erfolgten zum Einen an Gefrierschnitten von Leberbiopsien, die bei -18 °C am Kryotom mit einer Dicke von 5µm geschnitten und direkt mit dem Objektträger abgenommen wurden. Bis zum Färbvorgang wurden sie bei -20°C verwahrt. Die Lebergewebeproben selbst lagern bei -80°C. Von jeder Probe wurden 10 bis 14 Schnitte angefertigt.

Zum Anderen wurden paraffineingebettete Leberschnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm verwendet. Diese wurden entwacht und rehydriert.

Färbvorgang:

Zu Beginn des Färbvorgangs wurden die Gefrierschnitte zunächst mit -20°C- kaltem Methanol für zwei Minuten fixiert. Dadurch kommt es nicht nur zu einer Konservierung des Gewebes durch Entwässerung und Denaturierung, sondern auch zu einer Permeabilisierung der Zellmembranen, die die Penetration von Antikörper an die Zielstrukturen erleichtert. Überschüssiges Methanol wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS (-/-) für 30sec bzw. zweimal 10min entfernt. Um unspezifische Bindungen durch den Primärantikörper zu minimieren, wurden die Paraffin- und Gefrierschnitte in 5%igem FCS bei Raumtemperatur blockiert. Nachfolgend wurde der Primärantikörper aufgetragen und die Schnitte bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 Minuten, erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper sowie Hoechst für eine weitere Stunde. Bevor die Schnitte mittels *Mounting Medium* eingedeckelt wurden, wurden sie abschließend nochmals dreimalig gewaschen. Bis zur Auswertung lagerten die Schnitte lichtgeschützt bei 4°C.

Auswertung und Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung:

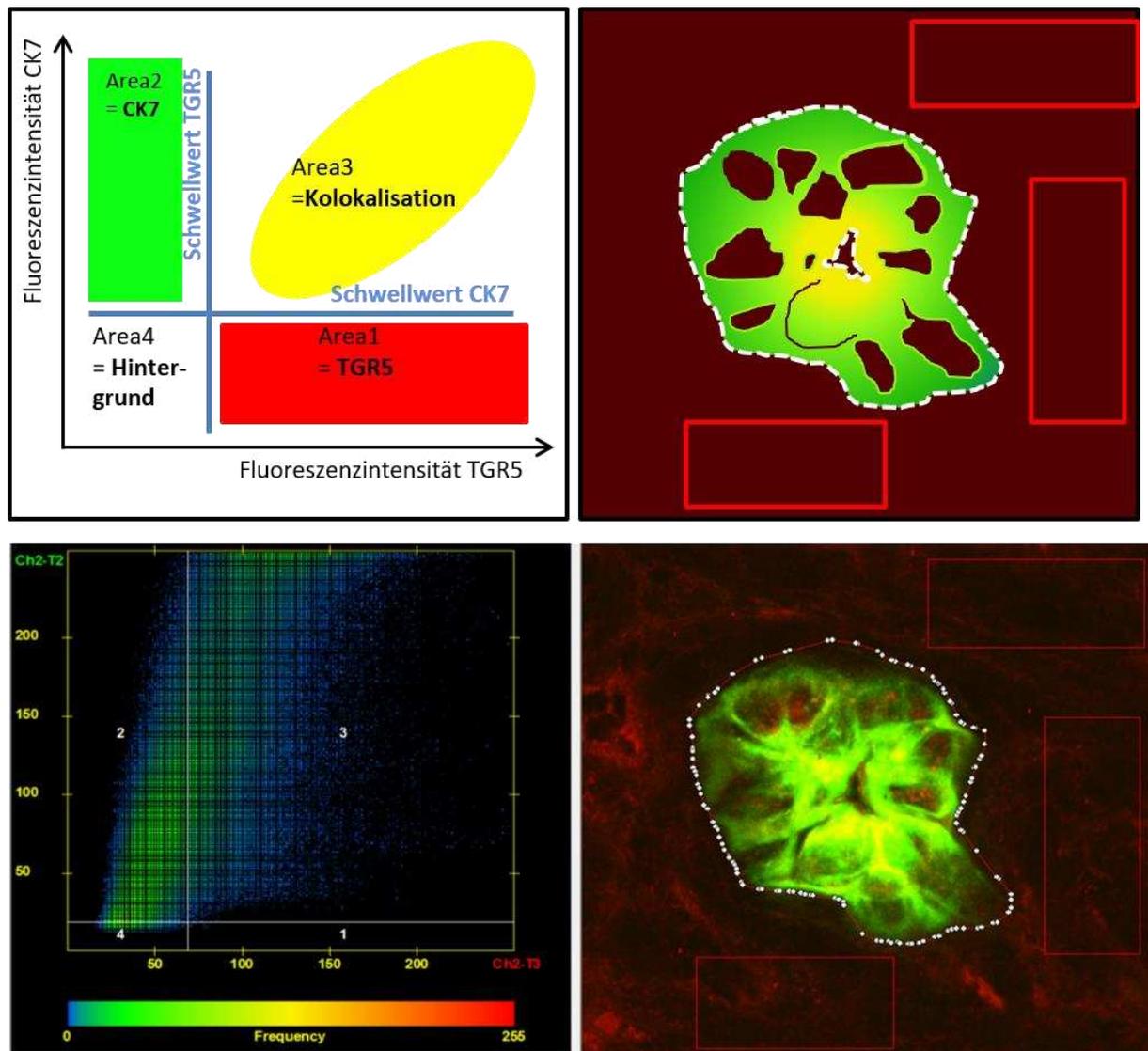


Abb. 03 Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung

Für die Bestimmung der Immunfluoreszenz von CK7 bzw. TGR5 in einem Gallengang wurde der Gallengang sowie das Lumen umrandet. Um die Hintergrundfluoreszenz zu bestimmen, wurden drei Rechtecke (rot dargestellt) gesetzt und die Schwellenwerte für CK7 bzw. TGR5 (blau dargestellt) gesetzt. Durch die Schwellenwerte wurden vier Bereiche voneinander abgegrenzt. Der Bereich 1 beschreibt die TGR5-positiven Pixel, während Bereich 2 die CK7-positiven Pixel abbildet. In Bereich 3 werden die Pixel dargestellt, die sowohl CK7 als auch TGR positiv sind. Die Hintergrundfluoreszenz wird in Bereich 4 wiedergegeben, der durch die Bestimmung der drei Rechtecke festgesetzt wird.

Die Aufnahme der Leberschnitte erfolgte am konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM 510* bzw. *Zeiss LSM 880*. Von den einzelnen Biopsien wurden in Abhängigkeit der Gallengangs-Anzahl sechs bis zehn Aufnahmen in einer 63-fachen Vergrößerung und in der mittleren Schnittebene angefertigt. In den Bildern wird TGR5 rot, CK7 grün und die Zellkerne blau dargestellt. Regionen, die sowohl TGR5 als auch CK7 beinhalten werden gelb wiedergegeben. Die Aufnahmen wurden mit den exakt gleichen Einstellungen angefertigt.

Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels der Auswertungssoftware Axio Vision Rel. 4.8. In Abbildung 3 wird exemplarisch die Auswertung eines Gallenganges in diesem Programm dargestellt.

Dabei wurde zunächst um die Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können drei Rechtecke in repräsentativen Regionen neben den Gallengang gesetzt. In Abhängigkeit der Intensität des Hintergrundes wurden dann die Schwellenwerte für CK7 und TGR5 gesetzt.

Anschließend wurde eine erste *Region of Interest* (ROI) um den Gallengang gesetzt. Eine zweite ROI umrandet das Lumen des entsprechenden Gallengangs. Für die einzelnen ROI erhält man nun die Anzahl der Pixel, welche TGR5 bzw. CK7 positiv sind. Die Anzahl der Pixel wird in der unten gezeigten Formel als N wiedergegeben. Darüber hinaus wurde aus den Daten die mittlere Intensität pro Pixel für den jeweiligen Kanal (TGR5 bzw. CK7) entnommen. Die mittlere Intensität wird in der zusammenfassenden Formel als X abgekürzt. Die Anzahl der Pixel wurde mit den mittleren Intensitäten pro Pixel multipliziert, um die gesamte Fluoreszenzintensität von TGR5 bzw. CK7 im Gallengang zu erhalten. Dabei entspricht die Fluoreszenzintensität der Expressionsmenge von TGR5 bzw. CK7 im Gallengang und wird in der unten stehenden Formel als I abgekürzt. Von der Fluoreszenzintensität des gesamten Gallenganges wurde die Immunfluoreszenzintensität des entsprechenden Lumens subtrahiert. Abschließend wurde die TGR5-Fluoreszenzintensität ins Verhältnis zur CK7-Fluoreszenzintensität gesetzt. In der folgenden Formel wird das oben Beschriebene zusammengefasst:

$$I - \text{Quotient} \frac{TGR5}{CK7} = \frac{(N_{TGR5 \text{ Gallengang}} \times X_{TGR5 \text{ Gallengang}}) - (N_{TGR5 \text{ Lumen}} \times X_{TGR5 \text{ Lumen}})}{(N_{CK7 \text{ Gallengang}} \times X_{CK7 \text{ Gallengang}}) - (N_{CK7 \text{ Lumen}} \times X_{CK7 \text{ Lumen}})}$$

4 Ergebnisse

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Posterbeiträgen und in einer Publikation veröffentlicht [1, 118-120].

4.1 Relative Quantifizierung der TGR5-Proteinmenge in Gallengängen von PSC-Lebern mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laserscanning Mikroskopie

Der membranständige Gallensäurerezeptor TGR5 weist eine hohe Expression in biliären Epithelzellen auf und vermittelt hier Sekretion, Proliferation und Schutz vor Gallensäure-induzierter Zytotoxizität [49, 74]. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob bei PSC-Erkrankten eine Veränderung der Expression und Lokalisation von TGR5 in Gallengangsepithelzellen zu beobachten ist.

In einem ersten Schritt wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen TGR5 durchgeführt. Hierbei wurde PSC-Lebergewebe sowie Kontrolllebergewebe, welches im Rahmen von Lebermetastasen-Resektionen gewonnen wurde, mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Es war ein Fluoreszenzsignal für TGR5 in Sinusendothelzellen, Kupffer-Zellen sowie Cholangiozyten der intrahepatischen Gallenwege sowohl in Kontroll- als auch in PSC Lebergewebe nachweisbar (siehe Abbildung 4).

Um die Expression und Lokalisation von TGR5 in den Cholangiozyten genauer zu untersuchen wurden Kofärbungen mit einem Antikörper gegen TGR5 sowie gegen CK7 durchgeführt. CK7 diente hierbei als Markerprotein für Cholangiozyten. TGR5 und CK7 waren sowohl im Kontroll- als auch im PSC-Lebergewebe in biliären Epithelzellen kolokalisiert. Allerdings fiel eine verminderte Intensität der TGR5-Färbung in den Gallengangsepithelzellen der PSC Lebern auf. In den Kupffer Zellen erschien sie, wie in Abbildung 4 dargestellt, hingegen unverändert. Ebenso konnte kein Unterschied in der Intensität der CK7-Fluoreszenz gesehen werden. Um diese Beobachtung näher zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine relative Quantifizierung der TGR5 Fluoreszenzintensität in den Gallenwegen entwickelt. Auf diese Weise konnte die grundlegende Annahme einer verminderten TGR5-Expression in PSC-Lebern objektiv analysiert werden.

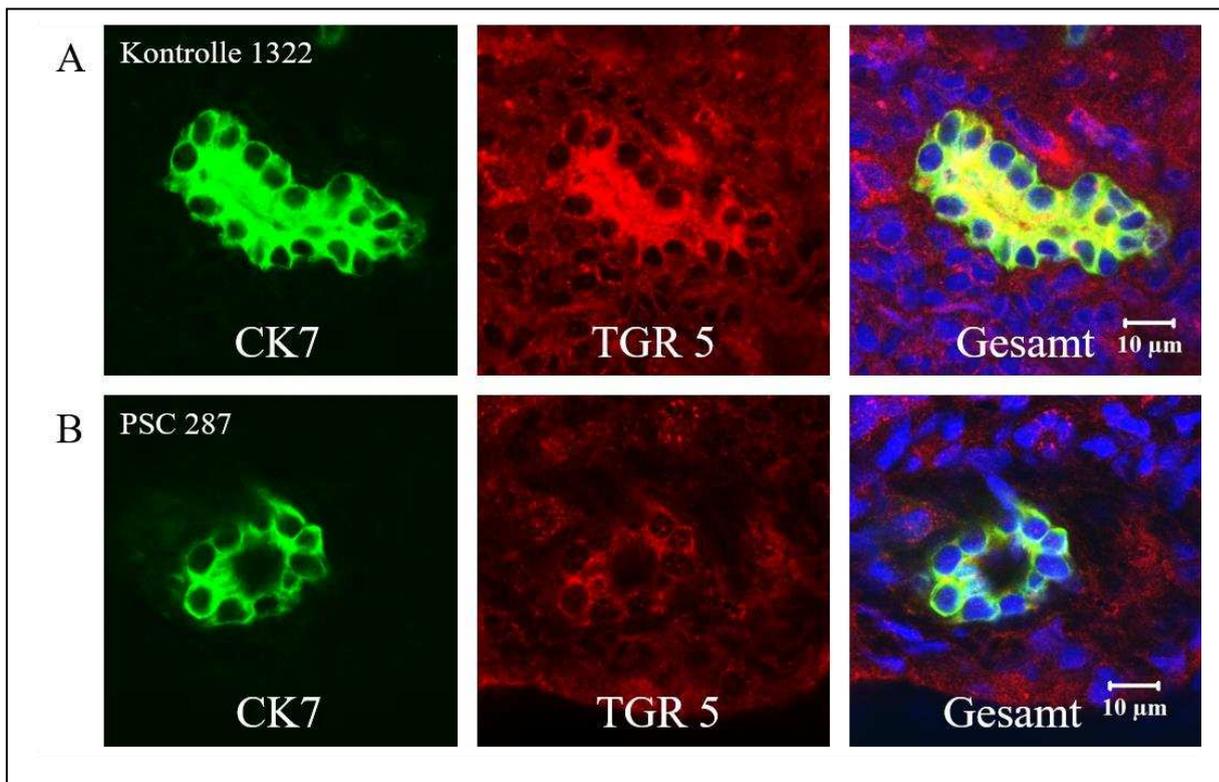


Abb. 04 Immunfluoreszenzfärbung von humanen Lebern mit Darstellung von TGR5 in Cholangiozyten

A: Immunfluoreszenzfärbung des Kontrollgewebes (Kontrolle 1322)

B: Immunfluoreszenzfärbung der PSC-Biopsien (PSC 287)

TGR5 wurde in kryofixierten bzw. Paraffin-Schnitten aus Leberbiopsien von Kontrollgruppen (A) sowie PSC-Patienten*innen (B) mittels Immunfluoreszenz-Färbung sichtbar gemacht. Dabei werden TGR5 (rot), Cholangiozyten (grün) sowie die Zellkerne (blau) dargestellt. Regionen mit einer Kolo-kalisation von TGR5 und CK7 sind gelb wiedergegeben. Die Aufnahme der Präparate erfolgte am konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM 510*. Balken = 10 µm.

4.1.1 Relative Quantifizierung der TGR5-Proteinmenge mittels Auswertung einzelner Gallengangszellen

Um die TGR5- sowie die CK7-Fluoreszenz zu quantifizieren wurde das Auswertungsprogramm AxioVision 4.8 verwendet. Zunächst wurde die Hintergrundfluoreszenz bestimmt und unterschiedliche Schwellenwerte für die CK7- bzw. TGR5-Immunfluoreszenzintensitäten gesetzt. In einem ersten Auswertungsschritt wurden die Immunfluoreszenzintensitäten für einzelne Cholangiozyten des Gallengangs betrachtet, welche durch die Färbung von CK7 gekennzeichnet sind. Hierbei wurden lediglich solche Zellen eingeschlossen, welche in der gewählten Schnittebene über einen Zellkern und über sichtbare Zellgrenzen verfügen (Kontrollgruppe n=787 Zellen in 13 Lebern, PSC-Gruppe n=252 Zellen in 10 Lebern). Diese wurden in dem Auswertungsprogramm manuell umrandet und unter Berücksichtigung der festgelegten Schwellenwerte ausgewertet. Die Berechnung der einzelnen Werte ist im Abschnitt 3.2. näher beschrieben. Abbildung 5 stellt exemplarisch die Auswertung einzelner Zellen in einer PSC- sowie einer Kontroll-Leber dar.

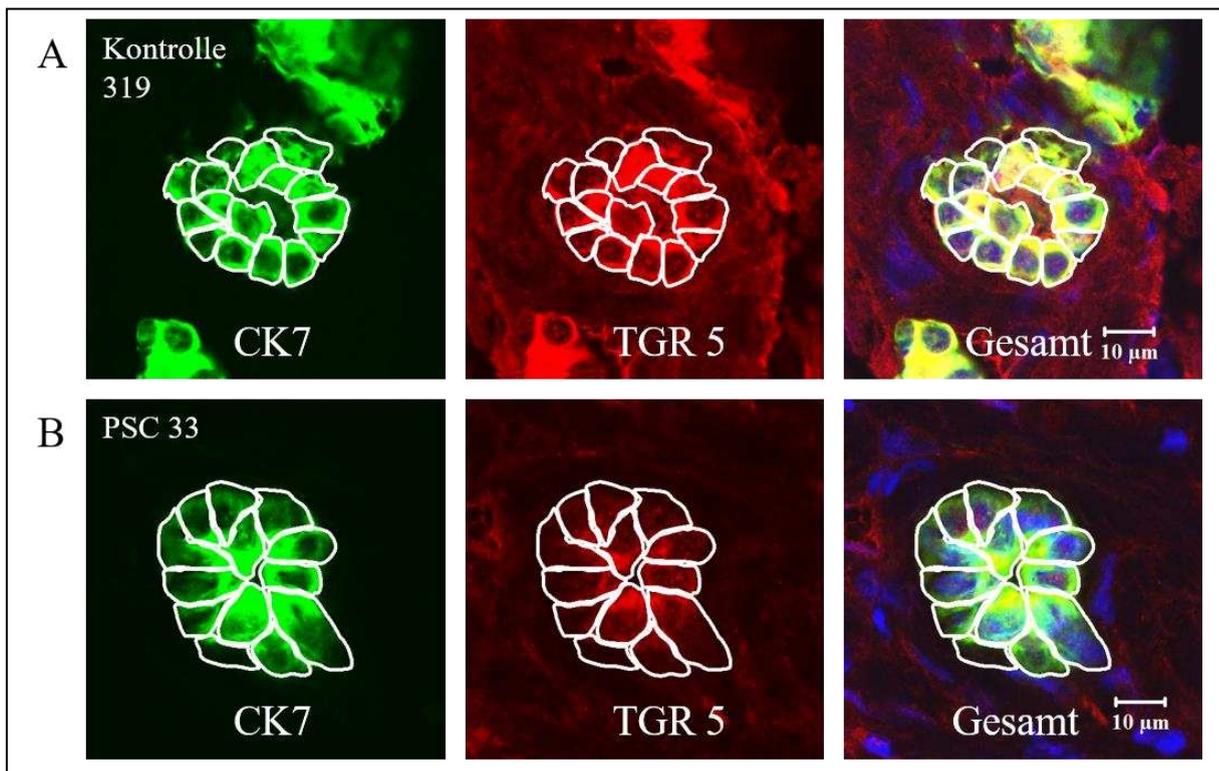


Abb. 05 Exemplarische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mittels Betrachtung einzelner Cholangiozyten

A: Immunfluoreszenzfärbung des Kontrollgewebes (Kontrolle 319)

B: Immunfluoreszenzfärbung der PSC-Biopsien (PSC 33)

Kryofixierte Schnitte aus Leberbiopsien von Kontrollgruppen (A) sowie PSC-Patienten*innen (B) wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbung gefärbt. Dabei werden TGR5 (rot), Cholangiozyten (grün) sowie die Zellkerne (blau) dargestellt. Regionen mit einer Kolokalisation von TGR5 und CK7 sind gelb wiedergegeben. Die Aufnahme der Präparate erfolgte an dem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM 510/880*. Mit Hilfe des Programms AxioVision 4.8 wurden die einzelnen Cholangiozyten zur späteren Auswertung manuell ausgeschnitten. Balken = 10 µm

In den betrachteten Gallengängen fand sich sowohl in den Kontroll-Proben (n=111 Gallengänge) als auch in den PSC-Biopsien (n=50 Gallengänge) eine vorwiegend apikale TGR5-Lokalisation. Verteilt waren die einzelnen Gallengänge auf 13 Kontroll-Proben und zehn PSC-Biopsien. In den Kontrollgruppen wurden insgesamt mehr Cholangiozyten pro Gallengang in die Auswertung eingeschlossen (Kontrollgruppe: 7,1 Zellen/Gallengang; PSC-Gruppe: 5,0 Zellen/Gallengang). Insgesamt war die Auswertung einzelner Zellen mit einer Reihe von Problemen behaftet. Da kein Zellmembranmarker verwendet wurde, ließen sich die Zellgrenzen nicht klar differenzieren. Als „Zelle“ markiert wurden nur Zellen mit positiver/sichtbarer Kernfärbung im gewählten Schnitt, so dass ein Teil des dargestellten Gallengangs nicht in die Auswertung einbezogen werden konnte. Aufgrund dieser Probleme war davon auszugehen, dass die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung durch einen zweiten Betrachter eingeschränkt ausfallen würde. Somit wurde in einem nächsten Ansatz der gesamte Gallengang quantifiziert.

4.1.2 Relative Quantifizierung der TGR5-Proteinmenge mittels Auswertung ganzer Gallengänge

Wie in Abschnitt 4.1.2. dargestellt war die Quantifizierung einzelner Cholangiozyten mit einer Reihe von Problemen behaftet. Daher erfolgte im nächsten Schritt eine Analyse unter Einbezug des gesamten, in der gewählten Schnittebene sichtbaren, CK7-positiven Gallenganges.

Hierfür wurden der gesamte Gallengang sowie das Lumen des Gallenganges manuell umrandet. Die Berechnung der Immunfluoreszenzintensität von TGR5 und CK7 im Gallengang wurde nach Abzug des Lumens identisch zu der Auswertung der einzelnen Cholangiozyten durchgeführt. Abbildung 6 zeigt exemplarisch die Auswertung der einzelnen Gallengänge unter Berücksichtigung des Lumens.

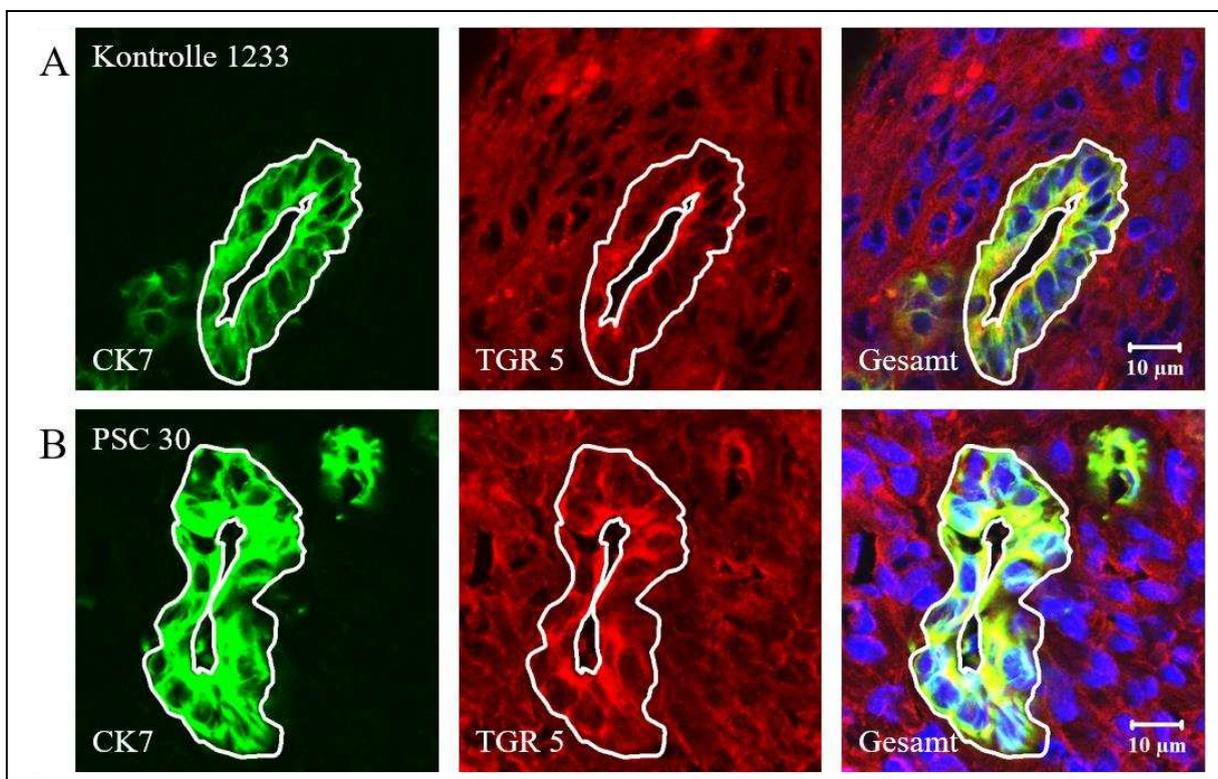


Abb.06 Exemplarische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mittels Einschluss des gesamten Gallenganges nach Subtraktion des Lumens

A: Immunfluoreszenzfärbung des Kontrollgewebes (Kontrolle 1233)

B: Immunfluoreszenzfärbung der PSC-Biopsien (PSC 30)

Kryofixierte bzw. Paraffin-Schnitte aus Leberbiopsien von Kontrollgruppen (A) sowie PSC-Patienten*innen (B) wurden mittels Immunfluoreszenz-Färbung behandelt. Dabei werden TGR5 (rot), Cholangiozyten (grün) sowie die Zellkerne (blau) dargestellt. Regionen mit einer Kolo-kalisation von TGR5 und CK7 sind gelb wiedergegeben. Die Aufnahme der Präparate erfolgte an dem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM 510/880*. Mit Hilfe des Programmes AxioVision 4.8 wurden die gesamten Gallengänge sowie das Gallenganglumen zur späteren Auswertung manuell ausgeschnitten.

Balken = 10 µm

Für die Auswertung der gesamten Gallengänge konnten weitere Leberproben eingeschlossen werden, so dass sowohl die Biopsieanzahl in der Kontrollgruppe (n=28 Biopsien) als auch in der PSC-Gruppe erhöht werden konnten (n=30 Biopsien). Die subzelluläre Verteilung von TGR5 war in den Gallengängen vorwiegend apikal. Die CK7-Immunfluoreszenzintensität in den Gallengängen unterschied sich zwischen Kontrolllebern und PSC Lebern nicht ($p=0,43$; n=28 Kontrollgruppe; n=30 PSC-Gruppe). Die TGR5-Immunfluoreszenzintensität hingegen zeigte sich im Verhältnis zur CK7-Immunfluoreszenz in den Biopsien der PSC-Erkrankten ($60,6\pm 6,1\%$) im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen ($100\pm 7,8\%$) vermindert. Die nun gewählte Methode der Quantifizierung war einfacher anzuwenden und die o.g. Ergebnisse konnten durch zwei weitere unabhängige Untersucher (Frau Dr. L. Spomer, Herr Dr. J. Stindt) reproduziert werden. Auch konnte die Methode an einer zweiten Kohorte von PSC-Lebern und Kontrolllebern (diesmal Paraffingewebe) angewandt und das Ergebnis der signifikant reduzierten TGR5-Fluoreszenzintensität in den Gallenwegen durch einen dritten Untersucher (Herrn Dr. J. Stindt) reproduziert werden. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 7A dargestellt. Die neu hinzugewonnenen Paraffinschnitte waren eingeteilt in frühe (Stadium I/II, n=4) sowie späte PSC-Stadien (Stadium III/IV, n=4). Diese Proben wurden mit Kontrollgewebe (n=5) verglichen, welche ebenfalls in Paraffin eingebettet waren. Wie Abbildung 7B verdeutlicht, konnte sowohl in den frühen (Stadium I/II, $27,6\pm 4,0\%$) als auch in den späteren PSC-Stadien (Stadium III/IV, $24,4\pm 7,5\%$) eine signifikante Reduktion der TGR5-Immunfluoreszenz im Verhältnis zur CK7-Immunfluoreszenz gesehen werden. Unterschiede in der TGR5-Immunfluoreszenz zwischen den einzelnen Stadien konnten nicht gesehen werden.

Es fand sich keine Veränderung der TGR5-Fluoreszenzintensität in den Gallengängen von Patienten*innen mit PBC, medikamentös-toxischem Leberschaden (DILI), nichtalkoholischer Steatohepatitis bzw. Virushepatitis (Analyse Frau Dr. L. Spomer, Herr Dr. J. Stindt)[1]. Hier kam ebenfalls die oben beschriebene Methode zum Einsatz. Somit scheint die Reduktion der TGR5-Proteinmenge in Cholangiozyten spezifisch für PSC zu sein.

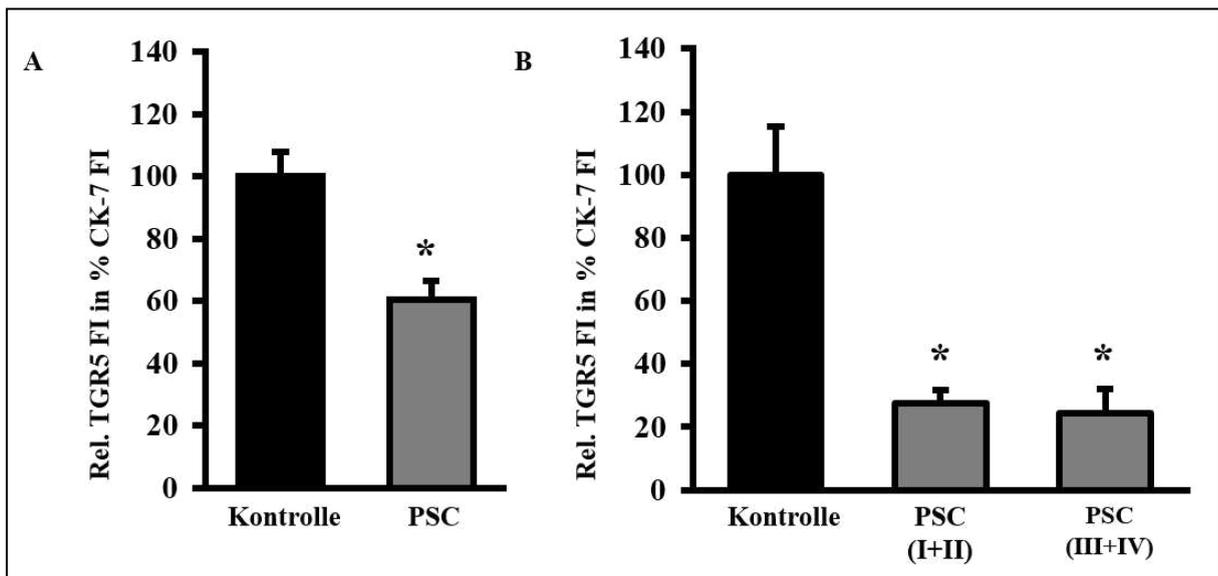


Abb. 07 Die TGR5-Immunfluoreszenz (IF) ist in biliären Epithelzellen reduziert

(A) Die TGR5-Immunfluoreszenzintensität (FI) wurde in CK7-positiven Cholangiozyten sowohl in Kontrolllebergewebe als auch in PSC-Lebergewebe bestimmt (Kontrollgruppe n=28, PSC-Lebern n=30). Die TGR5-FI wurde in Relation zu CK7 ausgedrückt. Die mittlere relative TGR5-FI der Kontrollen wurde auf 100% gesetzt. (B) Ergänzend wurden die PSC-Biopsien nach einem frühem (Stadium I-II) oder einem späterem Krankheitsstadium (Stadium III/IV) eingeteilt (Kontrolllebern n=5, PSC-Stadium I-II n=4, PSC-Stadium III-IV n=4). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt.

*= signifikant verschieden zur Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U-Test)

Adaptiert von: [1]

4.2 Regulation der TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte eine verminderte Proteinexpression von TGR5 in den Gallengängen von PSC-Erkrankten gezeigt werden. Ob diese Veränderungen ebenfalls auf mRNA-Ebene zu finden sind und durch welche Mediatoren sie vermittelt werden, war unklar. Neben Cholangiozyten spielen auch Immunzellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PSC. Wie oben beschrieben findet sich eine hohe Expression von TGR5 in den CD14-positiven Monozyten, den Makrophagen sowie den gewebeständigen Lebermakrophagen (Kupffer-Zellen).

Da humane Cholangiozyten nur schwer zu gewinnen sind, wurden für die folgenden Experimente zunächst humane Makrophagen verwendet. Mit den folgenden Versuchen sollte die Regulation der TGR5-Expression auf mRNA-Ebene näher untersucht werden. Dafür wurden humane Makrophagen mit verschiedenen PSC-assoziierten Substanzen für einen festgelegten Zeitraum stimuliert und anschließend die TGR5-mRNA-Expression mittels semi-quantitativer *Realtime*-PCR bestimmt. Die humanen Makrophagen wurden aus PBMC von tagesfrischen *Buffy Coats* differenziert.

4.2.1 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Gallensäuren

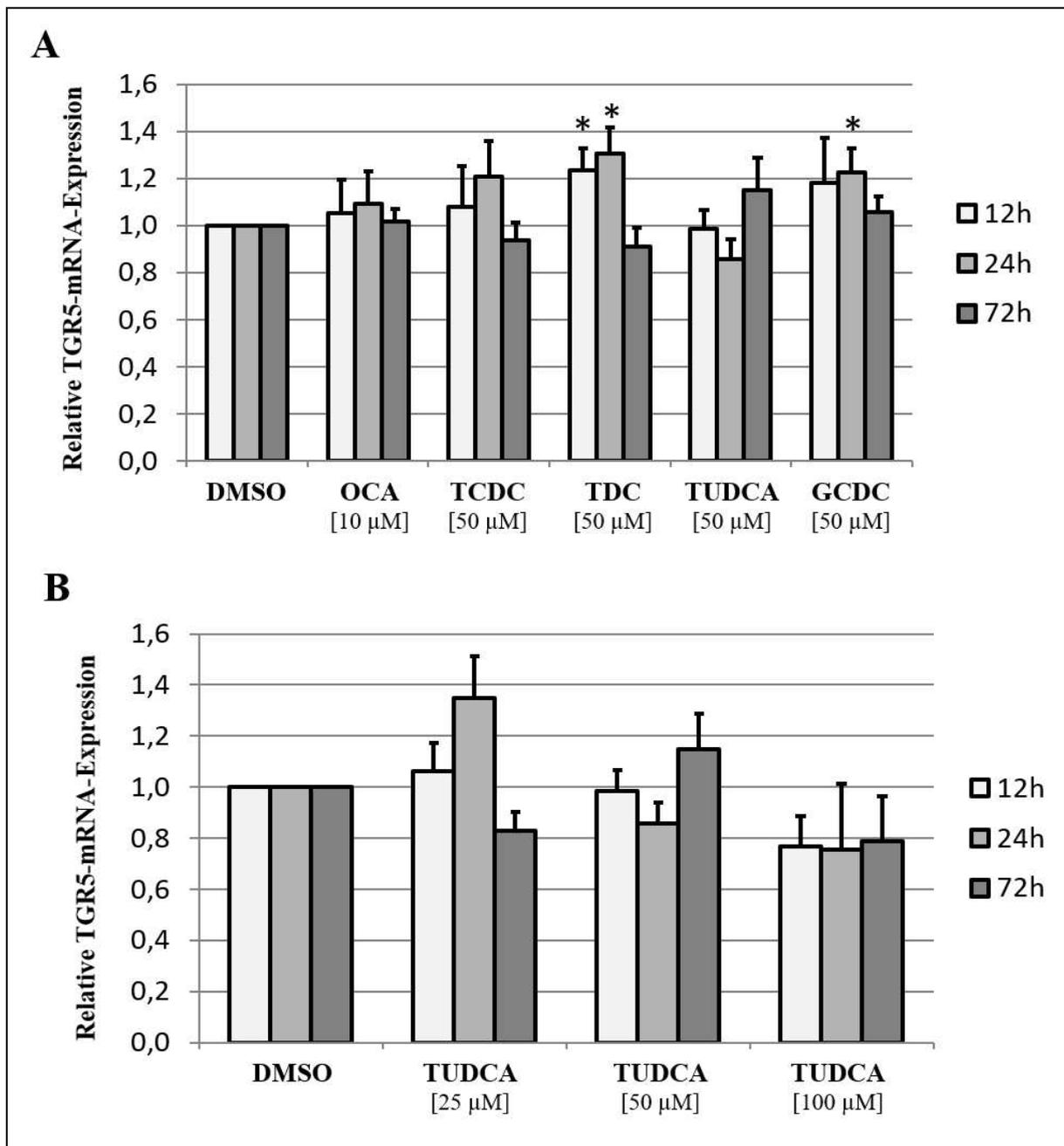


Abb. 08 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Gallensäuren

A. TGR5-mRNA-Expression nach Stimulation mit konjugierten Gallensäuren (TCDC, TDC, GCDC, TUDCA (je 50 µM)) und dem FXR-Agonist OCA (10 µM).

B. TGR5-mRNA-Expression nach Stimulation von TUDCA in verschiedenen Konzentrationen (25 µM, 50 µM, 100 µM).

Die Stimulation der humanen Makrophagen mit den Gallensäuren erfolgte jeweils zwölf (hellgrauer Balken), 24 (grauer Balken) und 72 Stunden (dunkelgrauer Balken) vor der Ernte. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen Real-Time PCR analysiert. Die Messergebnisse wurden mittels der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierbei diente HPRT-1 als *Housekeeping Gene*.

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten DMSO-Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den SEM.

*= signifikant verschieden zur DMSO-Kontrolle ($p < 0,05$, zweiseitiger Student'scher T-Test)

A: OCA (n=9-11), TCDC (n=11-12), TDC (n=9-12), TUDCA (n=13-14), GCDC (n=8-9)

B: TUDCA 25 µM (n=3-4), TUDCA 50 µM (n=13-14), TUDCA 100 µM (n=6-7)

Zunächst erfolgte eine Stimulation der humanen Makrophagen mit verschiedenen Gallensäuren. Verwendet wurden dafür die primären konjugierten Gallensäuren TCDC (n=11-12) und GCDC (n=8-9) sowie die sekundäre konjugierte Gallensäure TDC (n=9-12). Zusätzlich wurde mit der tertiären konjugierten Gallensäure TUDCA (n=13-14) stimuliert. Für diese vier Gallensäuren wurde eine einheitliche Konzentration (50 μM) gewählt. Die Daten zu TUDCA wurden in dieser Konzentration bereits in der Dissertation von Lina Spomer veröffentlicht [2]. Zusätzlich wurde der FXR-Agonist OCA (n=9-11) verwendet, welcher zur Behandlung der PBC eingesetzt wird und mittlerweile auch positive Effekte in einer Phase II Studie bei PSC gezeigt hat [121, 122]. Die Stimulation der humanen Makrophagen mit den beschriebenen Gallensäuren erfolgte jeweils über zwölf, 24 und 72 Stunden. Mittels semiquantitativer *Real-time-PCR* wurde die TGR5-mRNA-Expression bestimmt und in Relation zu dem *Housekeeping Gene* HPRT-1 gesetzt. Die TGR5-mRNA-Expression wurde relativ zur Lösungsmittelstimulierten (DMSO)-Kontrolle bestimmt.

In Abbildung 8A wird ersichtlich, dass eine signifikante Erhöhung der TGR5-mRNA-Expression nach der Stimulation mit TDC nach zwölf bzw. 24 Stunden (12h: 123% \pm 9%; 24h: 131% \pm 11%) sowie mit GCDC nach 24 Stunden (122% \pm 11%) bestand ($p < 0,05$). Alle übrigen getesteten Gallensäuren haben keinen signifikanten Einfluss auf die TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen. Dies bestätigte sich für alle getesteten Zeiträume.

Weiterführend erfolgte die Stimulation der humanen Makrophagen mit verschiedenen Konzentrationen der Gallensäure TUDCA (25 μM , 50 μM , 100 μM), um einen möglichen konzentrationsabhängigen Effekt von Gallensäuren auf die Expression von TGR5 beobachten zu können. Neben der initial verwendeten Konzentration, wie sie auch in der Abbildung 8A zu sehen ist, wurde daher zum Vergleich eine höhere sowie eine niedrigere Konzentration von TUDCA in einem zweiten Versuch gewählt. Wie aus Abbildung 8B hervorgeht, konnte auch nach Stimulation mit niedrigeren oder höheren Konzentrationen keine signifikante Änderung der TGR5-mRNA-Menge gesehen werden. Die Versuche wurden zunächst lediglich probatorisch durchgeführt. Als sich in ersten Voruntersuchungen kein Effekt nachweisen ließ, erfolgten keine weiteren Versuche mit diesen Konzentrationen. In der höheren (TUDCA 100 μM , n=6-7) sowie in der niedrigeren TUDCA-Konzentration (TUDCA 25 μM , n=3-4) finden sich daher geringere Anzahlen an Wiederholungen.

4.2.2 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Zytokinen

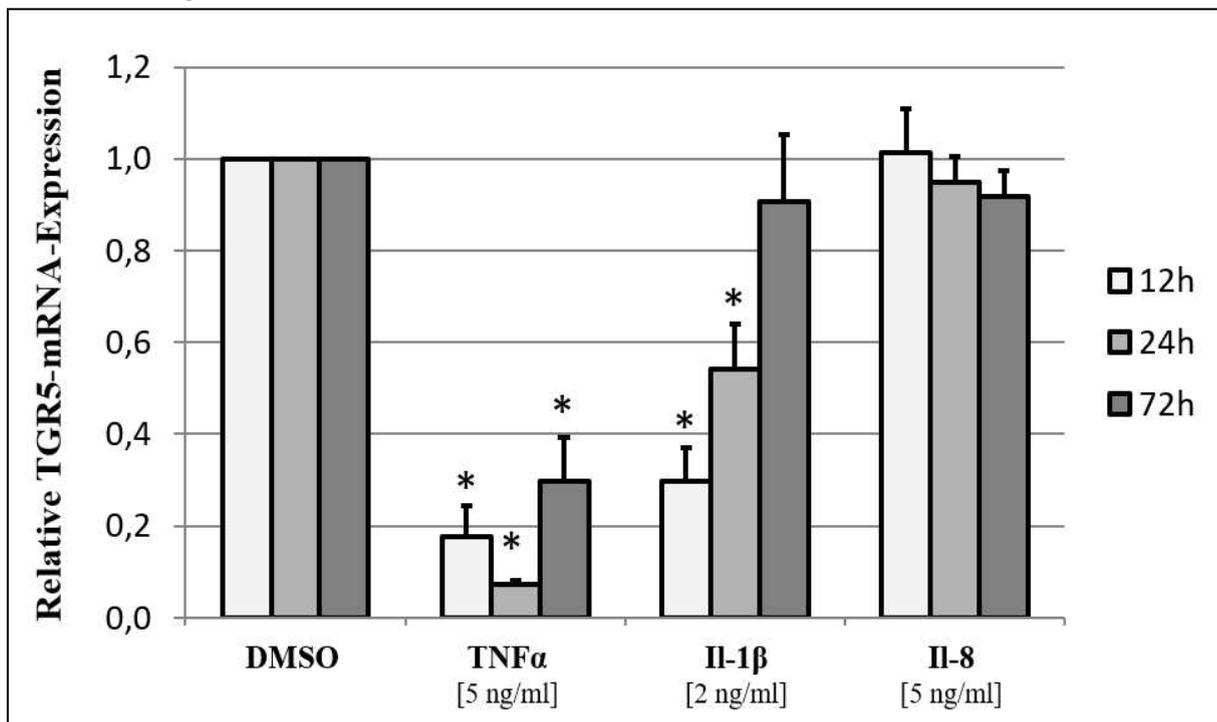


Abb. 09 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Zytokinen

Die Stimulation der humanen Makrophagen mit den Zytokinen erfolgte jeweils zwölf (hellgrauer Balken), 24 (grauer Balken) und 72 Stunden (dunkelgrauer Balken) vor der Ernte. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen *Realtime* PCR analysiert. Die Messergebnisse wurden mittels der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierbei diente HPRT-1 als *Housekeeping Gene*. Die Abbildung ist modifiziert nach der Abbildung 17 der Dissertation von Lina Spomer [2].

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten DMSO-Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den SEM. *= signifikant verschieden zur DMSO-Kontrolle (Zweiseitiger Student'scher T-Test, $p < 0,05$)

TNF- α (n=10-11), IL-1 β (n=9), IL-8 (n=10-11)

Im Folgenden wurde der Einfluss der Zytokine TNF- α (n=10-11), IL-1 β (n=9) und IL-8 (n=10-11) auf die mRNA-Expression von TGR5 in humanen Makrophagen näher untersucht, welche im Serum von PSC-Patienten erhöht sind. Die Daten zu den Zytokinen TNF- α sowie IL-1 β wurden bereits in der Dissertationsschrift von Lina Spomer veröffentlicht [2]. Ergänzend erfolgte in dieser Arbeit die Stimulation der humanen Makrophagen mit dem Zytokin IL-8. In Abbildung 10 wird deutlich, dass es nach Stimulation der humanen Makrophagen mit TNF- α zu einer signifikanten Reduktion der TGR5-mRNA-Expression kommt. Dies zeigt sich zu allen drei Stimulationszeitpunkten. Dabei kommt es im Vergleich zur unstimulierten DMSO-Kontrolle zu einer 5,6-fachen Reduktion nach zwölf Stunden, zu einer 13,7-fachen Reduktion nach 24 Stunden sowie zu einer 3,4-fachen Reduktion nach 72 Stunden dauernder Stimulation mit TNF- α . Ebenso kann eine signifikante Abnahme der TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach der Stimulation mit IL-1 β detektiert werden. Dieser Effekt ist mit zunehmender Inkubationszeit abnehmend. Während nach zwölf Stunden eine 3,4-fache bzw.

nach 24 Stunden eine 1,8-fache Verminderung der TGR5-mRNA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gesehen werden kann, ist nach 72 Stunden keine signifikante Änderung nachweisbar. In den ergänzenden Versuchen mit dem Zytokin Il-8 konnte nach keiner Stimulationsdauer eine signifikante Auswirkung auf die TGR5-mRNA-Ausbildung beobachtet werden.

Während Gallensäuren keinen Einfluss auf die Regulation der TGR5-Expression zu haben scheinen, fand sich eine schnelle, mit zunehmender Inkubationszeit abnehmende Suppression der TGR5-Expression durch die Zytokine TNF- α und Il-1 β .

4.2.3 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Aktivatoren von nukleären Gallensäurenrezeptoren

Neben den Gallensäuren und Zytokinen erfolgte die nähere Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen der TGR5-mRNA-Expression durch Aktivatoren von nukleären Gallensäurerezeptoren, da diese potentiell therapeutisch genutzt werden könnten. Dabei wurden die humanen Makrophagen mit $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ (n=15-16) und dessen Vorstufen Vitamin-D₃ (n=8) sowie mit 25-OH-Vitamin-D₃ (n=8) stimuliert, welche Aktivatoren des nukleären Gallensäurerezeptors VDR sind. Die Ernte erfolgte erneut zwölf, 24 sowie 72 Stunden nach Stimulation der Zellen. Die Abbildung 10 belegt, dass die Stimulation von humanen Makrophagen mit den Vitamin D-Vorstufen zu keinem getesteten Zeitpunkt einen signifikanten Effekt auf die Expression der TGR5-mRNA ausübt. Hingegen lässt sich nach Stimulation mit dem VDR-Liganden $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ eine signifikant verminderte Produktion der TGR5-mRNA im Vergleich zur Kontrollprobe nachweisen. Dabei kommt es zu einer abnehmenden mRNA-Expression bei längerer Stimulationsdauer. Während nach einer 12- bzw. 24-stündigen Stimulation (12h: 77% \pm 8%; 24h: 69% \pm 8%) eine ähnliche Abnahme der mRNA Menge nachgewiesen werden konnte, fand sich nach einer 72-stündigen Inkubation (72h: 49% \pm 5%) eine stärkere Verminderung der TGR5-mRNA-Expression.

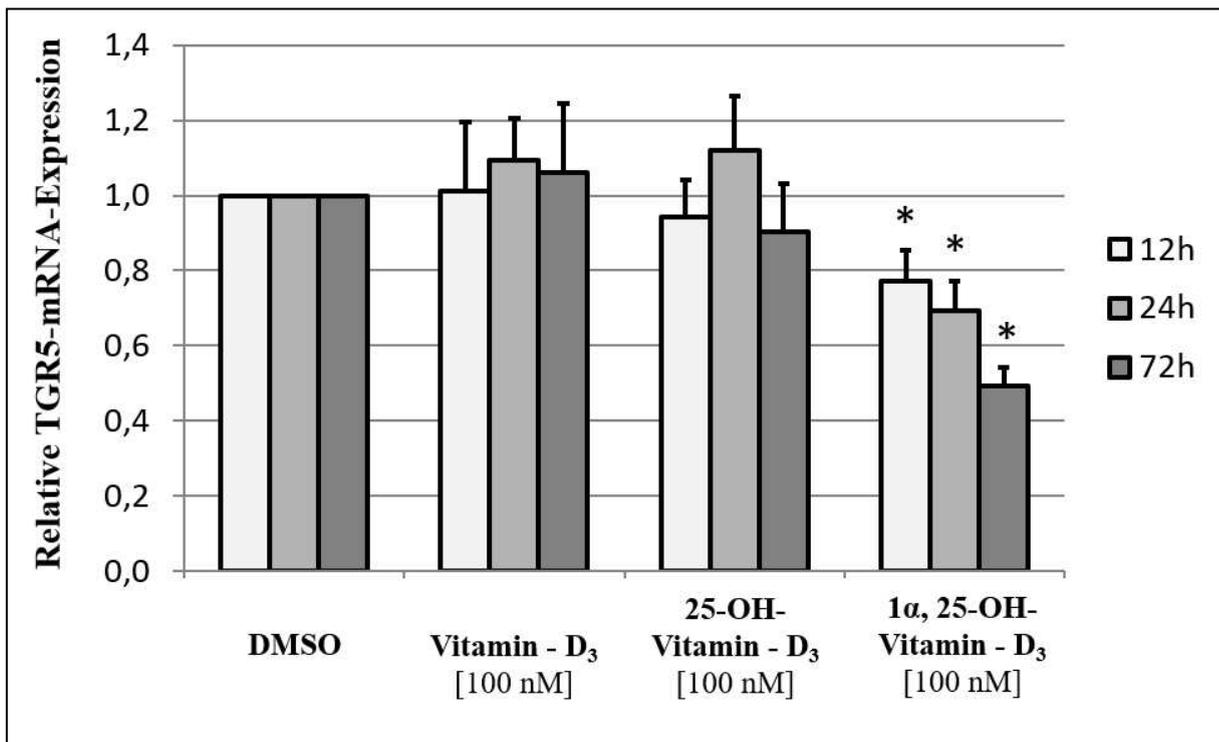


Abb. 10 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Calcitriol und seinen Vorstufen Vitamin-D₃ sowie 25-OH-Vitamin-D₃

Die Stimulation der humanen Makrophagen erfolgte jeweils 12 (hellgrauer Balken), 24 (grauer Balken) und 72 Stunden (dunkelgrauer Balken) vor der Ernte. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen *Realtime* PCR analysiert. Die Messergebnisse wurden mittels der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierbei diente HPRT-1 als *housekeeping gene*.

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten DMSO-Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler (SEM). *= signifikant verschieden zur DMSO-Kontrolle (Zweiseitiger Student'scher t-Test, $p < 0,05$)

Vitamin-D₃ (je n=8), 25-OH-Vitamin-D₃ (je n=8), 1α,25-OH-Vitamin-D (n=15-16)

Weiterführend wurde der Einfluss von Aktivatoren des nukleären Gallensäurenrezeptors PXR auf die TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen näher betrachtet. Dafür wurden die humanen Makrophagen mit Dexamethason (n=7-9), Mifepriston (n=7-9) und Rifampicin (n=7-9) stimuliert und nach zwölf, 24 sowie 72 Stunden geerntet. Wie in Abbildung 11 dargestellt, bewirkte Dexamethason zwar einen supprimierenden Effekt auf die TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen, allerdings war dieser zu keinem Zeitpunkt signifikant. Mifepriston hingegen reduziert nach 24-stündiger (55% ± 10%) sowie nach 72-stündiger Inkubation (68% ± 13%) die TGR5-mRNA-Expression signifikant im Verhältnis zur Kontrollprobe. Ähnliche Effekte konnten nach der Stimulation mit dem PXR-Agonisten Rifampicin beobachtet werden. Hier kam es nach einer 12-stündigen (78% ± 4%) bzw. 72-stündigen Inkubation (65% ± 8%) mit Rifampicin zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression in den humanen Makrophagen im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle.

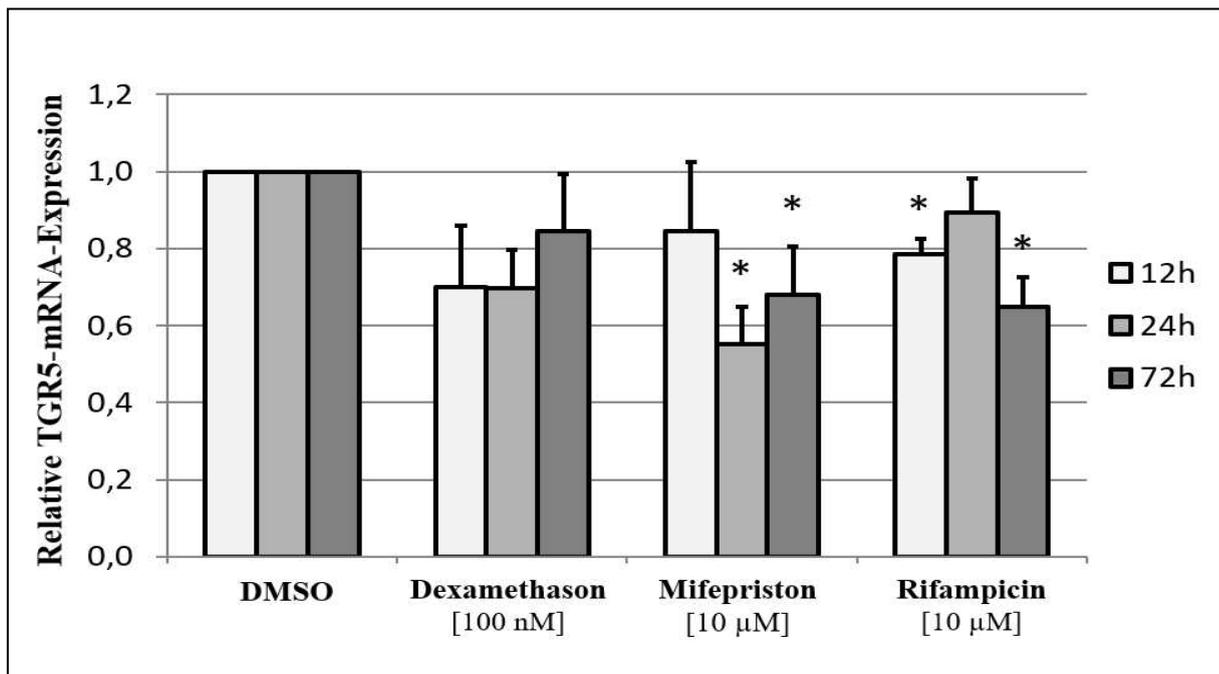


Abb. 11 TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Aktivatoren des nukleären Gallensäurenrezeptors PXR

Die Stimulation der humanen Makrophagen erfolgte jeweils 12 (hellgrauer Balken), 24 (grauer Balken) und 72 Stunden (dunkelgrauer Balken) vor der Ernte. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen *Realtime* PCR analysiert. Die Messergebnisse wurden mittels der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierbei diente HPRT-1 als *housekeeping gene*.

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten DMSO-Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler (SEM). *= signifikant verschieden zur DMSO-Kontrolle (Zweiseitiger Student'scher t-Test, $p < 0,05$)

Dexamethason (n=7-9), Mifepriston (n=7-9), Rifampicin (n=7-9)

Zusammenfassend fand sich in humanen Makrophagen nach Stimulation mit Gallensäuren, Il-8, den Vitamin-D-Vorstufen sowie Dexamethason keine Änderung der TGR5-mRNA-Expression. Nach Inkubation mit TDC und GCDC fand sich eine leichte, jedoch signifikante Zunahme der TGR5-mRNA-Menge. Hingegen konnte eine signifikante Verminderung der TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach der Stimulation mit den Zytokinen TNF- α und Il-1 β , dem aktiven Vitamin D sowie den PXR-Agonisten Mifepriston und Rifampicin beobachtet werden. Während die Zytokin-induzierte Suppression der TGR5-Expression am stärksten ausfiel, war diese im Gegensatz zur Mifepriston- und Rifampicin-assoziierten Suppression der TGR5-mRNA-Menge nur transient zu beobachten.

4.3 Regulation der TGR5-mRNA-Expression in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 und in humanen biliären Organoiden

In PSC-Leber-Biopsien wurde, wie oben stehend beschrieben, eine verminderte TGR5-Protein-Expression in den Gallengängen nachgewiesen. Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Vorversuche mit humanen Makrophagen zeigen, dass diese Minderexpression über Zytokine sowie Agonisten der nukleären Gallensäurenrezeptoren reguliert werden könnte. Im Folgenden sollte nun näher untersucht werden, welchen Einfluss bestimmte PSC-assoziierte Substanzen auf die TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten nehmen könnten. Diesbezüglich wurde die humane Cholangiozyten-Zelllinie H69 mit Gallensäuren, Zytokinen sowie Vitamin D für einen vorgegebenen Zeitraum kultiviert und anschließend geerntet. Die TGR5-mRNA-Expression wurde daraufhin mittels semiquantitativer *Realtime*-PCR bestimmt und ins Verhältnis zum *Housekeeping Gene* HPRT-1 gesetzt.

4.3.1 TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten der Zelllinie H69 nach Stimulation mit Gallensäuren

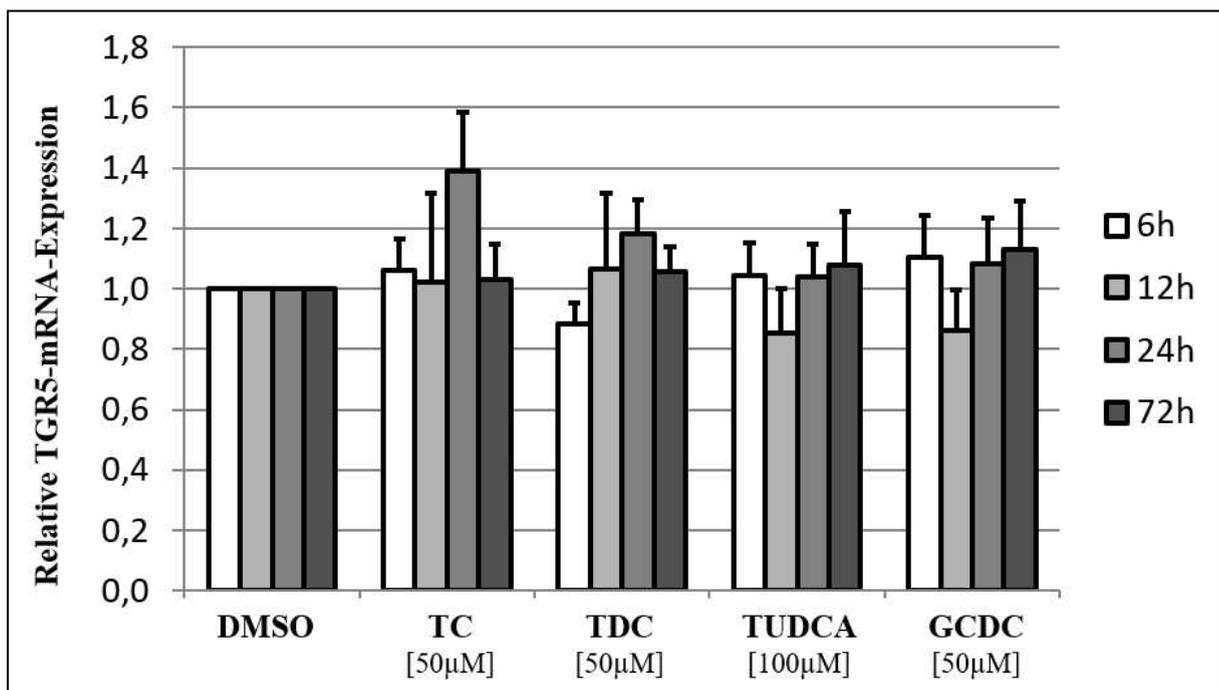


Abb. 12 TGR5-mRNA-Expression in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 nach Stimulation mit Gallensäuren

Cholangiozyten der Zelllinie H69 wurden mit den Gallensäuren TC (50 µM), TDC (50 µM), TUDCA (100 µM) und GCDC (50 µM) stimuliert. Die Stimulation erfolgte jeweils sechs (weißer Balken), zwölf (hellgrauer Balken), 24 (grauer Balken) und 72 Stunden (dunkelgrauer Balken) vor der Ernte. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen Real-Time PCR analysiert. Die Messergebnisse wurden mittels der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierbei diente HPRT-1 als *Housekeeping Gene*.

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten DMSO-Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler (SEM).

TC (n=6-8), TDC (n=8), TUDCA (n=7-8), GCDC (n=8)

Entsprechend den Versuchen mit den humanen Makrophagen wurden die Zellen der Cholangiozyten-Zelllinie H69 mit TDC (50 μM ; n=8), TUDCA (100 μM ; n=7-8) sowie GCDC (50 μM ; n=8) stimuliert. Ergänzend erfolgten zudem Stimulationen mit der primären Gallensäure TC (50 μM ; n=6-8). Anders als bei den Versuchen mit den humanen Makrophagen wurden die Cholangiozyten zusätzlich sechs Stunden nach stattgefundener Stimulation geerntet.

Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 12 im Verhältnis zur unstimulierten DMSO-Kontrolle dargestellt. Zu keinem beobachteten Zeitpunkt sowie bei keiner getesteten Gallensäure konnte eine Änderung der TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten der Zelllinie H69 beobachtet werden. Die Ergebnisse entsprechen somit den Beobachtungen mit den humanen Makrophagen.

Im Vergleich zu den humanen Makrophagen zeigte sich in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 eine deutlich geringere, absolute TGR5-mRNA-Menge.

4.3.2 TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten der Zelllinie H69 nach Stimulation mit Zytokinen und Vitamin D

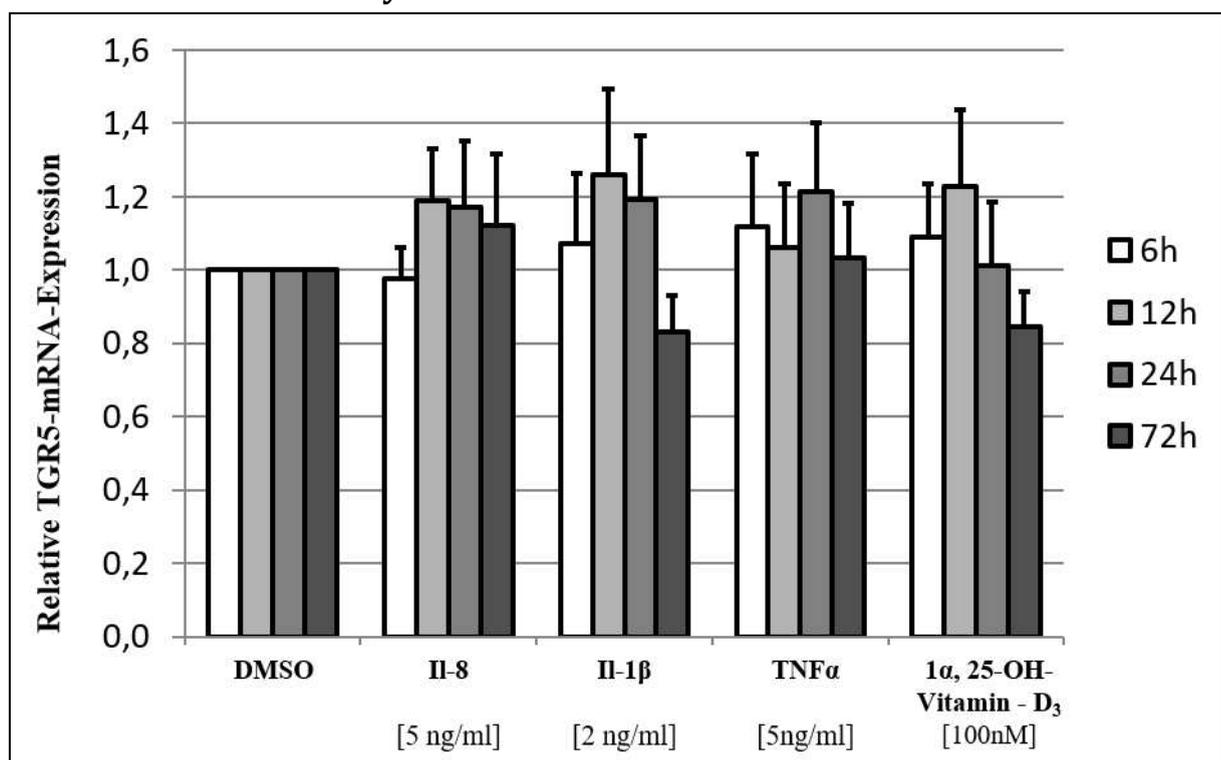


Abb. 13 TGR5-mRNA-Expression in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 nach Stimulation mit Zytokinen und Vitamin D

Cholangiozyten der Zelllinie H69 wurden mit den Zytokinen IL-8 (5 ng/ml), IL-1 β (2 ng/ml) und TNF α (5 ng/ml) sowie 1 α ,25 (OH)₂ – Vitamin D₃ (100 nM) stimuliert. Die Stimulation erfolgte jeweils sechs (weißer Balken), zwölf (hellgrauer Balken), 24 (grauer Balken) und 72 Stunden (dunkelgrauer Balken) vor der Ernte. Anschließend wurde die RNA, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen Real-Time PCR analysiert. Die Messergebnisse wurden mittels der ΔC_T -Methode ausgewertet. Hierbei diente HPRT-1 als *housekeeping gene*.

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten DMSO-Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den Standardfehler (SEM).

IL-8 (n=8), IL-1 β (n=8), TNF α (n=6-8), 1 α ,25 (OH)₂-Vitamin D₃ (n=7-8)

In dieser Arbeit konnte in den Versuchen mit humanen Makrophagen gezeigt werden, dass eine Stimulation der Zellen mit den Zytokinen Il-1 β und TNF- α zu einer Mindereexpression der TGR5-mRNA führt. Il-8 hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die TGR5-mRNA-Bildung. Die Cholangiozyten der Zelllinie H69 wurden nun identisch zu den Versuchen mit den humanen Makrophagen mit Il-8 (5 ng/ml; n=8), Il-1 β (2 ng/ml; n=8) und TNF- α (5 ng/ml; n=6-8) stimuliert. Wie in Abbildung 13 dargestellt, zeigte sich in der Cholangiozyten-Zelllinie H69 bei keinem getesteten Zytokin eine signifikante Änderung der TGR5-mRNA-Menge in Bezug auf die DMSO-Kontrolle. Dies konnte zu allen beobachteten Zeitpunkten nach den entsprechenden Inkubationsdauern festgestellt werden. Dabei standen die Ergebnisse bzgl. Il-8 im Gegensatz zu anderen Befunden, welche mit humanen und murinen Cholangiozyten in anderen Versuchen der Arbeitsgruppe erhoben wurden. Hier fand sich nach Stimulation mit IL8/IL-8 Homologen in primären murinen und humanen Cholangiozyten eine Herunterregulation der TGR5-mRNA bzw. Protein-Menge [1]. Exemplarisch werden daher in Abschnitt 4.3.3. die Ergebnisse zur TGR5-mRNA-Expression in humanen biliären Organoiden nach der Stimulation mit Il-8 gezeigt.

Darüber hinaus erfolgte eine Stimulation mit 1 α ,25 (OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ (100 nM; n=7-8), welches in humanen Makrophagen ebenfalls eine signifikante Minderung der TGR5-mRNA-Expression erzielte. Hier konnte bei den Versuchen mit der Cholangiozyten-Zelllinie H69 ebenfalls keine signifikante Auswirkung detektiert werden.

Zusammenfassend konnte bei keinem der verwendeten Stimulationssubstanzen und zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Effekt auf die mRNA-Expression des TGR5-Rezeptors in der Zelllinie beobachtet werden.

4.3.3 TGR5-mRNA-Expression in humanen biliären Organoiden nach der Stimulation mit Il-8

In dieser Arbeit zeigte sich nach der Stimulation von Cholangiozyten der Zelllinie H69 mit Il-8 keine Änderung der TGR5-mRNA. In Versuchen mit anderen humanen und murinen Cholangiozyten der eigenen Arbeitsgruppe konnten hingegen eine Herabregulation der TGR5-mRNA nach Stimulation mit Il-8 detektiert werden [120]. Dies konnte zudem in Versuchen mit humanen biliären Organoiden gesehen werden, welche durch Kathleen Deutschmann und Katharina Ebener durchgeführt wurden und an dieser Stelle gezeigt werden.

Die humanen biliären Organoide wurden durch Kathleen Deutschmann und Katharina Ebener generiert. Die Cholangiozyten wurden aus der Galle extrahiert, welche bei routinemäßigen ERCPs gewonnenen werden konnte. Die kultivierten Organoide wiesen die typischen Cholan-

giozyten-Markerproteine CK-7 und CK-19 auf. Außerdem behielten sie die Polarität von Cholangiozyten bei. Verdeutlicht wird dies in Abbildung 14 A.

Diese Organotide wurden für 24 Stunden mit Il-8 (n=4) stimuliert. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Herabregulation der TGR5-mRNA-Menge in den stimulierten biliären Organoiden ($67,1 \pm 4,9\%$). Abbildung 14 B stellt dieses Ergebnis zusätzlich graphisch dar.

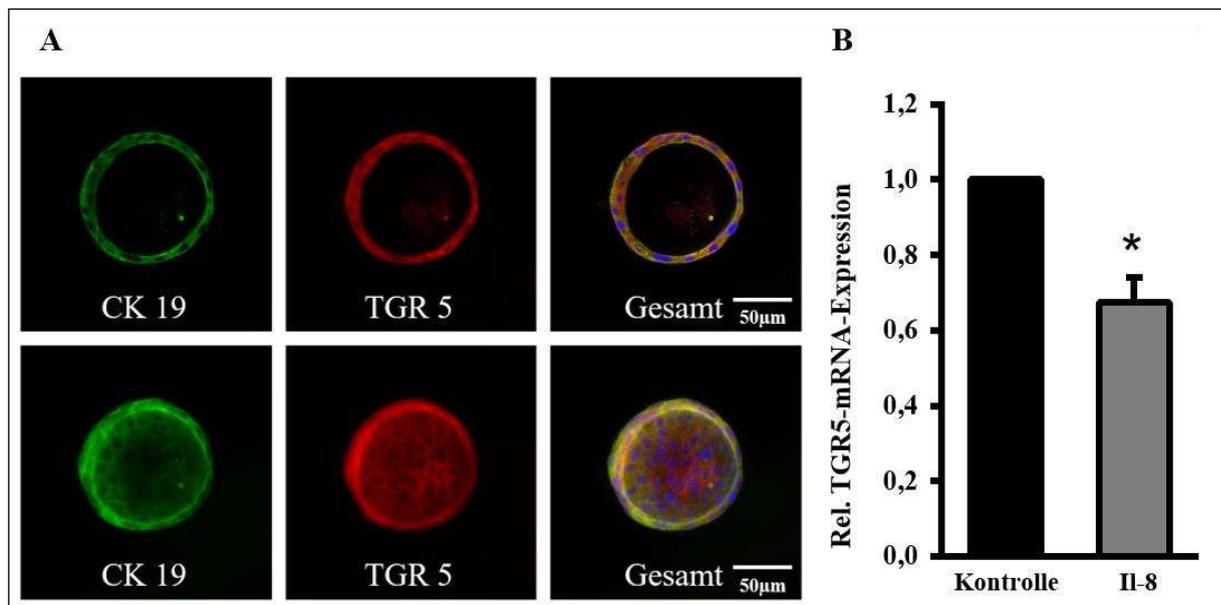


Abb. 14 TGR5-mRNA-Expression in biliären Organoiden nach Stimulation mit Il-8

A. Die humanen Cholangiozyten-Organotide exprimieren, wie diese Fluoreszenzmikroskopie exemplarisch zeigt, das Cholangiozyten-Markerprotein CK19 (grün). TGR5 wird rot-fluoreszierend dargestellt.

B. Die Stimulation der Cholangiozyten-Organotide mit Il-8 erfolgte über 24 Stunden.

Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels der semi-quantitativen *Realtime* PCR analysiert. Als *Housekeeping Gene* diente GAPDH.

Die Säulen zeigen den Mittelwert der relativen TGR5-mRNA-Expression und sind relativ zur unstimulierten Kontrolle wiedergegeben. Die Fehlerbalken beschreiben den SEM.

*= signifikant verschieden zur Kontrolle ($p < 0,05$, Mann-Whitney U-Test/Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test)

Adaptiert von: [1]

5 Diskussion und Schlussfolgerungen

5.1 *Verminderte TGR5-Proteinmenge in den Gallengängen von PSC-Patienten*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TGR5-Proteinmenge in den Gallengängen von PSC-erkrankten Patienten und Patientinnen mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Dabei konnte eine verminderte TGR5-Proteinmenge in den Gallengängen der PSC-Lebern im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen nachgewiesen werden. In einem ersten Auswertungsschritt erfolgte dazu zunächst eine Betrachtung einzelner Cholangiozyten. Dabei ergab sich nach einer Auswertung von zehn Lebern keine Änderung der TGR5-Immunfluoreszenzintensität gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den visuellen Eindrücken, welche bei der Mikroskopie der gefärbten Präparate eine deutlich verminderte TGR5-Expression in den Gallengängen der PSC-Lebern suggerierten. Ursächlich für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte unter anderem ein Selektionsfehler sein. Bei der Auswertung wurden lediglich Cholangiozyten eingeschlossen, welche in der gewählten Ebene eine markierbare Zellmembran sowie einen Zellkern aufwiesen. Die Abgrenzung der Zelle war vor allem erschwert, da bei der Färbung keine Zellmembranmarker verwendet wurden. Dies wäre, sofern diese Methode weiterverfolgt werden sollte, eine notwendige Voraussetzung. Bei der PSC kommt es in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu einer zunehmenden Fibrose mit Atrophie der Gallengänge [104]. Dies erschwert die Auswertung und passt gut zur Beobachtung der Arbeit, dass bei der Betrachtung von einzelnen Zellen in den PSC-Lebern weniger Zellen pro Gallengang auswertbar waren als in den Kontrolllebern. Es wäre denkbar, dass es sich bei diesen selektionierten Zellen, um die am wenigsten durch die Gallenwegserkrankung betroffenen Zellen handelt.

In einer Weiterentwicklung der Methode wurden daher ganze Gallengänge betrachtet. In dieser Auswertung konnten die visuell gewonnenen Eindrücke einer verminderten TGR5-Immunfluoreszenz in den PSC-Leberbiopsien durch drei unabhängige Untersucher (davon ein verblindeter Untersucher) bestätigt werden. Dabei blieb die CK7-Fluoreszenz als Marker für die Cholangiozyten konstant. Eine generelle Reduktion der Proteinmenge in den Gallengängen der PSC-Erkrankten konnte somit ausgeschlossen werden. Darüber hinaus fand sich in den gefärbten PSC-Lebern ähnlich zu den gesunden Kontrollproben eine vor allem apikale Verteilung von TGR5.

Die gewählte Methode ermöglicht lediglich eine relative Quantifizierung der TGR5-Proteinmenge in Cholangiozyten. Für eine alternative Quantifizierung der TGR5-Expression in Cholangiozyten, beispielsweise mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung, ist die Expression des Rezeptors jedoch zu gering [123].

In den ersten Auswertungen der Immunfluoreszenzfärbungen standen lediglich PSC-Biopsien ohne weitere pathologische Stadieneinteilung zur Verfügung. Im weiteren Verlauf konnten PSC-Proben mit Stadien-Einteilung hinzugewonnen werden. Hier zeigte sich sowohl in den frühen als auch in den späteren Stadien eine signifikante Verminderung der TGR5-Expression. Unterschiede innerhalb der Stadien ergaben sich allerdings nicht. Diese Beobachtung konnte lediglich an einer kleinen Anzahl an Biopsieproben getroffen werden. Bei aktuell fehlender Empfehlung für eine Leberbiopsie zur Diagnosesicherung der PSC ist die Anzahl der verfügbaren Gewebeproben jedoch limitiert [124]. Zusätzlich fehlen meist Gewebeproben aus den frühen PSC-Stadien, da diese bei zunächst unspezifischen und symptomarmen Krankheitsbeginn oft erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien diagnostiziert wird [99]. Bei anderen Lebererkrankungen (PBC, nicht-alkoholische Steatohepatitis, medikamentös-toxischer Leberschaden, Virushepatitis) fand sich keine Reduktion der TGR5-Expression in den Gallenwegen [1].

Im Folgenden soll die Relevanz einer verminderten TGR5-Menge in den Cholangiozyten auf die Genese sowie den Verlauf der PSC näher betrachtet werden.

TGR5 fördert in Cholangiozyten über den Chloridkanal CFTR die Chlorid- und Bikarbonatsekretion. Dadurch ist TGR5 maßgeblich an der Alkalisierung der Galle oberhalb der Cholangiozyten und somit an der Aufrechterhaltung eines Schutzfilmes („*The biliary HCO₃⁻ Umbrella*“) beteiligt. Dieser Schutzfilm verhindert einen unkontrollierten Übertritt von toxischen Gallensäuren in die Cholangiozyten. Eine Gallensäuren-bedingte Zellschädigung sowie Apoptose, wie sie im Konzept der toxischen Galle zur PSC-Pathogenese diskutiert wird, wird folglich unterbunden [51]. CFTR^{-/-}-Mäuse entwickeln mit einer fokalen Gallengangsinfektion, Gallengangsproliferationen und abschließender biliärer Zirrhose ein ähnliches Krankheitsbild wie die PSC [97]. Eine Verminderung des TGR5-Rezeptors und somit ein Verlust der protektiven Wirkung könnte die Entstehung der PSC somit fördern und den Krankheitsverlauf negativ beeinflussen.

Neben dieser protektiven Funktion wirkt TGR5 in Cholangiozyten choloretisch. So zeigen TGR5^{-/-}-Mäuse einen reduzierten Gallenfluss [54]. Die PSC ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende Cholestase. Hier könnte eine verminderte TGR5-Expression im Hinblick auf die Cholestase aggravierend wirken.

Darüber hinaus induziert TGR5 nach Stimulation durch Gallensäuren eine Zellproliferation von Cholangiozyten [46]. Im Krankheitsverlauf der PSC kommt es von einer periduktalen Entzündungsreaktion, über eine zunehmende Fibrose und Gallengangsatrophy final zu einer biliären Zirrhose mit fast vollständigem Verlust der Gallengänge. Entgegenwirkend kann in frühen Krankheitsstadien eine reaktive Gallengangsproliferation beobachtet werden [104].

Durch eine Herabregulation von TGR5 in Cholangiozyten kann durch den Rezeptor ein geringerer proliferativer Effekt erzeugt werden.

In dieser Arbeit konnte eine Herabregulation des TGR5-Rezeptors in den Gallengängen von PSC-erkrankten Lebern nachgewiesen werden. In der Leber ist TGR5 zusätzlich in Sinusendothel-, Gallenblasenepithel- und Kupffer-Zellen lokalisiert [44].

In Sinusendothelzellen zeigt eine TGR5-Aktivierung antiapoptotische Wirkungen, eine Förderung der Leberdurchblutung sowie schützende Effekte vor toxischen Gallensäuren [41, 125]. Darüber hinaus bewirkt TGR5 in den leberspezifischen Makrophagen eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Er wirkt dort daher entzündungshemmend [61]. Eine TGR5-Herabregulation könnte also auch in weiteren Zelltypen der Leber an der Entwicklung einer PSC beteiligt sein und den Progress der Erkrankung vorantreiben. Interessanterweise fand sich jedoch in PSC-Lebergewebe eine Hochregulation von TGR5 in CD68⁺CD206⁺ Makrophagen [126]. Dieses Ergebnis spricht für eine differentielle, Zelltypspezifische Regulation von TGR5 in verschiedenen Zelltypen (z.B. Makrophagen und Cholangiozyten).

Der Großteil der Patienten entwickelt zusätzlich zu der PSC die chronisch entzündliche Darmerkrankung Colitis Ulcerosa, welche sich auf das Colon beschränkt [78]. Die Leitsymptomatik der Colitis Ulcerosa besteht aus blutigen und schleimigen Durchfällen. Dabei ist die Entstehung dieser Durchfälle multifaktoriell. Ursachen können unter anderem eine erhöhte Permeabilität der Darmwand, eine gesteigerte Motilität des Kolons, eine Malabsorption von Gallensäuren oder eine geänderte Sekretion/Absorption von Wasser bzw. Ionen sein [127]. TGR5 wird in verschiedenen Zellen des Kolons exprimiert. Dort fördert der Rezeptor die Darmmotilität und wirkt hemmend auf die Chlorid-abhängige Wassersekretion [69, 70]. Des Weiteren zeigen TGR5-*Knockout*-Mäuse eine veränderte Verteilung bzw. Reifung der schleimproduzierenden Zellen sowie eine Störung der *Tight Junctions* im Colon, welches eine erhöhte Permeabilität der Colonwand bedingt [128]. Neben diesen Einflüssen auf die Leitsymptomatik der Colitis Ulcerosa, kann TGR5 auch eine Rolle in der chronischen Entzündung selbst spielen. Bei der Colitis Ulcerosa besteht eine chronische Aktivierung des Immunsystems mit einem Ungleichgewicht zugunsten von proinflammatorischen Zytokinen, wobei vor allem Makrophagen die Hauptregulatoren der Zytokin-Produktion im Gastrointestinaltrakt sind [129]. TGR5 vermittelt in Makrophagen eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen und kann somit der chronischen Entzündung des Darms entgegenwirken [61]. Der Zusammenhang zwischen der PSC und der Colitis Ulcerosa ist weitestgehend unbekannt [82]. In dieser Arbeit konnte eine verminderte TGR5-Expression in den Gallengängen von PSC-Patienten nachgewiesen werden. Zur weiteren Klärung eines Zusammenhangs zwischen der

PSC und der Colitis Ulcerosa wäre eine nähere Betrachtung von TGR5 in den TGR5-exprimierenden Zellen des Darms interessant. Eine Herabregulation in diesen Zellen könnte eine Förderung der chronischen Inflammation sowie eine erhöhte Permeabilität des Kolons hervorrufen. Damit würde eine verminderte TGR5-Expression im Darm die Symptomatik einer Colitis Ulcerosa begünstigen.

Abschließend bleibt unklar, ob die verminderte TGR5-Expression in den Gallengängen von PSC-Patienten eine Folge oder eine Ursache der Erkrankung ist. Dahingehend wurden weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit getätigt.

5.2 Regulation des TGR5-Rezeptors

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Regulationsmechanismus hinter der verminderten TGR5-Proteinmenge in PSC-erkrankten Lebern näher untersucht werden. Diesbezüglich wurden differenzierte humane Makrophagen sowie Cholangiozyten der Zelllinie H69 mit Gallensäuren, Zytokinen, Vitamin-D-Derivaten sowie mit Agonisten der nukleären Gallensäurenrezeptoren stimuliert. Die TGR5-mRNA-Expression wurde anschließend mittels semi-quantitativer *Realtime*-PCR bestimmt. Ergänzend wurde in der eigenen Arbeitsgruppe humane biliäre Organotide etabliert und mit Il-8 stimuliert.

5.2.1 Regulation des TGR5-Rezeptors in humanen differenzierten Makrophagen

Erste Versuche erfolgten zunächst mit differenzierten humanen Makrophagen. Diese zeichnen sich durch eine vermehrte TGR5-Expression aus und werden als maßgeblicher Bestandteil in der Genese der PSC gesehen [61, 130].

5.2.1.1 Regulation der TGR5-mRNA-Expression durch Gallensäuren

Der TGR5-Rezeptor wird hauptsächlich durch Gallensäuren aktiviert. Dabei zeigen vor allem hydrophobe Gallensäuren sowie Taurin-konjugierte Derivate eine hohe Potenz. TLC bildet den stärksten endogenen Agonisten [38]. Erste Versuche der eigenen Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass eine Stimulation von humanen Makrophagen mit TLC keinen Effekt auf die TGR5-mRNA-Expression hat. Diese Daten wurden im Rahmen der Promotion von Lina Spomer veröffentlicht [2]. Weiterführend erfolgte in dieser Arbeit die Untersuchung mit den primären Gallensäuren GCDC sowie TCDC, da diese entgegengesetzt zu den sekundären Gallensäuren im Serum von PSC Patienten erhöht sind [131]. Außerdem wurden die humanen Makrophagen mit der sekundären Gallensäure TDC stimuliert. Während sich für TCDC keine signifikante Änderung der mRNA-Expression nachweisen ließ, zeigte sich eine Hochregulation der TGR5-mRNA nach einer Inkubation mit TDC nach zwölf bzw. 24 Stunden sowie GCDC nach 24 Stunden.

Näher betrachtet wurde zudem der Effekt einer Stimulation der humanen Makrophagen mit der therapeutisch eingesetzten Gallensäure UDCA in seiner Taurin-konjugierten Variante in verschiedenen Konzentrationen. UDCA ist wegen seiner choloretischen, antiinflammatorischen und antiapoptotischen Effekte in der Behandlung der chronischen Gallenwegserkrankung PBC indiziert [106]. Der genaue Wirkmechanismus ist aktuell noch unklar. Im Hinblick auf die entstehenden Effekte ist eine Vermittlung über TGR5 allerdings denkbar, der ähnliche Wirkungen in der Leber erzielen kann [41, 54, 60]. Die Stimulation mit dieser Gallensäure wurde mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt, da sie je nach Substitution unter-

schiedliche Konzentrationen im Serum der Patienten erreicht. Durch eine orale UDCA-Dauertherapie in mittlerer Dosierung kann zum Beispiel eine ca. 30-fache Erhöhung von UDCA im Serum bei PBC-Patienten und Patientinnen festgestellt werden [132]. Hinsichtlich der PSC wurde mit einer Therapie in niedrigen und mittleren Dosierungen zwar ein Rückgang der Cholestaseparameter beobachtet, ein Überlebensvorteil ergab sich allerdings nicht [15, 108]. Eine Hochdosis-Gabe (28-30 mg/kg/Tag) führte hingegen zu einem schnelleren Progress der Erkrankung mit frühzeitiger Lebertransplantation beziehungsweise zu einem Versterben der Patienten. Darüber hinaus entwickelten die behandelten Patienten eher kolorektale Dysplasien sowie Tumore [107, 109]. Ursächlich diskutiert wird ein vermehrter Anfall von UDCA im Darm und folglich eine vermehrte bakterielle Umwandlung zur zytotoxischen Gallensäure LCA [133]. In dieser Arbeit konnte eine UDCA-Konzentrationsänderung bei der Stimulation von humanen Makrophagen in den beobachteten Zeitpunkten keine Änderung der TGR5-mRNA-Expression zeigen. Eine veränderte TGR5-Expression bei erhöhten UDCA-Spiegeln scheint also nicht ursächlich für die beobachteten Effekte zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TDC und GCDC nach einzelnen Inkubationszeiten eine geringe Hochregulation der TGR5-mRNA-Menge bewirkten. Dies würde zu der von Chen und Kollegen beschriebenen TGR5-Hochregulation in CD68⁺CD206⁺ Makrophagen in PSC-Lebergewebe passen [126]. Die molekularen Mechanismen der TGR5-Hochregulation in Makrophagen sind jedoch noch unklar. Auch ist unklar, ob höhere Gallensäurekonzentrationen als in der vorliegenden Arbeit gewählt, zu einer stabileren und stärkeren Induktion der TGR5-mRNA-Expression führen können. Postprandial können im portalvenösen Blut von gesunden Probanden ähnlich hohe Gallensäurekonzentrationen erreicht werden, wie sie in dieser Arbeit zur Stimulation der Makrophagen verwendet wurden [134]. Daten zu Gallensäurekonzentrationen im portalvenösen Blut von PSC-Patienten sind noch nicht erhoben. Ergebnisse aus peripheren Blutseren von PSC-Patienten lassen allerdings darauf schließen, dass im portalvenösen Blut deutlich höhere Gallensäurekonzentrationen entstehen können als in dieser Arbeit verwendet wurden. Eine Regulation der TGR5-mRNA-Expression nach Stimulation mit höheren Gallensäuren-Konzentrationen wäre daher in Makrophagen denkbar. Allerdings zeigte sich bei ersten Versuchen keine signifikante Änderung der TGR5-mRNA-Expression.

5.2.1.2 Regulation der TGR5-mRNA-Expression durch Zytokine

In dieser Arbeit wurde zudem der Einfluss der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Il-1 β sowie Il-8 auf die TGR5-mRNA-Expression in differenzierten Makrophagen näher untersucht.

Die PSC ist durch eine chronische Entzündung der Gallengänge mit folgender periduktaler Fibrose gekennzeichnet. Dabei kommt es zu einer periportalen Infiltration von T-Lymphozyten, welche in der PSC vor allem TNF- α sowie Il-1 β sezernieren [135]. Hier kann bereits in den frühen PSC-Stadien eine erhöhte TNF- α -Konzentration im Serum detektiert werden [135, 136]. Darüber hinaus zeigt sich eine hoch signifikante Zunahme der Il-8-Konzentration vor allem in der Galle von PSC-Patienten [137]. Dies könnte über eine gesteigerte Il-8-Produktion durch seneszente Cholangiozyten erklärt werden [138]. TNF- α und Il-1 β konnten hingegen in der Galle nicht nachgewiesen werden [137]. Interessanterweise korreliert die Höhe der Il-8-Konzentration im Serum und der Galle von PSC-Erkrankten unabhängig vom Alter und Krankheitsdauer mit dem transplantations-freien Überleben. Je niedriger der Il-8-Spiegel war, desto länger war das transplantations-freie Überleben [139].

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass eine Stimulation von humanen Makrophagen mit TNF- α und Il-1 β zu einer verminderten TGR5-mRNA-Expression führt. Dabei konnte eine signifikante TGR5-Reduktion nach TNF- α -Stimulation nach allen untersuchten Inkubationszeiträumen (12h, 24h und 72h) nachgewiesen werden. Der Effekt nach Il-1 β -Stimulierung war mit zunehmender Inkubationszeit hingegen abnehmend. Nach der Stimulation der differenzierten Makrophagen mit Il-8 konnte zu keinem Zeitpunkt eine Änderung der TGR5-mRNA-Expression detektiert werden.

Während die untersuchten Zytokine (TNF- α und Il-1 β) einen hemmenden Einfluss auf die TGR5-mRNA-Expression in Makrophagen ausüben, hat TGR5 wiederum einen inhibitorischen Effekt auf die Zytokin-Synthese in Makrophagen. Nach Stimulation des TGR5-Rezeptors in Kupffer-Zellen kommt es zu einer verminderten Synthese der Zytokine Il-1 β und TNF- α [64]. Il-8 wurde in dieser Studie nicht näher untersucht. Allerdings konnte in isolierten Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit dem TGR5-Agonisten LCA eine verminderte Il-8-Produktion gezeigt werden [38]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass TGR5 auch auf Il-8 eine supprimierende Wirkung hat.

Zusammenfassend kommt es bei der PSC zu erhöhten Serumkonzentrationen der Zytokine Il-1 β und TNF- α , welche zu einer Supprimierung der TGR5-mRNA-Expression in Makrophagen führen [135]. Dadurch kann sich der inhibitorische Effekt von TGR5 auf die Zytokinproduktion in Makrophagen weniger stark ausbilden. Es entsteht somit ein Teufelskreis, der die progrediente periduktale Inflammation bei der PSC erklären könnte. Ob die erhöhten Gallen-

säuren die Zytokin-induzierte Herunterregulation verhindern können, ist unklar. Ob es in Folge der Reduktion der mRNA zu einer Herunterregulation der TGR5-Proteinmenge kommt, ist ebenfalls noch ungeklärt.

5.2.1.3 Regulation der TGR5-mRNA-Expression durch Agonisten von nukleären Gallensäurenrezeptoren

Teil dieser Arbeit war es zudem den Einfluss von Agonisten der nukleären Gallensäurenrezeptoren VDR, FXR und PXR auf die TGR5-mRNA-Expression näher zu untersuchen. Dabei sollten mögliche Beziehungen der nukleären Gallensäurerezeptoren zu TGR5 aufgezeigt werden.

Regulation durch FXR-Agonisten (Obeticholsäure)

Der FXR wird hauptsächlich im Darm sowie in der Leber exprimiert. Darüber hinaus ist er auch in Makrophagen zu finden [140]. Dabei ist er ein zentraler Regulator der Synthese, des Transports sowie des Stoffwechsels von Gallensäuren [10].

In dieser Arbeit erfolgte die Stimulation der humanen Makrophagen mit Obeticholsäure (OCA). OCA ist eine modifizierte Gallensäure und ein selektiver FXR-Agonist [141]. Seit Dezember 2016 ist OCA zudem in der Behandlung der PBC zugelassen. Nach den aktuellen PBC-Leitlinien wird eine Kombinationstherapie aus OCA und UDCA empfohlen, wenn eine UDCA-Intoleranz oder ein mangelndes Ansprechen auf eine UDCA-Monotherapie besteht [124]. Allerdings folgte der Leitlinie ein roter Handbrief zur OCA-Gabe bei PBC-Patienten mit mittelschwerer bis schwerer Einschränkung der Leberfunktion. Der Hintergrund war das gehäufte Auftreten von teils schwerwiegenden, leberbedingten Komplikationen in dieser Patientengruppe, wenn eine höhere OCA-Dosis als empfohlen eingenommen wurde. Daher wird zu einer Dosisanpassung je nach Child-Pugh-Stadium sowie zu regelmäßigen Kontrollen der Leberparameter gemahnt [142].

Hinsichtlich einer OCA-Gabe in der Behandlung der PSC ist bereits eine randomisierte, doppelblinde, plazebo-kontrollierte Phase-2-Studie (AESOP) abgeschlossen. Dort konnte durch eine Kombinationstherapie aus OCA und UDCA eine signifikante Reduktion der alkalischen Phosphatase erzielt werden, wobei eine OCA-Monotherapie zu einer stärkeren Reduktion führte. Dieser 24-wöchigen Studie folgt eine Studie, welche für weitere 2 Jahre angesetzt und aktuell noch nicht abgeschlossen ist [143].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass OCA keinen Einfluss auf die TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nimmt. Ebenso zeigten andere Gallensäuren wie CDCA, die ebenfalls starke FXR-Agonisten sind, keinen Einfluss auf die TGR5-mRNA-Expression [144]. In einer Studie konnte entgegen dieser Ergebnisse gezeigt werden, dass

FXR im Darm von Mäusen eine TGR5-Gen-Expression induzieren kann. Eine orale Fütterung der Mäuse mit OCA sowie dem dualen TGR5- und FXR-Agonisten INT-767 führte dabei zu einem signifikanten Anstieg der TGR5-mRNA-Expression im Ileum. Weiterführend konnte zudem eine FXR-abhängige Region auf dem TGR5-Promotor identifiziert werden, welche eine *Conserved DNA Sequence* darstellt und somit vermutlich ebenso in menschlichen Darmzellen zu finden ist. Die Diskrepanz zwischen dieser Studie und den hier präsentierten Ergebnissen könnte dadurch bedingt sein, dass OCA im Vergleich zu INT-767 einen schwächeren FXR-Agonisten darstellt [141]. Ebenso ist eine fehlende Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelltypen wie humane Makrophagen denkbar. Letzteres erscheint wahrscheinlich, da in der vorliegenden Arbeit eine Zelltyp-spezifische Regulation von TGR5 nachgewiesen werden konnte. Weitere Versuche mit einer Stimulation von humanen Makrophagen mit INT-767 wären notwendig.

Regulation durch Agonisten des Vitamin-D-Rezeptors

Weiterführend wurde der Einfluss von Vitamin D und seinen Vorläufern auf die mRNA-Expression von TGR5 untersucht. 1α -25(OH)₂-Cholecalciferol wird im klinischen Alltag zur Behandlung der PSC eingesetzt. Durch die chronische Cholestase kommt es zu einer verminderten Aufnahme fettlöslicher Vitamine, so dass gehäuft ein Vitamin-D-Mangel bei PSC-Patienten und Patientinnen entsteht [145, 146]. Dabei korreliert der Mangel mit dem Stadium der Erkrankung [146]. Eine Substitution ist in den aktuellen Leitlinien vor allem im Hinblick auf das erhöhte Osteoporose-Risiko empfohlen [124, 145]. Auch über die Osteoporoseprophylaxe hinaus werden Vitamin D und seinem Rezeptor VDR therapeutisches Potential und eine Rolle in der Entstehung von cholestatischen Lebererkrankungen zugeschrieben. Ähnlich wie TGR5 wird VDR in der Leber vor allem in Cholangiozyten, Sinusendothel- und Kupffer-Zellen exprimiert, wodurch allein räumlich ein Kontakt zur Cholestase hergestellt werden kann [27]. Neben seinem Hauptliganden 1α -25(OH)₂-Cholecalciferol kann VDR auch von dem potentesten TGR5-Agonisten LCA aktiviert werden [16]. Nach einer LCA-Aktivierung kommt es zu einem Abbau eben dieser Gallensäure. Bei einer Hochdosis-UDCA-Therapie konnte ein gehäuftes Auftreten von kolorektalen Dysplasien bei PSC-Patienten detektiert werden [107, 109]. Ursächlich könnte dafür eine vermehrte Umwandlung von UDCA im Darm in die zytotoxische und prokarzinogene Gallensäure LCA sein [133]. Eine Vitamin-D-Gabe könnte hier somit protektiv für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms sein. Weiterführend zeigt VDR immunmodulierende Wirkungen und könnte darüber bei Autoimmunerkrankungen schützend wirken [147]. In den peripheren Blutmakrophagen von PSC-Erkrankten konnten eine verminderte VDR-Expression nachgewiesen werden, was einen

möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese cholestatischer Lebererkrankungen unterstreicht [49].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von humanen Makrophagen mit dem stärksten VDR-Agonisten $1\alpha,25(\text{OH})_2$ – Vitamin D₃ eine signifikant verminderte TGR5-mRNA-Expression zur Folge hat. Allerdings zeigte die Stimulation mit den Vitamin-D-Vorstufen keine Effekte. Vitamin D kann somit als mögliches Medikament zur Vermittlung protektiver, choleretischer und antiinflammatorischer Effekte über TGR5 nicht in Erwägung gezogen werden. Im Hinblick auf die Herabregulation des TGR5-Rezeptors ist Vitamin D zudem zur Behandlung von cholestatischen Lebererkrankungen nicht zu empfehlen. Ob diese Effekte über den nukleären Rezeptor VDR selbst vermittelt werden ist unklar und könnte Teil weiterer Forschung sein.

Regulation durch PXR-Agonisten

Weiterführend wurde zudem der Einfluss der PXR-Agonisten Rifampicin, Mifepriston sowie Dexamethason auf die TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen näher betrachtet. PXR reguliert in der Leber die Expression von Genen, welche die Entgiftung körpereigener sowie –fremder Substanzen vermitteln. Dabei ist PXR auch an der Detoxifikation von Gallensäuren beteiligt und inhibiert die NF- κ B-induzierte Inflammation in der Leber [30, 148]. Die höchste PXR-Expression findet sich in der Leber sowie im Darm [149]. Darüber hinaus konnte PXR auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Nagetieren nachgewiesen werden [150]. PXR bildet daher ein interessantes Ziel in der Behandlung von cholestatischen Erkrankungen wie der PSC.

Der PXR-Agonist Rifampicin wird nach der aktuellen Leitlinie zur Behandlung des cholestatischen Juckreizes bei der PBC/PSC eingesetzt [124]. Eine Verbesserung der Cholestaseparameter kann allerdings in der Therapie mit Rifaximin, welches wie Rifampicin ein Rifamycin-Derivat darstellt, nicht erzielt werden [151]. Auch mit Hinblick auf die mögliche Hepatotoxizität des Medikaments besteht daher aktuell keine Indikation von Rifampicin in der PSC-Therapie außerhalb der Behandlung des Juckreizes [124, 148]. Der Mechanismus, welcher zur Reduktion des Pruritus führt ist aktuell unklar [124, 152]. Juckreiz wird bei cholestatischen Lebererkrankungen unter anderem durch TGR5 vermittelt. TGR5 konnte in dermalen Makrophagen sowie in den Spinalganglienzellen von Mäusen nachgewiesen werden, welche für die Weiterleitung von Pruritus und Schmerzreiz zuständig sind. Gallensäuren sowie TGR5-Agonisten induzieren eine vermehrte Aktivität eben dieser Neurone. Nach der subkutanen Gallensäuren-Injektion konnte zudem bei TGR5-überexprimierenden Mäusen ein verstärktes Kratzverhalten nachgewiesen werden, während es bei TGR5^{-/-}-Mäusen reduziert war [153]. In

dieser Arbeit konnte nun eine signifikante Abnahme der TGR5-mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach der Stimulation von Rifampicin nachgewiesen werden. Rifampicin könnte also über die Herabregulation von TGR5 in Spinalganglien sowie dermalen Makrophagen eine Verringerung des Juckreizes bei cholestatischen Erkrankungen vermitteln.

Mifepriston (RU 486) ist von den synthetisch hergestellten Liganden einer der potentesten PXR-Aktivatoren [28]. Darüber hinaus ist Mifepriston bei einer hohen Affinität zum Progesteron-Rezeptor ein kompetitiver Progesteron-Antagonist und wird in dieser Funktion zur Induktion eines Schwangerschaftsabbruchs eingesetzt [100]. Für Progesteron sowie für verschiedene Progesteronmetabolite (PM) konnte bereits ein agonistischer Effekt am TGR5-Rezeptor nachgewiesen werden [113]. Mifepriston wurde als potentieller TGR5-Ligand bisher nicht getestet. Weiterführend konnte in humanen Blutmakrophagen nach der Stimulation mit PM4 sowie PM5 eine signifikante Herabregulation der TGR5-mRNA-Menge gezeigt werden [113]. In dieser Arbeit konnte zudem ein supprimierender Effekt auf die TGR5-mRNA-Expression nach Stimulation der Makrophagen mit Mifepriston nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen PM sowie der Entstehung einer Cholestase wird vor allem im Rahmen der intrahepatischen Schwangerschaftscholestase diskutiert. Hinsichtlich der Pathogenese sowie der Behandlungsoptionen der PSC spielt Mifepriston sowie andere PM wohl eine eher untergeordnete Rolle.

Eine Behandlung der PSC mit Kortikosteroiden wie Dexamethason führt zwar zu einem signifikanten Abfall der Cholestase-Parameter, bietet allerdings keinen Vorteil im Hinblick auf die Fibroseprogression sowie dem Erreichen von harten Endpunkten. Es besteht daher bei vermehrtem Auftreten von Cortison-bedingten Nebenwirkungen aktuell keine Therapieempfehlung [124]. Dexamethason wirkt lediglich in höheren Konzentrationen ($>10 \mu\text{M}$) als direkter PXR-Agonist und induziert darüber eine verstärkte Expression PXR-abhängiger Gene. In niedrigeren Dosierungen hingegen vermittelt Dexamethason über eine Aktivierung des Glukokortikoid-Rezeptors eine vermehrte Expression von PXR selbst [154]. In dieser Arbeit wurden die humanen Makrophagen mit einer geringen Dexamethason-Konzentration (100 nM) stimuliert. Somit ist keine direkt agonistische Wirkung von Dexamethason am PXR zu erwarten. Hierunter konnte lediglich eine nicht signifikante Abnahme der TGR5-mRNA-Expression beobachtet werden. Ein deutlicherer Effekt nach Stimulation mit einer höheren Dexamethason-Dosierung und folgend einer direkten PXR-Aktivierung wäre denkbar.

Letztlich bleibt der Regulationsmechanismus, welcher zu einer Herabregulation der TGR5-mRNA-Expression nach Stimulation von PXR-Agonisten führt, unklar. Eine direkte TGR5-Gen-Beeinflussung durch PXR wäre denkbar, da alle betrachteten PXR-Agonisten zu einer Herabregulation der TGR5-mRNA führten.

5.2.2 Regulation des TGR5-Rezeptors in Cholangiozyten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in humanen Makrophagen nach der Stimulation mit Zytokinen sowie verschiedenen Agonisten der nukleären Gallensäurenrezeptoren eine verminderte TGR5-mRNA-Menge nachzuweisen ist. Weiterführend wurde der Einfluss von Gallensäuren, Zytokinen (IL-8, IL-1 β , TNF- α) sowie 1 α ,25 (OH) $_2$ -Vitamin D $_3$ auf die mRNA-Expression in Cholangiozyten untersucht. Verwendet wurde hierfür die Cholangiozyten-Zelllinie H69.

Nach Stimulation der Cholangiozytenzelllinie H69 mit Gallensäuren konnte keine Änderung der TGR5-mRNA-Expression beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Versuchen mit den humanen Makrophagen zeigte sich kein Effekt nach der Stimulation mit TNF- α /IL-1 β sowie Vitamin D. Es konnte also nach keiner Inkubationszeit und bei keiner Stimulationssubstanz eine Änderung der TGR5-mRNA in den Cholangiozyten der Zelllinie H69 gesehen werden.

Dies deutet auf eine Zelltyp-spezifische Regulation der TGR5-mRNA-Expression hin. Bei multilokulärer TGR5-Expression (u.a. Plazenta, Leber, Zellen des Immunsystems, Darm, Milz) mit unterschiedlichsten Milieus ist diese Annahme wahrscheinlich [38]. So kann bei Ratten in den ortständigen Makrophagen der Leber nach einer Gallengangsligatur eine Hochregulation des TGR5-Proteins beobachtet werden, während in den Sinusendothelzellen eine unveränderte TGR5-Expression vorlag [61]. Diese unterschiedlichen Effekte wären über eine veränderte Rezeptorempfindlichkeit oder einer Vermittlung über einen anderen Signalweg möglich. Dahingehend sind die ortständigen Makrophagen der Leber im Vergleich zu den Cholangiozyten weit geringeren Gallensäurekonzentrationen ausgesetzt, was eine geänderte Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber Gallensäuren wahrscheinlich macht [155]. Weiterführend kann TGR5 in den verschiedenen Zellen über unterschiedliche Signalwege eine Proliferation der Zelle vermitteln. Während zum Beispiel in gastralen Adenokarzinom-Zellen die Proliferation der Zelle über die Kopplung an die stimulierende G-Protein-Untereinheit G α_s und folgender Aktivierung des EGF-Rezeptors vermittelt werden kann, ist in Ösophaguskarzinom-Zellen eine Bindung von TGR5 an die G-Protein-Untereinheit G $_q$ zu beobachten. Dort wird der proliferative Effekt über die gesteigerte Expression von NOX5-S und die Produktion von Prostaglandin E2 induziert [75-77].

Neben einer unterschiedlichen Effektvermittlung von TGR5 in den verschiedenen Zelltypen, ist auch innerhalb der Cholangiozyten selbst eine differenzierte Effektausübung zu beobachten. Bereits die Lokalisation von TGR5 in verschiedenen Zellkompartimenten der Cholangiozyten lässt vermuten, dass TGR5 innerhalb einer Zelle verschiedene Aufgaben wahrnimmt

[46, 47]. Exemplarisch zeigen sich unterschiedliche TGR5-medierte Effekte in Abhängigkeit des Vorhandenseins eines primären Ziliums. Während in Cholangiozyten ohne ein primäres Zilium nach TGR5-Aktivierung eine Proliferation zu beobachten ist, wird diese in zilientragenden Zellen gehemmt. Dies ist ebenfalls auf einen unterschiedlichen Signalweg zurückzuführen. In zilien-losen Zellen zeigt sich vor allem eine Bindung von TGR5 an die $G\alpha_s$ -Untereinheit, welche die Adenylatzyklase stimuliert. Entgegengesetzt konnte in zilientragenden Zellen eine vermehrte Kopplung mit der $G\alpha_i$ -Untereinheit gesehen werden, welche die Adenylatzyklase inhibiert [46]. An diesen Beispielen soll verdeutlicht werden, dass die TGR5-Effektausübung in Cholangiozyten komplex ist und bereits zwischen den einzelnen Cholangiozyten variieren kann.

Retrospektiv wurden die möglichen Effekte von Gallensäuren, Zytokinen und Vitamin-D-Derivaten auf die TGR5-mRNA-Expression in Cholangiozyten in dem verwendeten Versuchsaufbau sowie in der Auswahl der Cholangiozytenzellreihe H69 vermutlich nicht richtig erfasst. Die Ergebnisse hinsichtlich IL-8 stehen im Gegensatz zu anderen, nachfolgenden Versuchen mit primären murinen und humanen Cholangiozyten in der eigenen Arbeitsgruppe. So konnte nach Stimulation mit IL-8 in humanen biliären Organoiden, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Herabregulation der TGR5-mRNA und in primären humanen Cholangiozyten der TGR5-Protein Menge beobachtet werden. Zusätzlich fand sich auch eine signifikante Reduktion der TGR5-mRNA Menge in murinen Cholangiozyten nach Stimulation mit IL-8 Homologen [119]. Ein Grund könnte die niedrigere TGR5-Expression in Cholangiozyten der Zelllinie H69 im Vergleich zu primären Cholangiozyten sein. Da neben der mRNA-Expression von TGR5 nur die der HPRT-1 und keines weiteren, durch IL-8 regulierten Gens bestimmt wurde, ist eine Aussage zur Effektivität des eingesetzten IL-8 sowie der gewählten Dosierung in den H69 Zellen nicht möglich. Eine Wiederholung der Versuche mit der Cholangiozytenreihe H69 und einer Stimulation mit IL-8 sowie Analyse weiterer IL-8 regulierter Gene könnte hier weiteren Aufschluss geben.

Weiterführend können Zellversuche meist nicht die Komplexität einer Erkrankung mit der Interaktion verschiedener Stoffe und Zellarten abbilden. Als Beispiel seien die Versuche mit $Abcb4^{-/-}$ -Mäusen genannt. $Abcb4^{-/-}$ -Mäuse entwickeln eine intrahepatische Cholestase mit einer progredienten Leberfibrose und dienen daher als Maus-Modell für die PSC [156]. In diesen Mäusen konnte eine verminderte Expression von TGR5 in den murinen Gallengängen analog den Befunden in den humanen PSC-Leberbiopsen beobachtet werden [119]. Entgegengesetzt konnte keine Änderung der TGR5-Expression in *in vitro* kultivierten Cholangiozyten aus $Abcb4^{-/-}$ -Mäusen gesehen werden. Das deutet daraufhin, dass die TGR5-Regulation durch das intrahepatische, periduktale Mikromilieu hervorgerufen wird und nicht durch die

Deletion von Abcb4. Dieses Mikromilieu kann in einer einzelnen Zellkultur mit getrennter Stimulation von Stoffen nicht ausreichend simuliert werden. Weiterführend bietet der gewählte Versuchsaufbau keine Möglichkeit zur Untersuchung eines möglichen Krankheitsverlaufs. Passend zu diesen Überlegungen entwickeln Cholangiozyten in der PSC einen geänderten Phänotyp. Dieser Phänotyp ist charakterisiert durch eine geringere Proliferationsrate, eine vermehrte Sekretion von u.a. Il-6, Il-8 und TGF- β sowie die Expression von Markern, die auf eine zelluläre Seneszenz hinweisen [91]. Zelluläre Seneszenz ist das Stadium einer Zelle, in der sie sich in einem dauerhaften Zellzyklus-Arrest befindet und einen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) annehmen kann. Dieser Phänotyp ist durch die vermehrte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen entzündungsfördernd und kann Entzündungszellen ins Gewebe rekrutieren [157]. Der aktivierte Cholangiozyten-Phänotyp, wie er in der PSC vorkommt, exprimiert Marker für SASP [91]. Daher wirkt er in der Leber aggravierend auf die Schädigungen der Gallengänge und beeinträchtigt die Leberregeneration. Des Weiteren können seneszente Cholangiozyten in den umliegenden Cholangiozyten ebenfalls Seneszenz induzieren und somit weiter negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen [157]. Eine Seneszenz kann in Cholangiozyten sowohl durch exogene als auch endogene Stoffe hervorgerufen werden. Dabei kann ein Übergang in eine seneszente Form durch die Stimulation mit Bakterien-assoziierten Stoffen wie Lipopolysaccharide erreicht werden. Die Stimulation mit den Gallensäuren DCA und LCA löste hingegen keine Seneszenz aus [138].

In dem gewählten Versuchsaufbau mit der humanen Cholangiozyten-Zelllinie H69 konnte die Komplexität der Erkrankung und der Übergang in den seneszenten Cholangiozytenphänotyp nicht ausreichend simuliert werden. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieser Probleme konnten Organoide bieten. Organoide sind dreidimensionale, organähnliche Zellverbände [158]. Im Anschluss an die Zellversuche mit der Cholangiozyten-Zelllinie H69 wurde daher durch Kathleen Deutschmann und Katharina Ebener ein humanes biliäres Organoid-Modell etabliert. Hier konnte nach Stimulation mit Il-8 eine Herabregulation der TGR5-mRNA-Menge gesehen werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Versuchen mit murinen Cholangiozyten [119]. Il-8 ist besonders in der Galle von PSC-Patienten erhöht und stellt einen prognostisch ungünstigen Parameter dar [137, 139]. Die schlechtere Prognose im PSC-Krankheitsverlauf bei hohen Il-8-Spiegeln könnte durch die Herabregulation von TGR5 und der abgeschwächten TGR5-vermittelten, protektiven Effekte erklärt werden. Letztlich ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch andere Faktoren, zum Beispiel die Seneszenz selbst, zu einer Herabregulation von TGR5 beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Reich, M., et al., *Downregulation of TGR5 (GPBAR1) in biliary epithelial cells contributes to the pathogenesis of sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2021. **75**(3): p. 634-646.
2. Spomer, L., *Bedeutung des Gallensalzrezeptors TGR5 (Gpbar-1) bei cholestatischen Lebererkrankungen*, in *Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie*. 2013, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. p. 139.
3. Esteller, A., *Physiology of bile secretion*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5641-9.
4. Hofmann, A.F., *The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease*. Arch Intern Med, 1999. **159**(22): p. 2647-58.
5. Hofmann, A.F., *Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly*. News Physiol Sci, 1999. **14**: p. 24-29.
6. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, *Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(16): p. 2461-83.
7. Kuntz, E. and H.-D. Kuntz, *Hepatology : principles and practice : history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy*. 3rd ed. 2008, Heidelberg ;: Springer. XX, 937.
8. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 137-74.
9. Fromm, H., et al., *Metabolism in man of 7-ketolithocholic acid: precursor of cheno- and ursodeoxycholic acids*. Am J Physiol, 1980. **239**(3): p. G161-6.
10. Keitel, V., R. Kubitz, and D. Haussinger, *Endocrine and paracrine role of bile acids*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5620-9.
11. Vitek, L. and M. Haluzik, *The role of bile acids in metabolic regulation*. J Endocrinol, 2016. **228**(3): p. R85-96.
12. Fan, M., et al., *Bile acid signaling and liver regeneration*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1849**(2): p. 196-200.
13. Gutt, C., et al., *[Updated S3-Guideline for Prophylaxis, Diagnosis and Treatment of Gallstones. German Society for Digestive and Metabolic Diseases (DGVS) and German Society for Surgery of the Alimentary Tract (DGAV) - AWMF Registry 021/008]*. Z Gastroenterol, 2018. **56**(8): p. 912-966.
14. Calmus, Y. and R. Poupon, *Shaping macrophages function and innate immunity by bile acids: mechanisms and implication in cholestatic liver diseases*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2014. **38**(5): p. 550-6.
15. European Association for the Study of the L., *EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases*. J Hepatol, 2009. **51**(2): p. 237-67.
16. Makishima, M., et al., *Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1313-6.
17. Hylemon, P.B., et al., *Bile acids as regulatory molecules*. J Lipid Res, 2009. **50**(8): p. 1509-20.
18. Häussinger, D., V. Keitel, and R. Kubitz, *Hepatobiliary transport in health and disease*. 2012, Berlin ; Boston: De Gruyter. xix, 292 p.
19. Rizzo, G., et al., *Role of FXR in regulating bile acid homeostasis and relevance for human diseases*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2005. **5**(3): p. 289-303.
20. Sinal, C.J., et al., *Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis*. Cell, 2000. **102**(6): p. 731-44.
21. Goodwin, B., et al., *A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 517-26.
22. Claudel, T., B. Staels, and F. Kuipers, *The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(10): p. 2020-30.
23. Landrier, J.F., et al., *The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(3): p. G476-85.
24. Gnerre, C., et al., *Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(10): p. 635-45.
25. Song, C.S., et al., *Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42549-56.
26. Barbier, O., et al., *FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1926-40.
27. Gascon-Barre, M., et al., *The normal liver harbors the vitamin D nuclear receptor in nonparenchymal and biliary epithelial cells*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1034-42.
28. Lehmann, J.M., et al., *The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(5): p. 1016-1023.
29. Zhang, J., et al., *The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49517-22.

30. Gonzalez-Sanchez, E., et al., *Nuclear receptors in acute and chronic cholestasis*. Dig Dis, 2015. **33**(3): p. 357-66.
31. Xie, W., et al., *An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3375-80.
32. Sommerfeld, A., R. Reinehr, and D. Haussinger, *Tauroursodeoxycholate Protects Rat Hepatocytes from Bile Acid-Induced Apoptosis via beta1-Integrin- and Protein Kinase A-Dependent Mechanisms*. Cell Physiol Biochem, 2015. **36**(3): p. 866-83.
33. Nguyen, A. and B. Bouscarel, *Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis*. Cell Signal, 2008. **20**(12): p. 2180-97.
34. Kwong, E., et al., *Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(2): p. 151-7.
35. Studer, E., et al., *Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes*. Hepatology, 2012. **55**(1): p. 267-76.
36. Duboc, H., Y. Tache, and A.F. Hofmann, *The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application*. Dig Liver Dis, 2014. **46**(4): p. 302-12.
37. Maruyama, T., et al., *Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **298**(5): p. 714-9.
38. Kawamata, Y., et al., *A G protein-coupled receptor responsive to bile acids*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9435-40.
39. Sato, H., et al., *Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies*. J Med Chem, 2008. **51**(6): p. 1831-41.
40. Keitel, V., et al., *The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain*. Glia, 2010. **58**(15): p. 1794-805.
41. Keitel, V., et al., *The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 695-704.
42. Keitel, V., et al., *The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders*. Hepatology, 2009. **50**(3): p. 861-70.
43. Keitel, V. and D. Haussinger, *Role of TGR5 (GPBAR1) in Liver Disease*. Semin Liver Dis, 2018. **38**(4): p. 333-339.
44. Keitel, V. and D. Haussinger, *Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012. **36**(5): p. 412-9.
45. Jones, H., G. Alpini, and H. Francis, *Bile acid signaling and biliary functions*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(2): p. 123-8.
46. Masyuk, A.I., et al., *Ciliary subcellular localization of TGR5 determines the cholangiocyte functional response to bile acid signaling*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **304**(11): p. G1013-24.
47. Keitel, V., C. Ullmer, and D. Haussinger, *The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes*. Biol Chem, 2010. **391**(7): p. 785-9.
48. Larusso, N.F. and T.V. Masyuk, *The role of cilia in the regulation of bile flow*. Dig Dis, 2011. **29**(1): p. 6-12.
49. Reich, M., et al., *TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro*. Gut, 2016. **65**(3): p. 487-501.
50. Kuntz, E. and H.D. Kuntz, *Hepatology: Textbook and Atlas*. 2009: Springer Berlin Heidelberg.
51. Beuers, U., L. Maroni, and R.O. Elferink, *The biliary HCO(3)(-) umbrella: experimental evidence revisited*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(3): p. 253-7.
52. Merlen, G., et al., *TGR5-dependent hepatoprotection through the regulation of biliary epithelium barrier function*. Gut, 2020. **69**(1): p. 146-157.
53. Lazaridis, K.N., et al., *Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2714-21.
54. Li, T., et al., *The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling*. Mol Endocrinol, 2011. **25**(6): p. 1066-71.
55. Welsch, U. and J. Sobotta, *Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [online Zugang + interaktive Extras]*. 2006: Elsevier, Urban & Fischer.
56. Poisson, J., et al., *Liver sinusoidal endothelial cells: physiology and role in liver diseases*. J Hepatol, 2016.
57. Theodorakis, N.G., et al., *Role of endothelial nitric oxide synthase in the development of portal hypertension in the carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **297**(4): p. G792-9.
58. Klindt, C., et al., *The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 (Gpbar1) Modulates Endothelin-1 Signaling in Liver*. Cells, 2019. **8**(11).
59. Rubbo, H., et al., *Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives*. J Biol Chem, 1994. **269**(42): p. 26066-75.

60. Reinehr, R., et al., *Bile salt-induced apoptosis involves NADPH oxidase isoform activation*. Gastroenterology, 2005. **129**(6): p. 2009-31.
61. Keitel, V., et al., *Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **372**(1): p. 78-84.
62. Hauser, K., et al., *Duale Reihe Biochemie*. 2012: Thieme.
63. Wang, Y.D., et al., *The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice*. Hepatology, 2011. **54**(4): p. 1421-32.
64. Pols, T.W., et al., *TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading*. Cell Metab, 2011. **14**(6): p. 747-57.
65. Ichikawa, R., et al., *Bile acids induce monocyte differentiation toward interleukin-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway*. Immunology, 2012. **136**(2): p. 153-62.
66. Heufler, C., et al., *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 659-68.
67. Poole, D.P., et al., *Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(7): p. 814-25, e227-8.
68. Alemi, F., et al., *The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice*. Gastroenterology, 2013. **144**(1): p. 145-54.
69. Lund, M.L., et al., *Enterochromaffin 5-HT cells - A major target for GLP-1 and gut microbial metabolites*. Mol Metab, 2018. **11**: p. 70-83.
70. Ward, J.B., M.S. Mroz, and S.J. Keely, *The bile acid receptor, TGR5, regulates basal and cholinergic-induced secretory responses in rat colon*. Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(8): p. 708-11.
71. Potthoff, M.J., et al., *Colesevelam suppresses hepatic glycogenolysis by TGR5-mediated induction of GLP-1 action in DIO mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013. **304**(4): p. G371-80.
72. Hellstrom, P.M., *GLP-1: broadening the incretin concept to involve gut motility*. Regul Pept, 2009. **156**(1-3): p. 9-12.
73. Tuteja, N., *Signaling through G protein coupled receptors*. Plant Signal Behav, 2009. **4**(10): p. 942-7.
74. Deutschmann, K., et al., *Bile acid receptors in the biliary tree: TGR5 in physiology and disease*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018. **1864**(4 Pt B): p. 1319-1325.
75. Yasuda, H., et al., *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, 2007. **354**(1): p. 154-9.
76. Hong, J., et al., *Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma*. Gut, 2010. **59**(2): p. 170-80.
77. Zhou, X., et al., *NADPH oxidase NOX5-S and nuclear factor kappaB1 mediate acid-induced microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(5): p. 978-90.
78. LaRusso, N.F., et al., *Primary sclerosing cholangitis: summary of a workshop*. Hepatology, 2006. **44**(3): p. 746-64.
79. Molodecky, N.A., et al., *Incidence of primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis*. Hepatology, 2011. **53**(5): p. 1590-9.
80. Karlsen, T.H., E. Schrumpf, and K.M. Boberg, *Genetic epidemiology of primary sclerosing cholangitis*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(41): p. 5421-31.
81. Bergquist, A., et al., *Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives*. J Hepatol, 2005. **42**(2): p. 252-6.
82. O'Mahony, C.A. and J.M. Vierling, *Etiopathogenesis of primary sclerosing cholangitis*. Semin Liver Dis, 2006. **26**(1): p. 3-21.
83. Hov, J.R., et al., *Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12403.
84. Sheth, S., et al., *Increased prevalence of CFTR mutations and variants and decreased chloride secretion in primary sclerosing cholangitis*. Hum Genet, 2003. **113**(3): p. 286-92.
85. Henckaerts, L., et al., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene polymorphisms in patients with primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2009. **50**(1): p. 150-7.
86. Pols, T.W., et al., *The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation*. J Hepatol, 2011. **54**(6): p. 1263-72.
87. Terjung, B. and U. Spengler, *Atypical p-ANCA in PSC and AIH: a hint toward a "leaky gut"? Clin Rev Allergy Immunol, 2009. **36**(1): p. 40-51.*
88. Grant, A.J., et al., *Homing of mucosal lymphocytes to the liver in the pathogenesis of hepatic complications of inflammatory bowel disease*. Lancet, 2002. **359**(9301): p. 150-7.
89. Pollheimer, M.J., et al., *Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(6): p. 727-39.
90. O'Hara, S.P., T.H. Karlsen, and N.F. LaRusso, *Cholangiocytes and the environment in primary sclerosing cholangitis: where is the link? Gut, 2017. **66**(11): p. 1873-1877.*

91. Tabibian, J.H., et al., *Characterization of cultured cholangiocytes isolated from livers of patients with primary sclerosing cholangitis*. *Lab Invest*, 2014. **94**(10): p. 1126-33.
92. Karlsen, T.H., *Primary sclerosing cholangitis: 50 years of a gut-liver relationship and still no love?* *Gut*, 2016. **65**(10): p. 1579-81.
93. Kummel, M., et al., *The gut microbial profile in patients with primary sclerosing cholangitis is distinct from patients with ulcerative colitis without biliary disease and healthy controls*. *Gut*, 2017. **66**(4): p. 611-619.
94. Trauner, M., et al., *Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases*. *Wien Med Wochenschr*, 2008. **158**(19-20): p. 542-8.
95. Fickert, P., et al., *Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 261-74.
96. Fickert, P., et al., *Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(2): p. 410-22.
97. Durie, P.R., et al., *Characteristic multiorgan pathology of cystic fibrosis in a long-living cystic fibrosis transmembrane regulator knockout murine model*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(4): p. 1481-93.
98. Bergquist, A., K. Said, and U. Broome, *Changes over a 20-year period in the clinical presentation of primary sclerosing cholangitis in Sweden*. *Scand J Gastroenterol*, 2007. **42**(1): p. 88-93.
99. Tischendorf, J.J., et al., *Characterization, outcome, and prognosis in 273 patients with primary sclerosing cholangitis: A single center study*. *Am J Gastroenterol*, 2007. **102**(1): p. 107-14.
100. Keitel, V., M. Reich, and D. Haussinger, *TGR5: pathogenetic role and/or therapeutic target in fibrosing cholangitis?* *Clin Rev Allergy Immunol*, 2015. **48**(2-3): p. 218-25.
101. Weismuller, T.J., et al., *Patient Age, Sex, and Inflammatory Bowel Disease Phenotype Associate With Course of Primary Sclerosing Cholangitis*. *Gastroenterology*, 2017. **152**(8): p. 1975-1984 e8.
102. Bjornsson, E., et al., *The natural history of small-duct primary sclerosing cholangitis*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(4): p. 975-80.
103. Haseeb, A., et al., *Elevated Serum Bilirubin Level Correlates With the Development of Cholangiocarcinoma, Subsequent Liver Transplantation, and Death in Patients With Primary Sclerosing Cholangitis*. *J Clin Gastroenterol*, 2016. **50**(5): p. 431-5.
104. Barbatis, C., et al., *Histological features of sclerosing cholangitis in patients with chronic ulcerative colitis*. *J Clin Pathol*, 1985. **38**(7): p. 778-83.
105. Ludwig, J., et al., *Morphologic features of chronic hepatitis associated with primary sclerosing cholangitis and chronic ulcerative colitis*. *Hepatology*, 1981. **1**(6): p. 632-40.
106. Paumgartner, G. and U. Beuers, *Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited*. *Hepatology*, 2002. **36**(3): p. 525-31.
107. Chapman, R., et al., *Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis*. *Hepatology*, 2010. **51**(2): p. 660-78.
108. Tabibian, J.H., et al., *Physiology of cholangiocytes*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(1): p. 541-65.
109. Karlsen, T.H., M. Vesterhus, and K.M. Boberg, *Review article: controversies in the management of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **39**(3): p. 282-301.
110. Fickert, P., et al., *norUrsodeoxycholic acid improves cholestasis in primary sclerosing cholangitis*. *J Hepatol*, 2017. **67**(3): p. 549-558.
111. Halilbasic, E., et al., *Therapy of Primary Sclerosing Cholangitis--Today and Tomorrow*. *Dig Dis*, 2015. **33 Suppl 2**: p. 149-63.
112. Grubman, S.A., et al., *Regulation of intracellular pH by immortalized human intrahepatic biliary epithelial cell lines*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(6 Pt 1): p. G1060-70.
113. Keitel, V., et al., *Effect of maternal cholestasis on TGR5 expression in human and rat placenta at term*. *Placenta*, 2013. **34**(9): p. 810-6.
114. Ehrling, C., et al., *Distinct functions of the mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinases MK2 and MK3: MK2 mediates lipopolysaccharide-induced signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation by preventing negative regulatory effects of MK3*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(27): p. 24113-24.
115. Soroka, C.J., et al., *Bile-Derived Organoids From Patients With Primary Sclerosing Cholangitis Recapitulate Their Inflammatory Immune Profile*. *Hepatology*, 2019. **70**(3): p. 871-882.
116. Dheda, K., et al., *Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR*. *Biotechniques*, 2004. **37**(1): p. 112-4, 116, 118-9.
117. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
118. Spomer, L., et al., *The TGR5 protein amount is reduced in patients with primary sclerosing cholangitis (PSC)*. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2015. **53**(12): p. A1_39.
119. Reich, M., et al., *Expression of the bile acid receptor TGR5 in livers of PSC patients and Mdr2-/- (Abcb4-/-) mice*. *Journal of Hepatology*, 2017. **66**(1): p. S555-S556.

120. Spomer, L., et al., *Biliary TGR5 expression is reduced in the course sclerosing cholangitis in humans and mice*. Zeitschrift für Gastroenterologie, 2018. **56**(01): p. A1. 5.
121. Nevens, F., et al., *A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis*. N Engl J Med, 2016. **375**(7): p. 631-43.
122. Kowdley, K.V., et al., *A randomized, placebo-controlled, phase II study of obeticholic acid for primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2020. **73**(1): p. 94-101.
123. Pepe-Mooney, B.J., et al., *Single-Cell Analysis of the Liver Epithelium Reveals Dynamic Heterogeneity and an Essential Role for YAP in Homeostasis and Regeneration*. Cell Stem Cell, 2019. **25**(1): p. 23-38 e8.
124. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, V.-u.S., et al., *[Practice guideline autoimmune liver diseases - AWMF-Reg. No. 021-27]*. Z Gastroenterol, 2017. **55**(11): p. 1135-1226.
125. Reinehr, R. and D. Haussinger, *Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95*. Gastroenterology, 2004. **126**(1): p. 249-62.
126. Chen, Y.Y., et al., *Intrahepatic macrophage populations in the pathophysiology of primary sclerosing cholangitis*. JHEP Rep, 2019. **1**(5): p. 369-376.
127. Vitek, L., *Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(2): p. 476-83.
128. Cipriani, S., et al., *The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25637.
129. Huang, Y. and Z. Chen, *Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity*. Am J Transl Res, 2016. **8**(6): p. 2490-7.
130. Cameron, R.G., L.M. Blendis, and M.G. Neuman, *Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis*. Clin Biochem, 2001. **34**(3): p. 195-201.
131. Trottier, J., et al., *Metabolomic profiling of 17 bile acids in serum from patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: a pilot study*. Dig Liver Dis, 2012. **44**(4): p. 303-10.
132. Poupon, R.E., et al., *Serum bile acids in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid therapy*. Hepatology, 1993. **17**(4): p. 599-604.
133. Sinakos, E., et al., *Bile acid changes after high-dose ursodeoxycholic acid treatment in primary sclerosing cholangitis: Relation to disease progression*. Hepatology, 2010. **52**(1): p. 197-203.
134. Angelin, B., et al., *Hepatic uptake of bile acids in man. Fasting and postprandial concentrations of individual bile acids in portal venous and systemic blood serum*. J Clin Invest, 1982. **70**(4): p. 724-31.
135. Bo, X., et al., *Tumour necrosis factor alpha impairs function of liver derived T lymphocytes and natural killer cells in patients with primary sclerosing cholangitis*. Gut, 2001. **49**(1): p. 131-41.
136. Spengler, U., et al., *T lymphocytes from patients with primary biliary cirrhosis produce reduced amounts of lymphotoxin, tumor necrosis factor and interferon-gamma upon mitogen stimulation*. J Hepatol, 1992. **15**(1-2): p. 129-35.
137. Zweers, S.J., et al., *Elevated interleukin-8 in bile of patients with primary sclerosing cholangitis*. Liver Int, 2016. **36**(9): p. 1370-7.
138. Tabibian, J.H., et al., *Cholangiocyte senescence by way of N-ras activation is a characteristic of primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2263-75.
139. Vesterhus, M., et al., *Novel serum and bile protein markers predict primary sclerosing cholangitis disease severity and prognosis*. J Hepatol, 2017. **66**(6): p. 1214-1222.
140. Fiorucci, S., et al., *Bile Acids Activated Receptors Regulate Innate Immunity*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1853.
141. Pathak, P., et al., *Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 cross-talk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism*. J Biol Chem, 2017. **292**(26): p. 11055-11069.
142. Glässing, A., *Rote-Hand-Brief zu OCALVIA® (Obeticholsäure): Differenzierte Dosierungsempfehlungen von OCALIVA bei Patienten mit primär biliärer Cholangitis (PBC) mit mittelschwerer und schwerer Einschränkung der Leberfunktion*, B.f.A.u. Medizinprodukte, Editor. 2018, Intercept.
143. Kowdley, K.V., *The AESOP trial: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of obeticholic acid in patients with primary sclerosing cholangitis*. Hepatology, 2017: p. 3.
144. Parks, D.J., et al., *Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1365-8.
145. Angulo, P., et al., *Bone disease in patients with primary sclerosing cholangitis*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 180-8.
146. Jorgensen, R.A., et al., *Serum lipid and fat-soluble vitamin levels in primary sclerosing cholangitis*. J Clin Gastroenterol, 1995. **20**(3): p. 215-9.
147. Zuniga, S., et al., *Vitamin D and the vitamin D receptor in liver pathophysiology*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011. **35**(4): p. 295-302.
148. Beuers, U., et al., *Medical treatment of primary sclerosing cholangitis: a role for novel bile acids and other (post-)transcriptional modulators?* Clin Rev Allergy Immunol, 2009. **36**(1): p. 52-61.

149. Qiao, E., et al., *Expression of the PXR gene in various types of cancer and drug resistance*. *Oncol Lett*, 2013. **5**(4): p. 1093-1100.
150. Owen, A., et al., *Expression of pregnane-X-receptor transcript in peripheral blood mononuclear cells and correlation with MDR1 mRNA*. *Antivir Ther*, 2004. **9**(5): p. 819-21.
151. Tabibian, J.H., et al., *Prospective Clinical Trial of Rifaximin Therapy for Patients With Primary Sclerosing Cholangitis*. *Am J Ther*, 2017. **24**(1): p. e56-e63.
152. Tandon, P., et al., *The efficacy and safety of bile Acid binding agents, opioid antagonists, or rifampin in the treatment of cholestasis-associated pruritus*. *Am J Gastroenterol*, 2007. **102**(7): p. 1528-36.
153. Alemi, F., et al., *The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(4): p. 1513-30.
154. Pascussi, J.M., et al., *Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(24): p. 6346-58.
155. Keitel, V. and D. Haussinger, *TGR5 in cholangiocytes*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(3): p. 299-304.
156. Popov, Y., et al., *Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes*. *J Hepatol*, 2005. **43**(6): p. 1045-54.
157. Ferreira-Gonzalez, S., et al., *Paracrine cellular senescence exacerbates biliary injury and impairs regeneration*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 1020.
158. Akbari, S., et al., *Next-Generation Liver Medicine Using Organoid Models*. *Front Cell Dev Biol*, 2019. **7**: p. 345.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Professor Dr. Verena Keitel-Anselmino bedanken unter deren nahen Betreuung und Anleitung diese Arbeit erst möglich wurde.

Mein Dank gilt zudem Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger für die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe Keitel. Insbesondere möchte ich Lina Zeissler für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden, für die Unterstützung während den Untersuchungen und den anschließenden Auswertungen danken. Mein besonderer Dank gilt zudem Maria Reich, die mir auch nach Abschluss der experimentellen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite stand. Darüber hinaus möchte ich mich bei dem gesamten Team des Instituts für experimentelle Hepatologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die geduldigen Hilfestellungen bedanken.

Tiefe Dankbarkeit empfinde ich für meine Eltern und meine Schwester, denen ich diese Arbeit widmen möchte. Durch euren bedingungslosen Rückhalt, euer offenes Ohr bei jeglichen Problemen und eure stetigen Ermutigungen konnte ich mein Studium und diese Arbeit abschließen. Mein letzter Dank gilt meinem Freund Michael Schwerter für seine unerschöpfliche Geduld und vorbehaltlose Unterstützung bei dieser Arbeit und in allen Lebenslagen.

8 Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, den 30. Juni 2022

Johanna Mathilde Höhne