

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

**Charakterisierung der Bedeutung des Gallensalzrezeptors TGR5
in Epithelzellen des Darms
und der Gallenwege bei Cholestase**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sara Magdalena Naisar
2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Keitel-Anselmino

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Dr. rer. pol. Caspers

Für meine Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Posterbeitrag GASL 2021

Naisar, S., Klindt, C., Reich, M., Luedde, T., & Keitel, V. (2021). Targeted deletion of Tgr5 in the intestine leads to less biliary damage in cholestasis. Zeitschrift für Gastroenterologie, 59 (01), 1-9

Zusammenfassung

TGR5 (Gpbar1) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der von Gallensäuren aktiviert werden kann und in verschiedenen Zellen des Verdauungssystems exprimiert wird. TGR5 mRNA wurde unter anderem in den Epithelzellen des biliären Systems und des Dünn- und Dickdarms gefunden. Frühere Arbeiten der Gruppe belegen, dass Mäuse mit einer Deletion von TGR5 anfälliger für cholestatische Leberschädigung sind, die durch die Fütterung mit Lithocholsäure bzw Gallengangsligaturen induziert wurde. Da auch die Darm-Leber-Achse eine relevante Rolle bei Leberschädigung und Leberregeneration spielt, war es Ziel dieser Arbeit, die Rolle von TGR5 im Darm nach einer Gallensalzhaltigen Fütterung zu untersuchen. Hierfür wurden TGR5^{Vil-Cre(-/-)} und TGR5^(+/+) Mäusen für 84h eine Diät mit 1% Lithocholsäure oder Placebo Futter verabreicht.

TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse sind im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern anfälliger für schwere Schädigungen der Gallenwege, wie durch signifikante Erhöhungen der alkalischen Phosphatase und des Bilirubins sowie durch Histopathologie der extrahepatischen Gallengänge nachgewiesen wurde. Obwohl die TGR5 mRNA- und Proteinexpression im Dünn- und Dickdarm signifikant erniedrigt war, zeigte sich die TGR5 mRNA- und Proteinexpression des hepatobiliären Systems bei TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen nicht verändert. Beide Genotypen wiesen einen schweren Leberschaden auf, der sich durch hohe Serumspiegel von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) widerspiegelte, wobei TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse nach 84h mit Gallensalzen angereicherter Nahrung eine niedrigere Expression von Fibrosemarkern (Col1a1, Col1a2 und α -SMA) aufwiesen. TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse hatten eine erhaltene TGR5 Expression in Makrophagen im Darm bei gleichbleibendem histopathologischem und laborchemischem hepatozytären Schaden in beiden Genotypen. Im Ileum waren höhere ASBT-Proteinmengen und eine signifikante Erhöhung der FGF15-mRNA in TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen zu beobachten. Letzteres spricht für eine verstärkte Rückresorption von Gallensalzen aus dem Darmlumen via ASBT. Die FXR-Proteinspiegel in der Leber und im Darm zeigten keinen Unterschied zwischen beiden Genotypen.

Weitere Studien werden erforderlich sein, um zu untersuchen, ob die Expression von ASBT durch TGR5 allein verändert wird oder ob es andere Einflussparameter gibt.

Auch bleibt zu untersuchen, ob eine erhaltene Expression von TGR5 in den Makrophagen des enterohepatischen Systems die Entstehung von Fibrose verhindert und welchen Einfluss Inflammation auf die Schädigung des hepatobiliären Systems nimmt.

Summary

Tgr5 (Gpbar1) is a G protein coupled receptor responsive to bile acids (BA) which is expressed in various cells of the digestive system. Among others Tgr5 mRNA has been found in cholangiocytes in the biliary tree and along the mucosa of the small intestine (1,2). Previous works of the group have shown that mice with general and targeted deletion of Tgr5 are more susceptible towards cholestatic liver injury induced by cholic acid-feeding, resulting in a reduced proliferative response and increased liver injury (3,4). Aim of this study was to investigate the role of Tgr5 in the intestine during cholestasis which was demonstrated by feeding a diet supplemented with 1% lithocholic acid (LCA) for 84h using the Tgr5^{Vil-Cre(-/-)} mouse model.

Tgr5^{Vil-Cre(-/-)} mice are more susceptible towards severe damage of bile ducts compared to wildtype littermates as demonstrated by significant increases of alkaline phosphatase (AP) and bilirubin as well as on histopathology of extrahepatic bile ducts. Although Tgr5 mRNA and protein expression was significantly down regulated in the small and large intestine, Tgr5 mRNA and protein expression of the hepatobiliary system was not altered in Tgr5^{Vil-Cre(-/-)} mice. Both genotypes showed a severe liver damage which was reflected by high serum levels of aspartate (AST) and alanine aminotransferase (ALT) yet Tgr5^{Vil-Cre(-/-)} mice had lower expression of fibrosis markers (Col1a1, Col1a2 and α -SMA) after 84h of BS-enriched diet. In the ileum significant reduction of Asbt mRNA expression and higher Asbt protein levels were detectable amongst a significant increase of Fgf15 mRNA in Tgr5^{Vil-Cre(-/-)} mice. This suggests enhanced reabsorption of bile salts from the intestinal lumen via ASBT. Fxr protein levels in the liver and the intestine showed no difference between both genotypes. Further studies will be needed to investigate whether the expression of Asbt is altered through Tgr5 alone or whether there are other influencing parameters.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Alb	Albumin
ALP	Alkalische Phosphatase
BDL	Bile duct ligation
BEC	Biliary epithelial cells
BS	bile salts
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Cholic acid
cAMP	Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CD95	Cell death receptor 95
CDCA	Chenodeoxycholsäure
cDNA	zyklische Desoxyribonukleinsäure
DCA	Deoxycholic acid
dH₂O	Destilliertes Wasser (auch A. dest)
EC₅₀	Mittlere effektive Dosis
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Gallensalze
HBS	HEPES buffered saline
HRP	Horseradish peroxidase
h	Hours, (engl.) Stunden
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
KO	Knock-out

LCA	Lithocholic acid
LDH	Lactatdehydrogenase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
NPC	Non-parenchymal cells
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
Rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfat
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
T-Bil	Totales (Gesamt-) Bilirubin
T-Pro	Totales (Gesamt-) Protein
TGR5^{Vil-Cre(-/-)}	TGR5 Villin-Cre Knockout
Tris	Trishydroxy-Aminomethan
WT	Wildtyp

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Die Galle.....	1
1.2. Der Enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren	1
1.3. Gallensalzrezeptoren	6
1.4. Cholestase.....	12
1.5. Primär sklerosierende Cholangitis	14
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Tierversuche	17
2.2. Organentnahme.....	17
2.3. Proteinanalytische Methoden	22
2.4. Färbungen	26
2.1. Serummessung	30
2.2. Reverse Transkription und quantitative Real-Time-PCR	30
2.3. Statistische Auswertung	32
3. ERGEBNISSE.....	33
3.1. Untersuchung der TGR5 mRNA Expression in TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen im Darm	34
3.2. Die Auswirkungen der Lithocholsäurefütterung auf das Darmepithel der TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse	38
3.3. Die Veränderungen in der Expression von Tight Junctions im Dünndarm nach Litholcholsäurefütterung.....	39
3.4. Die Veränderungen in der Expression von Gallensäuretransportern nach Lithocholsäurefütterung	46

3.5. Die Auswirkung der 1%-LCA Fütterung auf die Lebern der TGR5 Wildtyp und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse	52
3.6. Adaptive mRNA Expression der basolateralen und apikalen Gallensalztransporter nach der Lithocholsäure Fütterung	67
3.7. Auswirkungen der Lithocholsäurefütterung auf das Gallengangsepithel in den extrahepatischen Gallengängen der TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse.....	70
4. DISKUSSION	73
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	82
6. ABBILDUNGSSVERZEICHNIS	96
7. TABELLENVERZEICHNIS	97
8. DANKSAGUNG.....	98

1. EINLEITUNG

1.1. Die Galle

Die Galle besteht zu ~ 95% aus Wasser und darin gelösten Makromolekülen wie Gallensalzen, Bilirubin, Phospholipiden, Cholesterin, Steroiden, Enzymen, Aminosäuren, Xenobiotika und Toxinen (Boyer 2002). Sie ermöglicht eine verbesserte Aufnahme von Nahrungsfetten im Dünndarm, dient als Ausscheidungsweg für endogene und exogene Substanzen und übernimmt endokrine und immunmodulatorische Funktionen (Boyer 2013). Ihre Produktion und Zusammensetzung wird dabei endokrin gesteuert und unterliegt einem strengen Feedback-Mechanismus (Boyer 1986; Wang et al. 1999; Goodwin et al. 2000; Inagaki et al. 2005; Boyer 2013). Störungen dieses feinabgestimmten Zusammenspiels führen zu einer Vielzahl an möglichen Pathologien, darunter angeborene und erworbene cholestatische Erkrankungen.

1.2. Der Enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren

Der Enterohepatische Kreislauf umfasst die Produktion der Galle in den Leberzellen, Speicherung in der Gallenblase, die Sekretion in den Dünndarm und die Absorption aus dem terminalen Ileum. Jeden Tag zirkuliert der Gallensalz-Pool des Menschen zwischen sechs bis zehn Mal, die durchschnittliche Menge an Gallensalzen beträgt hierbei 4-5 g. Es werden circa 0,5 g Gallensalze pro Tag mit dem Stuhl ausgeschieden und durch Neubildung der Gallensalze aus Cholesterin in der Leber ersetzt (Hofmann 1999a; Kullak-Ublick et al. 2000).

In den Hepatozyten der Leber werden die Gallensalze auf zwei unterschiedlichen Wegen synthetisiert. Der klassische Weg beinhaltet die Modifikation des Cholesterin Steroidrings durch 17 verschiedene Enzyme; ein wichtiges und geschwindigkeitslimitierendes CYP450 Enzym ist dabei die Cholesterin-7- α -Hydroxylase (Marin et al. 2015). Endprodukte der Synthese beim Menschen sind die primären Gallensäuren Cholsäure (CA) und Chenodeoxycholsäure (CDCA), bei der Maus hingegen Cholsäure und β -Muricholsäure (β -MCA), da die Maus über das Enzym CYP2C70 verfügt (Guo and Chiang 2020). Nach der Biosynthese werden bis

zu 98% der primären Gallensäuren im Peroxisom mit Taurin bzw. Glycin konjugiert. Die negative Ladung der jetzt vorliegenden Anionen, im weiteren Verlauf als Gallensalze bezeichnet, verhindert die passive Diffusion durch Zellmembranen und erhöht die Wasserlöslichkeit (Russell 2003; Rembacz et al. 2010). Für den Transport von Gallensalzen über die Zellmembran in Leber und Darm sind deshalb verschiedene Transportsysteme notwendig.

Mehr als 80% der konjugierten Gallensäuren werden aus dem Pfortaderblut über NTCP (*Na⁺-dependent Taurocholat Cotransporting Protein*) in den Hepatozyten aufgenommen. Dieser befördert Taurocholat in einem unidirektionalen Symport mit zwei Natriumionen über die Zellmembran (Weinman 1997; Kullak-Ublick et al. 2000). Natriumunabhängig werden unkonjugierte Gallensäuren und Gallensalze im Austausch mit intrazellulären Anionen (GSH, HCO_3^-) durch die Transporterfamilie der OATPs (*Organic Anion Transporting Polypeptides*) in die Zelle aufgenommen. Diese transportieren nebenbei weitere Substanzen wie Bilirubin und Xenobiotika, darunter eine Vielzahl an Medikamenten wie die Antibiotikagruppe der Fluorchinolone (Trauner and Boyer 2003; Hagenbuch and Gui 2008).

Für den Rückfluss der Gallensalze aus den Leberzellen über die sinusoidale Membran zurück ins Pfortaderblut ist ein weiterer Transporter der ABCC Familie verantwortlich. Der Cotransport von reduziertem Glutathion (GSH) mit konjugierten Gallensäuren findet über MRP4 (*Multidrug Resistance Protein 4*) statt (Rius et al. 2003).

Der Transport von Gallensalzen und anderen anionischen Substanzen durch die Zelle bedarf noch weiterer Forschung, bisher sind zumindest für anionische Substanzen drei unterschiedliche Wege beschrieben: Erstens binden gering hydrophobe Substanzen an im Cytosol gelegene Proteine, bisher bekannt sind 3- α -HSD (Stolz et al. 1989; Stolz et al. 1993), GSH-S-Transferase (Sugiyama, Yamada, and Kaplowitz 1983) und L-FABP (Martin et al. 2005). Des Weiteren wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass sich stark hydrophobe Substanzen wie beispielsweise Bilirubin mit den Lipidschichten von intrazellulären Membranen oder Vesikeln spontan verbinden können und somit ihren Weg durch die Zelle finden (Zucker, Goessling, and Hoppin 1999). Letzter bisher erforschter Weg beschreibt einen Microtubuli-medierten Vesikeltransport zur kanalikulären Membran. Anzunehmen ist hierbei eine Korrelation mit dem Immunglobulin A sowie den Transportern MRP2 (*Multidrug Resistance-Associated*

Protein 2) und BSEP (*Bile Salt Export Pump*) (Crawford 1996; Soroka, Pate, and Boyer 1999). Eine Studie von Crawford et al. lässt zudem vermuten, dass es bei geringen Gallensalzmengen beziehungsweise im metabolischen Ruhezustand vermehrt zu dem Microtubulär-abhängigen Vesikeltransport kommt, der unter physiologischen Bedingungen keine Rolle zu spielen scheint (Crawford, Berken, and Gollan 1988; Crawford 1996).

In der apikalen Membran des Hepatozyt finden sich MRP2 und BSEP, Transporter aus der ABC-Familie mit ATP-bindenden Einheiten. Sie sorgen für eine ATP abhängige Sekretion der Gallensalze ins Lumen der Gallengänge entgegen dem Konzentrationsgradienten. Dabei ist die Transportfunktion von BSEP zum einen abhängig von der Konzentration der Gallensalze in der Zelle und zum anderen fast proportional abhängig von der Cholesterinkonzentration in der Zellwand. Dieser Zusammenhang, wenn auch nicht ganz so stark, lässt sich auch bei dem vom ABCC2 Gen codierten Transporter MRP2 finden (Paulusma et al. 2009). Die Affinität für konjugierte Gallensalze ist bei BSEP höher als für unkonjugierte und da die Sekretion von Gallensalzen ins Lumen der Gallengänge gegen einen Konzentrationsgradienten stattfindet, ist die Aufwendung von ATP notwendig (Byrne et al. 2002). Auch MRP2 transportiert unter Energieverbrauch unidirektional Substanzen, die durch Konjugation in der zweiten Phase der Biotransformation wasserlöslich entstanden sind. Hierzu zählt einfach und zweifach konjugiertes Bilirubin (Kamisako et al. 1999), Glutathion und Konjugate organischer Anionen mit GSH, Glucuronat oder Sulfat (Nies and Keppler 2007).

Für die Bildung von gemischten Mizellen in den Hering-Kanälchen (Canaliculi biliferi) ist neben dem Transport von Gallensalzen der Export von Phospholipiden wichtig. Hierbei werden circa 95% des Phosphatidylcholins (Gilat and Somjen 1996), durch die Phospholipidfloppase MDR3 (*Multidrug Resistance Protein 3*) transportiert (Smit et al. 1993; Oude Elferink and Paulusma 2007). Mizellen schützen das Epithel der Gallengänge vor den toxischen Gallensalzen und tragen zur Löslichkeit von Cholesterin bei. Dies dient auch zur Vorbeugung von Gallensteinen (Elferink, Tytgat, and Groen 1997). Cholesterin, welche von heterodimeren ABC-Transportern ABCG5/ABCG8 (*ATP-binding cassette (ABC) transporters G5 and G8*) über die apikale Membran befördert wird, wird von den gebildeten Mizellen aus Phospholipiden und Gallensalzen aufgenommen und Richtung Gallenblase und Duodenum durch die

Gallengänge transportiert, um hier die Aufnahme von Triacylglyceriden und fettlöslichen Vitaminen (Vitamin A, D, E, K) zu verbessern (Yu et al. 2002; Graf et al. 2003).

Das Epithel der Gallengänge besteht aus Cholangiozyten, deren Oberfläche mit Microvilli um ein Vielfaches vergrößert wird (Ludwig et al. 1998). Entlang der Ductuli wird die Galle durch sekretive und absorptive Vorgänge modifiziert, wobei die Alkalisierung des pH-Wertes eine große Rolle spielt. Die hormonell induzierte Bikarbonat- und Chloridsekretion sowie ein passiver Wassereinstrom werden von verschiedenen Transportsystemen übernommen, die dabei in der apikalen Membran der Cholangiozyten verankert sind (Alpini et al. 1997; Baiocchi et al. 1999; Banales et al. 2006; Banales, Prieto, and Medina 2006). Apikal lassen sich in den großen Gallengängen Transporter wie der Natrium-abhängige Cotransporter ASBT (*Apical sodium-dependent bile acid transporter*) finden (Christie et al. 1996; Alpini et al. 1997), der zusammen mit dem basalen lokalisierten heterodimeren Transporter OST α / OST β (*Organic solution transporter α/β*) die Rückresorption von konjugierten Gallensäuren aus dem Gallengangslumen übernimmt (Shneider et al. 1995; Ballatori et al. 2005; Dawson et al. 2005; Ballatori et al. 2009).

Im Darm beschleunigt sich durch Bildung von amphiphilen Mizellen die Aufnahme der durch Pankreaslipase gespaltenen Fettsäuren und 2-Monoglycerinmoleküle um den Faktor 100 (Hofmann and Mysels 1987; Hofmann 1999b; Hofmann and Hagey 2014). Nach geringer passiver Diffusion entlang des Dünndarms, findet eine aktive Rückresorption der Gallensalze unter physiologischen Bedingungen erst im distalen Ileum statt, wo der Natrium-abhängige Cotransporter ASBT zwei Natrium Ionen zusammen mit einem Gallensalz-molekül über die apikale Membran der Enterozyten befördert (Christie et al. 1996; Craddock et al. 1998). Der Transporter zeigt dabei eine höhere Affinität zu konjugierten Gallensäuren und wird angetrieben durch die Potenzialdifferenz zwischen Lumen und Enterozyten (Wong et al. 1994; Weinman, Carruth, and Dawson 1998). Im Cytoplasma der Enterozyten werden die Gallensalze an I-BABP (*Ileal Bile Acid Binding Protein*) gebunden (Gong et al. 1994) und über den basolateral sitzenden heterodimeren Transporter OST α / OST β ins Pfortaderblut exportiert (Seward et al. 2003; Dawson et al. 2005).

Somit ist der Großteil, der im Pfortaderblut befindlichen Gallensäuren konjugiert und über aktiven Transport im Ileum aufgenommen worden, während ein kleiner unkonjugierter Rest der Gallensäuren durch passive Diffusion entlang des Colons ins Pfortaderblut gelangt. Distal der Ileocaecalklappe katalysiert die bakterielle 7- α -Dehydroxylase die Abspaltung von Taurin und Glycin und die Entfernung der OH Gruppe an Position 7 und wandelt somit primäre zu sekundären Gallensalzen wie Desoxycholsäure und Lithocholsäure um (Mekhjian, Phillips, and Hofmann 1979; Hamilton et al. 2007).

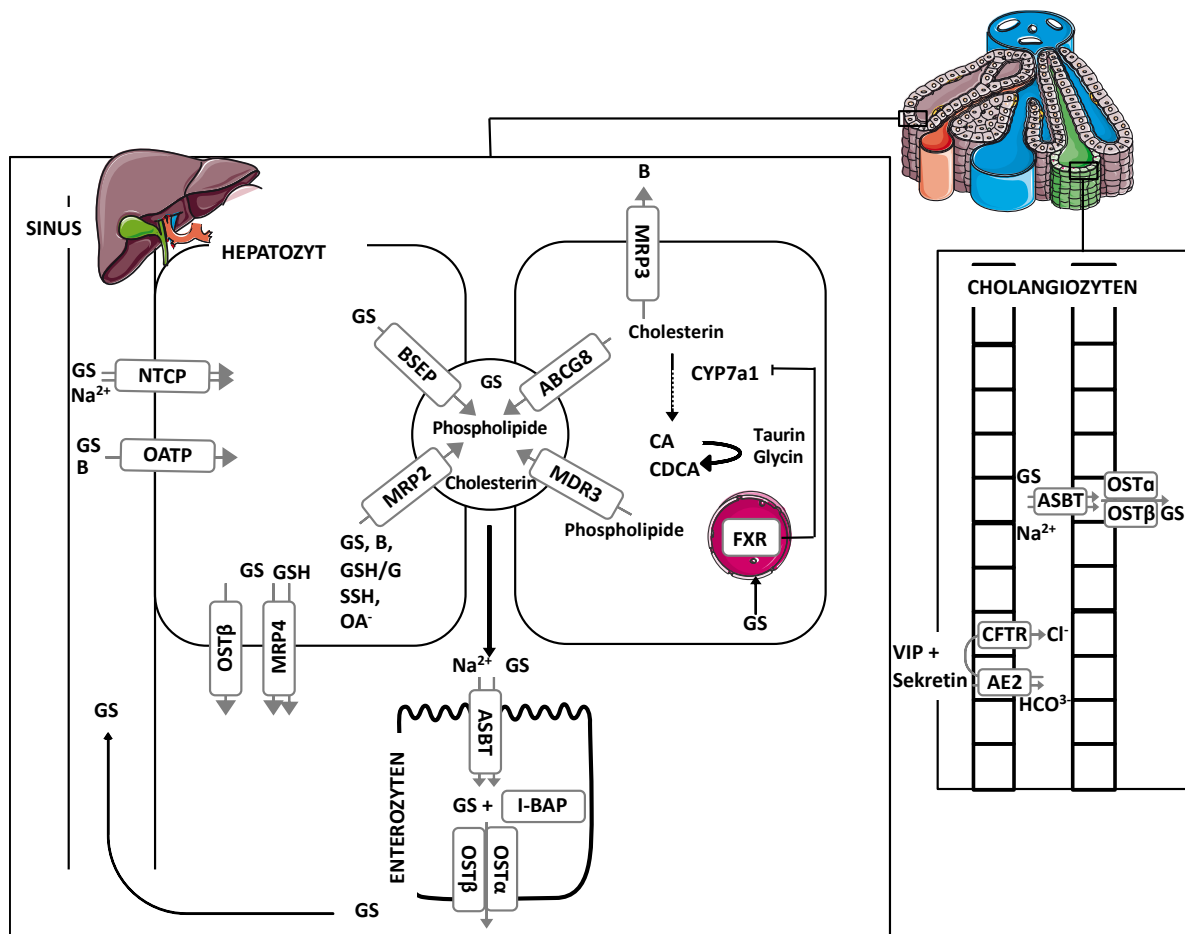


Abb. 1: Enterohepatischer Kreislauf der Gallensalze

Im Hepatozyt werden die Gallensalze (GS) basolateral über Transportsysteme aufgenommen. Dabei werden auch andere anionische Substanzen wie Bilirubin (B) befördert. Ein GS Efflux findet über MRP4 zurück in den sinusoidalen Zwischenraum statt. Apikal sitzen BSEP und MRP2, die GS aktiv in den Gallengang transportieren, wo sie mit Phospholipiden und Cholesterin als gemischte Mizellen zum Darm transportiert werden. Nach Dehydroxylierung durch Darmbakterien werden sie über ASBT aufgenommen, im Enterozyten an das Transportprotein I-BAP gebunden, über den Transporterkomplex OST α / OST β ins Pfortaderblut und zurück zur Leber transportiert. Im Cholangiozyt findet eine weitere Modifikation der Galle statt, indem Hormone wie Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) oder Sekretin eine

erhöhte Bikarbonat- und Chloridkonzentration im Gallengang fördern. Gallensalze können auch hier rückresorbiert werden und über den peribiliären Plexus den Lebersinusoiden zugeführt werden.

Grafik modifiziert nach Kullak-Ublick, G. A., Stieger, B., Hagenbuch, B., & Meier, P. J. (2000). Hepatic transport of bile salts. SeminLiver Dis, 20(3), 273-292.

1.3. Gallensalzrezeptoren

Die Gallensalzrezeptoren lassen sich in zwei Klassen einteilen: nukleäre Rezeptoren wie der Farnesoid-Rezeptor (FXR), der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) oder der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) (Makishima et al. 1999; Staudinger et al. 2001; Makishima et al. 2002) und G-protein gekoppelte Rezeptoren wie TGR5 (Gpbar-1), die Muskarinen Rezeptoren (M1-M5) und die Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPR) (Raufman et al. 2002; Ferrari et al. 2006; Pols, Noriega, et al. 2011a; Deutschmann et al. 2018).

Die Rezeptoren spielen eine Rolle im Glucose-, Lipid- und Energiemetabolismus des Körpers und können diese durch unterschiedlichen Signalwege beeinflussen. Der nukleäre Rezeptor FXR wird hierbei auf Grund seiner Funktion für Diabetes, Adipositas und Nicht-alkoholische Fettleber (NASH) diskutiert, während die genauen metabolischen Funktionen des G-protein-gekoppelten Rezeptor TGR5 noch Gegenstand weiterer Forschung sind (Chiang et al. 2017).

1.4. Gallensalzrezeptor TGR5 / GPBAR-1

Der plasmamembranständige Gallensalzrezeptor ist ein G-protein-gekoppelter Rezeptor, der durch primäre und sekundäre Gallensalze aktiviert werden kann (Maruyama et al. 2002; Kawamata et al. 2003). Er wird fast überall im menschlichen Organismus und im Gewebe von Nagetieren exprimiert und ist unter anderem in der Leber, der Gallenblase, dem Darm, der Niere, den Makrophagen/Monocyten der Milz und im Gehirn zu finden (Maruyama et al. 2002; Kawamata et al. 2003; Maruyama et al. 2006; Vassileva et al. 2006; Keitel et al. 2009; Keitel et al. 2010).

Speziell in der Leber lässt sich TGR5 in den Sinusendothelzellen (LSEC) (Keitel et al. 2007), den Kupffer Zellen, in aktivierten Hepatischen Sternzellen (HSC) (Keitel et al. 2008), in der apikalen Membran und den primären Zilien der Cholangiozyten der kleinen und großen intrahepatischen Gallengängen und in dem Epithel des extrahepatischen Gallengangs detektieren (Keitel et al. 2010; Keitel and Haussinger 2013; Masyuk et al. 2013). Im Gastrointestinaltrakt von Mäusen ist TGR5 weitläufig

exprimiert; unter anderem in den Neuronen der Plexi myenterici und submucosi des Dünndarms und Dickdarms und in der Muscularis externa und Mucosa des Dünndarms (Poole et al. 2010) sowie in den Microvilli der Enterozyten (Zietek et al. 2015).

Konjugierte und unkonjugierte Galensalze wirken als Liganden für den TGR5 Rezeptor. Taurolithocholat (TLC) stellt mit einer EC_{50} von $0,29 \mu M$ den potentesten TGR5 Agonisten dar, es folgen mit abnehmender Potenz LCA ($EC_{50} = 0,6 \mu M$) > DCA ($EC_{50} = 1,3 \mu M$) > CDCA ($EC_{50} = 6,7 \mu M$) > CA ($EC_{50} = 13,6 \mu M$) (Sato et al. 2008). Zudem können verschiedene Progesteron Derivate wie zum Beispiel Neuroaktive Steroide als Rezeptoragonisten agieren (Sato et al. 2008; Keitel et al. 2010). Gallensalze können vermittelt über eine G-Protein gekoppelte Aktivierung von TGR5 Einfluss auf den Gallensalz-, Lipid- und Glukosestoffwechsel ausüben (Keitel et al. 2008; Duboc, Tache, and Hofmann 2014). Die rezeptortypischen Signalwege und deren Wirkungsmechanismen sind in der Abbildung 2 dargestellt. Die Wirkungsweise des Rezeptors ist vom Zelltyp und Expressionsort abhängig und kann antiinflammatorische, antiapoptotische, vasodilatorische, choleretische oder proliferative Funktion übernehmen (Keitel and Haussinger 2018).

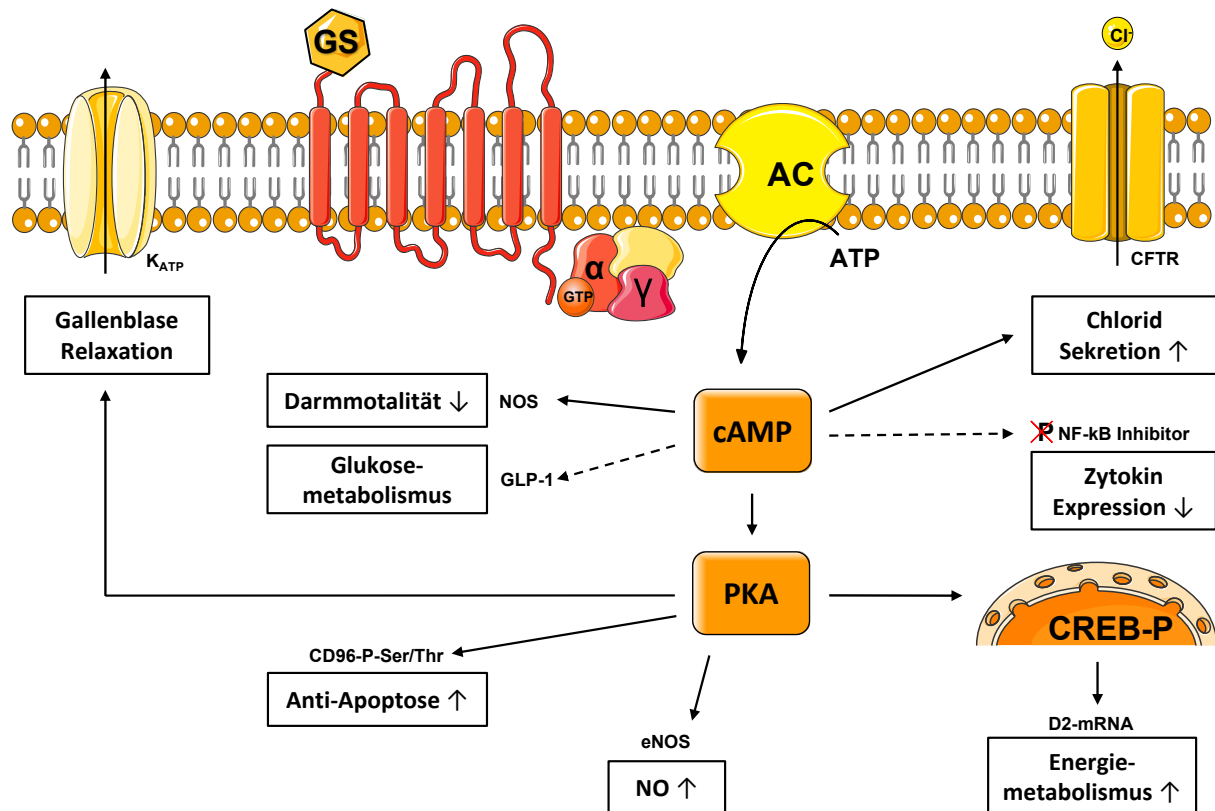


Abb. 2: Signalwege von TGR5

Die Aktivierung von TGR5 durch Gallensalze (GS) bewirkt einen Adenylatzyklase (AC) -abhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration (Maruyama et al. 2002; Kawamata et al. 2003), welche zum einen in Cholangiozyten zu einer erhöhten Chloridsekretion (Keitel and Haussinger 2013) und durch gesteigerte NO Produktion zu einer erniedrigten Darmmotilität führt (Poole et al. 2010). Der Einfluss von Gallensalzen auf den Glucosemetabolismus wird erzielt durch eine TGR5 aktivierte cAMP vermittelte Ausschüttung von GLP-1, die zur Erhöhung der Insulinsekretion und Abnahme der Glukagonsekretion in enteroendokrinen und pankreatischen Zellen führt (Katsuma, Hirasawa, and Tsujimoto 2005; Thomas et al. 2009; Kumar et al. 2012). Zuletzt vermindert TGR5 über cAMP die Zytokinexpression in Monozyten und Makrophagen, indem die Phosphorylierung des NF-KB Inhibitors verhindert wird (Pols, Nomura, et al. 2011; Wang et al. 2011). Über eine Erhöhung der cAMP Konzentration kommt es neben diesen Zellantworten auch zur Aktivierung von PKA, was wiederum über ATP gesteuerte Kaliumkanäle zur Relaxation mit anschließender Füllung der Gallenblase (Lavoie et al. 2010) führt, in Cholangiozyten und Sinusendothelzellen durch Internalisierung des Fas-Rezeptors CD95 antiapoptotische Effekte hat (Reinehr and Haussinger 2004; Keitel et al. 2007; Keitel et al. 2008) und zu einer gesteigerten endothelialen NO Produktion führt (Keitel et al. 2007). Der Energiemetabolismus wird über die Gallensalz vermittelte TGR5-cAMP-PKA Aktivierung durch Phosphorylierung von CREB beeinflusst, die die Expression der Deiodinase 2 (D2)- mRNA beeinflusst (Watanabe et al. 2006).

Grafik modifiziert nach Keitel, V. and D. Häussinger (2012). "Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease." Clin Res Hepatol Gastroenterol 36(5): 412-419.

1.4.1. Funktionen von TGR5 im Darm

Im Darm nimmt TGR5 Einfluss auf die Flüssigkeitssekretion und Motilität. Die Aktivierung von TGR5 im enterischen Nervensystem durch sekundäre Gallensalze führt zu einem verlangsamten Transport des Darminhalts im Dünndarm (Poole et al. 2010) und durch Transmitterfreisetzung im Colon zu einer schnelleren Ausscheidung des Darminhalts (Alemi, Poole, et al. 2013).

Zudem zeigte sich eine eingeschränkte basale Sekretion von Chlorid durch Aktivierung von TGR5 im Colon (Ward, Mroz, and Keely 2013; Duboc et al. 2016). Eine Studie von Cipriani et. al lässt vermuten, dass TGR5 protektiv bei chemisch induzierter Colitis wirkt, da die Aktivierung des Gallensalzrezeptors einen Einfluss auf die Expression von epithelialen Tight Junctions hat und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung im Darm vermittelt (Cipriani et al. 2011).

Eine weitere Studie von Ao et al. 2013 ergab, dass die Gallensalz induzierte Chloridsekretion durch CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) in der apikalen Membran des Colons mit der intrazellulären cAMP-Konzentration in Verbindung steht. In diesem Zusammenhang wurde zudem TGR5 mRNA in den untersuchten Zellen gefunden und die Autoren stellten daher die Vermutung auf, dass TGR5 einen Einfluss auf die Chloridsekretion im Colon hat.

1.4.2. Funktionen von TGR5 in den Gallengängen und der Leber

In humanen Cholangiozyten führt die Aktivierung von TGR5 durch $G_{\alpha(i)}$ in den Zilien über erniedrigte cAMP Werte zu einer verringerten Zellproliferation, während in der apikalen Membran ein gegensätzlicher Effekt des Rezeptors beobachtet wurde (Masyuk et al. 2013). In Mäusen wird die Zellproliferation nicht über erhöhte cAMP Werte, sondern über Phosphorylierung des wachstumsfördernden EGF-Rezeptors (*Epidermal Growth Factor Receptor*) reguliert (Reich et al. 2016). Durch eine weitere TGR5 vermittelte Phosphorylierung, diesmal des CD95 Rezeptorkomplexes, können Cholangiozyten dem programmierten Zelltod (Apoptose) entkommen (Keitel, Reich, and Haussinger 2015; Reich et al. 2016). Der choleretische Effekt von TGR5 in Cholangiozyten lässt sich auf eine cAMP getriggerte Aktivierung von AE2 und CFTR in der apikalen Membran zurückführen (Keitel et al. 2009; Keitel, Reich, and Haussinger 2015). Bestärkt wird diese Erkenntnis durch weitere Studien, die einen

Ausfall dieser schützenden Funktion mit der Progression von sklerosierenden/fibrosierenden Cholangitiden in Verbindung bringen (Beuers et al. 2010; Hov, Keitel, Laerdahl, Spomer, Ellinghaus, ElSharawy, Melum, Boberg, Manke, Balschun, Schramm, Bergquist, Weismuller, et al. 2010; Reich et al. 2021).

In der Leber führt die Aktivierung von TGR5 zu einer Reduktion des durch Endothelin-1 vermittelten portalen Perfusionsdruck (Klindt et al. 2019). Zudem ließ sich zeigen, dass TGR5^(-/-) Mäuse schlechter auf einen gallensalzinduzierten - somit cholestatischen - Leberschaden reagierten, welcher sich durch erhöhte Leberwerte (GPT, GOT), größere Nekrosen und eine verstärkte Immunantwort messen ließ (Deutschmann et al. 2018; Klindt et al. 2019). Mäuse mit fehlender TGR5 Expression hatten bei partieller Hepatektomie eine verlangsamte Leberregeneration durch veränderten Gallenfluss und verminderte Chlorid- und Bikarbonatsekretion (Péan et al. 2013). In Kupffer-Zellen und isolierten Makrophagen fiel die proinflammatorische Zytokinausschüttung von Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6 und Tumor Necrosis factor- α (TNF- α) nach LPS Stimulation durch TGR5 Aktivierung bei den TGR5^(-/-) Mäusen stärker aus als bei den Wildtypen (Keitel et al. 2008; Pols, Nomura, et al. 2011).

1.5. Gallensalzrezeptor Farnesoid-X Rezeptor (FXR)

Der zweite Gallensalzrezeptor ist der nukleäre Farnesoid-X-Rezeptor (FXR), welcher hauptsächlich in der Leber, der Niere und dem Darm exprimiert wird. Als Transkriptionsfaktor beeinflusst er den Gallensalz-, Lipid-, und Glucosemetabolismus. In der Zelle wird er nukleär exprimiert und übernimmt dort nach Aktivierung durch Gallensalze eine Rolle als Transkriptionsfaktor (Forman et al. 1995; Wang et al. 1999; Makishima et al. 1999; Shin and Wang 2019). In der Leber spielt FXR unter anderem eine Rolle in der Gallensalzsynthese und kann über eine Hochregulation von SHP (*Small Heterodimer Partner-1*) die Transkription von CYP7a1 reprimieren (Goodwin et al. 2000). Ebenso kann FXR durch Aktivierung von SHP die Expression von NTCP und die Expression der Gallensalztransporter der OATP Familie im Hepatozyten reduzieren (Jung et al. 2001; Denson et al. 2001; Jung et al. 2004) und die Gallensekretion durch Induktion der Expression von BSEP (Ananthanarayanan et al. 2001), MRP2 (Kast et al. 2002) und MRD3 (Huang et al. 2003) (bei der Maus Mrd2) fördern. FXR wirkt somit hepatoprotektiv, was auch die erhöhte Mortalitätsrate bei FXR Knockout Mäusen nach einem Cholsäure Fütterungsversuch belegt (Sinal et al. 2000).

1.6. Gallensalzrezeptoren-/transporter und die Darm-Leber-Achse

Neben den bereits erwähnten Funktionen von FXR in der Leber, kann FXR im Darm nach Aktivierung durch Gallensalze die Expression des Hormons Fibroblast-growth factor 15 (FGF-15) steigern, welches nach Transport im Portalblut an den am Hepatozyt sitzenden *Fibroblast Growth Factor Rezeptor 4* (FGFR4) bindet, dies bewirkt eine Hemmung der Gallensalzsynthese und nimmt Einfluss auf den Füllungsstand der Gallenblase (Stravitz et al. 1996; Holt et al. 2003; Inagaki et al. 2005). Die selektive Aktivierung des intestinalen FXR ist somit auch über diesen Weg für eine verringerte Gallensalzexpression verantwortlich. Die selektive intestinale FXR-Aktivierung schützt die Leber vor Cholestase assoziierten Verletzungen, indem zunächst die Expression von FGF15 und daraus resultierend die Suppression von Cyp7a1 bewirkt wird (Modica et al. 2012). Im BDL (bile-duct-ligation) Modell, wiesen Mäuse, die mit FGF-19 (= humanes FGF-15) behandelt wurden, keinen Ikterus und keine Anzeichen einer hepatischen Toxizität auf. Zudem zeigten die Serumanalysen der FGF-19 behandelten Mäuse geringere Level an Cholestaseparametern (Bilirubin, ALP) und Leberparametern (GOT, GPT). Zudem beschreiben Modica et al. 2012 in ihrer Arbeit, dass die intestinale FXR-Aktivierung auch den Darm vor Cholestase assoziierten Schleimhautverletzungen schützt.

Ein weiterer wichtiger Gallensalztransporter in der Darm-Leber-Achse ist der Natrium-abhängige Cotransporter ASBT, der in der apikalen Membran von Enterozyten im Duodenum (gering exprimiert), Jejunum, Ileum und Colon exprimiert wird (Hruz et al. 2006). Die genaue Wirkung von Gallensalzen auf den Transporter wird kontrovers diskutiert (Xiao and Pan 2017). Bei Mäusen wird die Genexpression des Transporters durch Gallensalzaktivierung von FXR, SHP und LRH-1 herunterreguliert (Chen et al. 2003). In cholestatischen Modellen zeigte sich die Effektivität von ASBT Inhibitoren, die eine Rückresorption von Gallensalzen in die Leber verhinderten und somit die intrahepatische Cholestase verbesserten (Mittermayer et al. 2015). Zudem kann eine Repression von ASBT den Verlauf der primär sklerosierenden Cholangitis verbessern, indem das Verhältnis von Phosphatidylcholin und Gallensalzen verändert wird (Miethke et al. 2016). Seit Oktober 2021 sind zudem ASBT Inhibitoren zur Therapie der Progressiven Familiären Intrahepatischen Cholestase (PFIC), einer genetisch bedingten cholestastischen Lebererkrankung, die häufig schon im Kleinkinderalter beginnt, zugelassen. In einer randomisierten, placebokontrollierten Phase-3-Studie

zur Untersuchung der Wirksamkeit und Sicherheit des ASBT Inhibitors zeigten sich verminderte Pruritussymptomatik sowie reduzierte Gallensalzlevel im Serum im Vergleich zur Placebogruppe (Thompson et al. 2022)

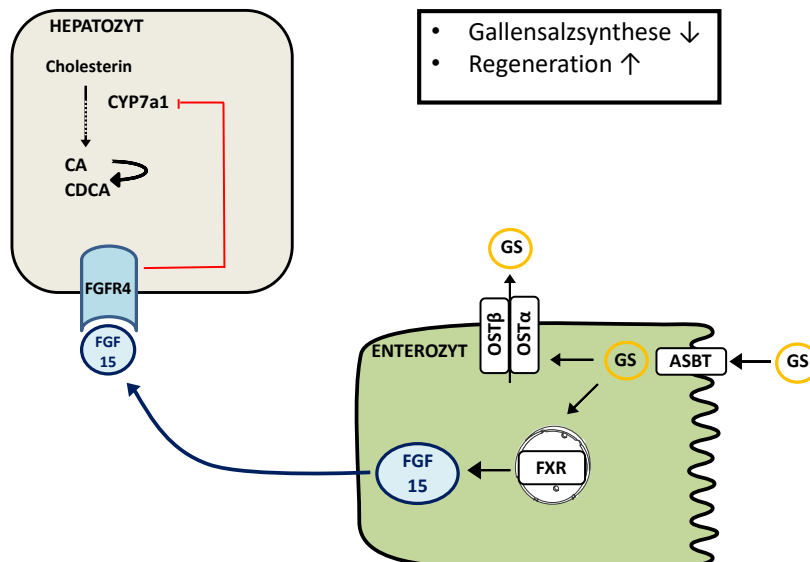


Abb. 3: FXR/FGF15 (= humanes FGF19) Signalweg

Im Ileum werden die Gallensalze (GS) über ASBT in den aufgenommen und durch OSTα/β in den portalen Kreislauf sekretiert. Im Enterozyt binden und aktivieren Gallensäuren FXR, was die Transkription von FGF15 in der Maus bzw von FGF19 beim Menschen stimuliert, das für ein funktionelles Hormon kodiert, welches in den portalen Kreislauf sezerniert wird. Gallensäuren werden in der Leber durch CYP7A1-initiierte Umwandlung von Cholesterin in primäre Gallensäuren gebildet. In der Leber bindet FGF15 an seinen Rezeptor FGFR4, der einen Signalweg unter Beteiligung von MAP-Kinasen aktiviert und eine Repression von CYP7A1 bewirkt, wodurch die Gallensäuresynthese herunterreguliert wird. FGF15 beeinflusst neben der Gallensäuresynthese auch die Lipogenese, Gluconeogenese und die Leberregeneration.

Grafik modifiziert Schaap FG, Trauner M, Jansen PL. Bile acid receptors as targets for drug development. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014 Jan;11(1):55-67. doi: 10.1038/nrgastro.2013.151. Epub 2013 Aug 27.

1.7. Cholestase

Klinisch wird die Cholestase beim Menschen definiert als ein gestörter Abfluss von Galle in den Darm („Gallestauung“) mit Ikterus, Pruritus und Erhöhung der Cholestaseenzyme (ALP, gamma-GT, direktes Bilirubin) (Herold 2021).

Dabei wird unterschieden zwischen einer intrahepatischen und einer extrahepatischen Cholestase. Bei der intrahepatischen Cholestase handelt es sich um eine Störung der

Gallesekretion in der Leber. Diese kann angeboren sein (z.B. PFIC, Alagille Syndrom, Dubin-Johnson-Syndrom) oder im Laufe des Lebens erworben werden (z.B. PSC; PBC, virale oder bakterielle Hepatiden, toxischer oder medikamentöser Leberschaden). Die extrahepatische Cholestase entsteht durch eine Abflussstörung der großen Gallengänge bis zur Papille (Papilla Vateri). Auch hier muss man unterscheiden zwischen einem intrakanalikulären Verschluss (z.B. Choledochusstein, Strikturen, Tumor) und einem extrakanalikulären Kompressionsverschluss (z.B. Pankreaskopfkarzinom, Leberabszesse, HCC (Gregor and Stremmel 2013; Herold 2021)).

Infolge des Gallenrückstaus lassen sich histopathologisch in der Leber sogenannte Netznekrosen beobachten, während die nekrotisch unterbrochenen Gallengänge im Portalfeld proliferieren (Riede, Werner, and Freudenberg 2009). Laborchemisch zeigt sich im Verlauf eine Erhöhung der Leberparameter (GPT, GOT). Klinisch kommt es bei Patienten mit Cholestase häufig zu acholischem Stuhlgang und dunkel gefärbten Urin, durch die veränderte Ausscheidung von Bilirubin über die Nieren (Herold 2021).

1.7.1. Cholestase im Fütterungsmodell

Zum Verständnis der cholestatischen Erkrankungen beim Menschen und deren zugrunde liegenden Mechanismen werden Tiermodelle experimentell genutzt.

Dabei kann entweder ein Modell der Gallengangsligatur (bile duct ligation; BDL) (Kountouras, Billing, and Scheuer 1984), ein Fütterungsmodell mit Gallensalzen wie LCA (Hunt, Leveille, and Sauberlich 1964; Palmer and Ruban 1966) oder ein genetisches Modell verwendet werden (Smit et al. 1993; Fickert et al. 2004). Neben biochemischen und morphologischen Veränderungen der kanalikulären Membran (Layden, Schwarz, and Boyer 1975; Kakis and Yousef 1978; Kakis, Phillips, and Yousef 1980), kommt es in den Canaliculi zur Bildung von Gallethromben (Miyai et al. 1977; Bonvicini et al. 1978) und zur Beeinträchtigung des Transports von Exportpumpen von und zur kanalikulären Membran (Beuers et al. 2003; Kubitz et al. 2004). In einer Studie von Fickert et al. konnte zudem gezeigt werden, dass Mäuse bei einer Fütterung von 1% CA über 1, 2, und 4 Tage gallige Nekrosen entwickelten, was zu einer periportalen Entzündung und der Aktivierung von Myofibroblasten und schlussendlich zur Entwicklung einer periduktulären Fibrose führte. Zudem zeigte sich

eine signifikante Veränderung der Expression von Gallentransportern in Hepatozyten und eine Veränderung der Enzymexpression im Gallensäuremetabolismus (Fickert et al. 2006). In einer weiteren Studie mit MDR2^(-/-) Mäusen stellte sich heraus, dass der Austritt von Galle aus den geschädigten Gallengängen durch Induktion einer periduktulären Fibrose schlussendlich zu einer sklerosierenden Cholangitis (Fickert et al. 2004) führt.

1.8. Primär sklerosierende Cholangitis

Bei der primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) handelt es sich um eine chronisch progrediente Entzündung der intra- und extrahepatischen Gallenwege, die im Verlauf über eine Sklerosierung zur Cholestase führt. Durch die Entzündungsprozesse daraus resultierender pathognomonischer zwiebelschalenartiger Fibrosierung (Onion-skinning) kommt es zu Strikturen und Stenosen der Gallengänge mit Cholestase und schlussendlich zur Ausbildung einer Leberzirrhose (Karlsen et al. 2017; Herold 2021).

Über 60% der PSC Patienten sind männlich. Die Krankheit manifestiert sich meist zwischen dem 30. Und 40. Lebensjahr (möglich aber auch bei Kindern und älteren Patienten ab dem 70. Lebensjahr). Die Prävalenz beträgt ca. 10/100000 (Hunt, Leveille, and Sauberlich 1964; Palmer and Ruban 1966; Chapman et al. 1980; Broomé et al. 1996; Bambha et al. 2003; Tischendorf et al. 2007; Lindkvist et al. 2010) Die Prävalenz chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen bei Vorliegen einer PSC beträgt 60 – 80 % (Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie et al. 2017). Die Ätiologie hinter der Krankheit ist noch nicht ganz verstanden, vermutet werden unter anderem genetische Ursprünge (Hov, Keitel, Laerdahl, Spomer, Ellinghaus, ElSharawy, Melum, Boberg, Manke, Balschun, Schramm, Bergquist, Weismüller, et al. 2010), Veränderungen der Gallenzusammensetzung („toxic bile concept“), des intestinalen Mikrobioms und der bilären Gefäßversorgung (Hirschfield et al. 2013).

Klinisch verläuft die Erkrankung anfangs häufig asymptomatisch, diagnostisch wegweisend sind dabei meist erhöhte Cholestaseparameter (AP, gamma-GT, GOT, GPT). Zudem manifestiert sich die Erkrankung auch mit Oberbauchschmerzen, Pruritus, Ikterus und Müdigkeit. Unter anderem können Gallensalzen durch TGR5 gekoppelte Signalwege Ursache für den Pruritus sein (Alemi, Kwon, et al. 2013). Im Spätstadium kommt es zum zirrhotischem Umbau der Leber.

Bei Verdacht auf eine PSC sollte eine Kontrastdarstellung der Gallenwege mittels MRCP erfolgen, bei der sich die typischen Kaliberschwankungen darstellen. Zudem lassen sich bei 60-80% der Patienten antineutrophile, zytoplasmatische Antikörper (p-ANCA) laborchemisch nachweisen (Hirschfield et al. 2013; Häussinger 2018; Herold 2021). Patienten mit PSC haben ein erhöhtes Risiko für Cholangiokarzinome, Gallenblasenkrebs und Kolorektale Karzinome (besonders Patienten mit Colitis) (Dyson et al. 2018). Bei fortgeschrittener Fibrose oder Zirrhose ist außerdem das Risiko für ein Hepatozelluläres Karzinom erhöht (Razumilava, Gores, and Lindor 2011).

Da bisher keine Standardtherapie vorliegt, erhalten Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis ein multimodales Therapiekonzept zur Symptomkontrolle. Die Folgeerscheinungen der PSC können medikamentös (Ursodeoxycholsäure (UDCA) eventuell in Kombination mit Antibiotika) und/oder endoskopisch (Ballondilatation, Bougierung und die kurzzeitige Stenteinlage) behandelt werden (Lindor 1997; Siddiqui et al. 2013; Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie et al. 2017). Bei starker Einschränkung der Lebensqualität und geeigneten Patienten stellt die Lebertransplantation eine mögliche Therapie dar (Eaton et al. 2013).

1.9. Zielsetzung der Arbeit

TGR5 ist ein G-Protein gekoppelter, plasmamembranständiger Gallensalzrezeptor, der fast ubiquitär im Organismus exprimiert wird. Der Rezeptor kann abhängig von seinem Expressionsort antiinflammatorisch, antiapoptotisch, proliferativ und choleretisch wirken.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung des Gallensalzrezeptors TGR5 in Epithelzellen des Darms und der Gallenwege bei Cholestase aufzuklären.

Mit Hilfe der Zelltyp-spezifischen TGR5 Knockout Mauslinie $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ sollte der Einfluss von TGR5 in Darmepithelzellen nach LCA Fütterung untersucht werden. Hiermit verbunden sollte überprüft werden, ob das Gallensalzsignaling im Darm verändert wird und Einfluss auf die Schädigung der Leber hat. Hierfür sollten die Zusammenhänge der Darm-Leber-Achse genauer charakterisiert werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob das Fehlen von TGR5 in den Darmepithelzellen Einfluss auf einen LCA-induzierten Leberschaden nimmt. In Vorarbeiten der Gruppe wurde ein ähnliches Fütterungsmodell mit einem konstitutiven TGR5 Knockout untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dabei vor dem Hintergrund der Vorergebnisse eingeordnet und in einen Gesamtzusammenhang gebracht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien (analytischer Reinheitsgrad), die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von Pan Biotech (Aidenbach, D), Life Technologies (Karlsruhe, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D) bezogen.

2.1. Tierversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes §8 und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf unter dem Aktenzeichen AZ84-02.04.2016.A196 genehmigt. Zudem erfolgte die Teilnahme am Versuchstierkudenkurs der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) am 01.08.2019.

Für die Züchtung der TGR5 Villin-Cre ($TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$) Mäuse erfolgte die Injektion eines transgenen Konstrukts (Cre-Rekombinase ausgeschaltet durch den Promoter Villin-1 und eine Metallothionein-Polyadenylierungssequenz) in die befruchteten Eier von C57BL/6J X SJL/J Mäusen (Züchtung nach (Thomas et al. 2009)). Die Nachkommen wurden mit C57BL/6 Mäusen gepaart und dann fünf Generationen lang mit den gleichen rückgekreuzt. Internationale Nomenklatur der genetisch veränderten TGR5 Villin-Cre ($TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$): C57BL/6;Cg-Tg(Tgr5fl/fl)(Vil-Cre)997Gum/J.

Die Mäuse wurden aufgezogen in der ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Sie hatten unlimitierten Zugang zu Futter und Wasser und ein 12 h Tag/Nacht Rhythmus wurde eingehalten. Männliche und weibliche $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ und Wildtyp Mäuse im Alter von 8-24 (Maus 1954, 1953, 1952) Wochen erhielten eine 1% Litholcholsäure Futter (LCA, ssnieff, Soest, Germany) oder Placebofutter sowie Wasser ad libitum für 84h.

2.2. Organentnahme

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Ketavet und Rompun (Ketavet 100 mg/kg KG (Pharmacia, Erlangen, D) Rompun 20 mg/kg KG (Bayer, Leverkusen, D) narkotisiert und nach ausbleibender Schmerzreaktion wurde die

Peritonealhöhle eröffnet, die Vena portae freigelegt und eine Plastikkanüle (18G) eingeführt, durch die eine Spülung der Leber mit Krebs-Henseleit-Puffer (Zusammensetzung s. Material und Methoden, 2.2.5.) ermöglichte. Während dieser erfolgte die Durchtrennung der Vena cava inferior mit einer Schere, das Tier verstarb somit durch Verbluten während der Narkose.

2.2.1. Isolierung und Kultivierung von murinen Cholangiozyten

Nach der Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer erfolgte eine weitere Spülung der portalvenösen Äste mit 1 ml blau gefärbter, erwärmter und somit flüssiger Agarose (Biozym, Oldendorf, D) (Reich et al. 2016). Nach Entnahme der Leber wurde diese in PBS auf Eis gelagert und die Gallengänge entlang der blau markierten Pfortaderäste unter einem Stereomikroskop mit Mikropinzetten vorsichtig isoliert. Anschließend wurden die Gallengänge in eine Kollagenmatrix (3 ml/ 6 cm²) gelegt und nach dem Auspolimerisieren des Kollagens mit Medium bedeckt. In den ersten zwei Wochen erfolgte zweimal pro Woche ein Mediumwechsel in den Schalen. Nach Auswachsen der ersten Cholangiozyten wurde das Kollagen mit einer Kollagenase verdaut, die Zellen mit PBS und Medium gewaschen und in eine Kollagen-beschichtete Kulturflasche (25 cm) überführt. Nach Überführung der Zellen erfolgte der Mediumwechsel dreimal pro Woche. Die ausgewachsenen Cholangiozyten wurden bis zur Passage 8 für die Versuche eingesetzt.

2.2.2. Isolierung von extrahepatischen Gallengängen

Die extrahepatischen Gallengänge wurden nach Perfusion der Leber vorsichtig vom umliegenden Pankreasgewebe gelöst und ihr Verlauf von der Papilla Vateri im Duodenum bis zur Gallenblase (einschließlich Ductus cysticus) dargestellt. An beiden Enden wurde ein ungefähr 3 x 3 mm großes Stück aus Leber und Duodenum als Begrenzung mitentnommen und das Stück quer auf ein Filterpapier (Schleicher und Schuell, Mannheim, D) für mindestens 2 Tage in 4% Roti-Histofix (Roth, Karlsruhe, D) eingelegt.

2.2.3. Isolierung von BEC und NPC

Zunächst erfolgte die Spülung bis zur Blutleere der Leber mit HANKS-Puffer 1 für 3-5 Minuten, dann die Perfusion des Lebergewebes mit Kollagenasehaltigem HANKS-

Puffer 2 bis nach ungefähr 15-20 Minuten erste Zeichen des Verdaus sichtbar wurden. Die entnommene Leber wurde anschließend in eine 10 cm² Schale mit PBS gelegt. Nach Entfernung der Gallenblase wurde die Leberkapsel mit einer Pinzette entfernt, so dass die Hepatozyten aus dem Parenchym gespült werden konnten. Nach Zerkleinerung des restlichen Gewebes erfolgte die Überführung der Reste in ein 50 ml Falcon mit Verdauungslösung 1 und die Inkubation unter Schütteln für 20 Minuten bei 37°C. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein 40 µm Sieb filtriert und mit 40 ml DMEM gewaschen und nach Beschriftung bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gehalten. Die restlichen, unverdauten, verbliebenen Lebergewebsstücke aus dem Sieb wurden erneut aufgesammelt und in ein neues 50ml Falcon mit Verdauungslösung 2 überführt. Inkubation, Filtrierung und Waschen erfolgten wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Auch hier erfolgte nach Beschriftung der Zellfraktionen die Lagerung auf Eis bis zur Weiterverarbeitung. Weitere unverdaute Leberstücke wurden erneut im Sieb eingesammelt und in ein 50ml Falcon mit Verdauungslösung 3 (Accutase) überführt. Die darauffolgende Inkubation erfolgte dieses Mal nur für 10 Minuten unter Schütteln bei 37°C. Anschließend wurden die nach jedem Verdauungsschritt gewonnenen Zellfraktionen bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes, wurde das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen und gepolt und durch Zentrifugieren bei 50 g für 1 Minute wurden die Hepatozyten depletiert. Diese wurden mitsamt dem Pellet verworfen, während der Überstand wieder vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt wurde. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis nach Abzentrifugation keine Hepatozyten mehr sichtbar waren. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis von 1:1 mit 35% Percoll (GE Healthcare, Chicago, USA) gemischt und für 20 Minuten (mit ausgeschalteter Bremse) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es erfolgte anschließend das Absaugen und Verwerfen der obersten Trümmerschicht. Die pelletierten Zellen wurden in PBS gewaschen, bei 300 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und anschließend in Antikörper-Lösung (im FACS-Puffer) überführt.

2.2.4. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS- Analyse)

Biliary epithel cells (BECs) wurden mit einem fluoreszierenden Anti-EpCAM-Antikörper (eBioscience/Thermo Fisher, Waltham, USA, Klon-Nr.: G8.8; 1:100) für die Positivselektion biliärer Epithelzellen angefärbt. Die Negativselektion erfolgte mit den mesenchymalen/hämatopoetischen Abstammungsmarkern CD45 und CD11b (DB

Pharmingen San Diego, USA, Klon-Nr. 30-F11; 1:100; Klon-Nr.: M71/70; 1:100) und dem Endothelzellmarker CD31 (DB Pharmingen, San Diego, USA, Klon-Nr.: 390; 1:100). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte für 30 Minuten bei 4°C. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer (PBS +/- + 0,5mM EDTA, +2% FCS) und dem Pelletieren bei 300g für 5 Minuten wurden die BECs dann mit einem BD FACS Aria III SORP Cell sorter (BD Biosciences, New Jersey, USA) und einer 100 µm Düse sortiert. Die gesorteten Zellen wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR weiterverarbeitet (s. 2.2).

2.2.5. Medien, Reagenzien und Lösungen in der Zellkultur

PBS Puffer (1000 ml)	137 mM Natriumchlorid
	2,7 mM Kaliumchlorid
	12 mM Gesamt-Phosphat
HBS-Puffer10x (200 ml)	16,3 g NaCl (MW 58,4 g/mol)
	0,8 g KCl (MW 74,6 g/mol)
	0,2 g Na ₂ HPO ₄ (MW 174,9 g/mol)
	11,2 g Hepes (MW 238,3 g/mol)
	pH 7,4
Krebs-Henseleit-Puffer (250 ml)	25 ml HBS 10x
	48 mg EGTA (MW 308,4 g/mol)
	pH 7,4
Waschpuffer (500 ml)	50 ml HBS (10x)
	50 mg MgSO ₄
	0,2 g Glucose
	10 ml CaCl ₂
Cholangiozyten-Vollmedium	230 ml HAM's
	230 ml DMEM (1 g /l Glucose)
	50 ml FCS (Thermo Scientific, Rockford, USA)

	5 ml MEM Non Essential Amino Acids NEAA (100x)
	5 ml Insulin-Transferrin-Selenium Supplements
	5 ml Chemically Defined Lipid Concentrate (100x)
	5 ml Soybean Trypsin Inhibitor (5 mg/ml in PBS)
	5 ml L-Glutamin (200 mM)
	5 ml Penicillin/Streptomycin (100x)
	5 ml MEM Vitamin Solution (100x)
	1 ml Gentamycin (10 mg/ml)
	0.5 ml Triiodothyronin (3,4 mg/ml in 0,01N NaOH)
	0.5 ml EGF (25 µg/µl in PBS/Albumin 0,1 %)
	0.5 ml Dexamethason (393 µg/ml in EtOH)
	1.5 ml Forskolin (0,411 mg/ml in DMSO)
HANKS Puffer 1	2mM EGTA
	0.1% Glucose
HANKS Puffer 2	0.1% Glucose
	5 mM CaCl ₂
	0.3 mg/ml Kollagenase CSL II 229 U/mg
Verdauungslösung 1	PBS (mit Ca/Mg)
	2.5 mg/ml Kollagenase Typ 4
	0.1 mg/ml DNase I
Verdauungslösung 2	PBS (mit Ca/Mg)
	10 mg/ml Kollagenase Typ4
	10 mg/ml Pronase
Zellmedium NPC/BEC	DMEM
	1% FCS
	0.1 mg/ml DNase
FACS Puffer	PBS (mit Ca/Mg)

0,5mM EDTA

2% FCS

2.3. Proteinanalytische Methoden

2.3.1. Aufarbeitung von Geweben

Die Organe (Leber, Darm) wurden von 8-24 Wochen alten TGR5 Wildtyp und Knockout Mäusen entnommen, in flüssigem Stickstoff direkt schockgefrostet und für längere Zeit bei -80°C gelagert. Die Anfertigung von Gewebeschnitten erfolgte im Kryotom (Leica, Wetzlar, D) bei -20°C. Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die Organstücke zerkleinert, gewogen und mit der 7-fachen Menge an RL-Puffer versetzt, anschließend entweder bei Raumtemperatur mechanisch homogenisiert oder 5-10x gepottet bei 1000 rpm. Nach erneuter Lagerung auf Eis wurde die DNA der Proben 3x 10 Sekunden mit dem Ultraschall mit einer Pause von 1 Minute zerstört, 5 Minuten bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppli überführt. Die weitere Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.2. Proteinbestimmung mit Bradford Advanced

Für die Durchführung der Messung wurden zu 9 ml dH₂O 6 ml Bradford Advanced Reagent (Biorad, Herkules, USA) angesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte in 3-facher Bestimmung und Ermittlung des Mittelwertes. Dazu wurde zuerst in benötigten Wells einer 96 Well-Platte 150 µl dH₂O vorpipettiert und mit 1 µl Proteinprobe versetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe weiterer 150 µl der Bradford-Lösung. Nach einer sichtbaren Farbveränderung wurde die Messung der Extinktion bei ΔE 595 nm (Extinktionsbereich von 0,1 bis 1,0) im Thermoskan Multiplate Reader (Thermo Fisher, Waltham, USA) durchgeführt.

2.3.3. Vorbereitung der Proben für SDS-Elektrophorese

Nach der Proteinbestimmung wurden die Proben mit der benötigten Menge RL-Puffer auf die gleiche Proteinmenge (30- 50 ng/ml) eingestellt, mit 5x Lämmli Puffer (20% β-Mercaptoethanol) versetzt und 3 Minuten mit 95°C denaturiert, anschließend für 20 Sekunden abzentrifugiert. Bei der Detektion der TGR5-Proteine erfolgte eine zusätzliche Vorbehandlung der Proben mit 1M DTT im Verhältnis 1:4. Nach

anschließender Inkubation bei 95°C für 3 Minuten wurden die Proben mit 5x Lämmli Puffer (20% β -Mercaptoethanol) versetzt und erneut denaturiert. Bei der Detektion von großen Proteinen (>100 kDa) wurden der Denaturierungsschritt bei 95°C durch eine Inkubation der Proben bei 37° C für 30 Minuten ersetzt.

2.3.4. PAA-Gele

Die Trenngele enthielten 100 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% APS und 10 μ l TEMDED. Die Prozentigkeit der PAA-Gele variierte abhängig zur Größe der zu untersuchenden Proteine (zwischen 7,5% bis 12 %). Die 5% Sammelgele enthielten 100 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% APS und 5 μ l TEMDED. Die Lagerung über Nacht erfolgte bei 4°C in nassen Tüchern.

2.3.5. Western Blot

Nach Entfernung der Kämme, wurden die Gele mit Aqua dest. gespült und die Gelkammern mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. 5 μ l des Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad, München, D) wurde als Kontrollmarker verwendet und die Gelelektrophorese erfolgte bis zur Grenze des Sammelgels mit 100 mV, dann mit 160 mV. Zur Vorbereitung des Protein-Transfers wurden 15 Whatmann-Papiere (Schleicher & Schuell, Mannheim, D) und eine PVDF-Membran (GE Healthcare, Braunschweig, D) in Gelgröße zurechtgeschnitten. Sechs Whatmann-Papiere wurden in den Anodenpuffer-1 gelegt, drei zusammen mit der für 10 Sekunden in Methanol aktivierten Membran in Anodenpuffer-2 und weitere sechs inklusive Gel in den Kathodenpuffer. Membran und Gel befanden sich bei Transfer zwischen Anoden- und Kathodenpapieren. Nach Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit, erfolgte das Blotten der Gele je nach Proteingröße zwischen 20 Minuten und 3 Stunden bei einer Stromstärke von 1mA/cm² nach Semidry-Blotting-Methode (Biometra, Göttingen, D). Anschliessend wurden die Membranen in 5% BSA-Lösung für eine 30 Minuten bei RT geblockt, mit dem Erstantikörper beladen und eine Nacht bei 4°C im Kühlraum unter Schütteln gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für 20 Minuten bei RT erfolgte die Beladung der Membran mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei RT. Die Membranen wurden erneut drei Mal für 20 Minuten gewaschen und die Antikörperkonjugate mit ECL-Lösung (Perkin Elmer, Rodgau, D)

in einer Entwicklermaschine der Firma Biorad, München, D mit dem Chemiluminescence Programm detektiert.

2.3.6. Antikörper und Lösungen zur Proteinanalytik

RL-Puffer (500ml)	5 ml 2 M Tris pH 7,4 14 ml 5 M NaCl 210 mg NaF 2,2 g Na-Pyrophosphat x 10 H ₂ O 5 ml Triton X-100 1 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 1 ml 0,5 M EGTA pH 8.0 100 mg Na-Vanadat 2,2 g β -Glycerolphosphat 20 Tabletten/l Proteaseinhibitor-Cocktail (Complete, Roche, Mannheim, D)
Lämmli (5x)- Auftragspuffer	31,25 ml 1 M Tris pH 6,8 20 ml Glycerin 10 g SDS Bromphenolblau (Bio-Rad, München, D)
Elektrophoresepuffer (10x)	60 g Tris 300,28 g Glycin 20 g SDS 2 l Aqua dest.
Anodenpuffer-1	300 mM Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer-2	25 mM Tris 20 % Methanol

Kathodenpuffer	40 mM Aminocaprinsäure
	20 % Methanol
TBS-T (10x) pH 7.6	20 mM Tris/HCl
	137 mM NaCl

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Proteinanalytik

Antikörper	Herkunft	Firma	Verwendung
Primärantikörper			
β-Actin	Mouse monoclonal	Abcam, Cambridge; UK	1:5000
ASBT	Rabbit monoclonal	Abcam, Cambridge; UK	1:2000
FXR	Rabbit monoclonal	Abcam, Cambridge; UK	1:1000
JAM-A	Rabbit polyclonal	Thermo Fisher, Waltham; USA	1:1000
PCNA	Mouse monoclonal	Dianova, Hamburg, D	1:1000
RIPK3	Rabbit monoclonal	Cell Signaling, Denvers; USA	1:1000
Sekundärantikörper			
HRP- anti-guinea pig	Goat polyclonal	DAKO/Agilent, Hercules; USA	1: 5000
HRP- anti-mouse	rabbit polyclonal	DAKO/Agilent, Hercules; USA	1: 5000
HRP- anti-rabbit	Goat polyclonal	DAKO/Agilent, Hercules; USA	1: 5000

2.4. Färbungen

2.4.1. Probenaufbereitung für histologische Untersuchungen

Für die Paraffinschnitte wurden nach Organentnahme die perfundierten Lebern und restlichen Organe der Mäuse in 4% Roti-Histofix (Roth, Karlsruhe, D) fixiert und in Einbettkassetten für zwei Tage gelagert, bis sie in flüssigem Paraffin eingebettet wurden. Das Einbetten der Gallengänge erfolgte nach gesondertem Vorgehen in zwei Schritten mit einem ausgehärtetem Paraffintropfen am Ende des Blocks, damit eine Längslagerung der Gallengänge gewährleistet werden konnte. Nach Aushärtung der Blöcke bei 4°C wurden die Organe 5 µm (Gallengänge 8 µm) dick an einem Rotationsmikrotom (Leica, Nussloch, D) bei Raumtemperatur geschnitten, in 40°C warmem Wasser auf die Objektträger (Leica, Nussloch, D) gezogen und für mindestens 2 Tage getrocknet.

Für die Kryoschnitte wurden die Organe nach Entnahme direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80°C für längere Zeit zwischengelagert und dann im Kryotom bei -20°C mit OCT Embeddin Matrix (CellPath, Newton, UK) eingebettet, bevor sie als 5 µm dicke Schnitte auf Objektträger der Firma Marienfeld (Lauda-Königshofen, D) gezogen und wieder bei -20°C gelagert wurden.

2.4.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zu Beginn dieser Standardfärbung, bei der die Zellkerne blau-violett und das Gewebe rosa gefärbt wird, wurden die Schnitte zweimal für jeweils zehn Minuten in Xylol deparaffinisiert und dann in einer Ethanolreihe (2x 100%, 1x 90%, 1x 70%) für jeweils 5 Minuten rehydriert. Anschließend kamen die Schnitte für 1,5 Minuten (Gallengänge) oder für 3 Minuten (Darm- und Leberschnitte) in Hämatoxylin Solution Gill Nr. 3 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) und direkt folgend für 20 Sekunden in 0,1% Salzsäurelösung. Vor der Behandlung der Schnitte mit Eosin Y solution alcoholic (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) für weitere 3 Minuten (Gallengänge) bis 5 Minuten (Darm- und Leberschnitte) wurden die Schnitte erst für 10 Minuten mit H₂O gewaschen. Die Dehydrierung erfolgte mit der diesmal aufsteigenden Ethanolreihe (1x 70%, 1x 90%, 2x 100) für jeweils wieder 5 Minuten, bevor die Schnitte mit sauberem

Xylol fixiert und schlussendlich mit Vecta Mount Medium (Vector Laboratories, Burlingame; USA) eingedeckt wurden.

2.4.3. Pikro-Siriusrot-Färbung

Zur Detektion von Kollagenfasern im Gewebe wurde das Picrosirius Red Stain Kit der Firma Polysciences (Warrington, USA) verwendet und die Schnitte erst deparaffinisiert und dann in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (s. 2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Anschließend folgte ein zweifaches Waschen mit dH₂O für 5 Minuten und eine Behandlung mit Hämatoxylin nach Weigert (Roth, Mannheim, D) für 8 Minuten. Die beiden Weigert Lösungen A und B wurden kurz vorher in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Nach einem weiteren Waschschrift kamen die Schnitte für 2 Minuten in die 0,2% Phosphomolybdic Acid Lösung A und nach weiterem Waschen für 1 Stunde in die Pikro-Siriusrot-Lösung B. Zum Schluss folgte eine Behandlung mit 0,4% HCL Lösung für 2 Minuten, die Dehydrierung mit aufsteigender Ethanolreihe und Fixierung mit sauberem Ethanol für 10 Minuten. Das Eindeckeln erfolgte mit Vecta Mount Medium (Vector Laboratories, Burlingame; USA).

2.4.4. Immunhistochemie

Die Schnitte für die IHC Färbungen wurden Analog der HE-Methode erst entparaffinisiert und rehydriert (s. 2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Bei Verwendung von Peroxidase als Zweitantikörper erfolgte initial die Blockierung der endogenen Peroxidase Aktivität mit Methanol und 10% H₂O₂ Lösung für 30 Minuten bei RT. Anschließendes Waschen der Schnitte für 5 Minuten mit dH₂O und zum Antigen Retrieval erfolgte mittels Dampfgerar bei 100°C in einem Citratpuffer mit pH6 (Signet, Hayward, USA) oder in einem Citratpuffer mit pH10 für 20 Minuten. Abschließendes Auskühlen der Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBS (3x 5 Minuten) wurden die unspezifischen Bindungsstellen 30 Minuten lang in einer 3-10% FCS/PBS Lösung geblockt. Die Inkubation mit Erstantikörper-Lösung fand entweder für 1 Stunde bei RT statt oder über Nacht bei 4°C im Kühlraum. Im Anschluss wurden die Objektträger mit TBST (Rezept) 3x 10 Minuten gewaschen. Die weitere Inkubation fand mit Peroxidase- gekoppelten Zweitantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur statt. Nach erneuten Waschschriftten mit TBS-T für 3x 10 Minuten erfolgte die Inkubation der Objektträger mit der Peroxidase-Substratlösung (DAB

Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories (Burlingame; USA)). Dabei wurde nach Protokoll des Herstellers Buffer Stock Solution, DAB-Stock Solution und Hydrogen Peroxide Solution zu 5 ml dH₂O hinzugegeben und für 20 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Um eine stärkere Braunfärbung der Peroxidase Enzyme zu bekommen, wurde erneut Substratlösung hinzugefügt und der Vorgang wiederholt. Zum Schluss wurden die Zellkerne mit Hämatoxylinlösung Nr. 2 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) für 3 Sekunden gegengefärbt und 5 Minuten unter laufendem Leitungswasser differenziert. Danach erfolgte erneut analog der HE-Methode die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Ethanolreihe und das Eindeckeln mit Vecta Mount Medium (Vector Laboratories, Burlingame; USA).

2.4.5. Immunfluoreszenz

Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten folgte analog der IHC Färbung. Nach Inkubation mit dem Erstantikörper über 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wurden die Schnitte 3x 10 Minuten bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit dem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper gegen die entsprechenden Spezies und DAPI (1:20000) beladen und wieder für 1 Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Schlussendlich folgte ein letzter Waschdurchgang mit PBS 3x 10 Minuten im Dunkeln, anschließend 2 Minuten mit dH₂O, das Eindecken mit Fluorescence Mounting Medium (DAKO/Agilent, Hercules; USA) und die Fixierung mit Nagellack.

Zur Fixierung der Kryoschnitte und Cholangiozyten wurden die Objektträger bzw. Glas-Cover-Slips mit -20°C gekühltem Methanol für 3 (Cover-Slips) bzw. 5 Minuten (Kryoschnitte) versetzt. Eine alternative Fixierung bei bestimmten Antikörpern erfolgte mit 4% Paraformaldehyd für 15 Minuten oder für 3 Minuten bei den Cover Slips bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden nach dem Waschen (3x 5 Minuten mit PBS) weitere 5 Minuten (Leber) oder 15-20 Minuten (Darm) mit 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert und erneut 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die unspezifischen Antikörper Bindungsstellen wurden mit einem 3-10% FCS/PBS-Gemisch für 30 Minuten abgesättigt. Die Inkubation der Erstantikörper fand entweder 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C statt. Die mikroskopischen Untersuchungen und Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM 510 (Zeiss, Jena, D) und der Software Zen 3.1. (Zeiss, Jena, D) durchgeführt.

2.4.6. Antikörper und Lösungen zum Färben

4% PFA	500 ml 1x PBS (50°C)
	20 g PFA
	pH 7.4 mit HCl
0,1% Triton-X-100	1g Triton X-100
	ad 1l A. dest
0,1% HCL	1 ml 100% HCL
	ad 1l A. dest
PBS	
FCS	
Citrat-Puffer 10mM	1,921 g Zitronensäure (Citrat acid)
	ad 1l A. dest
	pH 10,0 mit NaOH

Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Färbungen

Antikörper	Herkunft	Firma	Verwendung
Immunfluoreszenz (IF)			
Claudin	Mouse	Thermo Fisher, Waltham; USA	1:100
F4/80	Rat monoclonal	Abcam, Cambridge, UK	1:200
Jam-A	Rabbit polyclonal	Thermo Fisher, Waltham; USA	1:100
Tgr5 (PA5-23182)	Rabbit polyclonal	Thermo Fisher, Waltham; USA	1:100
Troma III-c	Rat monoclonal	DSHB, Iowa City; USA	1:100
Villin	Mouse monoclonal	Chemicon, Temecula; USA	1:100

Zo-1	Purified mouse anti-human	Bencton-Dickinson, Franklin Lakes; USA	1:100
Zo-2	Rabbit polyclonal	LS Bio, Seattle; USA	1:25
Immunhistochemie (IHC)			
pCK	Rabbit polyclonal	DAKO/Agilent, Hercules; USA	1:500
Pcna	Mouse monoclonal	Dianova, Hamburg, D	1:25
Tgr5 (PA5-27076)	Rabbit polyclonal	Thermo Fisher, Waltham; USA	1:100

2.1. Serummessung

Bei Organentnahme wurde eine möglichst große Menge Blut aus der Aorta entnommen (> 100 µl) entnommen und für eine 30 Minuten bei RT stehengelassen. Danach wurden die Proben bei 21°C und 12000 rpm für 10 Minuten herunterzentrifugiert und das Serum in ein neues Eppi überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt und schließlich wurden die Serumproben bei -20°C eingeforen. Die Bestimmung der Serumparameter erfolgte photometrisch mit dem Spotchem EZ 4330 der Firma Akray (Kyoto, Japan) und Teststreifen eben genannter Firma. Es wurden bei den Proben die Serumparameter LDH, GPT, GOT, Albumin, Total-Protein, Total-Bilirubin und ALP gemessen. Bei Werten außerhalb der Messrange wurden die Proben entsprechend beginnend mit 1:2 verdünnt mit 0,9% NaCl. Die Bestimmung der Gallensalze erfolgte im Serum der Mäuse und in Einfachbestimmung.

2.2. Reverse Transkription und quantitative Real-Time-PCR

Für die Herstellung der RNA wurden die entsprechenden Organstücke nach Entnahme in 200 µl Homogenization Solution aufgenommen und die Gesamt-RNA entsprechend dem Herstellerprotokoll des Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit im Maxwell 16 IVD (Promega, Madison, USA) automatisch aufgereinigt. Eine Reinheitsbestimmung der RNA Proben erfolgte in Zweifachbestimmung mittels Nanodrop (Thermo Fisher, Waltham, USA) spektralphotometrisch in einem Extinktionsbereich von 260/ 280 nm. Die Generierung der cDNA erfolgte nach Herstellerprotokoll mittels Biozym cDNAase Kit (Biozym, Oldendorf, D). Für die Synthesereaktion wurden 20 µl cDNA für 30

Minuten bei 55°C und anschließend 5 Minuten bei 99°C gekocht. Die gewonnene RNA aus den isolierten intrahepatischen Gallengängen wurden aufgrund ihrer geringen Konzentration 30 Minuten bei RT mittels Vakuum konzentriert. Anschließend erfolgte die relative Quantifizierung am Light Cycler 480 (ABI Applied Biosystems, Foster City, USA) mittels TaqMan Gene Expression Master Mix derselben Firma und den umgeschriebenen cDNA Proben in 96-Well-Platten und einer nach Keitel et al. (2007); (2009) modifizierten Doppelbestimmung der Proben. Semiquantitative qRT-PCR-Ergebnisse wurden durch die ABI Software SDS Version 1.4 Patch 2 und die ΔCT -Methode ermittelt. Es erfolgte eine Berechnung über die 2. Ableitung. HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-1-Gen) wurde aufgrund seiner ubiquitären Expression als Bezugsgen gewählt und die Werte durch Bezug auf ein zweites Housekeeping Gen (GAPDH oder SDHA) validiert.

Tabelle 3: Verwendete TaqMan Sonden der Firma ABI Applied Biosystems, Foster City, USA

Taq Man Sonden	TaqMan gene expression assay IDs
αSMA	Mm01546133_m1
Asbt	Mm01217042_m1
Bsep	Mm00445168_m1
CD11b	Mm00434455_m1
CK19	Mm00492980_m1
Col1a1	Mm00801666_g1
Col1a2	Mm00483888_m1
Cyp7a1	Mm00484152_m1
Endothelin-1	Mm00438656_m1
F4/80	Mm00802529_m1
Ffg15	Mm00433278_m1
Fgrf4	Mm01341852_m1
Fxr	Mm00436425_m1
Gapdh	Mm99999915_g1
Gata4	Mm_0048489_m1
Hprt	Mm00446968_m1
Jam-A	Mm00554113_m1

Mrp2	Mm00496899_m1
Mrp3	Mm00551550_m1
Mrp4	Mm01226381_m1
Ntcp	Mm01302716_m1
Oatp1a1	Mm01267415_m1
Oatp1b2	Mm00451510_m1
Ost- β	Mm00619242_m1
Pdgfr1α	Mm00440701_m1
Pdgfr1β	Mm00435546_m1
Sdha	Mm01352366_m1
Shp	Mm00442278_m1
TF-β	Mm01178820_m1
Tgr5	Mm00558112_s1
Zo-1	Mm00493699_m1

2.3. Statistische Auswertung

Die Tierexperimente wurden mit einer Gruppengröße von $n \geq 4$ durchgeführt, graphisch dargestellt wurde der Mittelwert mit SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Als statistische Tests zum Signifikanznachweis von $p < 0,05$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ wurden der Student t-Test und der Mann-Whitney U Test verwendet.

3. ERGEBNISSE

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen der TGR5 Defizienz in Villin-exprimierenden Zellen im Darm (TGR5^{Vil-Cre(-/-)}). Aus der Literatur ist bekannt, dass TGR5 in den Villin exprimierenden Enterozyten des Dün- und Dickdarms exprimiert wird (Zietek et al. 2015). Zudem wird Villin in den Cholangiozyten der Leber exprimiert (Robine et al. 1985). Die Effizienz der TGR5 Deletion im Darm wurde mithilfe der qPCR Methode in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen in Vergleich zu deren Wildtyp-Gruppe überprüft. Im Darm zeigte sich der Knockout fast vollständig effizient, in den Cholangiozyten ließ sich TGR5 sowohl in den großen Villin exprimierenden Gallengängen als auch in den kleinen Gallengängen, die physiologisch kein Villin exprimieren, nachweisen. Der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} ist somit ein nahezu vollständiger Darm-Phänotyp.

Für die *in vivo* Versuche erhielten beide Mausgruppen eine Placebo- und eine Lithocholsäurehaltige (1% LCA) Fütterung ad libitum über 84 h bei ausreichender Wasserzufuhr. Mit Hilfe dieses Fütterungsmodells lassen sich die Auswirkungen einer Cholestase und daraus resultierende Organschäden und organische Alterationen zeigen (Miyai et al. 1977; Fickert et al. 2006; Moustafa et al. 2012). Eine Fütterung mit LCA führt zu Galleninfarkten, destruktiver Cholangitis und periduktaler Fibrose sowie zu veränderter hepatozellulärer Transporter- und Stoffwechselenzym-Expression (Fickert et al. 2006). Dabei wurden neben der veränderten Zellpermeabilität auch verschiedene Transporter und ihre Expressionsmuster im Jejunum und terminalen Ileum untersucht.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen des Knockouts sowie der Lithocholsäure-Fütterung in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen auf das hepatobiliäre System. Dabei wurde das *in vivo* Modell durch *in vitro* Analysen an isolierten Cholangiozyten ergänzt. Neben der Schädigung in Leber und Gallengängen, wurde hier der Fokus auf die hepatobiliären Transporter gelegt. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe histologischer, immunhistologischer und biochemischer Methoden analysiert und ausgewertet.

3.1. Untersuchung der TGR5 mRNA Expression in TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen im Darm

Im ersten Schritt wurde die Effektivität des TGR5 Knockouts im Darm mittels relativer Expression der mRNA durch qPCR untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Expression zwischen den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen zu den Wildtypen, aber kein Unterschied bei den unterschiedlichen Fütterungsmodellen. Dabei konnte bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Tieren eine durchschnittliche Restexpression der TGR5 mRNA Expression von 19% im Verhältnis zu den Wildtyp Tieren festgestellt werden (19% bei Placebofutter, 18% bei LCA Futter, höchste Restexpression im terminalen Ileum bei LCA Fütterung von 29%, niedrigste Restexpression im Jejunum bei LCA Fütterung von 13%, höchste Restexpression bei Placebo Fütterung von 25% im Dünndarm, niedrigste Restexpression von 13% im Colon ascendens).

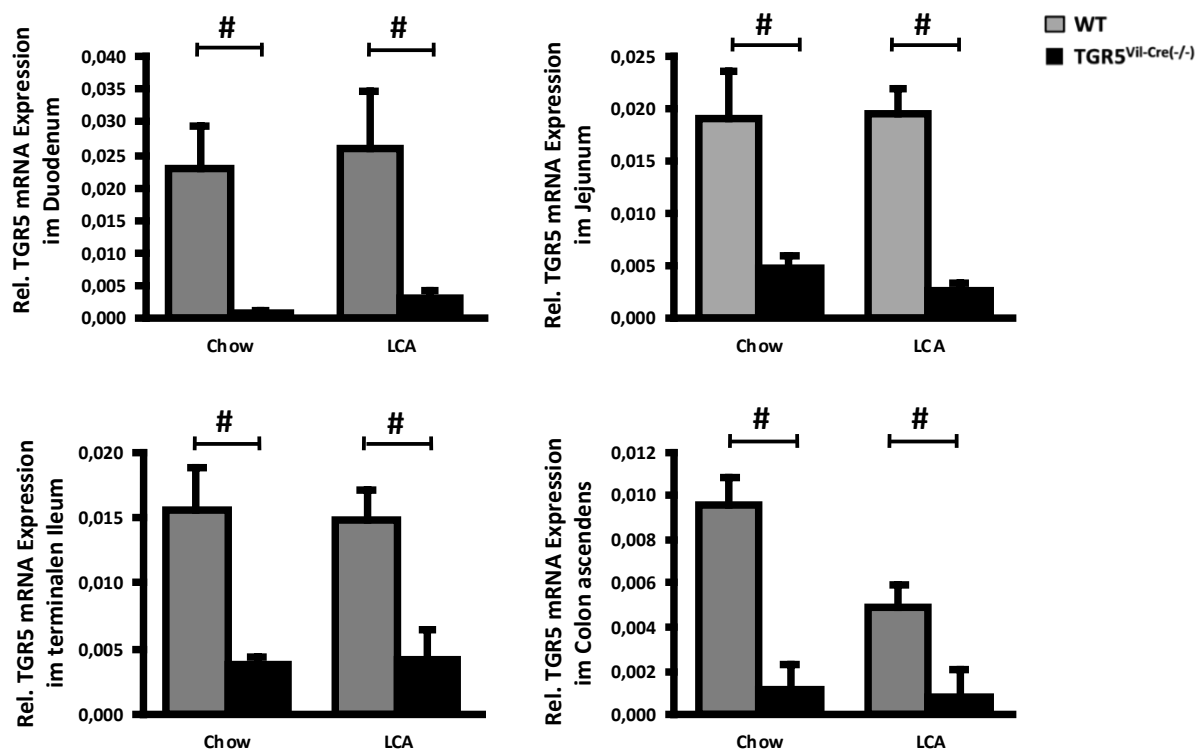


Abb. 4: TGR5 mRNA Expression im Dün- und Dickdarm der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} und Wildtyp Mäuse

Männliche und weibliche TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse und Wildtypen (WT) erhielten über 84 h entweder Placebo (Chow) oder 1% LCA Futter (n = 4-8/Gruppe). Die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse exprimieren signifikant weniger TGR5 mRNA als ihre Wurfgeschwister. Die RNA Isolierung fand mittels Maxwell 16 LEV simply RNA Cell and Tissue Kit statt. Es folgte die cDNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. # = Signifikante Reduktion zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

Zudem wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbung untersucht, ob sich die Lokalisation des G-protein gekoppelten Rezeptors im Jejunum bei TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen verändert hat. Der TGR5 Antikörper (rot) co-lokalisiert in den Wildtyp Tieren mit dem Villin Antikörper (grün), in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen konnte man keine bis eine geringe Co-Lokalisierung feststellen. Villin ist ein Aktin-bindendes Protein, das sich in den Microvilli des Darms findet und hier als Epithelmarker verwendet wird (Robine et al. 1985).

Neben der Co-Färbung von TGR5 und Villin wurde eine weitere Immunfluoreszenzfärbung mit TGR5 und dem Makrophagenmarker F4/80 durchgeführt. Im Dünndarm können gewebespezifische Makrophagen mittels F4/80 Antikörper in der Lamina propria, der Submucosa, in der Subserosa und in den neuronalen Plexi detektiert werden (Mikkelsen et al. 1988). Zudem zeigten Kawamata et al. 2003, dass TGR5 mRNA von Makrophagen und Monocyten exprimiert wird. Abbildung 6 und deutlicher noch Abbildung 7 (Vergrößerung 64x) zeigen, dass ein Teil der TGR5 exprimierenden Strukturen, die mit dem Farbstoff FITC (grün) angefärbt sind, Immunzellen des Darms sind (hier rot angefärbt mit dem Antikörper F4/80). Andere hier nicht untersuchte, aber TGR5 exprimierende Zellen im Gastrointestinaltrakt sind neben Immunzellen neuroendokrine Zellen (Thomas et al. 2009; Pols, Noriega, et al. 2011b).

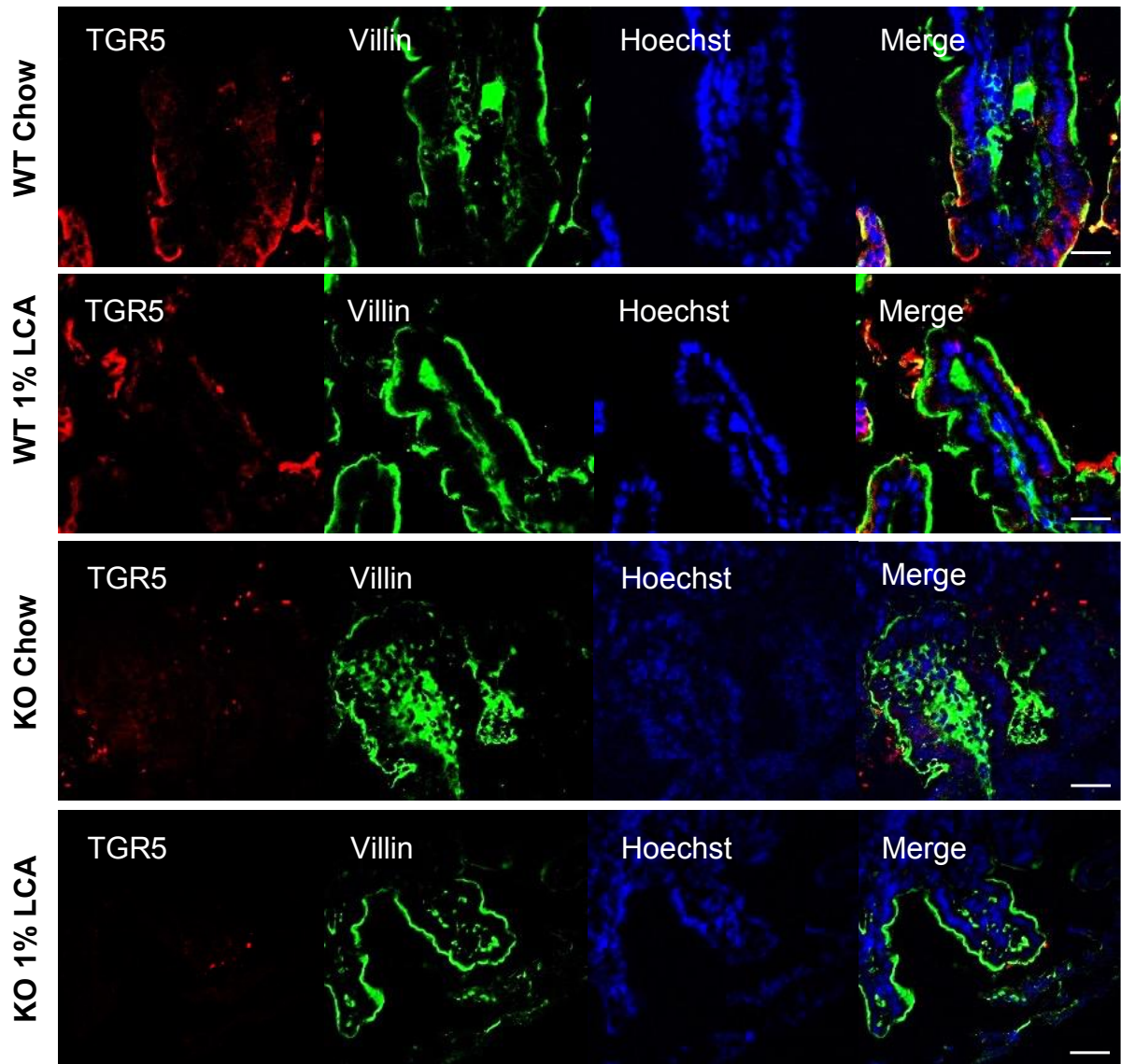


Abb. 5: Immunfluoreszenz Färbung von TGR5 und Villin im Jejunum

Die Färbung wurde mit Antikörpern gegen den Rezeptor TGR5 (rot) und gegen den Epithelmarker Villin (grün) durchgeführt (n = 3-4/Gruppe) mit Schnitten aus dem Jejunum von Wildtyp (WT) und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (KO) Mäusen nach Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Dabei wurden die Schnitte für 20 Minuten mit 4% PFA fixiert und dann 10 Minuten mit 0,1 % Triton-X-100 permeabilisiert. Geblockt wurde mit 3% FCS in PBS. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte jeweils eines Darmabschnitts pro Genotyp und Fütterung. Balken = 50 µm.

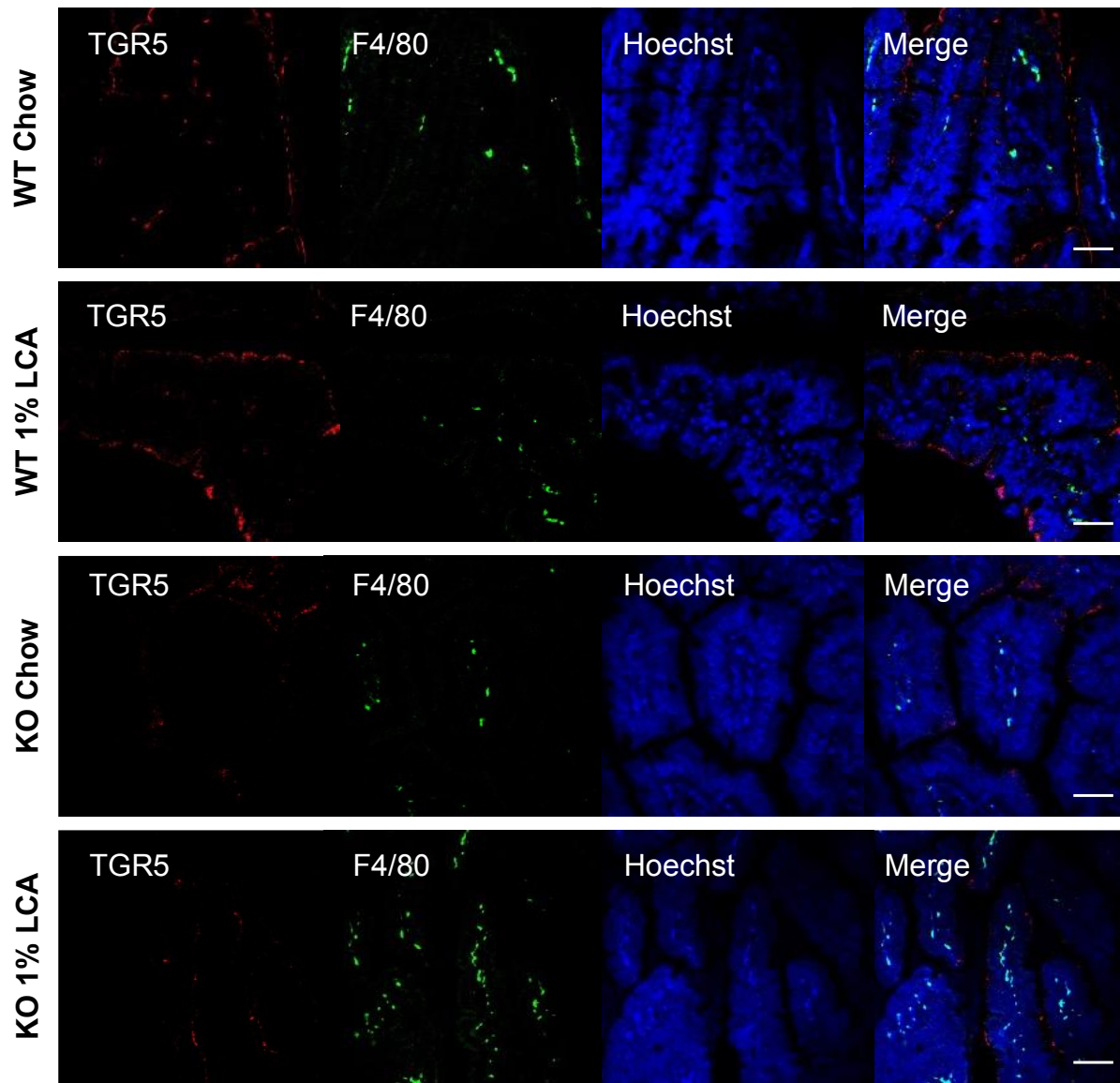


Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung TGR5 und F4/80 im Jejunum

Die Färbung wurde mit Antikörpern gegen den Rezeptor TGR5 (rot) und gegen den Makrophagenmarker F4/80 (grün) durchgeführt (n = 3-4/Gruppe) mit Schnitten aus dem Jejunum von Wildtyp (WT) und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (KO) Mäusen nach Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Dabei wurden die Schnitte für 20 Minuten mit 4% PFA fixiert und dann 10 Minuten mit 0,1 % Triton-X-100 permeabilisiert. Die unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden mittels 5% FCS, 2% Goat-Serum in PBS abgeblockt. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte jeweils eines Darmabschnitts pro Genotyp und Fütterung. Balken = 50 µm.

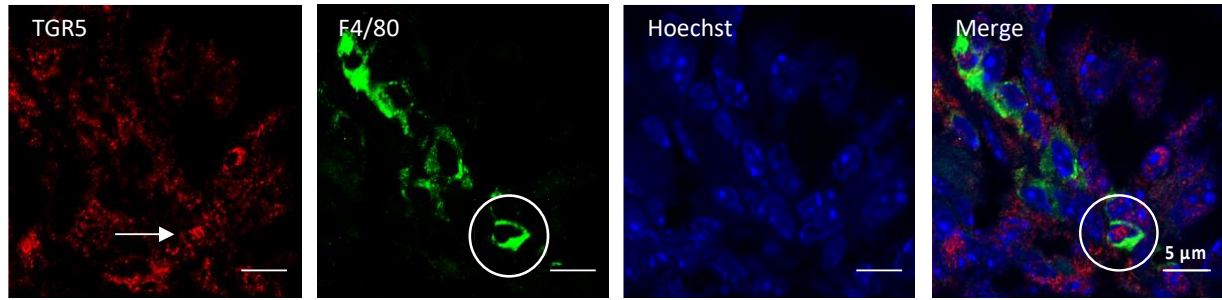


Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung TGR5 und F4/80 in $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen mit Placebo (Chow) Fütterung im Jejunum, 64x Vergrößerung

Die Färbung wurde mit Antikörpern gegen den Rezeptor TGR5 (rot, beispielhaft mit Pfeil dargestellt) und gegen den Makrophagenmarker F4/80 (grün, beispielhaft mit Kreis dargestellt) durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Vorgehen siehe Abb. 5. TGR5 und der Makrophagenmarker F4/80 lassen sich co-lokalisieren (Kreis). In der Färbung zeigt sich außerdem, dass TGR5 in weiteren Zellen exprimiert wird, die sich nicht mit dem Makrophagenmarker F4/80 co-lokalisieren lassen. Balken = 5 µm.

3.2. Die Auswirkungen der Lithocholsäurefütterung auf das Darmepithel der $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäuse

In den HE gefärbten Schnitten des Dünndarms zeigten sich die Zotten und Krypten beider Mausgruppen histopathologisch intakt. Becherzellen lassen sich in beiden Mausgruppen nachweisen. Es ließ sich kein akuter Entzündungsprozess im Bereich des Dünndarms nachweisen.

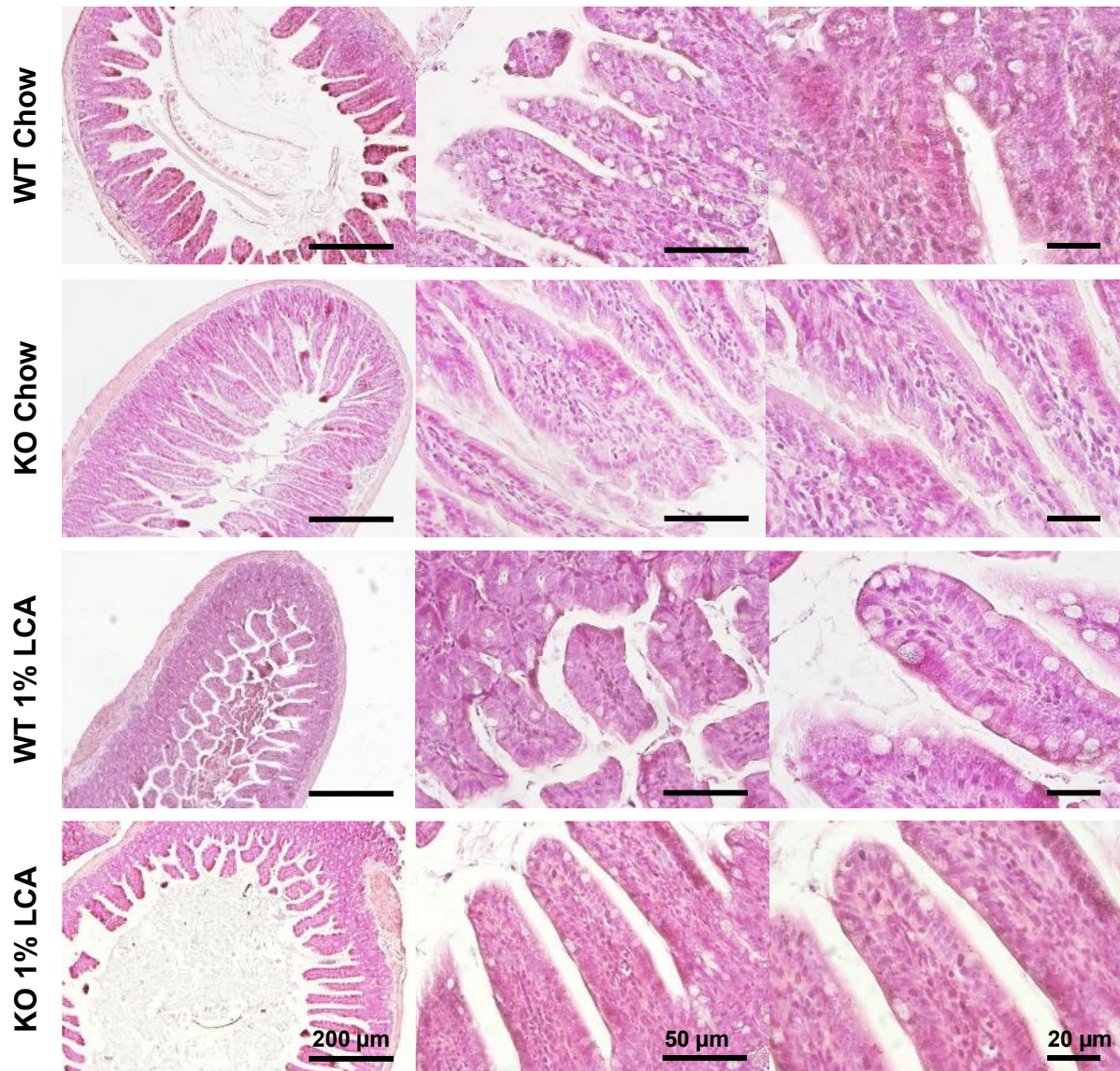


Abb. 8: Histopathologische Untersuchungen des Dünndarms nach 84h Fütterung mit Placebo oder 1% LCA

Das Jejunum der TGR5 Wildtyp (WT) und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (KO) Mäuse wurde nach der Fütterung mit Placebo (Chow) oder 1% LCA circa 5 cm oral des terminalen Ileums entnommen und mittels HE Färbung histopathologisch untersucht (n= 4-5/Gruppe). Das Epithel der Zotten und Krypten zeigte keine akute Schädigung durch die Litholcholsäurefütterung. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte pro Genotyp und Fütterung. Balken = 200, 50 und 20 μm.

3.3. Die Veränderungen in der Expression von Tight Junctions im Dünndarm nach Litholcholsäurefütterung

Eine Studie von Cipriani et al. im Jahr 2011 ergab, dass TGR5 für die Expression von Tight Junctions im Colon und die damit verbundene Permeabilität des Epithels verantwortlich ist. Tight Junctions sorgen für eine Barrierefunktion zwischen der Plasmamembran zweier Zellen und bestehen aus multiplen Proteinkomplexen

(Anderson and Van Itallie 2009). Das Tight Junction Protein JAM-A ist zum Beispiel für die Regulierung der Integrität und Permeabilität der epithelialen Barrierefunktion im Darm zuständig (Laukoetter, Bruewer, and Nusrat 2006). JAM-A defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte epitheliale intestinale Permeabilität und inflammatorische Zytokin Produktion (Vetrano et al. 2008).

Die Expression des Junctional Adhesion Molecules A (JAM-A) zeigte sowohl im Jejunum als auch im terminalen Ileum keinen Unterschied auf Proteinebene, auch zwischen den einzelnen Fütterungsmodellen ließen sich keine deutlichen Unterschiede beobachten.

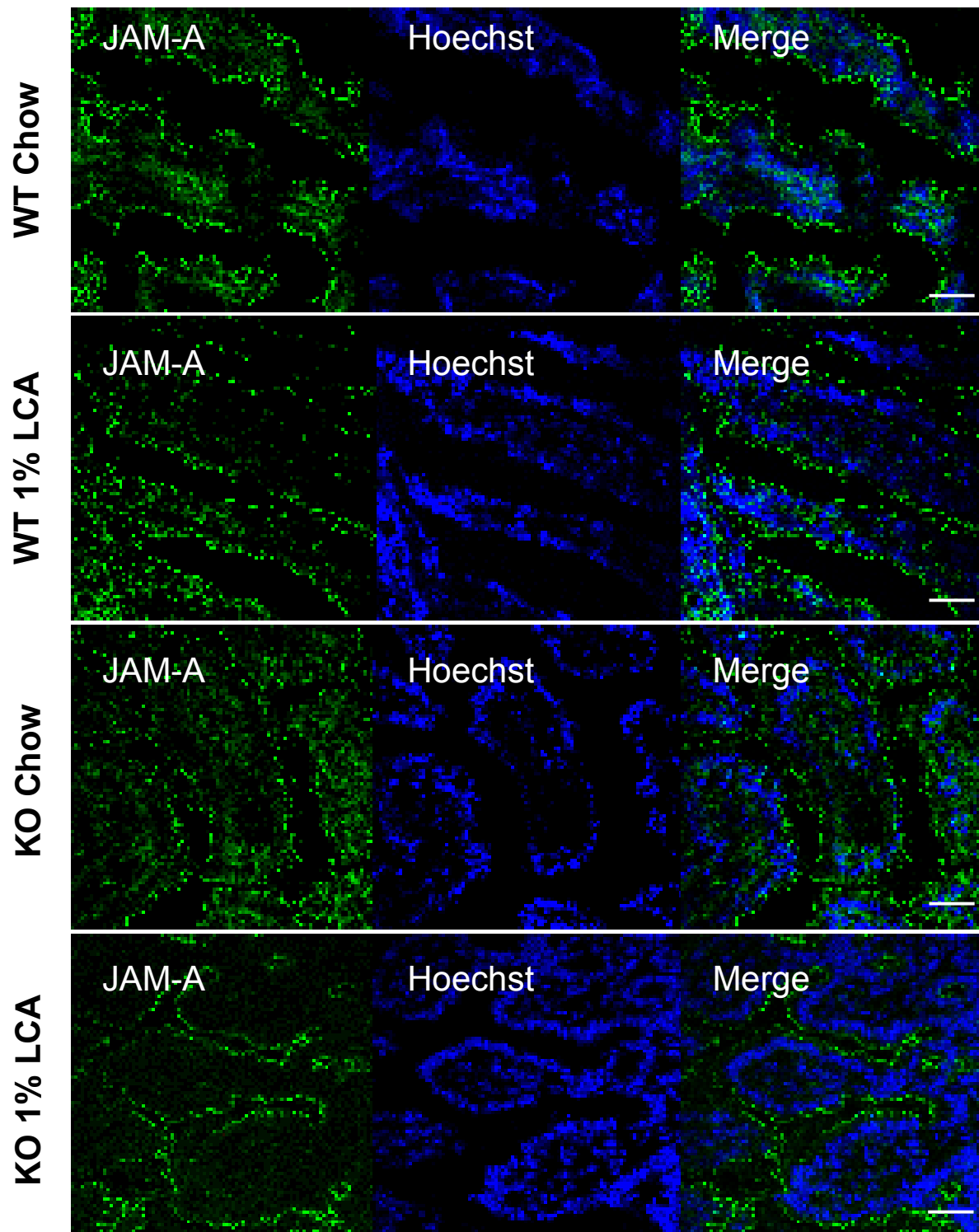


Abb. 9: Immunfluoreszenz Färbung von JAM-A im Jejunum

Das Junctional Adhesion Molecules (JAM-A, grün) wurde durch den entsprechenden Antikörper gefärbt (n= 4-5/Gruppe) an Schnitten aus dem Jejunum von Wildtyp (WT) und $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ (KO) Mäusen nach Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung. Der Farbstoff Hoechst (blau) wurde für die Lokalisation der Zellkerne verwendet. Die Schnitte wurden für 15 Minuten mit 4% PFA behandelt und anschließend mit 0,1% Triton für 15 Minuten permeabilisiert. Dargestellt sind repräsentative Darmausschnitte pro Genotyp und Fütterung. Es zeigte sich kein Unterschied in der Expression auf Proteinebene. Balken = 50 μ m.

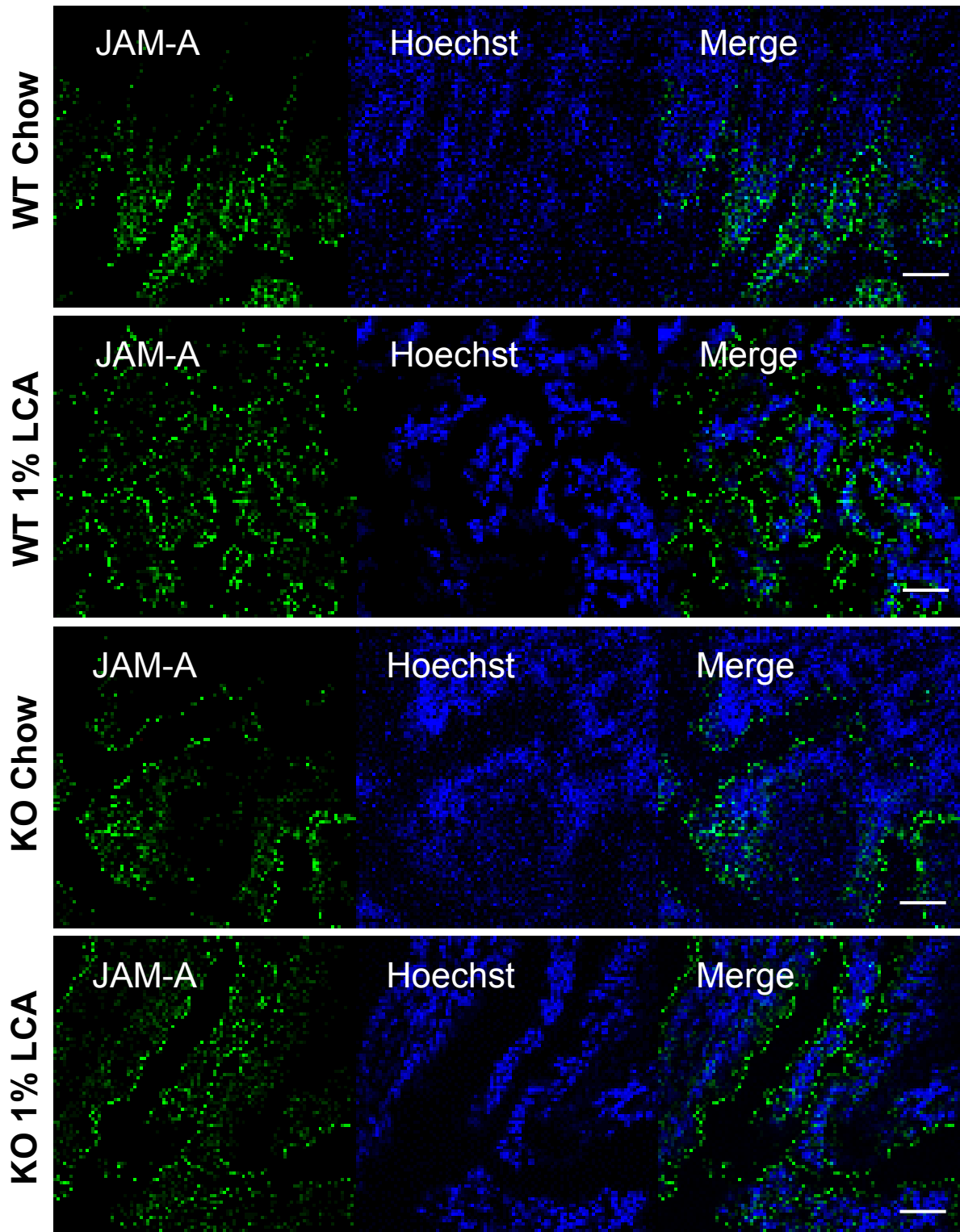


Abb. 10: Immunfluoreszenz Färbung von JAM-A im terminalen Ileum

Das Protein JAM-A, gekoppelt mit FITC (grün), wurde durch den entsprechenden Antikörper nach Protokoll gefärbt (n= 4-5/Gruppe). Die Schnitte stammen aus dem terminalen Ileum von Wildtyp (WT) und $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ (KO) Mäusen nach Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung. Der Farbstoff Hoechst (blau) wurde für die Lokalisation der Zellkerne verwendet. Dargestellt sind repräsentative

Darmausschnitte des terminalen Ileums pro Genotyp und Fütterung. Auch im terminalen Ileum wird kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen ersichtlich. Balken = 50 µm.

Im Rahmen der physiologischen Zellerneuerung kommt es zum sogenannten Shedding des Zonula-occludens Protein ZO-2. Dabei verteilt sich ZO-2 von der Tight Junction in Richtung der apikalen und dann basolateralen Zellregion um, was ungefähr 15 Minuten vor der Bewegung des Zellkerns aus der Epithelschicht geschieht (Guan et al. 2011). Dieser Prozess der Umverteilung von Tight Junction-Proteinen gestattet eine Versiegelung der von der ausgestoßenen Zelle hinterlassenen Epithellücke und erhält so die Barrierefunktion des Darmepithels aufrecht (Ngo, Neurath, and López-Posadas 2022). In der Immunfluoreszenzfärbung mit dem Tight Junction Protein ZO-2 zeigt sich besonders in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} der Prozess des „Cell Sheddings“ durch die teils grüne Färbung des an ZO-2 gekoppelten Antikörpers FITC im Bereich der apikalen und basolateralen Zellregion. Der Zellkern wurde durch den Antikörper Hoechst angefärbt.

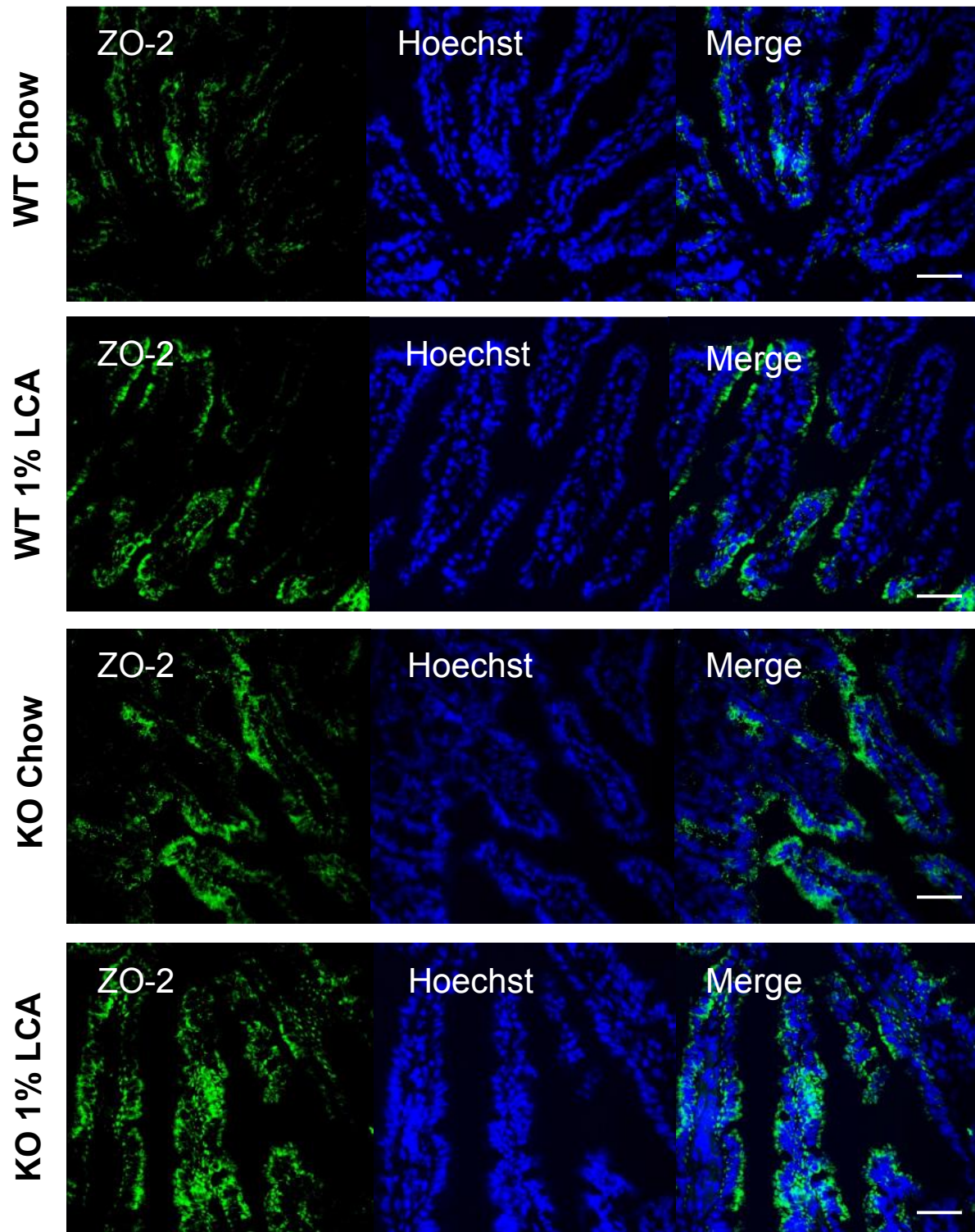


Abb. 11: Immunfluoreszenz Färbung Tight Junction ZO-2 im terminalen Ileum

Für die Färbung wurde der Primärantikörper ZO-2 (grün) verwendet und mit dem grünen Zweitantikörpern FITC gegengefärbt (n= 4-5/Gruppe). Hoechst (blau) wurde als Zellkernfarbstoff verwendet, um die Lokalisation der Tight Junction in der Zelle zu veranschaulichen. Die Schnitte stammen aus dem terminalen Ileum von Wildtyp (WT) und $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ (KO) Mäusen nach Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung. Die Färbung wurde analog der Immunfluoreszenzfärbung des Proteins JAM-A durchgeführt. Am deutlichsten lässt sich in den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ kann ein Cell Shedding

beobachten. Dargestellt sind repräsentative Darmausschnitte pro Genotyp und Fütterung. Balken = 50 μm .

Die Expression der Tight Junction Proteine JAM-A sowie Zonula occludens-1 (ZO-1) wurde zusätzlich auf mRNA Ebene untersucht. Bei der mRNA Expression von JAM-A ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp und $\text{TGR5}^{\text{Vil-Cre}(-/-)}$ Mäusen nach Placebo Fütterung sowohl im Jejunum (WT Placebo (n= 3) $1,2 \pm 0,1$ vs. KO Placebo (n= 4) $0,6 \pm 0,1$, 2-fache Abnahme; $p < 0,05$) als auch im terminalen Ileum (WT Placebo (n= 5) $2,9 \pm 0,3$ vs. KO Placebo (n= 6) $2,1 \pm 0,2$; 1,4-fache Abnahme; $p < 0,05$) festmachen. Zudem wurde im terminalen Ileum eine signifikante Zunahme der mRNA Expression nach LCA Fütterung bei den $\text{TGR5}^{\text{Vil-Cre}(-/-)}$ Mäusen (WT LCA (n= 5) $2,2 \pm 0,2$ vs. KO LCA (n= 5) $2,7 \pm 0,2$; 1,2-fache Zunahme; $p < 0,05$) sichtbar.

Im terminalen Ileum zeigte sich eine gegensätzliche Entwicklung der Expression von JAM-A nach der 1% LCA Fütterung. Die TGR5 Wildtyp Mäuse exprimierten um das 0,8-fache weniger JAM-A, während sich bei den $\text{TGR5}^{\text{Vil-Cre}(-/-)}$ Mäusen eine signifikante Zunahme um das 1,3-fache der mRNA Expression beobachten ließ. Bei der Expression von ZO-1 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in beiden Dünndarmabschnitten. Die große Varianz innerhalb der Gruppen lässt keine eindeutige Aussage zu den Ergebnissen zu.

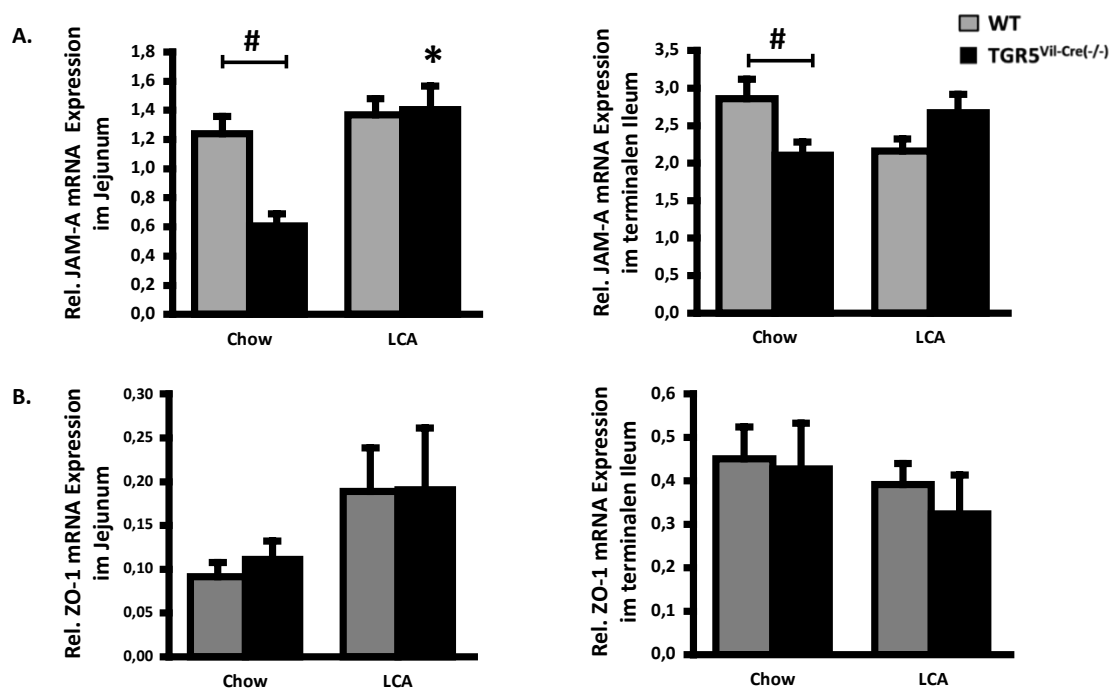


Abb. 12: mRNA Expression von JAM-A und ZO-1 im Dünndarm

Die mRNA Expression von JAM-A (A.) und ZO-1 (B.) im Jejunum und terminalen Ileum der Wildtyp (WT) und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse (n= 4-10/Gruppe) mit Placebo (Chow) oder 1% LCA (LCA) Fütterung wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. Im Dünndarm zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Expression von JAM-A mRNA nach der Placebofütterung zwischen den WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Tieren. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Placebogruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

3.4. Die Veränderungen in der Expression von Gallensäuretransportern nach Lithocholsäurefütterung

Der Gallensäuretransport im enterohepatischen Kreislauf läuft physiologisch zum großen Teil im terminalen Ileum über den apikal sitzenden Natrium-Cotransporter ASBT ab (Doring et al. 2012). Apikal sitzend nimmt ASBT Gallensalze aus dem Darmlumen auf und transportiert sie über das I-BAP (*Ileal Bile Acid Binding Protein*) durch das Plasma des Enterozyten. Basolateral werden die Gallensalze vom heterodimeren Transporter OST α /OST β weiter ins Pfortaderblut transportiert (Seward et al. 2003).

Daher wurde die Protein Expression des Gallensäuretransporter ASBT mittels Western-Blot in unterschiedlichen Dünndarmabschnitten genauer untersucht.

Nach Auswertung mit Densitometrie zeigte sich der Trend einer zunehmenden ASBT Proteinexpression im terminalen Ileum der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse nach der 1% LCA Fütterung (KO Placebo (n= 3) $0,08 \pm 0,03$ vs. KO LCA (n= 3) $0,12 \pm 0,01$). Zudem ließ sich die Tendenz einer Zunahme der Proteinexpression im Jejunum in der Kontrollgruppe nach der 1% LCA Fütterung beobachten (WT Placebo (n= 3) $0,03 \pm 0,01$ vs. WT LCA (n= 3) $0,05 \pm 0,02$).

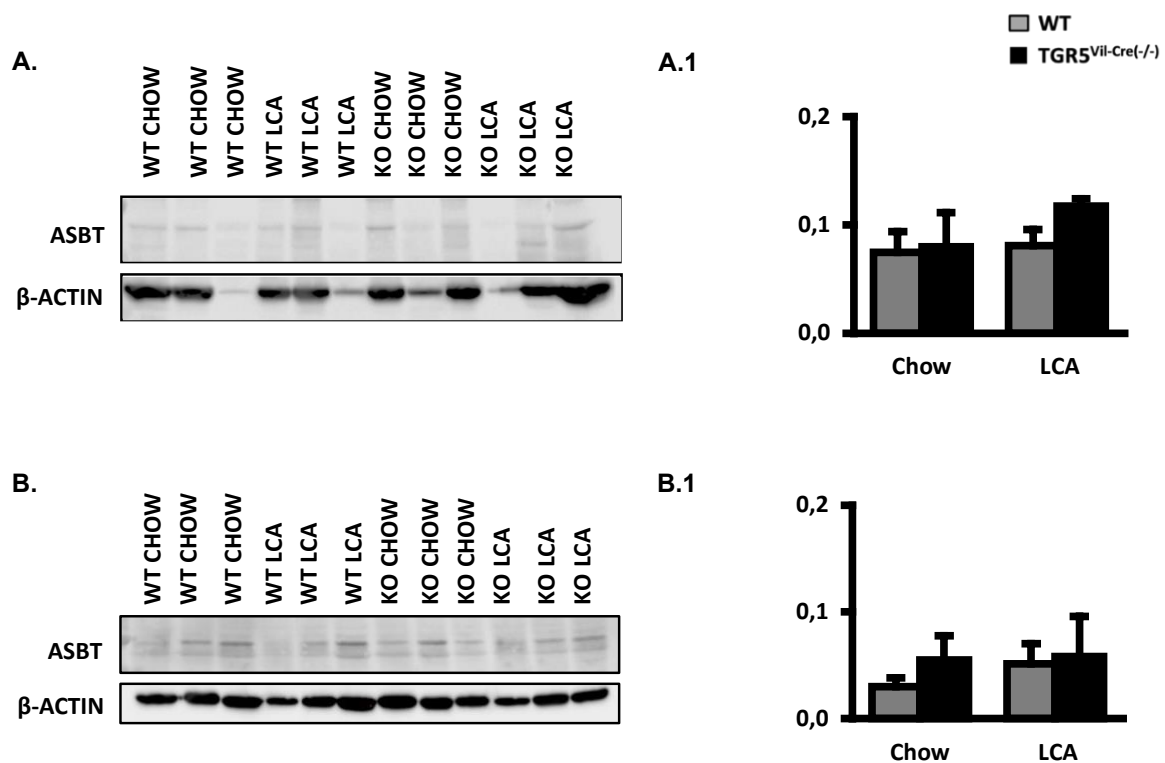


Abb. 13: Western Blot Untersuchung des Gallensalztransporters ASBT im Dünndarm

A. ASBT im Jejunum von Wildtyp (WT) und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (KO) Mäusen mit Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung nach 84h (n= 3). beta-Actin diente als Ladungskontrolle A.1. Auswertung des Western Blots im Jejunum mittels Densitometrie. Dabei wurde die Intensität von ASBT auf die Signalstärke von beta-Actin bezogen. Die WT Mäuse zeigen eine Zunahme der Proteinexpression. B. ASBT im terminalen Ileum von Wildtyp (WT) und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (KO) Mäusen mit Placebo (Chow) und 1% LCA (LCA) Fütterung nach 84h (n =3). beta-Actin diente als Ladungskontrolle. B.1. Auswertung des Western Blots im terminalen Ileum mittels Densitometrie. Dabei wurde die Intensität von ASBT auf die Signalstärke von beta-Actin bezogen. Nach der LCA Fütterung kam es zu einer Zunahme der Proteinexpression bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen. Für beide Western-Blots wurden 12%-Gele verwendet.

Neben der Proteinexpression wurde auch die mRNA Expression von ASBT untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme um das 2,6-fache der Expression bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen im terminalen Ileum nach LCA Fütterung (KO Placebo (n= 5) $6,8 \pm 1,4$ vs. KO LCA (n= 6) $2,6 \pm 0,8$; $p < 0,05$). Auch die Wildtyp Mäuse zeigten eine verringerte mRNA Expression um das 1,3-fache nach LCA Fütterung (WT Placebo (n= 5) $11,4 \pm 1,6$ vs. WT LCA (n= 6) $8,3 \pm 1,3$). Dennoch wurde ein signifikanter Unterschied bei beiden Genotypen deutlich (WT LCA (n= 6) $8,3 \pm 1,3$ vs. KO LCA (n= 6) $2,6 \pm 0,8$, 3,1-fache Differenz; $p < 0,05$).

Im Jejunum hingegen kam es bei den WT Mäusen zu keiner Veränderung der ASBT mRNA Expression nach 84h 1% LCA Fütterung. Die Versuchsgruppe der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse exprimierten die dreifache Menge an ASBT mRNA im Vergleich zu den Kontrollmäusen unter Placebo Fütterung (WT Placebo (n= 4) $0,03 \pm 0,02$ vs. KO Placebo (n= 7) $0,09 \pm 0,02$; 3-fache Differenz).

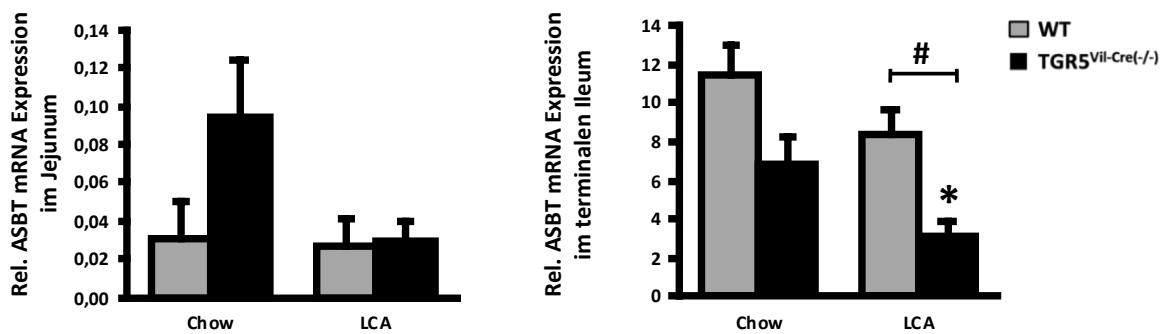


Abb. 14: mRNA Expression von ASBT im Dünndarm

Beide Genotypen zeigen eine Abnahme der mRNA Expression im terminalen Ileum nach LCA Fütterung. Ein signifikanter Unterschied kann zwischen den beiden Mausgruppen ausgemacht werden. Die mRNA Expression von ASBT im Jejunum und terminalen Ileum der beiden Mausgruppen (n= 4-8/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

Bei der mRNA Analyse von OSTalpha/OSTbeta wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen im Jejunum und terminalen Ileum deutlich. Nach der 1% LCA Fütterung zeigten sowohl die Wildtyp als auch die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse im Jejunum eine Zunahme der Expression von OSTalpha/OSTbeta mRNA (WT Placebo (n= 4) $4,9 \pm 1,4$ vs. WT LCA (n= 4) $6,3 \pm 1,3$; 1,3-fache Zunahme; $p > 0,05$, KO Placebo (n= 4) $4,1 \pm 1,0$ vs. KO LCA (n= 4) $7,0 \pm 1,3$; 1,7-fache Zunahme; $p > 0,05$). Dieser Trend zeigte sich ebenso bei beiden Genotypen im terminalen Ileum (WT Placebo (n= 4) $8,9 \pm 1,5$ vs. WT LCA (n= 4) $18,2 \pm 4,9$; 2,1-fache Zunahme; $p > 0,05$, KO Placebo (n= 4) $7,8 \pm 0,9$ vs. KO LCA (n= 4) $12,7 \pm 2,3$; 1,6-fache Zunahme; $p > 0,05$).

Außerdem ließ sich beim Transkriptionsfaktor GATA4, welcher die Reabsorption von Gallensalzen über den Transporter ASBT beeinflussen kann (Out et al. 2015), im

Dünndarm kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen sowohl nach Placebo als auch nach LCA Fütterung erkennen.

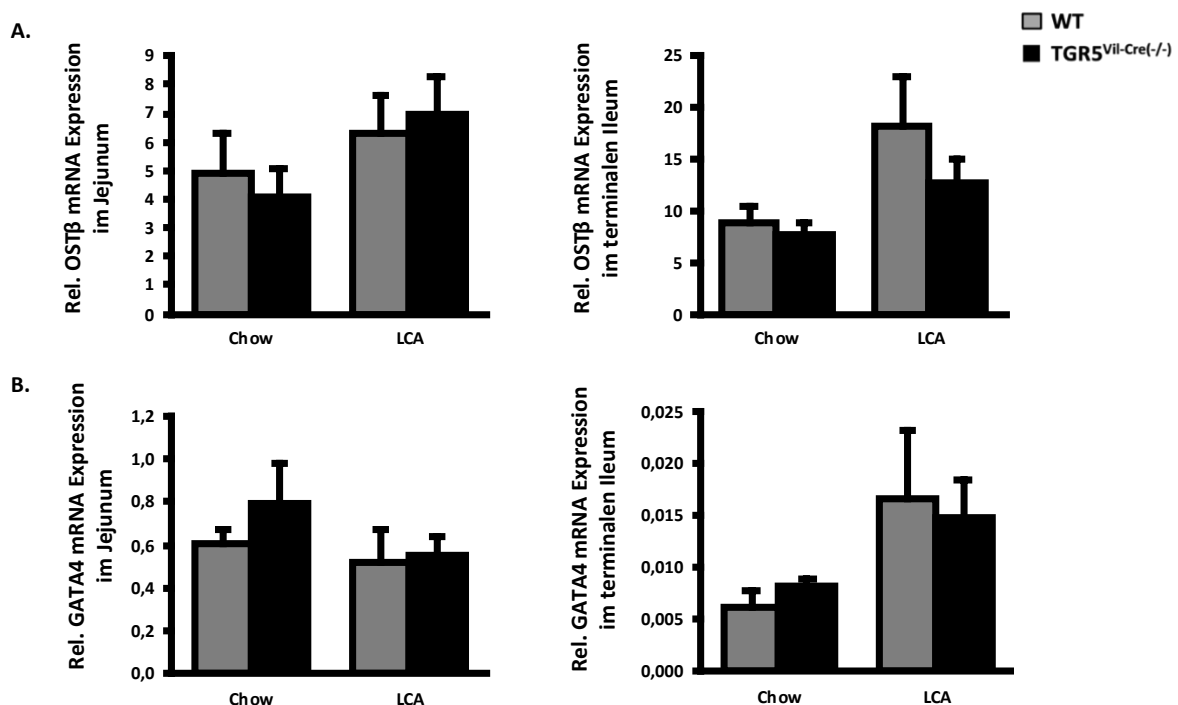


Abb. 15: mRNA Expression von OST α /OST β im Dünndarm

A. Die mRNA Expression des Transporters OST α /OST β im Jejunum und terminalen Ileum der beiden Mausgruppen (n = 4-8/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. B. Die mRNA Expression des Transkriptionsfaktors GATA4 im Jejunum und terminalen Ileum der beiden Mausgruppen (n= 4-8/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. Es ließ sich kein Unterschied zwischen den Genotypen feststellen.

Als Transkriptionsfaktor beeinflusst der nukleäre Gallensalzrezeptor FXR im Darm neben der Genexpression von ASBT und OST α /OST β (Dawson, Lan, and Rao 2009) auch *Fibroblast Growth Factor 15* (FGF15). Dieses Mausprotein ist vergleichbar dem menschlichen FGF19 (Nishimura et al. 1999) und übernimmt im enterohepatischen Kreislauf die Funktion eines Hormons. Daher können Gallensalze über FXR die Transkription von FGF15 beeinflussen, welches wiederum in der Leber die Expression von CYP7a1 und die Gallenblasenfüllung regulieren kann (Kliwer and Mangelsdorf 2015).

Die Untersuchung von FXR erfolgte im Darm mittels Realtime-PCR und Western Blot. Das mRNA Expressionsmuster von FXR im Dünndarm von Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen war nach LCA Fütterung gegensätzlich. Während es im Jejunum der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse zu einer signifikanten Zunahme um das 1,4-fache der mRNA Expression nach der 1% LCA Fütterung kam (WT LCA (n= 5) $0,9 \pm 0,1$ vs. KO LCA (n= 9) $1,3 \pm 0,1$; 1,4-facher Anstieg; $p < 0,05$) nahm die Expression der mRNA im terminalen Ileum im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen signifikant um das 1,5-fache ab (WT LCA (n= 6) $3,3 \pm 0,4$ vs. KO LCA (n= 7) $2,2 \pm 0,2$; 1,5- Abnahme; $p < 0,05$). Die Wildtyp Mäuse zeigten hingegen im terminalen Ileum nach 1% LCA Fütterung eine signifikante Zunahme der Expression von FXR mRNA um das 1,5-fache (WT Placebo (n= 4) $2,3 \pm 0,3$ vs. WT LCA (n= 6) $3,3 \pm 0,4$; 1,5-fache Zunahme $p < 0,05$). Die Proteinexpression des Gallensalzrezeptors zeigte in den Western Blots des Dünndarms der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse keinen Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen.

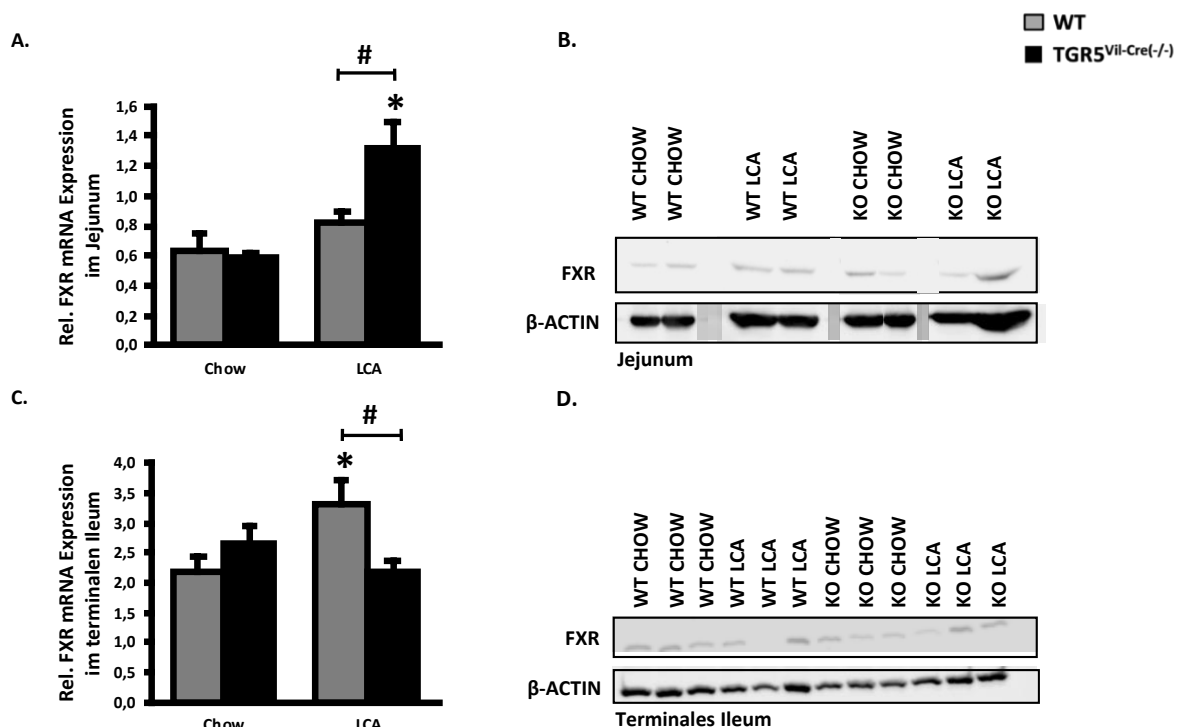


Abb. 16: Relative FXR mRNA- und Proteinexpression im Dünndarm

A. Zu beobachten war eine signifikante Zunahme der mRNA Expression nach LCA Fütterung bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen. Die mRNA Expression des nukleären Gallensalzrezeptors FXR im Jejunum der beiden Mausgruppen (n= 4-9/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode untersucht. B. Western Blot mit Lysaten hergestellt aus Jejunum mit FXR-Antikörper (Abcam (n= 2)). Dabei wurde die Intensität von FXR auf die

Signalstärke von beta-Actin bezogen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. C. Die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse exprimierten signifikant weniger FXR mRNA im terminalen Ileum als die Wildtypen (n = 4-8/Gruppe). Die Analyse erfolgte nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. D. Western Blot mit Lysaten hergestellt aus dem terminalen Ileum der beiden Mausgruppen (n= 3). Dabei wurde die Intensität von FXR (Abcam) auf die Signalstärke von beta-Actin bezogen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Für beide Western-Blots wurden 12%-Trenngele mit 5% Sammelgelen verwendet. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

Bei der Realtime-PCR Untersuchung der mRNA Expression des *Fibroblast Growth Factors 15* im terminalen Ileum zeigte sich ein signifikanter Anstieg um das 2,8-fache der mRNA Menge nach dem 1% LCA Fütterungsversuch bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)}Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen (WT LCA (n= 4) $0,5 \pm 0,2$ vs. KO LCA (n= 5) $1,5 \pm 0,3$, $p < 0,05$).

Im Jejunum lässt sich FGF15 nur in sehr geringem Maße nachweisen (Zhang et al. 2013), weshalb hier auf eine Untersuchung des Gewebes verzichtet wurde.

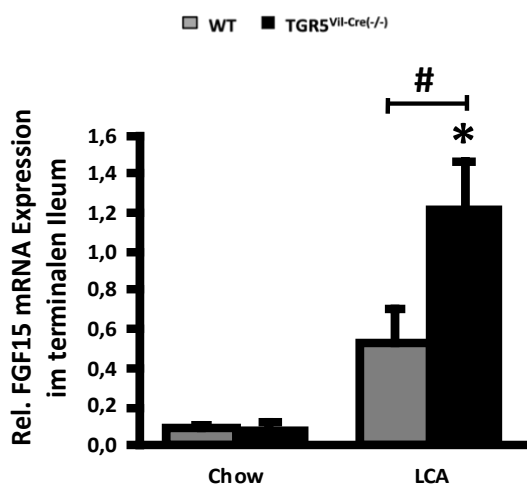


Abbildung 17: mRNA Expression von FGF15 im terminalen Ileum

Die FGF15 mRNA Expression im terminalen Ileum (n = 4-5/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mittels qRT-PCR-Methode ausgewertet. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

3.5. Die Auswirkung der 1%-LCA Fütterung auf die Lebern der TGR5 Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse

Neben den Auswirkungen des TGR5 Knockouts im Darm der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse auf das Darmepithel wurden die Auswirkungen des Knockouts nach Placebo und 1% LCA Fütterung in der Leber und in den Gallengängen untersucht.

In vorausgehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass das Leber- und Gallengangsepithel der TGR5^(-/-) Mäuse einen schwereren Schaden nach 84h 1% LCA Fütterung aufwiesen im Vergleich zu den Wildtyp Kontrolltieren. Anhand der serologischen Leberparameter GOT und GPT, des portalen Drucks und der histologischen Auswertung des Leberparenchyms wurde der Schaden der Wildtyp Mäuse mit dem der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse verglichen. Zudem wurde bei der Untersuchung des portalvenösen Drucks deutlich, dass TGR5 durch Modulation der Expression von Endothelin-1 einen Einfluss auf den portalvenösen Druck hat (Klindt et al. 2019).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die Lebern der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse mit denen der Wildtyp Mäuse nach Placebo und nach 1% LCA Fütterung untersucht. Zudem erfolgte eine Analyse der Serumwerte und Lebermorphologie, um eine Aussage über den Schädigungszustand der Leber zu treffen.

In der Serumanalyse wurde deutlich, dass es zwar nach 1% LCA Fütterung zu einem signifikanten Anstieg der Nekroseparameter GOT (WT LCA (n= 16) 6654,4 ± 942,6 IU/l vs. KO LCA (n= 6) 6566 ± 695,5 IU/l, p> 0,05), GPT (WT LCA (n= 17) 4402,4 ± 509,9 IU/l vs. KO LCA (n= 6) 3803,0 ± 565,5 IU/l, p> 0,05) und LDH (WT LCA (n= 17) 41238,5 ± 8351,4 IU/l vs. KO LCA (n= 6) 25448,3 ± 3173,4 IU/l, p> 0,05) kam, es sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen zeigte. Die Syntheseleistung der Leber, welche mithilfe des totalen Proteins (T-Pro, WT LCA (n= 15) 4,2 ± 0,2 g/dl vs. KO LCA (n= 5) 4,8 ± 0,8 g/dl, p> 0,05) und der Albuminkonzentration (Alb, WT LCA (n= 15) 1,8 ± 0,1 g/dl vs. KO LCA (n= 5) 1,6 ± 0,2 g/dl, p> 0,05) im Serum untersucht wurde, war auch nach Lithocholsäurefütterung nicht beeinträchtigt.

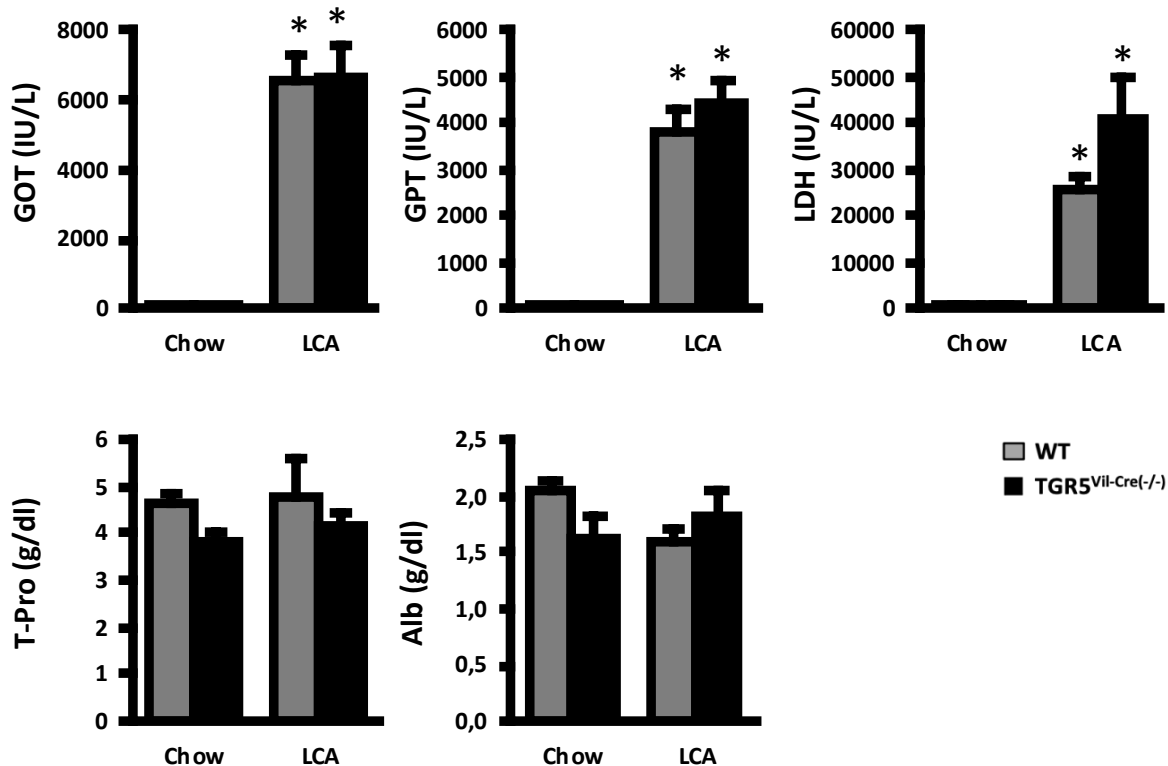


Abb. 18: Analyse der Leberwerte im Serum der WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse nach 84h Placebo und 1% LCA Fütterung

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Lactatdehydrogenase (LDH) wurden zur Beurteilung des Leberschadens verwendet. Die Syntheseleistung wurde mittels Totalprotein (T-Pro) und Albuminkonzentration (Alb) analysiert. Die Quantifizierung der Serumwerte erfolgte mit Hilfe des Spotchem SP-4430 Analyzer der Firma AxioLab aus Stuttgart (n= 5-19). Daten sind dargestellt als MW + SEM. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe des gleichen Genotyps

Neben den Serumparametern erfolgte die Analyse der Leber mit Hilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung, die die nekrotischen Areale sichtbar machte. Ähnlich den Ergebnissen der Arbeiten von Fickert et al. 2006 und Klindt et al. 2019 zeigten sich Charcot-Gombault-Nekrosen (Galle Infarkte) im Lebergewebe beider Mausgenotypen nach der 84-stündigen LCA Fütterung. Mittels mikroskopischer Analyse ließ sich kein Unterschied zwischen den WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen ausmachen, daher wurde auf eine genaue Bestimmung der Größe der Nekroseareale verzichtet.

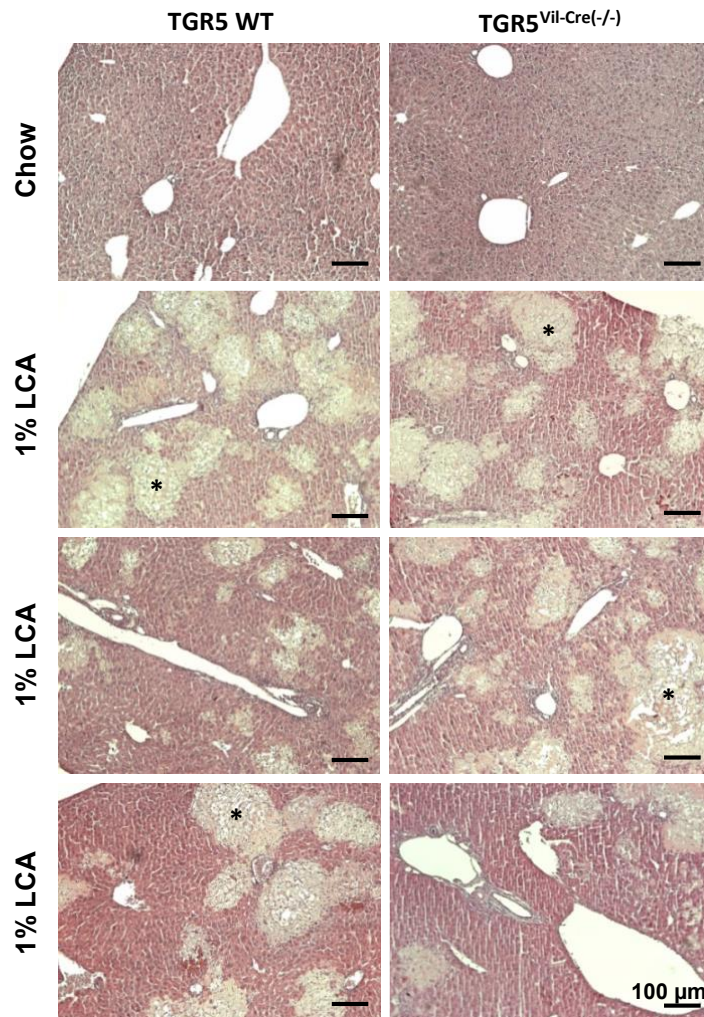


Abbildung 19: Histopathologische Auswertung der Lebern der TGR5 WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen

A. Die Lebern wurden nach 84h Fütterungsversuch entnommen, in 4 % Formalin fixiert und mit HE gefärbt (n= 4-6/Gruppe). * zeigen beispielhafte Areale mit Charcot-Gombault Nekrosen, die nach Lithocholsäurefütterung ubiquitär in der Leber zu finden sind. Balken = 100 μ m.

Bei der Analyse zur mRNA Expression des vasokonstriktorisches Peptidhormons Endothelin-1, welches von hepatischen Sternzellen in der Leber produziert wird und eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der portalen Hypertension in zirrhotischen Lebern spielt (Ezhilarasan 2020), zeigte sich bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} eine Zunahme um das 5-fache nach der LCA Fütterung (KO Placebo (n= 5) $0,004 \pm 0,001$ vs. KO LCA (n= 5) $0,02 \pm 0,005$; $p < 0,05$, jedoch erreichten diese Unterschiede aufgrund individueller Schwankungen keine Signifikanz (Abbildung 21, Abschnitt A). Des Weiteren wurde die relative mRNA Expression der Fibrosemarker TGF β , PDGFR α und PDGFR β (Zhou, Zhang, and Qiao 2014) untersucht (Abbildung 21, Abschnitt B). Sowohl nach Placebo als auch nach LCA Fütterung kam es bei beiden Genotypen zu signifikant reduzierter Expression der mRNA des Fibrosemarkers PDGFR α (WT Placebo (n= 5) $0,03 \pm 0,004$ vs. KO Placebo (n= 7) $0,001 \pm 0,03$, 30-fach weniger Expression bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)}; $p < 0,05$ und WT LCA (n= 5) $0,1 \pm 0,01$ vs. KO LCA (n= 7) $0,07 \pm 0,01$; 1,4-fach weniger PDGFR α bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)}; $p < 0,05$).

Diese signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp Mäusen und $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen zeigten sich auch bei der Expression von PDGFR β (WT Placebo (n= 5) $0,03 \pm 0,01$ vs. KO Placebo (n= 5) $0,01 \pm 0,002$; 3-fach weniger Expression bei den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$; $p < 0,05$, WT LCA (n= 5) $0,04 \pm 0,01$ vs. KO LCA (n= 5) $0,01 \pm 0,003$; 4-fach weniger Expression; $p < 0,05$).

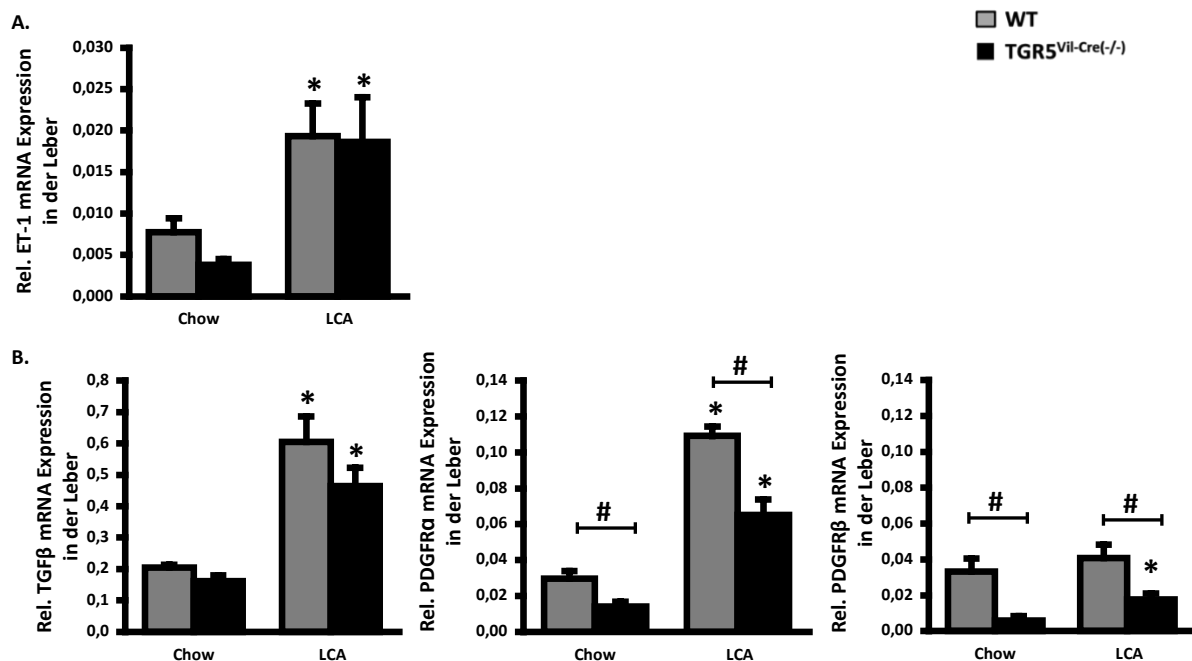


Abb. 20: Portale Hypertension und Fibrosemarker in der Leber von Wildtyp und $TGR5^{Vil-Cre-/-}$ Mäusen

Die RNA-Isolierung der Lebern fand mittels Maxwell 16 LEV simplyRNA Cell and Tissue Kit statt. Es folgte die cDNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mithilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der ΔCT -Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

Die Sirius-Rot-Färbung des Lebergewebes nach 84h LCA Fütterung zeigte eine leichte Zunahme der periportalen Kollagenablagerung (Abbildung 22, Abschnitt A). Eine Zunahme der Kollagenexpression nach LCA Fütterung ließ sich auch auf mRNA Ebene beider Mausgruppen beobachten. Hierbei kam es zu einer deutlich stärkeren mRNA Expression von Col1a1, Col1a2 und α -SMA nach LCA Fütterung, wobei die Zunahme von Col1a1 bei den Wildtyp Mäusen signifikant höher war als bei den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen. Bei Col1a2 als auch bei der mRNA des Fibrosemarkers α -SMA ließ sich die gleiche Tendenz nach LCA Fütterung beobachten (Col1a1: WT LCA

(n= 4) $13,9 \pm 2,7$ vs. KO LCA (n= 6) $5,5 \pm 0,9$; 2,5-facher Anstieg in WT LCA; $p < 0,05$; Col1a2: WT LCA (n= 4) $0,8 \pm 0,2$ vs. KO LCA (n= 4) $0,1 \pm 0,04$; 8-facher Anstieg in WT LCA; $p > 0,05$; α -SMA: WT LCA (n= 4) $0,5 \pm 0,1$ vs. KO LCA (n= 4) $0,3 \pm 0,1$; 1,7-facher Anstieg in WT LCA; $p > 0,05$)

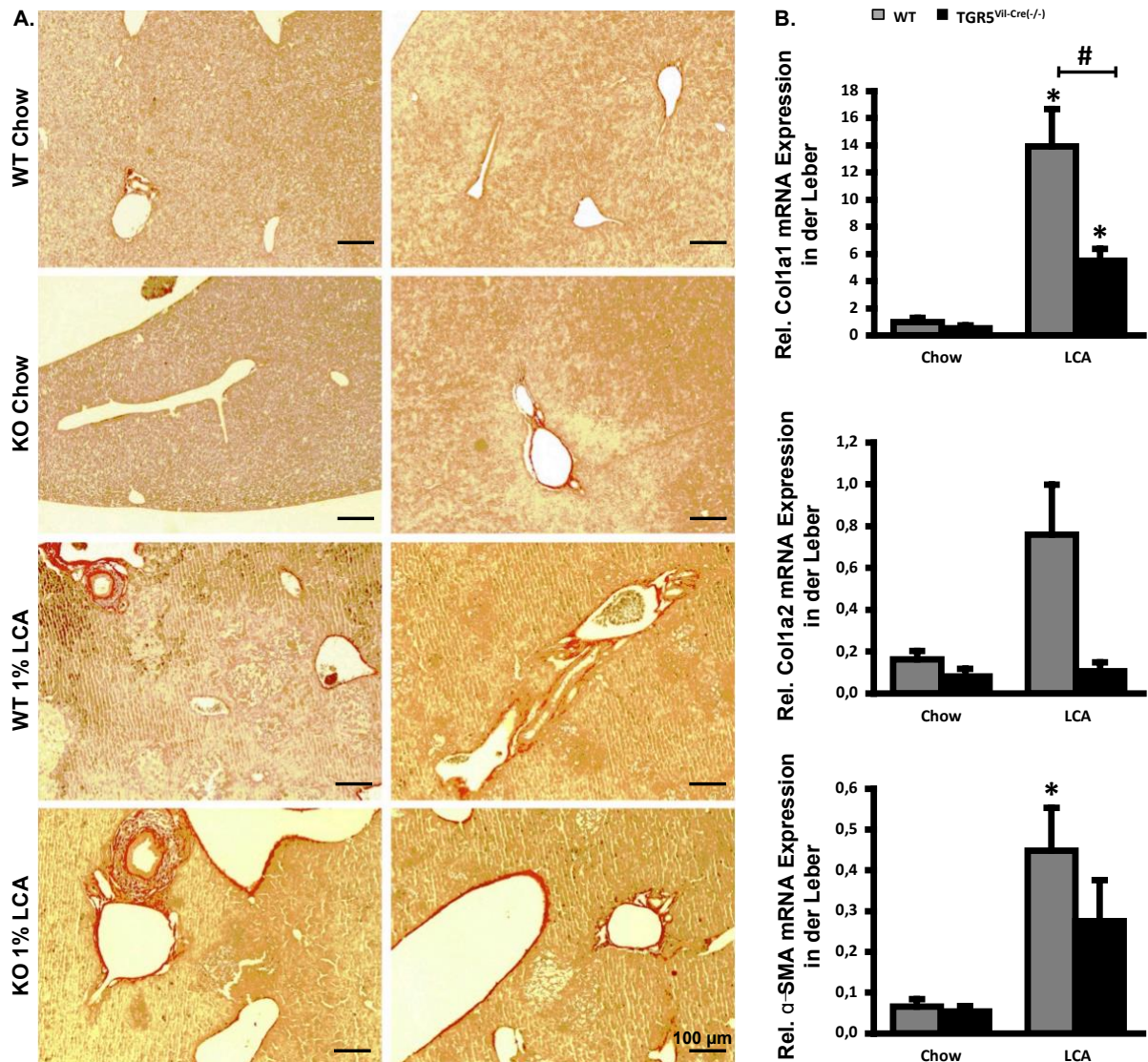


Abb. 21: Kollagenexpression in der Leber auf Protein- und mRNA-Ebene

A. Paraffinschnitte der Leber wurden mit dem Picrosirius Red Stain Kit der Firma Polysciences eingefärbt. Kollagenfasern zeigen sich hierbei in Rot. Balken = 100 μ m. B. Relative mRNA Expression der Fibrosemarker Col1a1, Col1a2 und α -SMA (n= 4-6) nach Placebo und 1% LCA Fütterung nach RNA Isolierung, cDNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

In der Abbildung 23 wurden die proliferierenden Zellen der Wildtyp und $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäuse mittels des spezifischen Proliferationsmarker PCNA (braun) nach 1% LCA Fütterung angefärbt. In den großen Gallengängen lassen sich keine Unterschiede in der Proliferation zwischen beiden Genotypen beobachten. In den kleinen Gallengängen der Wildtyp Mäuse ist eine erhöhte Tendenz an PCNA positiven Zellen zu beobachten. Diese Beobachtung ist auch in der Proteinanalyse mittels Western Blot nachvollziehbar. Hierbei weisen die Wildtyp Mäuse mehr PCNA Proteine in den Leberproben auf als die $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäuse (WT LCA (n= 3) $3,4 \pm 0,3$ vs. KO LCA (n= 3) $2,0 \pm 0,4$; 1,7-fache Differenz; $p > 0,05$). Das Ergebnis ist aufgrund der hohen Varianz in den Gruppen nicht signifikant. Zusätzlich zum Proliferationsmarker PCNA wurde ein Nekroptose-spezifischer Antikörper (RIPK3) (Orozco and Oberst 2017) verwendet, um die Menge der Zellen zu zeigen, die einem programmierten Zelltod unterliegen. Die Wildtyp Mäuse weisen mehr nekroptotische Zellen in der Leber nach Lithocholsäurefütterung auf als ihre Wurfgeschwister mit $TGR5$ Knockout im Darm (WT LCA (n= 3) $0,8 \pm 0,3$ vs. KO LCA (n= 3) $0,5 \pm 0,2$; 1,6-fache Differenz; $p > 0,05$). Die Ergebnisse wurden durch Densitometrie Auswertung quantifiziert.

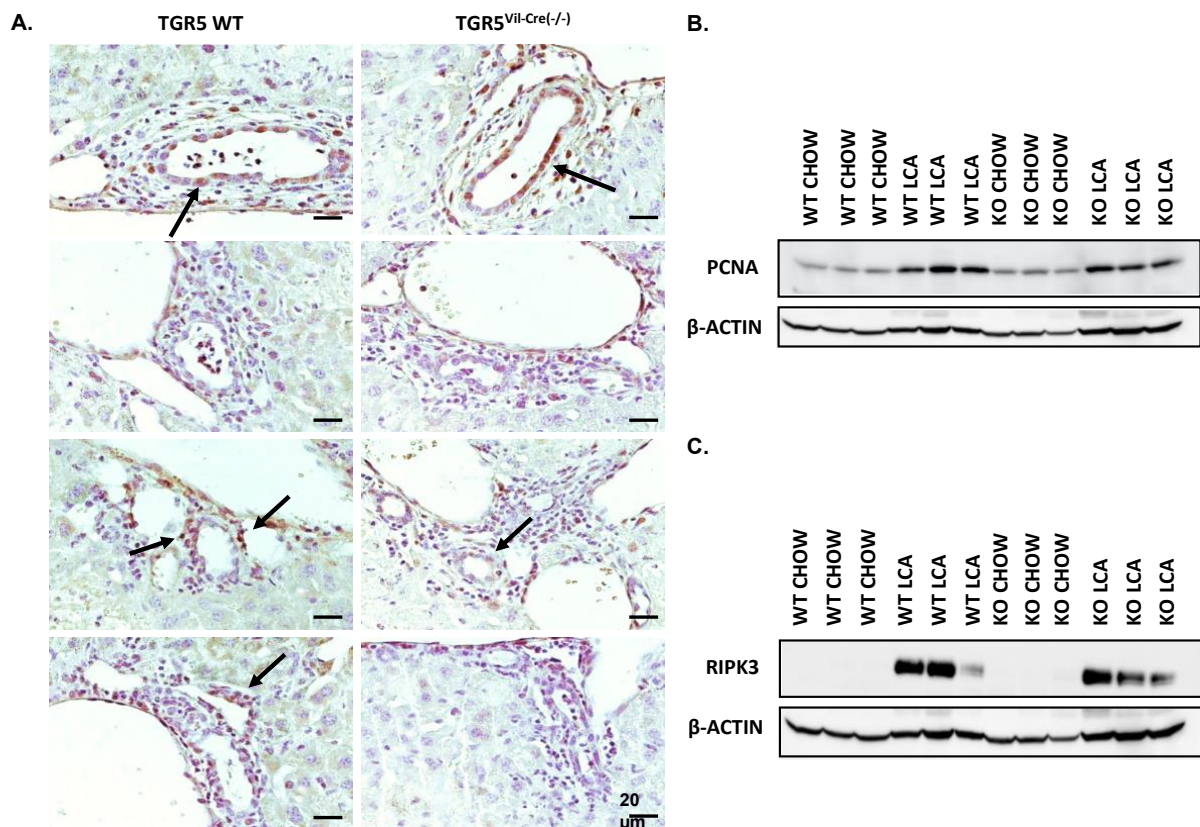


Abb. 22: Immunhistologische Auswertung und Western Blot spezifischer Proliferations- und Apoptosemarker in den Lebern der WT und $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen

A. Die Lebern der WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)}Mäuse wurden nach 1% LCA 84h entnommen, in 4 % Formalin fixiert und immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen PCNA (braun, mit Pfeil markiert) als Marker für die Zellproliferation angefärbt (n= 4-5/Gruppe). Balken = 20 µm. B. Western Blot mit Leberlysaten der Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (KO) Mäusen mit Placebo (Chow) und 1% LCA Fütterung (n= 3). Dabei wurde die Intensität von PCNA auf die Signalstärke von beta-Actin bezogen. C. Western Blot mit Leberlysaten der Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen mit Placebo (Chow) und 1% LCA Fütterung (n= 3). Dabei wurde die Intensität von RIPK3 auf die Signalstärke von beta-Actin bezogen. Für beide Western-Blots wurden 10%-Trenngele verwendet mit 5% Sammelgelen.

Das Aktin-bindende Protein Villin ist nicht nur in den Microvilli des Darmepithels lokalisiert, es wird auch im Pankreas und in den großen Gallengängen der Leber exprimiert (Robine et al. 1985). Um den spezifischen TGR5 Knockout in den Villin-exprimierenden Zellen bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen zu ergründen, wurde untersucht, ob es auch im hepatobiliären System zu einer Reduktion des Gallensalzrezeptors in den Villin-exprimierenden Zellen bei TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen kam.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper TGR5 (Thermo Fisher, Waltham, USA) und Villin (Chemicon, Temecula, USA) (Abbildung 24) zeigte, dass es zu keinem TGR5 Knockout in den Gallengängen der Leber kam. Villin war, wie laut aktuellem Forschungsstand (Ozeki et al. 2019) bekannt, nur in den großen Gallengängen der Leber nachweisbar. Für die Färbung wurden nur TGR5 Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse nach 84h Placebofütterung verwendet. In den kleinen Gallengängen ließ sich durch den Antikörper das Protein Villin nicht nachweisen.

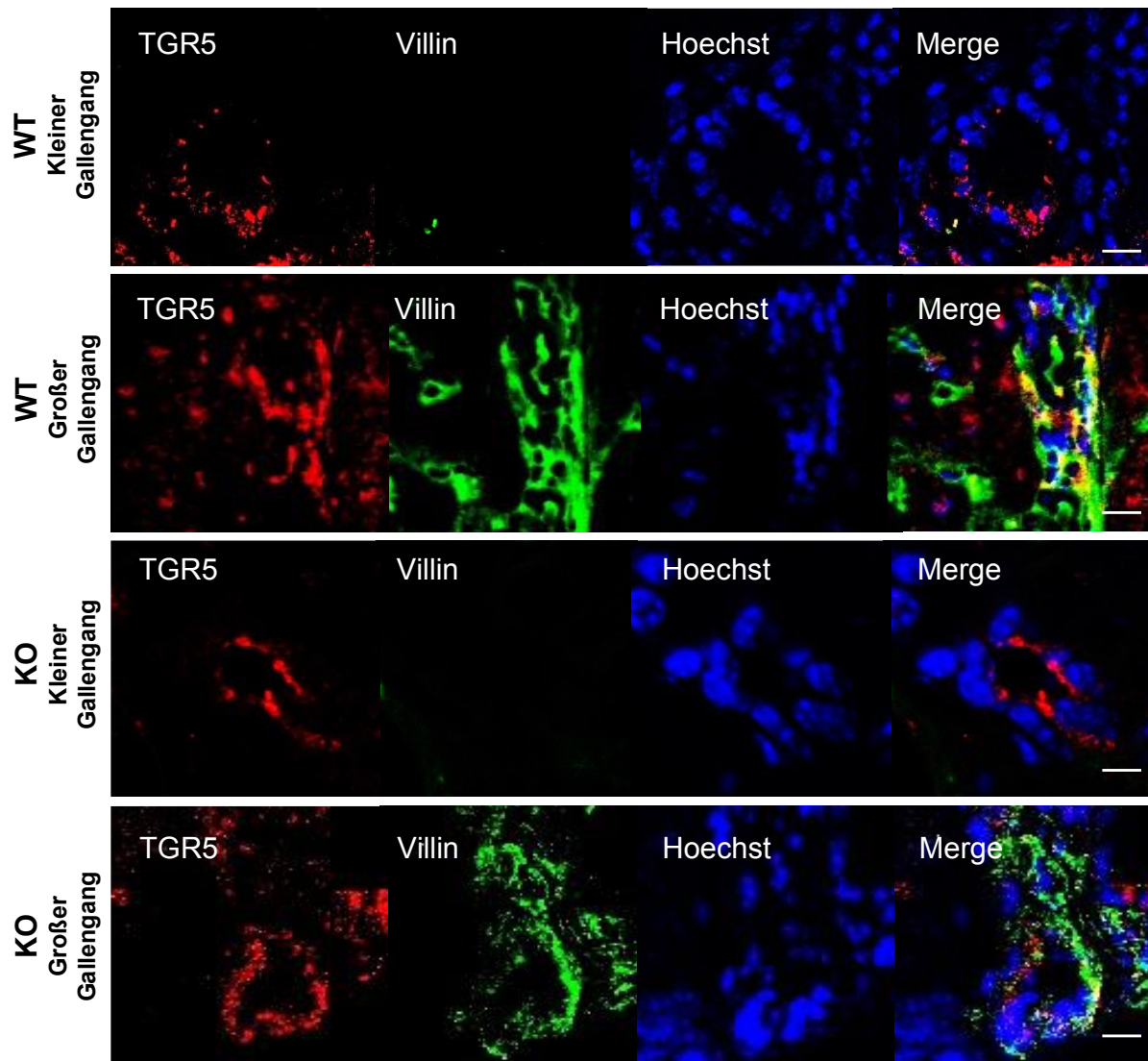


Abb. 23: TGR5 und Villin in Gallengängen der Leber von TGR5 WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden Kryoschnitte von Placebo (Chow) gefütterten WT und KO Mäusen mit 4% PFA fixiert und für 5 Minuten mit 0,1%-Triton-X-100 permeabilisiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern TGR5 (rot, Thermo Fisher, Waltham, USA) und Villin (grün, Chemicon, Temecula, USA) erfolgte bei 4°C über Nacht. (n= 4-5). Der Farbstoff Hoechst (blau) wurde für die Lokalisation der Zellkerne verwendet. Das Protein Villin war in den kleinen Gallengängen nicht nachweisbar. Balken = 50 µm.

Eine weitere Immunfluoreszenz Färbung (Abbildung 25) zeigte die Expression von TGR5 in Cholangiozyten. Dabei wurde TGR5 (rot) in diesen Zellen gegen den Cholangiozyten-spezifischen Marker CK-19 (grün) dargestellt. In beiden Mausgenotypen konnte TGR5 nach Placebo- und nach 1% LCA Fütterung nachgewiesen werden.

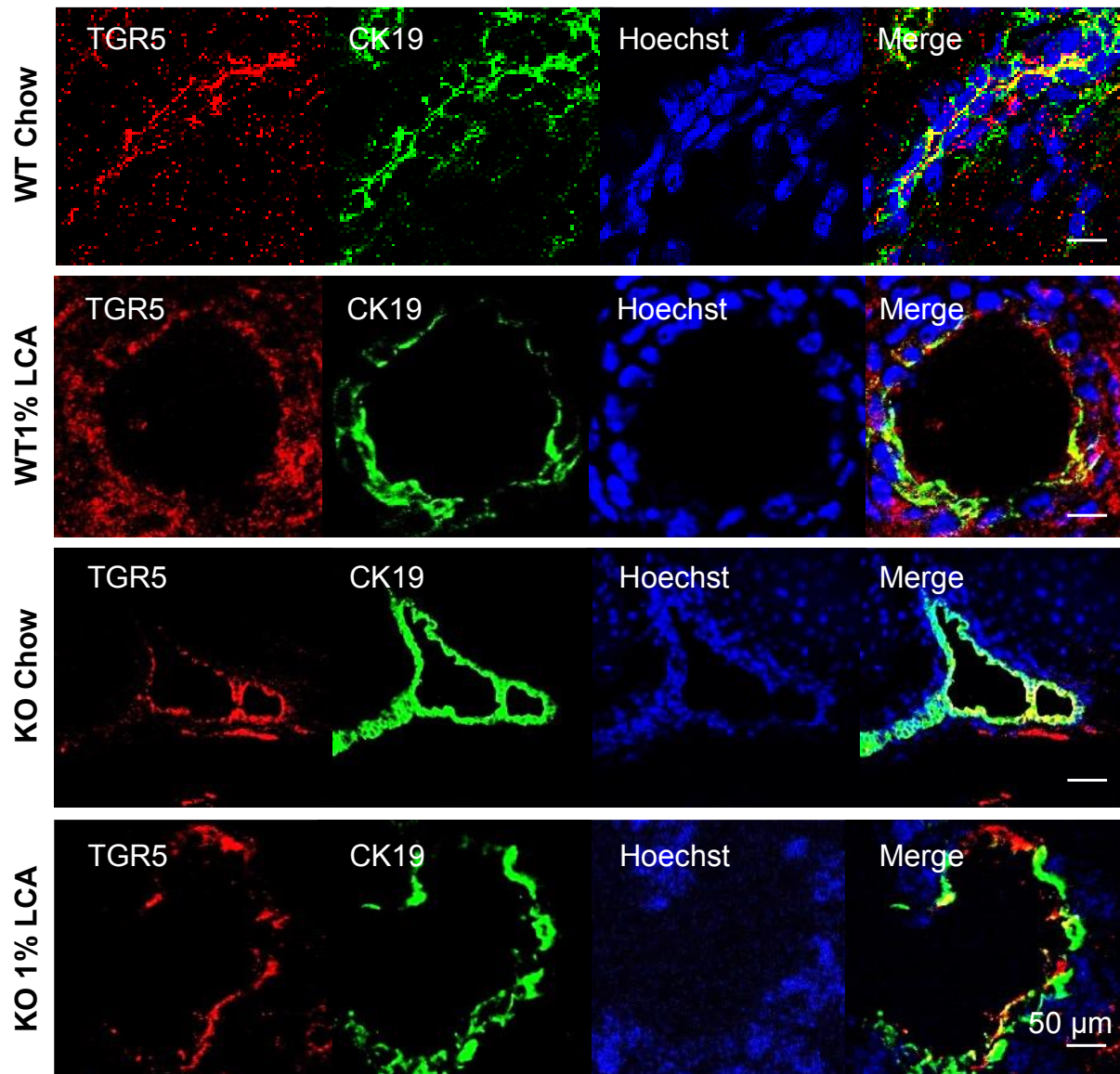


Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbung von TGR5 und des Cholangiozytenmarkers CK19 in Mauslebern

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Kryoschnitte der Leber von Placebo (Chow) gefütterten WT und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen (KO) mit 4% PFA fixiert und für 5 Minuten mit 0,1%-Triton-X-100 permeabilisiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern TGR5 (rot) und CK19 (grün) erfolgte bei 4°C über Nacht. (n= 4-5). Der Farbstoff Hoechst wurde für die Lokalisation der Zellkerne verwendet. TGR5 konnte in den Cholangiozyten der Leber bei allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Balken = 50 µm.

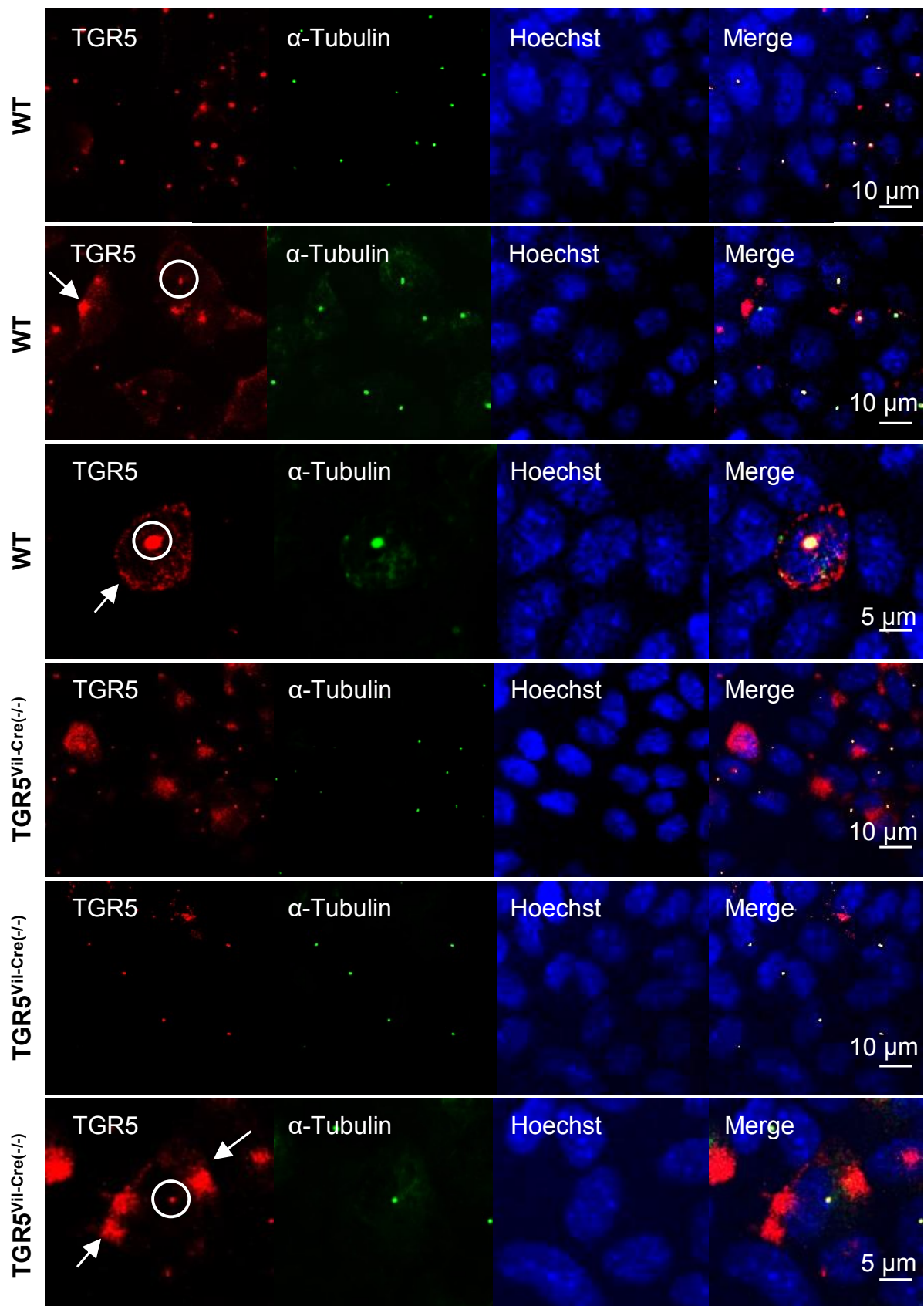


Abb. 25: Immunfluoreszenzfärbung TGR5 und α -Tubulin in isolierten murinen Cholangiozyten

Die Co-Färbung mit TGR5 (rot) und α -Tubulin (grün) zeigt die Lokalisation des Gallensalzrezeptors in der apikalen Membran (Pfeil) und im primären Zilium (Merge von TGR5 mit α -Tubulin) in Cholangiozyten

der Mäuse. Die Cholangiozyten wurden isoliert, mit 4% PFA für 3 Minuten fixiert und mit die unspezifischen Bindungsstellen mit 3% FCS/PBS geblockt, bevor sie mit den Primärantikörpern beladen wurden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt. Balken = 10 oder 5 μm .

In Cholangiozyten konnte TGR5 sowohl in der apikalen Membran als auch im primären Zilium lokalisiert werden (Keitel, Ullmer, and Haussinger 2010). Zilien sind Zellorganellen, die aus einem Zentriol und neun Mikrotubuluskdoubletten, auch Axonem genannt, bestehen und durch Vorwölbung in den Extrazellulärraum spezifische mechano-, osmo- und chemosensorische Signale in intrazelluläre Signale umwandeln können (Singla and Reiter 2006).

Die TGR5 Färbung gegen das α -Tubulin wurde an isolierten murinen Cholangiozyten durchgeführt. Die Gallengänge aus den Lebern der Mäuse wurden isoliert und in einer Kollagenschicht eingebettet. Das Kultivieren der Gallengänge erfolgte in speziellen Medien über einen Zeitraum von 4 Monaten. Die Co-Färbung (Abbildung 26) von TGR5 vs. α -Tubulin zeigte, dass TGR5 sowohl in den Zilien der Cholangiozyten als auch in der apikalen Membran der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mauslinie exprimiert wird. α -Tubulin wurde dabei als Markerprotein für das Axonem eingesetzt. Es wurden für die Immunfluoreszenzfärbung unstimulierte Cholangiozyten verwendet.

Zusätzlich wurde der TGR5 Knockout der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse auf mRNA Ebene in der Leber und speziell in den Cholangiozyten untersucht. Eine signifikant zunehmende um das 2,3-fach erhöhte Expression TGR5 mRNA nach der LCA Fütterung in der Leber wurde nach Bezug der Real-Time Ergebnisse auf das Housekeeping Gen HPRT und das Housekeeping Gen GAPDH deutlich (KO Placebo (n= 4) $0,3 \pm 0,1$ vs. KO LCA (n= 5) $0,7 \pm 0,004$; $p < 0,05$). Insgesamt zeigten die mRNA Level des membranständigen Gallensalzrezeptors in der Leber keine Unterschiede zwischen den TGR5 Wildtypen und den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen.

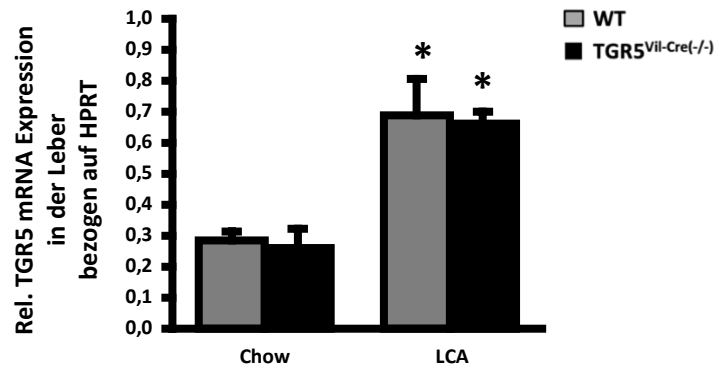


Abb. 26: TGR5 mRNA Level in der Leber nach LCA Fütterung

Die mRNA Level des membranständigen Gallensalzrezeptors TGR5 in der Leber zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, nach der 1% LCA Fütterung kommt es zu einer bis 2,3-fach erhöhten Expression von TGR5 mRNA. Die Analyse der relativen mRNA Expression von TGR5 nach Placebo und 1% LCA Fütterung erfolgte nach RNA Isolierung, cDNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 und auf GAPDH berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level und zur Vergleichbarkeit in dieser Abbildung in Prozent angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe (n= 4-5).

Um die TGR5 Expression in den Cholangiozyten zu analysieren, wurden die Gallengangszellen nach angegebenem Protokoll (s. Material und Methoden) isoliert und mithilfe des FACS in *biliary epithelial cells* (BEC) und *non-parenchymal cells* (NPC) gesortet. Zu BEC zählen unter anderem TGR5 exprimierende Zellen wie Kupfferzellen (KC) und Sinusendothelzellen (Reich et al. 2016). Danach wurde aus den Proben RNA gewonnen und die mRNA Menge der Cholangiozyten und NPCs mittels der qRT-PCR analysiert. Die Proben der TGR5 Wildtypen und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen, wurden um einen weiteren Mausgenotypen ergänzt, um die Ergebnisse besser vergleichen und validieren zu können. Bei diesem Mausgenotypen TGR5^(-/-), der im Paper von Klindt et al. (2019) näher beschrieben wird, handelt es sich um einen TGR5 Knockout, bei dem das TGR5 Gen in allen Zellen des Körpers deletiert ist.

In Abbildung 28 Abschnitt A wurde der Primer für das TGR5 Gen auf das Housekeeping Gen HPRT bezogen, um die Menge an TGR5 mRNA in den BEC und NPC Proben deutlich zu machen. Es zeigte sich in den *biliary epithelial cells* der Wildtypen mehr TGR5 mRNA Expression (1,4-facher Anstieg) als in denen der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen. Bei den Tieren mit dem unspezifischen TGR5^(-/-) war keine TGR5 mRNA Expression zu beobachten. In den NPC zeigte sich eine 1,6-fach

vermehrte mRNA Expression von TGR5 in den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen im Vergleich zu den Wurfgeschwistern.

In Abschnitt B wurde in den BEC Proben mittels des Primers für den Cholangiozytenmarker CK19 untersucht, ob die TGR5 mRNA aus Abschnitt A in allen Genotypen tatsächlich nur von Cholangiozyten stammt oder ob die Probe durch andere periphere TGR5 exprimierende Zellen (NPC) verunreinigt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die TGR5 mRNA in den Genotypen in fast gleichem Maße von den Gallengangszellen exprimiert wurde und somit kaum weitere TGR5 exprimierende Zellen in den Proben zu finden waren.

In Abschnitt C wurde anschließend die relative CK 19 mRNA Expression auf das Housekeeping HPRT bezogen. Es zeigte sich eine stärkere Expression von CK19 bezogen auf das Housekeeping (1,6-facher Anstieg) in den BEC der Wildtypen als in denen der Genotypen $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ und den $TGR5^{(-/-)}$.

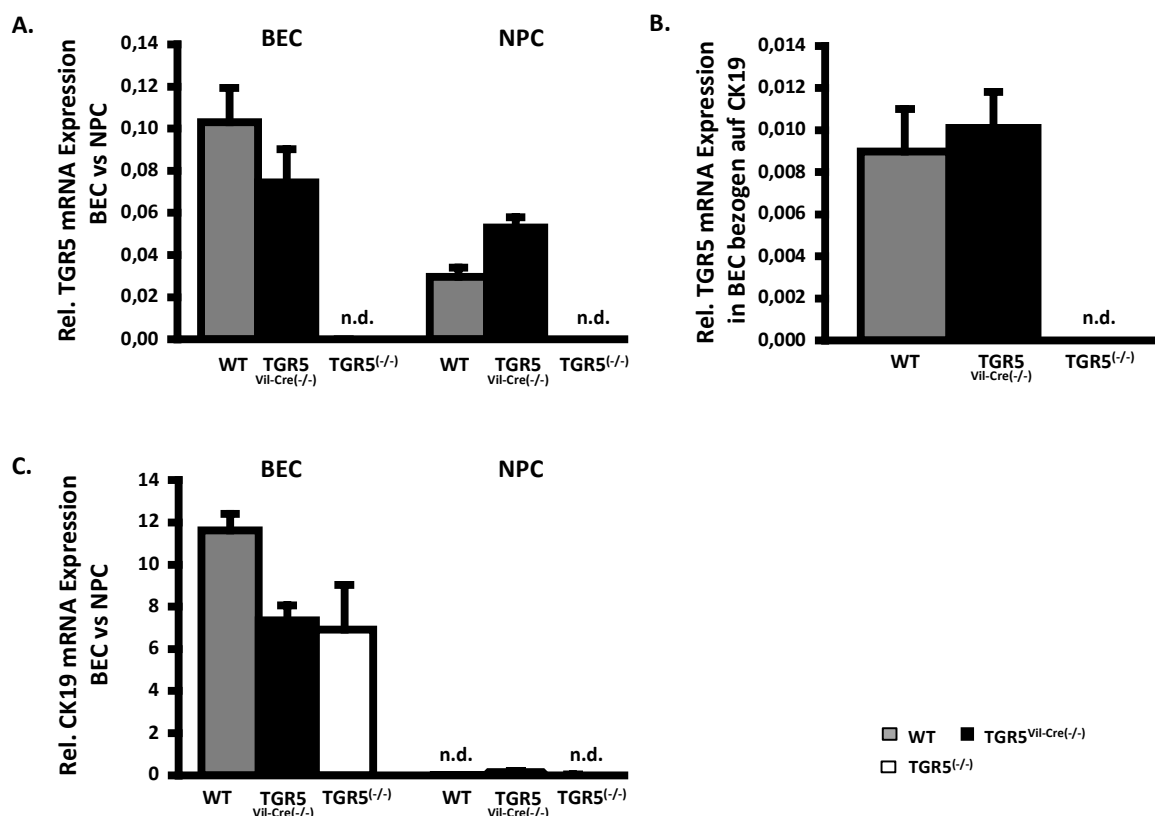


Abbildung 26: TGR5 und CK-19 mRNA Expression in biliary epithel cells (BEC) und non-parenchymal cells (NPC)

Abb. 27: TGR5 und CK-19 mRNA Expression in biliary epithel cells (BEC) und non-parenchymal cells (NPC)

A. Abschnitt A zeigt die relative Expression von TGR5 mRNA bezogen auf das Housekeeping-Gen HPRT in biliary epithelial cells (BEC) und non-parenchymal cells (NPC) der drei Genotypen Wildtyp (WT), $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ und $TGR5^{(-/-)}$. Es konnte keine TGR5 mRNA in den $TGR5^{(-/-)}$ Mäusen detektiert werden (n.d.). B. In Abschnitt B wird die TGR5 mRNA auf den Cholangiozytenmarker CK19 bezogen. C. Hierbei wurde die Expression von CK19 in den Proben auf das Housekeeping Gen HPRT bezogen. Abschnitt A-C. Nach Sortung von Leberproben der drei Genotypen am FACS in BEC und NPC, wurde aus den Proben RNA isoliert und diese mittels cDNA-Synthese aufbereitet. Die relative mRNA Expression von TGR5 und CK19 (n= 3-4/Gruppe) wurde mit Hilfe der qRT-PCR-Methode quantifiziert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der ΔCT -Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1, GAPDH oder zum Cholangiozytenmarker CK19 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben.

Neben dem membranständigen Gallensalzrezeptor TGR5 wurde auch der nukleär sitzende Gallensalzrezeptor FXR und die Gallensäuresynthese durch die Bestimmung von CYP7a1 in der Leber untersucht. Bei cholestatischen Verhältnissen in der Leber oder cholestatischen Erkrankungen wie der *Progressiven familiären intrahepatischen Cholestase* (PFIC) zeigt sich eine Reduktion in der Expression und in der Aktivität des Rezeptors (Keitel, Dröge, and Häussinger 2019). Auch bei den Experimenten konnte nach der 84-stündigen LCA Fütterung bei beiden Mausgenotypen sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA Ebene eine signifikante Reduktion von FXR mRNA gezeigt werden. $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen zeigten eine 5,2-fache Reduktion nach 1% LCA Fütterung (WT Placebo (n= 4) $2,6 \pm 0,2$ vs. WT LCA (n= 4) $0,7 \pm 0,1$; $p < 0,05$ und KO Placebo (n= 4) $2,6 \pm 0,3$ vs. KO LCA (n= 6) $0,5 \pm 0,1$; $p < 0,05$).

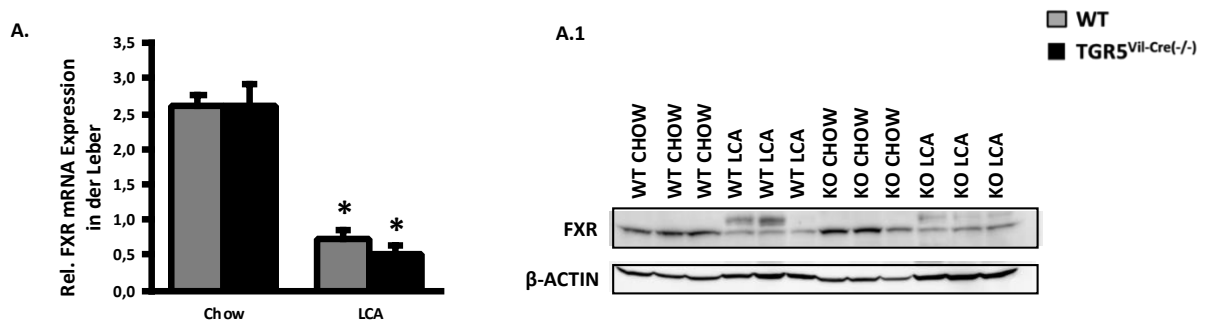


Abb. 28: Expression von FXR auf Protein- und mRNA Ebene in der Leber

A. Nach der LCA Fütterung wird die mRNA des nukleären Gallensalzrezeptors FXR in der Leber der beiden Mausgruppen (n = 4-6/Gruppe) signifikant weniger exprimiert. Die Analyse erfolgte nach RNA Isolierung und reverser DNA-Synthese mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der ΔCT -Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. A.1. Western Blot mit Leberlysatproben und dem FXR-Antikörper von Abcam (n= 3/Gruppe). Dabei wurde die Intensität von

FXR auf die Signalstärke von beta-Actin bezogen. Es wurde ein 12%-Trenngel mit einem 5% Sammelgel verwendet. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe.

Die hepatische Gallensäuresynthese wird durch Feedbackmechanismen von Gallensäuren gehemmt, die über den enterohepatischen Kreislauf in die Leber zurückkehren (Myant and Mitropoulos 1977). Der Feedbackmechanismus kann über verschiedene Wege funktionieren: stellvertretend hierfür wurde die Expression der Gene des FXR-SHP und des FGF15-FGFR4 abhängigen Wegs mithilfe von RT-Quantifizierung analysiert (Song et al. 2009). In Abbildung 30 wird deutlich, dass die Expression von CYP7a1 bei beiden Genotypen nach LCA Fütterung signifikant um das 1800-fache reduziert ist. Bei den Wildtypmäusen zeigte sich sowohl bei dem *small heterodimer partner* (SHP) eine Abnahme der mRNA Expression um die Hälfte als auch beim hepatischen *FGF receptor 4* (FGFR4) eine Abnahme der mRNA Expression um das 1,6 fache. Die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse zeigten hingegen bei beiden Rezeptoren nach LCA Fütterung eine Zunahme der Expression (SHP: KO Placebo (n= 6) $0,07 \pm 0,01$ vs. KO LCA (n= 5) $0,1 \pm 0,02$; 1,4-fache Zunahme der Expression, FGFR4; KO Placebo (n= 6) $0,3 \pm 0,01$ vs. KO LCA (n= 5) $0,4 \pm 0,1$; 1,3-fache Zunahme der Expression). Zudem wird deutlich, dass die Expression dieser zwei Rezeptoren nach der Placebofütterung bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen deutlich reduziert ist (SHP: WT Placebo (n= 6) $0,2 \pm 0,01$ vs. KO Placebo (n= 6) $0,07 \pm 0,01$, 2,8-fache Reduktion der Expression, FGFR4; KO Placebo (n= 6) $0,5 \pm 0,005$ vs. KO Placebo (n= 7) $0,3 \pm 0,02$; 1,6-fache Abnahme der Expression).

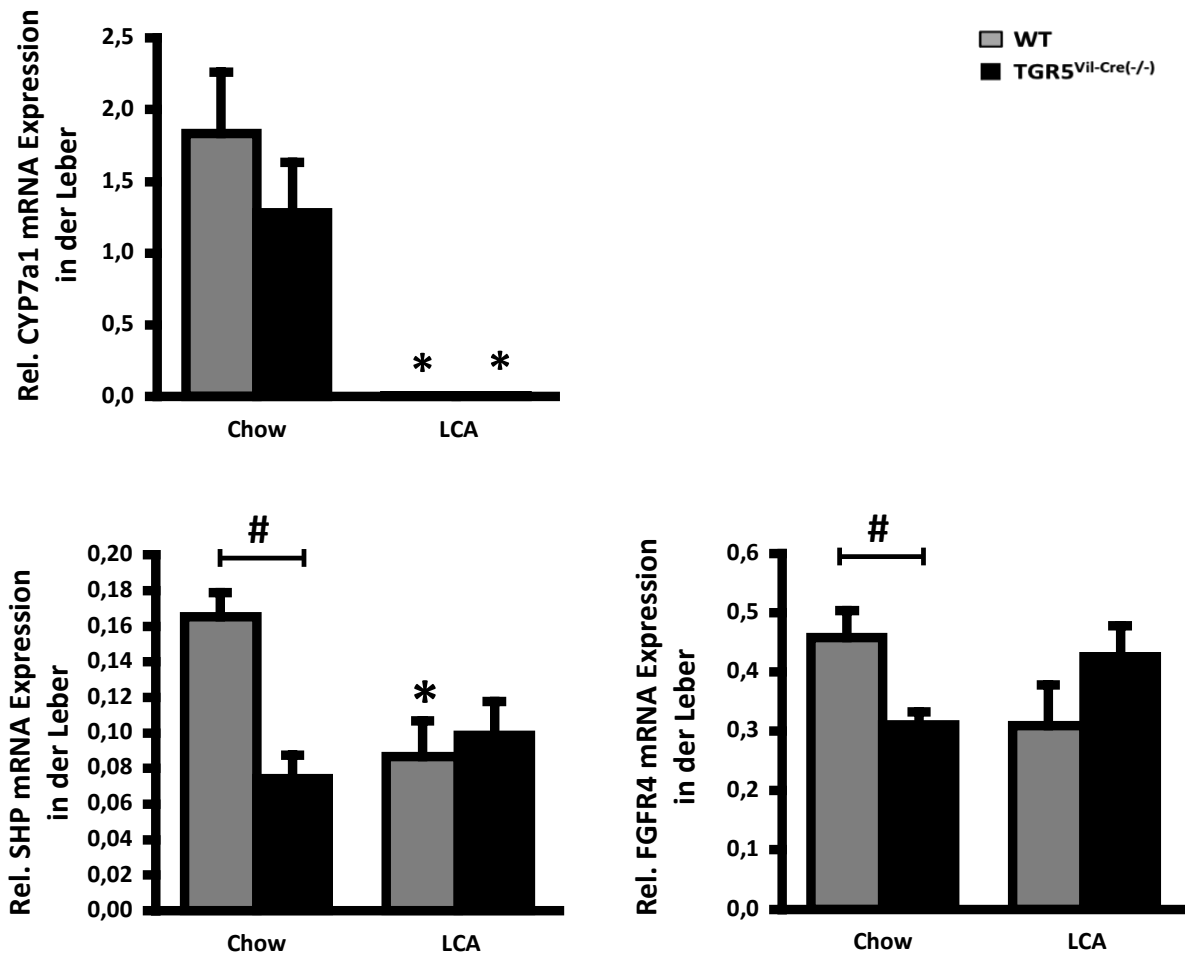


Abb. 29: Relative mRNA Expression von CYP7a1, SHP und FGFR4 in der Leber

Die mRNA Expression von CYP7a1, SHP und FGFR4 in der Leber der beiden Mausgruppen (n = 4-6/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. Die Wildtypmäuse zeigen nach LCA Fütterung eine Reduktion der mRNA Expression der verwendeten Gensequenzen. Die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion zu den Wildtypmäusen bei den Rezeptoren SHP und FGFR4 nach der Placebofütterung. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

3.6. Adaptive mRNA Expression der basolateralen und apikalen Gallensalztransporter nach der Lithocholsäure Fütterung

Fickert et al. zeigte in seiner Studie von 2006, dass eine Veränderung im Expressionsmuster von Gallensalztransportern eine mögliche adaptive Antwort der Leber auf den cholestatischen Schaden sei. Auf Grundlage dieser Ergebnisse, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Untersuchung der Genexpression von basolateralen

und apikalen Transportern mit Hilfe einer qReal-Time PCR. Bei den basolateral sitzenden Gallensalz- (NTCP) und teilweise auch Bilirubin (OATP1a1, OATP1b2) aufnehmenden Transportern zeigte sich bei beiden Genotypen eine signifikant verminderte Expression nach LCA Fütterung. Nach der Placebofütterung ließ sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp Mäusen und den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ ausmachen (NTCP: WT Placebo (n= 5) $13,4 \pm 2,0$ vs. KO Placebo (n= 5) $6,2 \pm 1,0$, 2,2-fache Reduktion in KO Placebo, $p < 0,05$; OATP1a1: WT Placebo (n= 4) $4,2 \pm 0,5$ vs. KO Placebo (n= 4) $1,3 \pm 0,5$, 3,5-fache Reduktion in KO Placebo, $p < 0,05$. Diese Tendenz ließ sich auch bei dem Bilirubin spezifischen Transporter OATP1b2 beobachten.

Für den Gallensäurenefflux sind unter anderem der ABC Transporter MRP4 und der bei Cholestase hochregulierte Transporter OST β (Boyer et al. 2006) zuständig. Bei der Analyse von OST β zeigte sich bei beiden Genotypen eine um das 10-fache gesteigerte Expression der mRNA nach 84h LCA, während sich bei MRP4 nach Placebo und LCA Fütterung kein signifikanter Unterschied ausmachen ließ.

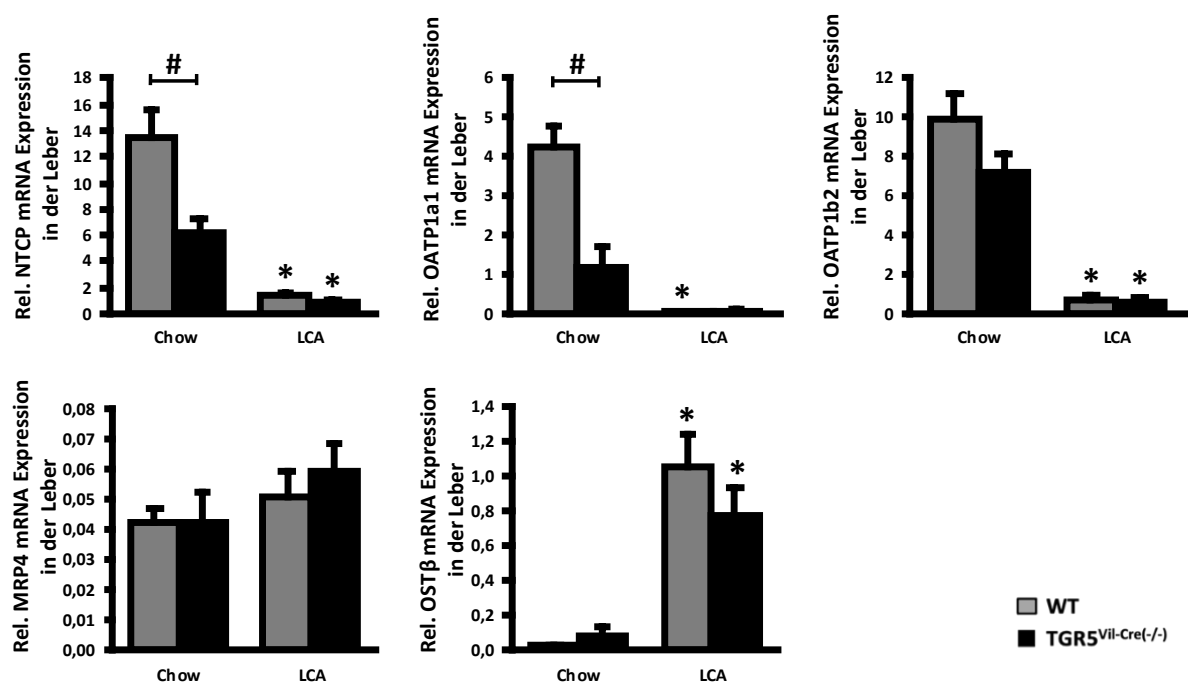


Abb. 30: Relative mRNA Expression basolateraler Gallensalztransporter im Hepatozyten

Die $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion in der Expression im Vergleich zu den Wildtypmäusen bei den Transportern NTCP und OATP1a1. OST β wird, wie auch in der Literatur bekannt, bei cholestatischen Verhältnissen hochreguliert. Die mRNA Expression in der Leber der beiden Mausgruppen (n= 4-6/Gruppe) wurde nach RNA Isolierung, reverser DNA-Synthese und Quantifizierung der mRNA mit Hilfe der qRT-PCR-Methode analysiert. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels

der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

Bei den apikal sitzenden Transportern BSEP, MRP2 und MRP3 ließ sich bei den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ Mäusen eine verminderte Expression nach 84h LCA Fütterung feststellen. Diese Abnahme zeigte sich auch bei den Wildtyp Mäusen bei den ins Gallenlumen reichenden Transportern BSEP und MRP2. Bei dem ABC Transporter MRP3 kam es nach LCA Fütterung zu einer signifikanten Zunahme der mRNA Expression, welche sich signifikanten von den $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ unterschied (MRP3: WT LCA (n= 4) $3,4 \pm 0,01$ vs. KO LCA (n= 7) $2,5 \pm 0,5$; 1,4-facher Anstieg in WT LCA, $p < 0,05$).

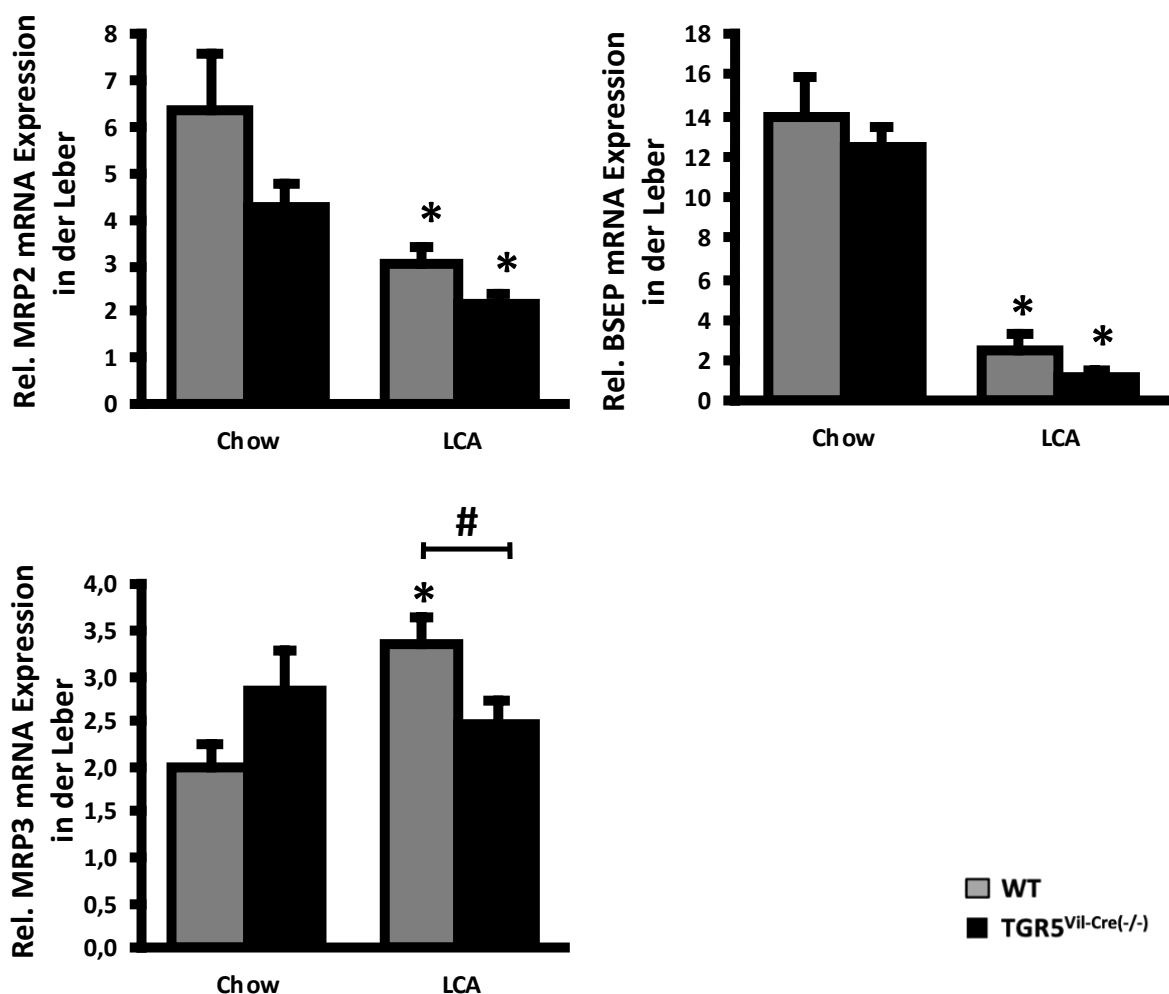


Abb. 31: Relative mRNA Expression apikaler Gallensalztransporter im Hepatozyten

Nach der LCA Fütterung wird die mRNA der apikalen Gallensalzrezeptoren MRP2, BSEP und MRP3 in der Leber der $TGR5^{Vil-Cre(-/-)}$ (n= 4-7/Gruppe) weniger exprimiert. Bei MRP3 zeigt sich ein signifikanter

Unterschied zwischen den beiden Genotypen nach der LCA Fütterung. Die Analyse erfolgte nach RNA Isolierung und reverser DNA-Synthese mit Hilfe der qRT-PCR-Methode. Semi-quantitative mRNA-Level wurden mittels der Δ CT-Methode in Relation zum Housekeeping-Gen HPRT1 berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (+SEM) der relativen mRNA Level angegeben. * = Signifikanter Unterschied nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

3.7. Auswirkungen der Lithocholsäurefütterung auf das Gallengangsepithel in den extrahepatischen Gallengängen der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse

Zusätzlich zu den lebertypischen Serumwerten aus Unterpunkt 3.5 wurde die Serumanalyse um die für die Cholestasetypischen Werte der Alkalischen Phosphatase (ALP) und des Gesamt-Bilirubin (T-Bil) ergänzt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Werte bei den Wildtypen und den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen. Allerdings wurde ein signifikanter Unterschied nach der LCA Fütterung zwischen den beiden Genotypen ersichtlich, die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse wiesen geringere Cholestaseparameter als die Kontrollgruppe der Wildtyp Mäuse (ALP: WT LCA (n= 6) 796,7 ± 156,2 IU/L vs. KO LCA (n= 17) 376,6 ± 31,3 IU/L, 2,1-facher Anstieg in WT LCA; p< 0,05; T-Bil: WT LCA (n= 6) 3,8 ± 0,6 mg/dl vs. KO LCA (n= 17) 2,3 ± 0,3 mg/dl; 1,7-facher Anstieg in WT LCA; p< 0,05).

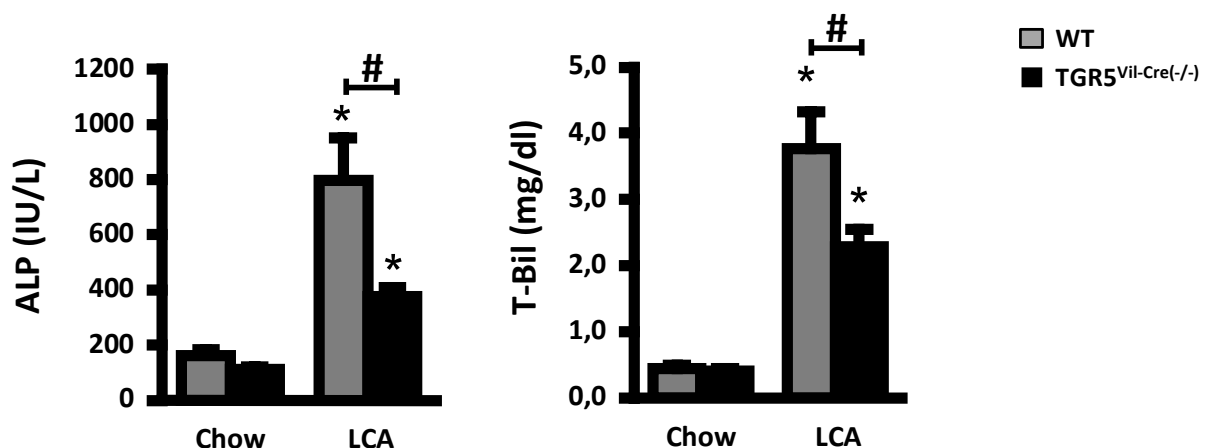


Abb. 32: Cholestaseparameter im Serum der Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse

Alkalische Phosphatase (ALP) und das Gesamtbilirubin (T-Bil) wurden als gängige Cholestaseparameter zur Beurteilung des Gallengangsschadens verwendet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen und den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen nach 84h Diät mit 1% LCA. Die Quantifizierung der Serumwerte erfolgte mit Hilfe des Spotchem SP-4430 Analyzer der Firma AxioLab aus Stuttgart (n= 5-17). Daten sind dargestellt als MW + SEM. * = Signifikanter Unterschied

nach LCA Fütterung zur Kontrollgruppe des gleichen Genotyps. # = Signifikanter Unterschied zu den Wildtyp Mäusen unter den gleichen Bedingungen.

Im Vergleich mit den Ergebnissen aus vorausgehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe, bei denen die TGR5^(-/-) Tiere signifikant höhere Cholestaseparameter (ALP und Bilirubin) als die ihre Kontrollgruppe an Wildtyp Mäuse aufwiesen, konnte bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen weniger Gallengangsschaden nachgewiesen werden, was sich auf laborchemischer Ebene zeigen ließ.

Auch die extrahepatischen Gallengänge der TGR5^(-/-) Tiere wiesen histopathologisch nach Lithocholsäurefütterung einen stärkeren Schaden auf als ihre Kontrollgruppe. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde das Gallengangsepithel der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen mithilfe einer histopathologischen Aufbereitung untersucht. Es ließ sich nachweisen, dass die extrahepatischen Gallengänge der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse einen mikroskopisch geringeren Schaden aufwiesen als das Epithel der Wildtypgruppe. Die Ulcerationen der Gallengänge nach LCA Fütterung, die Fickert et al. 2006 in ihrer Arbeit beschreiben, sind deutlich besser bei den Wildtyp Tieren sichtbar.

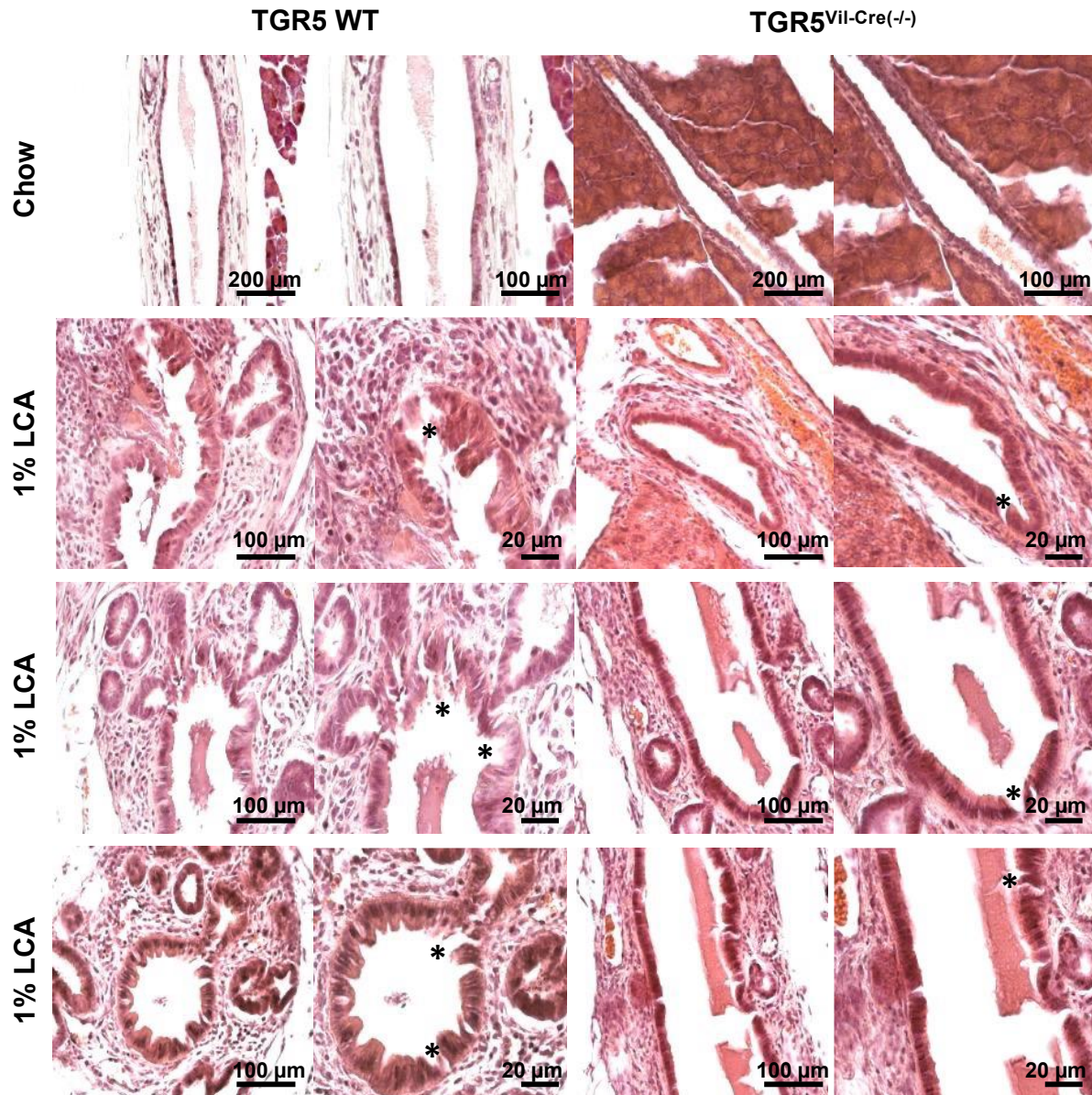


Abb. 33: Histopathologische Untersuchung der extrahepatischen Gallengänge mit Placebo und 1% LCA Fütterung

Die Gallengänge der TGR5 Wildtyp und TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen wurden entnommen und möglichst längs im Paraffinblock eingebettet, sodass ein Längsanschnitt mit einer Stärke von 5 μm am Mikrotom möglich war, der mittels HE Färbung histologisch untersucht wurde (n= 4-6). Periductale Fibrose, Ulcerationen (*) und Pericholangitis zeigt sich bei beiden Mausgruppen nach 1% LCA Fütterung. Balken = 200, 100 oder 20 μm.

4. DISKUSSION

TGR5 ist ein G-protein-gekoppelter Rezeptor, der durch primäre und sekundäre Gallensalze aktiviert werden kann (Maruyama et al. 2002; Kawamata et al. 2003) und unter anderem in der Leber, der Gallenblase, dem Darm, der Niere, den Makrophagen/Monocyten der Milz und im Gehirn exprimiert wird (Maruyama et al. 2002; Kawamata et al. 2003; Maruyama et al. 2006; Vassileva et al. 2006; Keitel et al. 2009; Keitel et al. 2010). Im Gastrointestinaltrakt wird TGR5 im Dünndarm und Dickdarm (Poole et al. 2010; Pols, Noriega, et al. 2011b) exprimiert. In der Leber konnte TGR5 in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in der apikalen Membran sowie den primären Zilien der Cholangiozyten detektiert werden (Keitel et al. 2009; Keitel et al. 2013). Der Rezeptor kann antiinflammatorisch, antiapoptotisch, vasodilatorisch, choleretisch und proliferativ wirken (Keitel and Haussinger 2018; Klindt et al. 2019) und Gallensalz-vermittelt Einfluss auf den Gallensalz-, Lipid- und Glukosestoffwechsel nehmen und den Portaldruck der Leber modulieren (Keitel, Kubitz, and Haussinger 2008; Duboc, Tache, and Hofmann 2014; Klindt et al. 2019).

Gallensalze zirkulieren sechs bis zehnmal täglich im enterohepatischen Kreislauf von der Leber über den Darm und beeinflussen mit Hilfe ausgeprägter Feedbackmechanismen und der Aktivierung verschiedener Rezeptoren eine Vielzahl an Körperfunktionen (Keitel, Kubitz, and Haussinger 2008; Boyer 2013). Beim Krankheitsbild der Cholestase, dem Gallenrückstau in die Leber, kommt es zu galligen Nekrosen, periportalen Entzündungen und periduktalen Fibrosen. Der Schaden zeigt sich durch eine Erhöhung der Leber- und Cholestaseparameter im Serum. Im weiteren Verlauf ist die Entwicklung einer Leberzirrhose und/oder sklerosierenden Cholangitis möglich (Fickert et al. 2004; Fickert et al. 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von TGR5 im Darm während Cholestase untersucht. Diese wurde durch ein Fütterungsmodell induziert, bei dem TGR5^{Vil-Cre(-/-)} und TGR5 Wildtypen für 84h eine Diät mit 1% LCA oder Placebo Futter bei ausreichender Wasserzufuhr erhielten. Die *in vivo* Auswirkungen der Fütterung auf das hepatobiliäre und gastrointestinale System wurden durch *in vitro* Versuche mit Hilfe von isolierten Cholangiozyten ergänzt.

4.1. Gezielter TGR5 Knockout im Darm in der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Maus

Das 95 kDa schwere Protein Villin findet sich unter physiologischen Bedingungen in der Darm-Leber-Achse unter anderem in den intestinalen Microvilli, wo es mit dem Protein Actin assoziiert ist (Bretscher et al. 1981) und in den Microvilli der Gallengänge (Tsukada, Ackerley, and Phillips 1995). Daher wurde zu Beginn die Arbeitshypothese aufgestellt, dass der TGR5 spezifische Knockout in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen in den Enterozyten und Cholangiozyten stattfindet. Nach Analysen der TGR5 mRNA Expression und der Proteinlevel der Mäuse zeigte sich, dass ein spezifischer Knockout im Darmepithel mit einer residuellen mRNA Expression (Abbildung 4) von durchschnittlich < 20% im Vergleich zu den TGR5 Wildtyp Tieren stattgefunden hatte. Die TGR5 Expression innerhalb der Gallengänge war sowohl auf mRNA (Abbildung 4) als auch auf Proteinebene (Abbildung 5) unverändert. Um den Ursprung der residuellen TGR5 mRNA im Darm zu explorieren, wurde untersucht, ob sich die Restexpression auf TGR5 exprimierende Immunzellen im Darm (Biagioli et al. 2017) zurückführen ließ. Dafür wurde der Makrophagen-spezifische Marker F4/80 verwendet. In der Immunfluoreszenzfärbung von TGR5 gegen diesen Marker (Abbildung 6 und 7) zeigte sich, dass die durch F4/80 angefärbten Makrophagen TGR5 exprimierten. Daher ist nicht auszuschließen, dass TGR5 exprimierende Immunzellen in den Mäusedarmproben zur Restexpression in der PCR Analyse beigetragen haben. In der Färbung zeigten sich aber auch andere TGR5 exprimierende Zellen, die sich nicht mit dem Makrophagenmarker F4/80 co-lokalisieren ließen.

TGR5 wird im Darm neben Immunzellen auch im Plexus myentericus in neuroendokrinen Zellen exprimiert (Thomas et al. 2009), welche hier nicht untersucht wurden. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass es sich bei der Mauslinie TGR5^{Vil-Cre(-/-)} um einen nahezu vollständigen Darmphänotyp für den Gallensalzrezeptor TGR5 handelt.

4.2. Auswirkungen des TGR5 Knockouts in TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Tieren auf die Expression von Tight-Junctions

Die Freisetzung endogener Gallensalze im Darmlumen fördert die Regeneration des Darmepithels über die Aktivierung intestinaler Stammzellen via TGR5 (Sorrentino et al. 2020). Daher wurde in der Arbeit untersucht, ob es zu einer Veränderung der Epithelpermeabilität der verschiedenen Mausgruppen kam. Auf Proteinebene lässt

sich anhand der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen kein Unterschied im Jejunum und terminalen Ileum der einzelnen Mausgruppen beobachten (Abbildung 11). Cipriani et al. zeigten 2011 in ihrem Paper, dass es im Colon von TGR5^(-/-) zu einer verstärkten Expression der Tight Junctions kam und dass die Occludensproteine auch subzellulär zu lokalisieren waren. Beim physiologischen Prozess der Zellerneuerung kommt es zu einer Umverteilung des Proteins in Richtung der apikalen und dann der basolateralen Zellregion. Dieser Prozess wird im Englischen als *Shedding* (Guan et al. 2011) bezeichnet. Aufgrund des Drucks der Zellteilung und der Migration der Zellen ausgehend von den Krypten kommt es in der epithelialen Schicht des Darms zu einer Zellablösung (Ngo, Neurath, and López-Posadas 2022). Insbesondere bei inflammatorischen oder tumorösen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes ist eine Veränderung des physiologischen Vorgangs zu beobachten, was zu einer erhöhten Permeabilität des Epithels führt (Ngo, Neurath, and López-Posadas 2022; Martínez-Sánchez et al. 2023). In der HE Färbung des Dünndarms zeigte sich eine intakte Krypten- und Zottenmorphologie sowie kein Hinweis auf eine akute Ileitis nach 1% LCA Fütterung. Die geringe Anzahl der Immunzellen in der F4/80 Immunfluoreszenzfärbung spricht ebenso für einen fehlenden Entzündungsprozess im Bereich des Jejunums und terminalen Ileums. Eine erhöhte Permeabilität wie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Kiesslich et al. 2012) scheint für Veränderungen in der Darm-Leber-Achse in beiden Mausgruppen nicht die Ursache zu sein. Das Cholestase Fütterungsmodell ist somit für eine Analyse des veränderten Cell Sheddings nicht geeignet. Hierfür wäre ein Colitis induzierendes Fütterungsmodell (Wirtz et al. 2017; Mizoguchi 2012) besser geeignet.

4.3. Auswirkungen des TGR5 Knockouts in TGR5^{Vil-Cre(-/-)} auf das hepatobiliäre System

Neben den Auswirkungen des TGR5 Darmphänotyps auf die Darm-Leber-Achse unter physiologischen Bedingungen (Placebo-Fütterung), wurden die Auswirkungen auch nach toxischer Gallensalz fütterung mit dem sekundären, hydrophoben Gallensalz Litholcholsäure (LCA) untersucht. Das Fütterungsmodell ist ein seit den 1960er Jahren etabliertes Modell für Cholestase (Hunt, Leveille, and Sauberlich 1964; Palmer and Ruban 1966). Dabei wurde der Gallensalzinduzierte Schaden im hepatobiliären System von Nagetieren bei diesem Modell 2006 ausführlich durch Fickert et al. charakterisiert.

Im Rahmen der Arbeitsgruppe wurde das Fütterungsmodell an TGR5^(-/-) Mäusen etabliert (Reich et al. 2016; Klindt et al. 2019) und es zeigte sich, dass die Aktivierung des Gallensalzrezeptors TGR5 bei Cholestase im hepatobiliären System eine protektive Wirkung hat. Die TGR5^(-/-) Mäuse wiesen einen schwerwiegenderen Leberschaden auf als ihre Wildtyp Wurfgeschwister, welcher sich histopathologisch und laborchemisch durch erhöhte Transaminasen im Serum manifestierte, welches auch durch Fickert et al. 2006 beschrieben wurde.

Bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen ergab die Analyse der Serumparameter GOT und GPT jedoch, dass die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse keinen signifikanteren Leberschaden hatten. Die histopathologische Untersuchung der Lebern beider Genotypen bestätigte dieses Ergebnis, da hierbei sowohl in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen als auch in den Wildtypen nach LCA Fütterung vergleichbar große Nekroseareale zu finden waren (Abbildung 20).

Des Weiteren konnte in den TGR5^(-/-) Mäusen ein Anstieg im portalvenösen Druck und eine stärkere Expression von Genen, die mit portaler Hypertension und Fibrose (ET-1, TGF- β , PDGFR α , PDGFR β) assoziiert sind (Klindt et al. 2019), festgestellt werden. Obwohl die Tiere aufgrund der Serumanalyse einen gravierenderen Leberschaden aufwiesen, konnte kein signifikanter Unterschied in der Produktion von extrazellulärer Matrix ausgemacht werden, beide Genotypen wiesen dabei nach LCA Fütterung eine erhöhte mRNA Expression von Col1 α 1 und Col1 α 2 auf. Die Sirius Rot Färbung zeigte zudem ähnliche fibrotische Muster in beiden Genotypen nach der Gallensalzhaltigen Fütterung (Klindt et al. 2019).

Im Mausmodell TGR5^{Vil-Cre(-/-)} mit gezieltem TGR5 Knockout im Darm zeigte sich keine Veränderung des portalvenösen Drucks im Vergleich zur Wildtyp Maus. Auch die mRNA Expression von Endothelin-1 blieb in gleichem Maße erhalten. Daraus lässt sich ableiten, dass die Funktion von TGR5 in Sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) und Hepatischen Sternzellen (HSC) beim gezielten Darmknockout erhalten ist. Die mRNA Expression der Wachstumsfaktoren PDGF α , PDGF β und TGF β , die bei Cholestase als chemotaktische Mediatoren eine wichtige Rolle bei der Ausbildung periduktaler Fibrose spielen (Kinnman et al. 2000; Rygiel et al. 2008), war in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen hingegen signifikant niedriger als bei den Wildtypen (Abbildung 21). Auf Proteinebene konnte dieser Unterschied mit Hilfe der Sirius Rot Färbung nicht

dargestellt werden. Hierbei muss allerdings die Länge des Fütterungsversuchs beachtet werden. Innerhalb von 84 Stunden wäre eine deutliche Veränderung auf Proteinebene noch nicht zu erwarten. Interessant wäre die Analyse der Lebern nach einem siebentägigen 0,1% LCA Fütterungsversuch, da eine Tendenz zu vermehrter Hydroxyprolinexpression in TGR5^(-/-) Mäusen auch schon nach 84 Stunden zu beobachten ist (Klindt et al. 2019).

Zudem ist die anti-inflammatorische Wirkung der erhaltenen TGR5 exprimierenden Makrophagen im enterohepatischen Systems neben der Expression von TGR5 in den LSEC ein möglicher Einflussfaktor auf die Fibroseentstehung und könnte eine wichtige Rolle im Rahmen der Schädigung des hepatobiliären Systems spielen.

Zudem wäre es interessant, die Mauslinie in einem anderen Cholestase Modell zu untersuchen. Zum Beispiel wird durch Ligatur des extrahepatischen Gallengangs (sog. Gallengangsligatur; *bile duct ligation* (BDL)) das Krankheitsbild einer posthepatischen, obstruktiven Cholestase imitiert (Kountouras, Billing, and Scheuer 1984). Dabei kommt es aufgrund der akkumulierenden Gallensalze zu entzündlichen Prozessen in den Portalfeldern, adaptiv dann zu Proliferation der Cholangiozyten und nach 14-28 Tagen zur Ausbildung einer Fibrose (Geerts et al. 2008; Popov et al. 2010). Im BDL-Modell liegt allerdings eine Unterbrechung des enterohepatischen Kreislaufs vor, da die akkumulierenden Gallensalze nicht mit dem Darmepithel in Berührung kommen. Daher müsste charakterisiert werden, ob es nicht insgesamt zu einer Veränderung der Signalwege in der Darm-Leber-Achse in den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen kommt.

Obwohl sich bei der Analyse der Leberschädigung kein Unterschied zwischen den Wildtypen und den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse zeigte, wurde bei der Analyse der intrahepatischen und extrahepatischen Gallenwege ein Unterschied deutlich. Die Cholestaseparameter ALP und Bilirubin waren im Serum der Wildtypen signifikant erhöht (Abbildung 33), was für eine erhöhte Leckage, also einen stärkeren Schaden im biliären System spricht (Fickert et al. 2006). Die Fütterung mit dem primären Gallensalz Cholsäure (CA) bei TGR5^(-/-) und Wildtyp Mäusen bewirkte neben einem Anstieg der Leberparameter GOT und GPT auch einen Anstieg von Bilirubin, während bei den Serumleveln von ALP keine Veränderung zu beobachten war (Reich et al. 2016). Zudem konnten Reich et al. zeigen, dass TGR5^(-/-) Mäuse im Gegensatz zu ihren Wurfgeschwistern einen geringen Anteil an PCNA und Ki67 positiven Zellen nach

CA Fütterung aufwiesen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass TGR5 essenziell für die Gallensalzabhängige Proliferation von Cholangiozyten ist. Bei der Untersuchung des Proliferationsmarker PCNA auf Proteinebene im Western Blot zeigte sich der Trend, dass die TGR5 Wildtypen mehr Leberzellen in der S-Phase der Proliferation hatten als die Leberzellen der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} (Abbildung 23). Zudem konnte auf Proteinebene im Western Blot mit Leberlysaten gezeigt werden, dass die Wildtypen mehr Zellen mit dem Nekroptosemarker RIP3 exprimierten. Die Rezeptor-interagierende Proteinkinase 3 (RIPK3) wird bei Cholestase assoziiertem Zellschaden aktiviert und eine Signalkaskade führt daraufhin zum programmierten Zelltod (Afonso et al. 2016). Die Mäuse defizient für TGR5 im Darm haben somit einen stärkeren Zellschaden im Bereich des hepatobiliären Systems sowohl auf laborchemischer als auch auf molekularer Ebene. Es wurde allerdings nicht analysiert, ob der Darmknockout von TGR5 an sich schon zu einer Veränderung der Signalwege im Bereich des programmierten Zelltodes führt.

Zudem hatten TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse einen geringeren Anstieg der Cholestaseparameter ALP und Bilirubin als ihre Wurfgeschwister und zeigten histopathologisch auch weniger Gallengangschäden. In den Cholangiozyten ließ sich aber sowohl auf zellmolekularer als auch auf Proteinebene TGR5 nachweisen (Abbildungen 24 und 26). Bei der Analyse der mRNA Expression zeigte sich, dass in den *biliary epithel cells* (BEC) und *Non-parenchymal cells* (NPC) von Villin Cre Knockout und Wildtyp Tieren mehr TGR5 mRNA in BEC Zellen der Wildtypen exprimiert wurde, während die NPC der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse mehr TGR5 mRNA exprimierten. Allerdings unterstützen diese Untersuchungen die Aussage, dass die Funktionen von TGR5 in LSEC und HSC der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} nicht beeinträchtigt ist. Beide Zellpopulationen machen zusammen mehr als 50% der Non-parenchymal cells (NPC) aus (Racanelli and Rehmann 2006; Gao, Jeong, and Tian 2008). In der Immunofluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass sowohl die Wildtypen als auch die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} am primären Zilium und an der apikalen Membran TGR5 exprimierten (Abbildung 25) und somit die Schäden im biliären System nicht auf ein Fehlen von TGR5 zurückzuführen sind.

4.4. Auswirkungen des TGR5 Darmknockouts auf die Darm-Leber-Achse

Um die unterschiedlichen Ergebnisse der Genotypen besser in den Gesamtzusammenhang einordnen zu können, wurden weitere Signalwege des enterohepatischen Kreislaufs untersucht. Dabei war auffällig, dass die TGR5^{Vil-Cre^{-/-}} Mäuse mehr Anteil an ASBT Proteinen im terminalen Ileum zeigten (Abbildung 13). Gleichzeitig war die ASBT mRNA Expression im terminalen Ileum im Vergleich zu den Wildtypen signifikant vermindert. Desweiteren zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA Expression des *Fibroblast growth-factor 15* (FGF15) im Darm der TGR5^{Vil-Cre^{-/-}} Mäuse. Die Befunde suggerieren, dass ein Knockout von TGR5 im Darm über den FGF15 Signalweg Einfluss auf die Leber und die Gallengänge nimmt.

Uriarte et al. zeigten in einem 2013 veröffentlichten Paper, dass eine vermehrte Expression des Hormons FGF-15 eine verbesserte Leberregeneration zur Folge hat. Physiologisch wird das Hormon FGF15 durch den portalen Kreislauf transportiert und aktiviert im Hepatozyt den Hormonrezeptor FGFR4, worüber die Synthese des geschwindigkeitslimitierenden Enzyms CYP7a1 der Gallensalzsäuresynthese herunterreguliert (Holt et al. 2003; Inagaki et al. 2005) wird. Die FGF15^{-/-} Mäuse zeigten nach partieller Hepatektomie einen ausgeprägteren Leberschaden und eine erhöhte Sterblichkeitsrate als ihre Wildtyp Geschwistertiere aufgrund dauerhaft erhöhter intrahepatischer Gallensalzsäurelevel. Die deutlich reduzierte Überlebensrate ging mit erhöhten Serumspiegeln der zirkulierenden Leberenzyme GOT und GPT (signifikant erhöht nach 12, 24 und 44 Stunden nach Fütterung) und Bilirubin (signifikant erhöht nach 12, 36, 44 und 72 Stunden nach Fütterung) sowie GPT (signifikant erhöht nach 36 und 44 Stunden nach Fütterung) einher. Auch histologisch ließen sich die ausgeprägteren Leberschäden verifizieren. Die Kombination aus Cholestyramin, einem medikamentösen Gallensalzbinder und adenoviral verabreichten FGF15 senkte wiederum die Sterblichkeit der Mäuse signifikant (Uriarte et al. 2013). FGF15 ist somit erforderlich für die Regeneration der Leberzellen und das Wachstum der Leber nach Cholsäurefütterung. Die Proliferationsrate von Cholangiozyten und Hepatozyten zeigte sich deutlich reduziert in FGF15^{-/-} Mäuse, die mit dem Gallensalz Cholsäure gefüttert wurden. In *in vitro* Versuchen mit kultivierten Leberzellen kam es nach Stimulation mit FGF15 zu einer vermehrten Proliferation von Cholangiozyten, was durch vermehrte Expression der Proliferationsmarker PCNA, Cyclin-D1, Foxm1b und Cdc25b deutlich wurde (Uriarte et al. 2013). Die FGF15^{-/-}

Mäuse zeigten gewisse Ähnlichkeiten mit FXR^(-/-) Mäuse, die ebenso eine verminderte Proliferationsrate und somit eine schlechtere Regeneration des Leberparenchyms haben als ihre Wildtyp Geschwister (Huang et al. 2006), deren Sterberate aber nicht so hoch war wie die der FGF15^(-/-) Mäuse. Als Ursache hierfür wird unter anderem der vergrößerte Gallensalzpool bei den FGF15^(-/-) Mäusen angenommen, welcher durch eine fehlende Suppression von CYP7a1 entsteht. Bei näherer Untersuchung der mRNA Level der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse zeigte sich auch die Tendenz, dass die TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse geringere CYP7a1 mRNA Level aufwiesen als ihre Wildtyp Geschwistertiere. Allerdings muss man beachten, dass hierbei durch zusätzliche Gabe von Gallensalzen die Expression von CYP7a1 auch über andere Wege wie den Gallensalzrezeptor FXR im Hepatozyt inhibiert (Goodwin et al. 2000) wird. Ein direkter Vergleich der Mauslinien FGF15^(+/+) und der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} lässt sich somit nicht ziehen, da die Synthese der Gallensalze und die Regeneration der Leber multifaktoriell beeinflusst wird und man daher nur ähnliche Tendenzen beobachten kann. Dennoch lässt sich konstatieren, dass die vermehrte Produktion von FGF15 im terminalen Ileum einen Einfluss auf das verbesserte hepatobiliäre Outcome der TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse haben könnte. Bei der Untersuchung der Proteinlevel des Proliferationsmarker PCNA und der mRNA Level von Cytokeratin 19 bei den TGR5^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen zeigte sich allerdings eine geringere Expression im Gegensatz zu den Wildtypen. Wie Uriarte et al in ihrem Paper diskutieren, müssen hierbei die unterschiedlichen Einflüsse von Gallensalzen auf die Leberregeneration betrachtet werden. Zum einen hat eine vermehrte Gallensalzrückresorption im terminalen Ileum über FGF15 einen protektiven Einfluss auf die Regeneration des hepatobiliären Systems, zum anderen sind zu viele Gallensalze toxisch für die Zellen. Perspektivisch könnte eine genauere Untersuchung über die genauen ausgelösten Signalwege des TGR5 Knockouts im Darm der Mäuse zu einem besseren Verständnis der auf der einen Seite regenerativen und auf der anderen Seite schädlichen Prozesse in der Leber beitragen. Dabei würde sich anbieten, dass man das hier eingesetzte Cholestasemodell (Fütterung mit 1% des sekundären Gallensalz LCA) mit einem Cholestasemodell mit prozentuell weniger LCA für einen längeren Zeitraum ersetzt, da die Menge an hier zugeführtem LCA zu stark toxisch ist. Ein weiteres mögliches Fütterungsmodell wäre das DDC-Modell (Fickert et al. 2007). Hierbei könnte analysiert werden, ob die Hochregulation von FGF15 ein direkter oder indirekter Effekt des Fütterungsmodells ist. Interessant wäre auch, bei diesem Mausmodell eine partielle Hepatektomie durchzuführen, um einen besseren

Eindruck zu gewinnen, welche Auswirkungen der TGR5 Knockout im Darm tatsächlich auf die Regeneration des hepatobiliären Systems hat.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Afonso, M. B., P. M. Rodrigues, A. L. Simão, D. Ofengeim, T. Carvalho, J. D. Amaral, M. M. Gaspar, H. Cortez-Pinto, R. E. Castro, J. Yuan, and C. M. Rodrigues. 2016. 'Activation of necroptosis in human and experimental cholestasis', *Cell Death & Disease*, 7: e2390.
- Alemi, F., E. Kwon, D. P. Poole, T. Lieu, V. Lyo, F. Cattaruzza, F. Cevikbas, M. Steinhoff, R. Nassini, S. Materazzi, R. Guerrero-Alba, E. Valdez-Morales, G. S. Cottrell, K. Schoonjans, P. Geppetti, S. J. Vanner, N. W. Bunnett, and C. U. Corvera. 2013. 'The TGR5 receptor mediates bile acid-induced itch and analgesia', *Journal of Clinical Investigation*, 123: 1513-30.
- Alemi, F., D. P. Poole, J. Chiu, K. Schoonjans, F. Cattaruzza, J. R. Grider, N. W. Bunnett, and C. U. Corvera. 2013. 'The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice', *Gastroenterology*, 144: 145-54.
- Alpini, G., S. S. Glaser, R. Rodgers, J. L. Phinizy, W. E. Robertson, J. Lasater, A. Caligiuri, Z. Tretjak, and G. D. LeSage. 1997. 'Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes', *Gastroenterology*, 113: 1734-40.
- Ananthanarayanan, M., N. Balasubramanian, M. Makishima, D. J. Mangelsdorf, and F. J. Suchy. 2001. 'Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 28857-65.
- Anderson, J. M., and C. M. Van Itallie. 2009. 'Physiology and function of the tight junction', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1: a002584.
- Baiocchi, L., G. LeSage, S. Glaser, and G. Alpini. 1999. 'Regulation of cholangiocyte bile secretion', *Journal of Hepatology*, 31: 179-91.
- Ballatori, N., W. V. Christian, J. Y. Lee, P. A. Dawson, C. J. Soroka, J. L. Boyer, M. S. Madejczyk, and N. Li. 2005. 'OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia', *Hepatology*, 42: 1270-9.
- Ballatori, N., N. Li, F. Fang, J. L. Boyer, W. V. Christian, and C. L. Hammond. 2009. 'OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14: 2829-44.
- Bambha, K., W. R. Kim, J. Talwalkar, H. Torgerson, J. T. Benson, T. M. Therneau, E. V. Loftus, Jr., B. P. Yawn, E. R. Dickson, and L. J. Melton, 3rd. 2003. 'Incidence, clinical spectrum, and outcomes of primary sclerosing cholangitis in a United States community', *Gastroenterology*, 125: 1364-9.
- Banales, J. M., F. Arenas, C. M. Rodriguez-Ortigosa, E. Saez, I. Uriarte, R. B. Doctor, J. Prieto, and J. F. Medina. 2006. 'Bicarbonate-rich choleresis induced by secretin in normal rat is taurocholate-dependent and involves AE2 anion exchanger', *Hepatology*, 43: 266-75.
- Banales, J. M., J. Prieto, and J. F. Medina. 2006. 'Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion', *World Journal of Gastroenterology*, 12: 3496-511.
- Beuers, U., G. U. Denk, C. J. Soroka, R. Wimmer, C. Rust, G. Paumgartner, and J. L. Boyer. 2003. 'Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via

- phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 17810-8.
- Beuers, U., S. Hohenester, L. J. de Buy Wenniger, A. E. Kremer, P. L. Jansen, and R. P. Elferink. 2010. 'The biliary HCO₃⁽⁻⁾ umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies', *Hepatology*, 52: 1489-96.
- Biagioli, M., A. Carino, S. Cipriani, D. Francisci, S. Marchiano, P. Scarpelli, D. Sorcini, A. Zampella, and S. Fiorucci. 2017. 'The Bile Acid Receptor GPBAR1 Regulates the M1/M2 Phenotype of Intestinal Macrophages and Activation of GPBAR1 Rescues Mice from Murine Colitis', *Journal of Immunology*, 199: 718-33.
- Bonvicini, F., A. Gautier, D. Gardiol, and G. A. Borel. 1978. 'Cholesterol in acute cholestasis induced by taurolithocholic acid. A cytochemical study in transmission and scanning electron microscopy', *Laboratory Investigation*, 38: 487-95.
- Boyer, J. L. 2002. 'Bile Formation and Cholestasis.' in E. R. Schiff, W. C. Maddrey and M. F. Sorrell (eds.), *Schiff's Diseases of the Liver* (Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia).
- . 2013. 'Bile formation and secretion', *Compr Physiol*, 3: 1035-78.
- Boyer, J. L., M. Trauner, A. Mennone, C. J. Soroka, S. Y. Cai, T. Moustafa, G. Zollner, J. Y. Lee, and N. Ballatori. 2006. 'Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290: G1124-30.
- Boyer, James L. 1986. 'Mechanisms of Bile Secretion and Hepatic Transport.' in Thomas E. Andreoli, Joseph F. Hoffman, Darrell D. Fanestil and Stanley G. Schultz (eds.), *Physiology of Membrane Disorders* (Springer US: Boston, MA).
- Bretscher, A., M. Osborn, J. Wehland, and K. Weber. 1981. 'Villin associates with specific microfilamentous structures as seen by immunofluorescence microscopy on tissue sections and cells microinjected with villin', *Experimental Cell Research*, 135: 213-9.
- Broomé, U., R. Olsson, L. Lööf, G. Bodemar, R. Hultcrantz, A. Danielsson, H. Prytz, H. Sandberg-Gertzén, S. Wallerstedt, and G. Lindberg. 1996. 'Natural history and prognostic factors in 305 Swedish patients with primary sclerosing cholangitis', *Gut*, 38: 610-5.
- Byrne, J. A., S. S. Strautnieks, G. Mieli-Vergani, C. F. Higgins, K. J. Linton, and R. J. Thompson. 2002. 'The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors', *Gastroenterology*, 123: 1649-58.
- Chapman, R. W., B. A. Arborgh, J. M. Rhodes, J. A. Summerfield, R. Dick, P. J. Scheuer, and S. Sherlock. 1980. 'Primary sclerosing cholangitis: a review of its clinical features, cholangiography, and hepatic histology', *Gut*, 21: 870-7.
- Chen, F., L. Ma, P. A. Dawson, C. J. Sinal, E. Sehayek, F. J. Gonzalez, J. Breslow, M. Ananthanarayanan, and B. L. Shneider. 2003. 'Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 19909-16.
- Chiang, J. Y., P. Pathak, H. Liu, A. Donepudi, J. Ferrell, and S. Boehme. 2017. 'Intestinal Farnesoid X Receptor and Takeda G Protein Couple Receptor 5 Signaling in Metabolic Regulation', *Digestive Diseases*, 35: 241-45.
- Christie, D. M., P. A. Dawson, S. Thevananther, and B. L. Shneider. 1996. 'Comparative analysis of the ontogeny of a sodium-dependent bile acid

- transporter in rat kidney and ileum', *American Journal of Physiology*, 271: G377-85.
- Cipriani, S., A. Mencarelli, M. G. Chini, E. Distrutti, B. Renga, G. Bifulco, F. Baldelli, A. Donini, and S. Fiorucci. 2011. 'The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis', *PloS One*, 6: e25637.
- Craddock, A. L., M. W. Love, R. W. Daniel, L. C. Kirby, H. C. Walters, M. H. Wong, and P. A. Dawson. 1998. 'Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter', *American Journal of Physiology*, 274: G157-69.
- Crawford, J. M. 1996. 'Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion', *Seminars in Liver Disease*, 16: 169-89.
- Crawford, J. M., C. A. Berken, and J. L. Gollan. 1988. 'Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport', *Journal of Lipid Research*, 29: 144-56.
- Dawson, P. A., M. Hubbert, J. Haywood, A. L. Craddock, N. Zerangue, W. V. Christian, and N. Ballatori. 2005. 'The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter', *Journal of Biological Chemistry*, 280: 6960-8.
- Dawson, P. A., T. Lan, and A. Rao. 2009. 'Bile acid transporters', *Journal of Lipid Research*, 50: 2340-57.
- Denson, L. A., E. Sturm, W. Echevarria, T. L. Zimmerman, M. Makishima, D. J. Mangelsdorf, and S. J. Karpen. 2001. 'The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp', *Gastroenterology*, 121: 140-7.
- Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten, Medizin Deutsche Gesellschaft für Innere, M. Crohn Colitis ulcerosa Vereinigung Deutsche, V. Deutsche Leberhilfe e, Medizin Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der, Verfahren Deutsche Gesellschaft für Endoskopie und Bildgebende, Jugendmedizin Deutsche Gesellschaft für Kinder- und, Gastroenterologie Gesellschaft für Padiatrische, Rheumatologie Deutsche Gesellschaft für, Röntgengesellschaft Deutsche, Transplantationsgesellschaft Deutsche, Pathologen Deutsche Gesellschaft für Pathologie und Bundesverband Deutscher, Gastroenterologie Österreichische Gesellschaft für, Gesellschaft Schweizer Gastroenterologische, Authors, Collaborators, and durch Externe Begutachtung. 2017. '[Practice guideline autoimmune liver diseases - AWMF-Reg. No. 021-27]', *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 55: 1135-226.
- Deutschmann, K., M. Reich, C. Klindt, C. Droge, L. Spomer, D. Haussinger, and V. Keitel. 2018. 'Bile acid receptors in the biliary tree: TGR5 in physiology and disease', *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1864: 1319-25.
- Doring, B., T. Lutteke, J. Geyer, and E. Petzinger. 2012. 'The SLC10 carrier family: transport functions and molecular structure', *Curr Top Membr*, 70: 105-68.
- Duboc, H., Y. Tache, and A. F. Hofmann. 2014. 'The bile acid TGR5 membrane receptor: from basic research to clinical application', *Digestive and Liver Disease*, 46: 302-12.
- Duboc, H., G. Tolstanova, P. Q. Yuan, V. Wu, I. Kaji, M. Biraud, Y. Akiba, J. Kaunitz, M. Million, Y. Tache, and M. Larauche. 2016. 'Reduction of epithelial secretion in male rat distal colonic mucosa by bile acid receptor TGR5 agonist, INT-777: role of submucosal neurons', *Neurogastroenterology and Motility*, 28: 1663-76.

- Dyson, J. K., U. Beuers, D. E. J. Jones, A. W. Lohse, and M. Hudson. 2018. 'Primary sclerosing cholangitis', *Lancet*, 391: 2547-59.
- Eaton, J. E., J. A. Talwalkar, K. N. Lazaridis, G. J. Gores, and K. D. Lindor. 2013. 'Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management', *Gastroenterology*, 145: 521-36.
- Elferink, R. P., G. N. Tytgat, and A. K. Groen. 1997. 'Hepatic canalicular membrane 1: The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport', *FASEB Journal*, 11: 19-28.
- Ezhilarasan, D. 2020. 'Endothelin-1 in portal hypertension: The intricate role of hepatic stellate cells', *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*: 1535370220949148.
- Ferrari, C., A. Macchiarulo, G. Costantino, and R. Pellicciari. 2006. 'Pharmacophore model for bile acids recognition by the FPR receptor', *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 20: 295-303.
- Fickert, P., A. Fuchsbichler, H. U. Marschall, M. Wagner, G. Zollner, R. Krause, K. Zatloukal, H. Jaeschke, H. Denk, and M. Trauner. 2006. 'Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice', *American Journal of Pathology*, 168: 410-22.
- Fickert, P., U. Stöger, A. Fuchsbichler, T. Moustafa, H. U. Marschall, A. H. Weiglein, O. Tsybrovskyy, H. Jaeschke, K. Zatloukal, H. Denk, and M. Trauner. 2007. 'A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis', *American Journal of Pathology*, 171: 525-36.
- Fickert, Peter, Andrea Fuchsbichler, Martin Wagner, Gernot Zollner, Arthur Kaser, Herbert Tilg, Robert Krause, Frank Lammert, Cord Langner, Kurt Zatloukal, Hanns-Ulrich Marschall, Helmut Denk, and Michael Trauner. 2004. 'Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice', *Gastroenterology*, 127: 261-74.
- Forman, B. M., E. Goode, J. Chen, A. E. Oro, D. J. Bradley, T. Perlmann, D. J. Noonan, L. T. Burka, T. McMorris, W. W. Lamph, R. M. Evans, and C. Weinberger. 1995. 'Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites', *Cell*, 81: 687-93.
- Gao, B., W. I. Jeong, and Z. Tian. 2008. 'Liver: An organ with predominant innate immunity', *Hepatology*, 47: 729-36.
- Geerts, A. M., E. Vanheule, M. Praet, H. Van Vlierberghe, M. De Vos, and I. Colle. 2008. 'Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation', *International Journal of Experimental Pathology*, 89: 251-63.
- Gilat, T., and G. J. Somjen. 1996. 'Phospholipid vesicles and other cholesterol carriers in bile', *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286: 95-115.
- Gong, Y. Z., E. T. Everett, D. A. Schwartz, J. S. Norris, and F. A. Wilson. 1994. 'Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 4741-5.
- Goodwin, B., S. A. Jones, R. R. Price, M. A. Watson, D. D. McKee, L. B. Moore, C. Galardi, J. G. Wilson, M. C. Lewis, M. E. Roth, P. R. Maloney, T. M. Willson, and S. A. Kliewer. 2000. 'A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis', *Molecular Cell*, 6: 517-26.
- Graf, G. A., L. Yu, W. P. Li, R. Gerard, P. L. Tuma, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2003. 'ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 48275-82.

- Gregor, Michael, and Wolfgang Stremmel. 2013. *Pschyrembel Gastroenterologie* (De Gruyter).
- Guan, Y., A. J. Watson, A. M. Marchiando, E. Bradford, L. Shen, J. R. Turner, and M. H. Montrose. 2011. 'Redistribution of the tight junction protein ZO-1 during physiological shedding of mouse intestinal epithelial cells', *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 300: C1404-14.
- Guo, G. L., and J. Y. L. Chiang. 2020. 'Is CYP2C70 the key to new mouse models to understand bile acids in humans?', *J Lipid Res*, 61: 269-71.
- Hagenbuch, B., and C. Gui. 2008. 'Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family', *Xenobiotica*, 38: 778-801.
- Hamilton, J. P., G. Xie, J. P. Raufman, S. Hogan, T. L. Griffin, C. A. Packard, D. A. Chatfield, L. R. Hagey, J. H. Steinbach, and A. F. Hofmann. 2007. 'Human cecal bile acids: concentration and spectrum', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293: G256-63.
- Häussinger, Dieter. 2018. *Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie* (De Gruyter).
- Herold, Gerd. 2021. *Innere Medizin : eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2021 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis* (Gerd Herold: Köln).
- Hirschfield, G. M., T. H. Karlsen, K. D. Lindor, and D. H. Adams. 2013. 'Primary sclerosing cholangitis', *Lancet*, 382: 1587-99.
- Hofmann, A. F. 1999a. 'Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly', *News in Physiological Sciences*, 14: 24-29.
- . 1999b. 'The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease', *Archives of Internal Medicine*, 159: 2647-58.
- Hofmann, A. F., and L. R. Hagey. 2014. 'Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades', *Journal of Lipid Research*, 55: 1553-95.
- Hofmann, Alan F., and Karol J. Mysels. 1987. 'Bile salts as biological surfactants', *Colloids and Surfaces*, 30: 145-73.
- Holt, J. A., G. Luo, A. N. Billin, J. Bisi, Y. Y. McNeill, K. F. Kozarsky, M. Donahee, D. Y. Wang, T. A. Mansfield, S. A. Kliewer, B. Goodwin, and S. A. Jones. 2003. 'Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis', *Genes and Development*, 17: 1581-91.
- Hov, J. R., V. Keitel, J. K. Laerdahl, L. Spomer, E. Ellinghaus, A. ElSharawy, E. Melum, K. M. Boberg, T. Manke, T. Balschun, C. Schramm, A. Bergquist, T. Weismüller, D. Gotthardt, C. Rust, L. Henckaerts, C. M. Onnie, R. K. Weersma, M. Sterneck, A. Teufel, H. Runz, A. Stiehl, C. Y. Ponsioen, C. Wijmenga, M. H. Vatn, Ibsen Study Group, P. C. Stokkers, S. Vermeire, C. G. Mathew, B. A. Lie, U. Beuers, M. P. Manns, S. Schreiber, E. Schrumpf, D. Häussinger, A. Franke, and T. H. Karlsen. 2010. 'Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis', *PloS One*, 5: e12403.
- Hov, J. R., V. Keitel, J. K. Laerdahl, L. Spomer, E. Ellinghaus, A. ElSharawy, E. Melum, K. M. Boberg, T. Manke, T. Balschun, C. Schramm, A. Bergquist, T. Weismüller, D. Gotthardt, C. Rust, L. Henckaerts, C. M. Onnie, R. K. Weersma, M. Sterneck, A. Teufel, H. Runz, A. Stiehl, C. Y. Ponsioen, C. Wijmenga, M. H. Vatn, P. C. Stokkers, S. Vermeire, C. G. Mathew, B. A. Lie, U. Beuers, M. P. Manns, S. Schreiber, E. Schrumpf, D. Häussinger, A. Franke, and T. H. Karlsen. 2010. 'Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis', *PloS One*, 5: e12403.

- Hruz, P., C. Zimmermann, H. Gutmann, L. Degen, U. Beuers, L. Terracciano, J. Drewe, and C. Beglinger. 2006. 'Adaptive regulation of the ileal apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) in patients with obstructive cholestasis', *Gut*, 55: 395-402.
- Huang, L., A. Zhao, J. L. Lew, T. Zhang, Y. Hrywna, J. R. Thompson, N. de Pedro, I. Royo, R. A. Blevins, F. Pelaez, S. D. Wright, and J. Cui. 2003. 'Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 51085-90.
- Huang, W., K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang, and D. D. Moore. 2006. 'Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration', *Science*, 312: 233-6.
- Hunt, R. D., G. A. Leveille, and H. E. Sauberlich. 1964. 'Dietary Bile Acids and Lipid Metabolism. Iii. Effects of Lithocholic Acid in Mammalian Species', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 115: 277-80.
- Inagaki, T., M. Choi, A. Moschetta, L. Peng, C. L. Cummins, J. G. McDonald, G. Luo, S. A. Jones, B. Goodwin, J. A. Richardson, R. D. Gerard, J. J. Repa, D. J. Mangelsdorf, and S. A. Kliewer. 2005. 'Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis', *Cell Metabolism*, 2: 217-25.
- Jung, D., B. Hagenbuch, M. Fried, P. J. Meier, and G. A. Kullak-Ublick. 2004. 'Role of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors in regulating the human, mouse, and rat NTCP gene', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286: G752-61.
- Jung, D., B. Hagenbuch, L. Gresh, M. Pontoglio, P. J. Meier, and G. A. Kullak-Ublick. 2001. 'Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha', *Journal of Biological Chemistry*, 276: 37206-14.
- Kakis, G., M. J. Phillips, and I. M. Yousef. 1980. 'The respective roles of membrane cholesterol and of sodium potassium adenosine triphosphatase in the pathogenesis of lithocholate-induced cholestasis', *Laboratory Investigation*, 43: 73-81.
- Kakis, G., and I. M. Yousef. 1978. 'Pathogenesis of lithocholate- and tauroolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats', *Gastroenterology*, 75: 595-607.
- Kamisako, T., I. Leier, Y. Cui, J. Konig, U. Buchholz, J. Hummel-Eisenbeiss, and D. Keppler. 1999. 'Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2', *Hepatology*, 30: 485-90.
- Karlsen, T. H., T. Folseraas, D. Thorburn, and M. Vesterhus. 2017. 'Primary sclerosing cholangitis - a comprehensive review', *Journal of Hepatology*, 67: 1298-323.
- Kast, H. R., B. Goodwin, P. T. Tarr, S. A. Jones, A. M. Anisfeld, C. M. Stoltz, P. Tontonoz, S. Kliewer, T. M. Willson, and P. A. Edwards. 2002. 'Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor', *Journal of Biological Chemistry*, 277: 2908-15.
- Katsuma, S., A. Hirasawa, and G. Tsujimoto. 2005. 'Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329: 386-90.
- Kawamata, Y., R. Fujii, M. Hosoya, M. Harada, H. Yoshida, M. Miwa, S. Fukusumi, Y. Habata, T. Itoh, Y. Shintani, S. Hinuma, Y. Fujisawa, and M. Fujino. 2003. 'A G protein-coupled receptor responsive to bile acids', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 9435-40.

- Keitel, V., K. Cupisti, C. Ullmer, W. T. Knoefel, R. Kubitz, and D. Haussinger. 2009. 'The membrane-bound bile acid receptor TGR5 is localized in the epithelium of human gallbladders', *Hepatology*, 50: 861-70.
- Keitel, V., M. Donner, S. Winandy, R. Kubitz, and D. Haussinger. 2008. 'Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372: 78-84.
- Keitel, V., C. Dröge, and D. Häussinger. 2019. 'Targeting FXR in Cholestasis', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 256: 299-324.
- Keitel, V., B. Gorg, H. J. Bidmon, I. Zemtsova, L. Spomer, K. Zilles, and D. Haussinger. 2010. 'The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain', *Glia*, 58: 1794-805.
- Keitel, V., and D. Haussinger. 2013. 'TGR5 in cholangiocytes', *Current Opinion in Gastroenterology*, 29: 299-304.
- . 2018. 'Role of TGR5 (GPBAR1) in Liver Disease', *Seminars in Liver Disease*, 38: 333-39.
- Keitel, V., R. Kubitz, and D. Haussinger. 2008. 'Endocrine and paracrine role of bile acids', *World Journal of Gastroenterology*, 14: 5620-9.
- Keitel, V., M. Reich, and D. Haussinger. 2015. 'TGR5: pathogenetic role and/or therapeutic target in fibrosing cholangitis?', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 48: 218-25.
- Keitel, V., R. Reinehr, P. Gatsios, C. Rupprecht, B. Gorg, O. Selbach, D. Haussinger, and R. Kubitz. 2007. 'The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells', *Hepatology*, 45: 695-704.
- Keitel, V., L. Spomer, J. J. Marin, C. Williamson, V. Geenes, R. Kubitz, D. Haussinger, and R. I. Macias. 2013. 'Effect of maternal cholestasis on TGR5 expression in human and rat placenta at term', *Placenta*, 34: 810-6.
- Keitel, V., C. Ullmer, and D. Haussinger. 2010. 'The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes', *Biol Chem*, 391: 785-9.
- Kiesslich, R., C. A. Duckworth, D. Moussata, A. Gloeckner, L. G. Lim, M. Goetz, D. M. Pritchard, P. R. Galle, M. F. Neurath, and A. J. Watson. 2012. 'Local barrier dysfunction identified by confocal laser endomicroscopy predicts relapse in inflammatory bowel disease', *Gut*, 61: 1146-53.
- Kinnman, N., R. Hultcrantz, V. Barbu, C. Rey, D. Wendum, R. Poupon, and C. Housset. 2000. 'PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury', *Laboratory Investigation*, 80: 697-707.
- Kliwer, S. A., and D. J. Mangelsdorf. 2015. 'Bile Acids as Hormones: The FXR-FGF15/19 Pathway', *Digestive Diseases*, 33: 327-31.
- Klindt, C., M. Reich, B. Hellwig, J. Stindt, J. Rahnenfuhrer, J. G. Hengstler, K. Kohrer, K. Schoonjans, D. Haussinger, and V. Keitel. 2019. 'The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor TGR5 (Gpbar1) Modulates Endothelin-1 Signaling in Liver', *Cells*, 8.
- Kountouras, J., B. H. Billing, and P. J. Scheuer. 1984. 'Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat', *British Journal of Experimental Pathology*, 65: 305-11.
- Kubitz, R., G. Sufels, T. Kuhlkamp, R. Kolling, and D. Haussinger. 2004. 'Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase', *Gastroenterology*, 126: 541-53.
- Kullak-Ublick, G. A., B. Stieger, B. Hagenbuch, and P. J. Meier. 2000. 'Hepatic transport of bile salts', *Seminars in Liver Disease*, 20: 273-92.

- Kumar, D. P., S. Rajagopal, S. Mahavadi, F. Mirshahi, J. R. Grider, K. S. Murthy, and A. J. Sanyal. 2012. 'Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427: 600-5.
- Laukoetter, M. G., M. Bruewer, and A. Nusrat. 2006. 'Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex', *Current Opinion in Gastroenterology*, 22: 85-9.
- Lavoie, B., O. B. Balemba, C. Godfrey, C. A. Watson, G. Vassileva, C. U. Corvera, M. T. Nelson, and G. M. Mawe. 2010. 'Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels', *Journal of Physiology*, 588: 3295-305.
- Layden, T. J., Schwarz, and J. L. Boyer. 1975. 'Scanning electron microscopy of the rat liver. Studies of the effect of tauroolithocholate and other models of cholestasis', *Gastroenterology*, 69: 724-38.
- Lindkvist, B., M. Benito de Valle, B. Gullberg, and E. Björnsson. 2010. 'Incidence and prevalence of primary sclerosing cholangitis in a defined adult population in Sweden', *Hepatology*, 52: 571-7.
- Lindor, K. D. 1997. 'Ursodiol for primary sclerosing cholangitis. Mayo Primary Sclerosing Cholangitis-Ursodeoxycholic Acid Study Group', *New England Journal of Medicine*, 336: 691-5.
- Ludwig, J., E. L. Ritman, N. F. LaRusso, P. F. Sheedy, and G. Zumpe. 1998. 'Anatomy of the human biliary system studied by quantitative computer-aided three-dimensional imaging techniques', *Hepatology*, 27: 893-9.
- Makishima, M., T. T. Lu, W. Xie, G. K. Whitfield, H. Domoto, R. M. Evans, M. R. Haussler, and D. J. Mangelsdorf. 2002. 'Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor', *Science*, 296: 1313-6.
- Makishima, M., A. Y. Okamoto, J. J. Repa, H. Tu, R. M. Learned, A. Luk, M. V. Hull, K. D. Lustig, D. J. Mangelsdorf, and B. Shan. 1999. 'Identification of a nuclear receptor for bile acids', *Science*, 284: 1362-5.
- Marin, J. J., R. I. Macias, O. Briz, J. M. Banales, and M. J. Monte. 2015. 'Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology', *Curr Drug Metab*, 17: 4-29.
- Martin, G. G., B. P. Atshaves, A. L. McIntosh, J. T. Mackie, A. B. Kier, and F. Schroeder. 2005. 'Liver fatty-acid-binding protein (L-FABP) gene ablation alters liver bile acid metabolism in male mice', *Biochemical Journal*, 391: 549-60.
- Martínez-Sánchez, L. D. C., P. A. Ngo, R. Pradhan, L. S. Becker, D. Boehringer, D. Soteriou, M. Kubankova, C. Schweitzer, T. Koch, V. Thonn, L. Erkert, I. Stolzer, C. Günther, C. Becker, B. Weigmann, M. Klewer, C. Daniel, K. Amann, S. Tenzer, R. Atreya, M. Bergo, C. Brakebusch, A. J. M. Watson, J. Guck, B. Fabry, I. Atreya, M. F. Neurath, and R. López-Posadas. 2023. 'Epithelial RAC1-dependent cytoskeleton dynamics controls cell mechanics, cell shedding and barrier integrity in intestinal inflammation', *Gut*, 72: 275-94.
- Maruyama, T., Y. Miyamoto, T. Nakamura, Y. Tamai, H. Okada, E. Sugiyama, T. Nakamura, H. Itadani, and K. Tanaka. 2002. 'Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298: 714-9.
- Maruyama, T., K. Tanaka, J. Suzuki, H. Miyoshi, N. Harada, T. Nakamura, Y. Miyamoto, A. Kanatani, and Y. Tamai. 2006. 'Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice', *Journal of Endocrinology*, 191: 197-205.
- Masyuk, A. I., B. Q. Huang, B. N. Radtke, G. B. Gajdos, P. L. Splinter, T. V. Masyuk, S. A. Gradilone, and N. F. LaRusso. 2013. 'Ciliary subcellular localization of

- TGR5 determines the cholangiocyte functional response to bile acid signaling', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304: G1013-24.
- Mekhljian, H. S., S. F. Phillips, and A. F. Hofmann. 1979. 'Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man', *Digestive Diseases and Sciences*, 24: 545-50.
- Miethke, A. G., W. Zhang, J. Simmons, A. E. Taylor, T. Shi, S. K. Shanmukhappa, R. Karns, S. White, A. G. Jegga, C. S. Lages, S. Nkinin, B. T. Keller, and K. D. Setchell. 2016. 'Pharmacological inhibition of apical sodium-dependent bile acid transporter changes bile composition and blocks progression of sclerosing cholangitis in multidrug resistance 2 knockout mice', *Hepatology*, 63: 512-23.
- Mikkelsen, H. B., R. Mirsky, K. R. Jessen, and L. Thuneberg. 1988. 'Macrophage-like cells in muscularis externa of mouse small intestine: immunohistochemical localization of F4/80, M1/70, and Ia-antigen', *Cell and Tissue Research*, 252: 301-6.
- Mittermayer, F., E. Caveney, C. De Oliveira, L. Gourgiotis, M. Puri, L. J. Tai, and J. R. Turner. 2015. 'Addressing unmet medical needs in type 2 diabetes: a narrative review of drugs under development', *Current Diabetes Reviews*, 11: 17-31.
- Miyai, K., A. L. Richardson, W. Mayr, and N. B. Javitt. 1977. 'Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3beta-hydroxy-5-cholenoic, cholic, and dehydrocholic acids', *Laboratory Investigation*, 36: 249-58.
- Mizoguchi, A. 2012. 'Animal models of inflammatory bowel disease', *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 105: 263-320.
- Modica, S., M. Petruzzelli, E. Bellafante, S. Murzilli, L. Salvatore, N. Celli, G. Di Tullio, G. Palasciano, T. Moustafa, E. Halilbasic, M. Trauner, and A. Moschetta. 2012. 'Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis', *Gastroenterology*, 142: 355-65 e1-4.
- Moustafa, T., P. Fickert, C. Magnes, C. Guelly, A. Thueringer, S. Frank, D. Kratky, W. Sattler, H. Reicher, F. Sinner, J. Gumhold, D. Silbert, G. Fauler, G. Höfler, A. Lass, R. Zechner, and M. Trauner. 2012. 'Alterations in lipid metabolism mediate inflammation, fibrosis, and proliferation in a mouse model of chronic cholestatic liver injury', *Gastroenterology*, 142: 140-51.e12.
- Myant, N. B., and K. A. Mitropoulos. 1977. 'Cholesterol 7 alpha-hydroxylase', *Journal of Lipid Research*, 18: 135-53.
- Ngo, P. A., M. F. Neurath, and R. López-Posadas. 2022. 'Impact of Epithelial Cell Shedding on Intestinal Homeostasis', *International Journal of Molecular Sciences*, 23.
- Nies, A. T., and D. Keppler. 2007. 'The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2)', *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 453: 643-59.
- Nishimura, T., Y. Utsunomiya, M. Hoshikawa, H. Ohuchi, and N. Itoh. 1999. 'Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain', *Biochim Biophys Acta*, 1444: 148-51.
- Orozco, S., and A. Oberst. 2017. 'RIPK3 in cell death and inflammation: the good, the bad, and the ugly', *Immunological Reviews*, 277: 102-12.
- Oude Elferink, R. P., and C. C. Paulusma. 2007. 'Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein)', *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology*, 453: 601-10.
- Out, C., J. V. Patankar, M. Doktorova, M. Boesjes, T. Bos, S. de Boer, R. Havinga, H. Wolters, R. Boverhof, T. H. van Dijk, A. Smoczek, A. Bleich, V. Sachdev, D. Kratky, F. Kuipers, H. J. Verkade, and A. K. Groen. 2015. 'Gut microbiota inhibit

- Asbt-dependent intestinal bile acid reabsorption via Gata4', *Journal of Hepatology*, 63: 697-704.
- Ozeki, M., W. Aini, A. Miyagawa-Hayashino, and K. Tamaki. 2019. 'Prevention of Cell Growth by Suppression of Villin Expression in Lithocholic Acid-Stimulated HepG2 Cells', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 67: 129-41.
- Palmer, R. H., and Z. Ruban. 1966. 'Production of bile duct hyperplasia and gallstones by lithocholic acid', *Journal of Clinical Investigation*, 45: 1255-67.
- Paulusma, C. C., D. R. de Waart, C. Kunne, K. S. Mok, and R. P. Elferink. 2009. 'Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content', *Journal of Biological Chemistry*, 284: 9947-54.
- Péan, N., I. Doignon, I. Garcin, A. Besnard, B. Julien, B. Liu, S. Branchereau, A. Spraul, C. Guettier, L. Humbert, K. Schoonjans, D. Rainteau, and T. Tordjmann. 2013. 'The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice', *Hepatology*, 58: 1451-60.
- Pols, T. W., M. Nomura, T. Harach, G. Lo Sasso, M. H. Oosterveer, C. Thomas, G. Rizzo, A. Gioiello, L. Adorini, R. Pellicciari, J. Auwerx, and K. Schoonjans. 2011. 'TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading', *Cell Metabolism*, 14: 747-57.
- Pols, T. W., L. G. Noriega, M. Nomura, J. Auwerx, and K. Schoonjans. 2011a. 'The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation', *Journal of Hepatology*, 54: 1263-72.
- . 2011b. 'The bile acid membrane receptor TGR5: a valuable metabolic target', *Digestive Diseases*, 29: 37-44.
- Poole, D. P., C. Godfrey, F. Cattaruzza, G. S. Cottrell, J. G. Kirkland, J. C. Pelayo, N. W. Bunnett, and C. U. Corvera. 2010. 'Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system', *Neurogastroenterology and Motility*, 22: 814-25, e227-8.
- Popov, Y., D. Y. Sverdlov, K. R. Bhaskar, A. K. Sharma, G. Millonig, E. Patsenker, S. Krahenbuhl, L. Krahenbuhl, and D. Schuppan. 2010. 'Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298: G323-34.
- Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. 'The liver as an immunological organ', *Hepatology*, 43: S54-62.
- Raufman, J. P., Y. Chen, P. Zimniak, and K. Cheng. 2002. 'Deoxycholic acid conjugates are muscarinic cholinergic receptor antagonists', *Pharmacology*, 65: 215-21.
- Razumilava, N., G. J. Gores, and K. D. Lindor. 2011. 'Cancer surveillance in patients with primary sclerosing cholangitis', *Hepatology*, 54: 1842-52.
- Reich, M., K. Deutschmann, A. Sommerfeld, C. Klindt, S. Kluge, R. Kubitz, C. Ullmer, W. T. Knoefel, D. Herebian, E. Mayatepek, D. Haussinger, and V. Keitel. 2016. 'TGR5 is essential for bile acid-dependent cholangiocyte proliferation in vivo and in vitro', *Gut*, 65: 487-501.
- Reich, M., L. Spomer, C. Klindt, K. Fuchs, J. Stindt, K. Deutschmann, J. Hohne, E. Liaskou, J. R. Hov, T. H. Karlsen, U. Beuers, J. Verheij, S. Ferreira-Gonzalez, G. Hirschfield, S. J. Forbes, C. Schramm, I. Esposito, D. Nierhoff, P. Fickert, C. D. Fuchs, M. Trauner, M. Garcia-Beccaria, G. Gabernet, S. Nahnsen, J. P. Mallm, M. Vogel, K. Schoonjans, T. Lautwein, K. Kohrer, D. Haussinger, T. Luedde, M. Heikenwalder, and V. Keitel. 2021. 'Downregulation of TGR5

- (GPBAR1) in biliary epithelial cells contributes to the pathogenesis of sclerosing cholangitis', *Journal of Hepatology*.
- Reinehr, R., and D. Haussinger. 2004. 'Inhibition of bile salt-induced apoptosis by cyclic AMP involves serine/threonine phosphorylation of CD95', *Gastroenterology*, 126: 249-62.
- Rembacz, K. P., J. Woudenberg, M. Hoekstra, E. Z. Jonkers, F. A. van den Heuvel, M. Buist-Homan, T. E. Woudenberg-Vrenken, J. Rohacova, M. L. Marin, M. A. Miranda, H. Moshage, F. Stellaard, and K. N. Faber. 2010. 'Unconjugated bile salts shuttle through hepatocyte peroxisomes for taurine conjugation', *Hepatology*, 52: 2167-76.
- Riede, Ursus-Nikolaus, Martin Werner, and Nikolaus Freudenberg. 2009. *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie* (Springer Medizin Verlag: Heidelberg).
- Rius, M., A. T. Nies, J. Hummel-Eisenbeiss, G. Jedlitschky, and D. Keppler. 2003. 'Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane', *Hepatology*, 38: 374-84.
- Robine, S., C. Huet, R. Moll, C. Sahuquillo-Merino, E. Coudrier, A. Zweibaum, and D. Louvard. 1985. 'Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells?', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 8488-92.
- Russell, D. W. 2003. 'The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis', *Annual Review of Biochemistry*, 72: 137-74.
- Rygiel, K. A., H. Robertson, H. L. Marshall, M. Pekalski, L. Zhao, T. A. Booth, D. E. Jones, A. D. Burt, and J. A. Kirby. 2008. 'Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease', *Laboratory Investigation*, 88: 112-23.
- Sato, H., A. Macchiarulo, C. Thomas, A. Gioiello, M. Une, A. F. Hofmann, R. Saladin, K. Schoonjans, R. Pellicciari, and J. Auwerx. 2008. 'Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies', *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 1831-41.
- Seward, D. J., A. S. Koh, J. L. Boyer, and N. Ballatori. 2003. 'Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 27473-82.
- Shin, D. J., and L. Wang. 2019. 'Bile Acid-Activated Receptors: A Review on FXR and Other Nuclear Receptors', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 256: 51-72.
- Shneider, B. L., P. A. Dawson, D. M. Christie, W. Hardikar, M. H. Wong, and F. J. Suchy. 1995. 'Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter', *Journal of Clinical Investigation*, 95: 745-54.
- Siddiqui, U. D., S. Banerjee, B. Barth, S. S. Chauhan, K. T. Gottlieb, V. Konda, J. T. Maple, F. M. Murad, P. R. Pfau, D. K. Pleskow, J. L. Tokar, A. Wang, and S. A. Rodriguez. 2013. 'Tools for endoscopic stricture dilation', *Gastrointestinal Endoscopy*, 78: 391-404.
- Sinal, C. J., M. Tohkin, M. Miyata, J. M. Ward, G. Lambert, and F. J. Gonzalez. 2000. 'Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis', *Cell*, 102: 731-44.
- Singla, V., and J. F. Reiter. 2006. 'The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle', *Science*, 313: 629-33.

- Smit, J. J., A. H. Schinkel, R. P. Oude Elferink, A. K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, R. Ottenhoff, N. M. van der Lugt, M. A. van Roon, and et al. 1993. 'Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease', *Cell*, 75: 451-62.
- Song, K. H., T. Li, E. Owsley, S. Strom, and J. Y. Chiang. 2009. 'Bile acids activate fibroblast growth factor 19 signaling in human hepatocytes to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression', *Hepatology*, 49: 297-305.
- Soroka, C. J., M. K. Pate, and J. L. Boyer. 1999. 'Canalicular export pumps traffic with polymeric immunoglobulin A receptor on the same microtubule-associated vesicle in rat liver', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 26416-24.
- Sorrentino, G., A. Perino, E. Yildiz, G. El Alam, M. Bou Sleiman, A. Gioiello, R. Pellicciari, and K. Schoonjans. 2020. 'Bile Acids Signal via TGR5 to Activate Intestinal Stem Cells and Epithelial Regeneration', *Gastroenterology*, 159: 956-68.e8.
- Staudinger, J. L., B. Goodwin, S. A. Jones, D. Hawkins-Brown, K. I. MacKenzie, A. LaTour, Y. Liu, C. D. Klaassen, K. K. Brown, J. Reinhard, T. M. Willson, B. H. Koller, and S. A. Kliewer. 2001. 'The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 3369-74.
- Stolz, A., L. Hammond, H. Lou, H. Takikawa, M. Ronk, and J. E. Shively. 1993. 'cDNA cloning and expression of the human hepatic bile acid-binding protein. A member of the monomeric reductase gene family', *Journal of Biological Chemistry*, 268: 10448-57.
- Stolz, A., H. Takikawa, M. Ookhtens, and N. Kaplowitz. 1989. 'The role of cytoplasmic proteins in hepatic bile acid transport', *Annual Review of Physiology*, 51: 161-76.
- Stravitz, R. T., Y. P. Rao, Z. R. Vlahcevic, E. C. Gurley, W. D. Jarvis, and P. B. Hylemon. 1996. 'Hepatocellular protein kinase C activation by bile acids: implications for regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase', *American Journal of Physiology*, 271: G293-303.
- Sugiyama, Y., T. Yamada, and N. Kaplowitz. 1983. 'Newly identified bile acid binders in rat liver cytosol. Purification and comparison with glutathione S-transferases', *Journal of Biological Chemistry*, 258: 3602-7.
- Thomas, C., A. Gioiello, L. Noriega, A. Strehle, J. Oury, G. Rizzo, A. Macchiarulo, H. Yamamoto, C. Matak, M. Pruzanski, R. Pellicciari, J. Auwerx, and K. Schoonjans. 2009. 'TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis', *Cell Metabolism*, 10: 167-77.
- Thompson, R. J., H. Arnell, R. Artan, U. Baumann, P. L. Calvo, P. Czubkowski, B. Dalgic, L. D'Antiga, Ö Durmaz, B. Fischler, E. Gonzalès, T. Grammatikopoulos, G. Gupte, W. Hardikar, R. H. J. Houwen, B. M. Kamath, S. J. Karpen, L. Kjems, F. Lacaille, A. Lachaux, E. Lainka, C. L. Mack, J. P. Mattsson, P. McKiernan, H. Özen, S. R. Rajwal, B. Roquelaure, M. Shagrani, E. Shteyer, N. Soufi, E. Sturm, M. E. Tessier, H. J. Verkade, and P. Horn. 2022. 'Odevixibat treatment in progressive familial intrahepatic cholestasis: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial', *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 7: 830-42.
- Tischendorf, J. J., H. Hecker, M. Krüger, M. P. Manns, and P. N. Meier. 2007. 'Characterization, outcome, and prognosis in 273 patients with primary sclerosing cholangitis: A single center study', *American Journal of Gastroenterology*, 102: 107-14.

- Trauner, M., and J. L. Boyer. 2003. 'Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation', *Physiological Reviews*, 83: 633-71.
- Tsukada, N., C. A. Ackerley, and M. J. Phillips. 1995. 'The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins', *Hepatology*, 21: 1106-13.
- Uriarte, I., M. G. Fernandez-Barrena, M. J. Monte, M. U. Latasa, H. C. Chang, S. Carotti, U. Vespasiani-Gentilucci, S. Morini, E. Vicente, A. R. Concepcion, J. F. Medina, J. J. Marin, C. Berasain, J. Prieto, and M. A. Avila. 2013. 'Identification of fibroblast growth factor 15 as a novel mediator of liver regeneration and its application in the prevention of post-resection liver failure in mice', *Gut*, 62: 899-910.
- Vassileva, G., A. Golovko, L. Markowitz, S. J. Abbondanzo, M. Zeng, S. Yang, L. Hoos, G. Tetzloff, D. Levitan, N. J. Murgolo, K. Keane, H. R. Davis, Jr., J. Hedrick, and E. L. Gustafson. 2006. 'Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation', *Biochemical Journal*, 398: 423-30.
- Vetrano, S., M. Rescigno, M. R. Cera, C. Correale, C. Rumio, A. Doni, M. Fantini, A. Sturm, E. Borroni, A. Repici, M. Locati, A. Malesci, E. Dejana, and S. Danese. 2008. 'Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease', *Gastroenterology*, 135: 173-84.
- Wang, H., J. Chen, K. Hollister, L. C. Sowers, and B. M. Forman. 1999. 'Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR', *Molecular Cell*, 3: 543-53.
- Wang, Y. D., W. D. Chen, D. Yu, B. M. Forman, and W. Huang. 2011. '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*, 54: 1421-32.
- Ward, J. B., M. S. Mroz, and S. J. Keely. 2013. 'The bile acid receptor, TGR5, regulates basal and cholinergic-induced secretory responses in rat colon', *Neurogastroenterology and Motility*, 25: 708-11.
- Watanabe, M., S. M. Houten, C. Matak, M. A. Christoffolete, B. W. Kim, H. Sato, N. Messaddeq, J. W. Harney, O. Ezaki, T. Kodama, K. Schoonjans, A. C. Bianco, and J. Auwerx. 2006. 'Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation', *Nature*, 439: 484-9.
- Weinman, S. A. 1997. 'Electrogenicity of Na(+)-coupled bile acid transporters', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 70: 331-40.
- Weinman, S. A., M. W. Carruth, and P. A. Dawson. 1998. 'Bile acid uptake via the human apical sodium-bile acid cotransporter is electrogenic', *Journal of Biological Chemistry*, 273: 34691-5.
- Wirtz, S., V. Popp, M. Kindermann, K. Gerlach, B. Weigmann, S. Fichtner-Feigl, and M. F. Neurath. 2017. 'Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation', *Nature Protocols*, 12: 1295-309.
- Wong, M. H., P. Oelkers, A. L. Craddock, and P. A. Dawson. 1994. 'Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter', *Journal of Biological Chemistry*, 269: 1340-7.
- Xiao, L., and G. Pan. 2017. 'An important intestinal transporter that regulates the enterohepatic circulation of bile acids and cholesterol homeostasis: The apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT)', *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 41: 509-15.
- Yu, L., R. E. Hammer, J. Li-Hawkins, K. Von Bergmann, D. Lutjohann, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2002. 'Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their

- crucial role in biliary cholesterol secretion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16237-42.
- Zhang, J. H., J. D. Nolan, S. L. Kennie, I. M. Johnston, T. Dew, P. H. Dixon, C. Williamson, and J. R. Walters. 2013. 'Potent stimulation of fibroblast growth factor 19 expression in the human ileum by bile acids', *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304: G940-8.
- Zhou, W. C., Q. B. Zhang, and L. Qiao. 2014. 'Pathogenesis of liver cirrhosis', *World Journal of Gastroenterology*, 20: 7312-24.
- Zietek, T., E. Rath, D. Haller, and H. Daniel. 2015. 'Intestinal organoids for assessing nutrient transport, sensing and incretin secretion', *Scientific Reports*, 5: 16831.
- Zucker, S. D., W. Goessling, and A. G. Hoppin. 1999. 'Unconjugated bilirubin exhibits spontaneous diffusion through model lipid bilayers and native hepatocyte membranes', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 10852-62.

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Enterohepatischer Kreislauf der Gallensalze	5
Abb. 2: Signalwege von TGR5	8
Abb. 3: FXR/FGF15 (= humanes FGF19) Signalweg	12
Abb. 4: TGR5 mRNA Expression im Dün- und Dickdarm der TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} und Wildtyp Mäuse	34
Abb. 5: Immunfluoreszenz Färbung von TGR5 und Villin im Jejunum	36
Abb. 6: Immunfluoreszenzfärbung TGR5 und F4/80 im Jejunum	37
Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung TGR5 und F4/80 in TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen mit Placebo (Chow) Fütterung im Jejunum, 64x Vergrößerung	38
Abb. 8: Histopathologische Untersuchungen des Dünndarms nach 84h Fütterung mit Placebo oder 1% LCA	39
Abb. 9: Immunfluoreszenz Färbung von JAM-A im Jejunum	41
Abb. 10: Immunfluoreszenz Färbung von JAM-A im terminalen Ileum	42
Abb. 11: Immunfluoreszenz Färbung Tight Junction ZO-2 im terminalen Ileum	44
Abb. 12: mRNA Expression von JAM-A und ZO-1 im Dünndarm	45
Abb. 13: Western Blot Untersuchung des Gallensalztransporters ASBT im Dünndarm	47
Abb. 14: mRNA Expression von ASBT im Dünndarm	48
Abb. 15: mRNA Expression von OST α /OST β im Dünndarm	49
Abb. 16: Relative FXR mRNA- und Proteinexpression im Dünndarm	50
Abb. 17: mRNA Expression von FGF15 im terminalen Ileum	51
Abb. 18: Analyse der Leberwerte im Serum der WT und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse nach 84h Placebo und 1% LCA Fütterung	53
Abb. 19: Histopathologische Auswertung der Lebern der TGR5 WT und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen	54
Abb. 20: Portale Hypertension und Fibrosemarker in der Leber von Wildtyp und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen	55
Abb. 21: Kollagenexpression in der Leber auf Protein- und mRNA-Ebene	56
Abb. 22: Immunhistologische Auswertung und Western Blot spezifischer Proliferations- und Apoptosemarker in den Lebern der WT und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen	57
Abb. 23: TGR5 und Villin in Gallengängen der Leber von TGR5 WT und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäusen	59
Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbung von TGR5 und des Cholangiozytenmarkers CK19 in Mauslebern	60
Abb. 25: Immunfluoreszenzfärbung TGR5 und α -Tubulin in isolierten murinen Cholangiozyten	61
Abb. 26: TGR5 mRNA Level in der Leber nach LCA Fütterung	63
Abb. 27: TGR5 und CK-19 mRNA Expression in biliary epithel cells (BEC) und non-parenchymal cells (NPC) ...	64
Abb. 28: Expression von FXR auf Protein- und mRNA Ebene in der Leber	65
Abb. 29: Relative mRNA Expression von CYP7a1, SHP und FGFR4 in der Leber	67
Abb. 30: Relative mRNA Expression basolateraler Gallensalztransporter im Hepatozyten	68
Abb. 31: Relative mRNA Expression apikaler Gallensalztransporter im Hepatozyten	69
Abb. 32: Cholestaseparameter im Serum der Wildtyp und TGR5 ^{Vil-Cre(-/-)} Mäuse	70
Abb. 33: Histopathologische Untersuchung der extrahepatischen Gallengänge mit Placebo und 1% LCA Fütterung	72

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Proteinanalytik.....	25
Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Färbungen.....	29
Tabelle 3: Verwendete TaqMan Sonden der Firma ABI Applied Biosystems, Foster City, USA	31

8. DANKSAGUNG

Frau Professor Dr. Verena Keitel danke ich für die großartige Unterstützung dieser Arbeit. Ihr Enthusiasmus, ihr nicht endender Ideenreichtum und ihr wertvoller Input für meine Forschungsarbeiten haben die Dissertation in dieser Form erst möglich gemacht. Zudem danke ich ihr für die Erstbegutachtung meiner Arbeit und für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in den Laboratorien der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie am Universitätsklinikum Düsseldorf durchführen zu dürfen.

Mein besonderer Dank geht zudem an Frau Dr. Maria Reich für die wundervolle Betreuung im und außerhalb des Labors. Ihre Begeisterung für die Forschung und das experimentelle Arbeiten hat mich motiviert und mir auch in schwierigen Phasen stets eine Perspektive gegeben. Dem gesamten Team der Experimentellen Hepatologie des Universitätsklinikum Düsseldorf und des SFB 974 danke ich für die tolle Zeit und hervorragende Zusammenarbeit im Labor.

Mein Dank gilt Frau Paulina Philippski und Stefanie Lindner für die ausgezeichnete technische Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Dr. Svenja Caspers danke ich für die Zweitbegutachtung meiner Arbeit. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner wundervollen Familie für die liebevolle und immer tatkräftige Unterstützung in jeder Lebensphase. Ohne Sie wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Eidesstattliche Versicherung (gem. § 7 (2) PO)

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Inhalte wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zum Nichtbestehen der betreffenden Promotionsleistung führt und die weitere Folge hat, dass die Fakultät über die Entziehung des Doktorgrades entscheidet (§ 16 Promotionsordnung). Die strafrechtlichen Konsequenzen einer falschen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt (§156 StGB). Des Weiteren kann gemäß

§ 63 Absatz 5 HG eine Zuwiderhandlung mit einer Geldbuße von bis zu 50.000 € geahndet werden. Der/Die Antragsteller/in erklärt sich mit einer Überprüfung der Dissertationsschrift mittels einer Plagiatsoftware einverstanden.

Ich versichere weiterhin, dass alle von mir gemachten Angaben wahrheitsgemäß und vollständig sind.

Ort, Datum

Sara Magdalena Naisar